



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**THIAGO DE SOUSA FONSECA**

**SÍNTESE QUIMIOENZIMÁTICA DO MESILATO DE RASAGILINA (AZILECT®)**

**FORTALEZA**

**2013**

THIAGO DE SOUSA FONSECA

SÍNTESE QUIMIOENZIMÁTICA DO MESILATO DE RASAGILINA (AZILECT®)

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Química.  
Área de concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

- 
- F748s Fonseca, Thiago de Sousa.  
Síntese quimioenzimática do mesilato de rasagilina (AZILECT) / Thiago de Sousa Fonseca. –  
2013.  
114 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Mestrado (Dissertação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciência, Departamento de  
Química Orgânica e Inorgânica, Mestrado em Química, Fortaleza, 2013.  
Área de Concentração: Química Orgânica.  
Orientação: Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos.
1. Resolução cinética enzimática. 2. Biorredução. 3. Indanol. I. Título.

---

CDD 547

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

Thiago de Sousa Fonseca  
Thiago de Sousa Fonseca

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 30/07/2013.

EXAMINADORES:

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

Gilvandete Maria Pinheiro Santiago  
Profa. Dra. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago  
Universidade Federal do Ceará – UFC

Angélica Maria Lucchese  
Profa. Dra. Angélica Maria Lucchese  
Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais,  
familiares, amigos e professores.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre ter iluminado os passos da minha vida e dar sabedoria para os momentos difíceis.

À minha família, em especial à minha mãe Vanda e ao meu pai Gerardo, pelo esforço de cada dia, para proporcionar uma vida melhor e confortável para mim.

À tia Nenzinha, por ser minha segunda mãe e por todo carinho.

Ao meu orientador Professor Marcos, por toda a ajuda, compreensão, paciência, acolhimento e ensinamentos durante todo esse tempo.

À Professora Maria da Conceição Ferreira de Oliveira, pelo incentivo e apoio.

À Professora Vânia Melo e ao Departamento de Microbiologia- UFC, pelo auxílio nos experimentos.

À Natália, Bárbara, James e Ricardo pelas análises de RMN e ensinamentos experimentais.

À Cleane pelas análises do infravermelho.

À Juliana pelas análises do teor de proteínas.

Ao Ulisses pelos ensinamentos e colaboração nas imobilizações das lipases.

Aos alunos do Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica (LABS): Lis, Vanessa, Ricardo, Régis, Aline, Ingrid, Raiane, Leandro, Onassis, Sérgio, Gledson, Natália, Aquino, Jefferson, em especial ao Reinaldo por toda colaboração no trabalho e ao carinho da Manú, Bruna, Carol e Daniely.

Aos amigos que conquistei ao longo da graduação: Alberto, Dearlan, Erick, Frank, Guilherme, Jack, Lillian, Patrícia e Bruno, pelos momentos alegres e inesquecíveis.

Aos amigos e familiares: Caffé, Hugo, Magno, Juliana, Júlio César, Naldinho, Jéssica Maria, Felipe Guilherme, Andrezza, Eveline, Naiara, Matheus, Victor, Lívia, Zena, Aldir, Arnoldo e Maria, que sempre estiveram ao meu lado.

À toda família EJC.

Aos professores do Departamento de Química, pelos ensinamentos e motivações.

Aos funcionários do Departamento de Química.

Aos órgãos financiadores Funcap, CAPES e CNPQ.

"O analfabeto do século XXI não será aquele que não consegue ler e escrever, mas aquele que não consegue aprender, desaprender, e reaprender." (Alvin Toffler)

## RESUMO

Neste trabalho descrevemos a síntese quimioenzimática do Mesilato de Rasagilina (Azilect®), um fármaco utilizado na monoterapia de pacientes com Parkinson no estágio inicial. Um dos objetivos deste trabalho foi realizar a introdução da quiralidade *via* processos de biocatálise. Foram estudadas duas estratégias: i) biorredução da indanona na presença de uma série de leveduras e ii) resolução cinética do *rac*-indanol utilizando lipases, em solvente orgânico. Na estratégia (i) realizamos uma triagem com seis leveduras. Em todos os testes realizados o (*S*)-indanol foi obtido com baixas conversões (9,4-13,2%) e excessos enantioméricos de até 97,6%. Devido aos baixos valores de conversão, decidimos aplicar a estratégia (ii). Após uma triagem com nove lipases comerciais foi possível verificar que a Amano lipase AK a partir da *Pseudomonas fluorescens* e a Lipase a partir da *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em imobead-150 foram as mais eficientes na resolução cinética do *rac*-acetato de indanila, em meio aquoso, com razão enantiomérica de 111,0 e 167,0, respectivamente. Com isso, tais lipases foram selecionadas para a resolução cinética do *rac*-indanol em meio orgânico. Os melhores resultados de seletividade e atividade enzimática foram obtidos utilizando hexano como solvente orgânico, tempo reacional de 15 minutos e temperatura de 30°C para a Amano lipase AK (enzima livre) e 35°C para a *Thermomyces lanuginosus*, com razão enantiomérica >200 para ambos os casos. Foram realizadas imobilizações da Amano AK (enzima livre) em vários suportes e os melhores resultados de seletividade e atividade foram obtidos em hexano como solvente orgânico, tempo reacional de 6 horas e temperatura de 30°C empregando a Amano lipase AK imobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular; alginato de sódio 2,5% e a Amano lipase AK imobilizada em quitosana 5,0% de baixo peso molecular. Foi realizado o estudo de reuso das lipases imobilizadas, sendo a *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em imobead-150, a mais eficiente comparada às demais, uma vez que proporcionou excelentes resultados em maiores ciclos reacionais. Posteriormente, empregando uma reação de Mitsunobu, o (*S*)-indanol foi convertido no (*R*)-azidoindano com rendimento de 70%. Em seguida, o (*R*)-azidoindano foi submetido a uma reação de Staudinger, produzindo a (*R*)-indanamina com 60% de rendimento.

**Palavras-chave:** Mesilato de Rasagilina, Resolução cinética enzimática, Biorredução.

## ABSTRACT

Here we describe the synthesis of the chemoenzymatic Rasagilina mesylate (Azilect®), a drug used in monotherapy in patients with early stage Parkinson. One of the goals of this project was to carry out the introduction of chirality *via* biocatalysis processes. We studied two strategies: i) bioreduction of indanone in the presence of a series of yeast and ii) kinetic resolution of *rac*-indanol using lipases in organic solvent. In strategy (i) was conducted a screening with six yeasts. In all tests the (*S*)-indanol was obtained in low conversions (9.4 to 13.2%) and enantiomeric excesses of up to 97.6%. Due to low conversion rates, we decided to implement the strategy (ii). After screening of nine commercial lipases, was possible to verify that the Amano lipase AK from *Pseudomonas fluorescens* and Lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on immovead-150 were the most efficient in the kinetic resolution of *rac*-indanila acetate in aqueous medium with enantiomeric ratio equals 111.0 and 167.0 respectively. Thus, such lipases were selected for the kinetic resolution of *rac*-indanol in organic media. The best results of enzyme activity and selectivity were obtained using hexane as a solvent, reaction time of 15 minutes and 30°C for Amano lipase AK (free enzyme) and 35°C for *Thermomyces lanuginosus*, with enantiomeric ratio equals 200 for both cases. Were held assets of Amano AK (free enzyme) in various media and the best results were obtained selectivity and activity in hexane as organic solvent, reaction time of 6 hours and 30 ° C using Amano Lipase AK immobilized chitosan in 2.5% low molecular weight; sodium alginate 2.5% and Amano AK lipase immobilized on chitosan 5.0% low molecular weight. The study was conducted reuse of immobilized lipase, *Thermomyces lanuginosus* being immobilized on immovead-150, the more efficiently compared to the others, since it has provided excellent results in higher reaction cycles. Subsequently, using a Mitsunobu reaction, (*S*)-indanol was converted to (*R*)-azidoindano with 70% yield. Then, the (*R*)-azidoindano was subjected to Staudinger reaction, producing (*R*)-indanamine in 60% yield.

**Keywords:** Mesylate Rasagilina, Enzymatic kinetic resolution, Bioreduction.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1:	Fármacos utilizados no tratamento do mal de Parkinson	23
Figura 2:	Formação da ligação peptídica entre dois aminoácidos	24
Figura 3:	Métodos de imobilização de enzimas	27
Figura 4:	( <i>R</i> )-BINAL-H e ( <i>S</i> )-BINAL-H	29
Figura 5:	Mecanismo de reação mediada por ADH e sua coenzima	29
Figura 6:	Epotilona A e B	33
Figura 7:	( <i>S</i> )-propranolol	38
Figura 8:	Ezetimiba	41
Figura 9:	Curva de calibração referente ao indanol	46
Figura 10:	Esquema para os “modos produtivos” e “modos não produtivos” dos enantiômeros <i>R</i> e <i>S</i> do álcool <i>sec</i> -feniletanol e o sítio da subtilisina acilado	59
Figura 11:	Mecanismo de inibição enantiosseletiva da reação de acetilação do sulcatol empregando a lipase da <i>Pseudomonas sp.</i> em meio orgânico	60
Figura 12:	Imobilização de lipases na presença de surfactantes	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Classificação das enzimas	24
Tabela 2:	Vantagens e desvantagens no uso células íntegras ou enzimas isoladas	26
Tabela 3:	Resultados obtidos da reação de hidrólise do <i>rac</i> -acetato de indanila utilizando lipases	47
Tabela 4:	Resultados da resolução cinética <i>via</i> acetilação do <i>rac</i> -indanol utilizando a Amano lipase AK e acetonitrila como solvente orgânico	49
Tabela 5:	Resultados da resolução cinética <i>via</i> acetilação do <i>rac</i> -indanol utilizando a Amano lipase AK e tolueno como solvente orgânico	50
Tabela 6:	Resultados da resolução cinética <i>via</i> acetilação do <i>rac</i> -indanol utilizando a Amano lipase AK e THF como solvente orgânico	52
Tabela 7:	Resultados da resolução cinética <i>via</i> acetilação do <i>rac</i> -indanol utilizando a Amano lipase AK e hexano como solvente orgânico	53
Tabela 8:	Resultados da resolução cinética <i>via</i> acetilação do <i>rac</i> -indanol utilizando a Lipase a partir da <i>Thermomyces lanuginosus</i> e acetonitrila como solvente orgânico	54
Tabela 9:	Resultados da resolução cinética <i>via</i> acetilação do <i>rac</i> -indanol utilizando a Lipase a partir da <i>Thermomyces lanuginosus</i> e tolueno como solvente orgânico	55
Tabela 10:	Resultados da resolução cinética <i>via</i> acetilação do <i>rac</i> -indanol utilizando a Lipase a partir da <i>Thermomyces lanuginosus</i> e THF como solvente orgânico	56
Tabela 11:	Resultados da resolução cinética <i>via</i> acetilação do <i>rac</i> -indanol utilizando a Lipase a partir da <i>Thermomyces lanuginosus</i> e hexano como solvente orgânico	58
Tabela 12:	Resultados da resolução cinética <i>via</i> acetilação do <i>rac</i> -indanol utilizando a Amano lipase AK a partir da <i>Pseudomonas fluorescens</i> imobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular e hexano como solvente orgânico	61
Tabela 13:	Resultados da resolução cinética <i>via</i> acetilação do <i>rac</i> -indanol utilizando a Amano lipase AK a partir da <i>Pseudomonas fluorescens</i> imobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular na presença do surfactante Triton X-100 0,1% e hexano como solvente orgânico	62
Tabela 14:	Resultados da resolução cinética <i>via</i> acetilação do <i>rac</i> -indanol utilizando a Amano lipase AK a partir da <i>Pseudomonas fluorescens</i> imobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular na presença do surfactante CTAB 0,01% e hexano como solvente orgânico	63
Tabela 15:	Resultados da resolução cinética <i>via</i> acetilação do <i>rac</i> -indanol utilizando a Amano lipase AK a partir da <i>Pseudomonas fluorescens</i> imobilizada em óxido de alumínio e hexano como solvente orgânico	65
Tabela 16:	Resultados da resolução cinética <i>via</i> acetilação do <i>rac</i> -indanol utilizando a Amano lipase AK a partir da <i>Pseudomonas fluorescens</i> imobilizada em quitosana 2,5% de peso molecular médio e hexano como solvente orgânico	66
Tabela 17:	Resultados da resolução cinética <i>via</i> acetilação do <i>rac</i> -indanol utilizando a Amano lipase AK a partir da <i>Pseudomonas fluorescens</i> imobilizada em quitosana 5% de baixo peso molecular e hexano como solvente orgânico	66

Tabela 18:	Resultados da resolução cinética <i>via</i> acetilação do <i>rac</i> -indanol utilizando a Amano lipase AK a partir da <i>Pseudomonas fluorescens</i> imobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular na presença de alginato de sódio 2,5% e hexano como solvente orgânico	67
Tabela 19:	Resultados da resolução cinética <i>via</i> acetilação do <i>rac</i> -indanol utilizando a Amano lipase AK a partir da <i>Pseudomonas fluorescens</i> imobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular na presença de carragenina 2,5% e hexano como solvente orgânico	68
Tabela 20:	Resultados de imobilizações	69
Tabela 21:	Resultados obtidos do reuso da Amano lipase AK imobilizada em quitosana 5% de baixo peso molecular.	71
Tabela 22:	Resultados obtidos do reuso da Amano lipase AK imobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular na presença de alginato de sódio 2,5%.	71
Tabela 23:	Resultados obtidos do reuso da <i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada em immobead-150.	72

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1:	Mecanismo de degradação da dopamina pela monoamina oxidase B	19
Esquema 2:	Síntese do Mesilato de Rasagilina	20
Esquema 3:	Síntese do fármaco empregando leveduras	21
Esquema 4:	Síntese do fármaco realizando resolução cinética enzimática	21
Esquema 5:	Biorredução de 1,3-cicloexanodionas dissustituídas empregando <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
Esquema 6:	Síntese enzimática do ácido ( <i>R</i> )-3-(4-fluorofenil)-2-hidróxi-propiónico	30
Esquema 7:	Biorredução da 1,2-indanona empregando a levedura <i>Trichosporon cutaneum</i>	31
Esquema 8:	Síntese quimioenzimática de fármacos anti-inflamatórios	32
Esquema 9:	Resolução do éster 3-(4-metoxifenilglicidato) de metila	32
Esquema 10:	Resolução cinética enzimática de uma substância intermediária para a obtenção da epotilona A	33
Esquema 11:	Resolução cinética enzimática de derivados da anfetamina empregando a <i>Candida antarctica</i> lipase B	34
Esquema 12:	Resolução cinética enzimática do ( <i>S</i> )-2-pentanol empregando a lipase B a partir da <i>Candida antactica</i>	34
Esquema 13:	Hidrólise quimiosseletiva de um éster ftalimídico empregando a Lipozyme RM IM	35
Esquema 14:	Resolução cinética enzimática do 4-[(4-dimetilamino)-1-(4-fluorofenil)-1-hidróxi-1-butil]-3-(hidróximetil) benzonitrilo racêmico utilizando a <i>Candida antarctica</i> lipase B	35
Esquema 15:	Resolução cinética enzimática de derivados da 3-hidroximetil-1-tetralona racêmica empregando lipases	36
Esquema 16:	Resolução cinética enzimática do 3-hidroxi-3-fenilpropanonitrila racêmico e do 3-acetoxi-3-fenilpropanonitrila racêmico utilizando a Lipase a partir da <i>Pseudomonas cepacia</i>	36
Esquema 17:	Síntese quimioenzimática do Levamisol	37
Esquema 18:	Resolução de intermediários na preparação do ( <i>S</i> )-propranolol	38
Esquema 19:	Resolução cinética enzimática do racemato do éster metílico do Naproxeno	38
Esquema 20:	Síntese quimioenzimática do ( <i>S</i> )-Nebracetam	39
Esquema 21:	Síntese química de uma naftoquinona	40
Esquema 22:	Resolução cinética enzimática da naftoquinona racêmica empregando lipases	40
Esquema 23:	Resolução cinética enzimática do 3-[5-(4-fluoro-fenil)-5-hidróxi-pentanoil]-4-fenil-oxazolidin-2-ona racêmico utilizando lipases	41
Esquema 24:	Reação de biorredução da indanona empregando leveduras	43
Esquema 25:	Resolução cinética do <i>rac</i> -acetato de indanila utilizando lipases	47
Esquema 26:	Resolução cinética enzimática <i>via</i> acetilação do <i>rac</i> -indanol utilizando lipases, em meio orgânico	48
Esquema 27:	Reação de acetilação do sulcatol empregando lipases, em meio orgânico	60
Esquema 28:	Síntese quimioenzimática do Mesilato de Rasagilina	75

**LISTA DE GRÁFICOS**

Gráfico 1:	Resultados obtidos da reação de biorredução da indanona utilizando leveduras, em dois dias.	44
Gráfico 2:	Resultados obtidos da reação de biorredução da indanona utilizando leveduras, em quatro dias.	44
Gráfico 3:	Resultados obtidos da reação de biorredução da indanona utilizando leveduras, em seis dias.	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
BD	Batata Dextrose
BDA	Batata Dextrose Ágar
<i>c</i>	Conversão
CAL-B	Lipase a partir da <i>Candida antartica</i> B
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CENAUREM	Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DMAP	Dimetilaminopiridina
DPPA	Difenil-fosforil-azida
E	Razão enantiomérica
<i>e.e.</i>	Excesso enantiomérico
<i>e.e.<sub>s</sub></i>	Excesso enantiomérico do substrato
<i>e.e.<sub>p</sub></i>	Excesso enantiomérico do produto
DIC	Detector de Ionização de Chama
I.V.	Infravermelho
Lipozyme RM IM	Lipozyme a partir de <i>Rhizomucor miehei</i> imobilizado em resina aniônica
MHz	Megahertz
pH	Potencial Hidrogeniônico
<i>p</i> NPB	Butirato de <i>p</i> -nitrofenila
<i>p</i> NP	<i>p</i> -nitrofenol
PPL	Lipase a partir do pâncreas de Porco
<i>rac</i>	racêmico
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear Protônica
r.p.m	Rotação por minuto
THF	Tetraidrofurano

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	10
LISTA DE TABELAS .....	11
LISTA DE ESQUEMAS .....	13
LISTA DE GRÁFICOS.....	14
LISTA DE ABREVIATURAS.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
2.1 Mal de Parkinson.....	24
2.2 Biocatálise .....	25
2.3 Biocatálise em solventes orgânicos .....	29
2.4 Redução de cetonas para obtenção de alcoóis quirais .....	29
2.5 Aplicações das lipases na síntese de fármacos .....	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
3.1 Proposta (i): Introdução da quiralidade na molécula alvo <i>via</i> biorredução da indanona .....	44
3.2 Reações de biorredução da indanona empregando leveduras .....	44
3.2.1 <i>Reação de biorredução da indanona empregando leveduras, em dois dias</i> .....	44
3.2.2 <i>Reação de biorredução da indanona empregando leveduras, em quatro dias</i> .....	45
3.2.3 <i>Reação de biorredução da indanona empregando leveduras, em seis dias</i> .....	46
3.3 Proposta (ii): Introdução da quiralidade na molécula alvo <i>via</i> resolução cinética enzimática do <i>rac</i> -indanol .....	47
3.4 Triagem de lipases utilizando a reação de hidrólise do <i>rac</i> -acetato de indanila .....	47
3.5 Reação de acetilação do <i>rac</i> -indanol utilizando lipases, em meio orgânico .....	49
3.5.1 <i>Resolução cinética enzimática do rac-indanol utilizando a Amano lipase AK a partir da Pseudomonas fluorescens</i> .....	50
3.5.2 <i>Resolução cinética enzimática do rac-indanol utilizando a Lipase a partir da Thermomyces lanuginosus immobilizada em imobead-150</i> .....	54

3.5.3 Resolução cinética enzimática do rac-indanol utilizando a Amano lipase AK a partir da <i>Pseudomonas fluorescens</i> imobilizada em diferentes suportes.....	61
3.5.4 Resultados de imobilizações.....	69
3.6 Estudo do reuso das enzimas imobilizadas Amano lipase AK e <i>Thermomyces lanuginosus</i> .....	70
3.6.1 Estudo do reuso da Amano lipase AK imobilizada em quitosana 5% de baixo peso molecular.....	70
3.6.2 Estudo do reuso da Amano lipase AK imobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular na presença de alginato de sódio 2,5%.....	71
3.6.3 Estudo do reuso da Lipase a partir da <i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada em <i>immobead-150</i> .....	72
3.7 Síntese quimioenzimática do Mesilato de Rasagilina .....	75
4. CONCLUSÕES .....	77
5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	79
5.1 Instrumentos .....	79
5.2 Solventes e reagentes.....	80
5.2.1 Solventes empregados .....	80
5.2.2 Reagentes empregados .....	80
5.3 Biocatalisadores utilizados .....	81
5.4 Adsorventes utilizados.....	82
5.5 Secagem dos solventes utilizados na reação de biocatálise.....	82
5.6 Preparação dos compostos padrões .....	83
5.6.1 Síntese do indanol racêmico.....	83
5.6.2 Síntese do acetato de indanila racêmico .....	83
5.6.3 Síntese do (R)-azidoindano.....	83
5.6.4 Síntese da (R)-indanamina .....	84
5.7 Processos biocatalíticos .....	84
5.7.1 Meio de cultura empregado.....	84

5.7.2 Isolamento das leveduras .....	85
5.7.3 Conservação das leveduras .....	85
5.7.4 Meio reacional.....	85
5.8 Reações de resolução cinética enzimática.....	85
5.8.1 Resolução cinética enzimática do rac-acetato de indanila via reação de hidrólise empregando lipases comerciais.....	85
5.8.2 Resolução cinética enzimática do rac-indanol via reação de acetilação utilizando a Amano lipase AK a partir da <i>Pseudomonas fluorescens</i> e a Lipase a partir da <i>Thermomyces lanuginosus</i> immobilizada em <i>immobead-150</i> .....	86
5.9 Imobilizações enzimáticas.....	86
5.9.1 Preparação da solução enzimática da Amano lipase AK a partir da <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	85
5.9.2 Preparação do suporte quitosana e híbridos.....	86
5.9.3 Reticulação dos suportes com glutaraldeído.....	86
5.9.4 Imobilização da lipase.....	86
5.9.5 Determinação da atividade hidrolítica das lipases.....	87
5.9.6 Atividade da enzima solúvel (livre).....	87
5.9.7 Atividade hidrolítica dos derivados ( $A_{t_{derivado}}$ ).....	88
5.9.8 Determinação da atividade recuperada ( $A_{t_{rec.}}$ ) e do rendimento de imobilização (%R).....	88
5.10 Procedimento para calcular excesso enantiomérico, conversão e razão enantiomérica.....	89
REFERÊNCIAS .....	92

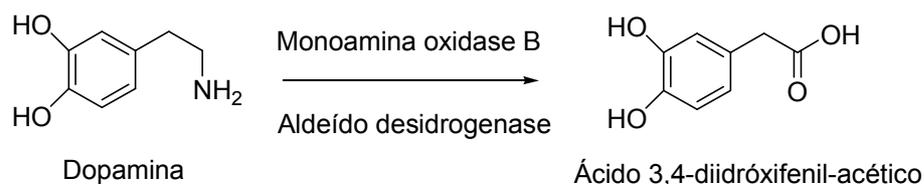
# *Capítulo 1*

## *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

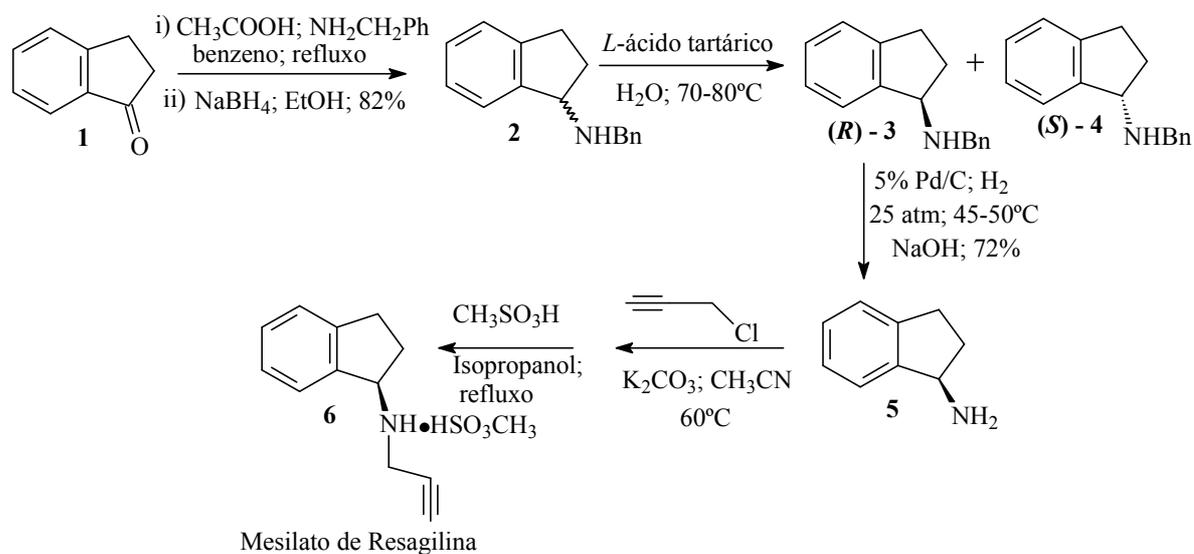
A indústria Teva lançou em 2005, em Israel, um fármaco denominado de Mesilato de Rasagilina (substância **6** apresentada no **Esquema 2**), princípio ativo do medicamento comercializado como Azilect®. Esse medicamento é utilizado na monoterapia de pacientes com Parkinson no estágio inicial e como adjuvante na fase moderada a avançada da doença (SAKIA; LIN; LIU, 2007, p. 443). O Mesilato de Rasagilina possui um centro estereogênico com configuração *R*, sendo 1000 vezes mais ativo que seu enantiômero *S* (WEINREB *et al.*, 2010, p. 334) O referido fármaco atua retardando a degradação da dopamina, inibindo a enzima monoamina oxidase B. Essa enzima tem como ação desaminar oxidativamente a dopamina presente no cérebro (**Esquema 1**) (BRAVO; NASSIF, 2006, p. 25).

**Esquema 1** - Mecanismo de degradação da dopamina pela monoamina oxidase B.

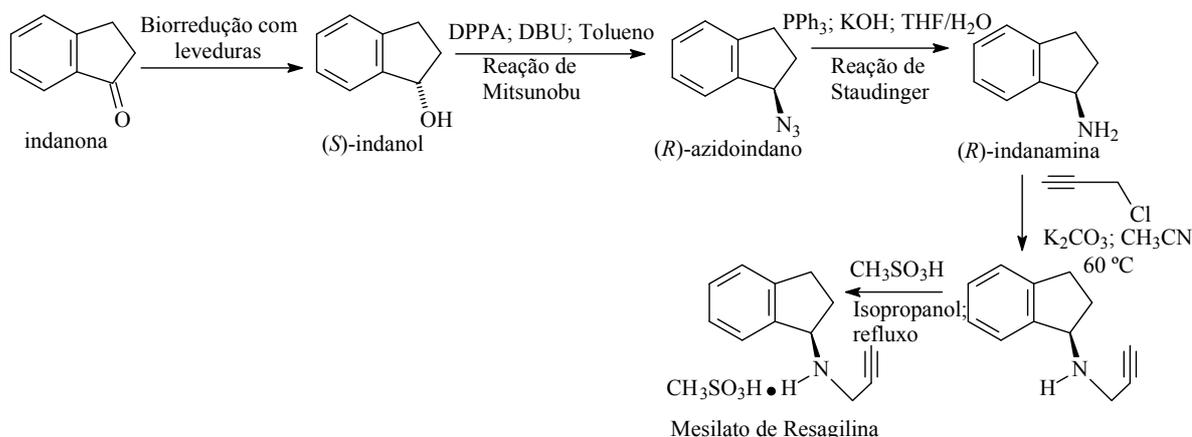


Após a busca de artigos na literatura referentes a síntese do Mesilato de Rasagilina, foi possível encontrar uma patente de Japoneses (URUYAMA *et al.*, 2006). Os autores realizaram a condensação da indanona (**1**) com a benzilamina resultando na correspondente imina, que foi reduzida com boroidreto de sódio, em etanol, produzindo uma substância intermediária racêmica (**2**) com 82% de rendimento. A substância **2** foi resolvida empregando o *L*-ácido tartárico, que após recristalização utilizando água, em ebulição, gerou o (*R*)-**3**. Em seguida, (*R*)-**3** foi desprotegido, em meio básico, na presença de Pd/C; H<sub>2</sub> resultando na (*R*)-indanamina (**5**) com 72% de rendimento. A amina **5** foi alquilada com cloreto de propargila para produzir o mesilato. Finalmente, o fármaco (**6**) foi obtido por tratamento com ácido metassulfônico, em isopropanol sob refluxo. Os autores não relataram o rendimento do Mesilato de Rasagilina.

