

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

“RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA DE PRECURSORES DA FENILALANINA  
OBTIDOS VIA CATÁLISE DE TRANSFERÊNCIA DE FASE (CTF).”

*Marcos Reinaldo da Silva*

Dissertação de Mestrado

*Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos*

Orientador

MARCOS REINALDO DA SILVA

“RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA DE PRECURSORES DA FENILALANINA  
OBTIDOS VIA CATÁLISE DE TRANSFERÊNCIA DE FASE (CTF).”

Dissertação submetida à Coordenação do  
Curso de Pós-Graduação em Química, da  
Universidade Federal do Ceará, como  
requisito parcial para obtenção do grau de  
Mestre em Química. Área de  
concentração: Química Orgânica  
Orientador: Prof. Dr. Marcos Carlos de  
Mattos.

FORTALEZA

2009

S581r

Silva, Marcos Reinaldo da

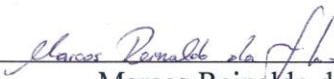
“Resolução cinética enzimática de precursores da fenilalanina obtidos via catálise de transferência de fase (CTF).” / Marcos Reinaldo da Silva. – Fortaleza: [s.n.], 2009. 104f. :il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.  
Departamento de Química Orgânica e Inorgânica.

Orientador: Dr. Marcos Carlos de Mattos


1. Química Orgânica – Síntese . I. Título. CDD. 547.2


Esta Dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.


  
\_\_\_\_\_  
Marcos Reinaldo da Silva

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 14/08/2009

EXAMINADORES:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos  
Universidade Federal do Ceará – UFC

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Nilce Viana G. P. de S. Brasil  
Universidade Federal do Ceará – UFC

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Vicente Gotor-Fernández  
Universidade de Oviedo – UNIOVE-ES

Este trabalho foi orientado pelo Professor **Dr. Marcos Carlos de Mattos** do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC).

***Dedico essa dissertação aos meus pais, João de Oliveira da Silva e Ana Cleide da Silva, que me deram o dom da vida, como também pelo amor e incentivo para chegar até aqui. Agradeço a Deus pela força e por sua graça. Ao Professor Dr. Marcos Carlos de Mattos serei eternamente grato pela amizade, seus incentivos, críticas (sempre construtivas), seu apoio, conhecimentos transmitidos e orientação segura no desenvolvimento deste Trabalho.***

***“O sucesso é composto de 1% de  
inspiração e 99% de transpiração.”***

***Thomas Edson***

## AGRADECIMENTOS

Estou muito grato aqueles que diretamente e indiretamente me ajudaram na conclusão desta dissertação de mestrado, dando junto comigo um grande passo em minha vida.

Inicialmente a Deus, pois Nele encontrei conforto e apoio nos momentos de apreensão e angústia que passei no desenrolar deste trabalho.

A todos os meus familiares e amigos pelo carinho e momentos de alegria, incentivos e apoios desprendidos.

À Paula, por sempre me apoiar, me incentivar e me proporcionar muita alegria, mesmo estando um pouco distante.

Aos meus amigos mais íntimos Felipe, Francisco, Daniel e a Rosa, pelos momentos de alegria compartilhados, pela superação das dificuldades.

Aos amigos de laboratório (os que se foram e os que se encontram), Daniel, Gizelle, Gabriel, Natália, Bartolomeu, Fátima, Furtado, Érica, Sebastião, Thiago e Pablo.

Aos professores, Chico Monte, Telma Lemos, Conceição e não se esquecendo da Professora Vânia, alguns sempre me apoiando, outros contribuindo com espaço físico para a realização deste trabalho.

Em especial a professora Dra. Nágila por ter doado a única enzima, dentre as analisadas, capaz de realizar a resolução cinética.

Aos professores que participaram de minha vida acadêmica pela paciência e por seus ensinamentos.

Ao Sávio e Dávila, UNICAMP, Lidiane da USP, pelos artigos enviados que foram necessários para esta dissertação.

Aos companheiros do CENAUREM pelas elaborações dos espectros de RMN.

À Mundinha, Lana, Célia pelos auxílios laboratoriais e burocráticos.

À CAPES pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.



## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	10
LISTA DE TABELAS .....	12
LISTA DE GRÁFICOS.....	13
LISTADEABREVIATURAS.....	14
RESUMO.....	16
ABSTRACT .....	18
1.INTRODUÇÃO .....	21
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	23
2.1 Biocatálise .....	23
2.2 Definição de enzima.....	23
2.2.1 Classificação das enzimas .....	24
2.3 Breve histórico da biocatálise.....	25
2.4 Lipases e sua aplicação em síntese.....	30
2.4.1 Biocatálise em solventes orgânicos .....	32
2.4.2 A escolha do solvente .....	33
2.5 Métodos usados para obtenção de compostos enantiomericamente puros.....	34
2.5a Síntese estereosseletiva .....	35
2.5b Resolução de racemato.....	35
2.6 Enantiosseletividade das lipases em solventes orgânicos .....	36
2.7 Métodos de determinação do ee.....	38
2.8 Resolução cinética por reação de interesterificação .....	38
2.9 Características gerais da catálise de transferência de fase .....	41
2.9.1 Vantagens da CTF sob os métodos tradicionais .....	43
2.9.2 Sais quaternários de amônio.....	43
2.9.3 Poliéteres macrocíclicos.....	44
2.9.4 Disponibilidade dos sais de amônio .....	45
2.9.5 Influência do solvente.....	45
2.10 Considerações gerais sobre $\alpha$ -aminoácidos .....	46
2.11 Síntese de precursores de $\alpha$ -aminoácidos <i>via</i> reação de C-alkilação.....	48
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53

3.1	Preparação dos padrões para a reação enzimática .....	53
3.1.1	Reação de C-alkilação .....	53
3.2	Hidrólise, esterificação e N-acilação dos sais de aminoácidos.....	55
3.3	Resolução cinética enzimática dos precursores de $\alpha$ -aminoácidos através de reações de interesterificação usando lipases como biocatalisadores. ....	56
3.4	Resolução cinética enzimática dos precursores de $\alpha$ -aminoácidos através de reações de transesterificação usando lipozyme RM IM como biocatalisador .....	65
4.	CONCLUSÃO.....	69
5.	PARTE EXPERIMENTAL.....	72
5.1	Instrumentos.....	72
5.2	Solventes e reagentes.....	72
5.2.1	Solventes utilizados.....	72
5.2.2	Reagentes utilizados .....	73
5.3	Catalisadores e biocatalisadores utilizados.....	73
5.4	Adsorventes utilizados.....	74
5.5	Pré-tratamento de solventes para as reações de biocatálise.....	74
5.6	Síntese dos padrões para a resolução cinética.....	75
5.6.1	Procedimento geral para alkilação do cianoacetamidoacetato de etila usando CTF-LL .....	75
5.6.1.1	Alquilação do cianoacetamidoacetato de etila seguindo o procedimento	
5.6.1	Usando o cloreto de benzila como agente alkilante. ....	75
5.6.2	Hidrólise total do alkilado. ....	76
5.6.3	Procedimento geral para a reação de esterificação do cloridrato da fenilalanina .....	76
5.6.4	Procedimento geral para a reação de n-acilação do aminoéster .....	76
5.7	Preparação dos reagentes não comerciais .....	77
5.7.1	Síntese do butirato de butila.....	77
5.8	Imobilização da lipase a partir da <i>Candida rugosa</i> .....	77
5.9	Separação enantiomérica dos padrões em cromatografia líquida de alta eficiência	77
5.10	Resolução cinética dos precursores da fenilalanina.....	78
5.10.1	Resolução cinética enzimática dos precursores da fenilalanina via reação de interesterificação usando solvente .....	78
5.10.2	Resolução cinética enzimática dos precursores da fenilalanina via reação de interesterificação sem solvente .....	78

5.10.3 Resolução cinética enzimática dos precursores da fenilalanina via reação de transesterificação .....	79
5.11 Métodos de análise .....	79
5.11.1 Métodos cromatográficos em CCD .....	79
5.11.2 Métodos espectroscópicos .....	79
5.11.2.1 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN <sup>1</sup> H) e de Carbono (RMN <sup>13</sup> C).....	79
5.11.2.2 Cromatogramas dos padrões obtidos via CLAE.....	97
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	100

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Variação na energia interna de um sistema sofrendo uma reação química a partir de substrato a produto. Ea corresponde a Energia de ativação para favorecer a reação (e) catalisada pela enzima e (n) não catalisada. S <sup>‡</sup> corresponde a suposta estrutura do estado de transição. ....	24
<b>FIGURA 2.</b> Produção de cerveja no antigo Egito. ....	26
<b>FIGURA 3.</b> Métodos para se obter compostos enantiomericamente puros. ....	34
<b>FIGURA 4.</b> Síntese estereosseletiva versus resolução de um racemato. ....	35
<b>FIGURA 5.</b> Complexação do éter-[18]-coroa-6 com cátion potássio. ....	45
<b>FIGURA 6.</b> L- <i>ter</i> -Leucina como precursor de vários fármacos importantes. ....	47
<b>FIGURA 7.</b> Proposta mecanística para a reação de transesterificação usando a LIPOZYME RM IM. ....	67
<b>FIGURA 8.</b> RMN <sup>1</sup> H do <i>rac</i> - <b>29</b> em CDCl <sub>3</sub> . ....	80
<b>FIGURA 9.</b> RMN <sup>13</sup> C DEPT-BB do <i>rac</i> - <b>29</b> em CDCl <sub>3</sub> . ....	81
<b>FIGURA 10.</b> RMN <sup>13</sup> C DEPT-BB do <i>rac</i> - <b>29</b> em CDCl <sub>3</sub> . ....	81
<b>FIGURA 11.</b> RMN <sup>1</sup> H do <i>rac</i> - <b>31</b> em CDCl <sub>3</sub> . ....	83
<b>FIGURA 12.</b> RMN <sup>13</sup> C-BB do <i>rac</i> - <b>31</b> em CDCl <sub>3</sub> ....	83
<b>FIGURA 13.</b> RMN <sup>13</sup> C DEPT-BB do <i>rac</i> - <b>31</b> em CDCl <sub>3</sub> . ....	84
<b>FIGURA 14.</b> Espectro de I.V. do <i>rac</i> - <b>31</b> . ....	84
<b>FIGURA 15.</b> RMN <sup>1</sup> H do <i>rac</i> - <b>32</b> em CDCl <sub>3</sub> . ....	86
<b>FIGURA 16.</b> RMN <sup>13</sup> C do <i>rac</i> - <b>32</b> em CDCl <sub>3</sub> ....	86
<b>FIGURA 17.</b> RMN <sup>13</sup> C-DEPT-BB do <i>rac</i> - <b>32</b> em CDCl <sub>3</sub> . ....	87
<b>FIGURA 18.</b> Espectro de I.V. do <i>rac</i> - <b>32</b> . ....	87
<b>FIGURA 19.</b> RMN <sup>1</sup> H do <i>rac</i> - <b>33</b> em CDCl <sub>3</sub> . ....	89
<b>FIGURA 20.</b> RMN <sup>13</sup> C do <i>rac</i> - <b>33</b> em CDCl <sub>3</sub> ....	89
<b>FIGURA 21.</b> RMN <sup>13</sup> C DEPT-BB do <i>rac</i> - <b>33</b> em CDCl <sub>3</sub> . ....	90
<b>FIGURA 22.</b> Espectro de I.V. do <i>rac</i> - <b>33</b> . ....	90
<b>FIGURA 23.</b> RMN <sup>1</sup> H do <i>rac</i> - <b>34</b> em CDCl <sub>3</sub> . ....	92
<b>FIGURA 24.</b> RMN <sup>13</sup> C-BB do <i>rac</i> - <b>34</b> em CDCl <sub>3</sub> ....	92
<b>FIGURA 25.</b> RMN <sup>13</sup> C DEPT-BB do <i>rac</i> - <b>34</b> em CDCl <sub>3</sub> . ....	93
<b>FIGURA 26.</b> Espectro de I.V. do <i>rac</i> - <b>34</b> ....	93
<b>FIGURA 27.</b> RMN <sup>1</sup> H do <i>rac</i> - <b>35</b> em CDCl <sub>3</sub> . ....	95

<b>FIGURA 28.</b> RMN $^{13}\text{C}$ do <i>rac-35</i> em $\text{CDCl}_3$ .....	95
<b>FIGURA 29.</b> RMN $^{13}\text{C}$ DEPT $135^\circ$ do <i>rac-35</i> em $\text{CDCl}_3$ .....	96
<b>FIGURA 30.</b> Espectro de I.V. do <i>rac-35</i> .....	96
<b>FIGURA 31.</b> Cromatograma do <i>rac-33</i> .....	97
<b>FIGURA 32.</b> Cromatograma do <i>rac-34</i> .....	97
<b>FIGURA 33.</b> Cromatograma do <i>rac-35</i> .....	98

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Resultados obtidos nas resoluções cinéticas enzimática do <i>rac</i> -34 e <i>rac</i> -36 em sistemas isentos de solventes.....	17
<b>TABELA 2:</b> Classificação das enzimas .....	25
<b>TABELA 3:</b> Reações catalisadas pela Lipase PS-C II (75mg/mL) interesterificação de 9b (0,1 M); tempo de reação 48h. ....	41
<b>TABELA 4:</b> Resultados obtidos por O'Donnel comparando as reações realizadas tradicionalmente e por CTF. ....	49
<b>TABELA 5:</b> Resultados obtidos na alquilação da base de Schiff <b>17</b> e o haleto de alquila <b>18</b> . ....	49
<b>TABELA 6:</b> Estudo de catalisadores e tempos utilizados para a reação de C – alquilação do cianoacetoamidoacetato de etila usando como agente alquilante cloreto de benzila e seus respectivos rendimentos a 70°C. ....	54
<b>TABELA 7:</b> Relação entre produtos e rendimentos após a síntese de proteção dos grupos funcionais amônio e carboxila. ....	56
<b>TABELA 8:</b> Relação de Lipases e sua capacidade de reação de interesterificação com solvente, THF, em diferentes tempos e temperaturas. ....	57
<b>TABELA 9:</b> Relação entre CAL-B e LIPOZYME RM IM na reação de interesterificação com ausência de solvente. ....	57
<b>TABELA 10:</b> Reação de interesterificação usando a LIPOZYME RM IM, em THF a temperatura de 30 °C. ....	58
<b>TABELA 11:</b> Reação de interesterificação usando a LIPOZYME RM IM, em THF a temperatura de 45 °C. ....	59
<b>TABELA 12:</b> Reação de interesterificação usando a LIPOZYME RM IM sem solvente a temperatura de 30 °C. ....	60
<b>TABELA 13:</b> Reação de interesterificação usando a LIPOZYME RM IM sem solvente a temperatura de 45 °C. ....	61
<b>TABELA 14:</b> Reação de interesterificação usando a LIPOZYME RM IM com hexano a temperatura de 45 °C. ....	62
<b>TABELA 15:</b> Resultados obtidos na resolução cinética do éster alílico do N-acetil-fenilamina. ....	64
<b>TABELA 16:</b> Reação de interesterificação sem solvente usando a LIPOZYME RM IM, a temperatura de 55 °C. ....	64
<b>TABELA 17:</b> Reação de transesterificação usando o álcool n-butílico a 30°C e a LPOZYME RM IM. ....	66

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>GRÁFICO 1:</b> N° de processos acumulados que tem sido iniciado em escala industrial.....	28
<b>GRÁFICO 2:</b> Os tipos de compostos produzidos usando processos de biotransformação (baseado em 134 processos industriais). .....	28
<b>GRÁFICO 3:</b> Processos de biotransformação industrial e seus respectivos setores.	29
<b>GRÁFICO 4:</b> Relação entre conversão e tempo na reação de interesterificação do precursor de metila, em THF na temperatura de 30 °C.....	59
<b>GRÁFICO 5:</b> Reação de interesterificação usando a LIPOZYME RM IM, em THF a temperatura de 45 °C.....	60
<b>GRÁFICO 6:</b> Reação de interesterificação usando a LIPOZYME RM IM sem solvente a temperatura de 30 °C.....	61
<b>GRÁFICO 7:</b> Reação de interesterificação sem solvente usando a LIPOZYME RM IM a 45 °C. ....	62
<b>GRÁFICO 8:</b> Reação de interesterificação em hexano usando a LIPOZYME RM IM a 30 °C. ....	63
<b>GRÁFICO 9:</b> Reação de interesterificação usando a LIPOZYME RM IM sem solvente a temperatura de 55 °C.....	65
<b>GRÁFICO 10:</b> Reação de transesterificação, usando álcool n-butílico e LIPOZYME RM IM a 30 °C.....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS

$[\alpha]_D^{25}$ - ROTAÇÃO ESPECÍFICA NA RAIA D, 589 nm, A 25 °C

**BBTBA**- BROMETO DE BENZILTRIBUTILAMÔNIO

**Bn**- BENZILA

**Bu**- BUTILA

**c**- CONVERSÃO

**CAL-A**- *Candida antarctica* Lipase A

**CAL-B**- *Candida Antarctica* Lipase B

**CBTBA**- CLORETO DE BENZILTRIBUTILAMÔNIO

**CG**- CROMATOGRAFIA GASOSA

**CLAE**- CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

**CTF**- CATÁLISE DE TRANSFERÊNCIA DE FASE

**CTF-SL**- CATÁLISE DE TRANSFERÊNCIA DE FASE SÓLIDO-LÍQUIDO

**CTF-LL**- CATÁLISE DE TRANSFERÊNCIA DE FASE LÍQUIDO-LÍQUIDO

**CTF-LLL**- CATÁLISE DE TRANSFERÊNCIA DE FASE LÍQUIDO-LÍQUIDO-LÍQUIDO

**CTMA**- CLORETO DE CETILTRIMETILAMÔNIO

**CTF-LSL**- CATÁLISE DE TRANSFERÊNCIA DE FASE LÍQUIDO-SÓLIDO-LÍQUIDO

**DDAB**- BROMETO DE DIDECILDIMETILAMÔNIO

**DMAP**- DIMETILAMINO PIRIDINO

**DTMA**- BROMETO DE DODECILTRIMETILAMÔNIO

**E**- ENANTIOSELETIVIDADE

**ee<sub>p</sub>**- EXCESSO ENANTIOMÉRICO DO PRODUTO

**ee<sub>s</sub>**- EXCESSO ENANTIOMÉRICO DO SUBSTRATO

**HMPA**- HEXAMETILFOSFOROAMIDA

**HTBA**- HIDROGENOSSULFATO TETRABUTILAMÔNIO



**IUPAC**- UNIÃO INTERNACIONAL DE QUÍMICA PURA E APLICADA

**I.V.**- INFRA-VERMELHO

**ln**- LOGARÍTIMO NEPERIANO

**LIPOZYME RM IM**- LIPOZYME A PARTIR DE *Rhizomucor miehei*  
IMOBILIZADO

**MHz**- MEGA HERTZ

**Pr**- PROPIL

**Q<sup>+</sup>X<sup>-</sup>**- SAL QUATERNÁRIO DE AMÔNIO

**rac**- RACÊMICO

**RMN**- RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

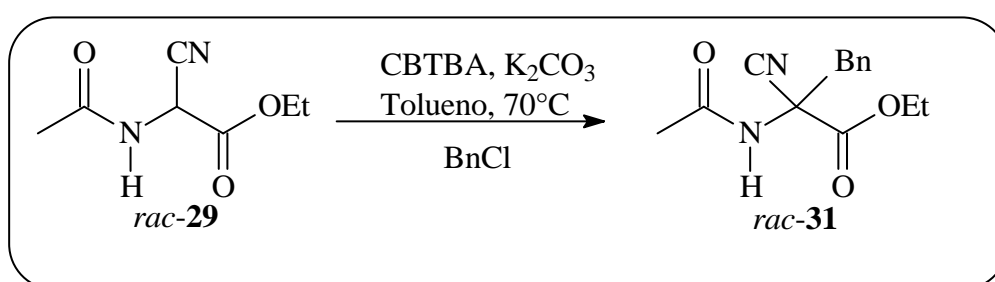
**TBAB**- BROMETO DE TETRABUTILAMÔNIO

**TEBA**- BROMETO DE BENZILTRIBUTILAMÔNIO

**THF**- TETRA-HIDROFURANO

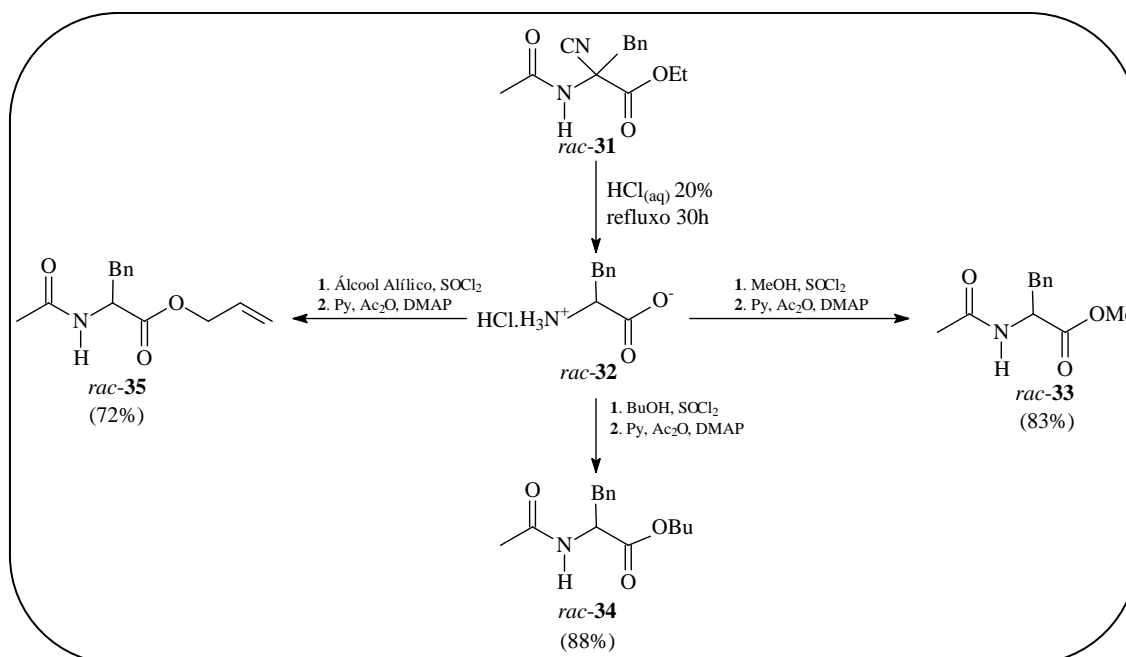
## RESUMO

Neste trabalho foram realizadas reações de C-alkilação *via* Catálise de Transferência de Fase (CTF) com a finalidade de obter os precursores de aminoácidos para uma posterior resolução cinética enzimática. As reações de C-alkilação ocorreram a 70 °C, vários agentes transferidores de fase foram testados, e o mais promissor foi o cloreto de benziltributilamônio (CBTBA). As reações se processaram com o uso de 3 mmol do cianoacetoamido acetato de etila, 3 mmol de carbonato de potássio, 6 mmol do agente alquilante, cloreto de benzila (Esquema 1).



Esquema 1. Reação de C-alkilação do cianoacetoamido acetato de etila via CTF.

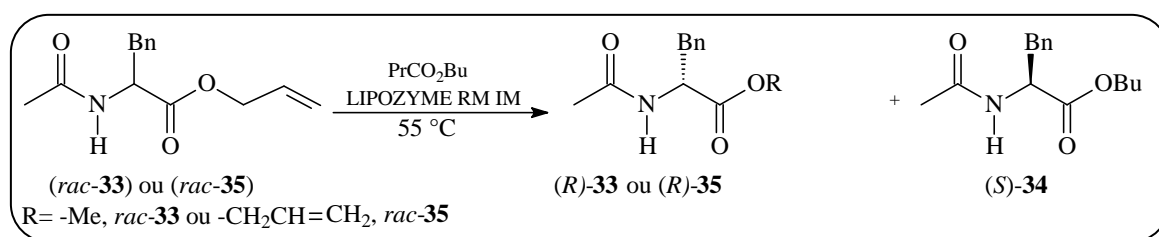
Após purificação do produto, realizou-se uma reação de hidrólise total com posterior proteção dos grupos amino e carboxila resultando em três diferentes compostos *rac*-33, *rac*-34 e *rac*-35 (Esquema 2).



Esquema 2. Reações de esterificação e N-acilação do cloridrato da fenilalanina

A resolução cinética enzimática do *rac-33* por reação de interesterificação usando o butirato de butila (PrCO<sub>2</sub>Bu) foi inicialmente testada com diversas lipases (*Candida antarctica* Lipase B e sua isoenzima *Candida antarctica* Lipase A, ACYLASE I obtida de *Aspergillus melleus*, PSL-C I, Lipase a partir da *Candida rugosa* e a LIPOZYME RM IM) variando tempo, temperatura e solvente. A LIPOZYME RM IM foi a única enzima capaz de promover a reação de interesterificação e com altos valores de enantiosseletividade (*E*). As melhores reações ocorreram à temperatura de 55 °C.

A resolução do *rac-33* a 55 °C ocorreu em oito horas e quinze minutos, em sistema sem solvente, com uma conversão de 50%, *ee<sub>S</sub>* >99%, *ee<sub>P</sub>* >99% com um alto valor de enantiosseletividade, *E* >200 (10633), Esquema 3. A resolução cinética do 2-acetilamino-3-fenil-propanoato de alila (*rac-35*) ocorreu em quatro horas e trinta minutos, sem solvente à temperatura de 55 °C, resultando em 49% de conversão, *ee<sub>S</sub>* 98%, *ee<sub>P</sub>* >99% e *E* >200 (9278), (Esquema 3). Os resultados para as reações sem solvente estão sumariados na Tabela 1.



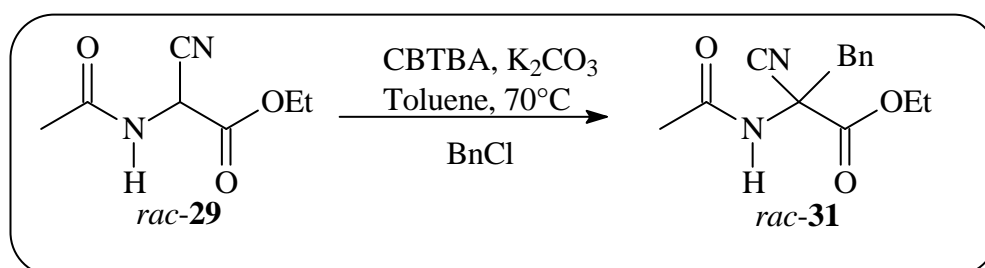
Esquema 3. Resolução cinética dos precursores da fenilalanina *rac-33* e *rac-35*.

Tabela 1. Resultados obtidos nas resoluções cinéticas enzimáticas via interesterificação de *rac-33* e *rac-35* em sistemas isentos de solventes, com a enzima LIPOZYME RM IM.

Substrato	Tempo (h)	Temperatura (°C)	<i>ee<sub>S</sub></i> (%)	<i>ee<sub>P</sub></i> (%)	<i>c</i> (%)	<i>E</i>
<i>rac-33</i>	124	30	97,4	>99	49	>200
<i>rac-33</i>	23	45	97,4	>99	49	>200
<i>rac-33</i>	8,2	55	>99	>99	50	>200
<i>rac-35</i>	4,5	55	98	>99	50	>200

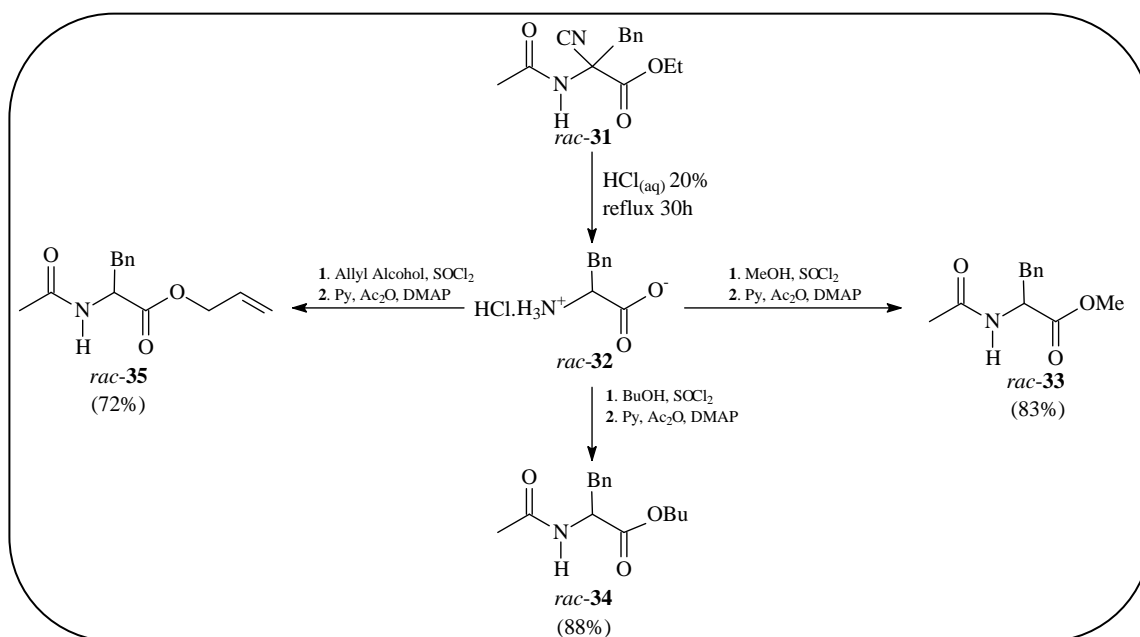
## ABSTRACT

In this work reactions of C-alkylation were carried out *via* Phase Transfer Catalysis (PTC) in order to obtain precursors of amino acids and them to perform enzymatic kinetic resolution. The reactions of C-alkylation occurred at 70 °C, several phase transfer agents were tested, and the most promising was the benzyltributylammonium chloride (CBTBA). The reaction were performed using 3 mmol of ethyl cianoacetoamidoacetate, 3 mmol of potassium carbonate, 6 mmol of alkylating agent, benzylchloride (**Scheme 1**).



**Scheme 1.** Reaction of C-alkylation of the of ethyl cianoacetoamidoacetate via PTC

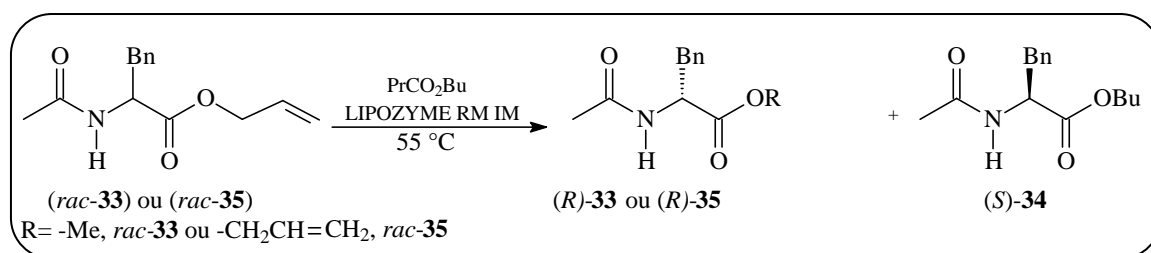
After purification of the product, a reaction of total hydrolysis was carried out with subsequent protection of amino and carboxyl groups resulting in three different compounds *rac*-33 *rac*-34 and *rac*-35 (**Scheme 2**).



**Scheme 2.** Reactions of esterification and N-acylation of hydrochloride of phenylalanine

The enzymatic kinetic resolution of *rac*-**33** via interesterification with butyl butyrate (PrCO<sub>2</sub>Bu) was initially tested with different lipases (*Candida antarctica* Lipase B and its isoenzyme, Lipase *Candida antarctica* Lipase A, ACYLASE I obtained from *Aspergillus melleus*, PSL-C I, Lipase from *Candida rugosa* and Lipozyme RM IM) varying time, temperature and solvent. The Lipozyme RM IM was the only enzyme capable of promoting the reaction of interesterification and with high values of enantioselectivity (*E*). The best reactions occurred at 55 °C.

The resolution of *rac*-**33** at 55 ° C occurred in eight hours and fifteen minutes in system solvent free, with conversion of 50%, *ee*<sub>S</sub>>99%, *ee*<sub>P</sub>>99% with a high value of enantioselectivity, *E* > 200 (10633), **Scheme 3**. The kinetic resolution of allyl 2-acetyl-amino-3-phenyl-propanoate (*rac*-**35**) occurred in four hours and thirty minutes, without any solvent at 55 ° C, resulting in 49% of conversion, *ee*<sub>S</sub>>98%, *ee*<sub>P</sub>>99% and *E* > 200 (9278), (**Scheme 3**). The results for the reactions without solvent are summarized in **Table 1**.