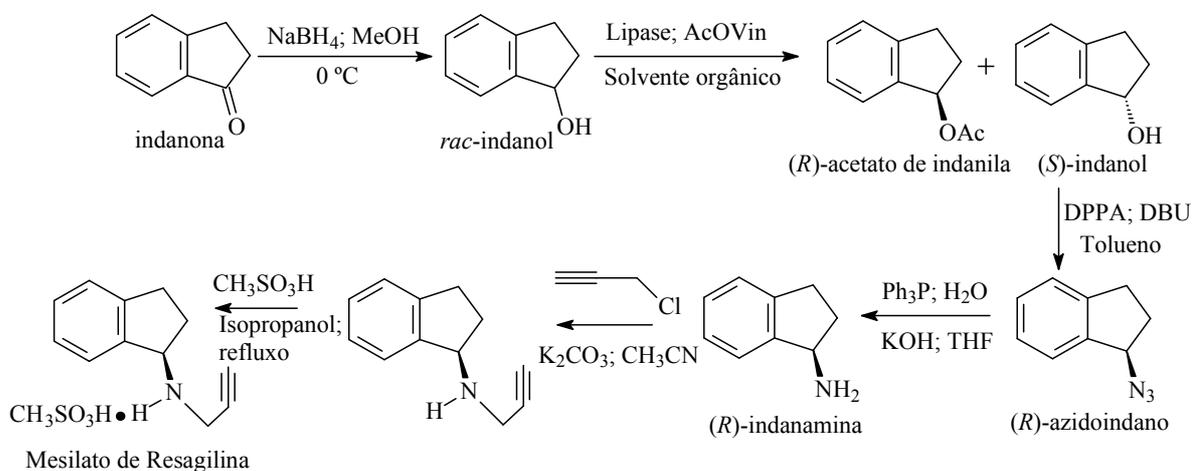
**Esquema 2 - Síntese do Mesilato de Rasagilina.**



O presente trabalho teve como objetivo sintetizar o Mesilato de Rasagilina, utilizando em uma das etapas a biocatálise para a introdução da quiralidade na molécula alvo. A proposta (i) consistiu em realizar a redução enantiosseletiva da indanona na presença de uma levedura eficiente para produzir o correspondente álcool com excelentes valores de conversão e excesso enantiomérico. Cetonas sofrem biorredução na presença de leveduras, sendo que grande parte dos alcoóis secundários foram obtidos com configuração *S* (produto Prelog) (PATEL, 2008, p. 682) (KURBANOGLU; ZILBEYAZ; KURBANOGLU, 2011, p. 346). Portanto, nesta proposta (i) a biorredução da indanona por levedura produz, provavelmente, o (*S*)-indanol. Na etapa seguinte, o (*S*)-indanol é convertido por uma reação de Mitsunobu, no (*R*)-azidoindano (FERNANDÉZ *et al.*, 2007, p. 6760). Nesta reação ocorrerá a inversão de configuração. Posteriormente, o (*R*)-azidoindano é transformado na (*R*)-indanamina, *via* uma reação de Staudinger (CHOW *et al.*, 2008). O fármaco Mesilato de Rasagilina é, finalmente, obtido após a reação da (*R*)-indanamina com cloreto de propargila, seguida de tratamento com ácido metassulfônico (**Esquema 3**).

**Esquema 3** - Síntese do fármaco empregando leveduras.

Na proposta (ii), a indanona é reduzida ao *rac*-indanol na presença de boroidreto de sódio. Em seguida o *rac*-indanol é submetido a uma resolução cinética enzimática na presença de uma lipase, capaz de levar a um excelente valor de razão enantiomérica (*E*) em um curto tempo reacional. Neste caso, a introdução da quiralidade na molécula alvo consiste na ação da lipase *via* uma resolução cinética do *rac*-indanol, na presença de um doador de acila. Comumente, tais resoluções cinéticas seguem a regra empírica de Kazlauskas, com a obtenção do álcool remanescente com configuração *S* e o correspondente éster com configuração *R* (KAZLAUSKAS *et al.*, 1991). Portanto, na proposta (ii), a resolução cinética enzimática do *rac*-indanol deve produzir o (S)-indanol. A partir deste ponto, o (S)-indanol é convertido na molécula alvo seguindo as mesmas etapas descritas na proposta (i), (**Esquema 4**).

**Esquema 4** - Síntese do fármaco realizando resolução cinética enzimática.

## *Capítulo 2*

# *Revisão Bibliográfica*

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Mal de Parkinson

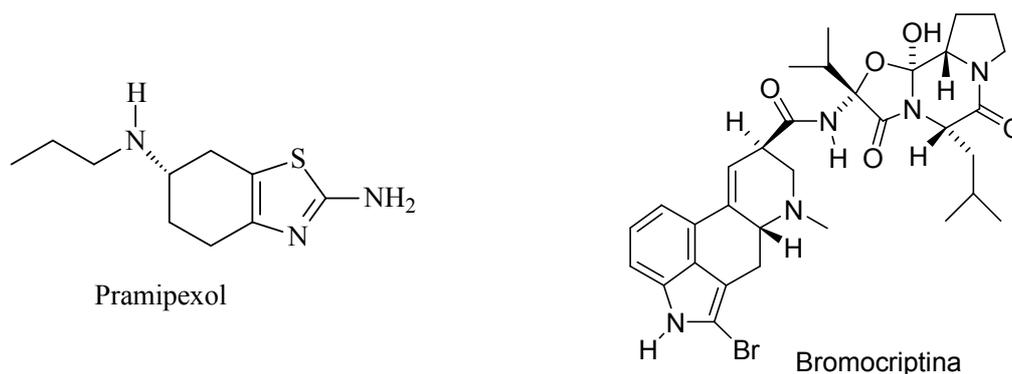
A doença ou mal de Parkinson é considerado uma desordem neurológica degenerativa progressiva do sistema nervoso central, acometendo, principalmente, o sistema motor. (MÜNCHAU; BHATIA, 2000, p. 602).

A característica principal presente nos pacientes é a intensa perda de neurônios cerebrais dopaminérgicos localizados na região negra, a qual compõe o sistema motor extrapiramidal e está diretamente relacionada à coordenação dos movimentos (RANG *et al.*, 2004, p. 567).

O médico inglês James Parkinson descreveu, em 1817, o mal de Parkinson, em sua principal obra “Um Ensaio sobre a Paralisia Agitante”, citando os seguintes sintomas: tremor em repouso, rigidez muscular, lentidão dos movimentos voluntários, alterações posturais, depressão e comprometimento da memória (BRAVO; NASSIF, 2006, p. 25).

Atualmente, não há nenhum tratamento definitivo para a doença, os fármacos empregados clinicamente atuam de forma dopaminomimética, como precursores de dopamina (levodopa) e/ou agonistas de receptores dopaminérgicos, tais como pramipexol ou bromocriptina (**Figura 1**) (DRUKARCH; van MUISWINKEL, 2000, p. 1023).

**Figura 1** - Fármacos utilizados no tratamento do mal de Parkinson.



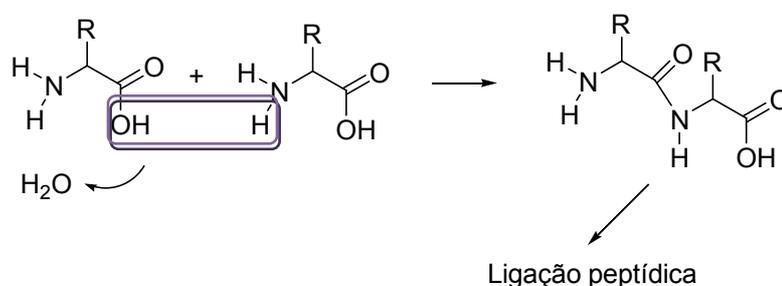
## 2.2 Biocatálise

A biocatálise é, atualmente, uma das áreas mais importantes em síntese orgânica, uma vez que faz o uso de catalisadores naturais. A área de biocatálise desenvolve transformações orgânicas em uma ou mais etapas, para a produção de substâncias bioativas com alto grau de pureza (LILJEBLAD; KANERVA, 2006, p. 5832).

O termo biocatálise abrange os processos em que um catalisador ambientalmente compatível (enzima) é utilizado para a conversão de um substrato (composto orgânico) em um produto de interesse. Essa conversão é realizada em condições reacionais brandas, com a utilização de água, na maioria das vezes, como solvente (SILVERMAN, 2000, p. 202).

As enzimas são proteínas de grande complexidade estrutural que atuam como catalisadores na maioria das reações químicas que ocorrem no metabolismo celular e são constituídas por resíduos de aminoácidos unidos através de ligações peptídicas (**Figura 2**). As enzimas têm funções de regular e manter os processos vitais, além de acelerar reações químicas, que, em sua ausência, ocorreriam lentamente ou até mesmo nem ocorreriam (SAID, PIETRO, 2004, p. 2).

**Figura 2** – Formação da ligação peptídica entre dois aminoácidos.



A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM) classifica as enzimas em seis diferentes grupos e cada uma delas são subdivididas de acordo com o tipo de reações que catalisam (FABER, 2004, p. 23) (**Tabela 1**).

**Tabela 1** – Classificação das enzimas.

Número	Classes	Tipo de reação catalisada	Subclasses	Utilidade <sup>a</sup>
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons ou remoção de hidrogênio	Hidrogenases, oxidases,	25%

---

			peroxidases e redutases	
2	Transferases	Reações de transferência de grupos	Transaldolases e transcetolases	5%
3	Hidrolases	Reações de hidrólise	Esterases, lipases, peptidases, fosfatases	60%
4	Liasas	Reações de adição de grupos à ligação dupla ou formação de ligações duplas por remoção de grupos	Descarboxilases e fosfatases	7%
5	Isomerasas	Transferência de grupos dentro da molécula para produzir isômeros	Racemases e epimerases	2%
6	Ligases	Formação e clivagem de ligações C-C, C-S, C-O, C-N e ésteres de fosfato	Sintetases	1%

---

<sup>a</sup> Utilidade estimada da classes de enzimas em transformações de substratos não naturais.

Uma das grandes vantagens de fazer o uso de enzimas em reações biocatalíticas são as condições reacionais brandas, como em temperaturas ambientes (20° - 40° C) e em soluções com pH em torno de 5 – 8, fato que proporciona uma diminuição em problemas reacionais de decomposição, racemização, eliminação e isomerização. Além disso, os biocatalisadores enzimáticos, comparados com os catalisadores sintéticos que contém metais pesados, são mais vantajosos, porque são ambientalmente aceitáveis, uma vez que são completamente biodegradáveis (FABER, 2004, p. 3).

O tipo de biocatalisador a ser empregado nestas condições (enzimas livres, isoladas ou imobilizadas e células de microrganismos) pode ser dependente de alguns fatores como o tipo de reação, a necessidade ou não do uso de cofatores e a escala na qual as biotransformações devem ser conduzidas. O método mais comum utilizado em biocatálise para a busca de novas enzimas é realizando a seleção de microrganismos. Neste caso, os microrganismos são de grande interesse devido ao curto período de reprodução, a grande

diversidade de processos metabólicos e enzimas envolvidas, além da diversidade de organismos na natureza que podem ser testados. Os microrganismos possuem a capacidade de modificar e degradar uma variedade de moléculas orgânicas. Sendo assim, é de se esperar que pelo menos alguns deles sejam capazes de catalisar uma dada reação de interesse em experimentos de triagens (DE CONTI; RODRIGUEZ; MORAN, 2001, p. 674).

Enzimas puras também são utilizadas como biocatalisadores, as quais são isoladas de diferentes fontes, sendo em sua maioria comercialmente disponíveis. As enzimas isoladas são mais ativas e seletivas do que as células íntegras de plantas e microrganismos. Entretanto, sua recuperação e purificação pode ser extremamente cara (FABER, 2004, p. 9).

A **Tabela 2** apresenta as vantagens e desvantagens do uso de enzimas isoladas e células íntegras.

**Tabela 2** – Vantagens e desvantagens no uso células íntegras ou enzimas isoladas (FABER, 2004, p. 10).

Biocatalisador	Forma	Vantagens	Desvantagens
<b>Enzimas isoladas</b>	Qualquer	Melhor produtividade devido à maior tolerância de concentrações	Necessidade de recuperação de cofatores
	Dissolvida em água	Alta atividade enzimática	Necessidade de extração e possíveis reações laterais
	Suspensas em solventes orgânicos	Fácil manipulação e fácil recuperação da enzima	Atividade reduzida
	Imobilizada	Fácil recuperação da enzima	Perda de atividade durante a imobilização
<b>Células íntegras</b>	Qualquer	Não há necessidade da recuperação de cofatores	Equipamentos caros e baixa produtividade
	Células em crescimento	Alta atividade	Formação de subprodutos
	Células imobilizadas	Reutilização de células	Baixa atividade

As enzimas imobilizadas possuem como vantagens, em relação às utilizadas na forma livre, maior estabilidade e facilidade de separação do meio de reação, proporcionando uma economia significativa no custo global do processo, desde que o processo de imobilização não seja muito dispendioso, possua uma boa recuperação da atividade enzimática e que a meia-vida operacional da enzima imobilizada seja suficientemente longa (BON *et al.*, 2008, p. 123).

Kennedy e Roig, em 1995, propuseram uma classificação dos métodos de imobilização de enzimas, considerando a combinação da natureza da interação responsável pela imobilização e o tipo de suporte utilizado (BON *et al.*, 2008, p. 126). A classificação mais aceita na literatura encontra-se abaixo.

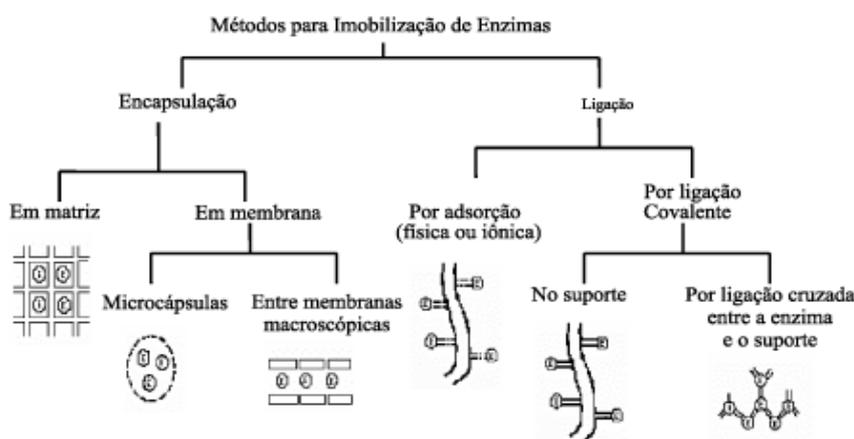
i) Ligação em suportes: modificação da enzima, por meio de técnicas apropriadas, para torná-las imóveis no meio da reação.

ii) Enzimas solúveis sem derivatização: enzimas solúveis, utilizadas em reatores equipados com membranas semipermeáveis de ultrafiltração e fibras ocas que retêm a enzima no interior do reator.

iii) Enzimas solúveis com derivatização: enzimas cuja mobilidade foi restringida pela ligação com outra macromolécula, porém permanecendo o complexo solúvel em água.

Existem duas principais técnicas de reter uma enzima no interior dos biorreatores, são elas: a imobilização de enzima no interior de um suporte (encapsulação e retenção por intermédio de membranas) e a imobilização na superfície de um suporte (ligação covalente e não-covalente) (CANILHA, CARVALHO, ALMEIDA, 2006, p. 49). A **Figura 3** ilustra os principais métodos de imobilização de enzimas.

**Figura 3** – Métodos de imobilização de enzimas.



### 2.3 Biocatálise em solventes orgânicos

As reações biocatalíticas empregando sistemas multifásicos em que uma das fases é um solvente orgânico apresentam vantagens como permitir a solubilização de compostos hidrofóbicos, tais como substratos e produtos, a redução de efeitos inibitórios/tóxicos de substratos e/ou produtos e o deslocamento do equilíbrio da reação através do controle de atividade de água. As principais desvantagens relacionadas ao uso de solventes orgânicos como meio de bioconversão, são o aumento das limitações difusionais à transferência de massa de substratos e/ou produtos, pois mais uma fase (orgânica) é adicionada, além da fase aquosa (e de uma fase sólida, se o biocatalisador estiver imobilizado) e o grau de toxicidade do solvente orgânico para o biocatalisador (AIRES-BARROS, 2013, p. 3).

Na seleção de um solvente orgânico existem vários critérios a serem avaliados, sendo um deles o físico-químico em que consiste na capacidade de solubilização do substrato e/ou produto, capacidade de extração, o solvente orgânico deve ser estável em diferentes temperaturas e não deve formar emulsões em meio aquoso. O critério biológico apresenta maior restritividade pelo fato de que o grau de toxicidade do solvente orgânico para o biocatalisador deve ser reduzido. Pelo critério de segurança, o solvente orgânico não deve ser tóxico ao meio ambiente, nem ser prejudicial para a saúde, além de não ser inflamável. Do ponto de vista da logística, deverá apresentar uma alta disponibilidade e a sua reciclagem deve ser possível. Em termos econômicos, o seu custo deve ser baixo (AIRES-BARROS, 2013, p. 4).

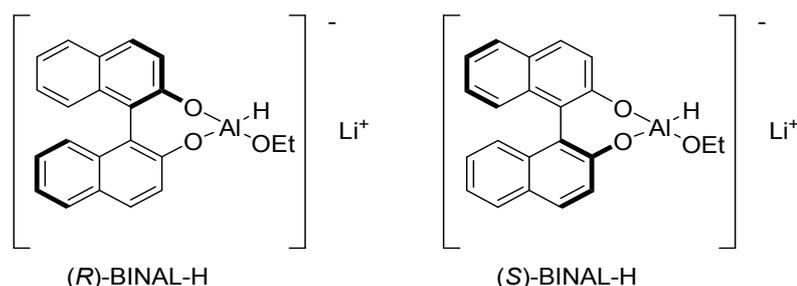
### 2.4 Redução de cetonas para obtenção de alcoóis quirais

A produção de alcoóis quirais tem como base a redução assimétrica de cetonas, Esses alcoóis podem ser transformados em várias outras funcionalidades, sem racemização e são utilizados para sintetizar importantes produtos químicos de interesse industrial, como o agroquímico, alimentícios e cosméticos. Entretanto, a indústria farmacêutica se destaca por uma busca crescente em sintetizar fármacos através de rotas alternativas, que sejam ambientalmente aceitáveis e com um maior interesse econômico (MOUAD, 2009, p. 13).

A síntese de álcoois quirais pode ser realizada utilizando um composto carbonílico pró-quiral e um agente redutor quiral. Entre esses agentes redutores quirais podem ser citados os (*R*)-BINAL-H e (*S*)-BINAL-H (**Figura 4**), alpino borano, complexos de rutênio, ródio e

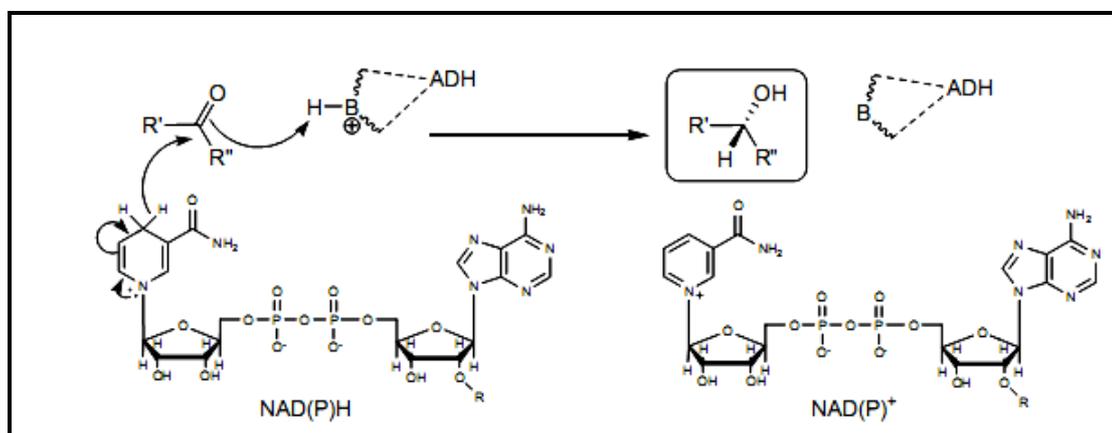
outros metais associados a ligantes quirais. No entanto, essa metodologia seria por *via* química com a desvantagem de ser prejudicial ao meio ambiente. Além disso, utilizam-se compostos que são tóxicos, como também na obtenção de baixos valores de rendimentos, proporcionando elevados custos e necessitando de condições específicas. (SCHAFER *et al.*, 2010, p. 356).

**Figura 4** – (*R*)-BINAL-H e (*S*)-BINAL-H.



A redução de grupos carbonílicos por *via* enzimática para obtenção de álcoois quirais, possui a vantagem de ser ambientalmente benigna e fazer uso de condições limpas. As enzimas que podem ser utilizadas para biorredução de grupos carbonílicos são a desidrogenase e oxido-redutase, que requerem a presença da coenzima (cofator) NADH ou NADPH que transferem o hidreto para o composto carbonílico, sendo assim formado NAD<sup>+</sup> ou NADP<sup>+</sup>. O papel da enzima desidrogenase é realizar uma interação do substrato com o cofator de forma, termodinamicamente, favorável para a ocorrência da reação (**Figura 5**) (JURCEK, WIMMEROVA, WIMMER, 2008, p. 773).

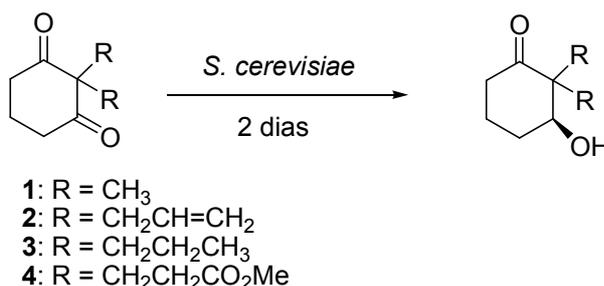
**Figura 5** - Mecanismo de reação mediada por ADH e sua coenzima.



R=H (NADH) ou R=PO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (NADPH); ADH= álcool desidrogenase, B= resíduo de aminoácido da enzima  
 Fonte: ANDRADE, 2008, p. 6.

Os pesquisadores chineses Wei, Li e Lin (2001) empregaram a levedura *Saccharomyces cerevisiae* na biorredução de 1,3-ciclohexanodionas com dois substituintes idênticos, produzindo os correspondentes (*S*)-monoalcoóis (**Esquema 5**). Os rendimentos dos produtos variaram entre 3 e 61%, além de excessos enantioméricos entre 96 e 98,4%.

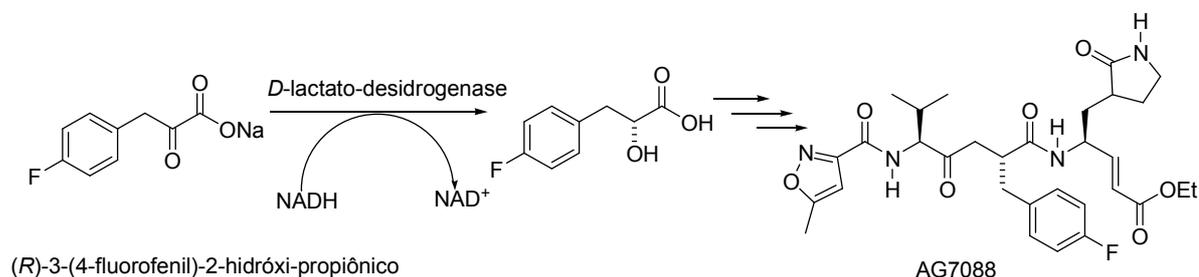
**Esquema 5** – Biorredução de 1,3-ciclohexanodionas dissustituídas empregando *Saccharomyces cerevisiae*.



Tao e McGee (2002) utilizaram um sistema reacional enzimático contínuo para sintetizar o ácido (*R*)-3-(4-fluorofenil)-2-hidróxi-propiónico, empregando duas desidrogenases, a *D*-lactato-desidrogenase dependente de NADH, responsável pela redução assimétrica da cetona (**Esquema 6**). Os autores tiveram como resultados 80 a 90% de rendimento e excesso enantiomérico >99%.

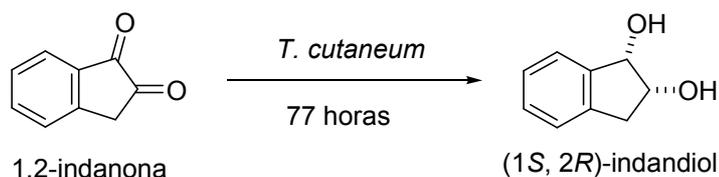
Esse ácido carboxílico é um intermediário sintético utilizado na síntese total do AG7088, um inibidor de peptidase (TAO; McGEE, 2002, p. 520).

**Esquema 6** – Síntese enzimática do ácido (*R*)-3-(4-fluorofenil)-2-hidróxi-propiónico.



Conceição, Moran e Rodrigues, em 2003, realizaram a biorredução da 1,2-indanona pela levedura *Trichosporon cutaneum* para a obtenção do (1*S*, 2*R*)-indandiol (**Esquema 7**). Os resultados obtidos pelos autores foram um rendimento de 75% e excesso enantiomérico do diol maior que 99%.

**Esquema 7** – Biorredução da 1,2-indanona empregando a levedura *Trichosporon cutaneum*.



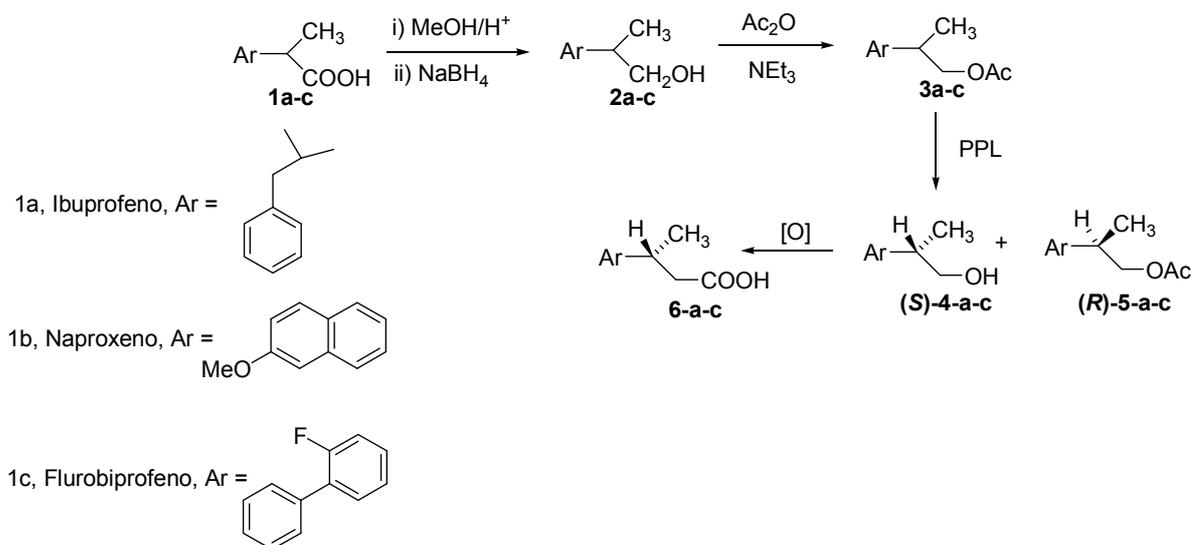
## 2.5 Aplicações das lipases na síntese de fármacos

As indústrias farmacêuticas vêm utilizando cada vez mais as lipases em seus processos produtivos. A utilização das lipases se deve, principalmente, pelas características de regio, enantio e quimiosseletividade no processo de resolução de racematos. Além disso, essa classe de enzimas possui, em geral, excelente estabilidade na presença de solventes orgânicos, nos quais os substratos dessas reações são solúveis (GOTOR-FERNÁNDEZ; BRIEVA; GOTOR, 2006, p. 111).

No início da década de 1980 as misturas racêmicas eram comercializadas em quantidade sete vezes superiores aos fármacos opticamente puros, embora a atividade biológica de um dos enantiômeros de um determinado fármaco seja diferente do outro enantiômero. Entretanto, em 1999, os fármacos opticamente puros representavam 25% dos fármacos em comercialização (BON *et al.*, 2008, p. 376).

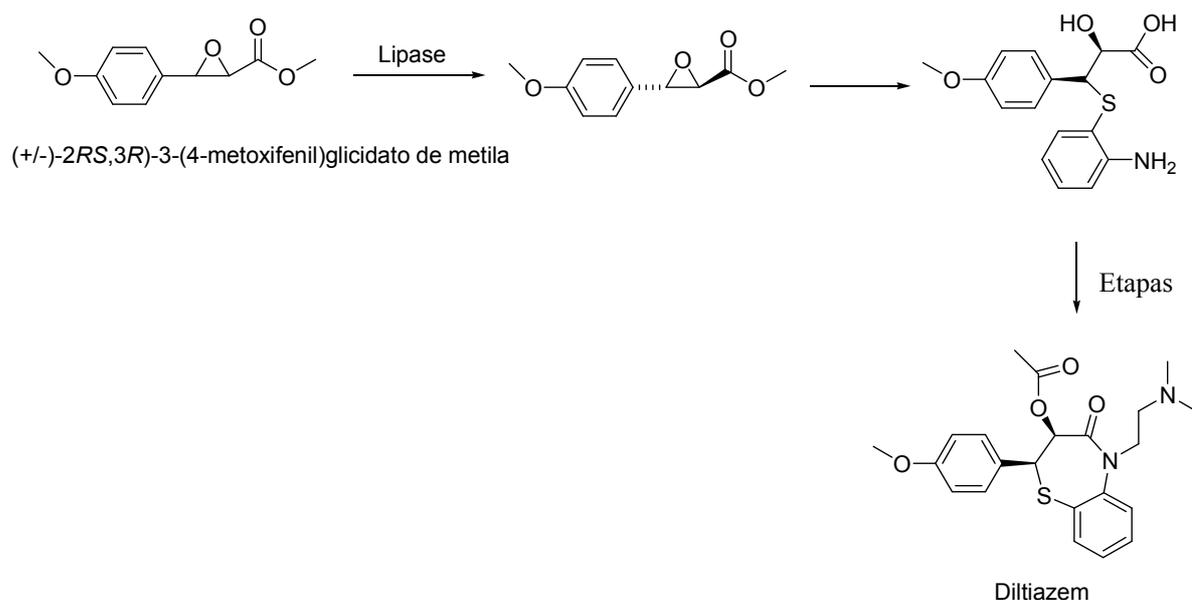
Basak e colaboradores, em 2000, realizaram a síntese quimioenzimática de fármacos que são anti-inflamatórios (**6-a-c**, apresentados no **Esquema 8**) em suas formas enantiomericamente puras (**Esquema 8**). Os pesquisadores realizaram, na etapa enzimática, a hidrólise do composto **3** (apresentado no **Esquema 8**) empregando a Lipase pancreática de porco (PPL). Como resultados, foram obtidos valores entre 89-94% de excesso enantiomérico do composto (**S**)-**4** (apresentado no **Esquema 8**), conversões entre 35-48% e razão enantiomérica entre 54-91,7%.