**Scheme 3.** Kinetic resolution of precursors of phenylalanine and *rac*-**33** *rac*-**35**.

**Table 1.** Results obtained in the kinetic resolution via enzymatic interesterification of *rac*-**33** and *rac*-**35** in solvents free systems, with enzyme LIPOZYME RM IM.

Substrate	Time (h)	Temperature (°C)	<i>ee</i> <sub>S</sub> (%)	<i>ee</i> <sub>P</sub> (%)	<i>c</i> (%)	<i>E</i>
<i>rac</i> - <b>33</b>	124	30	97,4	>99	49	>200
<i>rac</i> - <b>33</b>	23	45	97,4	>99	49	>200
<i>rac</i> - <b>33</b>	8,2	55	>99	>99	50	>200
<i>rac</i> - <b>35</b>	4,5	55	98	>99	50	>200

# *Capítulo 1*

*INTRODUÇÃO*

# *1. Introdução*

---

Devido ao aumento da utilização de  $\alpha$ -aminoácidos naturais e não-naturais nas indústrias farmacêuticas, de cosméticos e no campo da agroquímica e ocorrendo ao mesmo tempo um aumento no desenvolvimento de novas metodologias de obtenção de forma a não agredir ao ambiente, neste contexto a CTF (Catálise com Transferência de Fase) demonstrou-se um procedimento viável para a obtenção destes aminoácidos e seus derivados. A utilização da biocatálise na síntese orgânica tem se tornado uma estratégia alternativa e vantajosa possibilitando a obtenção de produtos com elevada enantiosseletividade e bons excessos enantioméricos fazendo dela uma ferramenta poderosa para os químicos orgânicos sintéticos.

Este estudo tem como objetivo realizar resolução cinética enzimática de precursores de  $\alpha$ -aminoácidos via transesterificação e interesterificação.

O presente trabalho está dividido em três capítulos:

Revisão Bibliográfica abrangendo aspectos gerais de biocatálise, resolução cinética, reações de interesterificação, aspectos gerais da Catálise de Transferência de Fase (CTF).

Apresentação e discussão dos resultados obtidos para a reação de C-alquilação e resolução cinética dos precursores de  $\alpha$ -aminoácidos.

Parte Experimental e determinação estrutural dos compostos sintetizados.

## *Capítulo 2*

*REVISÃO BIBLIOGRÁFICA*



## 2. Revisão bibliográfica

---

### 2.1 BIOCATÁLISE

A biocatálise é uma dos mais atrativos recursos da química verde. Condições do meio reacional (pH e condições freqüentemente fisiológica), um catalisador ambientalmente compatível (enzima) e solvente (muitas vezes água) combinada com altas atividades e quimio-, regio- e estereosseletividades em moléculas multifuncionais. Além disso, o uso de enzimas geralmente evita a necessidade de proteção e desproteção de grupos, necessitado na tradicional síntese orgânica.<sup>1</sup>

### 2.2 DEFINIÇÃO DE ENZIMA

Uma enzima é uma proteína com propriedades catalíticas. Como catalisador, a enzima baixa a energia de ativação da reação ( $E_a$ ), assim aumentando a velocidade de reação e conseqüentemente afeta a posição do equilíbrio. Uma vez que a velocidade de uma reação química é proporcional à concentração do complexo do estado de transição ( $S^\ddagger$ ), diminuindo a energia de ativação, efetivamente leva a um aumento na velocidade de reação.<sup>2</sup>

Baseado no ponto de vista de Linus Pauling, Joseph Kraut eloqüentemente salientou que "uma enzima pode ser considerado como um modelo molecular flexível, desenhado pela evolução para ser precisamente complementar aos reagentes na geometria do estado de transição ativado, o que o diferencia da sua geometria do estado de transição. Assim, uma enzima liga fortemente o reagente ao seu estado de transição, aumentando, conseqüentemente, a concentração do composto ativado, e acelerando a reação. Esta descrição da catálise enzimática é agora geralmente referida como estabilização do estado de transição."<sup>2</sup>



Figura 1. Variação na energia interna de um sistema sofrendo uma reação química a partir de substrato a produto.  $E_a$  corresponde a Energia de ativação para favorecer a reação (e) catalisada pela enzima e (n) não catalisada.  $S^\ddagger$  corresponde a suposta estrutura do estado de transição.

### 2.2.1 CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS

Atualmente, cerca de 4000 enzimas tem sido reconhecida pela União Internacional de Bioquímica e se a previsão de que são 25000 existentes na natureza é verdadeira, cerca de 90% deste vasto reservatório de biocatalisadores permanecem desconhecidos até serem descobertos e usados. No entanto, somente uma fração mínima destas enzimas já investigadas (aproximadamente 300, ~10%) é vendida comercialmente.<sup>3</sup>

Como apresentado na **Tabela 2**, as enzimas tem sido classificadas em seis categorias de acordo com o tipo de reação que podem catalisar.<sup>3</sup>

**Tabela 2. Classificação de enzimas.<sup>3</sup>**

Classe de enzimas	Números		Tipos de reações	Utilidade <sup>a</sup>
	Classificadas	Avaliadas		
<b>Oxidoreduases</b>	650	90	REDOX:oxigenação de ligações C-H, C-C, C=C, ou adição ou remoção de hidrogênios.	+++ 25%
<b>Transferases</b>	720	90	Transferência de grupos: aldeídico, cetônico, acilas, açúcares, fosforilas ou metila.	+ ~5%
<b>Hidrolases</b>	636	150	Hidrólises: formação de ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilas, anidridos, glicosídeos e organo-haletos.	+++ 65%
<b>Liasas</b>	255	35	Adição-eliminação de pequenas moléculas em ligações C=C, C=N, C=O.	++ ~5%
<b>Isomerases</b>	120	6	Isomerizações tais como racemização, epimerização e rearranjos.	± ~1%
<b>Ligases</b>	80	5	Clivagem-formação de ligações C-O, C-S, C-N, C-C como concomitantemente clivagens de trifosfato.	± ~1%

<sup>a</sup> A utilidade estimada de uma classe de enzimas para a transformação de substratos não-naturais varia de +++(muito usado) a ± (pouco usado). Os valores em % indicam a porcentagem de pesquisa realizada com as enzimas a partir do período 1987-99.

### 2.3 BREVE HISTÓRICO DA BIOCATÁLISE

As células são sistemas extraordinariamente complexos onde um grande número de reações químicas ocorre. Os catalisadores que permitem a ocorrência de tais reações químicas são chamados de enzimas. Sem sua existência, a reação realizada por células vivas, chamado de metabolismo, aconteceria em ritmo lento demais para o organismo ficar vivo.<sup>4</sup>

A história das enzimas e a aplicação de biocatalisadores remontam milhares de anos para o Egito antigo. Assim, a partir de enzimas, microrganismos foram usados na cozinha antiga, seja para panificação, produção de cerveja, de álcool e até mesmo, produção de queijo. Um antigo papiro egípcio revela métodos desenvolvidos para preservar alimentos e

bebidas alcoólicas. O mais interessante é o processo utilizado para a produção de cervejas, onde os grãos germinados são consideravelmente aquecidos para fornecer açúcar e aroma. O cozimento dos grãos tornaram-nos mais suscetíveis ao ataque de enzimas que convertem o amido em açúcares. Essa porção foi então misturada com o lêvedo, mas não aquecida. A combinação de açúcar e amido na solução contendo leveduras provocou a fermentação levando a produção da cerveja (Figura 2).<sup>4</sup>



**Figura 2. Produção de cerveja no antigo Egito.**

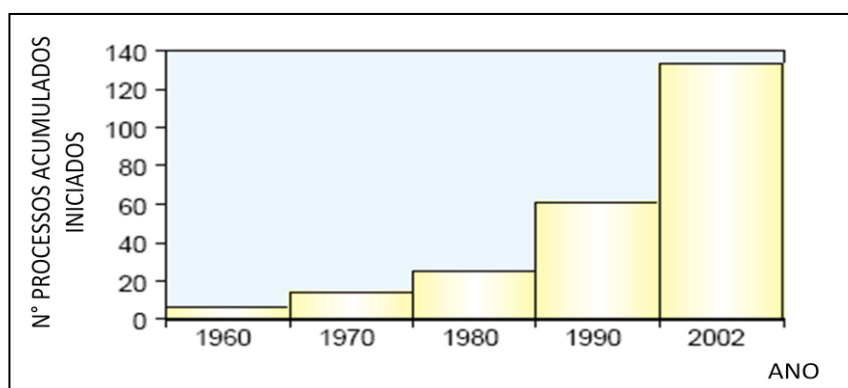
Durante os séculos XVIII e XIX, a biocatálise aplicada foi desenvolvida em mais uma metodologia científica. Em 1833, Payen e Persoz (da França) isolaram um complexo enzimático de malte, nomeando-o de "diástase" (uma mistura de amilases). Poucos anos mais tarde (1835), o químico sueco, Jöns Jacob Berzelius, descreveu a primeira hidrólise enzimática de amido utilizando diástase, que tem sido usado na produção de dextrinas a partir de 1830 em diante. Em 1836, Theodor Schwann (da Alemanha) isolou uma substância responsável pela digestão no estômago e a denominou "pepsina", a primeira enzima isolada a partir de tecidos animais. A fermentação do açúcar para o etanol pela levedura é um processo que tem sido conhecida por muito tempo. Em 1839, o químico alemão, Justus Von Liebig, desenvolveu uma explicação mecanicista para o papel da levedura no processo fermentativo. Ele mostra que a matéria que sofre fermentação pela levedura, em decomposição emite certas vibrações (os átomos de açúcar sofrem um deslocamento, pois eles se reorganizam em tal forma que produzem álcool etílico e dióxido de carbono, reação espontânea).<sup>4</sup>

Quase duas décadas depois, o Francês, químico e biólogo, Pasteur mostrou que as fermentações, conhecidas como práticas artesanais para obtenção de certos produtos como bebidas alcoólicas e vinagre, estavam associadas à presença de microrganismos. O trabalho pioneiro de Eduard Büchner (laureado com o Nobel de 1907), publicado em 1897 no *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, demonstrando que as fermentações são ações puramente químicas podendo ocorrer em meio livre de células, conduziu ao surgimento da Enzimologia - o estudo das enzimas, os agentes químicos responsáveis por essas ações de fermentação.<sup>5</sup>

Os trabalhos de Wöhler (1828) e de Büchner (1897), relatando a síntese da uréia por termoimerização do isocianato de amônio, são marcos na linha de esforços dos químicos no sentido de descrever e interpretar em termos moleculares as transformações que ocorrem nas células vivas, vencendo assim, a resistência vitalista de boa parte do pensamento corrente da época. Os sistemas deixavam de ser intratáveis pelas leis universais das ciências físicas para serem considerados como "sistemas altamente estruturados obedecendo a lei da dinâmica Química", no expressar de Lotka (1925). Surgiram, assim, a Bioquímica e a Biofísica.<sup>5</sup>

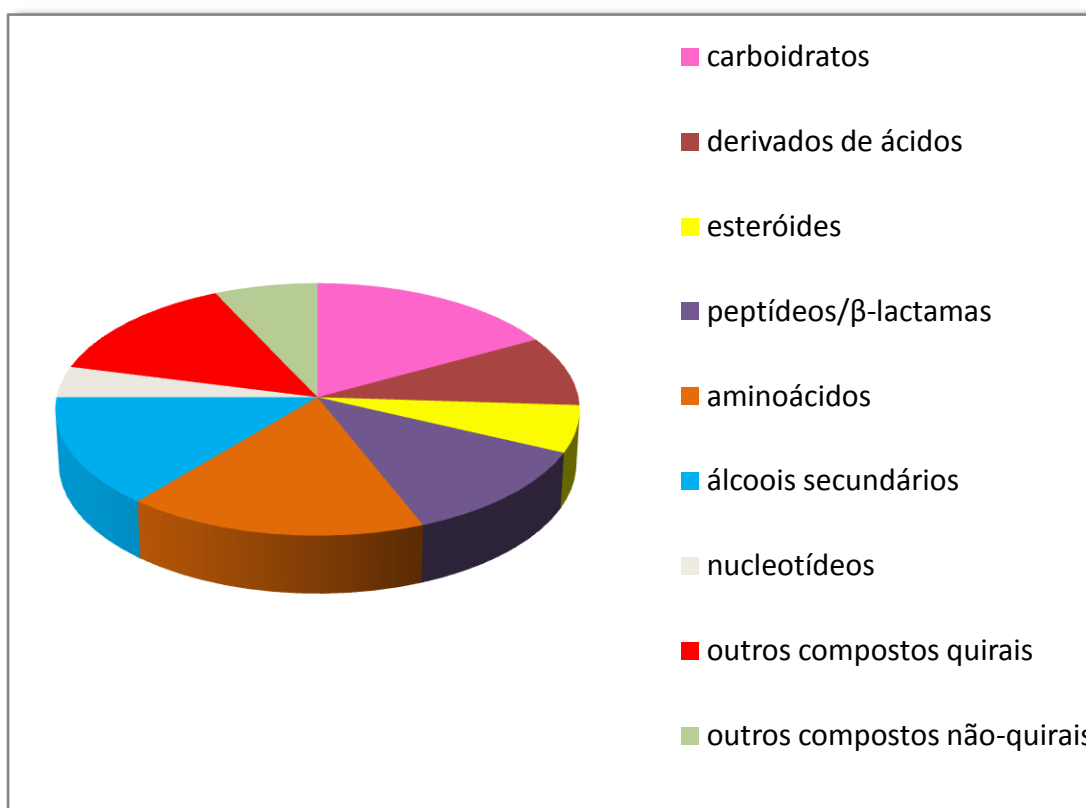
Atualmente a biocatálise tem se tornado uma metodologia aplicável nas indústrias de química fina, o que é refletido pelo número de processos industriais de biotransformação em execução em uma escala comercial. Nos últimos anos, um crescente número de livros e revisão de artigos vem descrevendo processos de biotransformação industrial e têm discutido a forma como a tecnologia pode ser aplicada sobre uma produção de nível de escala. Até agora, porém, não houve nenhuma indicação clara dos critérios técnicos que os processos de biotransformação devem respeitar para serem de importância comercial.<sup>6</sup>

O número total de processos industriais de biotransformações que estão sendo realizados tem crescido rapidamente nas últimas décadas (Gráfico 1). É de se esperar que este crescimento continue.<sup>6</sup>



**Gráfico 1.** Nº de processos acumulados que tem sido iniciado em escala industrial.

A análise das biotransformações industriais que foram identificados mostra que elas conduzem geralmente a compostos naturais ou seus derivados, **Gráfico 2**. Nenhuma das classes de compostos naturais predomina. Carboidratos e derivados de gorduras são utilizados principalmente no setor alimentar, enquanto que os outros tipos de compostos são aplicados principalmente em setores agroindustriais e farmacêuticos. Globalmente, a aplicação no setor farmacêutico domina fortemente (Gráfico 3).<sup>6</sup>



**Gráfico 2.** Os tipos de compostos produzidos usando processos de biotransformação (baseado em 134 processos industriais).

Nenhum dos nove produtos que são produzidos em uma escala granel (arbitrariamente definida como >20000 toneladas por ano) deriva de aplicações farmacêuticas, estes, são principalmente carboidratos. O pequeno número de produtos em granel parece indicar que as biotransformações são particularmente importantes no setor de química-fina.<sup>6</sup>

Dois bons exemplos da aplicação são as indústrias químicas que utilizam a biotransformação para produzir produtos em uma escala de 100 a 10000 toneladas por ano. Nestes exemplos, a produção de acrilamida pelo processo Mitsubishi Rayon. O outro, a produção do derivado da penicilina G/V ácido-6-aminopenicillânico. Frequentemente muitas empresas produzem os mesmos compostos citados acima e acabam tendo custos altíssimos, quando comparados com os processos biocatalíticos.<sup>6</sup>

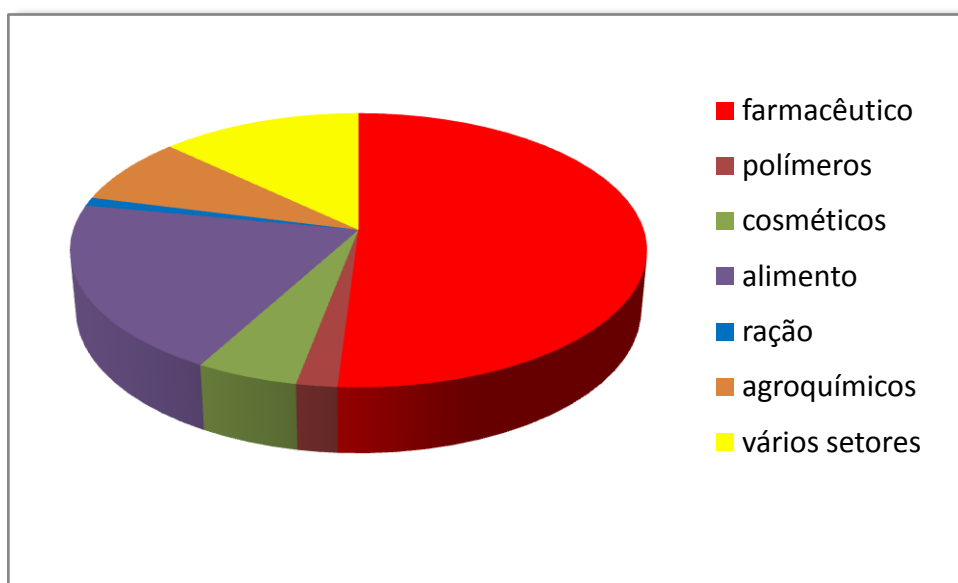


Gráfico 3. Processos de biotransformação industrial e seus respectivos setores.

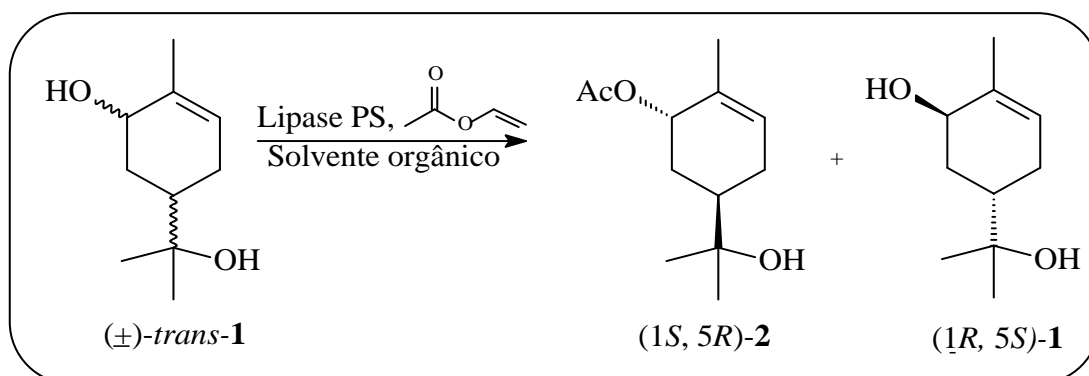
Muitas das pesquisas biocatalíticas envolve enzimas hidrolíticas, somente 1/4 dos estudos envolvem oxidoredutases e menos que 15% corresponde as outras categorias.<sup>6</sup> Com grande aplicação, as lipases são as enzimas que ganham destaque na classe das hidrolases.<sup>7</sup>

## 2.4 LIPASES E SUA APLICAÇÃO EM SÍNTESE

Enzimas hidrolíticas geralmente são de grande interesse devido o seu potencial biotecnológico.

As enzimas que hidrolisam triglicerídeos tem sido estudadas a mais de 300 anos e a habilidade das lipases de catalisarem a hidrólise bem como a síntese de ésteres tem sido relatado a 72 anos atrás por Van Der Walle.<sup>8</sup>

Enzimas, especialmente as lipases, são usadas para a síntese de fármacos enantiopuros como o sobrerol,<sup>1</sup> (Esquema 4)<sup>9</sup>, na resolução cinética de  $\beta$  – aminoácidos (Esquema 5)<sup>10</sup>, produção de biodiesel, produção de compostos aromatizantes<sup>11</sup> e outros.<sup>12,13 e 14</sup>

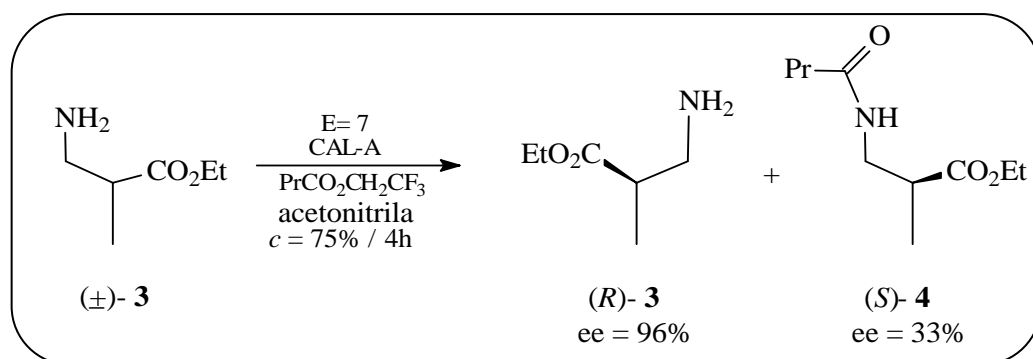


**Esquema 4. Resolução cinética enzimática do (±)-*trans*-sobrerol, sofrendo uma reação de transesterificação com auxílio da Lipase PS e acetato de vinila.**

Um dos mais importantes processos químicos industriais, a produção de ácidos graxos a partir de óleo vegetais por processos químicos (fazendo-se uso de ácidos, ou bases, fortes), pode ser obtida via hidrólise enzimática com aplicação de lipases, em grande velocidade e superior especificidade dependendo das condições do meio.<sup>7</sup>

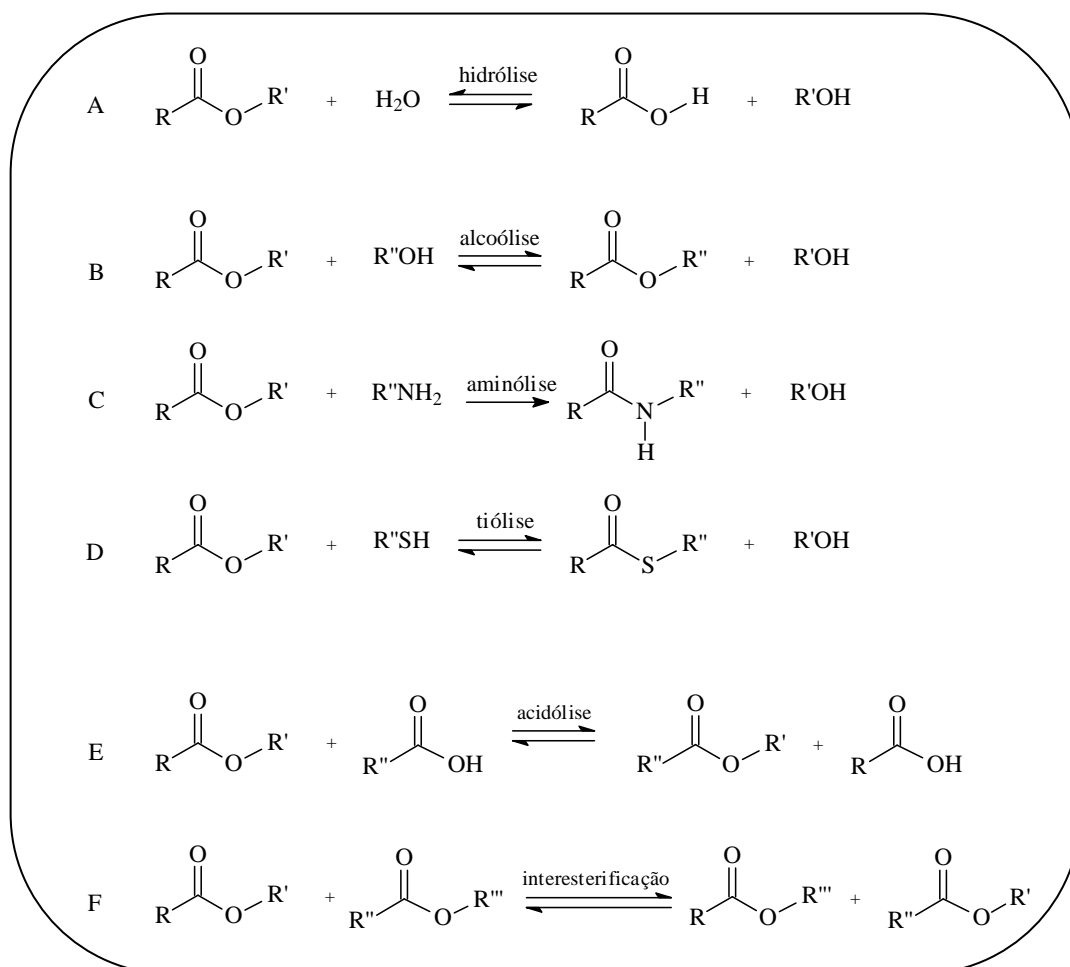
A químio-, regio-, e o comportamento enantioespecífico das lipases causam enorme interesse entre pesquisadores acadêmicos e industriais.<sup>7</sup>





Esquema 5. Tipos de reações catalisadas por lipase da *Candida antarctica*

Lipases fazem parte da família das hidrolases que agem na ligação carboxílica de ésteres. A regra fisiológica das lipases é a hidrólise de triglicerídeos a diglicerídeos, monoglicerídeos, gerando respectivamente ácidos graxos e glicerol.<sup>7</sup> Em adição a sua função natural de hidrolisar ésteres, as lipases podem catalisar reações de esterificação, transesterificação, interesterificação e outras, em meio não aquoso (Esquema 6).<sup>7,10</sup>



Esquema 6. Reações catalisadas por lipases.

O uso de solventes orgânicos tem sido o tópico de maior pesquisa na área de biotransformação. A respeito disso, menos que 10 processos industriais ocorrem na presença de solventes. Estas aplicações envolvem reações de esterificação, ou transesterificação, e amidação. Embora essa seja a realidade, existem várias vantagens para as reações ocorridas em solventes orgânicos.

#### **2.4.1 BIOCATÁLISE EM SOLVENTES ORGÂNICOS**

A catálise enzimática em solvente orgânico amplia significativamente as possibilidades para a biocatálise.<sup>9</sup> A água é um péssimo solvente para quase todas as aplicações na indústria química, desde que muitos compostos de interesse industrial são moderadamente solúveis e ao mesmo tempo, instáveis em solução aquosa. Além disso, a remoção da água é tediosa e dispendiosa devido ao alto ponto de ebulição e ao seu elevado calor de vaporização. Reações laterais como hidrólises, racemização, polimerização e decomposição, freqüentemente acompanham esses processos. Estas limitações levaram aos químicos a desenvolver procedimentos em solventes orgânicos.<sup>15</sup>

Transformações biocatalíticas em solventes orgânicos oferecem várias vantagens, como:<sup>4,16</sup>

- melhor rendimento global e facilidade de remoção do produto pelo uso de solventes orgânicos de baixo ponto de ebulição;
- substratos não-polares são convertidos em um ritmo mais rápido, devido à sua crescente solubilidade;
- reações laterais são desfavoráveis como, por exemplo, a hidrólise que é amplamente reprimida;
- imobilização de enzimas não é necessária; as enzimas podem ser recuperadas por simples filtração;
- desnaturação de enzimas é minimizada em solventes orgânicos (exceto em etanol);
- equilíbrios termodinâmicos são desviados para favorecer uma síntese em detrimento à hidrólise.<sup>4</sup>

O uso de enzimas em solventes orgânicos, no entanto, tem alguns inconvenientes:<sup>4</sup>

- diminuição da atividade catalítica devido à heterogeneidade do sistema;<sup>4</sup>
- Muitas reações enzimáticas são propensas a inibição pelo substrato ou produto, o que desativa as enzimas em maior concentração do substrato ou do produto, levando a uma diminuição na velocidade de reação e enantiosseletividade<sup>4</sup>

#### **2.4.2 A ESCOLHA DO SOLVENTE**

A escolha do solvente depende de vários fatores. Preferencialmente deve ser líquido em temperatura ambiente e suficientemente volátil para ser removido por uma simples destilação. Outra importante questão, em uma indústria, é o valor.<sup>1</sup>

O solvente dever ser também reaproveitado, ele não pode ser liberado no ambiente. Atualmente, isto tem se tornado demasiadamente rigoroso com a questão de uso de solventes na produção de compostos químicos e em outras indústrias. Os solventes são divididos em quatro classes:<sup>1</sup>

- Classe 1: os solventes não devem ser empregados na produção de fármacos devido a sua inaceitável toxicidade ou efeito nocivo ao ambiente. Estão inclusos benzeno e hidrocarbonetos clorados.
- Classe 2: os solventes devem ser limitados em processos farmacêuticos por causa de sua toxicidade inerente e inclui mais hidrocarbonetos clorados, como, diclorometano, acetonitrila, dimetilformamida e metanol.
- Classe 3: os solventes pode ser considerados como poucos tóxicos e de baixo risco a vida humana. Pertencentes a esta classe são alcoóis, éteres, ésteres e cetonas.
- Classe 4: os solventes em que os dados não foram encontrados, inclui diisopropil éter, metiltetra-hidrofurano e isooctano.

## 2.5 MÉTODOS USADOS PARA OBTENÇÃO DE COMPOSTOS ENANTIOMERICAMENTE PUROS

Os métodos usados para obtenção de compostos enantiomericamente puros são divididos em três categorias dependendo do tipo do material inicialmente usado (Figura 4).<sup>17</sup> Dois métodos são usados para a preparação dos enantiômeros com auxílio de enzimas;<sup>18,19</sup>

1. Síntese estereosseletiva e;
2. Resolução cinética de racematos.

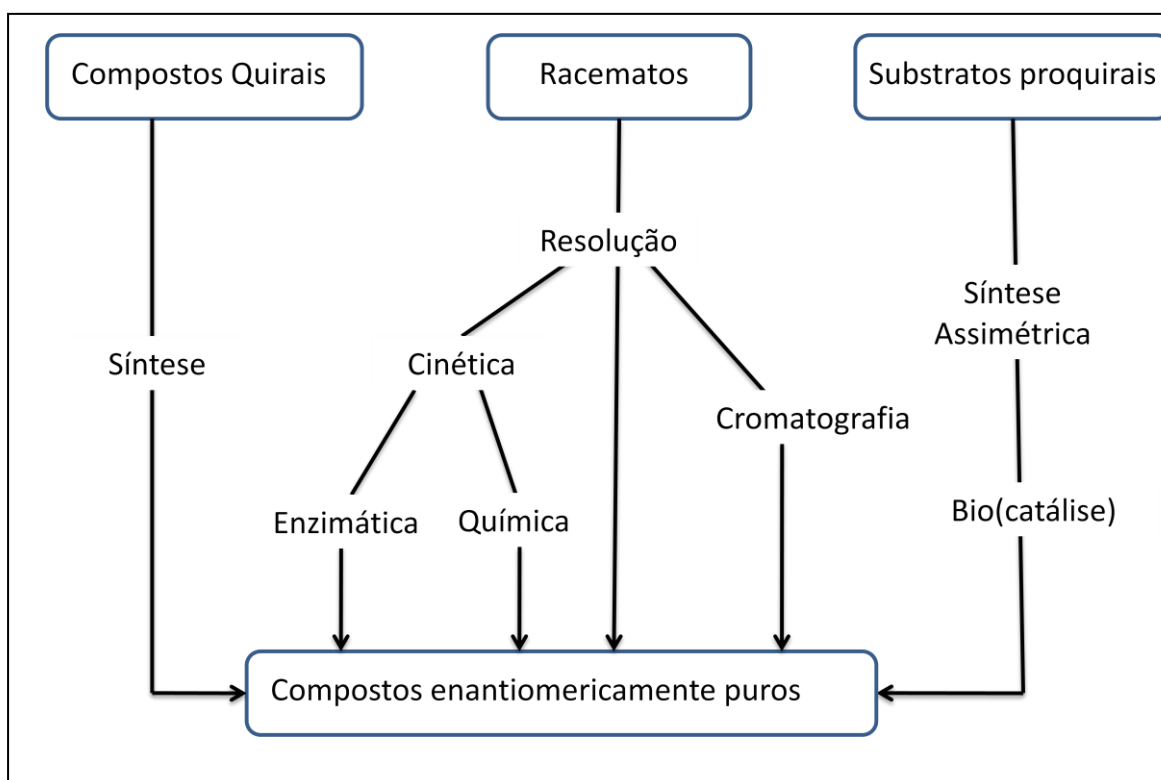
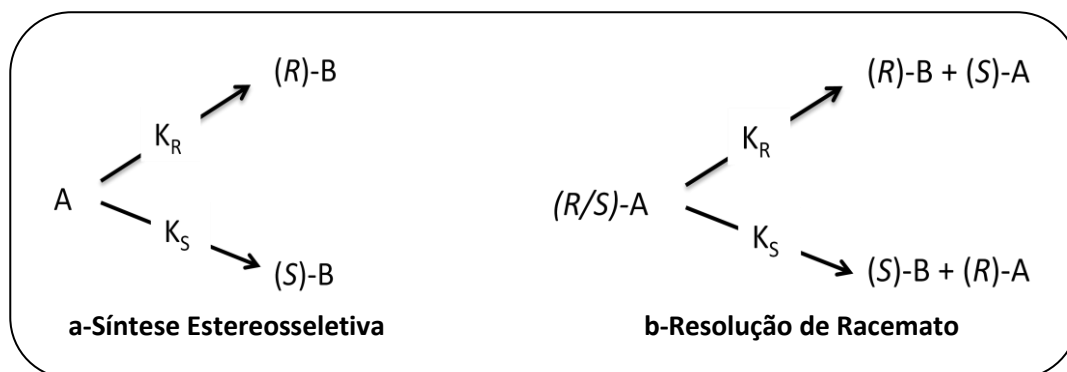


Figura 3. Métodos para se obter compostos enantiomericamente puros.