**Esquema 8** – Síntese quimioenzimática de fármacos anti-inflamatórios.



Um dos medicamentos mais comercializados no mundo, o Diltiazem®, prescrito para o tratamento da hipertensão arterial e vários outros distúrbios circulatórios, possui em uma das etapas a resolução do éster 3-(4-metoxifenilglicidato) de metila racêmico (apresentado no **Esquema 9**), utilizando-se a lipase a partir da *Serratia marcescens* (SHIBATANI *et al.*, 2000, p. 142).

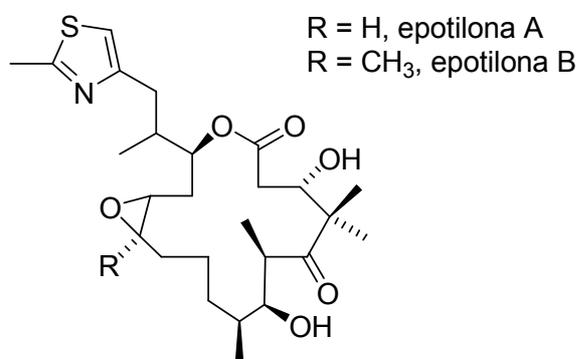
**Esquema 9** – Resolução do éster 3-(4-metoxifenilglicidato) de metila (ALMEIDA, 2001, p. 18).



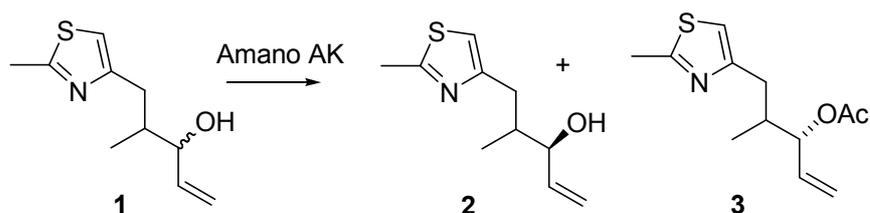
Outro exemplo é a obtenção das epotilonas A e B que possuem uma alta capacidade na atividade antitumoral. O mecanismo de ação das epotilonas A e B está relacionado com a estabilização da tubulina, impedindo a replicação celular (SOUZA, 2003, p. 310).

A Amano lipase AK a partir da *Pseudomonas fluorescens* foi utilizada para catalisar a reação de produção de um intermediário da síntese da epotilona A (R=H) ou da epotilona B (R=CH<sub>3</sub>) (**Figura 6**). A substância **2** (apresentada no **Esquema 10**) representa um intermediário para a síntese da epotilona A (JAEGER; EGGERT, 2002, p. 393).

**Figura 6** – Epotilona A e B.



**Esquema 10** – Resolução cinética enzimática de uma substância intermediária para a obtenção da epotilona A.



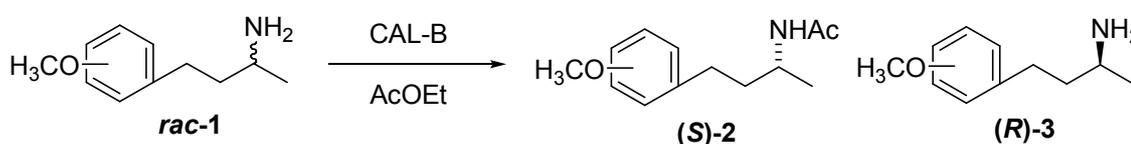
As aminas e seus derivados são substâncias importantes na área farmacológica. A *Candida antarctica* lipase B, mostrou-se ser um biocatalisador eficiente para a reação enzimática de aminólise, em solventes orgânicos, permitindo a preparação de uma enorme variedade de aminas primárias opticamente ativas (VAN RANTWIJK, SHELDON, 2004, p. 504).

As anfetaminas são um tipo de classe de fármacos sintéticos que agem estimulando a atividade do sistema nervoso central. O potencial de ação do referido fármaco é

aumentado devido à presença do grupo metoxila no anel aromático (GOTOR-FERNÁNDEZ; BRIEVA; GOTOR, 2006, p. 116).

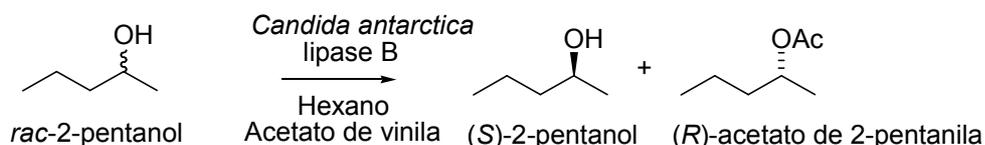
González-Sabin, Gotor e Rebolledo (2002) realizaram a resolução cinética enzimática dos isômeros *orto*, *meta* e *para*-metóxi Anfetaminas racêmicos (**rac-1**, apresentado no **Esquema 11**) empregando a *Candida antarctica* lipase B e o acetato de etila como doador de acila e solvente orgânico (**Esquema 11**).

**Esquema 11** – Resolução cinética enzimática de derivados da anfetamina empregando a *Candida antarctica* lipase B.



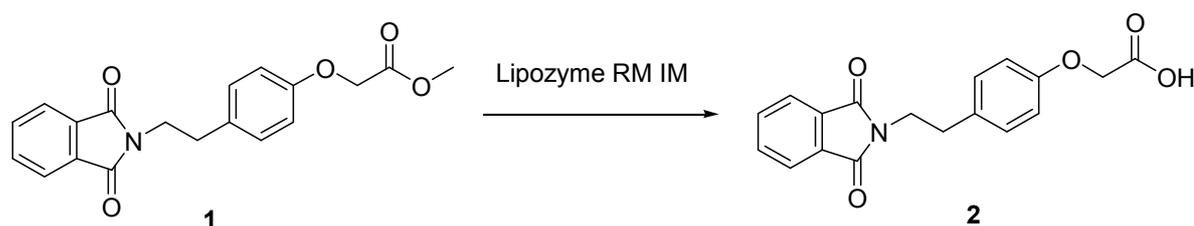
O (*S*)-2-pentanol é um intermediário na síntese de vários fármacos para o combate do mal de Alzheimer. A resolução cinética enzimática do 2-pentanol racêmico foi realizada pela lipase B a partir da *Candida antarctica* em hexano como solvente orgânico e acetato de vinila como agente doador de acila (**Esquema 12**). Como resultados da resolução cinética enzimática, obtiveram-se 49% de conversão e excesso enantiomérico >99% para o (*S*)-2-pentanol (PATEL, 2004, p. 314).

**Esquema 12** – Resolução cinética enzimática do (*S*)-2-pentanol empregando a lipase B a partir da *Candida antarctica*.



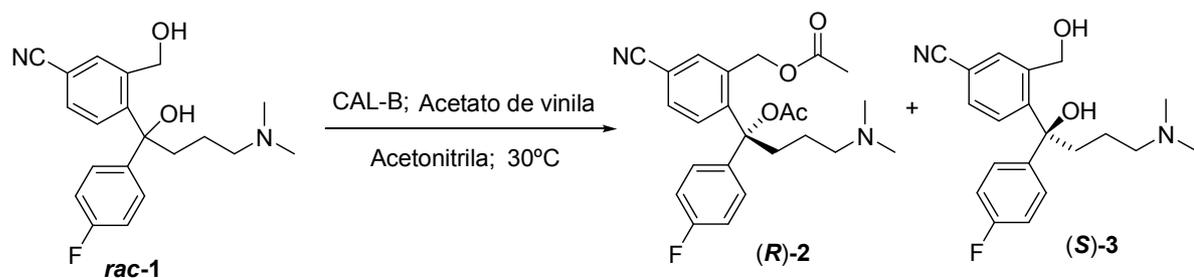
Bevilaqua e colaboradores (2004) realizaram a hidrólise quimiosseletiva de um éster ftalimídico (substância **1**, **Esquema 13**), produzindo a substância **2**, (**Esquema 13**) que é um precursor de um fármaco utilizado no combate da asma. Os pesquisadores empregaram uma lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme® IM), e obtiveram 98% de conversão (**Esquema 13**).

**Esquema 13** – Hidrólise quimiosseletiva de um éster ftalimídico empregando a Lipozyme RM IM.



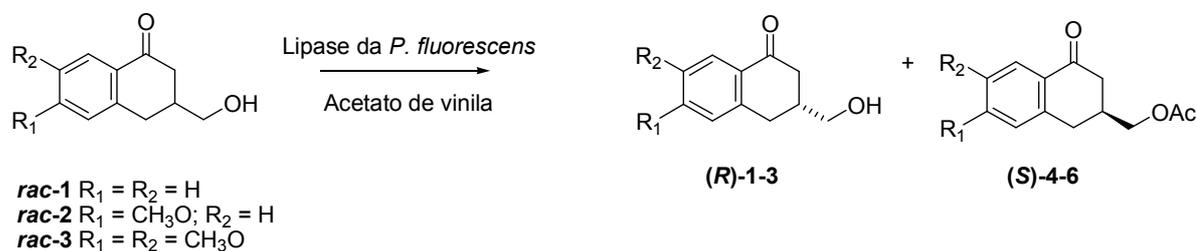
Solares *et al.* (2004) realizaram uma estratégia adequada para a síntese do citalopram, um inibidor seletivo da serotonina e, também, eficaz agente antidepressivo. Os autores realizaram a resolução cinética enzimática do 4-[(4-dimetilamino)-1-(4-fluorofenil)-1-hidroxi-1-butil]-3-(hidroximetil) benzonitrilo racêmico (*rac-1*, apresentado no **Esquema 14**). A atividade de inibição reside na forma do enantiômero *S*. Os melhores resultados foram obtidos com a *Candida antarctica* lipase B, acetato de vinila como doador de acila e acetonitrila como solvente orgânico (**Esquema 14**).

**Esquema 14** – Resolução cinética enzimática do 4-[(4-dimetilamino)-1-(4-fluorofenil)-1-hidróxi-1-butil]-3-(hidroximetil) benzonitrilo racêmico utilizando a *Candida antarctica* lipase B.



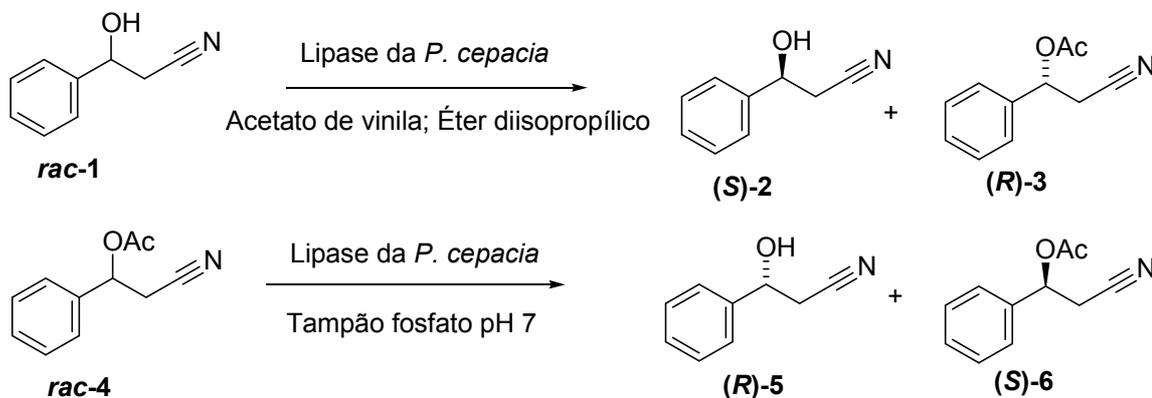
Caro *et al.* (2004) empregaram a resolução cinética enzimática de derivados da 3-hidroximetil-1-tetralona racêmica (*rac-1-3*, apresentados no **Esquema 15**), intermediários utilizados na síntese de fármacos com potenciais antipsicóticos (**Esquema 15**). Os autores utilizaram como catalisador enzimático a lipase a partir da *Pseudomonas fluorescens*, acetato de vinila como doador de acila e como solventes orgânicos: benzeno, THF e acetato de vinila. Foram obtidos resultados de conversões entre 48-58%, excessos enantioméricos de (*R*)-1-3, (apresentados no **Esquema 15**) entre 91->99%, excessos enantioméricos de (*S*)-4-6 (apresentados no **Esquema 15**) entre 72,5->99% e razão enantiomérica entre 45->200.

**Esquema 15** – Resolução cinética enzimática de derivados da 3-hidroxi-1-tetralona racêmica empregando lipases.



Kamal e seus colaboradores (2005) realizaram a síntese quimioenzimática do Levamisol (substância **(S)-14**, apresentada no **Esquema 17**). O fármaco possui ação imunostimulante e anti-helmíntico. Os autores iniciaram a síntese com a reação de acetilação do 3-hidroxi-3-fenilpropanonitrila racêmico (**rac-1**, apresentado no **Esquema 16**) utilizando a lipase a partir da *Pseudomonas cepacia* imobilizada em cerâmica modificada como biocatalisador, acetato de vinila como doador de acila e éter diisopropílico como solvente orgânico, além da reação de hidrólise do 3-acetóxi-3-fenilpropanonitrila racêmico (**rac-4**, apresentado no **Esquema 16**) utilizando a lipase a partir da *Pseudomonas cepacia* imobilizada em cerâmica modificada e em terra diatomácea como biocatalisador e uma solução tampão fosfato pH 7 (**Esquema 16**).

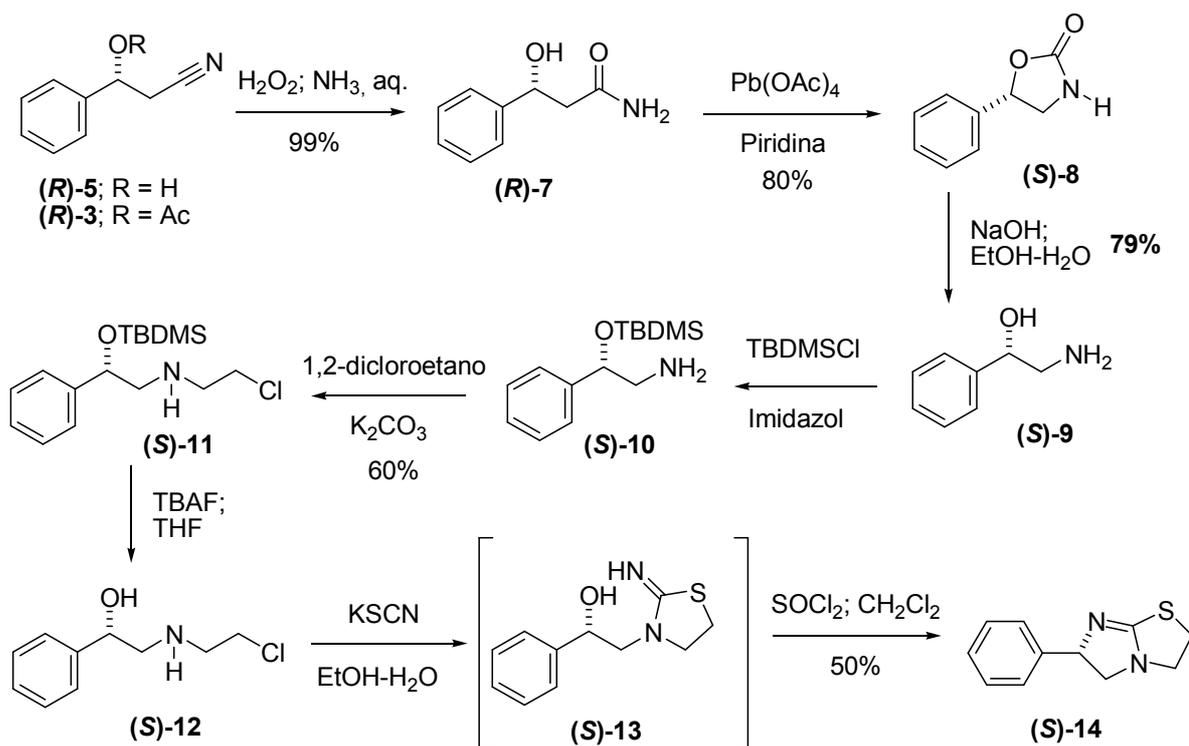
**Esquema 16** – Resolução cinética enzimática do 3-hidroxi-3-fenilpropanonitrila racêmico e do 3-acetoxi-3-fenilpropanonitrila racêmico utilizando a Lipase a partir da *Pseudomonas cepacia*.



Os resultados obtidos de excessos enantioméricos na reação de acetilação de **rac-1** foram maiores que 99% para **(S)-2** e **(R)-3** (apresentados no **Esquema 16**). Para a reação de

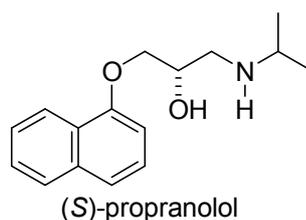
hidrólise de *rac-4*, foram obtidos excessos enantioméricos maiores que 99% para (*R*)-5 e (*S*)-6 (apresentados no **Esquema 16**) utilizando a lipase a partir da *Pseudomonas cepacia* imobilizada em cerâmica modificada e em terra diatomácea, em um tempo reacional de 14 horas e 80 horas, respectivamente.

**Esquema 17** – Síntese quimioenzimática do Levamisol.

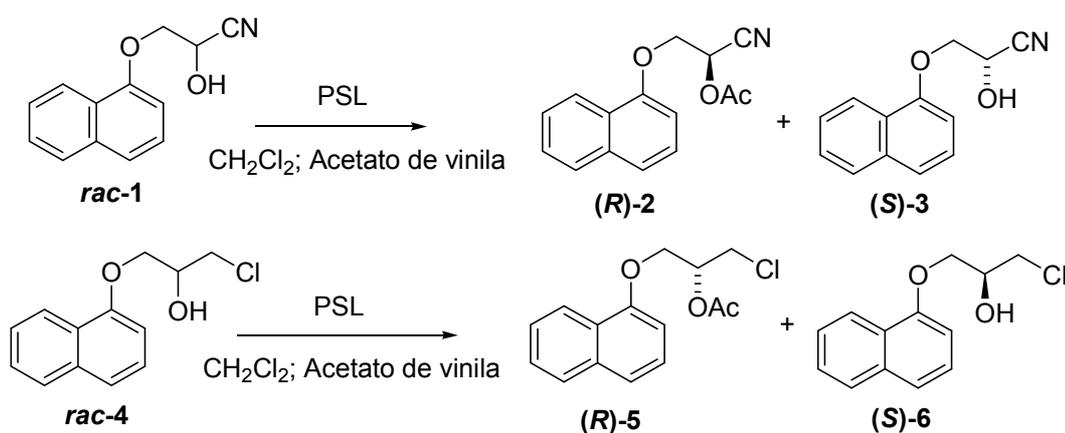


As lipases também são empregadas na síntese de compostos que atuam como vasodilatadores, antidepressivos e anti-hipertensivos. Gotor-Fernández e colaboradores, em 2006, relataram a produção de alguns desses fármacos. Os referidos autores citaram a resolução cinética enzimática através da acilação de halogenoalcoóis (*rac-4*, apresentado no **Esquema 18**) e cianoalcoóis (*rac-1*, apresentado no **Esquema 18**) usando a lipase a partir da *Pseudomonas cepacia* (**Esquema 18**). Esse procedimento foi utilizado com a finalidade de obter compostos intermediários para a síntese do (*S*)-propranolol (**Figura 7**), que é utilizado como anti-hipertensivo e no tratamento de prevenção do infarto do miocárdio (GOTOR-FERNÁNDEZ; BRIEVA; GOTOR, 2006, p. 113).

**Figura 7** – (*S*)-propranolol.

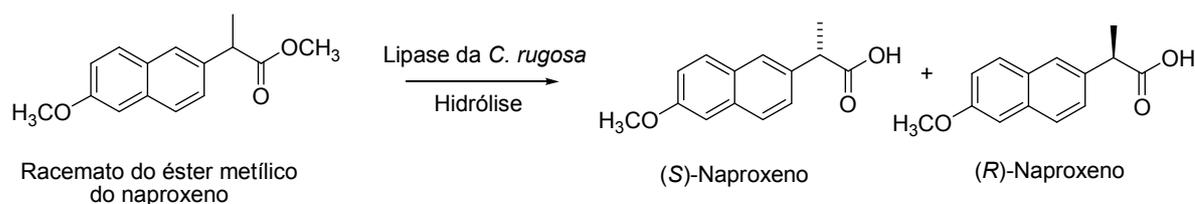


**Esquema 18** – Resolução de intermediários na preparação do (*S*)-propranolol.



Takaç e Bakkal, em 2007, realizaram uma reação de hidrólise do racemato do éster metílico do Naproxeno, empregando a Lipase da *Candida rugosa* imobilizada em Amberlite XAD 7 (**Esquema 19**). Os melhores resultados obtidos foram utilizando as seguintes condições: temperatura de 45°C, pH 6,0 e uma carga da lipase imobilizada de 800 U/mL. Dentro dessas condições, os autores obtiveram uma conversão de 49% e uma razão enantiomérica de 174,2. O Naproxeno na forma de *S* possui uma atividade 28 vezes maior do que seu enantiômero *R*. O (*S*)-Naproxeno é um anti-inflamatório não-esteroidal (TAKAÇ; BAKKAL, 2007, p. 1021).

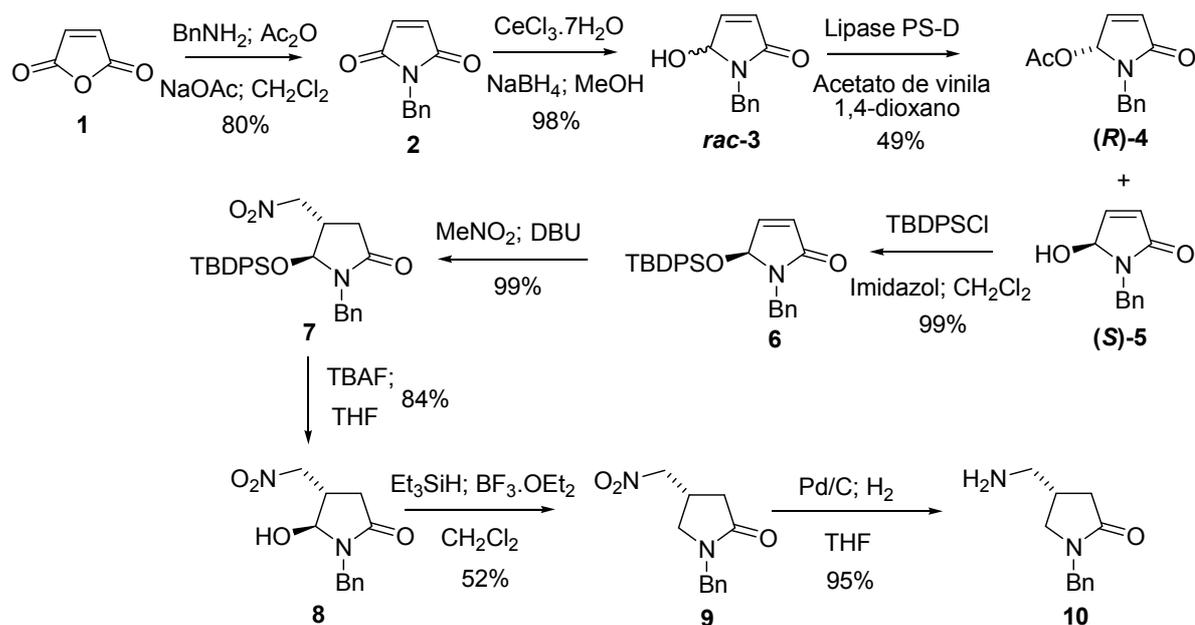
**Esquema 19** – Resolução cinética enzimática do racemato do éster metílico do Naproxeno.



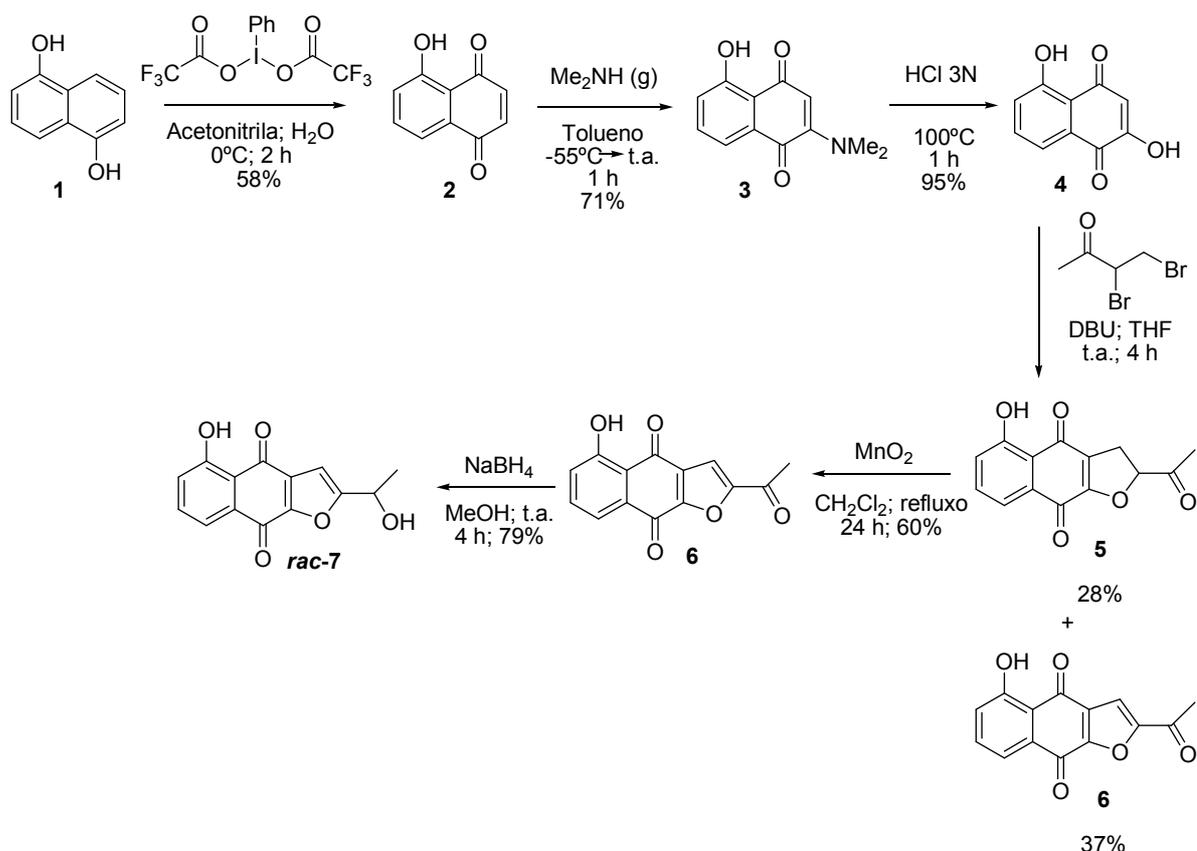
(*S*)-Nebracetam (substância **10**, apresentada no **Esquema 20**) é um fármaco utilizado como antidepressivo, que aumenta a neurotransmissão colinérgica e atua como agonista nos receptores muscarínicos pré-sinaticamente (YAMASHITA; MASE; TAKABE, 2008, p. 2115).

Os pesquisadores japoneses Yamashita, Mase e Takabe, em 2008, realizaram a síntese quimioenzimática do (*S*)-Nebracetam (**Esquema 20**). Na etapa enzimática, os autores realizaram uma reação de acetilação da hidroxilactama racêmica (*rac*-**3**, apresentada no **Esquema 20**) empregando a Amano lipase a partir da *Burkholderia cepacia* (lipase PS-D) como biocatalisador, acetato de vinila como doador de acila, 1,4-dioxano como solvente orgânico, em uma temperatura ambiente e por um tempo reacional de 48 horas. Como resultados, foram obtidos excessos enantioméricos maiores que 99% de (*R*)-**4** e (*S*)-**5** (apresentados no **Esquema 20**), conversão de 49% e razão enantiomérica maior que 200.

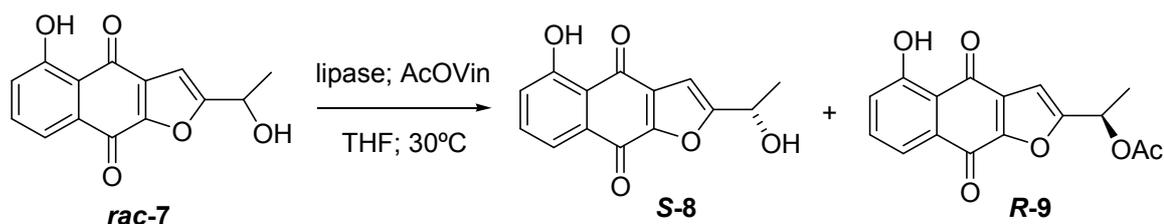
**Esquema 20** – Síntese quimioenzimática do (*S*)-Nebracetam.



Araújo e colaboradores, em 2009, realizaram a preparação quimioenzimática de uma naftoquinona (substância **S-8**, apresentada no **Esquema 22**, p. 40), utilizada como droga antitumoral (FUJIMOTO *et al.*, 1991, p. 2323). Os pesquisadores realizaram, inicialmente, a síntese química da naftoquinona racêmica, (*rac*-**7**, **Esquema 21**).

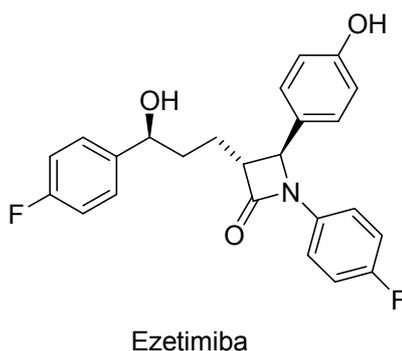
**Esquema 21** – Síntese química de uma naftoquinona.

Posteriormente, foi realizada uma resolução cinética enzimática da naftoquinona racêmica (substância *rac-7*, apresentada no **Esquema 22**) empregando lipases. Os melhores resultados foram obtidos com a lipase a partir da *Candida antarctica* B (2 horas de reação) e a lipase a partir da *Pseudomonas cepacia* (3 horas de reação) como biocatalisadores, acetato de vinila como doador de acila, THF como solvente orgânico e temperatura de 30°C. Foram obtidos excessos enantiomérico maiores que 99% para *S-8* e *R-9* (apresentados no **Esquema 22**), conversão de 50% e razão enantiomérica maior que 200.

**Esquema 22** – Resolução cinética enzimática da naftoquinona racêmica empregando lipases.

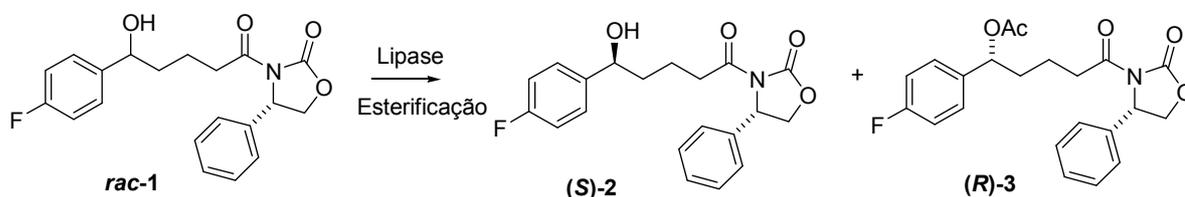
Singh e colaboradores, em 2013, desenvolveram um método para sintetizar a (S)-3-[5-(4-fluoro-fenil)-5-hidróxi-pentanoil]-4-fenil-oxazolidin-2-ona (**S-2**), apresentado no Esquema 23), uma substância intermediária para a produção do ezetimiba (**Figura 8**). O ezetimiba é um fármaco utilizado para a redução dos níveis de colesterol e lipídios no sangue (SINGH *et al.*, 2013, p. 99).

**Figura 8** – Ezetimiba.



Os autores realizaram, em uma das reações, a esterificação do 3-[5-(4-fluoro-fenil)-5-hidróxi-pentanoil]-4-fenil-oxazolidin-2-ona racêmico (**rac-1**), apresentado no **Esquema 23**) empregando lipases. Como melhores resultados obtiveram uma conversão de 12,5% e um excesso diastereoisomérico >99% do composto **S-2**. Esses resultados foram obtidos empregando a lipase a partir da *Candida rugosa*, o éter diisopropílico como solvente orgânico e o acetato de vinila como doador de acila.

**Esquema 23** – Resolução cinética enzimática do 3-[5-(4-fluoro-fenil)-5-hidróxi-pentanoil]-4-fenil-oxazolidin-2-ona racêmico utilizando lipases.



## *Capítulo 3*

### *Resultados e Discussão*

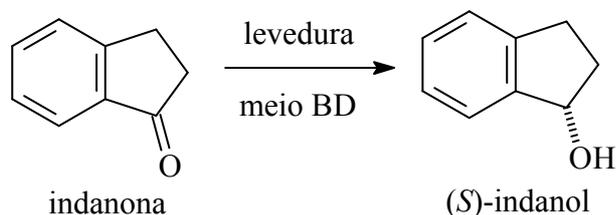
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Proposta (i): Introdução da quiralidade na molécula alvo *via* biorredução da indanona

#### 3.2 Reações de biorredução da indanona empregando leveduras

O potencial biocatalítico das leveduras disponíveis no nosso laboratório foi avaliado na reação de redução da indanona (**Esquema 24**). Foi realizada uma triagem com as seguintes leveduras: *Candida krusei* (1), *Candida krusei* (2), *Candida guilliermondi*, *Pichia membranifaciens*, *Candida rugosa* e *Klyveromyces lactis*, empregando o meio de cultura BD, e processando a reação em 2, 4 e 6 dias. Os alcoóis obtidos foram todos de configuração *S* (produto Prelog). Analisou-se a produção de indanol quanto à conversão (*c*) e excesso enantiomérico (*e.e.*).

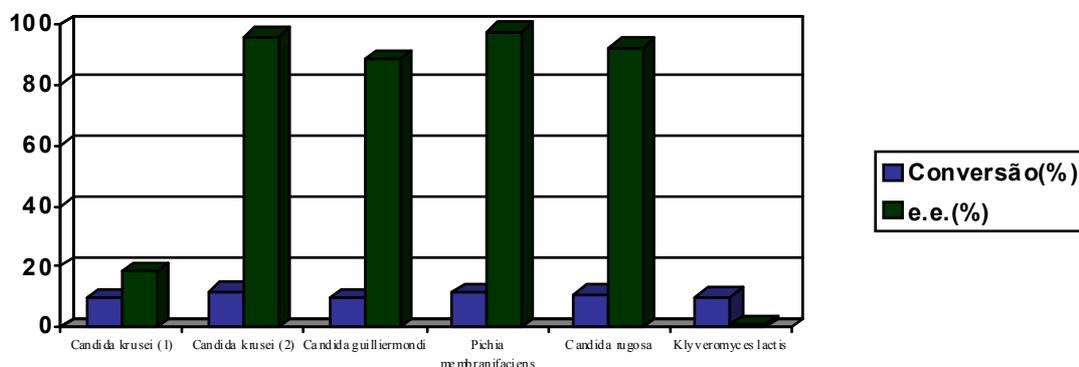
**Esquema 24** - Reação de biorredução da indanona empregando leveduras.



##### 3.2.1 Reação de biorredução da indanona empregando leveduras, em dois dias

Em dois dias de reação, obteve-se resultados de excesso enantiomérico variando entre 1 e 97,6%. Com quatro tipos de leveduras foram obtidos bons resultados de excesso enantiomérico, são elas: *Candida krusei* (2), *Candida guilliermondi*, *Pichia membranifaciens* e *Candida rugosa*. No entanto, para todas as leveduras utilizadas, não foram obtidos resultados satisfatórios de conversão, variando de 9,5 a 11,8%. Os resultados são apresentados no **Gráfico 1**.

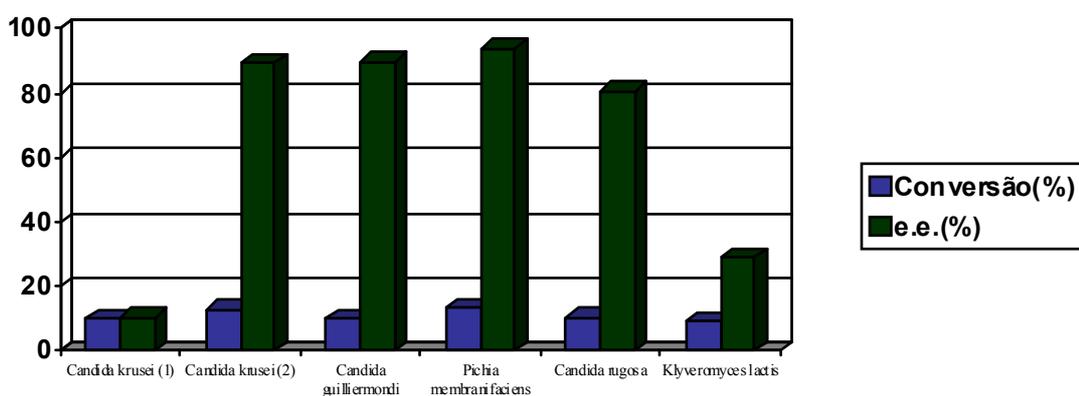
**Gráfico 1** - Resultados obtidos na biorredução da indanona utilizando leveduras, em dois dias.



### 3.2.2 Reação de biorredução da indanona empregando leveduras, em quatro dias

Em quatro dias de reação, obteve-se resultados de excesso enantiomérico variando entre 10,9 e 94,1%. Novamente, com os mesmos quatro tipos de leveduras descritas no item anterior foram obtidos bons resultados de excesso enantiomérico, porém baixos valores de conversão, variando de 9,4 a 13,2%. Os resultados são apresentados no **Gráfico 2**.

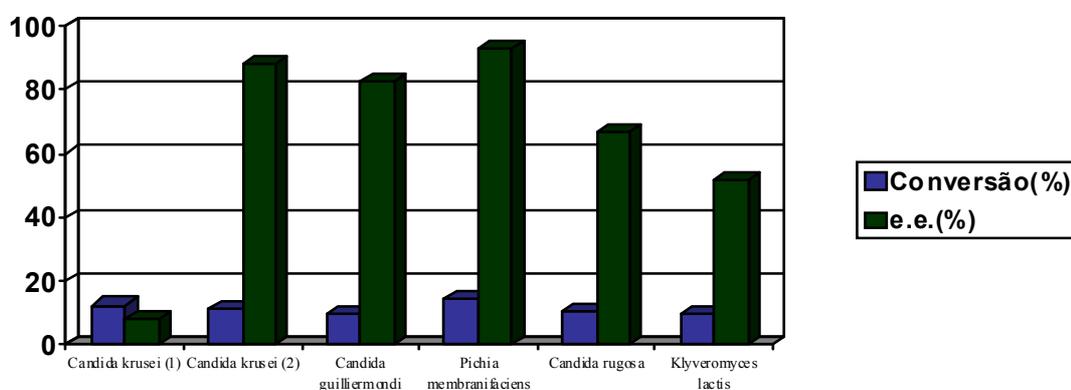
**Gráfico 2** - Resultados obtidos na biorredução da indanona utilizando leveduras, em quatro dias.



### 3.2.3 Reação de biorredução da indanona empregando leveduras, em seis dias

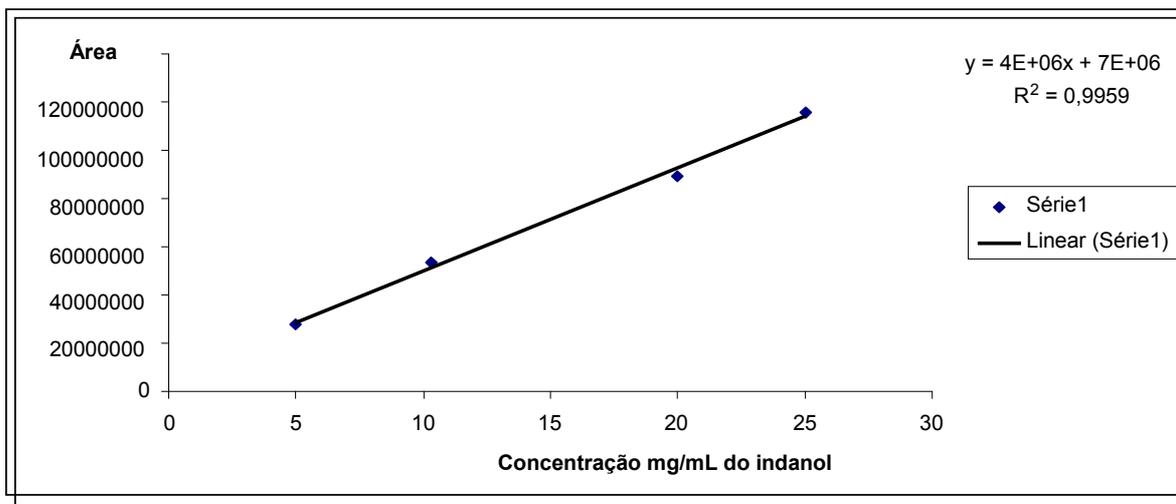
Em seis dias de reação, obteve-se resultados de excesso enantiomérico variando entre 8,1 e 93,1%. Entretanto, apenas três tipos de leveduras proporcionaram bons resultados de excesso enantiomérico, são elas: *Candida krusei* (2), *Candida guilliermondi* e *Pichia membranifaciens*. As leveduras *Candida rugosa* e *Klyveromyces lactis* apresentaram resultados moderados de excesso enantiomérico. Os resultados de conversão continuaram não sendo satisfatórios, variando entre 9,5 e 12,4%. Os resultados são apresentados no **Gráfico 3**.

**Gráfico 3** - Resultados obtidos na biorredução da indanona utilizando leveduras, em seis dias.



A curva de calibração referente ao indanol (**Figura 9**) foi realizada utilizando os dados de área *versus* concentração (mg/mL). Os dados referentes às áreas foram obtidos após análises, em CG, das soluções metanólicas de indanol com concentrações de 5 mg/mL; 10 mg/mL; 20 mg/mL e 25 mg/mL. Obteve-se um coeficiente linear ( $R^2$ ) satisfatório, sendo o valor próximo de 1.

**Figura 9** – Curva de calibração referente ao indanol.



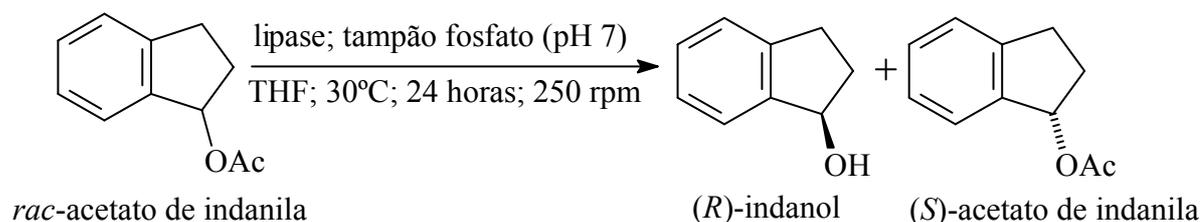
Devido à dificuldade na execução da proposta (i), já que as conversões do indanol foram baixas, decidimos estudar a proposta (ii) em que a introdução da quiralidade ocorre *via* resolução cinética enzimática do *rac*-indanol.

### 3.3 Proposta (ii) Introdução da quiralidade na molécula alvo *via* resolução cinética enzimática do *rac*-indanol

### 3.4 Triagem de lipases utilizando a reação de hidrólise do *rac*-acetato de indanila

Na proposta (ii) sugere-se a acilação do *rac*-indanol na presença de uma lipase, em solvente orgânico e de um doador de acila. A maneira mais prática para encontrar uma lipase ideal para a resolução cinética, em solvente orgânico, é realizar uma triagem de lipases em uma reação de hidrólise do *rac*-acetato de indanila, em uma solução tampão. As lipases que forem eficientes em realizar a hidrólise serão, também, eficientes em promover a resolução cinética do *rac*-indanol, em meio orgânico, na presença de doador de acila.

Inicialmente, realizou-se uma triagem com nove lipases comerciais empregando a reação de hidrólise do *rac*-acetato de indanila em tampão fosfato (pH 7), utilizando THF como co-solvente, 24 horas de reação e temperatura de 30°C (**Esquema 25**). As substâncias foram analisadas por CG-DIC, utilizando coluna quiral. Os resultados encontram-se apresentados na **Tabela 3**.

**Esquema 25** – Resolução cinética do *rac*-acetato de indanila utilizando lipases.

As configurações dos centros estereogênicos dos produtos obedeceram a regra empírica de Kazlauskas (KAZLAUSKAS *et al.*, 1991) que preconiza, nas reações de hidrólise utilizando lipases, a obtenção do álcool com configuração *R* e da substância acetilada remanescente com configuração *S*. Por outro lado, nas reações de acilação, utilizando lipases, em meio orgânico, o álcool será de configuração *S* e o produto acetilado será de configuração *R*.

**Tabela 3** - Resultados obtidos da reação de hidrólise do *rac*-acetato de indanila utilizando lipases.

Lipase	<i>e.e.</i> acetilado (%) <sup>a</sup>	<i>e.e.</i> álcool (%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>
Amano lipase G a partir do <i>Penicillium camemberti</i>	40,0	96,0	29,5	76,0
Amano lipase AK a partir da <i>Pseudomonas fluorescens</i>	90,0	94,6	49,0	111,0
Lipase a partir do <i>Rhizopus oryzae</i>	15,0	78,0	16,0	9,0
Lipase a partir da <i>Thermomyces lanuginosus</i> immobilizada em immovead-150	93,5	96,0	49,0	167,0
CAL - B	3,0	14,4	18,0	1,4
Lipase a partir da <i>Candida rugosa</i>	83,0	54,0	60,5	8,0
PPL	21,5	89,5	19,4	23,0
Acilase I a partir do <i>Aspergillus melleus</i>	1,0	37,0	3,0	2,0
Lipozyme RM IM a partir do <i>Rhizomucor miehei</i> immobilizada em resina aniônica	6,0	86,5	7,0	14,0

<sup>a</sup> Determinado por GC.

<sup>b</sup> Conversão,  $c = \frac{e.e. \text{ acetilado}}{e.e. \text{ acetilado} + e.e. \text{ álcool}}$ .

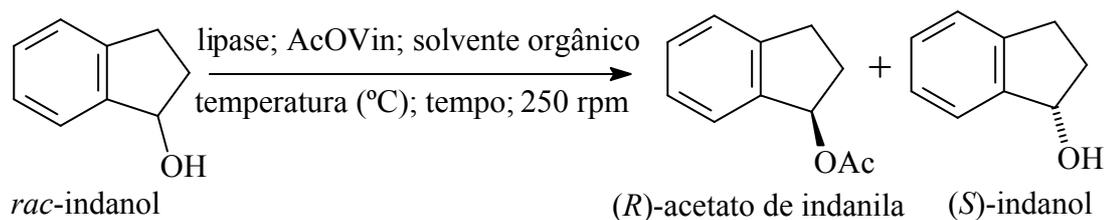
<sup>c</sup> Razão enantiomérica,  $E = \ln[1 - c(1 + e.e. \text{ álcool})] / \ln[1 - c(1 - e.e. \text{ álcool})]$ .

Através da análise dos resultados apresentados na **Tabela 3**, é possível verificar que as enzimas mais efetivas na hidrólise do *rac*-acetato de indanila foram a Amano lipase AK e a Lipase a partir da *Thermomyces lanuginosus*, as quais proporcionaram bons resultados de excesso enantiomérico de substrato e produto ( $\geq 90\%$ ), conversões próximas a 50% e valores de E >100.

### 3.5 Reação de acetilação do *rac*-indanol utilizando lipases, em meio orgânico

Sabendo-se que a Amano lipase AK e a Lipase a partir da *Thermomyces lanuginosus* foram eficientes na hidrólise do *rac*-acetato de indanila, decidimos realizar a resolução cinética enzimática *via* reação de acetilação do *rac*-indanol, em meio orgânico (**Esquema 26**), objetivando um menor tempo reacional, resultados de conversão, razão enantiomérica e excesso enantiomérico de substrato e produto otimizados. Realizamos as resoluções cinéticas enzimáticas, variando as seguintes condições: solvente orgânico (acetonitrila, hexano, THF ou tolueno), temperatura (30°C, 40°C ou 50°C), tempo reacional entre 1 hora e 6 horas e uma proporção 2:1 massa–massa do catalisador:substrato. As substâncias foram analisadas por CG–DIC. Os resultados encontram-se apresentados nos itens 3.5.1 e 3.5.2.

**Esquema 26** – Resolução cinética enzimática *via* acetilação do *rac*-indanol utilizando lipases, em meio orgânico.



As configurações dos centros estereogênicos dos produtos obedeceram a regra empírica de Kazlauskas (KAZLAUSKAS *et al.*, 1991) que preconiza, nas reações de acilação utilizando lipases, a obtenção do álcool remanescente com configuração *S* e do produto acetilado com configuração *R*. Tais configurações foram verificadas pelo método da polarimetria, no qual o valor da rotação óptica específica para o (*S*)-indanol foi de  $[\alpha]_D^{20} = +30,1$  (c 1,0; CHCl<sub>3</sub>) *e.e.* > 99%, enquanto que o valor fornecido pela literatura é de  $[\alpha]_D^{25} =$

+30,6 (c 1,0; CHCl<sub>3</sub>) *e.e.* > 99% (LEE *et al.*, 2011, p. 10014). Para o (*R*)-acetato de indanila o valor obtido foi de  $[\alpha]_D^{20} = +86,8$  (c 1,0; CHCl<sub>3</sub>) *e.e.* > 99%; e o relatado na literatura foi de  $[\alpha]_D^{26} = +87,6$  (c 1,0; CHCl<sub>3</sub>) *e.e.* > 99% (KIM *et al.*, 2004, p. 473).

O estudo de resolução cinética do *rac*-indanol, *via* acetilação, foi realizado em paralelo com a Amano lipase AK e com a *Thermomyces lanuginosus*, variando solvente orgânico (acetonitrila, THF, tolueno e hexano), tempo reacional e temperatura. A seguir apresentaremos os resultados obtidos com o referido estudo.

### 3.5.1 Resolução cinética enzimática do *rac*-indanol utilizando a Amano lipase AK a partir da *Pseudomonas fluorescens*

- **Utilizando acetonitrila como solvente orgânico:**

Inicialmente, a resolução foi realizada em acetonitrila usando uma proporção 2:1 massa – massa do catalisador:substrato. A reação foi monitorada na temperatura de 30°C, com um tempo reacional entre 1 hora e 6 horas, bem como na temperatura de 40°C, com tempo reacional de 1 hora e 2 horas. Os resultados são apresentados na **Tabela 4**.

Utilizando-se a temperatura de 30°C foram obtidos bons resultados de excessos enantioméricos do (*S*)-indanol e do (*R*)-acetato de indanila (maiores que 90%), conversão de quase 50% e uma razão enantiomérica maior que 100 em tempo reacional de 5 horas e de 6 horas. No entanto, visando obter bons resultados em um menor tempo reacional, a resolução cinética foi realizada com uma temperatura de 40°C. Desta forma, os resultados obtidos de excessos enantioméricos do (*S*)-indanol e do (*R*)-acetato de indanila foram maiores que 90%, conversão próxima a 50% e uma razão enantiomérica maior que 100 em um tempo reacional de 1 hora. A reação não foi realizada em tempos maiores que 2 horas, pois a conversão já ultrapassava o valor de 50%.

**Tabela 4** - Resultados da resolução cinética *via* acetilação do *rac*-indanol utilizando a Amano lipase AK e acetonitrila como solvente orgânico.

Temperatura (°C)	Tempo	<i>e.e.</i> <sub>álcool</sub> (%) <sup>a</sup>	<i>e.e.</i> <sub>acetilado</sub> (%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>
30	1 hora	50,3	97,3	34,0	120,7
30	2 horas	69,3	97,5	41,5	164,5

30	3 horas	84,0	96,3	46,6	141,5
30	4 horas	91,1	96,0	48,7	157,0
30	5 horas	93,5	94,7	49,7	128,7
30	6 horas	94,1	95,8	49,6	167,1
40	1 hora	92,0	94,5	49,3	116,5
40	2 horas	97,8	92,4	51,4	113,8

<sup>a</sup> Determinado por GC.

<sup>b</sup> Conversão,  $c = e.e._{\text{álcool}} / (e.e._{\text{álcool}} + e.e._{\text{acetilado}})$ .

<sup>c</sup> Razão enantiomérica,  $E = \ln[1 - c(1 + e.e._{\text{acetilado}})] / \ln[1 - c(1 - e.e._{\text{acetilado}})]$ .

- **Utilizando tolueno como solvente orgânico:**

Posteriormente, a resolução cinética foi realizada em tolueno usando uma proporção 2:1 massa–massa do catalisador:substrato. A reação foi monitorada nas temperaturas de 30, 40 e 50°C, com tempo reacional entre 1 hora e 6 horas. Os resultados estão sumariados na **Tabela 5**.

A 30°C foram obtidos bons resultados de excesso enantiomérico do (*S*)-indanol (82%), excesso enantiomérico do (*R*)-acetato de indanila (maior que 99%), conversão de 45,3% e valor de razão enantiomérica maior que 200, em 5 horas de reação. O aumento da temperatura para 40°C ou 50°C, levou a valores inferiores de *e.e.* do (*S*)-indanol e de conversão.

**Tabela 5** - Resultados da resolução cinética *via* acetilação do *rac*-indanol utilizando a Amano lipase AK e tolueno como solvente orgânico.

Temperatura (°C)	Tempo	<i>e.e.</i> <sub>álcool</sub> (%) <sup>a</sup>	<i>e.e.</i> <sub>acetilado</sub> (%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>
30	1 hora	46,2	98,3	32,0	184,4
30	2 horas	63,6	98,7	39,2	>200,0(295,2)
30	3 horas	72,4	>99,0	42,2	>200,0(433,8)
30	4 horas	81,3	>99,0	45,1	>200,0(503,6)
30	5 horas	82,0	>99,0	45,3	>200,0(510,5)
30	6 horas	82,0	>99,0	45,3	>200,0(510,5)

40	1 hora	14,4	>99,0	12,7	>200,0(229,2)
40	2 horas	22,6	>99,0	18,6	>200,0(248,2)
40	3 horas	26,8	>99,0	21,3	>200,0(258,6)
40	4 horas	29,0	>99,0	22,6	>200,0(264,2)
40	5 horas	27,9	>99,0	22,0	>200,0(261,4)
40	6 horas	29,0	>99,0	22,6	>200,0(264,2)
50	1 hora	29,4	>99,0	22,9	>200,0(265,3)
50	2 horas	40,1	>99,0	28,8	>200,0(295,3)
50	3 horas	44,2	>99,0	30,8	>200,0(308,1)
50	4 horas	44,8	>99,0	31,1	>200,0(310,1)
50	5 horas	51,4	>99,0	34,2	>200,0(332,9)
50	6 horas	51,4	>99,0	34,2	>200,0(332,9)

<sup>a</sup> Determinado por GC.

<sup>b</sup> Conversão,  $c = e.e. \text{álcool} / (e.e. \text{álcool} + e.e. \text{acetilado})$ .

<sup>c</sup> Razão enantiomérica,  $E = \ln[1-c(1+e.e. \text{acetilado})] / \ln[1-c(1-e.e. \text{acetilado})]$ .

- **Utilizando THF como solvente orgânico:**

Em seguida, a resolução foi realizada em THF usando uma proporção 2:1 massa-massa do catalisador:substrato. A reação foi monitorada em temperatura de 30, 40 e 50°C, com um tempo reacional entre 1 hora e 6 horas. Os resultados encontram-se apresentados na **Tabela 6**.

Observou-se que utilizando a temperatura de 30°C, a reação ocorreu lentamente. Com o aumento da temperatura para 40°C ocorreu um aumento na velocidade da reação, porém com valores de conversão de no máximo 30%, mesmo com 6 horas de reação. Por fim, os melhores resultados foram obtidos utilizando temperatura de 50°C, tempo reacional de 5 horas, com 73,4% de excesso enantiomérico do (*S*)-indanol, excesso enantiomérico do (*R*)-acetato de indanila de 98,8%, conversão de 42,6% e uma razão enantiomérica maior que 200.

**Tabela 6** - Resultados da resolução cinética *via* acetilação do *rac*-indanol utilizando a Amano lipase AK e THF como solvente orgânico.

Temperatura (°C)	Tempo	<i>e.e.</i> álcool(%) <sup>a</sup>	<i>e.e.</i> acetilado(%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>
30	1 hora	2,6	>99,0	2,6	>200,0(204,2)
30	2 horas	3,0	>99,0	3,0	>200,0(205,0)
30	3 horas	3,0	>99,0	3,0	>200,0(205,0)
30	4 horas	3,0	>99,0	3,0	>200,0(205,0)
30	5 horas	3,0	>99,0	3,0	>200,0(205,0)
30	6 horas	3,1	>99,0	3,1	>200,0(205,2)
40	1 hora	40,0	>99,0	29,0	>200,0(295,0)
40	2 horas	44,3	>99,0	31,0	>200,0(308,5)
40	3 horas	43,3	>99,0	30,4	>200,0(305,2)
40	4 horas	42,4	>99,0	30,0	>200,0(302,4)
40	5 horas	42,4	>99,0	30,0	>200,0(302,4)
40	6 horas	41,1	>99,0	29,3	>200,0(298,4)
50	1 hora	61,3	>99,0	38,3	>200,0(373,6)
50	2 horas	69,0	>99,0	41,0	>200,0(413,0)
50	3 horas	70,3	>99,0	41,5	>200,0(420,7)
50	4 horas	70,6	98,7	41,6	>200,0(324,4)
50	5 horas	73,4	98,8	42,6	>200,0(366,5)
50	6 horas	71,3	>99,0	41,8	>200,0(426,8)

<sup>a</sup> Determinado por GC.

<sup>b</sup> Conversão,  $c = e.e.álcool / (e.e.álcool + e.e.acetilado)$ .

<sup>c</sup> Razão enantiomérica,  $E = \ln[1 - c(1 + e.e.acetilado)] / \ln[1 - c(1 - e.e.acetilado)]$ .