## 2.5a SÍNTESE ESTEREOSELETIVA



**Figura 4. Síntese estereosseletiva versus resolução de um racemato.**

A síntese estereosseletiva parte de um substrato proquiral cujo produto pode ser apenas um enantiômero, dependendo de quão regioseletiva for o processo. Diferentemente, a resolução de racematos parte de uma mistura racêmica, que por diferença de velocidade de reação apenas um enantiômero reage preferencialmente com o catalisador. A diferença entre síntese estereosseletiva e a resolução de racematos é ilustrado na **Figura 4**.<sup>20</sup>

## 2.5b RESOLUÇÃO DE RACEMATO

Apesar dos impressionantes novos progressos na síntese assimétrica, o método de produção dominante para obter um simples enantiômero nas sínteses industriais consiste na resolução de racematos.<sup>21-25</sup> A resolução de enantiômeros pode ser dividida em quatro categorias: cristalização preferencial direta, cromatografia e resolução cinética.

- **CRISTALIZAÇÃO PREFERENCIAL**

Haarmann & Reimer, a empresa líder na síntese do (-)-mentol, utiliza a cristalização preferencial dos enantiômeros do benzoato de mentila. Isto pode ser induzida pelo processamento de um grande volume e obtendo um dos enantiômeros puro que é usado na síntese supracitada.<sup>26</sup> Este processo é tecnicamente praticável somente com racematos que formam conglomerados (consiste na mistura desiguais de dois tipos de cristais). Infelizmente, menos que 20% de todos os racematos formam cristais conglomerados, o resto consistindo de compostos racêmicos que não pode ser separados por

cristalização preferencial. O sucesso da cristalização preferencial depende do fato de que um dos enantiômeros que compõem o racemato seja mais solúvel que o outro.<sup>17</sup>

- **RESOLUÇÃO CINÉTICA**

De acordo com a IUPAC, resolução cinética é definida como a realização da resolução parcial ou completa em virtude das velocidades desiguais de reação dos enantiômeros em um racemato promovido por um agente quiral (catalisador, reagente, solvente, etc.).

A resolução cinética rende no máximo 50% do enantiômero desejado.<sup>27</sup> De maneira ideal, um dos enantiômeros reage mais rápido que o outro, por exemplo, se o reagente (R) tem somente um enantiômero reagindo ( $K_S=0$ , onde  $K_S$  é a constante de velocidade do enantiômero S). Neste caso, 50% de conversão da mistura inicial 50/50 leva a uma mistura final de 50% do reagente e 50% do produto. As resoluções cinéticas mais comuns de compostos racêmicos são as que fazem uso de lipases como catalisadores.<sup>20</sup>

## 2.6 ENANTIOSSELETIVIDADE DAS LIPASES EM SOLVENTES ORGÂNICOS

Dois importantes conceitos devem ser entendidos em reações catalisadas por enzimas, o excesso enantiomérico (ee) e a enantiosseletividade (E).

A pureza enantiomérica de alguns compostos é expresso em termos do valor de ee, que é definido como:

$$\%ee_{\text{do enantiômero majoritário}} = \frac{A-B}{A+B} \times 100$$

Onde A é a concentração do enantiômero majoritário e B é a concentração do enantiômero minoritário. Deste modo, o valor de ee para uma mistura racêmica é zero, diferentemente para um composto enantiomericamente puro, na qual o valor de ee é um (ou 100%).

Já que as lipases são quirais, elas possuem a habilidade de distinguir entre os dois enantiômeros de um mistura racêmica. O parâmetro da escolha descreve a estereosseletividade ou a enantiosseletividade das reações catalisadas por lipases é chamado de enantiosseletividade, que também é

conhecida como razão enantiomérica ( $E$ ). O valor de  $E$  é definido como a proporção da constante específica dos dois enantiômeros:

$$E_{RS} = \frac{(K_{cat}/K_M)_R}{(K_{cat}/K_M)_S}$$

Onde  $K_{cat}$  é a constante da velocidade e  $K_M$  é a constante de Michaelis-Menten. Sih<sup>28,29</sup> e colaboradores desenvolveram a equação em termos do ee do produto ( $ee_p$ ), substrato não reagido ( $ee_s$ ) e a conversão ( $c$ ). Deste modo, para uma reação reversível, o valor de  $E$  pode ser expresso por:

$$E = \frac{\ln\left[\frac{1 - (1 + K)c(1 + ee_p)}{1 - (1 + K)c(1 - ee_p)}\right]}{\ln\left[\frac{1 - (1 + K)(c + ee_s\{1 - c\})}{1 - (1 + K)(c - ee_s\{1 - c\})}\right]}$$

onde  $K$  é a constante de equilíbrio. Quando a reação é irreversível ou a reação reversível é insignificante ( $K=0$ ), a equação é reduzida a:

$$E = \frac{\ln\left[\frac{1 - c(1 + ee_p)}{1 - c(1 - ee_p)}\right]}{\ln\left[\frac{(1 - c)(1 - ee_s)}{(1 - c)(1 + ee_s)}\right]}$$

onde  $c$  é expressado por:

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p}$$

$E$  também pode ser expresso em termos de  $ee_s$  e  $ee_p$ , somente por:<sup>30</sup>

$$E = \frac{\ln\left[\frac{1 - ee_s}{1 + (ee_s/ee_p)}\right]}{\ln\left[\frac{1 + ee_s}{1 + (ee_s/ee_p)}\right]}$$

Assim, calcular o valor de  $E$  pode ser realizada pela medida de duas das três variáveis:  $ee_s$ ,  $ee_p$ . Uma reação não-seletiva tem o valor de  $E$  próximo a 1, o valor de  $E$  acima de 20 é o mínimo para uma resolução aceitável.<sup>30</sup>

## 2.7 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DO ee

- **Cromatografia Gasosa**

Um método atraente para a determinação do ee de substratos e produtos resultantes das resoluções cinéticas catalisada por enzimas de alcoóis secundários é a cromatografia gasosa com auxílio de colunas quirais (CG).<sup>31,32</sup> Este método é sensível, rápido, simples de realizar, e não afetado pela presença de impurezas na amostra analisada, portanto, o isolamento e purificação da amostra analisada não é necessária. Pequenas quantidades da amostra é necessária para a análise, portanto, estas reações podem ser realizadas em pequena escala. Uma das limitações associadas a este método é que a amostra deva ser suficientemente volátil, termicamente estável e separável na fase quiral estacionária usada.<sup>33</sup>

- **Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAE)**

Métodos que fazem uso de CLAE seguem os mesmos princípios e vantagens do que o método de análise de CG. A grande diferença é que compostos mais polares e também não voláteis podem ser analisados, o tipo de compostos a serem analisados depende do detector.

## 2.8 RESOLUÇÃO CINÉTICA POR REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO

Como apresentado no **Esquema 6** (p. 31), as lipases aceitam uma vasta gama de compostos como os seus substratos. Além da hidrólise de éster (**A**), em solventes orgânicos lipases catalisam alcoólise (**B**), aminólise (**C**), tiólise (**D**), acidólise (**E**) e interesterificação (**F**) quando a água não está presente. Em um amplo sentido, estas reações podem ser consideradas como acilação de um nucleófilo ( $\text{Nu}^2\text{H}$ ) e como desacilação de um doador de acila ( $\text{RCONu}^1$ ) para a reação apresentada no **Esquema 7**.

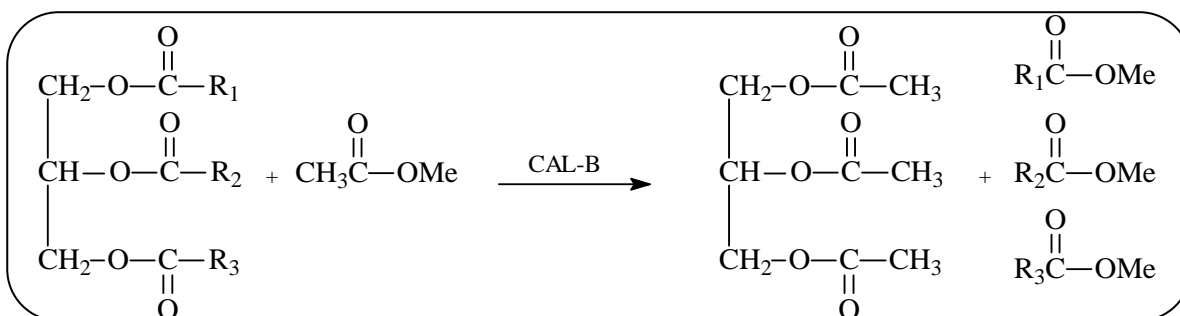


**Esquema 7. Modelo simplificado de reação que as lipases catalisam em solvente orgânico.**



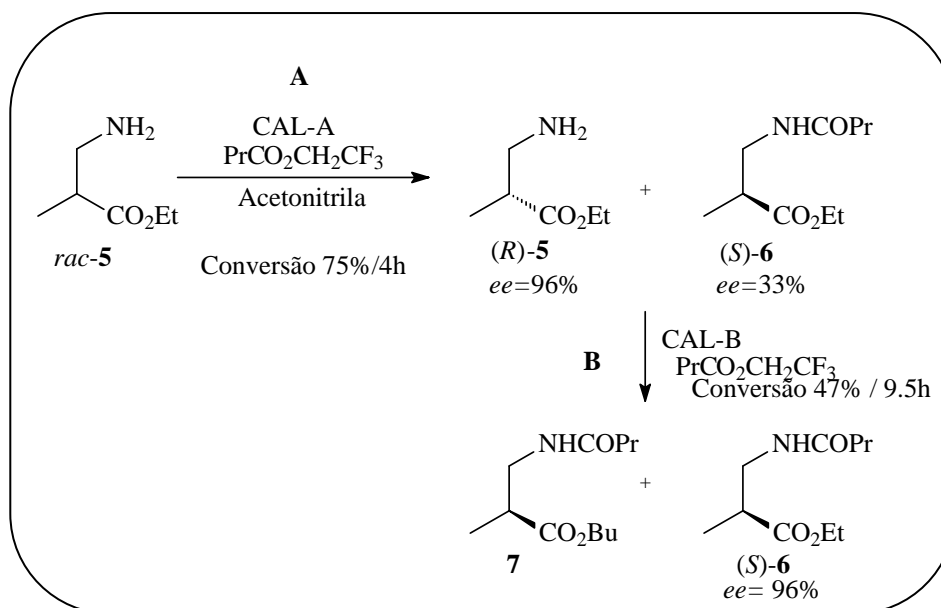
Vale a pena mencionar que os conceitos de inter- e transesterificação são freqüentemente utilizadas como sinônimos.<sup>10</sup> No entanto alguns pesquisadores julgam necessário reservar o termo para descrever reações de interesterificação (F, no esquema 6, p. 31). São escassos os exemplos de interesterificação na literatura.<sup>34-43</sup>

As reações mais comuns de interesterificação são as de obtenção de biodiesel, onde o triacilglicerídeo é interesterificado com ésteres simples como acetato de etila ou acetato de metila (Esquema 8).<sup>44</sup>



**Esquema 8.** Reação de interesterificação para obtenção de biodiesel usando acetato de metila.

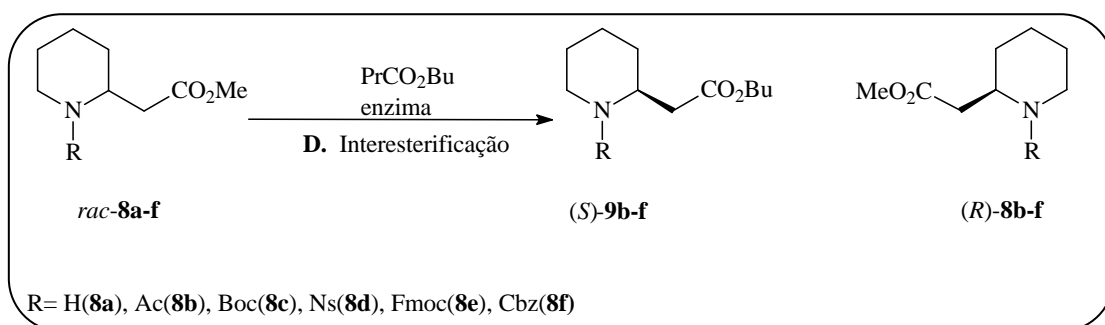
Gedey e colaboradores<sup>39</sup> estudaram resoluções cinéticas catalisadas por lipases (*Candida antarctica* Lipase B e *Candida antarctica* Lipase A) do 3-aminobutirato de etila, **5** (Esquema 9), um precursor de β-aminoácido, um aminoácido não-protéico, com diversos ésteres.



**Esquema 9.** Resolução sequencial do racêmico **5**.

Os autores concluíram que a *Candida antarctica* Lipase A (CAL-A) e B (CAL-B) catalisam resoluções cinéticas de ésteres de  $\alpha$ -metil- $\beta$ -alanina em butanoato de etila e butila e butanoato de 2,2,2-trifluoroetila em solventes orgânicos. A possibilidade da resolução cinética pela reação de transesterificação em n-butanol e MeOH (0,8 M) em diisopropil-éter foram estudadas. Para as resoluções por transesterificação foram obtidas baixos valores de  $E$  ( $E=10$ ). Os autores concluíram que o comportamento das lipases supracitadas em catalisar resoluções cinéticas depende da estrutura do éster utilizado. Excelentes enantiosseletividades foram observadas ( $E=100$ ) quando se fez uso de ésteres, indicando que a resolução seqüencial pode ser usada como ferramenta para resoluções deste tipo.

Posteriormente, Kanerva e colaboradores<sup>40</sup> estudaram a resolução cinética catalisada por lipases em solventes orgânicos. Vários grupos  $N$ -protetores foram usados porque eles são de grande importância em síntese (Esquema 10).



**Esquema 10. Exemplos de Resolução cinética de vários precursores de  $\beta$ -aminoácidos.**

As melhores reações de interesterificação ocorreram com 48h, temperatura de 23 °C em butirato de butila puro e resultou em uma enantiosseletividade de até 138,  $ee_S= 95\%$  e  $ee_P= 12\%$  com conversão de 10% (Entrada 1, Tabela 3).

**Tabela 3. Reações catalisadas pela Lipase PS-C II (75mg/mL) interesterificação de 8b (0,1 M); tempo de reação 48h.**

Entrada	Meio	Temp (°C)	ee <sup>(R)</sup> -9b (%)	ee <sup>(S)</sup> -10b (%)	c (%)	E
1	PrCO <sub>2</sub> Bu (puro)	23	12	99	10	138 ± 8
2	PrCO <sub>2</sub> Bu (puro)	47	23	95	19	42 ± 2
3	PrCO <sub>2</sub> Bu (puro)	80	4	55	7	3 ± 1

## 2.9 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA CATÁLISE DE TRANSFERÊNCIA DE FASE

Para que uma reação ocorra é necessário que as espécies reagentes: moléculas e/ou íons, etc., possam estar intimamente em contato. Por essa razão, uma tendência natural é que as reações químicas ocorram em meio homogêneo, em solventes capazes de dissolverem, ao menos parcialmente, os reagentes envolvidos.

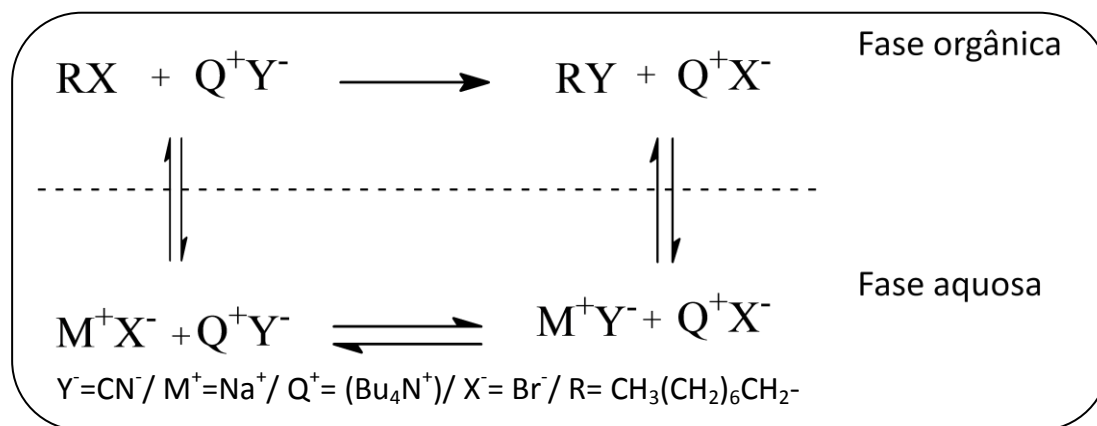
Em muitos casos, para uma reação, a formação de um meio homogêneo encontra sérias dificuldades, particularmente quando um reagente iônico reage com um composto orgânico apolar. Além deste, como em muitos outros casos, a Catálise de Transferência de Fase (CTF) oferece uma simples e eficiente solução.<sup>45-47</sup>

As reações de transferência de fase podem ser classificadas de acordo com a natureza e solubilidade do catalisador, o número e o tipo de fases envolvidas no sistema reacional. Os mais familiares são as reações do tipo líquido-líquido (CTF-LL) e sólido-líquido (CTF-SL). Existindo também líquido-sólido-líquido (CTF-LSL), por exemplo, onde os catalisadores de transferência de fase estão suportados em uma matriz polimérica, e líquido-líquido-líquido (CTF-LLL) onde o catalisador forma uma terceira fase líquida, menos usual.<sup>48-51</sup>

Um clássico exemplo, relatado por Starks<sup>45</sup>, é a reação entre o cianeto de sódio aquoso e 1-bromo-octano: agitando-se a mistura reacional por vários dias sob condições de refluxo, não se observou nenhuma reação a não ser a hidrólise lenta do cianeto a amônia. Entretanto com a adição de quantidades catalíticas de brometo de tetrabutilamônio (sal quaternário de amônio) ao meio,

a reação de S<sub>N</sub>2 se processou em poucos minutos. Para explicar tal resultado, Starks elaborou um mecanismo que envolve duas etapas:

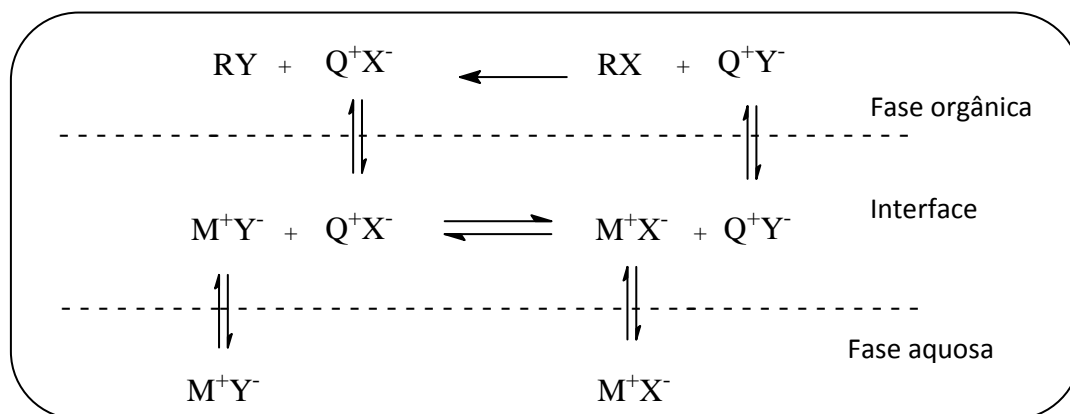
- i) transferência do ânion (Y<sup>-</sup>) da fase aquosa para a fase orgânica pelo catalisador(Q<sup>+</sup>X<sup>-</sup>);
- ii) reação entre o ânion transferido e com o substrato encontrado na fase orgânica (Esquema 11).



**Esquema 11. Mecanismo extrativo proposto por Starks.**

Conforme o Esquema 11, o processo de extração envolve três equilíbrios, sendo Q<sup>+</sup> o agente responsável pela transferência do íon Y<sup>-</sup> da fase aquosa para a fase orgânica. Uma vez, na fase orgânica, o ânion Y<sup>-</sup> reage com o haleto de alquila, RX, formando o produto RY.

A necessidade da partição do catalisador entre as duas fases para que ocorresse o processo foi questionado por Bränsdtröm<sup>51</sup> e Montanari<sup>52</sup>, independentemente. Estes autores demonstraram que a presença do cátion do catalisador na fase aquosa não era um requisito básico para a catálise, principalmente no caso de catalisadores muito lipofílicos, e que a formação do par iônico entre o sal de ônio e o ânion do reagente poderia ocorrer na interface do sistema (Esquema 12).<sup>53</sup>



Esquema 12. Modificação de Bränsdtröm-Montanari para o mecanismo extrativo.

### 2.9.1 VANTAGENS DA CTF SOB OS MÉTODOS TRADICIONAIS

Do ponto de vista preparativo a CTF apresenta várias vantagens sobre os métodos clássicos, tais como:<sup>53</sup>

- utilização de solventes sem a necessidade de tratamentos prévios para torná-los anidros;
- aumento da velocidade de reação e/ou emprego de temperaturas menores;
- uso de hidróxidos e carbonatos alcalinos em lugar de reagentes como hidretos, amidetos e alcóxidos;
- baixo custo de investimentos;
- simplicidade operacional;
- baixo consumo de energia.

### 2.9.2 SAIS QUATERNÁRIOS DE AMÔNIO

A escolha dos sais de amônio deve-se ao seu baixo custo e fácil síntese. Muitos sais de amônio são empregados em Catálise de Transferência de Fase, além deles, sais de fosfônios e arsônios. A eficiência destes catalisadores deve-se a lipofilicidade do cátion e da habilidade do ânion em efetuar a troca com o reagente contido na fase orgânica.

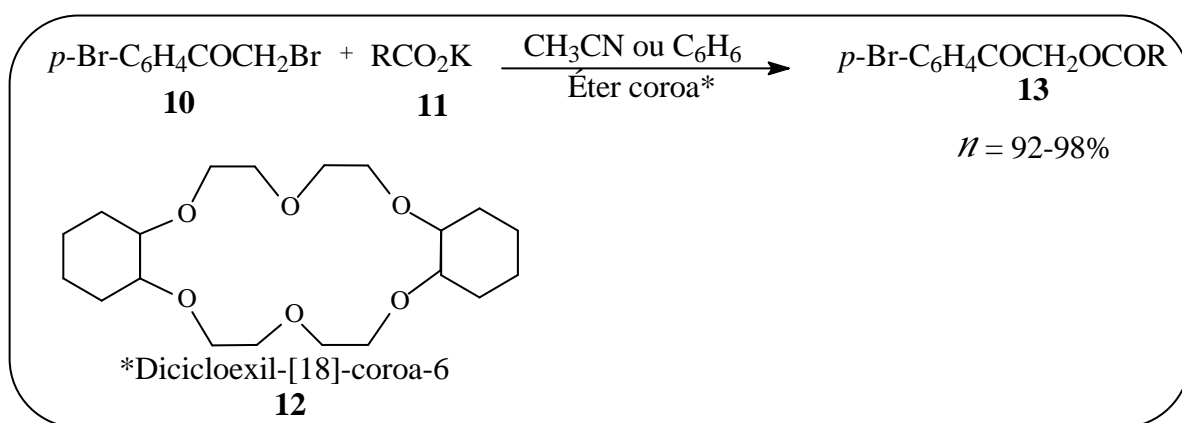
Os sais tetra-alquilamônios clássicos em CTF são os que foram desenvolvidos por Starks (Aliquat<sup>®</sup> 366)<sup>46</sup>, o que Makosza<sup>54</sup> introduziu (TEBA)

e o catalisador de Bränsdtröm<sup>51</sup> (TBAB), porém recentemente houve a aplicação de um catalisador, DDAB, na qual foi comprovada sua eficácia diante dos três supracitados. A avaliação verificou a estabilidade térmica e sua estabilidade em elevado pH.<sup>55</sup>

### 2.9.3 POLIÉTERES MACROCÍCLICOS

A habilidade de poliéteres macrocíclicos (éteres-coroa e criptandos) de formar complexos com vários íons e moléculas é uma das mais importantes descobertas da Química Orgânica moderna. O constante e crescente interesse em poliéteres como catalisadores de transferência de fase está baseada na sua capacidade de complexação específica com cátions, permitindo a solubilização de sais orgânicos e inorgânicos de metais alcalinos em solventes orgânicos apolares.<sup>56</sup>

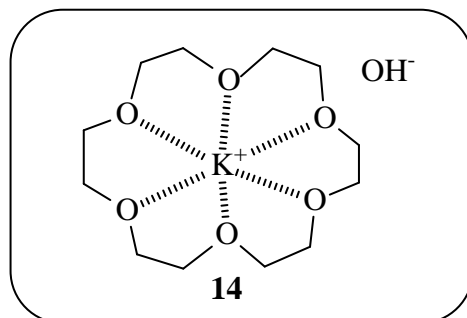
Um dos primeiros relatos do emprego destas estruturas foi o de Durst em 1974 que, na reação de substituição de brometo por acetato, utilizou como catalisador o éter dicroloexil-[18]-coroa-6, **12**, (Esquema 13).<sup>57</sup>



**Esquema 13.** Reação realizada por Durts, em 1974, empregando poliéteres macrocíclicos

O cátion potássio forma um complexo mais facilmente com macrocíclicos de 18 membros cujo diâmetro da cavidade é igual a 2,6 a 3,2 Å, correspondendo ao diâmetro do íon potássio 2,66 Å (Figura 6). A formação de um éter coroa lipofílico protege o cátion metálico permitindo a dissolução de sais orgânicos e inorgânicos em um meio apolar. A complexação do cátion

causa um aumento na reatividade do ânion do par iônico devido a diminuição da interação cátion-ânion, um exemplo é mostrado na **Figura 5**.



**Figura 5. Complexação do éter-[18]-coroa-6 com cátion potássio.**

#### 2.9.4 DISPONIBILIDADE DOS SAIS DE AMÔNIO

Com acessibilidade comercial de muitos sais quaternários de amônio, a disponibilidade dos catalisadores de transferência de fase é grande e dessa forma é possível testar vários sais de amônio na otimização dos rendimentos obtidos nas reações.

A efetividade do catalisador pode ser considerada a partir de dois aspectos:

- a) a habilidade do cátion quaternário de amônio transferir o ânion nucleofílico reativo através das duas faces da interface, e;
- b) o aumento da reatividade do ânion na fase orgânica.<sup>58</sup>

#### 2.9.5 INFLUÊNCIA DO SOLVENTE

A extração do cátion para a fase orgânica depende muito do solvente. Muitas vezes, pequenas mudanças na estrutura do solvente alteram drasticamente o modo como o catalisador se distribui na interface. Os solventes comumente empregados nas reações realizadas sob condições de CTF são:

- i) imiscíveis em água, para minimizar a hidratação do nucleófilo;
- ii) apróticos, para evitar as ligações de hidrogênio entre solvente e nucleófilo;

- iii) de polaridade média suficiente para separar o par iônico  $Q^+Y^-$  e com baixo grau de solvatação de  $Y^-$ , proporcionando sua reação com o substrato.

Solventes do tipo hidrocarbonetos clorados são bastante utilizados na CTF devido ao baixo ponto de ebulição e também a facilidade de remoção do meio reacional.<sup>45</sup>

## 2.10 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE $\alpha$ -AMINOÁCIDOS

A grande maioria dos aminoácidos tem o grupo amino ligado ao carbono adjacente, denominados assim de  $\alpha$ -aminoácidos. A síntese de aminoácidos, de forma geral, e seus derivados têm despertado um considerável interesse com o passar das décadas.<sup>59</sup> Quando os aminoácidos são constituintes de macromoléculas passam a ser denominados de proteínas ou enzimas. Na natureza existe mais de 500 tipos de aminoácidos, porém apenas 21 aminoácidos são protéicos e encontram-se em maioria na natureza, destes apenas oito aminoácidos são considerados essenciais (encontrados em proteína de animal) e treze são não-essenciais, encontrado em proteínas vegetais.

O interesse na síntese deve-se a grande aplicabilidade em diferentes áreas, citando:

- **cosmética** – são empregados na produção de xampus, protetores solares e hidratantes, desodorantes e anti-transpirantes;<sup>60-65</sup>
- **bioquímica** – na síntese de peptídeos e proteínas, na síntese de inibidores enzimáticos;<sup>60,66-68</sup>
- **agroquímica** – usado como reguladores do crescimento de plantas, fungicidas, herbicidas e pesticidas;<sup>60,61</sup>
- **indústria farmacêutica** – usados como esqueletos de diversos fármacos (Figura 6).<sup>69</sup>



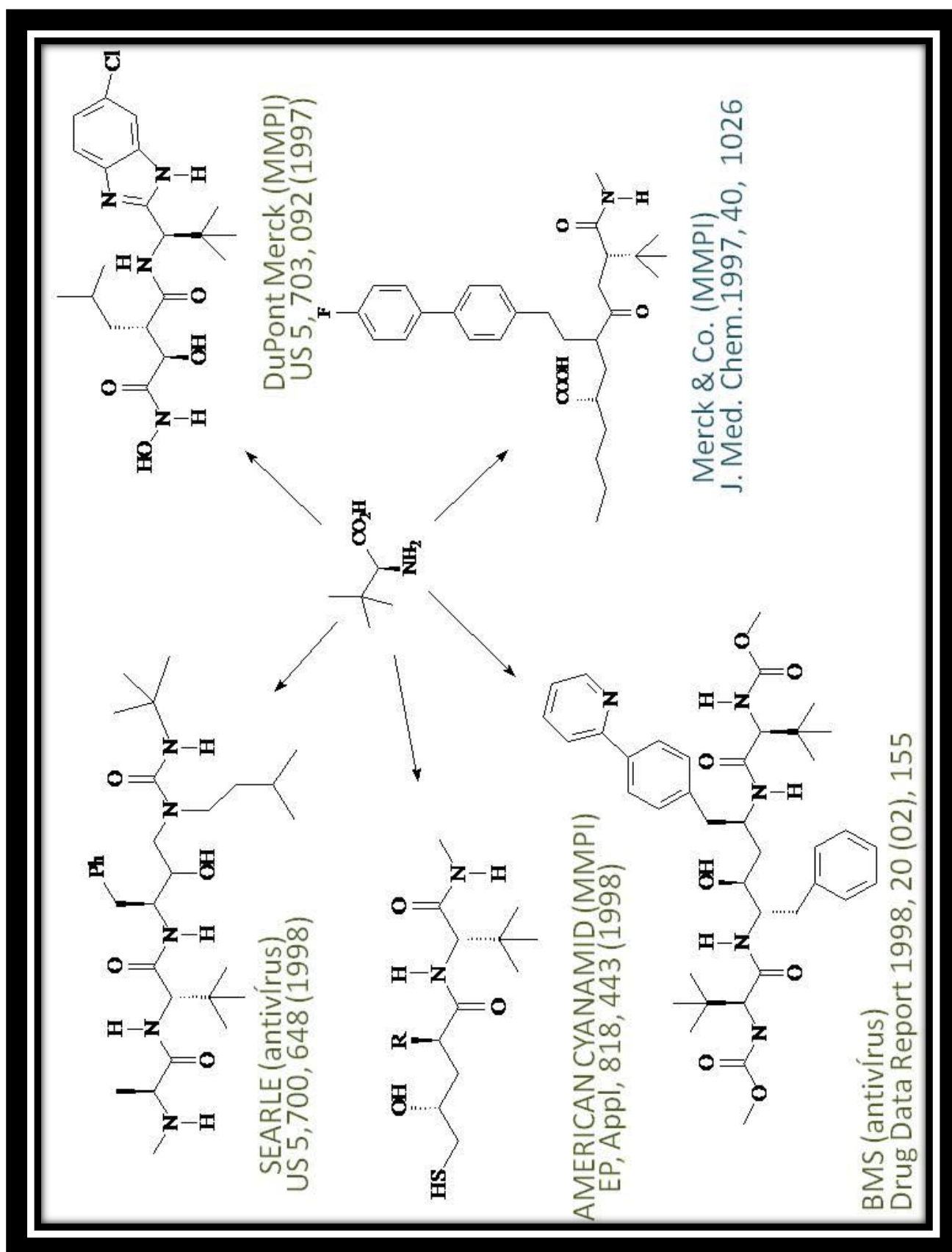


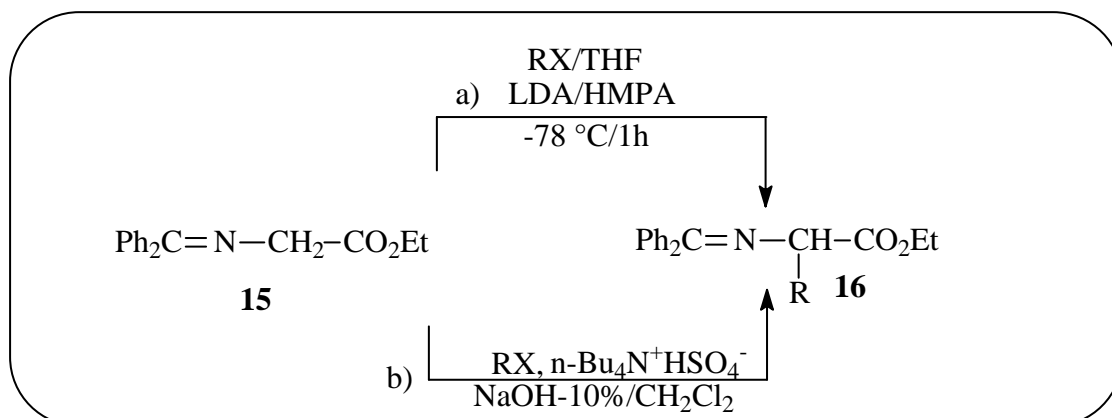
Figura 6. L-ter-Leucina como precursor de vários fármacos importantes.

## 2.11 SÍNTESE DE PRECURSORES DE $\alpha$ -AMINOÁCIDOS VIA REAÇÃO DE C-ALQUILAÇÃO

Várias são as referências que citam a reação de C-alkilação fazendo uso da CTF para a síntese de precursores de  $\alpha$ -aminoácidos. O'Donnel e seu grupo, foram os pioneiros com os trabalhos de C-alkilação, em 1978.<sup>70</sup> Assim como O'Donnel, a maioria dos pesquisadores fazem alusão a síntese assimétrica, com aplicação de catalisadores de transferência de fase quirais.

Em 1978, O'Donnel e colaboradores realizaram um experimento de alkilação da base de Schiff **15** derivada da benzofenona, com o éster etílico da glicina, na qual desejava observar a diferença entre a reação de C-alkilação pelo método convencional e por CTF.

A alkilação realizada pela metodologia convencional ocorreu pela adição da base de Schiff **15**, em THF, a uma solução de LDA, a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ , usando HMPA como co-solvente (Esquema 14-a). O meio reacional foi agitado por uma hora seguida da adição do haleto de alkila. Em um último passo, a temperatura foi aumentada até  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Os resultados estão sumariados na **Tabela 4**.



**Esquema 14.** Reações realizadas por O'Donnel e colaboradores para ver a diferença entre a metodologia tradicional e a CTF frente a precursores de aminoácidos.

A aplicação da CTF foi realizada em um sistema bifásico líquido-líquido contendo a base de Schiff **15** o agente transferidor de fase HTBA (hidrogenossulfato de tetrabutílamônio), haleto de alkila, uma solução aquosa de NaOH-10% e diclorometano (Esquema 14-b). A mistura reacional foi agitada

por uma noite a temperatura ambiente. Após devido tratamento, O'Donnel conseguiu obter os devidos precursores de  $\alpha$ -aminoácidos (Tabela 4).

**Tabela 4. Resultados obtidos por O'Donnel comparando as reações realizadas tradicionalmente e por CTF.**

RX	MÉTODO CONVENCIONAL	CTF
Me-I	93	89
Et-Br	87	---- <sup>a</sup>
Et-I	---- <sup>a</sup>	77
PhCH <sub>2</sub> Br	85	78
Pr-I	73	60
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> )CH-I	65	59

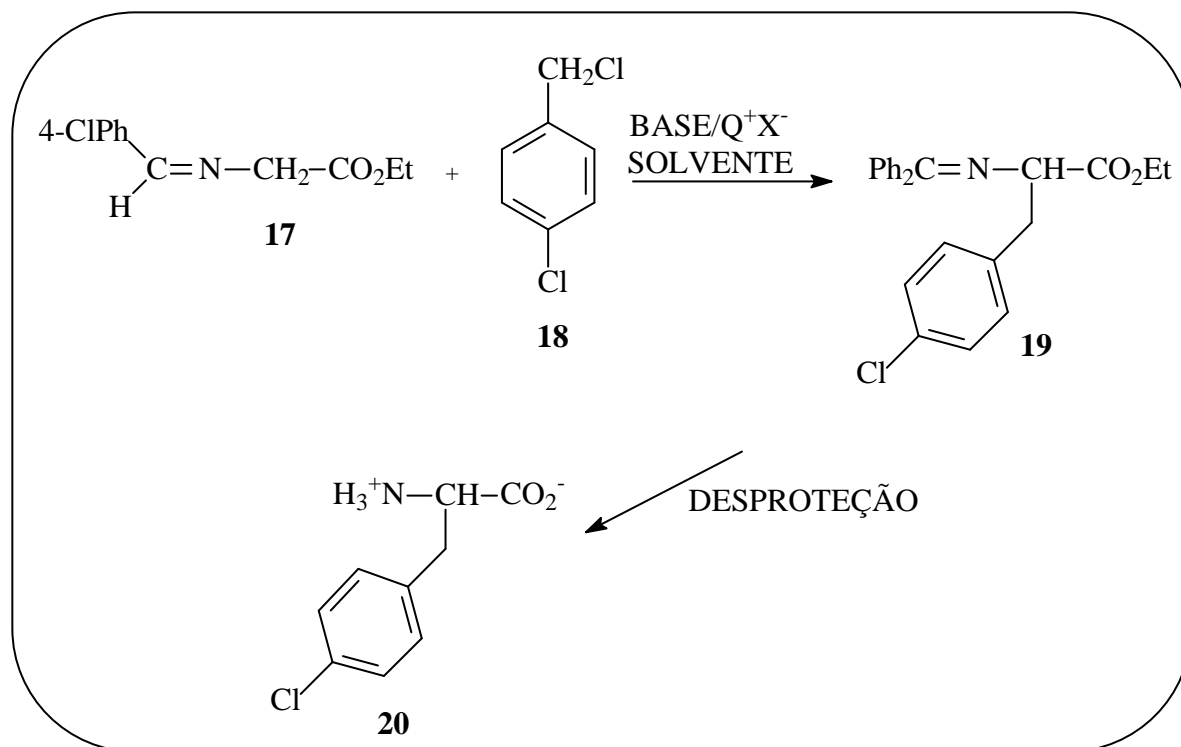
---<sup>a</sup> Não observação do produto

Por mais que os valores dos rendimentos dos produtos obtidos via CTF tenha sido ligeiramente mais baixos quando comparados com a metodologia tradicional, os autores consideraram que a alquilação por CTF é especialmente notável devido a sua simplicidade operacional, fazendo uso de reagentes mais acessíveis e solventes não anidros.

Posteriormente O'Donnel e colaboradores<sup>71</sup> realizaram uma série de reações de C-alquilação de várias bases de Schiff, seguida de hidrólise obtendo como resultado  $\alpha$ -aminoácidos. Como exemplo citaremos a reação com a base de Schiff que produziu o cloridrato do aminoácido **20**, derivado do *p*-clorobenzaldeído e o éster etílico da glicina (Esquema 15). Os autores testaram a atividade das bases hidróxidos e carbonatos de metais alcalinos. Os resultados estão na **Tabela 5**.

**Tabela 5. Resultados obtidos na alquilação da base de Schiff 17 e o haleto de alquila 18.**

BASE (Eq)/SOLVENTE	Q <sup>+</sup> X <sup>-</sup>	$\eta$ (%)
KOH (2,0) / CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	TEBA	80
NaOH <sub>(aq)</sub> -50% (2,5)	TEBA	86
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3,0) / CH <sub>3</sub> CN	TEBA	38

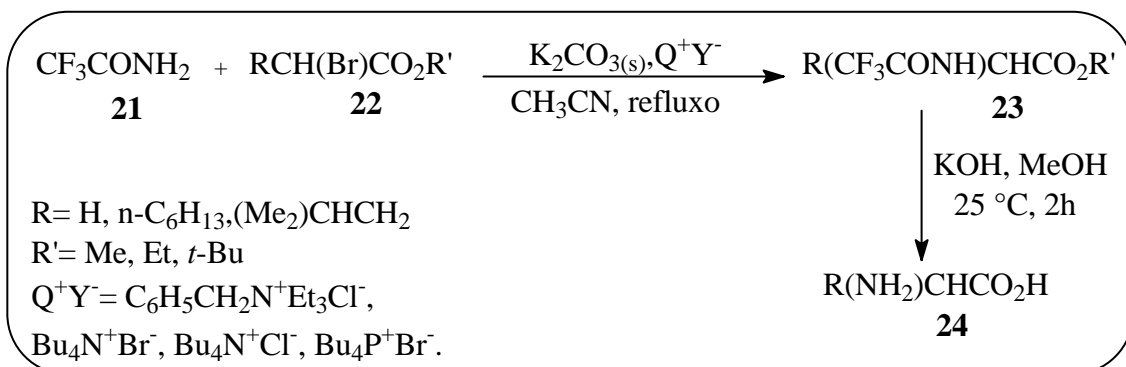


**Esquema 15. Esquema de síntese do aminoácido 20**

Através dos resultados apresentados na **Tabela 5** e de outros mencionados no trabalho<sup>67</sup> os autores concluíram que a base mais eficiente são os hidróxidos, e por seu elevado poder de basicidade resulta na não-necessidade de condições anidras.

O uso de carbonato de potássio como um efetivo agente não-nucleofílico para promover reações catalisadas por base sob condições de CTF-SL foi introduzida por Ferdorynski.<sup>72</sup>

Landini e Penso, em 1991<sup>73</sup>, relataram uma metodologia com apenas uma etapa para a *N*-alquilação da trifluoroacetamida com excelentes rendimentos. Esta mesma metodologia foi aplicada posteriormente em 1992<sup>74</sup>, para uma reação seletiva de mono *N*-alquilação da  $\text{CF}_3\text{CONH}_2$  com ésteres de alquil-2-bromo. A partir do intermediário **23** conseguiu-se hidrolisar facilmente e chegar aos respectivos aminoácidos. Este procedimento resultou em uma nova metodologia para obtenção de aminoácidos naturais e não-naturais (**Esquema 16**).<sup>74</sup>

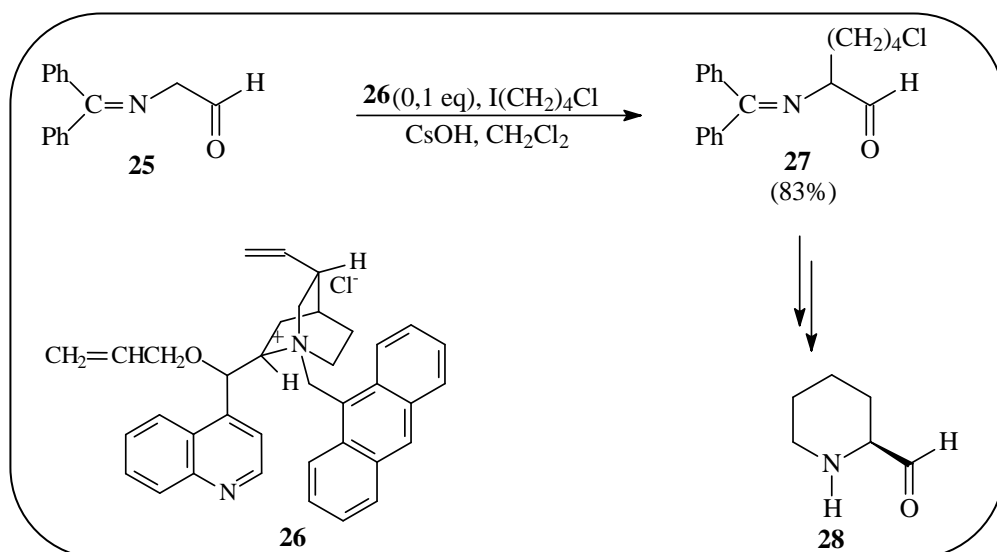


**Esquema 16. Metodologia empregada por Landini e Penson para a síntese de  $\alpha$ -aminoácidos.**

Os produtos alquilados foram isolados em 51-95% de rendimento e após a hidrólise, obtiveram os aminoácidos com rendimentos variando de 90 a 100%. O sal de amônio mais eficiente foi o TEBA. O rendimento para a reação com ausência do agente transferidor foi baixíssimo e a reação se processou de forma muito lenta.<sup>74</sup>

Ramachandran e Kumar<sup>75</sup> realizaram a síntese de vários intermediários de amidas que são precursores de ésteres piperídicos como exemplo citaremos a alquilação de **25** com 1-cloro-4-iodobutano e um agente transferidor de fase quiral **26**, usando CsOH.H<sub>2</sub>O (**Esquema 17**).

Os autores conseguiram bons resultados nos rendimentos das alquilações (de 54 a 85%) e obtendo excessos enantioméricos de até 99%.<sup>75</sup>



**Esquema 17. Síntese de glicinamidas, por reação de C-alquilação realizado por Ramachandran.**

## *Capítulo 3*

*RESULTADOS E DISCUSSÃO*

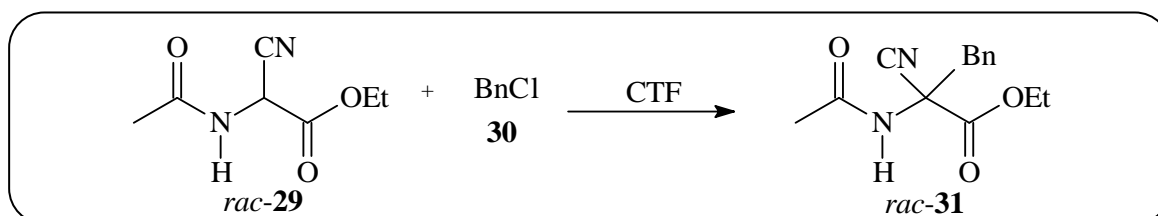
## 3. Resultados e Discussão

### 3.1 PREPARAÇÃO DOS PADRÕES PARA A REAÇÃO ENZIMÁTICA

#### 3.1.1 REAÇÃO DE C-ALQUILAÇÃO

O substrato utilizado para as reações de C-alkilação, *via* CTF, foi o cianoacetoamidoacetato de etila (*rac*-**29**), como agente alquilante usou-se cloreto de benzila (1:1). A base utilizada na reação foi carbonato de potássio (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). A temperatura do banho foi mantida a 70 °C por cinco horas (5h) utilizando como catalisador cloreto de benziltributilamônio (CBTBA) e como solvente, tolueno. Após obtenção do produto *rac*-**31**, o material bruto foi submetido à cromatografia em uma coluna suportado de gel de sílica, utilizando como eluentes misturas de hexano/acetona 8:2, 7:3 e 1:1, obtendo-se o produto isolado em 25% de rendimento.

Em um outro experimento, repetindo as condições reacionais anteriores, porém duplicando a quantidade do agente alquilante, cloreto de benzila, foi obtido o aumento de rendimento da reação para 75%, em cinco horas de reação a 70 °C (**Esquema 18**).



**Esquema 18.** Reação entre o cloreto de benzila e o cianoacetoamido acetato de etila empregando CTF como metodologia.

Outra variável estudada foi a influência do catalisador para a reação supracitada. Assim, oito catalisadores disponíveis foram testados nas mesmas condições, a saber: TEBA (Brometo de benziltriethylamônio), TBAH (Hidrogenossulfato de tetrabutylamônio), DTMA (Cloreto de dodeciltrimetilamônio), CTMA (Brometo de cetiltrimetilamônio), éter-18-coroa-6, BBTBA (Brometo de benziltributilamônio), ALIQUAT (Cloreto de tricaprilmethylamônio e cloreto de metiltriocetylamônio) e CBTBA (Cloreto de benziltributilamônio). Os resultados estão sumariados na **Tabela 6**.

**Tabela 6** Estudo de catalisadores e tempos utilizados para a reação de C – alquilação do cianoacetoamidoacetato de etila usando como agente alquilante cloreto de benzila e seus respectivos rendimentos a 70°C.

Entrada	Catalisador	Tempo (h)	Rendimento (%)
1	TEBA	5	62
2	TEBA	8	75
3	TBAH	5	59
4	DTMA	5	65
5	CTMA	5	64
6	éter-18-coroa 6	5	66
7	BBTBA	5	63
8	ALQUAT	5	66
9	CBTBA	5	75
10	CBTBA	10	75
11	CBTBA	15	75

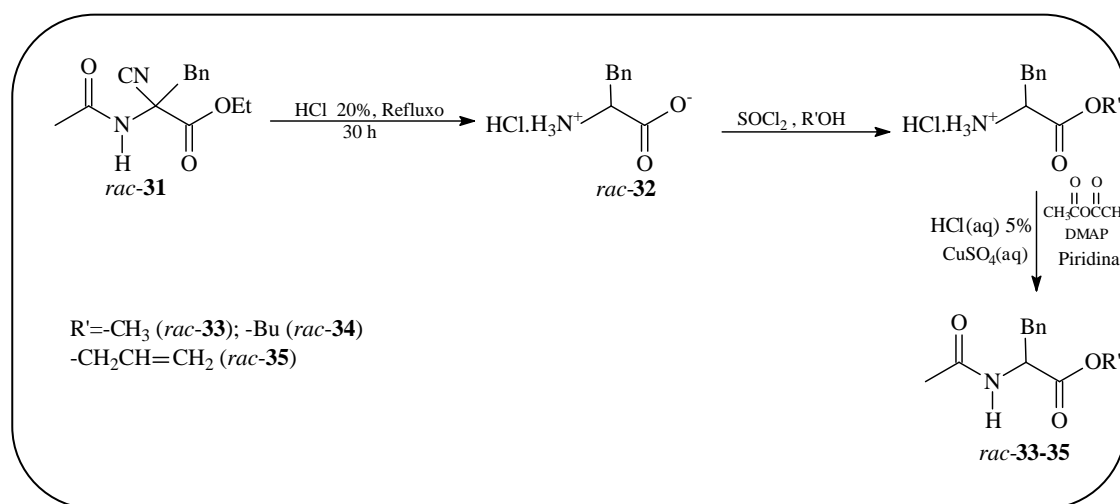
Com os resultados apresentados na **Tabela 6** (acima) foi possível concluir que o catalisador mais eficiente para esta reação foi o CBTBA, pois o produto alquilado, *rac-31*, foi obtido com 75% de rendimento em cinco horas de reação (**Tabela 6**, entrada 9).

Após a síntese do composto *rac-31* a próxima etapa consistiria na resolução cinética enzimática. Porém o *rac-31* possui um centro estereogênico do tipo quaternário. É sabido que centro estereogênicos quaternários não são facilmente resolvidos.<sup>76</sup> Dessa forma, optamos em realizar algumas transformações em *rac-31* conforme ilustrado no **Esquema 19**.



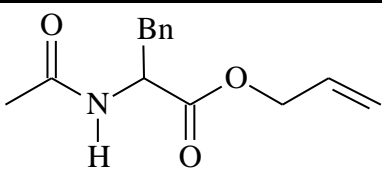
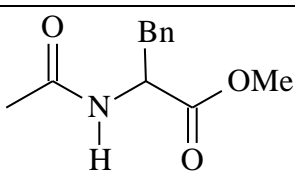
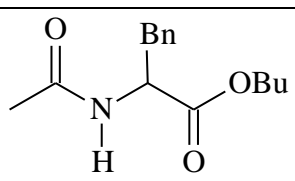
### 3.2 HIDRÓLISE, ESTERIFICAÇÃO E N-ACILAÇÃO DOS SAIS DE AMINOÁCIDOS

O precursor da fenilalanina (*rac*- **31**) foi submetido a uma reação de hidrólise total, resultando em 95% do cloridrato da fenilalanina, (*rac*-**32**). Em seguida, os grupos amino e carboxila foram protegidos. Para a reação de esterificação foram usados três alcoóis distintos, metílico, alílico e o n-butílico com a finalidade de se obter três diferentes precursores de  $\alpha$ -aminoácidos sendo os três amino-ésteres acetilados com anidrido acético (**Esquema 19**). Os resultados após as etapas de proteção estão sumariados na tabela abaixo (**Tabela 7**, p. 56).



**Esquema 19. Hidrólise, esterificação e N-acetilação do *rac*-31**

**Tabela 7. Relação entre produtos e rendimentos após a síntese de proteção dos grupos funcionais amônio e carboxila.**

PRODUTO	RENDIMENTO
	72%
	83%
	88%

### 3.3 RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA DOS PRECURSORES DA FENILALANINA ATRAVÉS DE REAÇÕES DE INTERESTERIFICAÇÃO USANDO LIPASES COMO BIOCATALISADORES.

As resoluções foram inicialmente realizadas em tetra-hidrofurano (THF) usando uma proporção 2:1 massa-massa do catalisador:substrato. As reações foram monitoradas em temperaturas de 30, 45 e 55 °C.

Esperávamos que a *Candida antarctica* lipase B (CAL-B) atuasse como biocatalisador nas reações empregadas, interesterificação e transesterificação. No entanto, o observado foi a ineficiência não apenas dela, porém de outras enzimas como a CAL-A, PSL-C I, *Candida rugosa* e Acilase I (**Tabela 8**, p. 57).

**Tabela 8. Relação de Lipases e sua capacidade de reação de interesterificação com solvente, THF, em diferentes tempos e temperaturas.**

TEMPERATURA		30 °C	45 °C	55 °C
LIPASE	TEMPO	5h	18h	5h
CAL-B		-	-	-
CAL-A		-	-	-
PSL-CI		-	-	-
<i>Candida rugosa</i>		-	-	-
LIPOZYME RM IM		+	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>
ACILASE I		-	-	-

(-) Indica na tabela a não observação de interesterificação dos precursores usando como éster o butirato de butila, enquanto o (+) indica a observação. <sup>a</sup> Detectado nas primeiras horas.

A possibilidade da resolução cinética enzimática por uma reação de transesterificação foi também avaliada usando n-butanol. Da mesma forma que resultados de interesterificação também não foi observada com a enzima CAL-B, enzima na qual é muito utilizada para reações de interesterificação e transesterificação. A reação de interesterificação só foi obtida com a LIPOZYME RM IM. Mesmo em uma temperatura relativamente alta, e por tempo de 320 horas a reação com a CAL-B não ocorreu (**Tabela 9**).

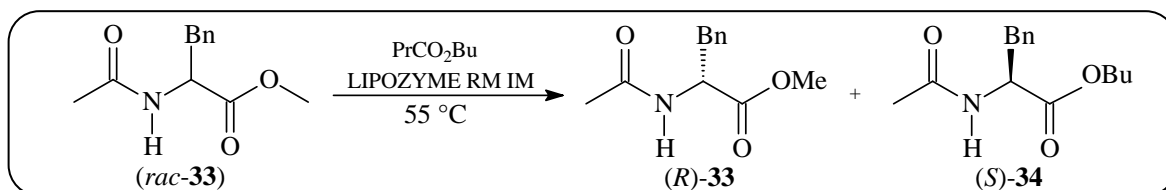
**Tabela 9. Relação entre CAL-B e LIPOZYME RM IM na reação de interesterificação com ausência de solvente.**

TEMPERATURA		30 °C	45 °C
LIPASE	TEMPO	48h	320h
CAL-B		-	-
LIPOZYME RM IM		+	+ <sup>a</sup>

(-) Indica na tabela a não observação de interesterificação dos precursores usando como éster o butirato de butila na ausência de THF. <sup>a</sup> Detectado nas primeiras horas.

A reação de interesterificação usando a LIPOZYME RM IM foi monitorada até o limite da capacidade de conversão da enzima nas temperaturas de 30, 45 e 55 °C, na presença ou ausência de solvente. Os resultados estão sumariados nas **Tabelas 10-16**.

Para a resolução a 55 °C na ausência de solvente (**Esquema 20**), os rendimentos isolados dos produtos foram 70 e 84% para os ésteres metílico e butírico, respectivamente. Para o éster (**R**)-2-acetilamino-3-fenil-propanoato de metila, (**R**)-**33**, obtivemos  $[\alpha]_D^{25} = -93,1^\circ$  (1,0, CHCl<sub>3</sub>; ee>99%), sendo da literatura,  $[\alpha]_D^{18} = -101,3$  (1,0; CHCl<sub>3</sub>; ee >99%).<sup>77</sup> Para o (**S**)-2-acetilamino-3-fenil-propanoato de butila, (**S**)-**34**,  $[\alpha]_D^{25} = +3,9^\circ$  (1,0, MeOH; ee>99%), a literatura relata  $[\alpha]_D^{25} = -7,4^\circ$  (1,0; MeOH; ee >99%)<sup>78</sup>, os resultados obtidos na reação de interesterificação estão sumariados na **Tabela 16, Gráfico 9** (p. 64 e p. 65, respectivamente).

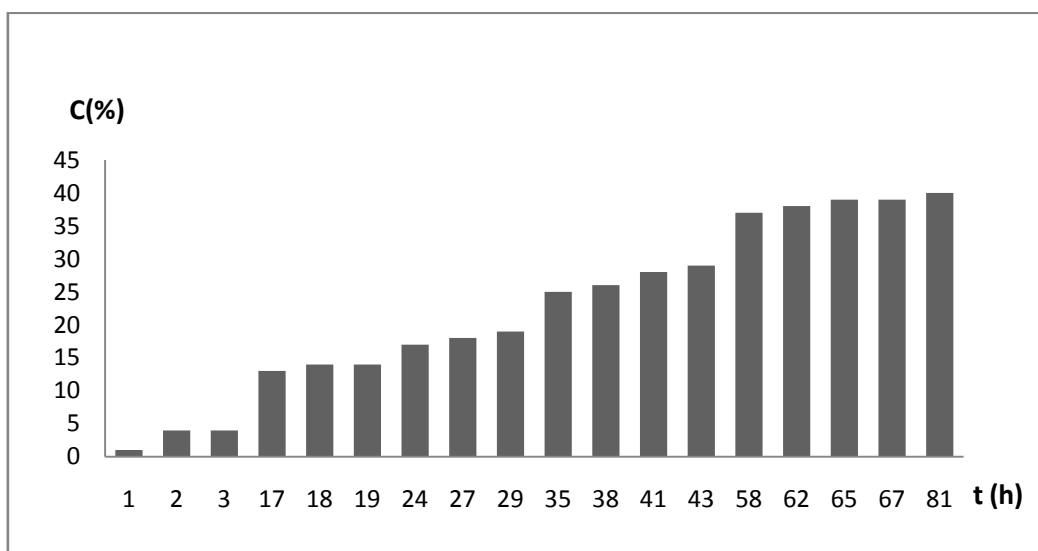


**Esquema 20. Resolução cinética do 2-acetilamino-3-fenil-propanoato de metila usando LIPOZYME RM IM.**

**Tabela 10. Reação de interesterificação usando a LIPOZYME RM IM, em THF a temperatura de 30 °C.**

t (h)	ee <sub>S</sub> (%)	ee <sub>P</sub> (%)	c (%)	E
1	0,52	>99	1	>200 (2019)
2h	4,6	>99	4	>200 (2080)
3h	4,6	>99	4	>200 (2080)
17h	15	>99	13	>200 (2316)
18h	16	>99	14	>200 (2338)
19h	16	>99	14	>200 (2338)
24h	20	>99	17	>200 (2431)
27h	22	>99	18	>200 (2479)
29h	24	>99	19	>200 (2528)
35h	34	>99	25	>200 (2789)
38h	36	>99	26	>200 (2846)
41h	39	>99	28	>200 (2933)
43h	40	>99	29	>200 (2964)

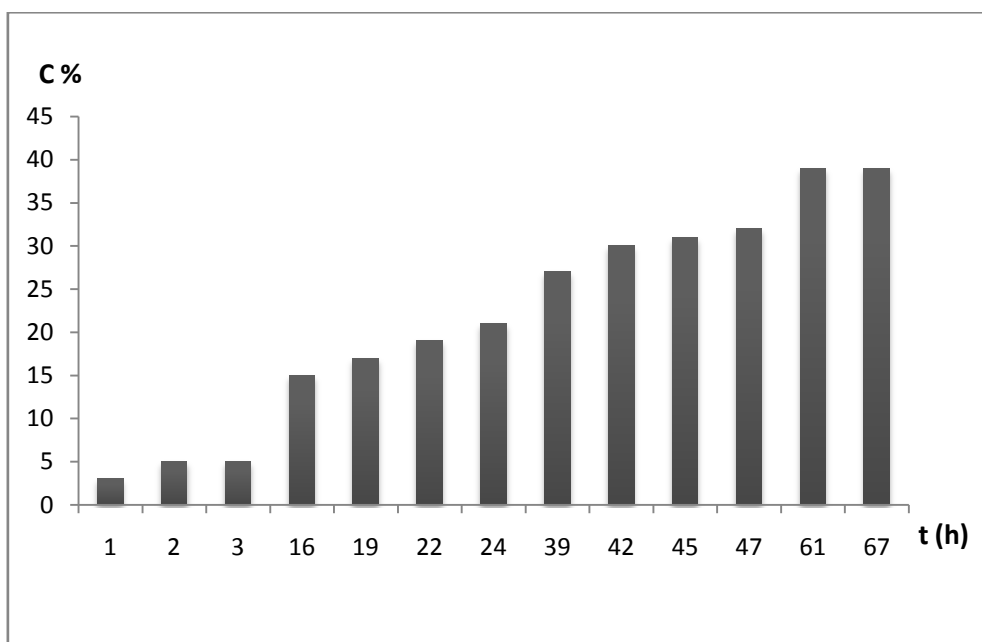
58h	58	>99	37	>200 (3607)
62h	60	>99	38	>200 (3694)
65h	63,3	>99	39	>200 (3834)
67h	63,3	>99	39	>200 (3834)
81h	66,3	>99	40	>200 (3985)



**Gráfico 4.** Relação entre conversão e tempo na reação de interesterificação do precursor de metila, em THF na temperatura de 30 °C.