- **Utilizando hexano como solvente orgânico:**

Finalmente, a resolução foi realizada em hexano usando uma proporção 2:1 massa–massa do catalisador:substrato. A reação foi monitorada em temperatura de 30°C, com um tempo reacional entre 15 minutos e 1 hora. Os resultados encontram-se na **Tabela 7**.

Após análises dos resultados obtidos em tempo reacional de 1 hora, foi possível observar que o valor de conversão já ultrapassava 50%. Sendo assim, a reação foi repetida

utilizando a mesma temperatura, com análises dos resultados em 15 minutos, 30 minutos e 45 minutos. Foram obtidos ótimos resultados de excessos enantioméricos do (*S*)-indanol e do (*R*)-acetato de indanila (maiores que 95%), conversão de 50% e uma razão enantiomérica maior que 200 em um tempo reacional de 15 minutos.

**Tabela 7** - Resultados da resolução cinética *via* acetilação do *rac*-indanol utilizando a Amano lipase AK e hexano como solvente orgânico.

Temperatura (°C)	Tempo	<i>e.e.</i> álcool(%) <sup>a</sup>	<i>e.e.</i> acetilado(%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>
30	15 minutos	98,0	97,0	50,0	>200,0(303,5)
30	30 minutos	>99,0	95,0	51,0	>200,0(205,8)
30	45 minutos	>99,0	92,0	51,8	126,0
30	1 hora	>99,0	89,4	52,5	93,4

<sup>a</sup> Determinado por GC.

<sup>b</sup> Conversão,  $c = \frac{e.e.\text{álcool}}{e.e.\text{álcool} + e.e.\text{acetilado}}$ .

<sup>c</sup> Razão enantiomérica,  $E = \frac{\ln[1-c(1+e.e.\text{acetilado})]}{\ln[1-c(1-e.e.\text{acetilado})]}$ .

Após análise dos dados apresentados nas tabelas 4 a 7 é possível verificar que a resolução cinética do *rac*-indanol, na presença da Amano lipase AK, foi mais eficiente utilizando hexano como solvente em tempo reacional de 15 minutos (**Tabela 7**).

Em seguida apresentaremos os dados obtidos no estudo da resolução cinética do *rac*-indanol utilizando a lipase a partir da *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em immobead-150.

### 3.5.2 Resolução cinética enzimática do *rac*-indanol utilizando a Lipase a partir da *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em immobead-150

- **Utilizando acetonitrila como solvente orgânico:**

Inicialmente, a resolução foi realizada em acetonitrila usando uma proporção 2:1 massa–massa do catalisador:substrato. A reação foi monitorada nas temperaturas de 30, 40 e 50°C, com um tempo reacional entre 1 hora e 6 horas. Os resultados são apresentados na **Tabela 8**.

Observou-se que utilizando a temperatura de 30°C, a reação ocorreu lentamente. Com o aumento da temperatura para 40°C ocorreu um aumento na velocidade de reação,

porém com excesso enantiomérico do (*S*)-indanol de apenas 58,2% e uma conversão de 37,0%, mesmo com 6 horas de reação. Por fim, os melhores resultados foram obtidos em 6 horas de reação, utilizando temperatura de 50°C, com excesso enantiomérico do (*S*)-indanol de 77,4%, excesso enantiomérico do (*R*)-acetato de indanila maior que 99%, conversão de 43,8% e uma razão enantiomérica maior que 200.

**Tabela 8** – Resultados da resolução cinética *via* acetilação do *rac*-indanol utilizando a Lipase a partir da *Thermomyces lanuginosus* e acetonitrila como solvente orgânico.

Temperatura (°C)	Tempo	<i>e.e.</i> álcool(%) <sup>a</sup>	<i>e.e.</i> acetilado(%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>
30	1 hora	11,2	>99,0	10,2	>200,0(222,2)
30	2 horas	15,8	>99,0	13,8	>200,0(232,4)
30	3 horas	19,3	>99,0	16,3	>200,0(240,4)
30	4 horas	22,3	>99,0	18,4	>200,0(247,5)
30	5 horas	28,1	>99,0	22,1	>200,0(261,9)
30	6 horas	31,6	>99,0	24,1	>200,0(271,1)
40	1 hora	32,1	>99,0	24,5	>200,0(272,5)
40	2 horas	41,4	>99,0	29,5	>200,0(299,3)
40	3 horas	47,7	>99,0	32,5	>200,0(319,7)
40	4 horas	52,3	>99,0	34,5	>200,0(336,6)
40	5 horas	56,4	>99,0	36,3	>200,0(352,3)
40	6 horas	58,2	>99,0	37,0	>200,0(359,8)
50	1 hora	55,6	>99,0	36,0	>200,0(349,1)
50	2 horas	57,4	>99,0	36,7	>200,0(256,4)
50	3 horas	65,3	>99,0	39,7	>200,0(393,0)
50	4 horas	69,8	>99,0	41,3	>200,0(417,7)
50	5 horas	75,2	>99,0	43,1	>200,0(453,0)
50	6 horas	77,4	>99,0	43,8	>200,0(469,5)

<sup>a</sup> Determinado por GC.

<sup>b</sup> Conversão,  $c = e.e.álcool / (e.e.álcool + e.e.acetilado)$ .

<sup>c</sup> Razão enantiomérica,  $E = \ln[1 - c(1 + e.e.acetilado)] / \ln[1 - c(1 - e.e.acetilado)]$ .

- **Utilizando tolueno como solvente orgânico:**

Posteriormente, a resolução cinética foi realizada em tolueno usando uma proporção 2:1 massa–massa do catalisador:substrato. A reação foi monitorada nas temperaturas de 30, 40 e 50°C, com um tempo reacional entre 1 hora e 6 horas. Os resultados são apresentados na **Tabela 9**.

Utilizando a temperatura de 30°C foram obtidos excelentes resultados de excesso enantiomérico do (*R*)-acetato de indanila (>99%) e valores de razão enantiomérica maiores que 200, em todos os tempos reacionais. Entretanto, os excessos enantioméricos do (*S*)-indanol e os valores de conversões não foram satisfatórios. Sendo assim, a temperatura reacional foi aumentada para 40 e 50°C, a fim de melhores resultados de excesso enantiomérico do álcool e conversão, porém sem alterações significativas.

**Tabela 9** - Resultados da resolução cinética *via* acetilação do *rac*-indanol utilizando a Lipase a partir da *Thermomyces lanuginosus* e tolueno como solvente orgânico.

Temperatura (°C)	Tempo	<i>e.e.</i> álcool(%) <sup>a</sup>	<i>e.e.</i> acetilado(%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>
30	1 hora	1,6	>99,0	1,6	>200,0(202,2)
30	2 horas	3,8	>99,0	3,7	>200,0(206,6)
30	3 horas	4,5	>99,0	4,4	>200,0(208,1)
30	4 horas	10,7	>99,0	10,7	>200,0(201,1)
30	5 horas	9,8	>99,0	9,0	>200,0(219,2)
30	6 horas	9,2	>99,0	8,5	>200,0(218,0)
40	1 hora	8,6	>99,0	8,0	>200,0(216,6)
40	2 horas	9,8	>99,0	9,0	>200,0(219,2)
40	3 horas	11,2	>99,0	10,2	>200,0(222,2)
40	4 horas	12,7	>99,0	11,4	>200,0(225,5)
40	5 horas	12,3	>99,0	11,0	>200,0(224,6)
40	6 horas	13,5	>99,0	12,0	>200,0(227,2)
50	1 hora	4,5	>99,0	4,3	>200,0(208,1)
50	2 horas	3,0	>99,0	3,0	>200,0(205,0)

50	3 horas	14,2	>99,0	12,5	>200,0(228,8)
50	4 horas	15,3	>99,0	13,4	>200,0(231,2)
50	5 horas	15,7	>99,0	13,7	>200,0(232,1)
50	6 horas	16,8	>99,0	14,5	>200,0(234,6)

<sup>a</sup> Determinado por GC.

<sup>b</sup> Conversão,  $c = e.e._{\text{álcool}} / (e.e._{\text{álcool}} + e.e._{\text{acetilado}})$ .

<sup>c</sup> Razão enantiomérica,  $E = \ln[1 - c(1 + e.e._{\text{acetilado}})] / \ln[1 - c(1 - e.e._{\text{acetilado}})]$ .

- **Utilizando THF como solvente orgânico:**

Em seguida, a resolução cinética foi realizada em THF usando uma proporção 2:1 massa–massa do catalisador:substrato. A reação foi monitorada nas temperaturas de 30, 40 e 50°C, com um tempo reacional entre 1 hora e 6 horas. Os resultados são apresentados na **Tabela 10**.

Na temperatura de 30°C e em tempos reacionais de 1 a 6 horas foram obtidos excelentes resultados de excesso enantiomérico para o (*R*)-acetato de indanila (>99%) e valores de razão enantiomérica (*E*) maiores que 200, porém com baixíssimos valores de *e.e.* para o (*S*)-indanol remanescente e de conversão. Portanto, as reações de resolução cinética foram realizadas em temperaturas mais altas (40°C e 50°C), porém sem alterações significativas a 40°C e com valores ainda mais baixos de *e.e.* para o (*S*)-indanol e de conversão, à 50°C.

**Tabela 10** - Resultados da resolução cinética *via* acetilação do *rac*-indanol utilizando a Lipase a partir da *Thermomyces lanuginosus* e THF como solvente orgânico.

Temperatura (°C)	Tempo	<i>e.e.</i> <sub>álcool</sub> (%) <sup>a</sup>	<i>e.e.</i> <sub>acetilado</sub> (%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>
30	1 hora	2,6	>99,0	2,6	>200,0(204,3)
30	2 horas	2,7	>99,0	2,7	>200,0(204,4)
30	3 horas	2,6	>99,0	2,6	>200,0(204,3)
30	4 horas	2,7	>99,0	2,7	>200,0(204,4)
30	5 horas	2,7	>99,0	2,7	>200,0(204,4)
30	6 horas	2,9	>99,0	2,9	>200,0(204,8)
40	1 hora	1,6	>99,0	1,6	>200,0(202,2)

40	2 horas	2,2	>99,0	2,2	>200,0(203,4)
40	3 horas	2,0	>99,0	2,0	>200,0(203,0)
40	4 horas	2,2	>99,0	2,2	>200,0(203,4)
40	5 horas	2,3	>99,0	2,3	>200,0(203,6)
40	6 horas	3,0	>99,0	3,0	>200,0(205,0)
50	1 hora	0,1	>99,0	0,1	200,0
50	2 horas	0,7	>99,0	0,7	>200,0(200,4)
50	3 horas	0,1	>99,0	0,1	200,0
50	4 horas	0,5	>99,0	0,5	200,0
50	5 horas	2,3	>99,0	2,3	>200(203,6)
50	6 horas	0,6	>99,0	0,6	200,0

<sup>a</sup> Determinado por GC.

<sup>b</sup> Conversão,  $c = e.e.\text{álcool}/(e.e.\text{álcool}+e.e.\text{acetilado})$ .

<sup>c</sup> Razão enantiomérica,  $E = \ln[1-c(1+e.e.\text{acetilado})]/\ln[1-c(1-e.e.\text{acetilado})]$ .

- **Utilizando hexano como solvente orgânico:**

Finalmente, a resolução foi realizada em hexano usando uma proporção 2:1 massa–massa do catalisador:substrato. A reação foi monitorada nas temperaturas de 30°C, com um tempo reacional entre 1 hora e 6 horas. Os resultados são apresentados na **Tabela 11**.

Foi possível observar que utilizando a temperatura de 30°C foram obtidos bons resultados de excesso enantiomérico do (*S*)-indanol e do (*R*)-acetato de indanila (maiores que 90%), conversão de quase 50% e razão enantiomérica maior do que 200, em um tempo reacional de 4 horas. Com o aumento da temperatura para 40°C, com a perspectiva de melhores resultados em um menor tempo reacional, observou-se que o valor de conversão já ultrapassava os 50%, em apenas uma hora de reação. Sendo assim, alterou-se a temperatura para 35°C, observando-se que, também, a conversão já ultrapassava os 50% em uma hora de reação. Finalmente, a reação foi monitorada em 15 minutos, com a obtenção de ótimos resultados de excessos enantiomérico do (*S*)-indanol e do (*R*)-acetato de indanila (maiores que 99%), conversão de 50% e razão enantiomérica maior do que 200.

**Tabela 11** - Resultados da resolução cinética *via* da acetilação do *rac*-indanol utilizando a Lipase a partir da *Thermomyces lanuginosus* e hexano como solvente orgânico.

Temperatura (°C)	Tempo	<i>e.e.</i> álcool(%) <sup>a</sup>	<i>e.e.</i> acetilado(%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>
30	1 hora	23,0	>99,0	19,0	>200,0(249,2)
30	2 horas	57,0	>99,0	36,5	>200,0(354,8)
30	3 horas	79,0	>99,0	44,4	>200,0(482,7)
30	4 horas	92,0	97,0	48,7	>200,0(217,0)
30	5 horas	>99,0	96,0	50,8	>200,0(259,0)
30	6 horas	>99,0	96,0	50,8	>200,0(259,0)
40	1 hora	>99,0	92,0	52,0	126,0
35	1 hora	>99,0	90,0	52,4	99,4
35	15 minutos	>99,0	>99,0	50,0	>200,0(1749,0)

<sup>a</sup> Determinado por GC.

<sup>b</sup> Conversão,  $c = \frac{e.e. \text{ álcool}}{e.e. \text{ álcool} + e.e. \text{ acetilado}}$ .

<sup>c</sup> Razão enantiomérica,  $E = \frac{\ln[1-c(1+e.e. \text{ acetilado})]}{\ln[1-c(1-e.e. \text{ acetilado})]}$ .

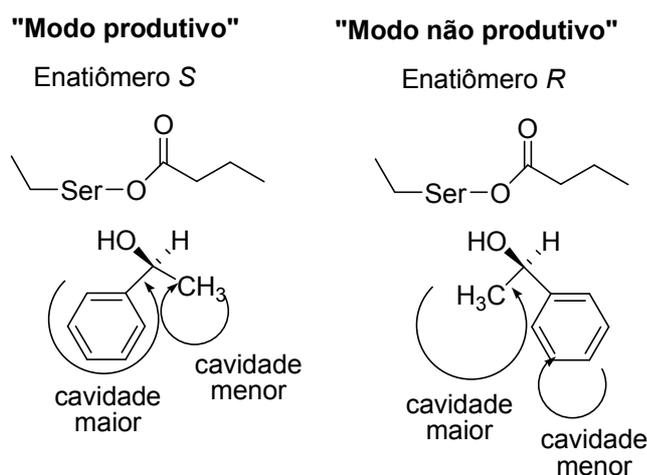
Após analisar os dados apresentados nas tabelas 8 a 11 é possível verificar que os melhores resultados para a resolução cinética do *rac*-indanol, na presença da lipase a partir da *Thermomyces lanuginosus*, foram obtidos utilizando hexano como solvente, a 35°C. Neste caso, a conversão alcançou 50% em 15 minutos de reação, com a obtenção do (*R*)-acetato de indanila com *e.e.* >99% e do álcool remanescente, o (*S*)-indanol, com *e.e.* >99% e uma razão enantiomérica (*E*) maior que 200 (**Tabela 11**).

Na presença da Amano lipase AK, a resolução cinética do *rac*-indanol foi mais eficiente, também na presença de hexano, a 30°C, em 15 minutos de reação, com a obtenção do (*S*)-indanol remanescente com 98% de *e.e.*, do (*R*)-acetato de indanila com 97% de *e.e.*, conversão de 50% e *E* >200 (**Tabela 7**).

Esses resultados obtidos são discutidos tomando como base o trabalho de Fitzpatrick e Klibanov (1991), em que realizaram o estudo da variação conformacional das enzimas induzidas por solventes orgânicos, sendo observada uma relação inversa entre a enantiosseletividade e a constante dielétrica dos solventes, nos quais os resultados foram interpretados baseados no efeito do solvente sobre a conformação da enzima, de acordo com o modelo de sítio ativo apresentado na **Figura 10**. Os autores relataram que um dos

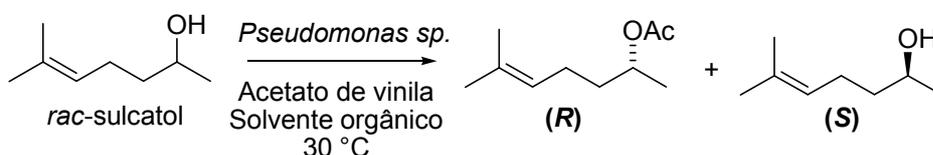
enantiômeros, no caso o *S* é ligado à enzima de acordo com uma geometria chamada de “modo produtivo”, neste caso o grupo mais volumoso (fenila) ocupa a cavidade maior, enquanto que o grupo menos volumoso (metila) ocupa a cavidade menor. Já o enantiômero *R* é ligado à enzima de acordo com uma geometria chamada de “modo não produtivo”, ou seja, o grupo mais volumoso (fenila) ocupando a cavidade menor e o grupo menos volumoso (metila) ocupando a cavidade maior. A enantiosseletividade é dependente da rigidez do sítio ativo da enzima. Sendo assim, quando o valor da constante dielétrica do solvente aumenta, a flexibilidade da enzima também é aumentada. Consequentemente, o impedimento estérico exerce menor influência, aumentando a reatividade do enantiômero *R* e diminuindo e enantioseletividade da enzima.

**Figura 10** – Esquema para os “modos produtivos” e “modos não produtivos” dos enantiômeros *R* e *S* do álcool *sec*-feniletanol e o sítio da subtilisina acilado.



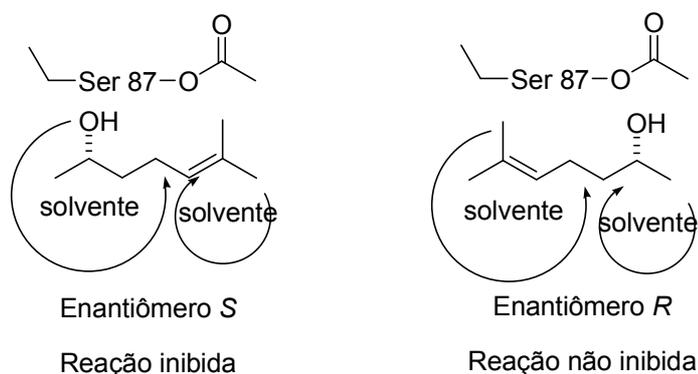
Os resultados podem ser, também, explicados de acordo com o trabalho de Nakamura e colaboradores, em 1995, referente à esterificação do sulcatol, utilizando o acetato de vinila como doador de acila e catalisada pela lipase a partir da *Pseudomonas sp.* (**Esquema 27**).

**Esquema 27** – Reação de acetilação do sulcatol empregando lipases, em meio orgânico.



Os autores estudaram o efeito da estrutura da molécula do solvente orgânico utilizado na reação, observando que os valores de enantiosseletividade foram maiores empregando alcanos e éteres lineares quando comparados aos solventes orgânicos correspondentes ramificados. Os pesquisadores constataram que os valores de enantiosseletividade diminuíram conforme o aumento do número de carbonos em uma série homóloga de cicloalcanos. Tais resultados foram explicados de acordo com a maior facilidade de incorporação das moléculas dos solventes lineares em relação às moléculas dos correspondentes solventes ramificados na cavidade menor do sítio ativo da lipase. A **Figura 11** mostra que as moléculas dos solventes orgânicos lineares, os quais possuem um maior grau de incorporação nas cavidades do sítio ativo da lipase diminuem a velocidade de reação do enantiômero *S* (apresentado no **Esquema 27**) que reage lentamente, resultando no aumento da enantiosseletividade.

**Figura 11** – Mecanismo de inibição enantiosseletiva da reação de acetilação do sulcatol empregando a lipase da *Pseudomonas sp.* em meio orgânico.



O solvente orgânico pode alterar a especificidade, a quimiosseletividade e a enantiosseletividade das enzimas. Essas alterações estão ligadas por uma série de fatores, interdependentes ou não, relacionadas com o arranjo do substrato, assim como os diferentes níveis de interação entre o microambiente e a enzima (COSTA, AMORIM, 1991, p. 871).

Das duas enzimas utilizadas a *Thermomyces lanuginosus* é imobilizada em imobead-150 e a Amano lipase AK encontra-se na forma livre. Com o objetivo de aproveitar o potencial da enzima Amano AK na resolução cinética do *rac*-indanol, realizamos um estudo de imobilização da referida enzima em vários suportes. Em seguida, relatamos o estudo de imobilização da Amano lipase AK e posteriormente relatamos o estudo do reuso

tanto da lipase a partir da *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em imobead-150 como da Amano lipase AK imobilizada no suporte ideal.

### 3.5.3 Resolução cinética enzimática do *rac*-indanol utilizando a Amano lipase AK a partir da *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em diferentes suportes

- **Amano lipase AK imobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular:**

As condições empregadas na resolução cinética do *rac*-indanol utilizando a Amano lipase AK a partir da *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em diferentes suportes foram as seguintes: hexano como solvente orgânico e uma temperatura reacional de 30°C. Essas condições proporcionaram melhores resultados de seletividade e atividade enzimática da enzima livre da Amano lipase AK a partir da *Pseudomonas fluorescens* e, portanto, realizando uma comparação entre a enzima livre e a imobilizada.

Inicialmente, a resolução foi realizada em hexano usando uma proporção 2:1 massa–massa do catalisador:substrato, utilizando a Amano lipase AK imobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular. A reação foi monitorada na temperatura de 30°C, com um tempo reacional entre 1 hora e 6 horas. Os resultados são encontrados na **Tabela 12**.

Foram obtidos bons resultados de razão enantiomérica (>200) e excesso enantiomérico (>99%) para o (*R*)-acetato de indanila em todos os tempos reacionais. Os resultados de conversão e excesso enantiomérico para o (*S*)-indanol remanescente foram baixos, sendo que o melhor resultado da resolução cinética neste sistema enzimático foi obtido em 6 horas de reação.

**Tabela 12** - Resultados da resolução cinética *via* acetilação do *rac*-indanol utilizando a Amano lipase AK a partir da *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular e hexano como solvente orgânico.

Temperatura (°C)	Tempo	<i>e.e.</i> álcool(%) <sup>a</sup>	<i>e.e.</i> acetilado(%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>
30	1 hora	17	>99,0	14,6	>200,0(235,1)
30	2 horas	29,1	>99,0	22,7	>200,0(264,5)
30	3 horas	33,8	>99,0	25,4	>200,0(277,1)

30	4 horas	40,3	>99,0	29,0	>200,0(296,0)
30	5 horas	49,3	>99,0	33,2	>200,0(325,3)
30	6 horas	62,5	>99,0	38,7	>200,0(218,0)

<sup>a</sup> Determinado por GC.

<sup>b</sup> Conversão,  $c = e.e.\text{álcool}/(e.e.\text{álcool}+e.e.\text{acetilado})$ .

<sup>c</sup> Razão enantiomérica,  $E = \ln[1-c(1+e.e.\text{acetilado})]/\ln[1-c(1-e.e.\text{acetilado})]$ .

- **Amano lipase AK imobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular na presença de Triton X-100:**

Em seguida, a resolução cinética foi realizada em hexano usando uma proporção 2:1 massa–massa do catalisador:substrato, utilizando a Amano lipase AK imobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular na presença do surfactante Triton X-100 0,1%. A reação foi monitorada na temperatura de 30°C, com um tempo reacional entre 1 hora e 6 horas. Os resultados são sumariados na **Tabela 13**.

Foram obtidos bons resultados de razão enantiomérica (>200) e excesso enantiomérico (>99%) do (*R*)-acetato de indanila em todos os tempos reacionais. Entretanto, os resultados de conversão e excesso enantiomérico do (*S*)-indanol não foram satisfatórios. Ainda assim, o melhor resultado utilizando este sistema enzimático foi obtido em 6 horas de reação.

**Tabela 13** - Resultados da resolução cinética *via* acetilação do *rac*-indanol utilizando a Amano lipase AK a partir da *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular na presença do surfactante Triton X-100 0,1% e hexano como solvente orgânico.

Temperatura (°C)	Tempo	<i>e.e.</i> álcool(%) <sup>a</sup>	<i>e.e.</i> acetilado(%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>
30	1 hora	8,1	>99,0	7,5	>200,0(215,6)
30	2 horas	15,3	>99,0	13,4	>200,0(231,2)
30	3 horas	21,2	>99,0	17,6	>200,0(244,8)
30	4 horas	26,6	>99,0	21,2	>200,0(258,1)
30	5 horas	33,8	>99,0	25,4	>200,0(277,1)
30	6 horas	40,3	>99,0	29,0	>200,0(296,0)

<sup>a</sup> Determinado por GC.

<sup>b</sup> Conversão,  $c = e.e.\text{álcool}/(e.e.\text{álcool}+e.e.\text{acetilado})$ .

<sup>c</sup> Razão enantiomérica,  $E = \ln[1-c(1+e.e.\text{acetilado})]/\ln[1-c(1-e.e.\text{acetilado})]$ .

- **Amano lipase AK imobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular na presença do surfactante CTAB 0,01%:**

Posteriormente, a resolução foi realizada em hexano usando uma proporção 2:1 massa–massa do catalisador:substrato, utilizando a Amano lipase AK imobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular na presença do surfactante CTAB 0,01% . A reação foi monitorada na temperatura de 30°C, com um tempo reacional entre 1 hora e 6 horas. Os resultados são sumariados na **Tabela 14**.

Foram obtidos bons resultados de razão enantiomérica (>200) e excesso enantiomérico (>99%) para o (*R*)-acetato de indanila em todos os tempos reacionais. Entretanto, os resultados de conversão e excesso enantiomérico para o (*S*)-indanol não foram satisfatórios.

**Tabela 14** - Resultados da resolução cinética *via* acetilação do *rac*-indanol utilizando a Amano lipase AK a partir da *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular, na presença do surfactante CTAB 0,01% e hexano como solvente orgânico.

Temperatura (°C)	Tempo	<i>e.e.</i> álcool(%) <sup>a</sup>	<i>e.e.</i> acetilado(%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>
30	1 hora	3,2	>99,0	3,1	>200,0(205,4)
30	2 horas	7,1	>99,0	6,7	>200,0(213,5)
30	3 horas	11,4	>99,0	10,3	>200,0(222,6)
30	4 horas	14,2	>99,0	12,5	>200,0(228,8)
30	5 horas	19,4	>99,0	16,4	>200,0(240,6)
30	6 horas	25,5	>99,0	20,5	>200,0(255,3)

<sup>a</sup> Determinado por GC.

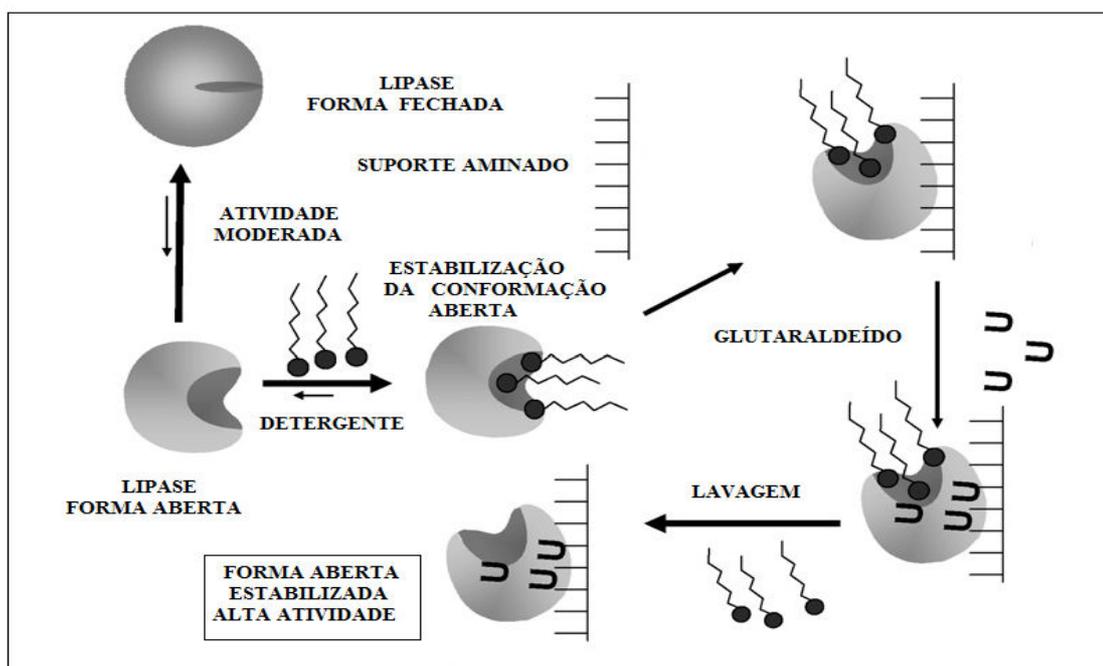
<sup>b</sup> Conversão,  $c = e.e.\text{álcool}/(e.e.\text{álcool}+e.e.\text{acetilado})$ .

<sup>c</sup> Razão enantiomérica,  $E = \ln[1-c(1+e.e.\text{acetilado})]/\ln[1-c(1-e.e.\text{acetilado})]$ .

Os surfactantes como o Triton X-100 e o CTAB têm sido utilizados como estabilizantes da estrutura aberta das lipases, sendo a enzima na forma livre ou na forma imobilizada, essa estabilização não é apenas influenciada pela natureza do surfactante, mas também pelo o método de imobilização, pelo o suporte utilizado e pela a origem da enzima

(MOGENSEN *et al.*, 2000, p. 1721; FILICE *et al.*, 2011, p. 966). A **Figura 12** mostra as etapas de imobilização de lipases na presença de surfactantes.