**Tabela 11.** Reação de interesterificação usando a LIPOZYME RM IM, em THF a temperatura de 45 °C.

t (h)	$ee_s$ (%)	$ee_p$ (%)	c (%)	E
1h	3	>99	3	>200 (2059)
2h	5	>99	5	>200 (2100)
3h	5	>99	5	>200 (2100)
16h	17	>99	15	>200 (2361)
19h	21	>99	17	>200 (2455)
22h	23	>99	19	>200 (2503)
24h	26	>99	21	>200 (2577)
39h	37	>99	27	>200 (2874)
42h	42,4	>99	30	>200 (3025)
45h	45,3	>99	31	>200 (3121)
47h	47	>99	32	>200 (3188)
61h	63	>99	39	>200 (3834)



**Gráfico 5.** Reação de interesterificação usando a LIPOZYME RM IM, em THF a temperatura de 45 °C.

**Tabela 12.** Reação de interesterificação usando a LIPOZYME RM IM sem solvente a temperatura de 30 °C.

t (h)	ees (%)	ee <sub>p</sub> (%)	c (%)	E
1	4	>99	4	>200 (2080)
2	6,3	>99	6	>200 (2121)
3	8,1	>99	7	>200 (2163)
16	38,9	>99	28	>200 (2933)
18	41,4	>99	29	>200 (2994)
22	47,8	>99	32	>200 (3223)
24	50,5	>99	33	>200 (3294)
27	53,4	>99	35	>200 (3405)
41	74,03	>99	43	>200 (4467)
43	75,8	>99	43	>200 (4611)
46	78,8	>99	44	>200 (4852)
51	80	>99	44	>200 (4940)
69	83,1	>99	45	>200 (5236)
75	85,28	>99	46	>200 (5464)
77	85,82	>99	46	>200 (5591)
79	86,22	>99	46	>200 (5591)
91	90,5	>99	47	>200 (6212)
96	92,3	>99	48	>200 (6628)
98	93,5	>99	48	>200 (6878)
101	94,35	>99	48	>200 (7169)
117	96,7	>99	49	>200 (8493)

122	97,1	>99	49	>200 (8493)
124	97,38	>99	49	>200 (8493)

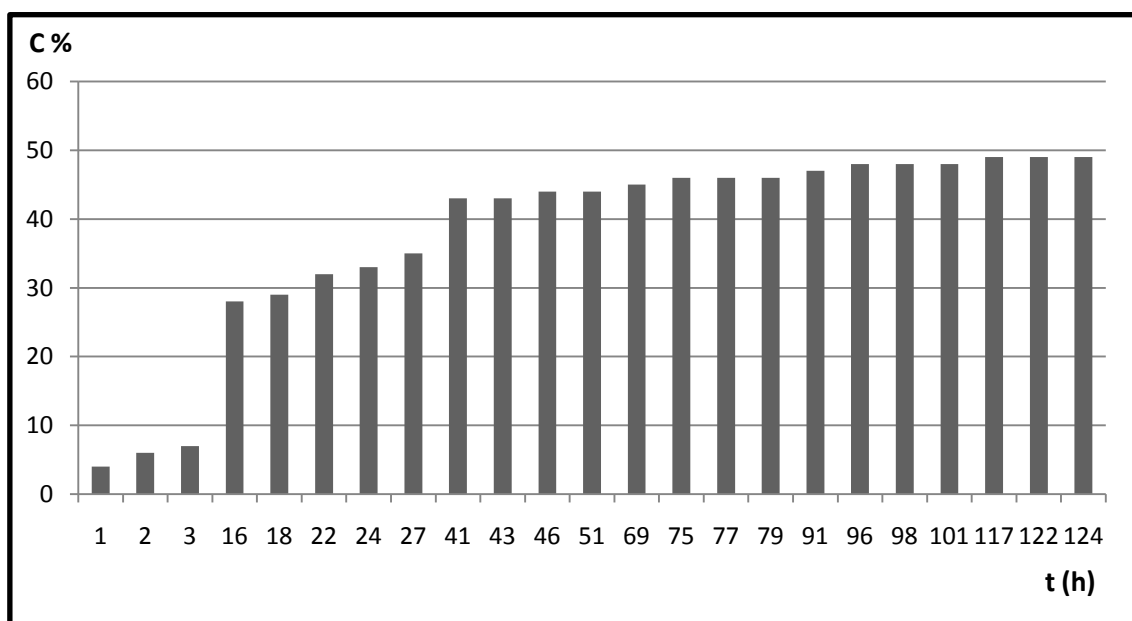
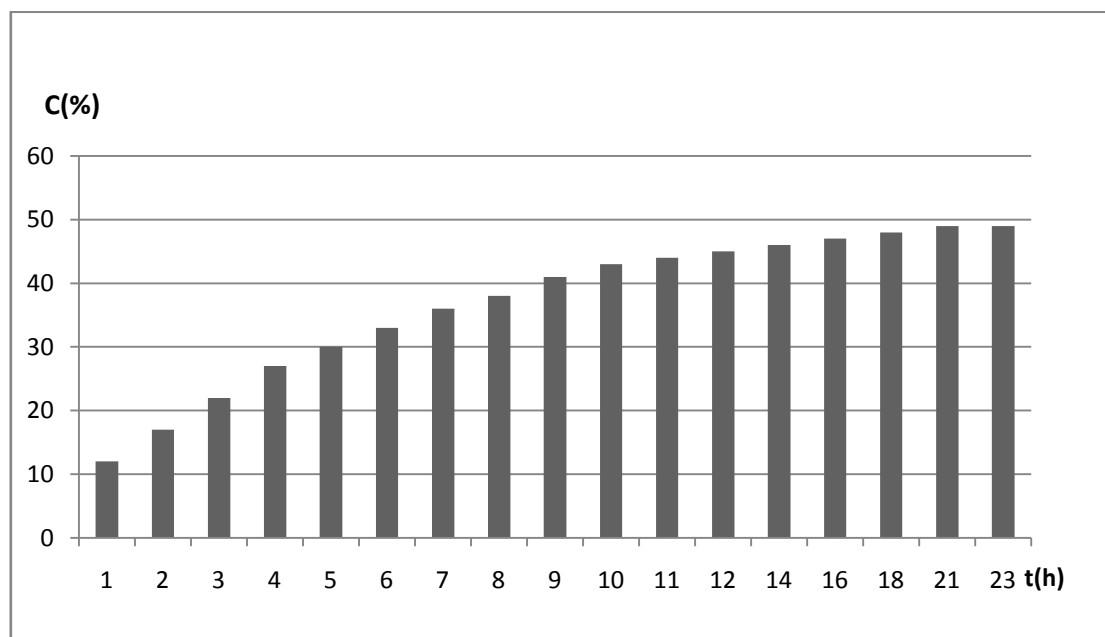


Gráfico 6. Reação de interesterificação usando a LIPOZYME RM IM sem solvente a temperatura de 30 °C.

Tabela 13. Reação de interesterificação usando a LIPOZYME RM IM sem solvente a temperatura de 45 °C.

t (h)	ees (%)	ee <sub>p</sub> (%)	c (%)	E
1	14,26	>99	12	>200 (2293)
2	21	>99	17	>200 (2455)
3	29,4	>99	22	>200 (2654)
4	37,57	>99	27	>200 (2874)
5	43,51	>99	30	>200 (3057)
6	49,64	>99	33	>200 (3294)
7	56,78	>99	36	>200 (3565)
8	60,78	>99	38	>200 (3740)
9	69,22	>99	41	>200 (4151)
10	73,74	>99	43	>200 (4467)
11	77,68	>99	44	>200 (4768)
12	80,99	>99	45	>200 (5033)
14	85,06	>99	46	>200 (5464)
16	90,51	>99	47	>200 (6212)
18	92,97	>99	48	>200 (6878)
21	94,64	>99	49	>200 (7315)
23	97,41	>99	49	>200 (8493)



**Gráfico 7.** Reação de interesterificação sem solvente usando a LIPOZYME RM IM a 45 °C.

A influência do THF (tetra-hidrofurano) para a reação foi examinada quando se avaliou as reações na presença de hexano. Dessa forma foi possível comparar THF com hexano. Através das análises das **Tabelas 10** (p. 58) e **14** (p. 62) é possível verificar que a reação de interesterificação do *rac-33* ocorre mais rápida em presença de hexano como solvente e que tal reação é ainda mais rápida na ausência de solventes (**Tabela 13**, p. 61).

**Tabela 14.** Reação de interesterificação usando a LIPOZYME RM IM com hexano a temperatura de 30 °C.

t (h)	ees (%)	ee <sub>p</sub> (%)	c (%)	E
1	14	>99	12	>200 (2293)
2	17	>99	15	>200 (2361)
3	19,59	>99	17	>200 (2431)
4	26,99	>99	21	>200 (2603)
5	27,07	>99	21	>200 (2603)
6	31,4	>99	24	>200 (2707)
7	35,63	>99	26	>200 (2846)
8	40,25	>99	29	>200 (2964)
9	47,01	>99	32	>200 (3188)
10	52,59	>99	35	>200 (3405)
11	55,75	>99	36	>200 (3523)
12	60,48	>99	38	>200 (3694)
14	66,74	>99	40	>200 (4039)
16	71,21	>99	42	>200 (4271)



18	74,1	>99	43	>200 (4467)
21	76,8	100	44	>200 (4688)
23	90,3	100	47	>200 (6212)

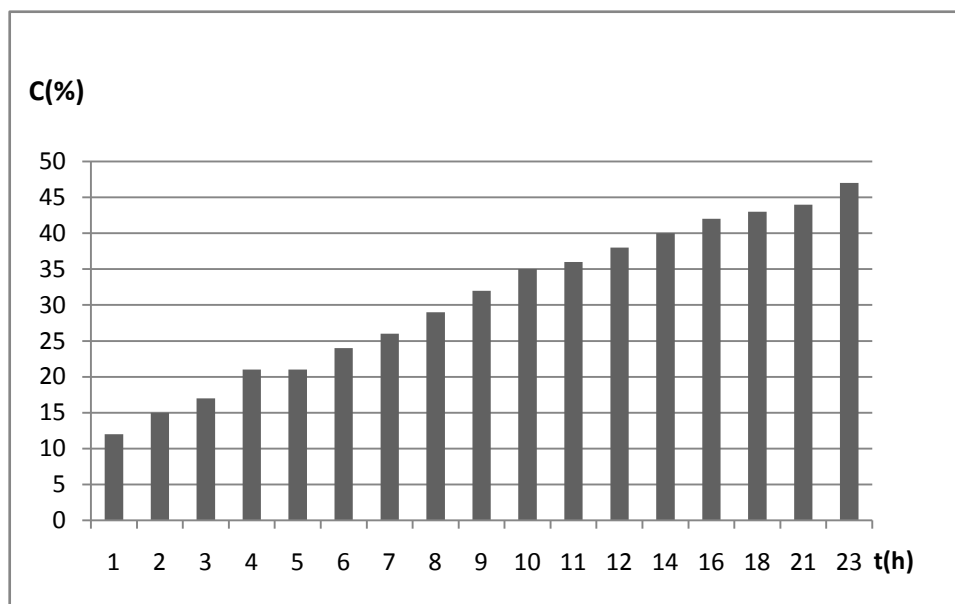
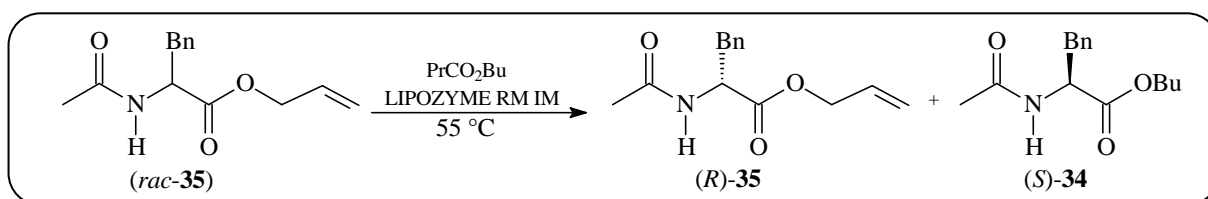


Gráfico 8. Reação de interesterificação em hexano usando a LIPOZYME RM IM a 30 °C.

A resolução cinética enzimática do 2-acetilamino-3-fenil-propanoato de alila, *rac*-**35** (**Esquema 21**), ocorre semelhante à resolução do 2-acetilamino-3-fenil-propanoato de metila, *rac*-**33**.



Esquema 21. Resolução cinética enzimática do *rac*-**35**

Para tal reação testamos o efeito da temperatura a 55 °C, e foi observado que a reação se processou em quatro horas e trinta minutos com 49% de conversão e excesso enantiomérico de 98% (**Tabela 15**). Terminada a reação o meio reacional foi submetido a uma filtração sob pressão reduzida e a enzima foi lavada com metanol. Após evaporação do solvente, realizou-se a purificação do produto bruto em coluna vertical usando gel de sílica. Os ésteres alílico e butírico foram obtidos com rendimentos de 56% e 48%, respectivamente. Para o (*S*)-2-acetilamino-3-fenil-propanoato de butila, (*S*)-**34**,

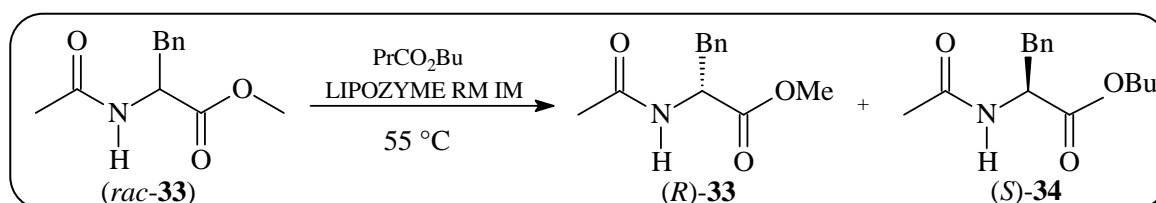
$[\alpha]_D^{25} = +3.9^\circ$  (1.0, MeOH), o relatado na literatura para o enantiômero (**R**)-2-acetilamino-3-fenil-propanoato de butila,  $[\alpha]_D^{25} = -7,4^\circ$  (1, MeOH)<sup>78</sup> e para o (**R**)-2-acetilamino-3-fenil-propanoato de alila obtido, (**R**)-**35**,  $[\alpha]_D^{25} = -34,0^\circ$  (0,9; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**Tabela 15. Resultados obtidos na resolução cinética do éster alílico do *N*-acetil-fenilamina.**

t(h)	ee <sub>s</sub> %	ee <sub>p</sub> %	C%	E
4,5	98	>99	50	>200 (9278)

Como houve coeluição de dois sinais na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (produto e substrato), não foi possível construir um gráfico para analisarmos o comportamento da reação com o tempo.

Para comparar o efeito do grupo de saída realizamos o seguinte:

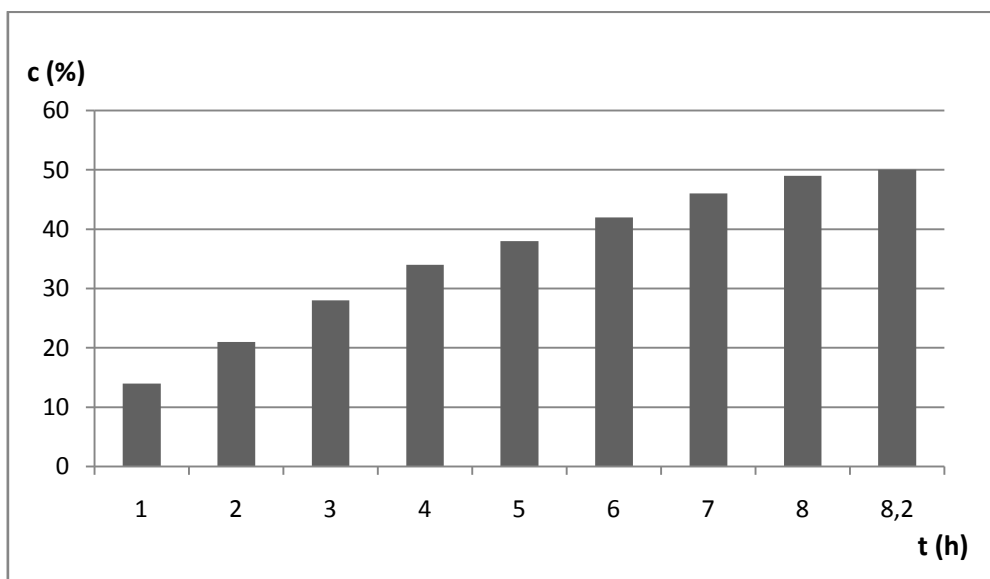


**Esquema 22. Resolução cinética enzimática do *rac*-33 a 55 °C**

Os resultados obtidos nesta resolução estão sumariados na **Tabela 16**.

**Tabela 16. Reação de interesterificação sem solvente usando a LIPOZYME RM IM, a temperatura de 55 °C.**

t (h)	ees (%)	ee <sub>p</sub> (%)	c (%)	E
1	16	>99	14	>200 (2338)
2	27	>99	21	>200 (2603)
3	39	>99	28	>200 (2933)
4	52	>99	34	>200 (3367)
5	62	>99	38	>200 (3785)
6	73	>99	42	>200 (4399)
7	85	>99	46	>200 (5591)
8	96	>99	49	>200 (7940)
8,2	>99	>99	50	>200 (10633)

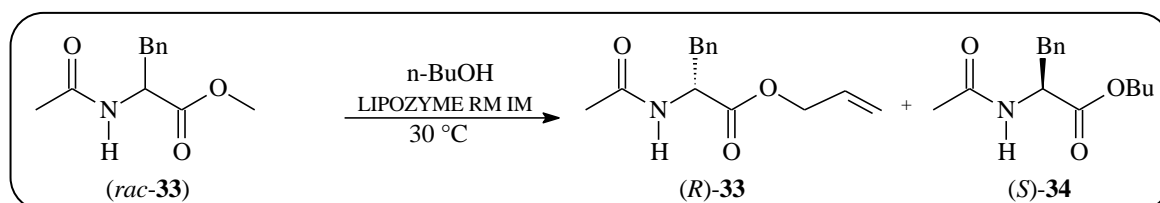


**Gráfico 9.** Reação de interesterificação usando a LIPOZYME RM IM sem solvente a temperatura de 55 °C.

Podemos verificar que para a resolução cinética usando o butirato de butila, a porção  $-OCH_2CH=CH_2$  do *rac*-**35** é melhor grupo de saída que a porção  $-OMe$  do *rac*-**33**, pois em mesmas condições o *rac*-**35** foi resolvido em quase na metade do tempo que levou o 2-acetilamino-3-fenil-propanoato de metila, *rac*-**33**.

### 3.4 RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA DOS PRECURSORES DE $\alpha$ -AMINOÁCIDOS ATRAVÉS DE REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO USANDO LIPOZYME RM IM COMO BIOCATALISADOR

A eficiência da LIPOZYME RM IM foi testada frente a alcoólise, reação de transesterificação, usando o álcool n-butílico (**Tabela 17**, p. 66).



**Esquema 13.** Reação de transesterificação do *rac*-**33** usando a LIPOZYME RM IM e álcool n-butílico.

Tabela 17. Reação de transesterificação usando o álcool n-butílico a 30°C e a LPOZYME RM IM.

t (h)	ees (%)	eeo (%)	c (%)	E
1	2	>99	2	>200 (2039)
2	2,2	>99	2	>200 (2039)
3	2,3	>99	2	>200 (2039)
16	12,7	>99	12	>200 (2271)
18	12,7	>99	12	>200 (2271)
22	14,4	>99	12	>200 (2293)
24	16,05	>99	14	>200 (2333)
27	18,79	>99	16	>200 (2408)
41	29,38	>99	22	>200 (2408)
43	29,38	>99	22	>200 (2408)
46	32,35	>99	24	>200 (2734)
51	34,7	>99	25	>200 (2789)
69	42,2	>99	30	>200 (3025)
75	45,7	>99	32	>200 (3155)
77	46,3	>99	32	>200 (3155)
91	56,4	>99	36	>200 (3523)
96	58,5	>99	37	>200 (3607)
117	68,9	>99	41	>200 (4151)
124	71,3	>99	42	>200 (4271)

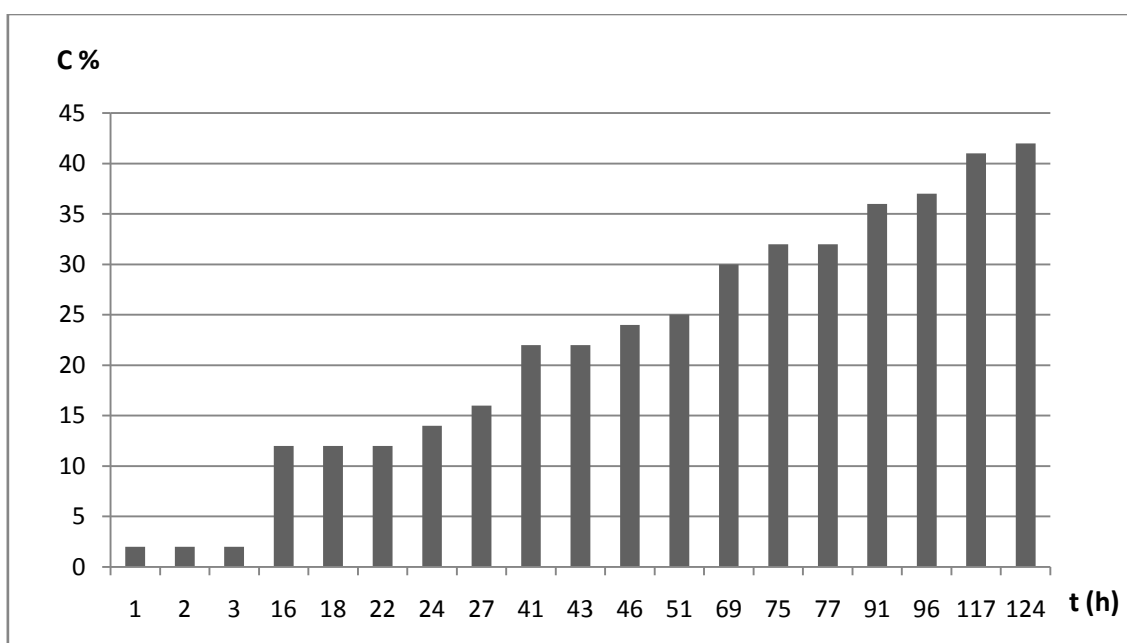
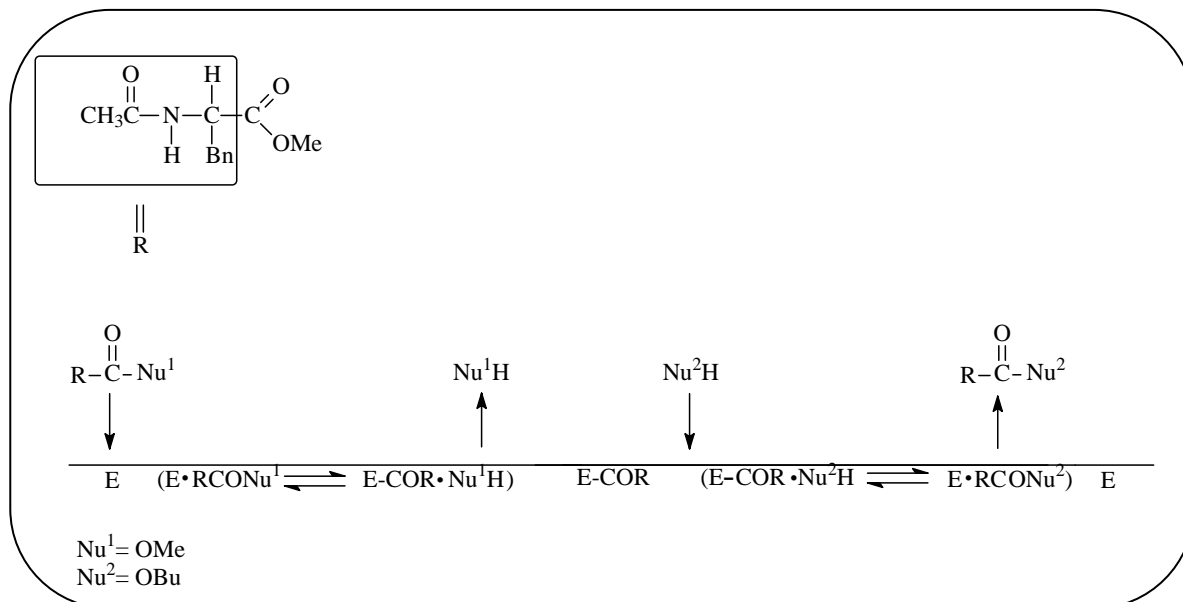


Gráfico 10. Reação de transesterificação, usando álcool n-butílico e LIPOZYME RM IM a 30 °C

Proposta de mecanismo da resolução cinética pela reação de transesterificação citado por Kanerva para resolução de  $\beta$ -aminoácidos:



**Figura 7. Proposta mecanística para a reação de transesterificação usando a LIPOZYME RM IM.**

A reação de transesterificação não se mostrou como uma boa alternativa para a resolução cinética enzimática dos tais precursores da fenilalanina, uma vez que levou 124h para chegar a 42% de conversão ( $E > 200$ ). Em mesmas condições de temperatura (30 °C) e tempo, a reação de interesterificação levou a uma conversão de 49% e  $E > 200$ .

## *Capítulo 4*

*CONCLUSÕES*

## 4. Conclusões

---

Em relação às reações de C-alkilação do cianoacetoamidoacetato de etila sob condições de Catálise de Transferência de Fase (CTF) é possível concluir que:

- A proporção de substrato:agente alquilante, em que o rendimento é maximizado é de 1:2, respectivamente.
- O catalisador mais eficiente foi o cloreto de benziltributilamônio.

Para as resoluções cinéticas podemos constatar que a enzima propícia para a reação de interesterificação dos precursores da fenilalanina é a LIPOZYME RM IM, uma vez que outras lipases foram testadas (PSL C-I, *Candida rugosa*, Acilase), assim como a CAL-B e sua isoenzima, CAL-A, e nenhuma delas mostraram-se reativas frente ao substrato em temperaturas de 30, 45 e 55 °C em tempos reacionais de até 320 horas, para a CAL-B, pois a referida enzima tem sido relatada na literatura como principal lipase para as reações de interesterificação em  $\beta$ -aminoácidos.

Para as reações ocorridas em presença de solvente, o hexano mostrou-se mais promissor que o THF. Com a reação em hexano a 30 °C obteve-se conversão de 44% com  $E > 200$ ,  $ee_s=76,8\%$  e  $ee_p>99\%$  em 21 h. Em THF, a 45 °C levou um tempo maior (61 h) com o máximo de conversão de 39%,  $E > 200$ ,  $ee_s=63\%$  e  $ee_p>99\%$ .

Com as reações realizadas na ausência de solvente foram obtidas as melhores conversões e excelentes excessos enantioméricos ( $ee$ ). A reação ocorrida em butirato de butila revelou-se promissora a 30 °C, onde foi alcançada uma conversão de 49%,  $E > 200$ ,  $ee_s= 97,4\%$  e  $ee_p>99\%$  em 124h. O aumento de temperatura para 45 °C favoreceu a reação e conseguiu-se chegar a 49% de conversão,  $E > 200$ ,  $ee_s= 94,7\%$  e  $ee_p>99\%$  em 21h.

A possibilidade de uma reação de transesterificação também foi avaliada, na qual comparada com a reação de interesterificação em mesmo tempo, 124h, e temperatura de 30 °C, não se revelou promissora, onde foi obtida uma

conversão de 42%,  $E > 200$ ,  $ee_s=71,3\%$  e  $ee_p>99\%$ . Para a interesterificação sem solvente, foi conseguida uma conversão de 49%,  $E > 200$ ,  $ee_s=97,4\%$  e  $ee_p>99\%$  em 21h a temperatura constante de 45 °C.

A resolução cinética do 2-acetilamino-3-fenil-propanoato de alila (*rac*-**35**) ocorreu em quatro horas e trinta minutos, sem solvente e a temperatura de 55 °C, resultando em 49% de conversão, excesso enantiomérico do substrato  $>98\%$ ,  $ee_p>99\%$  e enantiosseletividade maior que 200, a reação teve que ser finalizada antes de alcançar 50% de conversão (valor máximo para conversão em uma resolução cinética), porque o produto formado co-eluiu com o enantiômero *R*-acetilamino-3-fenil-propanoato de alila não-reagente, impossibilitando de verificarmos excesso enantiomérico do substrato nos cromatogramas de CLAE. Em mesmas condições o 2-acetilamino-3-fenil-propanoato de metila (*rac*-**33**) levou oito horas e quinze minutos para atingir uma conversão de 50%,  $ee_s>99\%$ ,  $ee_p>99\%$  e com um alto valor de enantiosseletividade,  $E > 200$ .



## *Capítulo 5*

*PARTE EXPERIMENTAL*

## 5. *Parte Experimental*

---

### 5.1 INSTRUMENTOS

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) uni-(1D) foram adquiridos em um espectrômetro Bruker DRX 500, operando a 500 MHz para hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ), e 125 MHz para carbono-13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ) com pulso de frequência e transformada de Fourier.

Os dados de ponto de fusão (p.f.) foram obtidos no aparelho de MQAPF-302, aparelho digital de ponto de fusão, Microquímica Equipamentos LTDA.

Os acompanhamentos das reações foram feitas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca SHIMADZU-10A com detector de UV-VIS no comprimento de onda de 254 nm acoplado a uma coluna quiral OD-H suportado com uma fase estacionária de celulose tris-(3,5-dimetilfinilcarbamato) revestido em 5  $\mu\text{m}$  de sílica-gel, de tamanho 150 mm x 4.6 mm $\Phi$  (L x D.I.)

As medidas de Rotação Específica e Rotação Ótica foram feitas em um polarímetro Perkin-Elmer 341 digital.

Os espectros de absorção na região infravermelho (I.V.) foram registrados em um espectrofotômetro Perkin-Elmer, modelo 1000.

### 5.2 SOLVENTES E REAGENTES

#### 5.2.1 SOLVENTES UTILIZADOS

Tolueno, álcool etílico, álcool metílico, éter etílico, álcool alílico, álcool n-butílico, acetona, hexano, diclorometano, clorofórmio todos de procedência Synth. THF (tetra-hidrofurano), grau HPLC, de procedência MERCK.

### 5.2.2 REAGENTES UTILIZADOS

- Cianoacetoamidoacetato de etila ( $C_7H_{10}N_2O_3$ ) comercial, de procedência ALDRICH.
- Carbonato de potássio ( $K_2CO_3$ ) comercial, de procedência VETEC.
- Cloreto de benzila ( $C_7H_7Cl$ ) comercial, de procedência SIGMA.
- Cloreto de tionila ( $SOCl_2$ ) comercial, procedência MERCK.
- Ácido clorídrico (HCl) comercial, de procedência DINÂMICA.
- Bicarbonato de sódio ( $NaHCO_3$ ) comercial, de procedência VETEC.
- Ácido butanóico ( $C_4H_8O_2$ ) comercial de procedência PROANALYSI.
- Álcool n-butílico ( $C_4H_9OH$ ) comercial de procedência VETEC.
- Anidrido acético ( $C_4H_6O_3$ ) comercial, de procedência DINÂMICA.
- Piridina ( $C_5H_5N$ ) comercial, de procedência DINÂMICA.
- Sulfato de cobre ( $CuSO_4$ ) comercial, de procedência VETEC.
- Butirato de alila ( $C_6H_{10}O_2$ ) comercial de procedência ALDRICH CHEMICAL Comp.
- Butirato de butila ( $C_8H_{16}O_2$ ) sintetizado conforme procedimento da literatura.<sup>37</sup>

### 5.3 CATALISADORES E BIOCATALISADORES UTILIZADOS

- Cloreto de N-benziltributilamônio (CBTBA) comercial, de procedência FLUKA;
- Brometo de benziltributilamônio (BBTBA) comercial, de procedência MERCK;
- Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTMA) comercial, de procedência MERCK;
- Éter 18-coroa-6, comercial, de procedência MERCK;
- Brometo de trietilbenzilamônio (TEBA) comercial, de procedência MERCK;

- Hidrogenossulfato de tetrabutilamônio (TBAH) comercial, de procedência MERCK;
- Dodecil trimetilamônio (DTMA) comercial, de procedência SIGMA-ALDRICH;
- Cloreto de tetraoctilamônio (ALIQMAT) comercial, de procedência MERCK.
  
- *Candida antarctica* Lipase B (7300 PLU/g) ou NOVOZYME 435, de procedência NOVOZYME
- *Candida antarctica* Lipase A de procedência NOVOZYME.
- Lipase a partir da *Candida rugosa* de procedência SIGMA.
- LIPOZYME RM IM de procedência NOVO NORDISK.
- Dimetilaminopiridina (DMAP) comercial, de procedência ACROS ORGANIC.
- Acylase I a partir de *Aspergillus melleus* de procedência SIGMA-ALDRICH.
- *Pseudomonas cepacia* lipase PSL-C I (1638 U/g) de procedência SIGMA-ALDRICH.

#### 5.4 ADSORVENTES UTILIZADOS

As cromatografias em coluna vertical foram efetuadas utilizando sílica gel 70-230 mesh, comercial, de procedência VETEC. Nas cromatografias de camada delgada (CCD) foi empregada sílica gel 60 G 5-40 µm comercial, de procedência VETEC.

#### 5.5 PRÉ-TRATAMENTO DE SOLVENTES PARA AS REAÇÕES DE BIOCATÁLISE

O tetra-hidrofurano foi tratado com adição contínua de sódio metálico na presença de benzofenona em refluxo até atingir coloração azul escura.

O hexano grau CLAE, foi tratado através de adição de peneiras moleculares ativadas.

## 5.6 SÍNTESE DOS PADRÕES PARA A RESOLUÇÃO CINÉTICA.

### 5.6.1 PROCEDIMENTO GERAL PARA ALQUILAÇÃO DO CIANOACETOAMIDOACETATO DE ETILA USANDO CTF-LL

A um balão de fundo redondo de 10,0 mL, equipado com um agitador mecânico, adicionou-se 3mmol de cianoacetamidoacetato de etila (*rac*-**29**), 3 mmol de carbonato de potássio, 6 mmol do agente alquilante, 10% em mol do agente transferidor de fase, sais de amônio, e 3 mL de tolueno. Introduziu-se o balão num banho de glicerina. A mistura reacional foi mantida, sob agitação vigorosa, a 70 °C por 5 a 15 horas. Verificou-se a formação do produto por cromatografia de camada delgada. Após finalizar a reação, diluiu-se a mistura com adição de 20,0 mL de clorofórmio e lavou-se com água destilada. Secou-se o extrato orgânico com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtrou-se e evaporou-se o solvente sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado através de cromatografia em coluna suportada com gel de sílica.

#### 5.6.1.1 ALQUILAÇÃO DO CIANOACETAMIDOACETATO DE ETILA SEGUINDO O PROCEDIMENTO 5.6.1 USANDO O CLORETO DE BENZILA COMO AGENTE ALQUILANTE.