**Figura 12** - Imobilização de lipases na presença de surfactantes.



Fonte: Mateo *et al.*, 2007, p. 1456.

O uso de agentes tensoativos no processo de imobilização pode produzir dois efeitos que são considerados significativos na atividade catalítica da enzima, como (i) a interação do surfactante com o sítio ativo da enzima, na qual se for tão intensa, pode ocasionar o mecanismo de inibição competitiva, proporcionando uma diminuição da afinidade do substrato pela enzima e (ii) o equilíbrio sendo deslocado para a conformação ativa (aberta) da enzima (FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2007, p. 243).

- **Amano lipase AK imobilizada em óxido de alumínio:**

Em seguida, a resolução foi realizada em hexano usando uma proporção 2:1 massa–massa do catalisador:substrato e utilizando a Amano lipase AK imobilizada em óxido de alumínio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). A reação foi monitorada na temperatura de  $30^\circ\text{C}$ , com um tempo reacional entre 1 hora e 6 horas. Os resultados são sumariados na **Tabela 15**.

Foram obtidos bons resultados de razão enantiomérica ( $>200$ ) e excesso enantiomérico ( $>99\%$ ) do (*R*)-acetato de indanila em todos os tempos reacionais. Entretanto,

os resultados de conversão e excesso enantiomérico para o (*S*)-indanol não foram satisfatórios.

**Tabela 15** - Resultados da resolução cinética *via* acetilação do *rac*-indanol utilizando a Amano lipase AK a partir da *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em óxido de alumínio e hexano como solvente orgânico.

Temperatura (°C)	Tempo	<i>e.e.</i> álcool(%) <sup>a</sup>	<i>e.e.</i> acetilado(%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>
30	1 hora	1,4	>99,0	1,4	>200,0(201,8)
30	2 horas	2,6	>99,0	2,6	>200,0(204,2)
30	3 horas	3,4	>99,0	3,3	>200,0(205,8)
30	4 horas	4,3	>99,0	4,1	>200,0(207,7)
30	5 horas	5,6	>99,0	5,3	>200,0(210,6)
30	6 horas	6,0	>99,0	5,7	>200,0(211,2)

<sup>a</sup> Determinado por GC.

<sup>b</sup> Conversão,  $c = e.e.álcool / (e.e.álcool + e.e.acetilado)$ .

<sup>c</sup> Razão enantiomérica,  $E = \ln[1 - c(1 + e.e.acetilado)] / \ln[1 - c(1 - e.e.acetilado)]$ .

- **Amano lipase AK imobilizada em quitosana 2,5% de peso molecular médio:**

Posteriormente, a resolução foi realizada em hexano usando uma proporção 2:1 massa–massa do catalisador:substrato e utilizando a Amano lipase AK imobilizada em quitosana 2,5% de peso molecular médio. A reação foi monitorada na temperatura de 30°C, com um tempo reacional entre 1 hora e 6 horas. Os resultados são sumariados na **Tabela 16**.

Foram obtidos bons resultados de razão enantiomérica (>200) e excesso enantiomérico (>99%) para o (*R*)-acetato de indanila em todos os tempos reacionais. Entretanto, os resultados de conversão e excesso enantiomérico para o (*S*)-indanol não foram satisfatórios.

**Tabela 16** - Resultados da resolução cinética *via* acetilação do *rac*-indanol utilizando a Amano lipase AK a partir da *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em quitosana 2,5% de peso molecular médio e hexano como solvente orgânico.

Temperatura (°C)	Tempo	<i>e.e.</i> álcool(%) <sup>a</sup>	<i>e.e.</i> acetilado(%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>
30	1 hora	6,8	>99,0	6,4	>200,0(212,8)
30	2 horas	11,6	>99,0	10,5	>200,0(223,0)
30	3 horas	16,7	>99,0	14,4	>200,0(234,4)
30	4 horas	21,4	>99,0	17,7	>200,0(245,4)
30	5 horas	26,4	>99,0	21,0	>200,0(257,6)
30	6 horas	27,0	>99,0	21,4	>200,0(259,1)

<sup>a</sup> Determinado por GC.

<sup>b</sup> Conversão,  $c = e.e.\text{álcool} / (e.e.\text{álcool} + e.e.\text{acetilado})$ .

<sup>c</sup> Razão enantiomérica,  $E = \ln[1 - c(1 + e.e.\text{acetilado})] / \ln[1 - c(1 - e.e.\text{acetilado})]$ .

- **Amano lipase AK imobilizada em quitosana 5% de baixo peso molecular:**

Em seguida, a resolução cinética foi realizada em hexano usando uma proporção 2:1 massa–massa do catalisador:substrato na presença da Amano lipase AK imobilizada em quitosana 5% de baixo peso molecular. A reação foi monitorada na temperatura de 30°C, com um tempo reacional entre 1 hora e 6 horas. Os resultados são sumariados na **Tabela 17**.

Foram obtidos ótimos resultados de razão enantiomérica (>200) e excesso enantiomérico (>99%) para o (*R*)-acetato de indanila em todos os tempos reacionais. A conversão da resolução atingiu 49% em 6 horas de reação levando ao (*S*)-indanol remanescente com 95,1% de *e.e.* Tais resultados permitem afirmar que este sistema enzimático imobilizado da Amano lipase AK é mais eficiente em relação aos estudados anteriormente.

**Tabela 17** - Resultados da resolução cinética *via* acetilação do *rac*-indanol utilizando a Amano lipase AK a partir da *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em quitosana 5% de baixo peso molecular e hexano como solvente orgânico.

Temperatura (°C)	Tempo	<i>e.e.</i> álcool(%) <sup>a</sup>	<i>e.e.</i> acetilado(%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>
30	1 hora	41,0	>99,0	29,3	>200,0(298,0)

30	2 horas	60,1	>99,0	37,8	>200,0(368,1)
30	3 horas	78,0	>99,0	44,1	>200,0(474,4)
30	4 horas	85,6	>99,0	46,4	>200,0(551,0)
30	5 horas	93,7	>99,0	48,5	>200,0(695,1)
30	6 horas	95,1	>99,0	49,0	>200,0(751,1)

<sup>a</sup> Determinado por GC.

<sup>b</sup> Conversão,  $c = e.e._{álcool} / (e.e._{álcool} + e.e._{acetilado})$ .

<sup>c</sup> Razão enantiomérica,  $E = \ln[1-c(1+e.e._{acetilado})] / \ln[1-c(1-e.e._{acetilado})]$ .

- **Amano lipase AK imobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular na presença de alginato de sódio 2,5%:**

Posteriormente, a resolução cinética foi realizada em hexano usando uma proporção 2:1 massa–massa do catalisador:substrato, utilizando a Amano lipase AK imobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular na presença de alginato de sódio 2,5%. A reação foi monitorada na temperatura de 30°C, com um tempo reacional entre 1 hora e 6 horas. Os resultados são sumariados na **Tabela 18**.

Foram obtidos ótimos resultados de razão enantiomérica (>200) e excesso enantiomérico (>99%) para o (*R*)-acetato de indanila em todos os tempos reacionais. A conversão de 50% e excesso enantiomérico do (*S*)-indanol (maior que >99%) foram obtidos em apenas 6 horas de reação. Com tais resultados, este sistema enzimático da Amano lipase AK imobilizada foi o mais eficiente em relação aos estudados anteriormente.

**Tabela 18** - Resultados da resolução cinética *via* da acetilação do *rac*-indanol utilizando a Amano lipase AK a partir da *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular na presença de alginato de sódio 2,5% e hexano como solvente orgânico.

Temperatura (°C)	Tempo	<i>e.e.</i> <sub>álcool</sub> (%) <sup>a</sup>	<i>e.e.</i> <sub>acetilado</sub> (%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>
30	1 hora	56,2	>99,0	36,2	>200,0(351,5)
30	2 horas	77,0	>99,0	43,7	>200,0(466,4)
30	3 horas	90,0	>99,0	47,6	>200,0(617,8)
30	4 horas	93,4	>99,0	48,5	>200,0(695,1)
30	5 horas	97,4	>99,0	49,6	>200,0(871,9)

30	6 horas	>99,0	>99,0	50,0	>200,0(1057,0)
----	---------	-------	-------	------	----------------

<sup>a</sup> Determinado por GC.

<sup>b</sup> Conversão,  $c = e.e.álcool / (e.e.álcool + e.e.acetilado)$ .

<sup>c</sup> Razão enantiomérica,  $E = \ln[1 - c(1 + e.e.acetilado)] / \ln[1 - c(1 - e.e.acetilado)]$ .

• **Amano lipase AK imobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular na presença de carragenina:**

Por último, a resolução foi realizada em hexano usando uma proporção 2:1 massa–massa do catalisador:substrato, utilizando a Amano lipase AK imobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular na presença de carragenina 2,5%. A reação foi monitorada na temperatura de 30°C, com um tempo reacional entre 1 hora e 6 horas. Os resultados são sumariados na **Tabela 19**.

Foram obtidos bons resultados de razão enantiomérica (>200) e excesso enantiomérico (>99%) para o (*R*)-acetato de indanila em todos os tempos reacionais. Os resultados de conversão e excesso enantiomérico para o (*S*)-indanol não foram totalmente satisfatórios, Porém, foram obtidos resultados medianos nos tempos reacionais de 5 e 6 horas.

**Tabela 19** - Resultados da resolução cinética *via* da acetilação do *rac*-indanol utilizando a Amano lipase AK a partir da *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular na presença de carragenina 2,5% e hexano como solvente orgânico.

Temperatura (°C)	Tempo	<i>e.e.</i> álcool(%) <sup>a</sup>	<i>e.e.</i> acetilado(%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>
30	1 hora	28,0	>99,0	22,0	>200,0(261,7)
30	2 horas	38,4	>99,0	26,3	>200,0(281,6)
30	3 horas	48,1	>99,0	32,7	>200,0(321,1)
30	4 horas	53,1	>99,0	35,0	>200,0(339,3)
30	5 horas	61,0	>99,0	38,1	>200,0(372,2)
30	6 horas	63,8	>99,0	39,2	>200,0(385,4)

<sup>a</sup> Determinado por GC.

<sup>b</sup> Conversão,  $c = e.e.álcool / (e.e.álcool + e.e.acetilado)$ .

<sup>c</sup> Razão enantiomérica,  $E = \ln[1 - c(1 + e.e.acetilado)] / \ln[1 - c(1 - e.e.acetilado)]$ .

### 3.5.4 Resultados de imobilizações

Em seguida, apresentamos na **Tabela 20** os resultados de carga de enzima oferecida, rendimentos de imobilizações e atividades dos derivados nas imobilizações descritas no item 3.5.3 realizadas na Amano lipase AK a partir da *Pseudomonas fluorescens* em diversos tipos de suportes.

**Tabela 20** – Resultados de imobilizações.

Derivado	Atividade do derivado ( $U_{pNPB}/g_{gel}$ )	Carga oferecida (U/g)	Rendimento de imobilização (%)	Atividade teórica ( $U_{pNPB}/g_{gel}$ )	Atividade recuperada (%)
Quitosana b.p.m. 2,5%	0,25	4,5	81	3,65	6,85
Quitosana b.p.m./Triton X-100 (2,5%/0,1%)	0,4	4,5	65	2,92	13,70
Quitosana b.p.m./CTAB (2,5%/0,01%)	0,34	4,5	61	2,75	12,36
Óxido de alumínio	0,05	4,5	30	1,35	3,70
Quitosana p.m.m. 2,5%	0,5	4,5	60	2,70	18,52
Quitosana b.p.m. 5%	1,4	4,5	68	3,06	45,75
Quitosana/Alginato (2,5%/2,5%)	1,3	4,5	81	3,65	35,61
Quitosana/Carragenina (2,5%/2,5%)	0,9	4,5	83	3,74	24,06

A carga de enzima oferecida foi de 4,5 U/g ( $8 \text{ mg}_{proteína}/g_{suporte}$ ) para todos os tipos de suportes utilizados. Os rendimentos de imobilização variaram entre 30% e 83%, sendo os melhores valores para a quitosana de baixo peso molecular 2,5%, quitosana de baixo peso molecular 2,5% na presença de alginato de sódio 2,5% e quitosana de baixo peso molecular 2,5% na presença de carragenina 2,5%. O óxido de alumínio teve um baixo valor de rendimento de imobilização (30%) pelo fato de que o tempo de imobilização de 5 horas não ser suficiente para proporcionar um maior valor. Os melhores resultados de atividade do derivado foram obtidos com a quitosana de baixo peso molecular 5% e da quitosana de

baixo peso molecular 2,5% na presença de alginato de sódio 2,5%. Esses valores explicam porque esses suportes proporcionaram os melhores resultados de seletividade na resolução cinética enzimática do indanol racêmico empregando a Amano lipase AK imobilizada, como descrita no item 3.5.3.

Após o estudo de imobilização da Amano lipase AK em vários suportes foi possível verificar que os sistemas mais eficientes foram com quitosana 2,5% de baixo peso molecular na presença de alginato de sódio 2,5% (**Tabela 18, 6 horas de reação**) e quitosana 5% de baixo peso molecular (**Tabela 17, 6 horas de reação**).

Posteriormente, relataremos o estudo de reuso das enzimas imobilizadas mais eficientes na resolução cinética enzimática do *rac*-indanol: i) Amano lipase AK imobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular na presença de alginato de sódio 2,5%, ii) Amano lipase AK imobilizada em quitosana 5% de baixo peso molecular e iii) *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em immobead-150.

### **3.6 Estudo do reuso das enzimas imobilizadas Amano lipase AK e *Thermomyces lanuginosus***

#### **3.6.1 Estudo do reuso da Amano lipase AK imobilizada em quitosana 5% de baixo peso molecular**

Primeiramente, realizou-se o estudo do reuso da Amano lipase AK imobilizada em quitosana 5% de baixo peso molecular. As condições do reuso foram: hexano como solvente orgânico, proporção 2:1 massa–massa do catalisador:substrato, temperatura de 30°C e um tempo reacional de 6 horas. Os resultados são sumariados na **Tabela 21**.

No primeiro ciclo foram obtidos bons resultados de excesso enantiomérico do (*S*)-indanol e do (*R*)-acetato de indanila (maiores que 90%), conversão de quase 50% e razão enantiomérica maior que 200. A partir do segundo ciclo até o sexto ciclo, observou-se um decréscimo nos valores de excesso enantiomérico do (*S*)-indanol e nos valores de conversão, porém o valor de excesso enantiomérico do (*R*)-acetato de indanila permaneceu o mesmo em todos os ciclos (maiores que 99%) e os valores de razão enantiomérica permaneceram maiores que 200, em todos os ciclos.

**Tabela 21** – Resultados obtidos do reuso da Amano lipase AK imobilizada em quitosana 5% de baixo peso molecular.

Ciclo	<i>e.e.</i> álcool(%) <sup>a</sup>	<i>e.e.</i> acetilado(%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>
1	92,5	>99,0	48,3	>200,0(671,2)
2	71,5	>99,0	42,0	>200,0(428,1)
3	23,1	>99,0	19,0	>200,0(249,5)
4	13,5	>99,0	12,0	>200,0(227,3)
5	12,3	>99,0	11,1	>200,0(224,6)
6	11,4	>99,0	10,3	>200,0(222,6)

<sup>a</sup> Determinado por GC.

<sup>b</sup> Conversão,  $c = e.e.álcool / (e.e.álcool + e.e.acetilado)$ .

<sup>c</sup> Razão enantiomérica,  $E = \ln[1 - c(1 + e.e.acetilado)] / \ln[1 - c(1 - e.e.acetilado)]$ .

### 3.6.2 Estudo do reuso da Amano lipase AK imobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular na presença de alginato de sódio 2,5%

Em seguida, realizou-se o estudo do reuso da Amano lipase AK imobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular na presença de alginato de sódio 2,5%. As condições do reuso foram: hexano como solvente orgânico, proporção 2:1 massa–massa do catalisador:substrato, temperatura de 30°C e um tempo reacional de 6 horas. Os resultados são sumariados na **Tabela 22**.

No primeiro ciclo foram obtidos bons resultados de excesso enantiomérico do (*S*)-indanol e do (*R*)-acetato de indanila (maiores que 95%), conversão de quase 50% e razão enantiomérica maior que 200. A partir do segundo ciclo até o sexto ciclo, observou-se um decréscimo nos valores de excesso enantiomérico do (*S*)-indanol e nos valores de conversão, porém o valor de excesso enantiomérico do (*R*)-acetato de indanila permaneceu o mesmo em todos os ciclos (maiores que 99%) e os valores de razão enantiomérica permaneceram maiores que 200, em todos os ciclos.

**Tabela 22** - Resultados obtidos do reuso da Amano lipase AK imobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular na presença de alginato de sódio 2,5%.

Ciclo	<i>e.e.</i> álcool(%) <sup>a</sup>	<i>e.e.</i> acetilado(%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>
1	98,5	>99,0	49,8	>200,0(978,1)

2	74	>99,0	42,7	>200,0(444,5)
3	30,5	>99,0	23,5	>200,0(268,2)
4	17,2	>99,0	14,8	>200,0(235,6)
5	12,3	>99,0	11,1	>200,0(224,6)
6	12,0	>99,0	10,8	>200,0(224,0)

<sup>a</sup> Determinado por GC.

<sup>b</sup> Conversão,  $c = e.e.\text{álcool}/(e.e.\text{álcool}+e.e.\text{acetilado})$ .

<sup>c</sup> Razão enantiomérica,  $E = \ln[1-c(1+e.e.\text{acetilado})]/\ln[1-c(1-e.e.\text{acetilado})]$ .

### 3.6.3 Estudo do reuso da Lipase a partir da *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em *immobead-150*

Finalmente, realizou-se o estudo do reuso da Lipase a partir da *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em *immobead-150*. As condições do reuso foram: hexano como solvente orgânico, proporção 2:1 massa–massa do catalisador:substrato, temperatura de 35°C e um tempo reacional de 15 minutos. Os resultados estão apresentados na **Tabela 23**.

Neste caso realizou-se o estudo de reuso da referida enzima em até dez ciclos, com a obtenção de excelentes resultados, como valores de excessos enantiomérico do (*S*)-indanol e do (*R*)-acetato de indanila (maiores que 90%), conversões de quase 50% e valores de razão enantiomérica maiores que 100.

**Tabela 23** – Resultados obtidos do reuso da *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em *immobead-150*.

Ciclo	<i>e.e.</i> álcool(%) <sup>a</sup>	<i>e.e.</i> acetilado(%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>
1	>99,0	95,0	51,0	>200,0(205,8)
2	>99,0	94,0	51,3	170,3
3	98,3	95,3	50,7	198,1
4	98,0	95,6	50,6	>200,0(205,0)
5	98,1	93,0	51,3	128,0
6	97,8	94,3	50,9	153,7
7	97,6	95,1	50,6	176,5
8	97,4	94,0	50,8	140,6
9	97,9	95,0	50,7	177,8

10	98,0	95,6	50,6	>200,0(205,0)
----	------	------	------	---------------

<sup>a</sup> Determinado por GC.

<sup>b</sup> Conversão,  $c = e.e_{\text{álcool}} / (e.e_{\text{álcool}} + e.e_{\text{acetilado}})$ .

<sup>c</sup> Razão enantiomérica,  $E = \ln[1 - c(1 + e.e_{\text{acetilado}})] / \ln[1 - c(1 - e.e_{\text{acetilado}})]$ .

No estudo de reuso, a Lipase a partir da *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em immovead-150 proporcionou melhores resultados em relação à Amano lipase AK imobilizada em quitosana 5% de baixo peso molecular e a Amano lipase AK imobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular na presença de alginato de sódio 2,5%, pois os valores de conversão e excesso enantiomérico do (*S*)-indanol foram satisfatórios em um maior número de ciclos reacionais, em um total de dez ciclos.

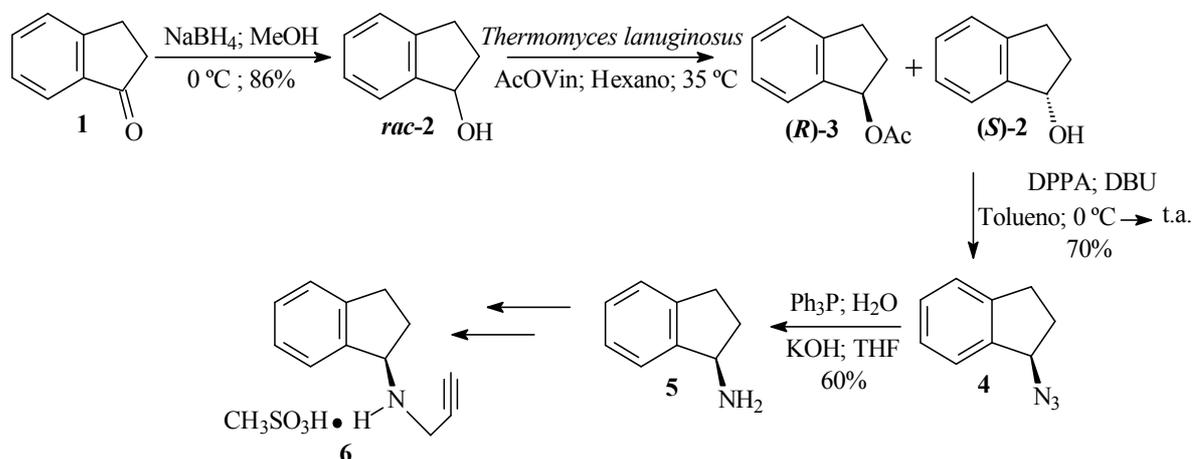
Na resolução cinética do *rac*-indanol (**Esquema 26, pág. 48**), os melhores resultados de seletividade e atividade enzimática foram obtidos utilizando hexano como solvente orgânico, tempo reacional de 15 minutos, para ambas as lipases, e temperatura de 30°C para a Amano lipase AK a partir da *Pseudomonas fluorescens* (**Tabela 7**) e 35°C para a Lipase a partir da *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em immovead-150 (**Tabela 11**). Com as enzimas imobilizadas foram obtidos excelentes resultados utilizando hexano como solvente orgânico, tempo reacional de 6 horas e uma temperatura de 30°C para a Amano lipase AK a partir da *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular na presença de alginato de sódio 2,5% (**Tabela 17**) e utilizando hexano como solvente orgânico, tempo reacional de 6 horas e uma temperatura de 30°C para a Amano lipase AK a partir da *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em quitosana 5,0% de baixo peso molecular (**Tabela 18**).

Cabe ressaltar que para a síntese do Mesilato de Rasagilina, optamos por utilizar a Lipase a partir da *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em immovead-150 em detrimento da Amano lipase AK a partir da *Pseudomonas fluorescens* (enzima livre), da Amano lipase AK a partir da *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular e alginato de sódio 2,5% e da Amano lipase AK a partir da *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em quitosana 5,0% de baixo peso molecular, por três motivos: (i) a enzima imobilizada comparada a enzima livre oferece a oportunidade de ser reciclada e, portanto utilizada em vários ciclos; (ii) proporcionou a obtenção de melhores resultados de seletividade e atividade enzimática em um menor tempo reacional (15 minutos) e (iii) um maior número de ciclos de reuso mantendo a atividade e seletividade enzimática.

### 3.7 Síntese quimioenzimática do Mesilato de Rasagilina

Após o processo de escolha da lipase na resolução cinética enzimática do *rac*-indanol, iniciou-se a síntese quimioenzimática do Mesilato de Rasagilina (**6**) (**Esquema 28**). Inicialmente, realizou-se uma redução química da indanona (**1**), empregando boroidreto de sódio em metanol, obtendo-se 86% de rendimento do indanol (*rac*-**2**). Em seguida, realizou-se a resolução cinética enzimática de *rac*-**2**, utilizando a lipase imobilizada que proporcionou um maior valor de razão enantiomérica e maior possibilidade de reuso, no caso a Lipase a partir da *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em imobead-150, em hexano como solvente orgânico, a 35°C e utilizando o acetato de vinila como doador de acila, obtendo-se o (*S*)-indanol (*S*-**2**) e o (*R*)-acetato de indanila (*R*-**3**). Posteriormente, realizou-se uma reação de Mitsunobu modificada a partir do *S*-**2**, empregando DPPA e DBU, em tolueno seco, obtendo-se um rendimento de 70% do (*R*)-azidoindano (**4**). Por último, realizou-se uma reação de Staudinger a partir de **4**, empregando trifetilfosfina, THF/H<sub>2</sub>O (3:1, v/v) como solvente, em meio básico, obtendo-se um rendimento de 60% da (*R*)-indanamina (**5**). No atual estágio de trabalho, a síntese de **6** foi realizada até a etapa de obtenção do composto **5**.

**Esquema 28** – Síntese quimioenzimática do Mesilato de Rasagilina.



## *Capítulo 4*

## *Conclusões*

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados de biorredução da indanona obtidos com as leveduras não foram satisfatórios, uma vez que apresentaram baixos valores de conversões. Entretanto, será realizada uma otimização das reações de biorredução da indanona. Adicionalmente, serão testadas outras leveduras, modificando as seguintes variáveis: pH, temperatura e meio reacional.

Por outro lado, a metodologia de introdução de quiralidade *via* resolução cinética enzimática foi eficiente. Foi possível observar que a Amano lipase AK a partir da *Pseudomonas fluorescens* e a Lipase a partir da *Thermomyces lanuginosus* immobilizada em imobead-150 foram eficientes, na presença de hexano como solvente orgânico e temperaturas de 30°C e 35°C, para Amano lipase AK (enzima livre) a partir da *Pseudomonas fluorescens* e Lipase a partir da *Thermomyces lanuginosus*, respectivamente. Os melhores resultados de seletividade foram obtidos na presença da Lipase a partir da *Thermomyces lanuginosus*. Os resultados obtidos através do estudo de reuso das lipases mostraram que a Lipase a partir da *Thermomyces lanuginosus* immobilizada em imobead-150 foi mais eficiente frente à Amano lipase AK a partir da *Pseudomonas fluorescens* immobilizada em quitosana 2,5% de baixo peso molecular na presença de alginato de sódio 2,5% e immobilizada em quitosana 5,0% de baixo peso molecular, mantendo a atividade e seletividade enzimática em até dez ciclos reacionais. Cabe ressaltar que o estudo do reuso foi realizado até o décimo ciclo. Como os resultados de seletividade e atividade mantiveram-se, praticamente, inalterados até o décimo ciclo, concluímos que já era possível afirmar que a referida enzima é eficiente na resolução cinética do *rac*-indanol com possível aplicação em processo industrial de baixo custo.

Foi possível realizar quatro etapas da síntese quimioenzimática do Mesilato de Rasagilina obtendo-se rendimentos variando de bons a moderados, faltando apenas duas últimas etapas da síntese.

## *Capítulo 5*

### *Procedimiento Experimental*

## 5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 5.1 Instrumentos

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram obtidos no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN/UFC), utilizando-se Espectrômetros Bruker, modelo Avance DPX- 300 e Avance DRX-500, que operam na frequência de 300 e 500 MHz para hidrogênio, respectivamente.

Os espectros de massas foram obtidos utilizando um cromatógrafo gasoso da marca Shimadzu de modelo GC-2010 Plus acoplado a um espectrômetro de massa da marca Shimadzu de modelo GCMS-QP 2010 SE, utilizando-se uma coluna com fase estacionária de 95% dimetilpolisiloxano/5% difenilpolisiloxano com um comprimento de 30 m, diâmetro interno de 0,25 mm, diâmetro externo de 0,39 mm e 0,25  $\mu\text{m}$  da espessura de filme e um auto-injetor da marca Shimadzu de modelo AOC-20i. A fase móvel utilizada foi o gás hélio.

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

Os acompanhamentos das reações de hidrólise e acetilação na resolução cinética enzimática do *rac*-indanol foram realizados em um cromatógrafo gasoso da marca Shimadzu de modelo GC 2010 com um detector DIC, utilizando-se uma coluna quiral com fase estacionária CP-ciclodextrina com um comprimento de 25 m, diâmetro interno de 0,25 mm, diâmetro externo de 0,39 mm e 0,25  $\mu\text{m}$  da espessura de filme e um auto-injetor da marca Shimadzu de modelo AOC-20i. A fase móvel utilizada foi o gás nitrogênio.

A conversão e o excesso enantiomérico dos produtos de biorredução da indanona e foram determinados a partir de dados obtidos em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC-20AT, com coluna quiral OD-H de dimensões 150 x 4,6 mm e detector UV-VIS Shimadzu SPD-M20A. Nas análises foi utilizada mistura binária de hexano e isopropanol de qualidade CLAE.

As determinações de Rotação Óptica Específica foram realizadas em um polarímetro Perkin-Elmer 341 digital.

As medidas de absorbância na região do ultravioleta-visível foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro modelo Cary 50 Conc da Varian. As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 600 nm.

O ponto de fusão do indanol foi determinado em um aparelho automático da marca Mettler-Toledo de modelo FP62.

A esterilização de vidrarias e meios de culturas foi realizada no Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica (LABS) – UFC.

Os procedimentos de esterilização foram realizados em autoclave vertical, PHOENIX<sup>®</sup> AV 75 e Soc. FABBE<sup>®</sup> 103 e a repicagem nos meios de cultura em capela de fluxo laminar LABCONCO<sup>®</sup> MOD # 8089000.

As reações com agitação foram realizadas em um shaker de bancada com uma incubação refrigerada da marca Cientec de modelo CT-712R.

## 5.2 Solventes e reagentes

### 5.2.1 Solventes empregados

Álcool metílico, hexano, acetato de etila e diclorometano foram todos de procedência Synth. O tolueno e o éter dietílico foram da marca Vetec. A acetonitrila e hexano, grau CLAE, foram da marca TEDIA. O THF foi de procedência Sigma-Aldrich.