Fazendo-se uso da metodologia de CTF-LL, sob aquecimento convencional, com agitação mecânica, realizou-se a reação entre o cianoacetamidoacetato de etila (*rac*-**29**) com o cloreto de benzila (**30**), quantidades catalíticas de TEBA como agente de transferência de fase. O produto foi purificado da mesma forma que o citado no procedimento 5.6.1, obtendo-se um rendimento de 25% do 2-acetilamino-2-ciano-3-fenil-propanoato de etila, *rac*-**31**, na forma de um sólido branco com ponto de fusão de 128,2-129,0 °C. Os rendimentos foram maximizados com a adição do dobro de agente alquilante (75%).

A fim de confirmar a formação do produto das reações e obter os espectros padrões, realizou-se a análise do reagente de partida, cianoacetamidoacetato de etila, e do produto 2-acetilamino-2-ciano-3-fenil-propanoato de etila, *rac*-**31**, por espectroscopia de RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-BB e DEPT 135°.

### 5.6.2 HIDRÓLISE TOTAL DO ALQUILADO

Em um balão de fundo redondo de 15 mL foi adicionado 500 mg do 2-acetilamino-3-fenil-propanoato de etila (*rac*-**31**) e 4 mL de ácido clorídrico 20%. O balão foi acoplado a um condensador de bolas e a reação ocorreu por 30 horas, sob refluxo. Em seguida, evaporou-se o solvente do meio reacional e os cristais obtidos foram lavados com éter etílico. Obteve-se um rendimento de 95% para o cloridrato da fenilalanina.

O cloridrato de fenilalanina (*rac*-**32**) foi submetido a uma reação de esterificação e acilação, respectivamente.

### 5.6.3 PROCEDIMENTO GERAL PARA A REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DO CLORIDRATO DA FENILALANINA

Em um balão de fundo redondo de 15 mL foram adicionados 1,79 mmol do cloridrato da fenilalanina, 2 mmol do cloreto de tionila e 6 mL de álcool (metanol, n-butanol ou álcool alílico). Após a adição o balão foi conectado a um tubo de cloreto de cálcio. A mistura reacional foi agitada por meia hora a temperatura de 0 °C, por uma hora a temperatura ambiente e por três horas sob refluxo. Em seguida, evaporou-se o solvente sob pressão reduzida, obtendo-se cristais do cloridrato do aminoéster, os quais foram lavados com éter etílico. Em seguida o produto bruto foi solubilizado em 30 mL de diclorometano e tratado com uma solução de bicarbonato de sódio 5%. Após a filtração, evaporou-se o solvente e obtiveram-se os produtos esterificados do cloridrato da fenilalanina (éster metílico, 99%; éster butírico, 98%; éster alílico, 96%).

### 5.6.4 PROCEDIMENTO GERAL PARA A REAÇÃO DE N-ACILAÇÃO DOS AMINOÉSTERES

Em um balão reacional de 50 mL, o éster da fenilalanina (1,77 mmol) foi diluído em 30 mL de diclorometano, adicionou-se 19,6 mmol de anidrido acético, 30 mmol de piridina e *N,N*-dimetilaminopiridino (DMAP) em quantidades catalíticas. O balão, vedado com uma rolha esmerilhada, teve o seu sistema reacional agitado por 24h. Em seguida, o meio reacional foi submetido a uma partição usando sulfato de cobre 0,4 M, seguida de partição

com ácido clorídrico 5% (v/v). A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro após filtração do secante, evaporou-se o solvente obtendo os produtos N-acilados. Finalmente realizou-se a purificação dos produtos utilizando uma coluna cromatográfica com 100 mL de hexano:acetona (9:1), 200 mL de hexano:acetona (8:2), 200 mL de hexano:acetona (7:3) e 100 mL de hexano:acetona (1:1).

## **5.7 PREPARAÇÃO DOS REAGENTES NÃO COMERCIAIS**

### **5.7.1 SÍNTESE DO BUTIRATO DE BUTILA**

A um balão de 20 mL foram adicionados 113,6 mmol de ácido butanóico, 227,2 mmol de álcool butílico e 170,4 mmol de cloreto de tionila, após a adição o balão foi acoplado a um tubo de cloreto de cálcio. Adicionou-se cloreto de tionila à mistura reacional com o balão imerso em um banho de gelo. A mistura reacional foi agitada por meia hora. Em seguida a mistura reacional ficou por uma hora a temperatura ambiente e três horas sob refluxo. Finalmente evaporou-se o solvente e o produto bruto foi submetido a cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando 50 mL de hexano:acetato de etila (9:1), 100 mL de hexano:acetato de etila (8:2) e por fim, 200 mL de hexano:acetato de etila (7:3) resultando em um rendimento de 87%.

### **5.8 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE A PARTIR DA *Candida rugosa***

Em um béquer de 50 mL foi adicionado 500 mg de PEO, poli(óxido de etileno), um polímero natural, 200 mg da enzima de procedência comercial, SIGMA 1170 U/mg e 25 mL de água destilada que foi aquecido em um banho de areia a 50 °C. O resultado foi um filme que foi cortado em pequenos pedaços e armazenado em geladeira na presença de hexano.

### **5.9 SEPARAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DOS PADRÕES EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Os enantiômeros dos padrões foram separados em uma CLAE suportado com uma coluna CHIRALCEL OD-H, 150 mm X 4,6 mm X 5 µm com fluxo de 1,0 mL/min com uma fase móvel isocrática composta de hexano:isopropanol (90:10).

## **5.10 RESOLUÇÃO CINÉTICA DOS PRECURSORES DA FENILALANINA**

### **5.10.1 RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA DOS PRECURSORES DA FENILALANINA VIA REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO USANDO SOLVENTE**

Para a resolução cinética, tendo como método a reação de interesterificação com solvente foram utilizados THF previamente tratado e hexano grau CLAE secado com peneira molecular. Em um erlenmeyer 10 mL foram adicionados 1,9 mL de solvente (sendo THF ou hexano); 50mg do substrato; 65mg (0,4524 mmol) do butirato de butila e 100mg de lipase. A reação foi monitorada em temperatura de 30, 45 e 55 °C. Inicialmente manteve-se o meio reacional e comparou-se enzimas e temperaturas. Testou-se como lipases capazes de promover a reação, Acilase I, CAL-B, CAL-A, Lipase a partir da *Candida rugosa*, PSL e a LIPOZYME RM IM. As reações foram em 30, 45 e 55 °C.

### **5.10.2 RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA DOS PRECURSORES DA FENILALANINA VIA REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO SEM SOLVENTE**

Para a resolução cinética, tendo como base a reação de interesterificação sem solvente usou-se 1,9 mL de butirato de butila; 50 mg do substrato e 100 mg de lipase. Após iniciada a reação foi retirada alíquotas de hora em hora e analisado via CLAE.

Após a reação de interesterificação, o meio reacional foi filtrado, o solvente evaporado e o produto bruto foi submetido a uma cromatografia em coluna de gel de sílica. Dessa forma, separou-se o produto obtido da interesterificação do substrato. Finalmente obteve-se as rotações ópticas específicas de cada composto.



### 5.10.3 RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA DOS PRECURSORES DA FENILALANINA VIA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO

Para a reação de transesterificação usou-se um volume de 1 mL de n-butanol (0.1 M), a reação iniciou após a adição de lipases (75 mg/mL). A reação foi acompanhada com auxílio da CLAE.

## 5.11 MÉTODOS DE ANÁLISE

### 5.11.1 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS EM CCD

Para a eluição das amostras em CCD, reagente e produto, utilizaram-se os solventes hexano/acetona (7:3).

A revelação das placas cromatográficas foram realizadas na presença de iodo.

### 5.11.2 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS:

#### 5.11.2.1 ESPECTROMETRIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN $^1\text{H}$ ) E DE CARBONO (RMN $^{13}\text{C}$ )

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  unidimensionais, foram realizados pelo Centro Nordestino Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREM) da Universidade Federal do Ceará. As dissoluções das amostras, enviadas ao CENAUREM, foram realizadas em clorofórmio ( $\text{CDCl}_3$ ). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e foram referenciadas para RMN  $^1\text{H}$  pelo pico do átomo de hidrogênio pertencente às moléculas residuais não deuteradas do clorofórmio ( $\delta = 7,27$ ) e para RMN  $^{13}\text{C}$ , pelo pico do átomo de carbono-13 do clorofórmio ( $\delta = 77,23$ ).

**OBS.:** As numerações apresentadas nas estruturas abaixo foram utilizadas apenas para a identificação dos átomos de carbono e hidrogênio e por isso, não se relaciona com a nomenclatura da IUPAC.

## DADOS ESPECTROSCÓPICOS DO CIANOACETAMIDOACETATO DE ETILA

RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1,3 (t, 3H); 2,2 (s, 3H); 4,32 (q, 2H); 5,6 (d, 1H) (Figura 8).

RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 14,1 ( $\text{C}_8$ ); 22,7 ( $\text{C}_1$ ); 43,13 ( $\text{C}_4$ ); 64,44 ( $\text{C}_7$ ); 114,2, ( $\text{C}_5$ ); 163,7 ( $\text{C}_2$ ); 169,8, ( $\text{C}_6$ ) (Figura 9).

DEPT 135° (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 14,1 ( $\text{C}_8$ ); 22,7 ( $\text{C}_1$ ); 43,13 ( $\text{C}_4$ ); 64,44 ( $\text{C}_7$ ) (Figura 10).

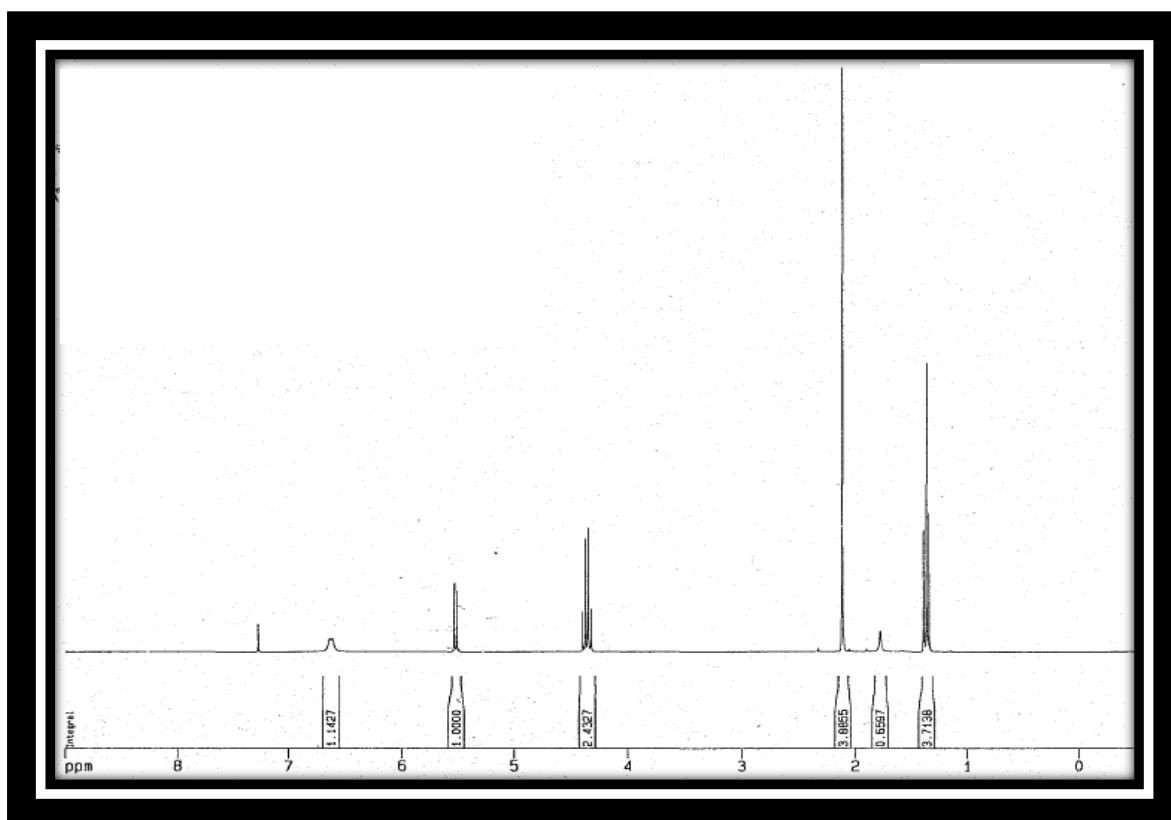
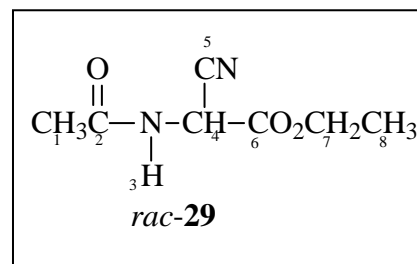


Figura 8. RMN  $^1\text{H}$  do *rac*-29 em  $\text{CDCl}_3$ .

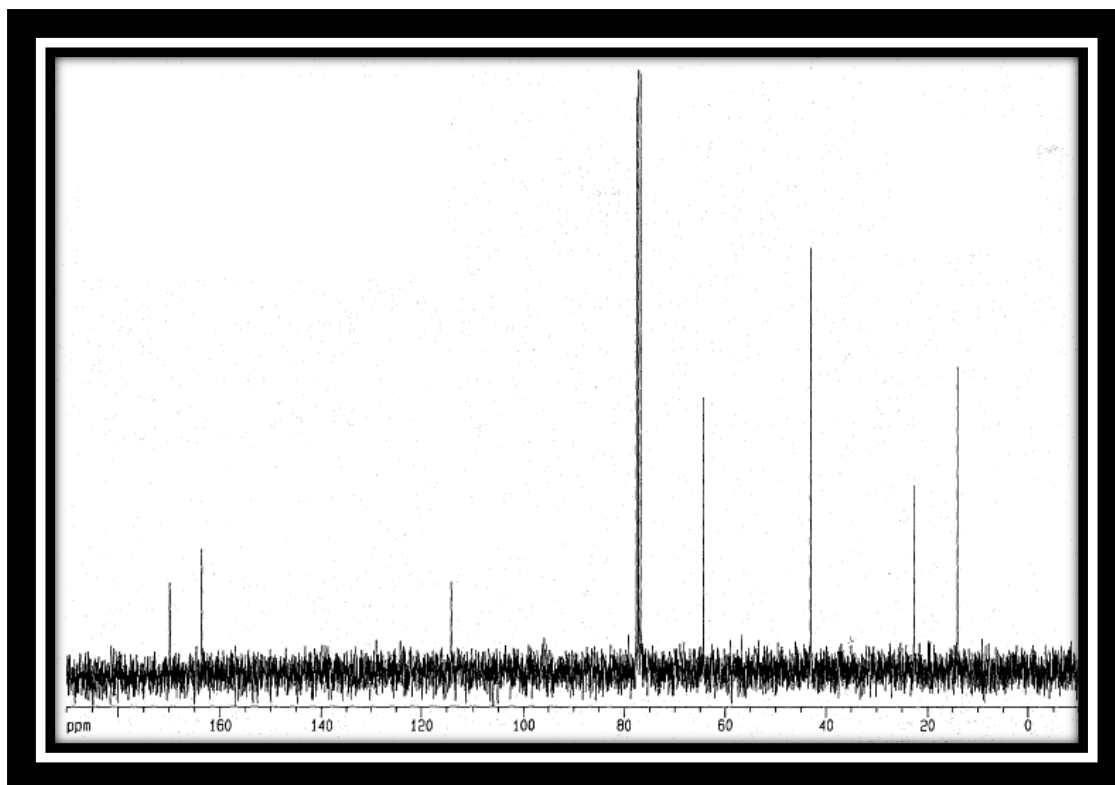


Figura 9. RMN <sup>13</sup>C -BB do *rac*-29 em CDCl<sub>3</sub>

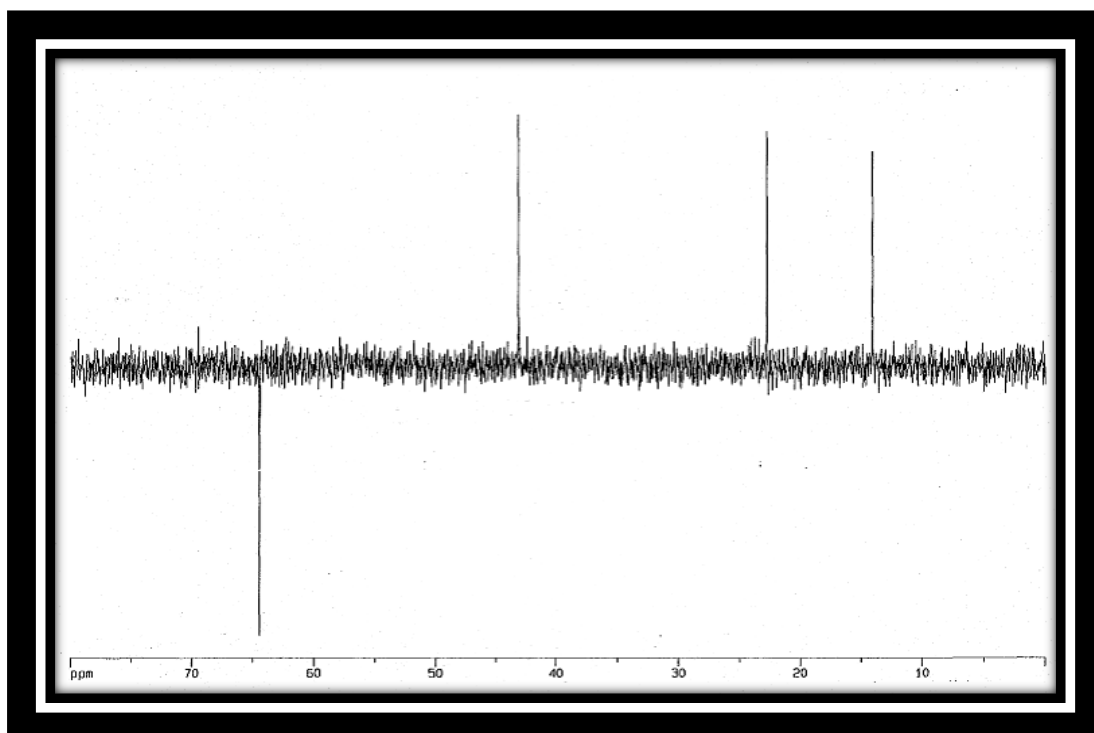


Figura 10. RMN <sup>13</sup>C DEPT-BB do *rac*-29 em CDCl<sub>3</sub>

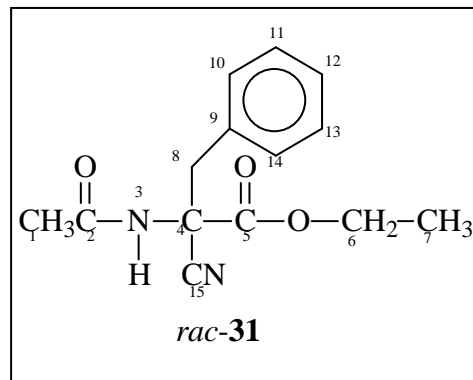
**DADOS ESPECTROSCÓPICOS DO ALQUILADO 2 (2-ACETILAMINO-2-CIANO-3-FENIL-PROPANOATO DE ETILA)**

**RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):** 1,27 (t, 3H); 2,0 (s, 3H); 3,35 (d, 1H,  $J=13$  Hz); 3,62 (d, 1H  $J= 13,5$  Hz); 4,22-4,30 (m, 2); 6,23 (s, 1H); 7,21-7,37 (m, 5H) (Figura 11).

**RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):** 14,0 ( $\text{C}_7$ ); 22,9 ( $\text{C}_1$ ); 41,6 ( $\text{C}_6$ ); 64,1 ( $\text{C}_8$ ); 116 ( $\text{C}_{15}$ ); 128,7-130,21 ( $\text{C}_{9 \text{ a } 14}$ ); 131,9 ( $\text{C}_4$ ); 165,95 ( $\text{C}_2$ ); 169,8 ( $\text{C}_5$ ) (Figura 12).

**DEPT  $135^\circ$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):** 14,0 ( $\text{C}_7$ ); 22,9 ( $\text{C}_1$ ); 41,6 ( $\text{C}_6$ ); 64,1 ( $\text{C}_8$ ); 128,7-130,21 ( $\text{C}_{9 \text{ a } 14}$ ) (Figura 13).

**I.V. (NaCl) ( $\nu\text{-cm}^{-1}$ ):** 3277 ( $\nu_{\text{N-H}}$ , def. axial); 1753 ( $\nu_{\text{C=O}}$  éster, def. axial); 1667 ( $\nu_{\text{N-H}}$  amida, def. axial); 1527 e 1439 ( $\nu_{\text{C=C}}$ , def. angular); 1220 ( $\nu_{\text{C-O}}$ , def angular); 701 e 740 ( $\nu_{\text{C-H}}$  arom., def. axial) (Figura 14).



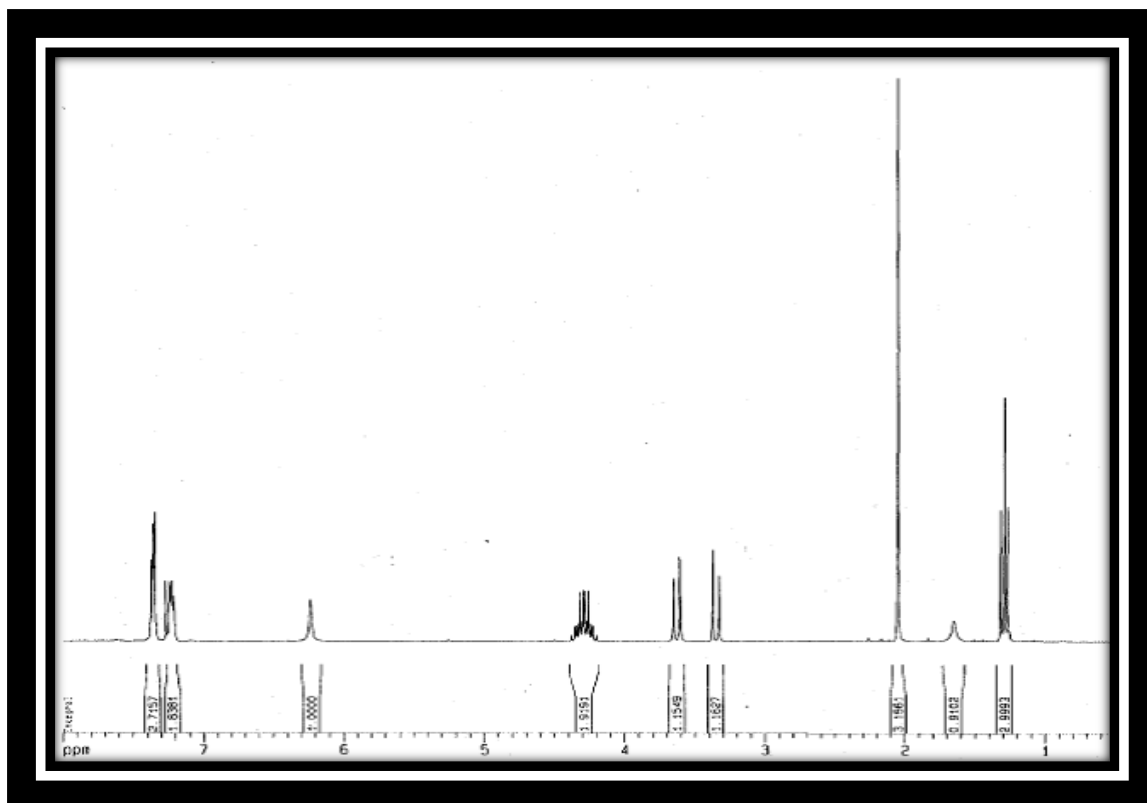


Figura 11. RMN  $^1\text{H}$  do *rac*-31 em  $\text{CDCl}_3$

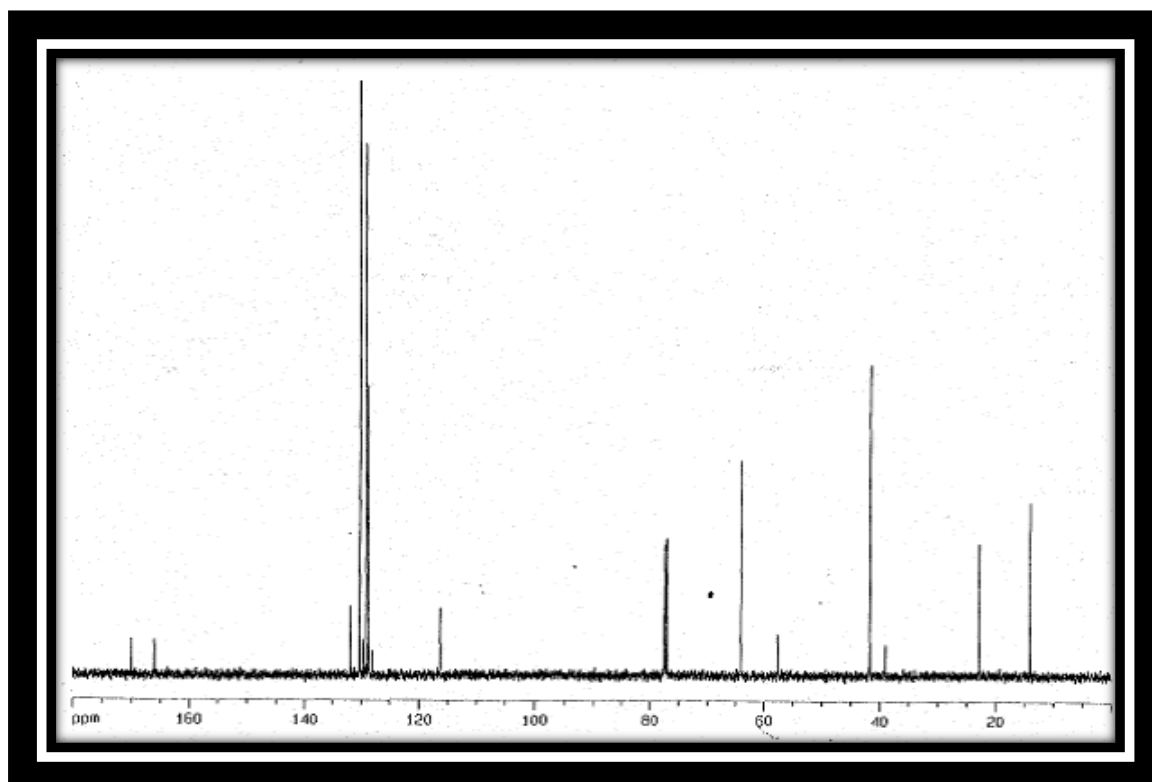


Figura 12. RMN  $^{13}\text{C}$ -BB do *rac*-31 em  $\text{CDCl}_3$

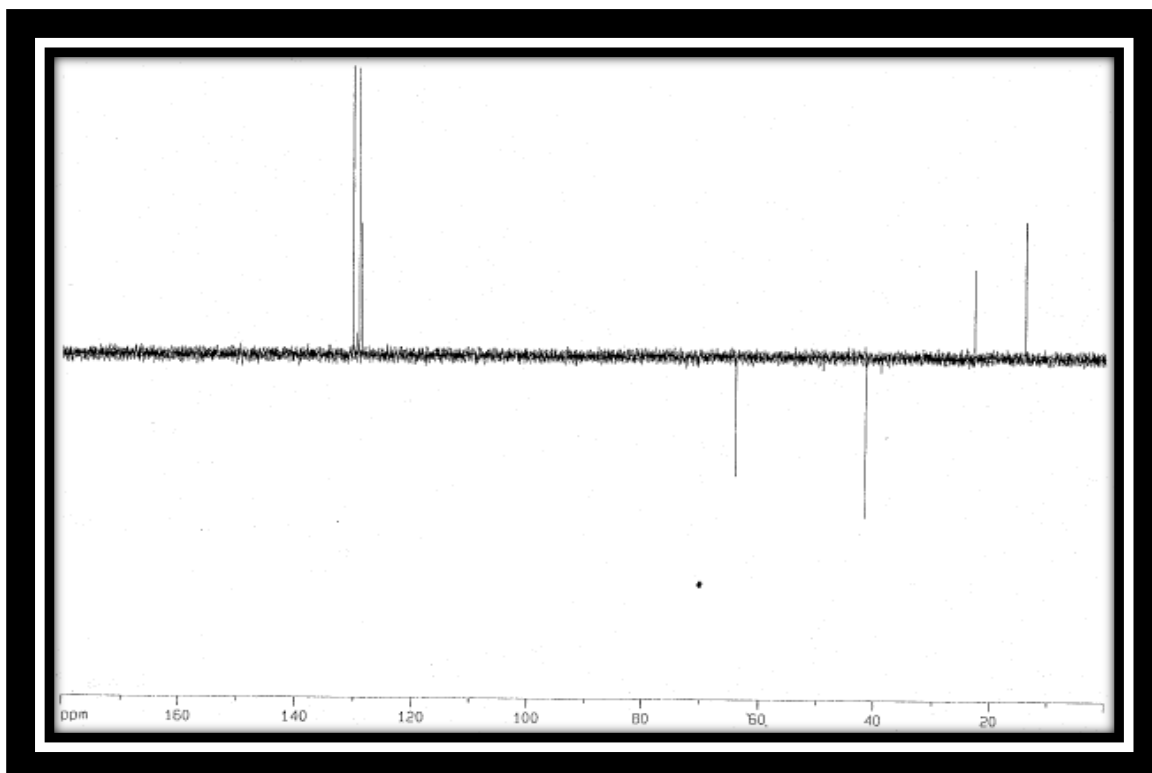


Figura 13. RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT-BB do *rac*-31 em  $\text{CDCl}_3$

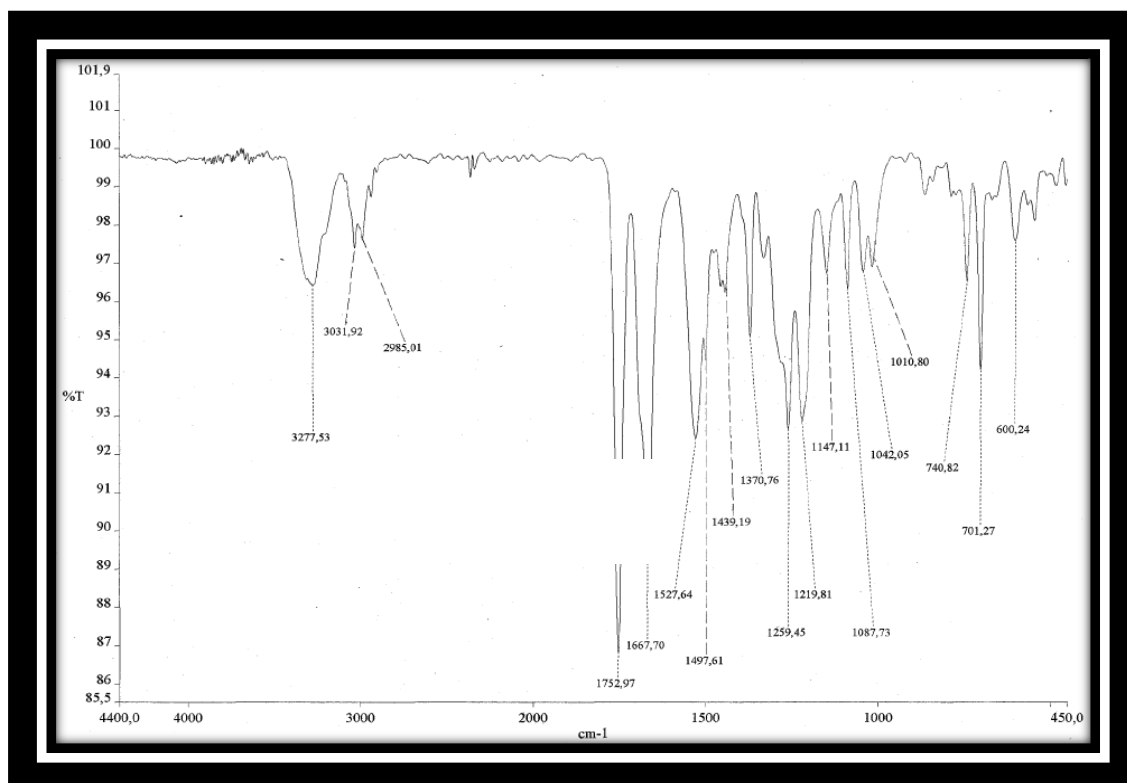


Figura 14. Espectro de I.V. do *rac*-31

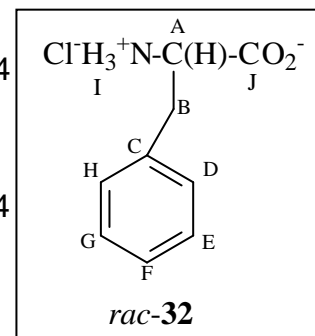
## DADOS ESPECTROSCÓPICOS DO CLORIDRATO DA FENILALANINA

**RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):** 3,17 (d, 2H); 4,11 (t, 1H); 7,26-7,34 (m, 5H); 8,58 (s, 2H) (Figura 15).

**RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):** 36,11 ( $\text{C}_\text{B}$ ); 53,69 ( $\text{C}_\text{A}$ ); 127,6-135,54 ( $\text{C}_\text{C}$ - $\text{C}_\text{H}$ ); 170,64 ( $\text{C}_\text{J}$ ) (Figura 16).

**RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):** 36,11 ( $\text{C}_\text{B}$ ); 53,68 ( $\text{C}_\text{A}$ ); 127,6-130,0 ( $\text{C}_\text{D}$ - $\text{C}_\text{H}$ ) (Figura 17).

**I.V. (NaCl) ( $\nu\text{-cm}^{-1}$ ):** 3031 ( $\nu_{\text{N-H}}$ , def. axial); 1721 ( $\nu_{\text{C=O}}$  éster, def. axial); 1656 ( $\nu_{\text{C=O}}$  amida, def. axial); 1596 e 1493 ( $\nu_{\text{C=C}}$ , def. angular); 1206 ( $\nu_{\text{C-O}}$ , def. angular); 701 ( $\nu_{\text{C-H}}$  arom., def. axial) (Figura 18).



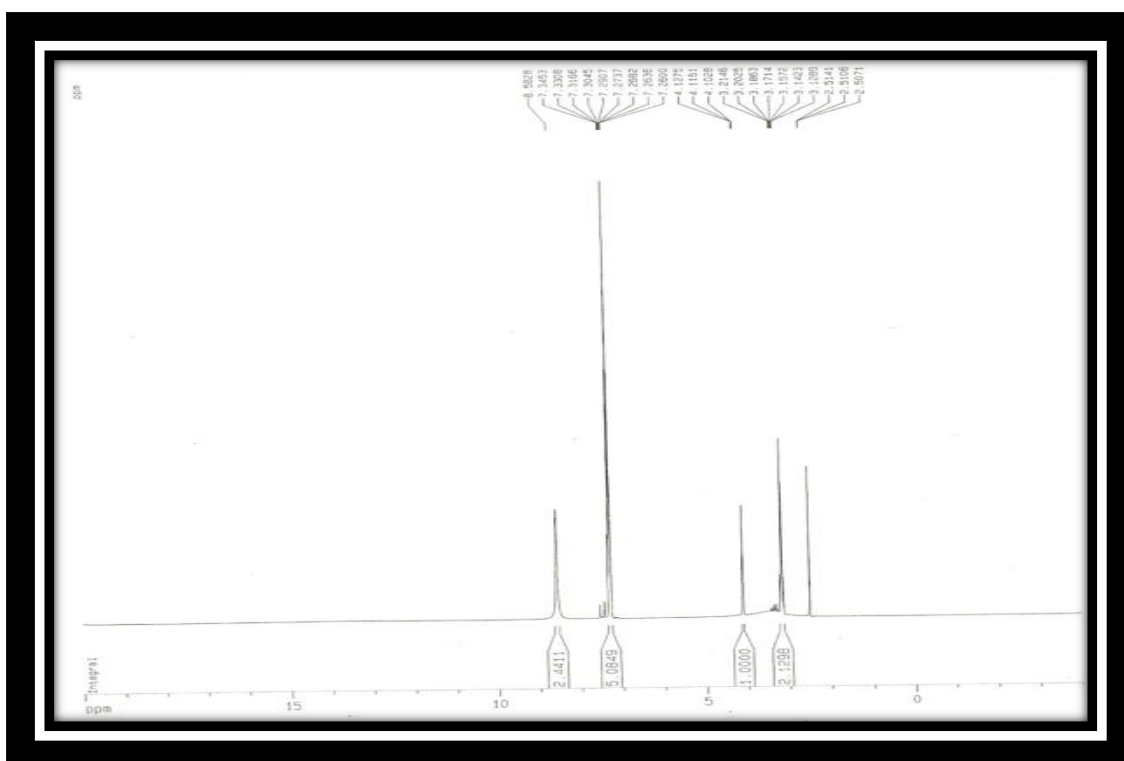


Figura 15. RMN <sup>1</sup>H do *rac*-32 em CDCl<sub>3</sub>

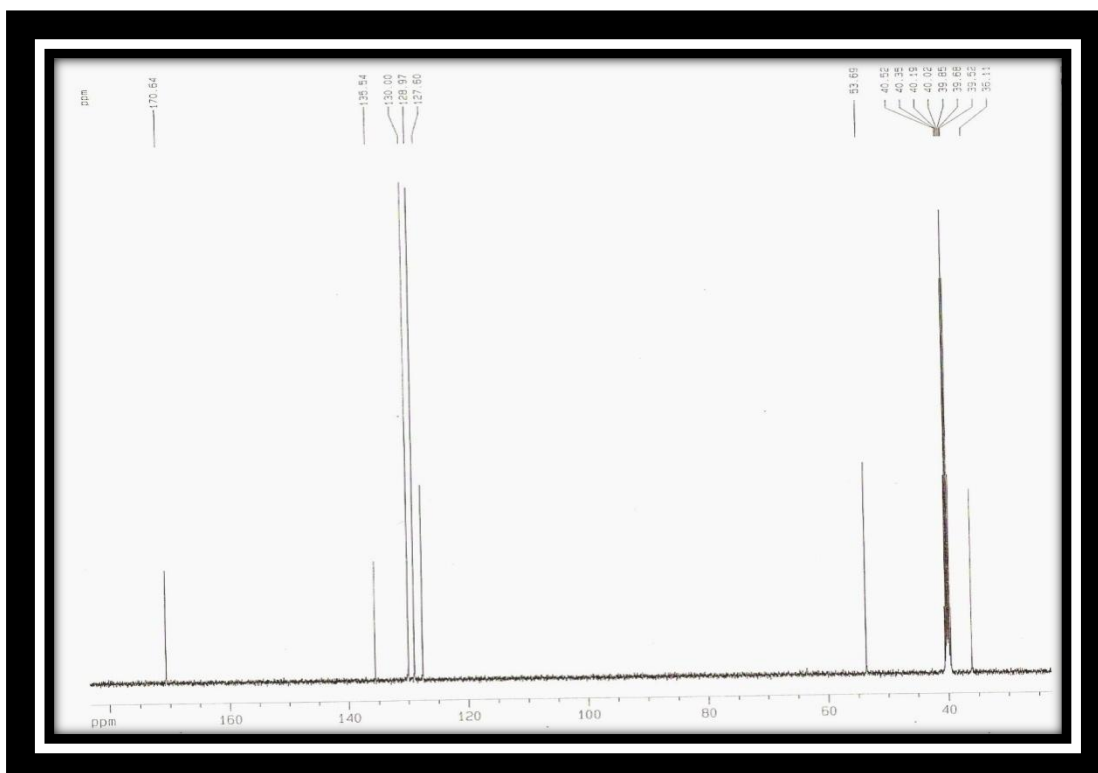


Figura 16. RMN <sup>13</sup>C do, *rac*-32 em CDCl<sub>3</sub>



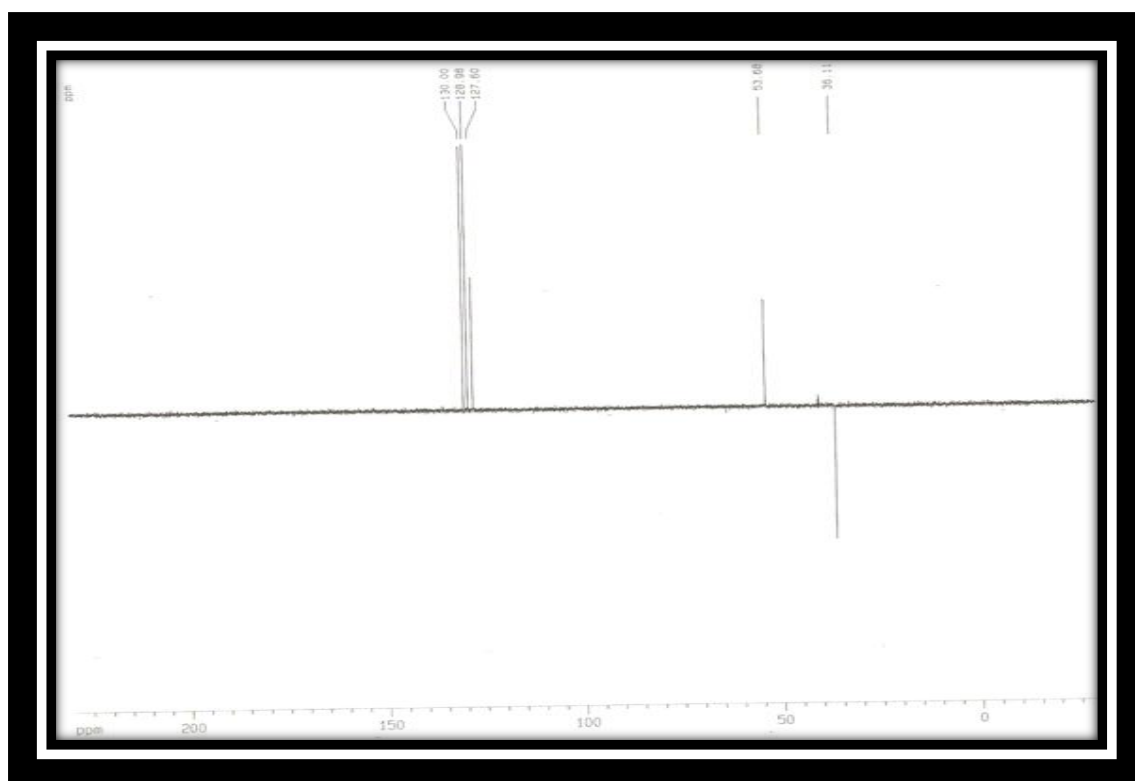


Figura 17. RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT-BB do *rac*-32 em  $\text{CDCl}_3$

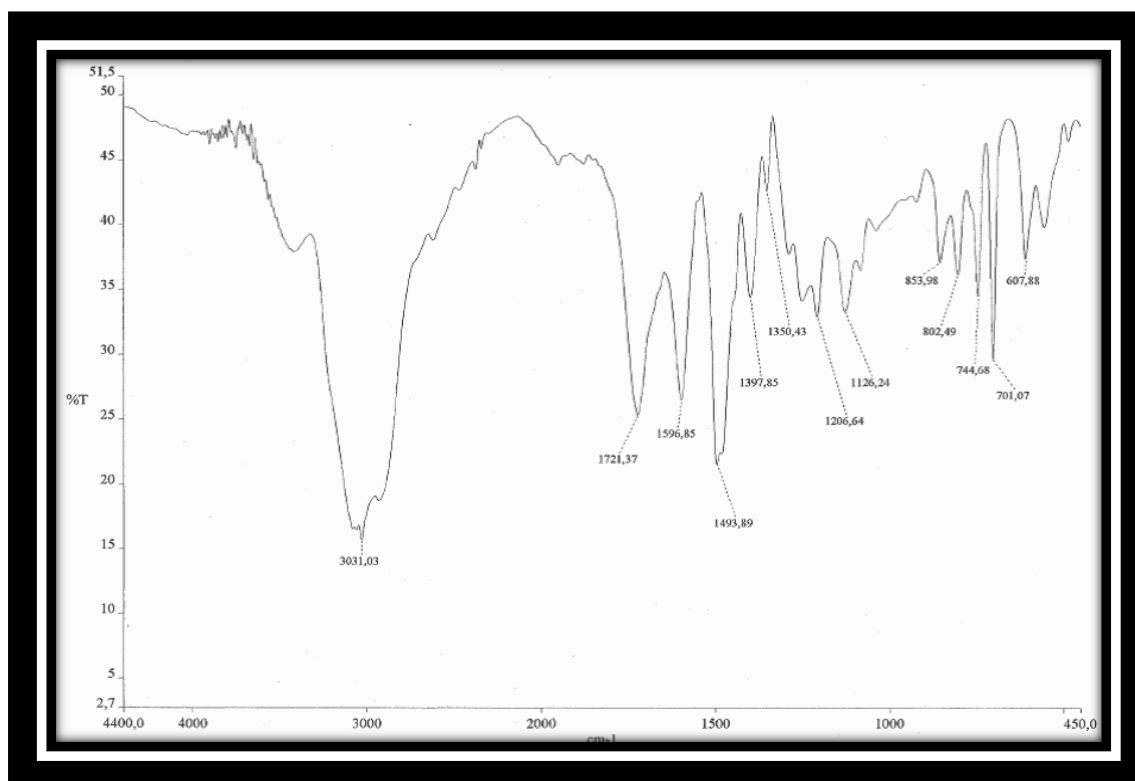


Figura 18. Espectro de I.V. do *rac*-32

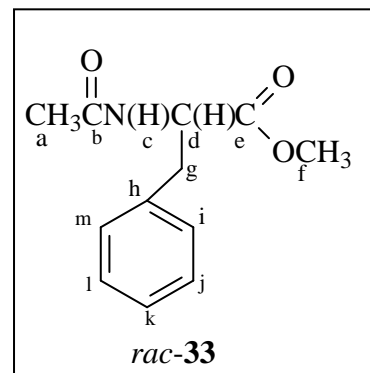
DADOS ESPECTROSCÓPICOS DO 2-ACETILAMINO-3-FENIL-  
PROPANOATO DE METILA

RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1,93 (s, 3H); 3,02-3,12 (m, 2H); 3,68 (s, 3H); 4,82-4,86 (q, 1H); 6,2 (d, 1H); 7,06-7,25 (m, 5H) (Figura 19).

RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 23,08 ( $\text{C}_a$ ); 37,93 ( $\text{C}_c$ ); 52,37 ( $\text{C}_i$ ); 53,31 ( $\text{C}_b$ ); 127,19-136,04 ( $\text{C}_i$ - $\text{C}_h$ ); 169,93 ( $\text{C}_b$ ); 172,27 ( $\text{C}_e$ ) (Figura 20).

RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 23,08 ( $\text{C}_a$ ); 37,93 ( $\text{C}_c$ ); 52,37 ( $\text{C}_i$ ); 53,31 ( $\text{C}_b$ ); 127,19-129,31 ( $\text{C}_i$ - $\text{C}_m$ ) (Figura 21).

I.V. ( $\text{NaCl}$ ) ( $\nu\text{-cm}^{-1}$ ): 3279 ( $\nu_{\text{N-H}}$ , def. axial); 1743 ( $\nu_{\text{C=O}}$  éster, def. axial); 1656 ( $\nu_{\text{C=O}}$  amida, def. axial); 1544 e 1437 ( $\nu_{\text{C=C}}$ , def. angular); 1217 ( $\nu_{\text{C-O}}$ , def. angular); 700 ( $\nu_{\text{C-H}}$  arom., def. axial) (Figura 22).





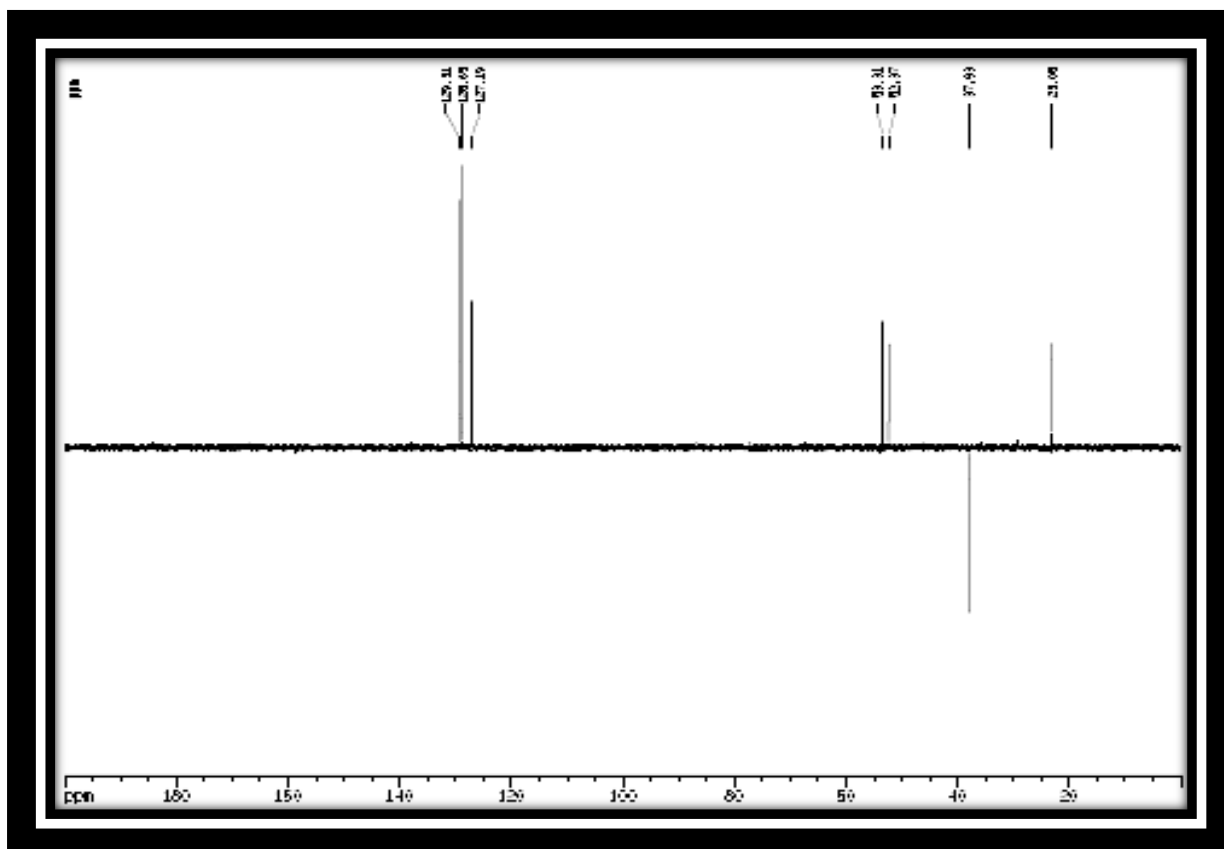


Figura 21. RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT-BB do *rac*-33 em  $\text{CDCl}_3$

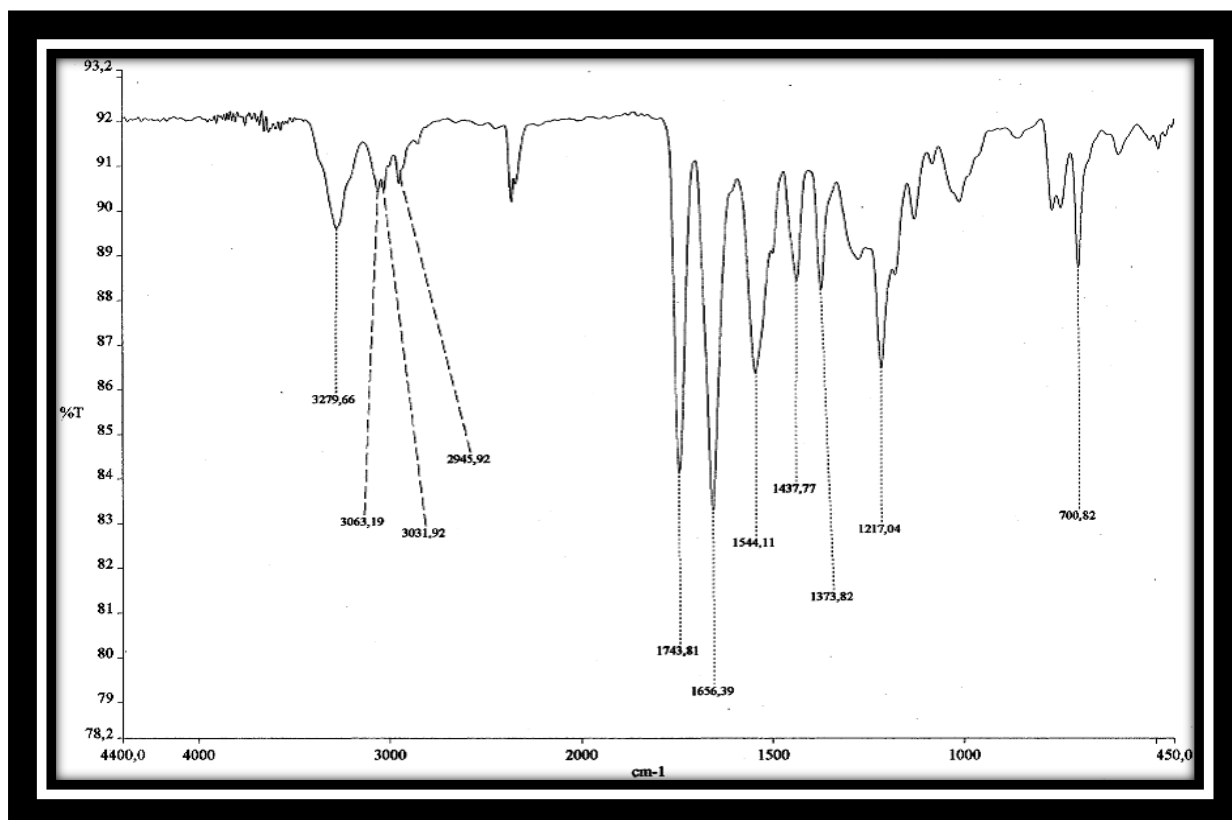


Figura 22. Espectro de I.V. do *rac*-33

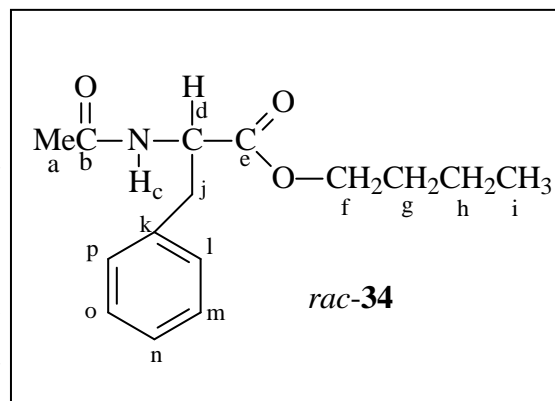
**DADOS ESPECTROSCÓPICOS DO 2-ACETILAMINO-3-FENIL-  
PROPANOATO DE BUTILA**

**RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):** 0,8 (q, 3H); 1,4 (m, 2H); 1,6 (m, 2H); 1,99 (s, 3H); 3,2 (t, 2H); 4,2 (m, 2H); 4,8 (d, 1H); 6,07 (d, 1H); 7,1-7,4 (m, 5H) (Figura 23).

**RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):** 13,8 ( $\text{C}_i$ ); 19,2 ( $\text{C}_h$ ); 23,2 ( $\text{C}_a$ ); 30,6 ( $\text{C}_g$ ); 38,1 ( $\text{C}_j$ ); 53,3 ( $\text{C}_d$ ); 65,5 ( $\text{C}_f$ ) 127,2-136,1 ( $\text{C}_{k-p}$ ); 169,8 ( $\text{C}_b$ ); 171,9 ( $\text{C}_e$ ) (Figura 24).

**RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):** 13,8 ( $\text{C}_i$ ); 19,2 ( $\text{C}_h$ ); 23,2 ( $\text{C}_a$ ); 30,6 ( $\text{C}_g$ ); 38,1 ( $\text{C}_j$ ); 53,3 ( $\text{C}_d$ ); 65,5 ( $\text{C}_f$ ); 127,2-136,1 ( $\text{C}_{l-p}$ ) (Figura 25).

**I.V. ( $\text{NaCl}$ ) ( $\nu\text{-cm}^{-1}$ ):** 3282 ( $\nu_{\text{N-H}}$ , def. axial); 1740 ( $\nu_{\text{C=O}}$  éster, def. axial); 1660 ( $\nu_{\text{C=O}}$  amida, def. axial); 1549 e 1455 ( $\nu_{\text{C=C}}$ , def. angular); 1212 ( $\nu_{\text{C-O}}$ , def angular); 700 e 745 ( $\nu_{\text{C-H}}$  arom., def. axial) (Figura 26).





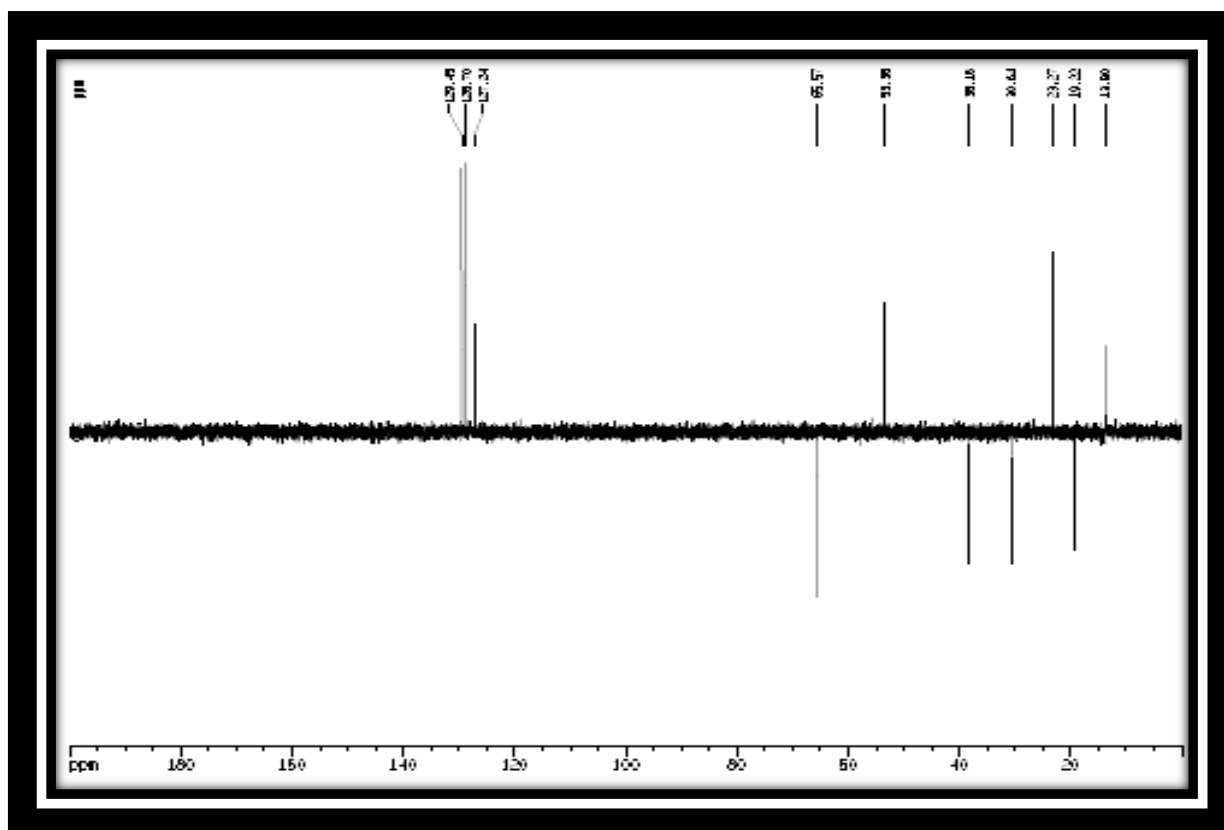


Figura 25. RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT-BB do *rac*-34 em  $\text{CDCl}_3$

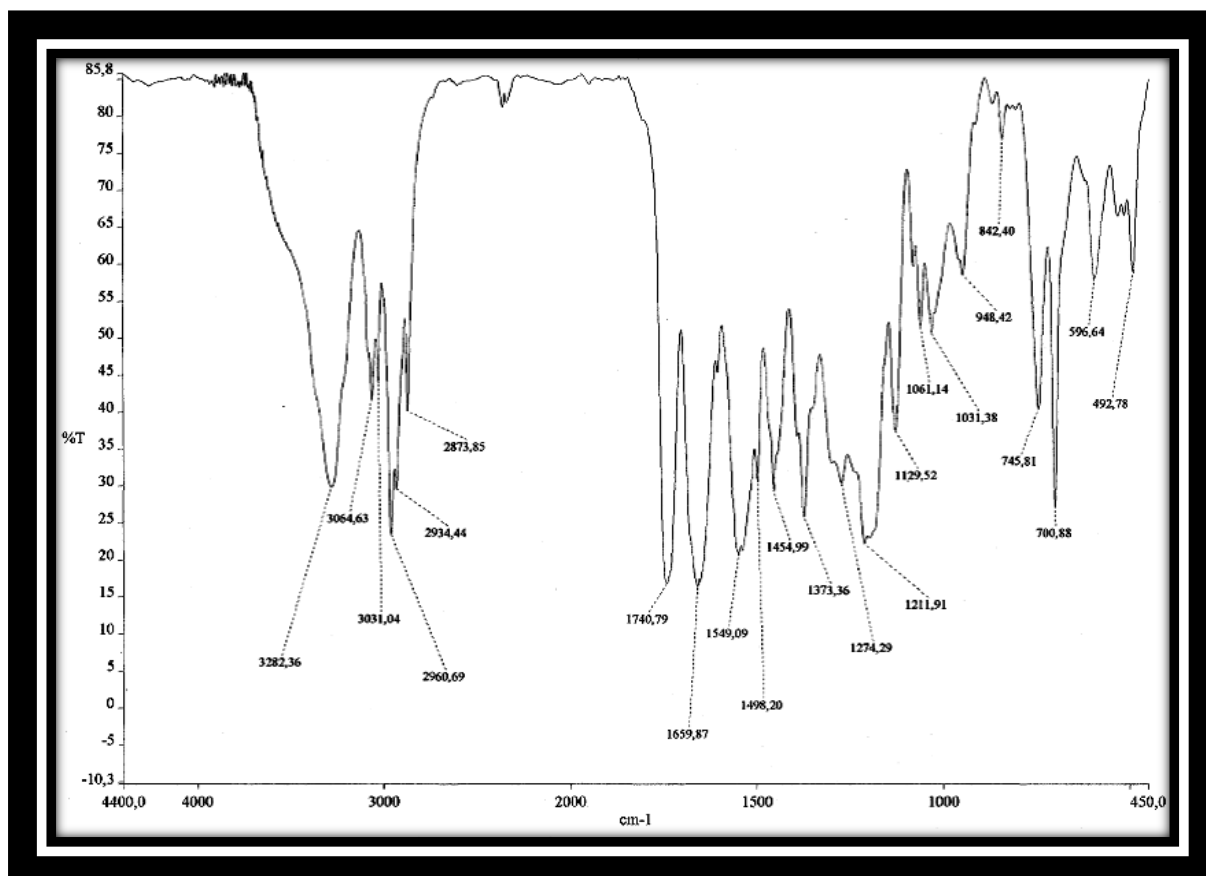


Figura 26. Espectro de I.V. do *rac*-34

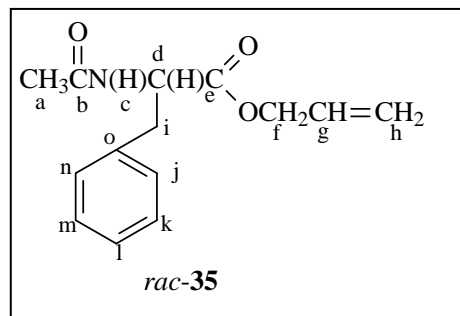
**DADOS ESPECTROSCÓPICOS DO 2-ACETILAMINO-3-FENIL-  
PROPANOATO DE ALILA**

**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 2,01 (s, 3H); 3,15 (q, 2H); 4,62 (d, 2H); 4,93 (d, 1H); 5,29 (q, 2H); 5,88 (m, 1H); 5,97 (d, 1H); 7,12 (d, 2H); 7,28 (m, 3H) (Figura 27).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 23,3 (C<sub>a</sub>); 38,08 (C<sub>i</sub>); 53,37 (C<sub>d</sub>); 66,30 (C<sub>f</sub>); 119,36 (C<sub>h</sub>); 127,35 (C<sub>g</sub>); 128,77-135,97 (C<sub>j</sub>-C<sub>o</sub>); 169,89 (C<sub>b</sub>); 171,57 (C<sub>e</sub>) (Figura 28).

**RMN <sup>13</sup>C-DEPT (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 23,33 (C<sub>a</sub>); 38,08 (C<sub>i</sub>); 53,37 (C<sub>d</sub>); 66,31 (C<sub>f</sub>); 119,36 (C<sub>h</sub>); 127,35 (C<sub>g</sub>); 128,77-131,56 (C<sub>j</sub>-C<sub>n</sub>) (Figura 29).