### 5.2.2 Reagentes empregados

- Indanona (C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O) comercial, de procedência Sigma-Aldrich.
- Boroidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) comercial, de procedência Sigma-Aldrich.
- Sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) comercial, de procedência Vetec.
- Anidrido acético (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>) comercial, de procedência Dinâmica.
- Dimetilaminopiridina – DMAP (C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>) comercial, de procedência ACROS ORGANICS.
- Difênil-fosforil-azida – DPPA (C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>ON<sub>3</sub>P) comercial, de procedência Sigma-Aldrich.
- 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno – DBU (C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>) comercial, de procedência Sigma-Aldrich.
- Trifenilfosfina (PPh<sub>3</sub>) comercial, de procedência Sigma-Aldrich.
- Hidróxido de potássio (KOH) comercial, de procedência Vetec.

- Hidróxido de sódio (NaOH) comercial, de procedência Vetec.
- Ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH) comercial, de procedência Synth.
- Acetato de vinila (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) comercial, de procedência Sigma-Aldrich.
- Hidreto de cálcio (CaH<sub>2</sub>) comercial, de procedência Merck.
- Benzofenona (C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>O) comercial, de procedência Vetec.
- Quitosana de baixo peso molecular e peso molecular médio comercial (C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>4</sub>N)<sub>n</sub>, de procedência Sigma-Aldrich.
- Óxido de alumínio (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) comercial, de procedência Sigma-Aldrich.
- Alginato de sódio (NaC<sub>6</sub>H<sub>7</sub>O<sub>6</sub>) comercial, de procedência Vetec.
- Carragenina comercial, de procedência Sigma.
- Glutaraldeído (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>) comercial, de procedência Sigma-Aldrich.
- Butirato de *p*-nitrofenila - *p*NPB (C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>) comercial, de procedência Sigma-Aldrich.
- Triton X-100 (C<sub>34</sub>H<sub>62</sub>O<sub>11</sub>) comercial, de procedência Sigma-Aldrich.
- Brometo de hexadeciltrimetilamônio - CTAB (C<sub>19</sub>H<sub>42</sub>BrN) comercial, de procedência Sigma-Aldrich.

### 5.3 Biocatalisadores utilizados

- Amano lipase G a partir do *Penicillium camemberti* de procedência Sigma-Aldrich.
- Amano lipase AK a partir da *Pseudomonas fluorescens* de procedência Sigma-Aldrich.
- Lipase a partir do *Rhizopus oryzae* de procedência Sigma-Aldrich.
- Lipase a partir da *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em immobead-150 de procedência Sigma-Aldrich.
- Lipase a partir da *Candida antartica* B (CAL-B) de procedência Novozyme.
- Lipase a partir da *Candida rugosa* de procedência Sigma-Aldrich.
- Lipase a partir do pâncreas do porco (PPL) de procedência Novozyme.
- Acilase I a partir do *Aspergillus melleus* de procedência Sigma-Aldrich.
- Lipozyme RM IM a partir do *Rhizomucor miehei* imobilizada em resina aniônica de procedência Novo Nordisk.

- As leveduras *Candida krusei* (1), *Candida krusei* (2), *Candida guilliermondi*, *Pichia membranifaciens*, *Candida rugosa* e *Klyveromyces lactis* todas disponibilizadas pelo Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

#### 5.4 Adsorventes utilizados

As cromatografias em coluna vertical foram efetuadas utilizando sílica gel 60-230 mesh, comercial, de procedência VETEC. Nas cromatografias de camada delgada (CCD) foi empregada sílica gel 60 G 5-40  $\mu\text{m}$  comercial, sobre poliéster T-6145 provenientes da marca SIGMA CHEMICAL CO com camada de 250  $\mu\text{m}$  de espessura e dimensões de 10 x 5 cm.

Após eluição das substâncias nas cromatoplas, as mesmas foram reveladas através de pulverização com solução de vanilina ( $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ , 5,0 g) e ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ , 0,75 mol/L, 100 mL) em etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$ , 100 mL), como também em uma solução de ninidrina ( $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4$ , 0,25 g) em etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$ , 100 mL) seguida de aquecimento a  $100^\circ\text{C}$  com pistola aquecedora da marca Steinel modelo HL500, por aproximadamente 1 minuto.

#### 5.5 Secagem dos solventes utilizados na reação de biocatálise

Os solventes hexano, acetonitrila e tolueno foram tratados com a adição de hidreto de cálcio em refluxo empregando nitrogênio como gás de purga (LI; LIMBERAKIS; PFLUM, 2007, p. 7).

O tratamento do THF foi realizado com a adição de sódio metálico na presença de benzofenona em refluxo utilizando o nitrogênio como gás de purga. O tratamento teve seu término com o aparecimento de uma coloração azul escura (LI; LIMBERAKIS; PFLUM, 2007, p. 6).

## 5.6 Preparação das substâncias utilizadas como padrões

### 5.6.1 Síntese do indanol racêmico

Em um balão de 250 mL, dissolveu-se 7,55 mmol (1000 mg) de indanona em 75,5 mL de metanol com concentração 0,1M. Em seguida adicionou-se, lentamente, 30,2 mmol (1142,3 mg) de boroidreto de sódio, à temperatura de 0°C. A reação procedeu-se por 3 horas. Ao término, evaporou-se o metanol a pressão reduzida. Adicionou-se água destilada e extraiu-se o produto com acetato de etila (4x60 mL), sendo a fase orgânica tratada com sulfato de sódio anidro. Evaporou-se o acetato de etila a pressão reduzida. Em seguida, purificou-se o produto realizando uma coluna cromatográfica, empregando gel de sílica como fase estacionária, e como fase móvel a mistura hexano:acetato de etila 10%. O *rac*-indanol foi obtido com 86% de rendimento como um sólido branco com ponto de fusão de 52°C, enquanto que o valor relatado na literatura varia de 52 a 54°C (ZEYNIZADEH; BEHYAR, 2005, p. 1204).

### 5.6.2 Síntese do acetato de indanila racêmico

Em um balão de 125 mL, dissolveu-se 4,16 mmol (500 mg) de indanol em 40 mL de diclorometano com concentração de 0,1M. Em seguida, adicionou-se 1,25 mmol (143,8 mg) de DMAP. Posteriormente, adicionou-se 12,48 mmol (1185,6 µL) de anidrido acético. A reação foi processada por 4 horas, e então, purificou-se o produto utilizando uma coluna cromatográfica com gel de sílica e como eluente uma mistura hexano:acetato 5%. Obteve-se o *rac*-acetato de indanila, como um líquido amarelo claro, com rendimento de 80%.

### 5.6.3 Síntese do (R)-azidoindano

Em um balão tritubular de 100 mL, adicionou-se 4,44 mmol (956 µL) de DPPA em 3,7 mmol (500 mg) do (*S*)-indanol, em tolueno seco, com concentração de 0,1M, sob atmosfera de nitrogênio. A reação foi resfriada a 0°C, agitada por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se à mistura reacional, lentamente, 4,44 mmol (663 µL) de DBU. Agitou-se a reação por 2 horas a 0°C e, posteriormente, por 20 horas a temperatura

ambiente. Removeu-se o solvente a vácuo, e então, purificou-se o produto utilizando uma coluna cromatográfica com gel de sílica e como fase móvel a mistura hexano:acetato 10%. Obteve-se 70% do composto (*R*)-azidoindano, um líquido amarelo claro, com um valor de  $[\alpha]_D^{20} = +28,7$  (c 1,5; hexano) *e.e.* = 95%, enquanto que o valor fornecido pela literatura é de  $[\alpha]_D^{20} = +29,3$  (c 1,61; hexano) *e.e.* = 94,1% (KULISZEWSKA; HANBAUER; HAMMERSCHMIDT, 2008, p. 8611).

#### 5.6.4 Síntese da (*R*)-indanamina

Em um balão de 50 mL, dissolveu-se 0,63 mmol (100 mg) do (*R*)-azidoindano em THF:água (3:1). Em seguida, adicionou-se 0,7 mmol (183,4 mg) de trifetilfosfina e 0,63 mmol (35,28 mg) de hidróxido de potássio. A reação foi agitada por 24 horas. Posteriormente, evaporou-se o solvente e a mistura foi diluída em uma solução de ácido clorídrico com concentração de 25% até pH 2. Extraiu-se a fase aquosa com éter dietílico (3x50 mL). A fase aquosa foi tratada com uma solução de hidróxido de sódio com concentração de 25% até pH 14. Em seguida, extraiu-se a fase aquosa com éter dietílico (3x50 mL) e os extratos orgânicos combinados foram secos com sulfato de sódio anidro. Por último, o solvente foi evaporado a pressão reduzida. Obteve-se 60% de rendimento da (*R*)-indanamina, um líquido de coloração alaranjada, com um valor de  $[\alpha]_D^{20} = -19,6$  (c 1,0; CHCl<sub>3</sub>) *e.e.* = 92%, enquanto que o valor fornecido na literatura é de  $[\alpha]_D^{23} = -20,0$  (c 1,0; CHCl<sub>3</sub>) *e.e.* = 96% (UITERWEERD *et al.*, 2003, p. 3484).

### 5.7 Processos biocatalíticos

#### 5.7.1 Meio de cultura empregado

Para o crescimento das leveduras utilizou meio de batata dextrose ágar obtido comercialmente marca HIMEDIA, em uma proporção de 24 g de batata dextrose para 1 L de água destilada e 1,5% do volume de ágar. Os meios de cultura foram autoclavados a 121°C por 15 minutos.

### **5.7.2 Isolamento das leveduras**

Foram feitos os plaqueamentos em meio batata dextrose ágar (BDA) descrito no item anterior e feito o estriamento com alça de Drigalski. As placas foram lacradas e ficaram em observação até o aparecimento das primeiras colônias de leveduras. Todos os plaqueamentos foram feitos em duplicatas.

### **5.7.3 Conservação das leveduras**

Uma colônia de cada levedura pura e isolada foi inoculada em tubo de ensaio com meio BDA, para manter controle e repicada quinzenalmente.

### **5.7.4 Meio reacional**

As leveduras foram utilizadas como fonte enzimática, elas foram diluídas em solução salina 0,9% de cloreto de sódio e analisadas em espectroscopia de absorvância UV/Vis com um valor de 0,5. Foi inoculado 1 mL da referida solução em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio BD esterelizado e adicionando 20 µL de substrato (indanona). Em seguida os frascos foram lacrados e submetidos à agitação em mesa agitadora a uma velocidade de 175 r.p.m e 28 °C durante períodos de 2, 4 e 6 dias. Todas as reações foram realizadas em duplicatas.

## **5.8 Reações de resolução cinética enzimática**

### **5.8.1 Resolução cinética enzimática do *rac*-acetato de indanila via reação de hidrólise empregando lipases comerciais**

Em um erlenmeyer de 5 mL, dissolveu-se 0,17 mmol (30 mg) de *rac*-acetato de indanila em 0,34 mL de THF, 1,36 mL de tampão fosfato ( $\text{PO}_4^{2-}$ ), 0,1M, pH 7, e por último, adicionou-se 60 mg de lipase. A reação foi processada a 30°C, com uma rotação de 250 r.p.m e por um período de 24 horas. O processo foi repetido em mais oito erlenmeyers, pois a triagem foi realizada com nove lipases. As lipases comerciais utilizadas nas reações foram as seguintes: Amano lipase G a partir do *Penicillium camemberti*, Amano lipase AK a partir

da *Pseudomonas fluorescens*, Lipase a partir do *Rhizopus oryzae*, Lipase a partir da *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em imobead-150, Lipase a partir da *Candida antartica* B (CAL-B), Lipase a partir da *Candida rugosa*, Lipase a partir do pâncreas do porco (PPL), Acilase I a partir do *Aspergillus melleus* e Lipozyme RM IM a partir do *Rhizomucor miehei* imobilizada em resina aniônica. Posteriormente, realizou-se uma extração do produto com acetato de etila (3x10 mL) sendo a fase orgânica tratada com sulfato de sódio anidro. Evaporou-se o acetato de etila a pressão reduzida. Em seguida, purificou-se o produto realizando uma coluna cromatográfica, empregando gel de sílica como fase estacionária, e como fase móvel a mistura hexano:acetato de etila 5%.

### ***5.8.2 Resolução cinética enzimática do rac-indanol via reação de acetilação utilizando a Amano lipase AK a partir da Pseudomonas fluorescens e a Lipase a partir da Thermomyces lanuginosus imobilizada em imobead-150***

Em um erlenmeyer de 5 mL, adicionou-se 30 mg (0,22 mmol) do *rac*-indanol e 60 mg de lipase. Em seguida, o erlenmeyer foi vedado com um septo e realizou-se vácuo seguido de purga com nitrogênio. Posteriormente, adicionou-se 2,2 mL de solvente, previamente seco e 1,1 mmol (103 µL) de acetato de vinila. A reação foi realizada em uma agitação de 250 r.p.m, variando-se a temperatura e o tempo reacional. Os solventes empregados foram: acetonitrila, hexano, THF e tolueno. Realizou-se uma filtração utilizando um papel de filtro. Em seguida, a enzima foi lavada com o devido solvente orgânico empregado na resolução cinética (5x10 mL). Finalmente, purificou-se o produto realizando uma coluna cromatográfica, empregando gel de sílica como fase estacionária, e como fase móvel a mistura hexano:acetato de etila 5%.

## **5.9 Imobilizações enzimáticas**

### ***5.9.1 Preparação da solução enzimática da Amano lipase AK a partir da Pseudomonas fluorescens***

Uma massa de extrato comercial da enzima foi pesada e dissolvida em 100 mL de tampão fosfato, 5 mmol/L, pH 7. A concentração final da solução da enzima foi de 25 mg/mL de proteína. A solução preparada foi submetida à agitação lenta durante 20

minutos a 25°C e em seguida centrifugada a 4000 r.p.m. por 1 hora. A solução resultante após filtração foi armazenada a 4°C.

### ***5.9.2 Preparação do suporte quitosana e híbridos***

Quitosana em pó foi dissolvida em solução de ácido acético 5 %. Após completa dissolução, a solução resultante foi adicionada, lentamente, a uma solução de NaOH 100 mmol/L (proporção quitosana/NaOH = 1:10) mantida sob agitação lenta e constante. Em seguida, o sistema foi deixado em repouso por 24 horas à temperatura ambiente. O gel obtido após este tempo foi lavado, exaustivamente, com água destilada até a neutralidade sendo, em seguida, secado por filtração a vácuo. Os suportes obtidos foram quitosana 2,5% de baixo peso molecular, quitosana 2,5% de baixo peso molecular; surfactante Triton X-100 0,1%, quitosana 2,5% de baixo peso molecular; surfactante CTAB 0,01%, óxido de alumínio (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), quitosana 2,5% de peso molecular médio, quitosana 5% de baixo peso molecular, quitosana 2,5% de baixo peso molecular; carragenina 2,5%, quitosana 2,5% de baixo peso molecular; alginato de sódio 2,5%.

### ***5.9.3 Reticulação dos suportes com glutaraldeído***

O gel de quitosana foi reticulado em solução tampão fosfato de sódio 100 mmol/L, pH 7 contendo glutaraldeído 0,6 % (razão  $V_{gel}/V_{total}$  de 1/10) por 1 hora a 25°C sob lenta agitação. Após reticulação, o suporte foi lavado, exaustivamente, com água destilada para remoção do excesso de glutaraldeído e, em seguida, foi secado por filtração a vácuo.

### ***5.9.4 Imobilização da lipase***

A imobilização da lipase foi efetuada em tampão fosfato 100 mmol/L, pH 7, por 5 horas e a 25°C sob lenta agitação. O suporte contendo a enzima imobilizada foi lavado com água destilada para remoção da proteína não-imobilizada e em seguida foi armazenado a 4°C em solução-tampão fosfato de sódio 100 mmol/L, pH 7. A carga adicionada nestes experimentos foram de acordo com os resultados descritos no item 5.3.4 empregando o método de Bradford (1976). Antes da adição do suporte utilizado ( $t=0$ ) e após o término da

imobilização (t=5h), alíquotas do meio reacional foram retiradas para a determinação do rendimento de imobilização.

### 5.9.5 Determinação da atividade hidrolítica das lipases

A atividade hidrolítica da lipase solúvel e imobilizada foi quantificada através da hidrólise do butirato do *p*-nitrofenila (*p*NPB) 0,4 mmol/L em tampão fosfato 25 mmol/L, pH 7, sendo o produto da reação o *p*-nitrofenol (*p*NP) monitorado espectrofotometricamente utilizando um comprimento de onda de 400 nm em cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm.

### 5.9.6 Atividade da enzima solúvel (livre)

Para a determinação da atividade enzimática da enzima solúvel foi previamente obtida uma taxa de consumo (hidrólise) do *p*NPB a partir da construção de uma curva de calibração com diferentes concentrações de *p*NP. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1  $\mu$ mol de *p*NPB por minuto em pH 7 à 25 °C, obtendo-se um valor de 3 U/mL. A determinação da atividade da enzima solúvel (livre) e das alíquotas do sobrenadante antes e após o processo de imobilização da enzima no suporte foi calculada de acordo com a **Equação 1**:

$$A_t = \frac{\alpha \cdot f_c \cdot V_r \cdot D}{V_{enzima}}$$

**Equação 1.** Atividade da enzima livre.

Em que:

$A_t$  = Atividade enzimática (U/mL);

$\alpha$  = (coeficiente angular da curva Abs x t(min) para a solução da enzima – coeficiente angular da curva Abs x t(min) para o branco (abs/min);

$f_c$  = fator da curva de calibração do *p*NP;

$V_r$  = volume de reação (mL);

D = diluição da amostra;

$V_{enzima}$  = volume da solução de enzima (mL).

### 5.9.7 Atividade hidrolítica dos derivados ( $At_{derivado}$ )

Nestas determinações, a reação foi conduzida em reator de 30 mL à temperatura ambiente sob contínua agitação, sendo a mesma iniciada com a adição de uma massa pré-estabelecida do biocatalisador. A hidrólise do *p*NPB é monitorada retirando-se alíquotas de 2 mL do meio reacional em diferentes tempos de reação lendo-se a absorbância da solução no espectrofotômetro nas condições citadas anteriormente. O tempo de monitoramento da reação estabelecido para esta determinação foi de 12 minutos. A atividade hidrolítica do derivado foi dada em unidades por grama de biocatalisador ( $U_{pNPB}/g_{gel}$ ) de acordo com a **Equação 2**:

$$At_{derivado} = \frac{\alpha \cdot f_c \cdot V_r}{m_{derivado}}$$

**Equação 2.** Atividade hidrolítica dos derivados.

Em que:

$At_{derivado}$  (ou Atividade aparente) é a atividade enzimática do derivado ( $U_{pNPB}/g_{gel}$ );

$\alpha$  (coeficiente angular da curva  $A \times t(\text{min})$  para o derivado – coeficiente angular da curva  $A \times t(\text{min})$  para o branco);

$f_c$  é o fator da curva de calibração do *p*-nitrofenol (*p*NP);

$V_r$  é o volume de reação (mL);

$m_{derivado}$  é a massa de derivado utilizada (g).

### 5.9.8 Determinação da atividade recuperada ( $At_{rec.}$ ) e do rendimento de imobilização ( $\%R_I$ )

O rendimento de imobilização  $R_I$  (%), foi calculado medindo-se a diferença entre a atividade hidrolítica do sobrenadante (enzima solúvel) antes ( $At_0$ ) e após ( $At_f$ ) imobilização, de acordo com a **Equação 3**:

$$R_I (\%) = \frac{At_0 - At_f}{At_0} * 100$$

**Equação 3.** Rendimento de imobilização.

Neste trabalho, a atividade recuperada ( $A_R$ ) foi definida como sendo a razão entre atividade hidrolítica aparente (ou atividade do derivado), obtida pela medida direta da atividade hidrolítica do derivado ( $At_d$ ) e a atividade teórica do derivado, de acordo com a

**Equação 4:**

$$At_{rec.} = \frac{At_{derivado}}{At_{teórica}} * 100$$

**Equação 4.** Atividade recuperada.

Em que:

$At_{derivado}$ : atividade hidrolítica no derivado ( $U_{pNPB}/g_{gel}$ );

$At_{teórica}$ : atividade teórica do derivado ( $U_{pNPB}/g_{gel}$ ).

A atividade teórica ( $At_{teórica}$  do derivado foi definida como sendo o produto da carga enzimática oferecida ou atividade oferecida ( $At_{oferecida}$ ) em  $U_{pNPB}/g_{suporte}$  pelo rendimento de imobilização ( $R_I$ ), de acordo com a **Equação 5:**

$$At_{teórica} = At_{oferecida} * R_I$$

**Equação 5.** Atividade teórica.

## 5.10 Procedimento para calcular excesso enantiomérico, conversão e razão enantiomérica

Os cálculos dos excessos enantioméricos dos produtos obtidos da biorredução da indanona foram realizados através das análises dos cromatogramas obtidos por CLAE, mais especificamente das análises das áreas dos picos referentes ao indanol de acordo com as seguintes equações:

$$e.e.(%) = \frac{\text{área do enantiômero majoritário} - \text{área do enantiômero minoritário}}{\text{área do enantiômero majoritário} + \text{área do enantiômero minoritário}} * 100\%$$

**Equação 6.** Cálculo de excesso enantiomérico relacionado à área.

As análises das conversões do substrato indanona utilizado na biorredução foram realizadas por intermédio das curvas de calibração. As substâncias utilizadas como padrão

foram analisadas por CLAE e os dados referentes às áreas foram utilizados para elaborar as curvas de calibração no Excel.

Os cálculos dos excessos enantioméricos de substrato remascente e produto nas reações de hidrólise do *rac*-acetato de indanila e acetilação do *rac*-indanol foram realizados utilizando a **Equação 6**, através das análises dos cromatogramas obtidos por CG referente as áreas dos picos.

As conversões nas reações de resolução cinética enzimática foram obtidas através da **Equação 7**:

$$c (\%) = \frac{e.e._s}{e.e._s + e.e._p} \times 100$$

**Equação 7.** Cálculo de conversão para reações de resolução cinética enzimática.

No qual  $e.e._s$  é o excesso enantiomérico do substrato e  $e.e._p$  é o excesso enantiomérico do produto.

Os resultados de razão enantiomérica foram obtidos através da **Equação 8**:

$$E = \frac{\ln[1-c(1+e.e._p)]}{\ln[1-c(1-e.e._p)]}$$

**Equação 8.** Equação da razão enantiomérica.

## REFERÊNCIAS

- AIRES-BARROS, M. R. Biocatálise em solventes orgânicos. **Boletim de Biotecnologia**. Disponível em: <dequim.ist.utl.pt/bbio/72/pdf/BiocatSolOrg.pdf>. Acesso em: 01 abr. 2013.
- ALMEIDA, R. V. Clonagem e expressão do gene de uma lipase de *Pyrococcus furiosus* em *Escherichia coli*. 2001. 109 p. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Química) – COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.
- ANDRADE, L.H. **Biocatálise**. São Paulo, USP, p. 1-12, 2008.
- ARAÚJO, D. M. F.; VIEIRA, G. A. B.; MATTOS, M. C.; LEMOS, T. L. G.; OLIVEIRA, M. C. F.; MELO, V. M. M.; GONZALO, G.; GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; GOTOR, V. Chemoenzymatic preparation of a biologically active naphthoquinone from *Tabebuia impetiginosa* using lipases or alcohol dehydrogenases. **J. Mol. Cat. B: Enzym.** v. 61, p. 279-283, 2009.
- BASAK, A.; NAG, A.; BHATTACHARYA, G.; MANDAL, S.; NAG, S. Chemoenzymatic synthesis of anti-inflammatory drugs in enantiomerically pure form. **Tetrahedron: Asymmetry**. v. 11, p. 2403-2407, 2000.
- BEVILAQUA, J. V.; PINTO, J. C.; LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J.; ALVES, T. L. M.; FREIRE, D. M. G. Enzymatic hydrolysis by immobilized lipase applied to a new prototype anti-asthma drug. **Biochem. Engin. J.** v. 21, p. 103-110, 2004.
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B.; COELHO, R. R. R. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. 1. ed., Rio de Janeiro: Interciência, 2008, 505 p.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRAVO, P. A. F.; NASSIF, M. C. Doença de parkinson: terapêutica atual e avançada. **Informa**. v. 18, p. 25-29, n. 9-10, 2006.
- CANILHA, L.; CARVALHO, W.; ALMEIDA, S. J. B. Biocatalisadores imobilizados: uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnol., Ciência e Desenvol.** v. 36, p. 48-57, 2006.
- CARO, Y.; TORRADO, M. MASAGUER, C. F.; RAVIÑA, E.; PADÍN, F.; BREA, J.; LOZA, M. I. Chemoenzymatic synthesis and binding affinity of novel (*R*)- and (*S*)-3-aminomethyl-1-tetralones, potential atypical antipsychotics. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 14, p. 585-589, 2004.
- CONCEIÇÃO, G. J. A.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R. Homochiral (1*S*,2*R*)-1,2-indandiol from asymmetric reduction of 1,2-indanedione by resting cells of the yeast *Trichosporon cutaneum*. **Tetrahedron: Asymmetry**. v. 14, p. 2327-2330, 2003.

COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Quím. Nova.** v. 22, p. 863-873, 1999.

CHOW, K.; FANG, W, K.; CORPUZ, E. G.; GIL, D. W.; GARST, M. E. **Substituted fluoroethyl ureas as alpha 2 adrenergic agents.** UNITED STATES PATENT APPLICATION. US n. PI 20080255239, 16 out. 2008.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Quím. Nova.** v. 27, p. 623-630, 2004.

DE CONTI, R.; RODRIGUEZ, J. A.; MORAN, J. S. Biocatálise: avanços recentes. **Quím. Nova.** v. 24, p. 672-676, 2001.

DRUKARCH, B.; VAN MUISWINKEL, F. L. Drug treatment of Parkinson's disease. Time for phase II. **Biochem. Pharmacol.** v. 1, p. 1023-1031, 2000.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry.** 5. ed.; Berlin: Springer-Verlag, 2004. 468 p.

FERNÁNDEZ-LORENTE, R.; PALOMO, J. M.; CABRERA, Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Improved catalytic properties of immobilized lipases by the presence of very low concentrations of detergents in the reaction medium. **Biotechnology and Bioengineering.** v. 97, p. 242-250, 2007.

FERNANDÉZ, R.; ROS, A; MAGRIZ, A.; DIETRICH, H.; LASSALETTA, J. M. Enantioselective synthesis of cis- $\alpha$ -substituted cycloalkanols and trans-cycloalkyl amines thereof. **Tetrahedron: asymmetric.** v. 63, p. 6755-6763, 2007.

FILICE, M.; MARCIELLO, M.; BETANCOR, L.; CARRASCOSA, A.V.; GUISÁN, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G. Hydrolysis of Fish Oil by Hyperactivated *Rhizomucor miehei* Lipase Immobilized by Multipoint Anion Exchange. **Biotechnol. Progress.** v. 27, p. 961-968, 2011.

FITZPATRICK, P. A.; KLIBANOV, A. M. How Can the Solvent Affect Enzyme Enantioselectivity?. **J. Am. Chem. Soc.** v. 113, p. 3166-3171, 1991.

FUJIMOTO, Y.; EGUCHI, T.; MURASAKI, C.; OHASHI, Y.; KAKINUMA, K.; TAKAGAKI, H.; ABE, M.; INAZAWA, K.; YAMAZAKI, K.; IKEKAWA, N.; YOSHIKAWA, O.; IKEKAWA, T. Studies on the structure and stereochemistry of cytotoxic furanonaphthoquinones from *Tabebuia impetiginosa*: 5- and 8-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)naphtho[2,3-b]furan-4,9-diones. **J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1** v. 1, p. 2323-2327, 1991.

GONZÁLEZ-SABIN, J.; GOTOR, V. REBOLLEDO, F. CAL-B-catalyzed resolution of some pharmacologically interesting  $\beta$ -substituted isopropylamines. **Tetrahedron: Asymmetry.** v. 13, p. 1315-1320, 2002.

GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. Lipases: useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. **J. Mol. Cat. B: Enzym.** v. 40, p. 111-120, 2006.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Cur. Opin. in Biotechnol.** v. 13, p. 390-397, 2002.

JURCEK, O.; WIMMEROVA, M.; WIMMER, Z. Selected chiral alcohols: enzymic resolution an reduction of convenient substrates. **Coord. Chem. Reviews.** v. 252, p. 767-781, 2008.

KAMAL, A.; KHANNA, G. B. R.; KRISHNAJI, T.; RAMU, R. A new facile chemoenzymatic synthesis of levamisole. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 15, p. 613-615, 2005.

KAZLAUSKAS, R. J.; WEISSFLOCH, A. N. E.; RAPPAPORT, A. T.; CUCCIA, L. A. A Rule to Predict Which Enantiomer of a Secondary Alcohol Reacts Faster in Reactions Catalyzed by Cholesterol Esterase, Lipase from *Pseudomonas cepacia*, and Lipase from *Candida rugosa*. **J. Org. Chem.** v. 56, p. 2656–2665, 1991.

KIM, M. J.; KIM, H. M.; KIM, D.; AHN, Y.; PARK, J. Dynamic kinetic resolution of secondary alcohols by enzyme–metal combinations in ionic liquid. **Green Chem.** v. 6, p. 471-474, 2004.

KULISZEWSKA, E.; HANBAUER, M.; HAMMERSCHMIDT, F. Preparation of  $\alpha$ -Aminobenzylphosphonic Acids with a Stereogenic Quaternary Carbon Atom via Microscopically Configurationally Stable  $\alpha$ -Aminobenzyllithiums. **Chem. Eur. J.** v. 14, p. 8603-8614, 2008.