**I.V. (NaCl) (v-cm<sup>-1</sup>):** 3284 (v<sub>N-H</sub>, def. axial); 1743 (v<sub>C=O</sub> éster, def. axial); 1659 (v<sub>C=O</sub> amida, def. axial); 1453 e 1539 (v<sub>C=C</sub>, def. angular); 1230 (v<sub>C-O</sub>, def. angular); 934 (v<sub>C-H</sub> arom., def. axial) (Figura 30).





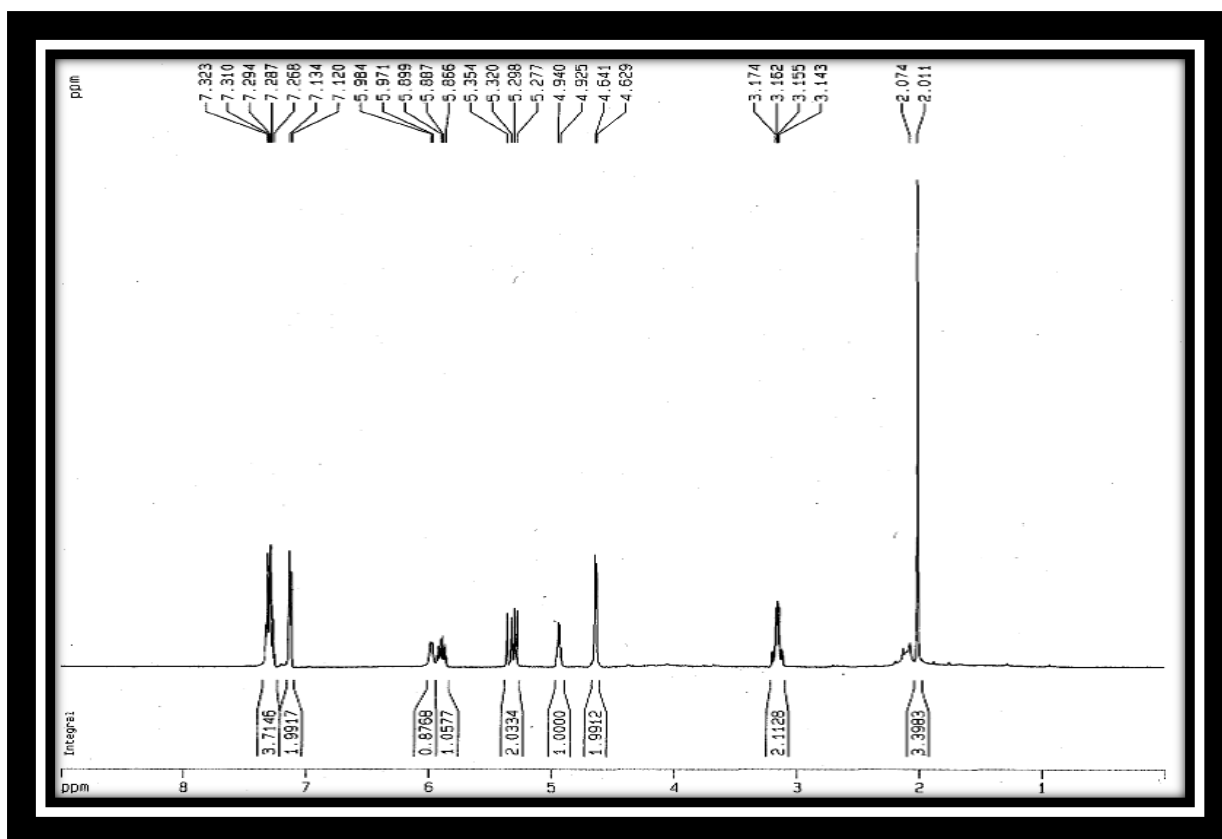


Figura 27. RMN  $^1\text{H}$  do *rac*-35 em  $\text{CDCl}_3$

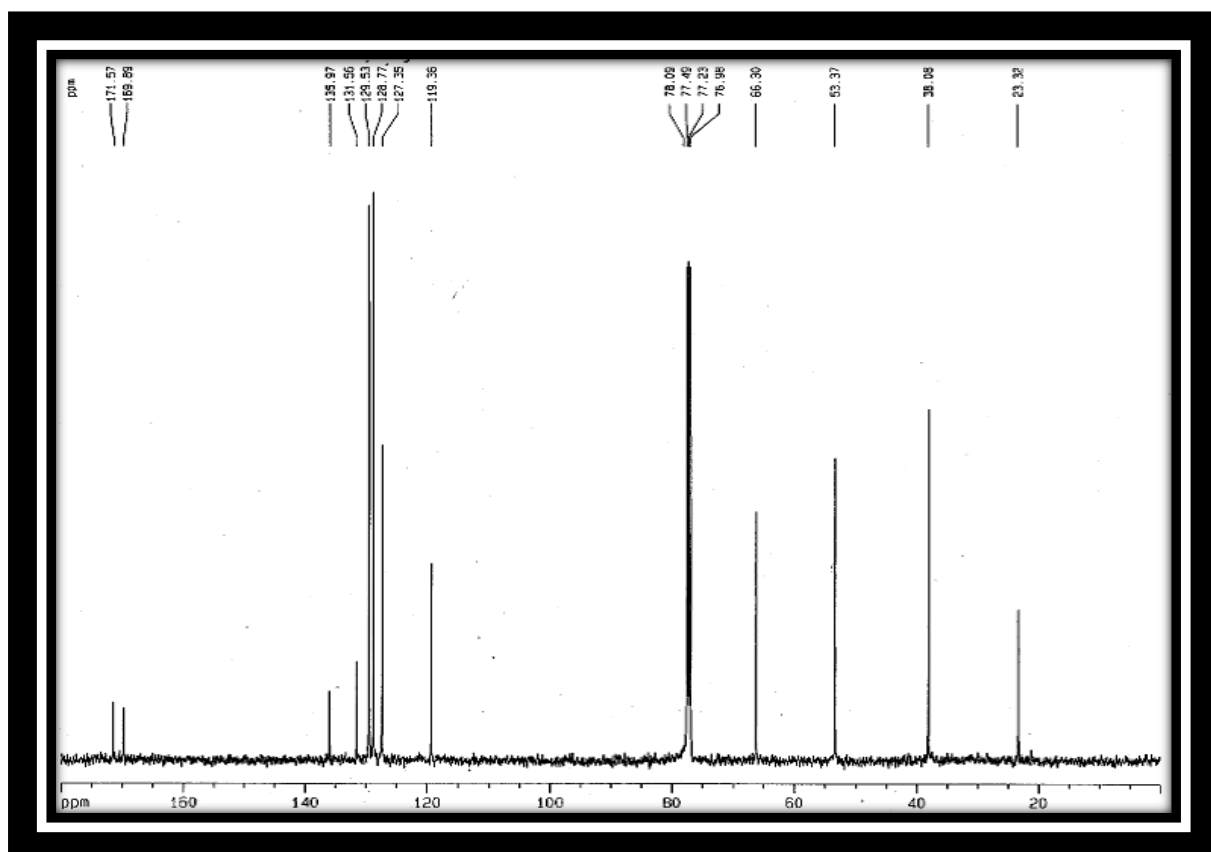


Figura 28. RMN  $^{13}\text{C}$  do *rac*-35 em  $\text{CDCl}_3$

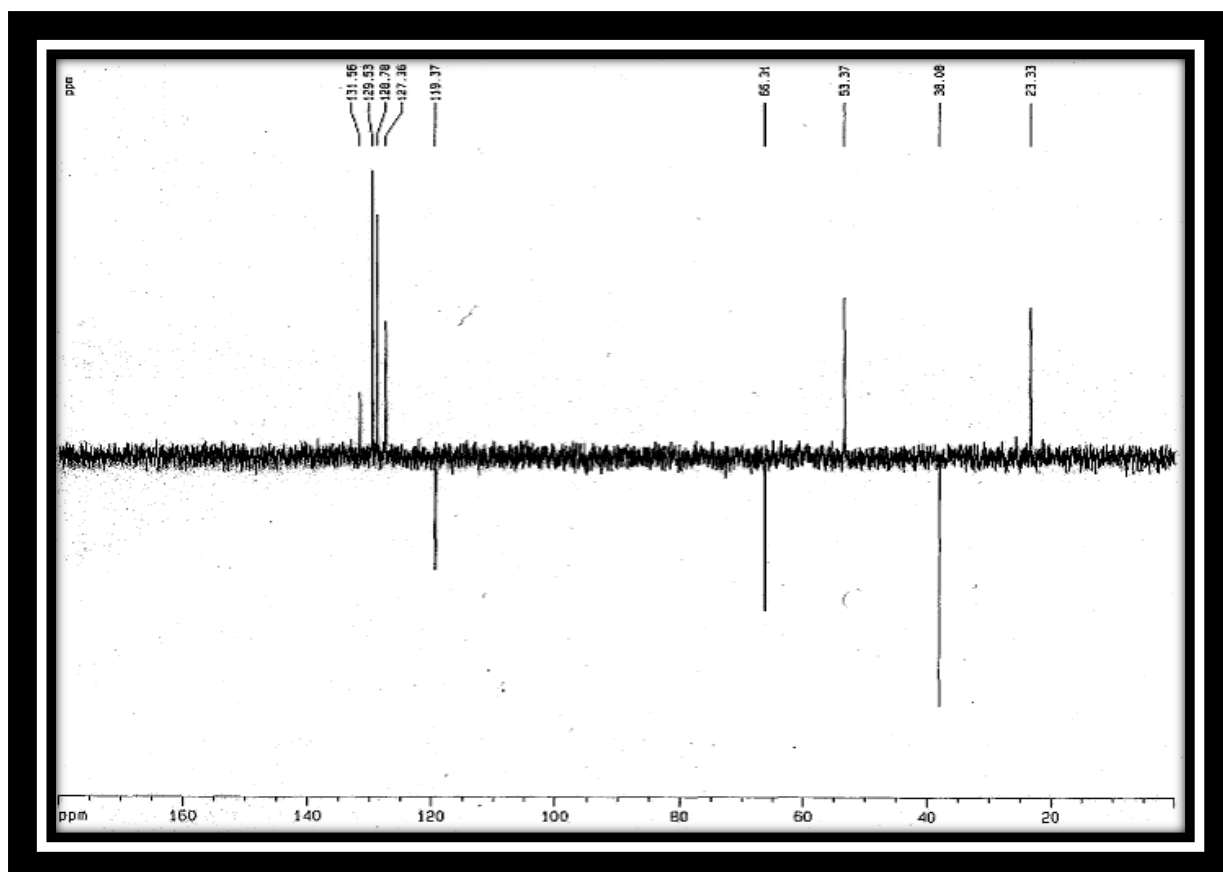


Figura 29. RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT  $135^\circ$  do *rac*-35 em  $\text{CDCl}_3$

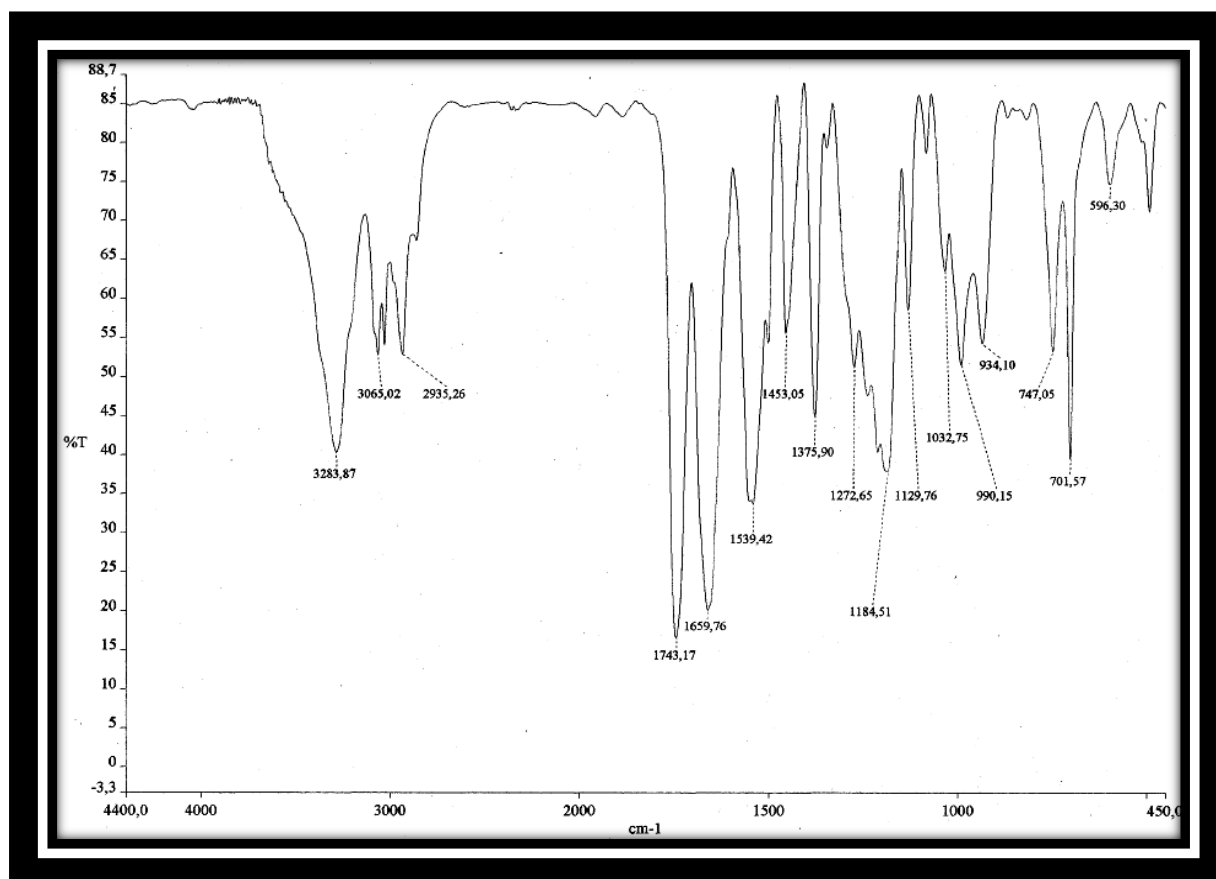


Figura 30. Espectro de I.V. do *rac*-35

### 5.11.2.2 CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES OBTIDOS VIA CLAE

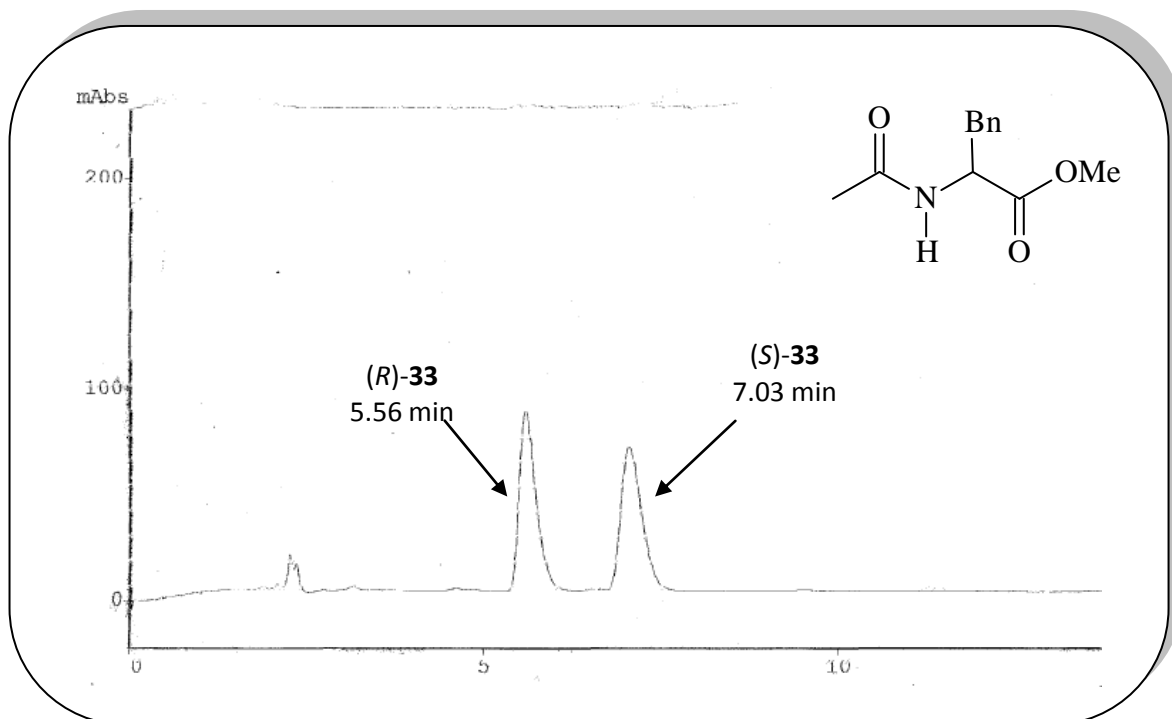


Figura 31. Cromatograma do *rac*-33

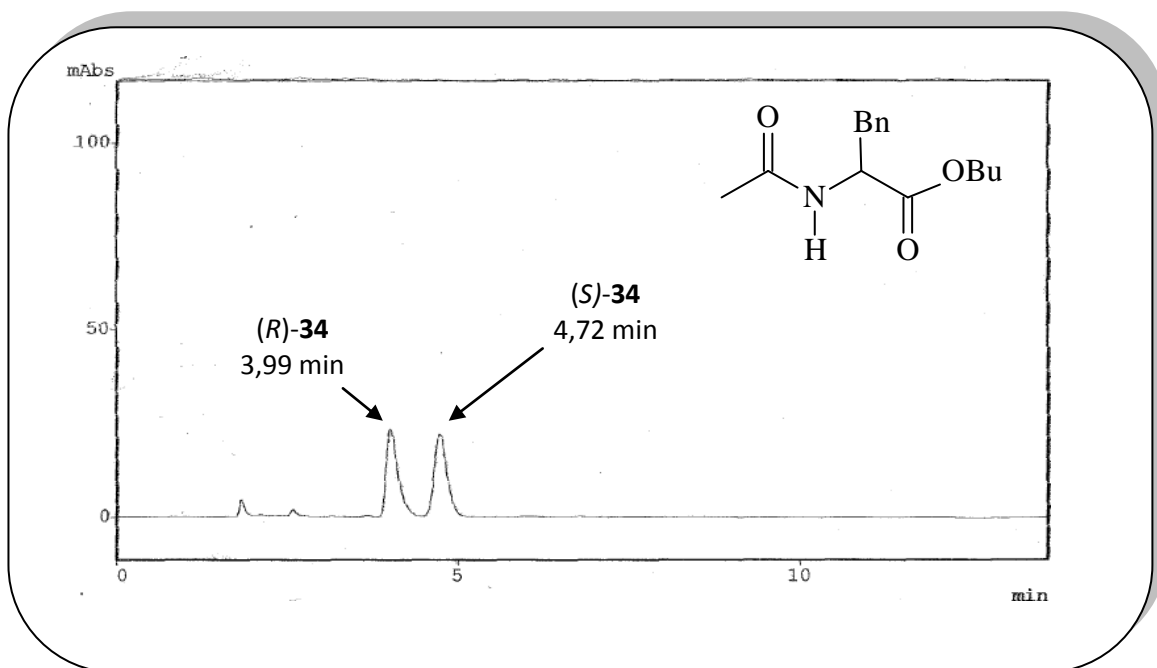


Figura 32. Cromatograma do *rac*-34

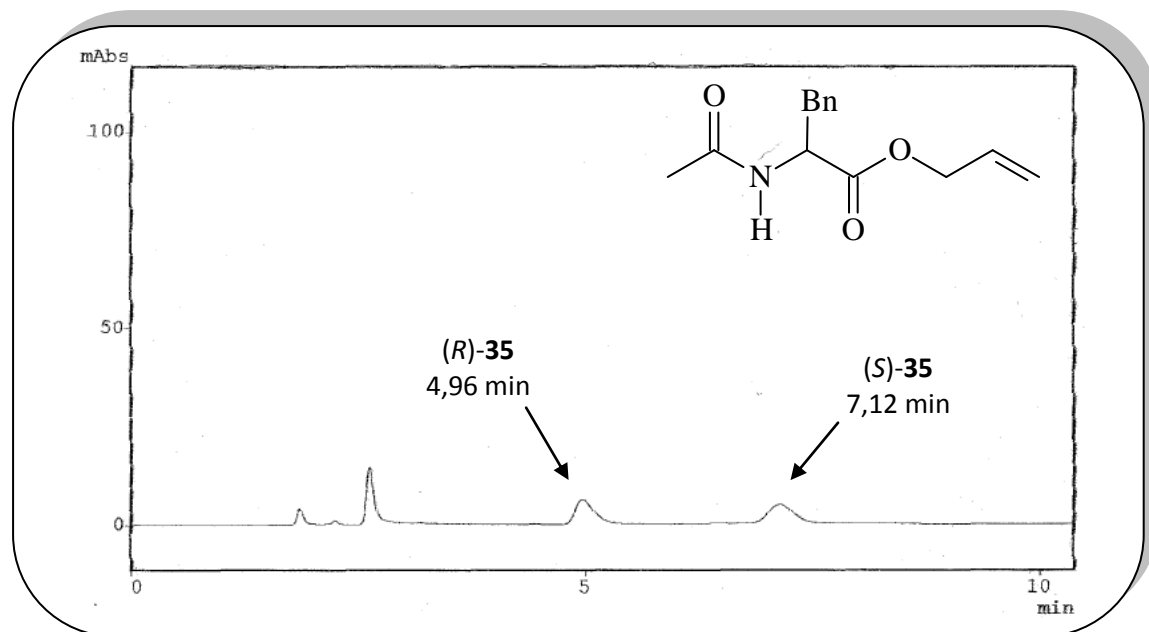


Figura 33. Cromatograma do *rac*-35

## *Capítulo 6*

### *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

## 6. Referências Bibliográficas

---

1. Sheldon, R. A., Arends, I.; Hanefeld, U.; *Green Chemistry and Catalysis*; WILEY-VCH; **2007**, chapter 7, pp 296.
2. Marangoni, A. G.; *Enzyme kinetics- A modern Approach*; John Wiley & Sons; USA; **2003**; chapter 2.
3. Faber, K.; *Biotransformations in Organic Chemistry*; Ed. Springer - Verlag; 4<sup>th</sup> edition; Germany; **2000**; chapter 1.
4. Ghanem, A.; *Tetrahedron*; **2007**; 63: 1721-1754.
5. Bom, E. P. S.; Ferrara; M. A.; et al. *Enzimas em biotecnologia- Produção, Aplicações e Mercado*; Ed. Interciência; Rio de Janeiro; **2008**; cap. 1.
6. Straathof, A. J. J.; Panke, S.; Schmid, A.; *Current Opinion in Biotechnology*; **2002**, 13: 548-556.
7. Hassan, F.; Shah, A. A.; Hameed, A.; *Enzyme and Microbial Technology*, **2006**, 39: 235-251.
8. Van Der Walle N. *Über synthetische Wirkung bakterieller Lipasen*; Cbl. Bakt. Parasitenk Infektionskr; **1927**; 70: 369-73.
9. Gotor, V.; Alfonso, I.; García-Urdiales, E.; *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*; Wiley-VCH; **2008**, chapter 1, p. 11.
10. Liljeblad, A.; Kanerva L. T.; *Tetrahedron*; **2006**; 62: 5831–5854.
11. VIEIRA, G. A. B.; et al. *Tetrahedron. Asymmetry* **2009**; 20: 214-219.
12. Patel, R. N.; et al. *Journal of the American Oil Chemists' Society*; **2000**; 77: 1015-1019.
13. Hakhoechi, H.M.S.; Korean Society for Microbiology and Biotechnology. **2008**; 36: 299-306.
14. Seebeck, F.P.; Hilvert, D: *Journal American Chemical Society*; **2003**, 125:10158-10159.
15. Cotterill IC, Sutherland AG, Robert SM, Grobbauer R, Spreitz J, Faber K. J.; *Chem Soc Perkin Trans*; **1991**; 1:1365.
16. Gotor-Fernández, V.; Gotor, V.; Brieva, R.; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*; **2006**; 40: 111-120.

17. Sheldon, R.A.; *Chirotechnology: industrial synthesis of optically active compounds*. New York: Marcel Dekker; **1993**.
18. Eliel, E.L.; Wilken, S.H.; Mander, L.N.; *Stereochemistry of organic compounds*. New York: John Wiley & Sons; **1994**.
19. Collins, A.N.; Sheldrake, G.N.; Crosby, J.; *Chirality in industry*. Chichester, UK: John Wiley & Sons; **1997**, vol. 2.
20. Ghanem, A.; Aboul-Enein, H. Y.; *Chirality*, **2005**, 17:1–15.
21. Atkinson, R.S.; *Stereoselective synthesis*. Chichester, UK: John Wiley & Sons; **1995**.
22. Carnell; A.J.; *Journal Molecular Cat. B: Enzymatic*, **2002**; 19 – 20: 83-92.
23. Taschner; M.J.; Black; D.J., Chen; Q. Z.; *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**; 4: 1387-1390.
24. Kiriwara, M.; Kawasaki, M.; Takuwa, T.; Kakuda, H. Wakikawa, T.; Takeuch Y.; Kirk, K.L.; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**; 14: 1753-1761.
25. Stinson, S.C.; *Chem Eng News*, **2001**; 79: 37.
26. Leffingwell, J. C.; Shakelford, R. E.; *Laevo menthol synthesis and organoleptic properties. Cosmet Perfum*, **1974**; 89: 69-89.
27. Klibanov, A.M.; *Trends Biochem Sci*; **1989**;14: 141-144.
28. Chen, C.S.; Wu, S.H.; Girdaukas, G.; Sih, C.J.; *Journal America Chemical Society*; **1987**; 109: 2812-2817.
29. Chen, C.S.; Sih, C.J.; *Angew Chem Int Ed Engl*; **1989**; 28: 695-707.
30. Bornscheuer, U.T.; Kazlauskas, R.J.; *Hydrolases in organic synthesis. Weinheim: Wiley-VCH*; **1999**.
31. Schurig, V.; *Journal Chromatography A*; **2001**; 906: 275-299.
32. Ghanem, A.; Ginatta, C.; Jian, Z.; Schurig, V.; *Chromatographia*; **2003**; 57: 275-281.
33. Aitkem RA, Kilenyi SN. *Asymmetric synthesis*. London: Chapman & Hall; **1992**.
34. Macfarlane, E. L. A.; Roberts, S. M.; Turner, N. J.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*; **1990**, 569–571.
35. Macfarlane, E. L. A.; Rebolledo, F.; Roberts, S. M.; Turner, N.; *J. Biocatalysis*; **1991**, 5: 13-19.

36. Fowler, P. W.; Macfarlane, E. L. A.; Roberts, S. M.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*; **1991**; 453-455.
37. Nakajima, M.; Isono, Y.; Nabetani, H.; *J. Fermentation and Bioengineering*; **1995**, Vol. II, 2: 170-175.
38. Gedey, S.; Liljeblad, A.; Fülöp, F.; Kanerva, L. T.; *Tetrahedron: Asymmetry*; **1999**, 10, 2573–2581.
39. Gedey, S.; Liljeblad, A.; Lázár, L.; Fülöp, F.; Kanerva, L. T.; *Can. J. Chem.*; **2002**, 80, 565–570.
40. Kanerva, L. T.; Liljeblad, A.; Kavenius, H-M.; Tähtinen, P.; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, 18: 181-191.
41. Prasad, R. B. N.; Modi, M. K.; Rao, B. V. S. K., Reddy, J. R. C.; *Bioresource Technology*; **2007**; 98: 1260-1264.
42. Gotor, V.; et al; *Tetrahedron: Asymmetry*; **2008**, 19: 1714-1719.
43. Ferreira-Dias, S.; Da Fonseca, M. M. R.; Ribeiro, M. H.; Osório, N. M.; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*; **2008**; 52–53: 58–66.
44. Liu, D.; Du, W.; Xu, Y.; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*; **2005**; 32: 241–245.
45. Dehmlow, E. V.; Dehmlow, S. S.; *Phase Transfer Catalysis*. 3rd ed. Weinheim: Verlag Chemie, **1993**.
46. Starks, C. M., Liotta, C. L.; Halpern, M.; *Phase Transfer Catalysis: Fundamentals, Applications and Industrial Perspectives*. New York: Chapman & Hall, **1994**.
47. Sasson, Y.; Neumann, R.; eds. *Handbook of Phase Transfer Catalysis*. London: Blackie Academic & Professional, **1997**.
48. Sasson, Y.; Rothenberg, G.; Clark, J.; Macquarrie, D.; *Blackwell Handbook of Green Chemistry and Technology*; Eds. Oxford; UK; **2002**; pp 206.
49. Jwo, J. J.; *Catal. Rev.* **2003**, 45: 397.
50. Wu, H. S.; Yang, H. M.; *Catal. Rev.* **2003**; 45: 463.
51. Bränsdtröm, A.; *Adv. Phys. Org. Chem.* **1977**; 15, 267.
52. Landini, D.; Maia, A.; Montanari, F.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1977**; 112.
53. Lucchese, A. M.; Marzorati, L.; *Química Nova*, **2000**; 23: 641-652.
54. Makosza, A.; *Pure Appl. Chem.* **1975**; 43: 439.



55. Sasson, Y.; et al; *Tetrahedron*; **2007**, 63: 7696-7701.
56. Pedersen, C. J.; Frensdorff, H. K.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1972**, 11, 16.
57. Durst, H. D.; *Tetrahedron Lett.* **1974**, 2421.
58. Jones, R. A.; *Quaternary Ammonium Salts. Their Use in Phase-Transfer Catalysis (Best Synthetic Methods)*, Elsevier, **2001**.
59. Ver as revisões: a) *Enantioselective Synthesis of  $\beta$ -Amino Acids* (Ed.: E. Juaristi), Wiley-VCH, New York, **1997**; b) *Enantioselective Synthesis of  $\alpha$ -Amino Acids*, 2nd ed. (Eds.: E. Juaristi, V. Soloshonok), Wiley, Hoboken, **2005**; c) Liu, M, Sibi, M. P.; *Tetrahedron*; **2002**, 58, 7991 – 8035; Abele, S.; Seebach, D., *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 1–15; e) Cardillo, G.; Tomasini, C.; *Chem. Soc. Rev.* **1996**, 25, 117 – 128. f) Chu, C. K.; *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; **2009**; 17: 1404-1409. g) Wang, Q.; Wang, L.; *J. AM. CHEM. SOC.*; **2008**, 130: 6066-6067.
60. Boukhis, S.; Souizi, A.; *Tetrahedron Lett.*; **1999**; 40: 1669.
61. Kleeman, A; Lenchtenberger, W.; Hoppe, B.; Tanner, H.; *Amino Acids in Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, A2 p. 57, **1985**.
62. Mzushima, M.; Nakamura, S.; Kurokawa, H.; *Chem. Abst.*; **1986**; 105:196981z.
63. Nakamura, S.; Kurokawa, H.; *Chem. Abst.*; **1986**; 105:196980y.
64. Lion Corp.; *Chem. Abst.*; **1984**; 101: 136807e.
65. Lion Corp.; *Chem. Abst.*; **1986**; 104: 39510g.
66. O' Donnel, M. J.; Wu, S.; *Tetrahedron: Asymmetry*; **1992**; 5: 591.
67. Seebach, D.; Weber, T.; *Chem. Abst.*; **1987**; 107:237288r.
68. Silverman, R. B.; Huang, H.; Zhang, H. Q.; *Chem. Abst.*; **1988**; 129:339884d.
69. Bommaris, A. S.; Iebel, B. R.; *Biocatalysis: Fundamentals and Applications*, VCH Wiley, chapter 7, p. 178, **2004**.
70. O'Doonel, M. J.; Boniece, J. M.; Earp, S. E.; *Tetrahedron Lett.*; **1978**; 30: 2641.
71. O'Donnel, M. J.; Delgado, F.; Pottorf, R. S.; *Tetrahedron*; **1999**, 55: 6347-6362.

72. Fedorynski, K. M.; Wojciechowski, Z.; Makosza, M. M.; *J. Org. Chem.* **1978**, 43: 4682.
73. Landini, D.; Penso, M.; *J. Org. Chem.*; **1991**, 56: 420.
74. Landini, D.; Penso, M.; Albanese, D.; *J. Org. Chem.*; **1992**, 57: 1603.
75. Ramachandran, U.; Kumar, S.; *Tetrahedron: Asymmetry*; **2003**, 14: 2539:2545.
76. María, P. D.; et al; *Biotech. Adv.*; **2006**; 24: 180-196.
77. Hang, J.; Deng, L. *Synlett*. **2003**, 12:1927-1930.
78. Fadnavs, N. W.; Jadhav, V.; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, Vol. 8, N°. 14, p. 2361-2366.