KURBANOGLU, E. B.; ZILBEYAZ, K.; KURBANOGLU, N. I. *Cryptococcus laurentii* as a new biocatalyst for the asymmetric reduction of substituted acetophenones. **Tetrahedron: asymmetric.** v. 22, p. 345-350, 2011.

LEE, S. H.; KIM, I. S.; LI, Q. R.; DONG, G. R.; JEONG, L. S.; JUNG, Y. H. Stereoselective Amination of Chiral Benzylic Ethers Using Chlorosulfonyl Isocyanate: Total Synthesis of (+)-Sertraline. **J. Org. Chem.** v. 76, p. 10011-10019, 2011.

LI, J. J.; LIMBERAKIS, C.; PFLUM, D. A. **Modern Organic Synthesis in the Laboratory: a collection of standard experimental procedures.** 3. ed.; New York: Oxford University Press, Inc, 2007. 198 p.

LILJEBLAD, A.; KANERVA, L.T. Biocatalysis a profound tool in the preparation of highly enantiopure amino acids. **Tetrahedron; asymmetric.** v. 62, p. 5831-5854, 2006.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enz. Microb. Technol.** v. 40, p. 1451-1463, 2007.

MOGENSEN, J. E.; SEHGAL, P.; OETZEN, D. E. Activation, Inhibition, and Destabilization of *Thermomyces lanuginosus* Lipase by Detergents. **Biochemistry**. v. 44, p. 1719-1730, 2005.

MOUAD, A. M. **Biocatalisadores de origem marinha (algas, bactérias e fungos) para redução estereosseletiva de cetonas**. 2009. 85f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MÜNCHAU, A.; BHATIA, K. P. Pharmacological treatment of Parkinson's disease. **Postgrad Med. J.** v. 76, p. 602-610, 2000.

NAKAMURA, K.; KINOSHITA, M.; OHNO, A. Structure of solvent affects enantioselectivity of lipase-catalyzed transesterification. **Tetrahedron**. v. 51, p. 8799-8808, 1995.

PATEL, R. N. Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. **Coordination Chem. Reviews**. v. 252, p. 659-701, 2008.

PATEL, R. N. Biocatalytic Synthesis of Chiral Pharmaceutical Intermediates. **Food Technol. Biotechnol.** v. 42, p. 305-325, 2004.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE P. K. **Distúrbios neurodegenerativos**. Farmacologia. 5. ed.; Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2004. 571 p.

SAID, S.; PIETRO, C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. 1. ed.; Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. 416 p.

SAKYA, S. M.; LIN, J.; LIU, K. K. Synthetic Approaches to the 2005 New Drugs. **Mini-Rewies in Medicinal Chemistry**. v. 7, p. 429-450, 2007.

SCHAFFER, F. HARMS, H. ROHWERDER, T. MÜLLER, R. H. Microbial synthesis of chiral alcohols using a novel monooxygenase. **J. of Biotechnol.** v. 150. p. 356, 2010.

SHIBATANI, T.; OMORI, K.; AKATSUKA, H.; KAWAI, E.; MATSUMAE, H. Enzymatic resolution of diltiazem intermediate by *Serratia marcescens* lipase: molecular mechanism of lipase secretion and its industrial application. **J. Mol. Cat. B: Enzym.** v. 10, p. 141-149, 2000.

SILVERMAN, R. B. **The organic chemistry of enzyme-catalyzed reactions**. San Diego: Academic Press, 2000. 717 p.

SINGH, A.; GOEL, Y.; RAI, A. K.; BANERJEE, U. C. Lipase catalyzed kinetic resolution for the production of (S)-3-[5-(4-fluoro-phenyl)-5-hydroxy-pentanoyl]-4-phenyl-oxazolidin-2-one: An intermediate for the synthesis of ezetimibe. **J. Mol. Cat. B: Enzym.** v. 85-86, p. 99-104, 2013.

SOLARES, L. F.; BRIEVA, R.; QUIRÓS, M.; LLORENTE, I.; BAYOD, M.; GOTOR, V. Enzymatic resolution of a quaternary stereogenic centre as the key step in the synthesis of (S)-(+)-citalopram. **Tetrahedron: Asymmetry**. v. 15, p. 341-345, 2004.

SOUZA, M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Quím. Nova.** v. 27, p. 308-312, 2003.

TAKAÇ, S.; BAKKAL, M. Impressive effect of immobilization conditions on the catalytic activity and enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase toward *S*-Naproxen production. **Process Biochem.** v. 42, p. 1021-1027, 2007.

TAO, J.; MCGEE, K. Development of a continuous enzymatic process for the preparation of (R)-3-(4-fluorophenyl)-2-hidroxy propionic acid. **Org. Process Res. Dev.** v. 6, p. 520-524, n. 4, 2002.

UITERWEERD, P. G. H.; VAN DER SLUIS, M.; KAPTEIN, B.; DE LANGE, B.; KELLOGG, R. M.; BROXTERMAN, Q. B. (*S*)-1-Aminoindane: synthesis by chirality transfer using (*R*)-phenylglycine amide as chiral auxiliary. **Tetrahedron: asymmetric.** v. 14, p. 3479-3485, 2003.

URUYAMA, S.; MUTOU, E.; INAGAKI, A.; OKADA, K.; SUGISAKI, S. *WO2006030739(A1)*, 2006.

VAN RANTWIJK; SHELDON, R. A. Enantioselective acylation of chiral amines catalysed by serine hydrolases. **Tetrahedron.** v. 60, p. 501-519, 2004.

WEI, Z. L.; LI, Z. Y.; LIN, G. Q. Baker's yeast mediated mono-reduction of 1,3-cyclohexanediones bearing two identical C(2) substituents. **Tetrahedron: Asymmetry.** v. 12, p. 229-233, 2001.

WEINREB, O.; AMIT, T.; BAR-AM, O.; YODIM, M. B. H. Rasagiline: A novel anti-Parkinsonian monoamine oxidase-B inhibitor with neuroprotective activity. **Progress in Neurob.** v. 92, p. 330-344, 2010.

YAMASHITA, S.; MASE, N.; TAKABE, K. Chemoenzymatic total synthesis and determination of the absolute configuration of (*S*)-nebracetam. **Tetrahedron: Asymmetry.** v. 19, p. 2115-2118, 2008.

ZEYNIZADEH, B.; BEHYAR, T. Fast and Efficient Method for Reduction of Carbonyl Compounds with NaBH<sub>4</sub> /Wet SiO<sub>2</sub> Under Solvent Free Condition. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 16, p. 1200-1209, n. 6, 2005.

### DADOS ESPECTROSCÓPICOS DA INDANONA (ANEXO 1)

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz):** δ (ppm) 2,7 (m, 2H<sub>c</sub>);

3,1 (m, 2H<sub>b</sub>); 7,4 (td, *J* 15,6 Hz, 1H<sub>g</sub>); 7,5 (dd, *J* 7,8 Hz, 1H<sub>i</sub>);

7,6 (td, *J* 15,9 Hz, 1H<sub>h</sub>); 7,8 (dd, *J* 8,1 Hz, 1H<sub>f</sub>)

**RMN <sup>13</sup>C-BB (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) 25,83 (C<sub>c</sub>);

36,25 (C<sub>b</sub>); 123,75 (C<sub>g</sub>); 126,73 (C<sub>i</sub>); 127,31 (C<sub>f</sub>);

134,62 (C<sub>h</sub>); 137,13 (C<sub>e</sub>); 155,19 (C<sub>d</sub>); 207,9 (C<sub>a</sub>)

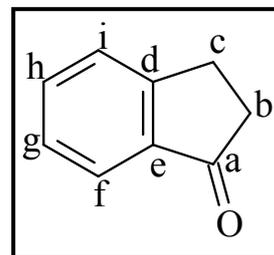
**DEPT 135° (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) 25,83 (C<sub>c</sub>);

36,25 (C<sub>b</sub>); 123,75 (C<sub>g</sub>); 126,73 (C<sub>i</sub>); 127,31 (C<sub>f</sub>); 134,62 (C<sub>h</sub>)

**EM (*m/z*):** 132 (M<sup>+</sup>, 100%), 115 (2%), 104 (88%), 89 (5%), 78 (40%), 63 (10%), 51 (25%)

**I.V. (NaCl) (ν-cm<sup>-1</sup>):** 1700 (ν C=O, def. axial); 1599 e 1585 (ν C=C, def. angular);

769 (ν C-H arom., def. axial)



### DADOS ESPECTROSCÓPICOS DO INDANOL (ANEXO 2)

**RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz):** δ (ppm) 1,9 (m, 1H<sub>b</sub>);

2,4 (m, 1H<sub>b</sub>); 2,8 (m, 1H<sub>c</sub>); 3,0 (m, 1H<sub>c</sub>); 5,1 (dd, *J* 12,35 Hz,

1H<sub>a</sub>); 7,2 (m, 3H<sub>i,h,g</sub>); 7,4 (dd, *J* 7,7 Hz, 1H<sub>f</sub>)

**RMN <sup>13</sup>C-BB (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ (ppm) 29,92 (C<sub>c</sub>);

35,96 (C<sub>b</sub>); 76,47 (C<sub>a</sub>); 124,36 (C<sub>h</sub>); 125,00 (C<sub>g</sub>);

126,80 (C<sub>i</sub>); 128,40 (C<sub>f</sub>); 143,44 (C<sub>d</sub>); 145,13 (C<sub>e</sub>)

**DEPT 135° (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ (ppm) 29,92 (C<sub>c</sub>);

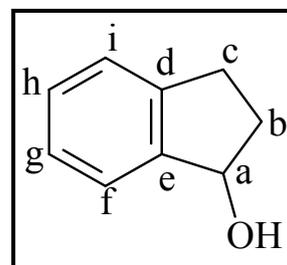
35,96 (C<sub>b</sub>); 76,47 (C<sub>a</sub>); 124,36 (C<sub>h</sub>); 125,00 (C<sub>g</sub>);

126,80 (C<sub>i</sub>); 128,40 (C<sub>f</sub>)

**EM (*m/z*):** 134 (M<sup>+</sup>, 57%), 133 (100%), 115 (44%), 105 (23%), 91 (19%), 77 (17%), 63 (8%)

**I.V. (NaCl) (ν-cm<sup>-1</sup>):** 3209 (ν O-H, def. axial); 1475 e 1455 (ν C=C, def. angular);

1326 e 1053 (ν C-O, deg. angular); 760 e 738 (ν C-H arom., def. axial)



### DADOS ESPECTROSCÓPICOS DO ACETATO DE INDANILA (ANEXO 3)

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):**  $\delta$  (ppm) 2,0 (s,  $1\text{H}_a$ );  
2,1 (m,  $1\text{H}_d$ ); 2,5 (m,  $1\text{H}_d$ ); 2,9 (m,  $1\text{H}_e$ ); 3,1 (m,  $1\text{H}_e$ );  
6,2 (dd,  $J$  12,00 Hz,  $1\text{H}_c$ ); 7,2 (m,  $3\text{H}_{kji}$ ); 7,4 (dd,  $J$  7,9 Hz,  $1\text{H}_h$ )

**RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) 21,51 ( $\text{C}_a$ );  
30,40 ( $\text{C}_e$ ); 32,50 ( $\text{C}_d$ ); 78,57 ( $\text{C}_c$ ); 125,01 ( $\text{C}_j$ );

125,75 ( $\text{C}_i$ ); 126,91 ( $\text{C}_k$ ); 129,15 ( $\text{C}_h$ ); 141,27 ( $\text{C}_f$ );  
144,62 ( $\text{C}_g$ ); 171,31 ( $\text{C}_b$ )

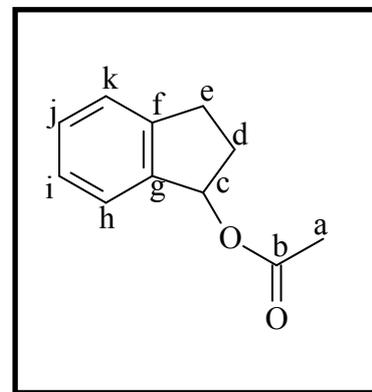
**DEPT  $135^\circ$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) 21,51 ( $\text{C}_a$ );

30,40 ( $\text{C}_e$ ); 32,50 ( $\text{C}_d$ ); 78,57 ( $\text{C}_c$ ); 125,01 ( $\text{C}_j$ );  
125,75 ( $\text{C}_i$ ); 126,91 ( $\text{C}_k$ ); 129,15 ( $\text{C}_h$ )

**EM ( $m/z$ ):** 176 ( $\text{M}^+$ , 2%), 158 (2%), 147 (2%), 133 (16%), 116 (100%), 105 (5%), 91 (7%),  
77 (5%), 63 (5%)

**I.V. ( $\text{NaCl}$ ) ( $\nu\text{-cm}^{-1}$ ):** 1730 ( $\nu$  C=O, def. axial); 1232 ( $\nu$  C-O, def. angular);

1479 e 1462 ( $\nu$  C=C, def. angular); 751 ( $\nu$  C-H arom., def. axial)



### DADOS ESPECTROSCÓPICOS DO AZIDOINDANO (ANEXO 4)

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):**  $\delta$  (ppm) 2,1 (m,  $1\text{H}_b$ );  
2,4 (m,  $1\text{H}_b$ ); 2,9 (m,  $1\text{H}_c$ ); 3,0 (m,  $1\text{H}_c$ ); 4,9 (dd,  $J$  11,7 Hz,  
 $1\text{H}_a$ ); 7,3 (m,  $3\text{H}_{ihg}$ ); 7,4 (dd,  $J$  6,5 Hz,  $1\text{H}_f$ )

**RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) 30,49 ( $\text{C}_c$ );  
32,56 ( $\text{C}_b$ ); 65,93 ( $\text{C}_a$ ); 124,58 ( $\text{C}_h$ ); 125,10 ( $\text{C}_g$ );  
126,88 ( $\text{C}_i$ ); 128,89 ( $\text{C}_f$ ); 140,70 ( $\text{C}_d$ ); 143,67 ( $\text{C}_e$ )

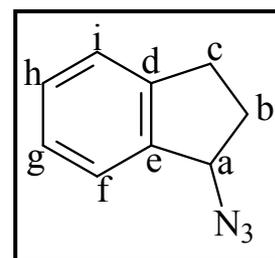
**DEPT  $135^\circ$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) 30,49 ( $\text{C}_c$ );

32,56 ( $\text{C}_b$ ); 65,93 ( $\text{C}_a$ ); 124,58 ( $\text{C}_h$ ); 125,10 ( $\text{C}_g$ );  
126,88 ( $\text{C}_i$ ); 128,89 ( $\text{C}_f$ )

**EM ( $m/z$ ):** 159 ( $\text{M}^+$ , 3%), 130 (43%), 117 (100%), 103 (21%), 91 (12%), 77 (16%)

**I.V. ( $\text{NaCl}$ ) ( $\nu\text{-cm}^{-1}$ ):** 2086 ( $\nu$  N=N=N, def. axial); 1478 e 1479 ( $\nu$  C=C, def. angular);

1235 ( $\nu$  C-N, def. angular); 751 ( $\nu$  C-H arom., def. axial)



### DADOS ESPECTROSCÓPICOS DA INDANAMINA (ANEXO 5)

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):** δ (ppm) 1,7 (m, 1H<sub>b</sub>);

1,8 (s, 2H-NH<sub>2</sub>); 2,5 (m, 1H<sub>b</sub>), 2,8 (m, 1H<sub>c</sub>); 2,95 (m, 1H<sub>c</sub>); 4,4 (dd, *J* 14,8 Hz, 1H<sub>a</sub>); 7,2 (m, 3H<sub>ihg</sub>); 7,35 (dd, *J* 9,0 Hz, 1H<sub>f</sub>)

**RMN <sup>13</sup>C-BB (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) 30,31 (C<sub>c</sub>);

37,33 (C<sub>b</sub>); 57,39 (C<sub>a</sub>); 123,55 (C<sub>h</sub>); 124,89 (C<sub>g</sub>);

126,72 (C<sub>i</sub>); 127,45 (C<sub>f</sub>); 143,30 (C<sub>d</sub>); 147,37 (C<sub>e</sub>)

**DEPT 135° (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) 30,31 (C<sub>c</sub>);

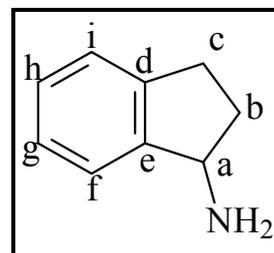
37,33 (C<sub>b</sub>); 57,39 (C<sub>a</sub>); 123,55 (C<sub>h</sub>); 124,89 (C<sub>g</sub>);

126,72 (C<sub>i</sub>); 127,45 (C<sub>f</sub>)

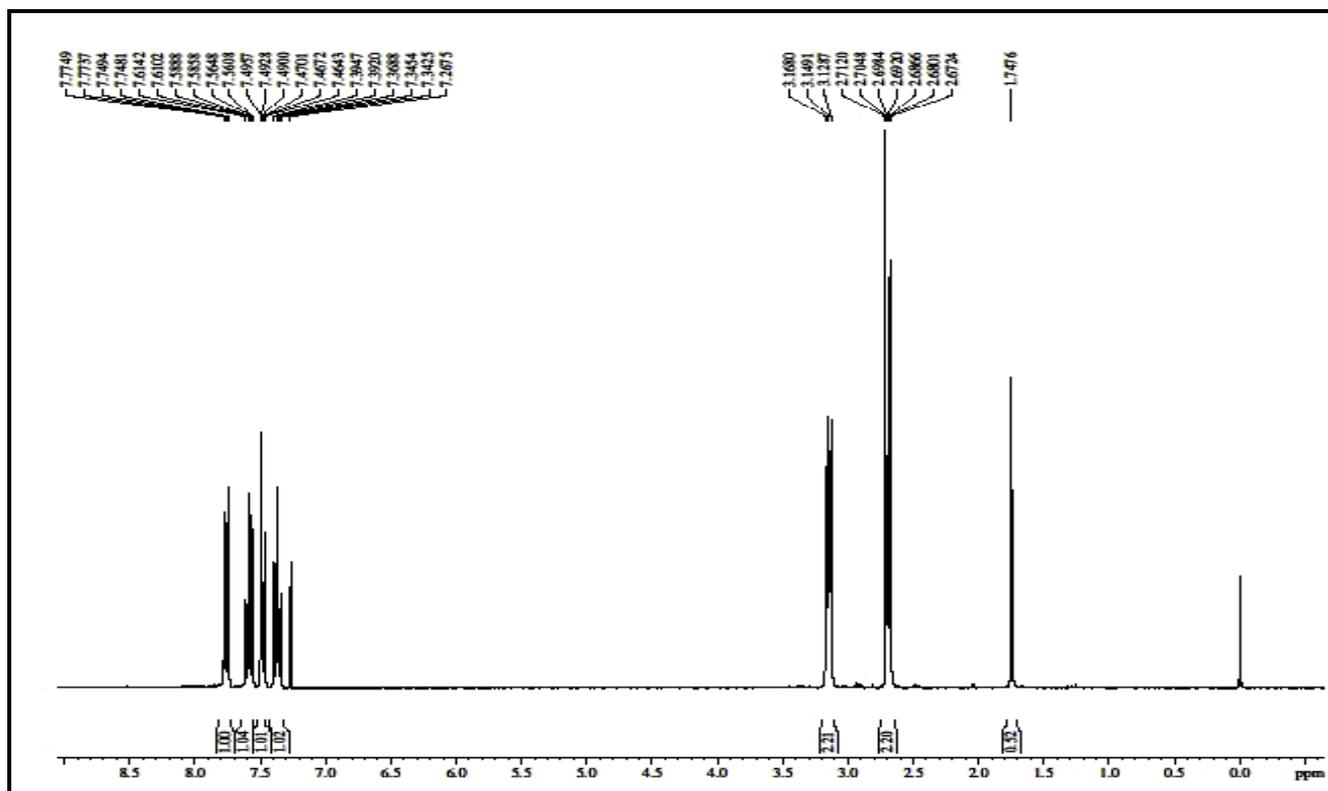
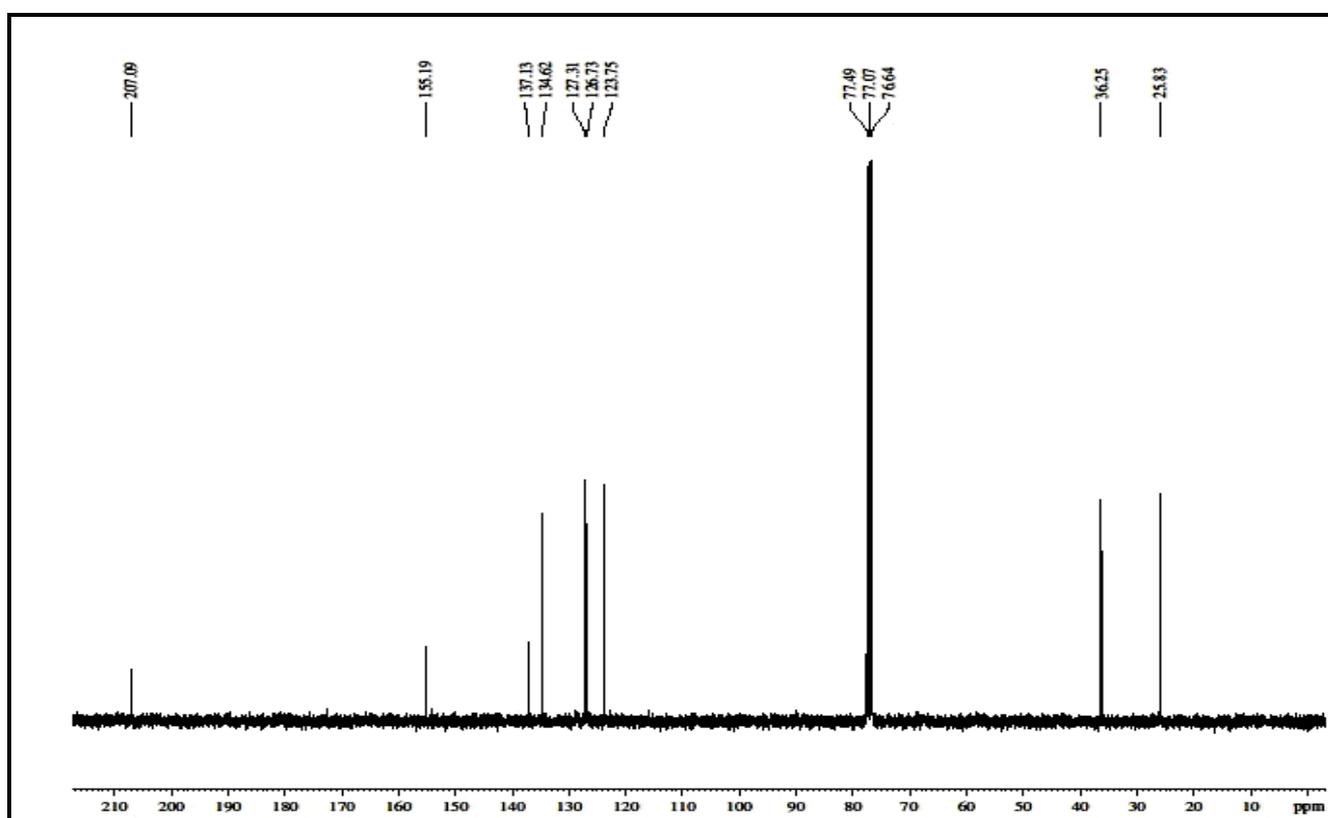
**EM (*m/z*):** 133 (M<sup>+</sup>, 18%), 132 (100%), 116 (38%), 104 (12%), 91 (10%), 77 (12%), 65 (8%)

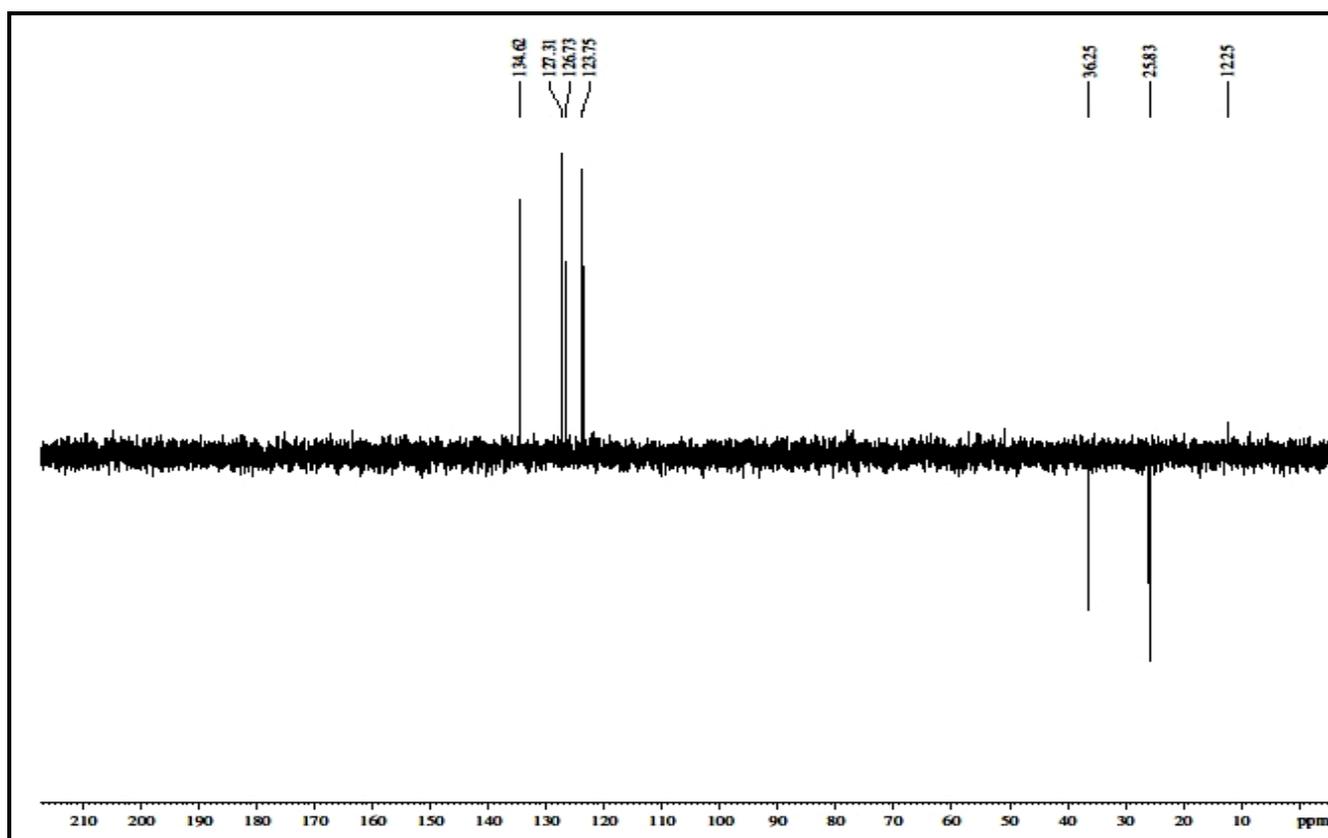
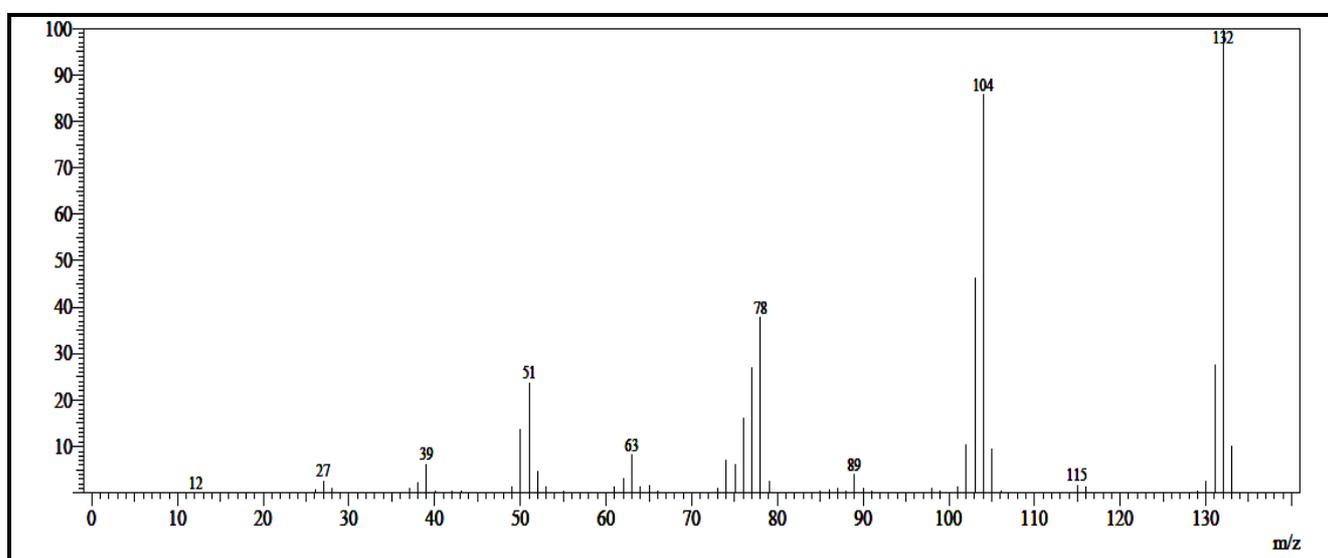
**I.V. (NaCl) (ν-cm<sup>-1</sup>):** 2920 e 2849 (ν NH<sub>2</sub>, def. axial); 1476 e 1457 (ν C=C def. angular);

1059 (ν C-N, def. angular); 740 (ν C-H arom., def. axial)

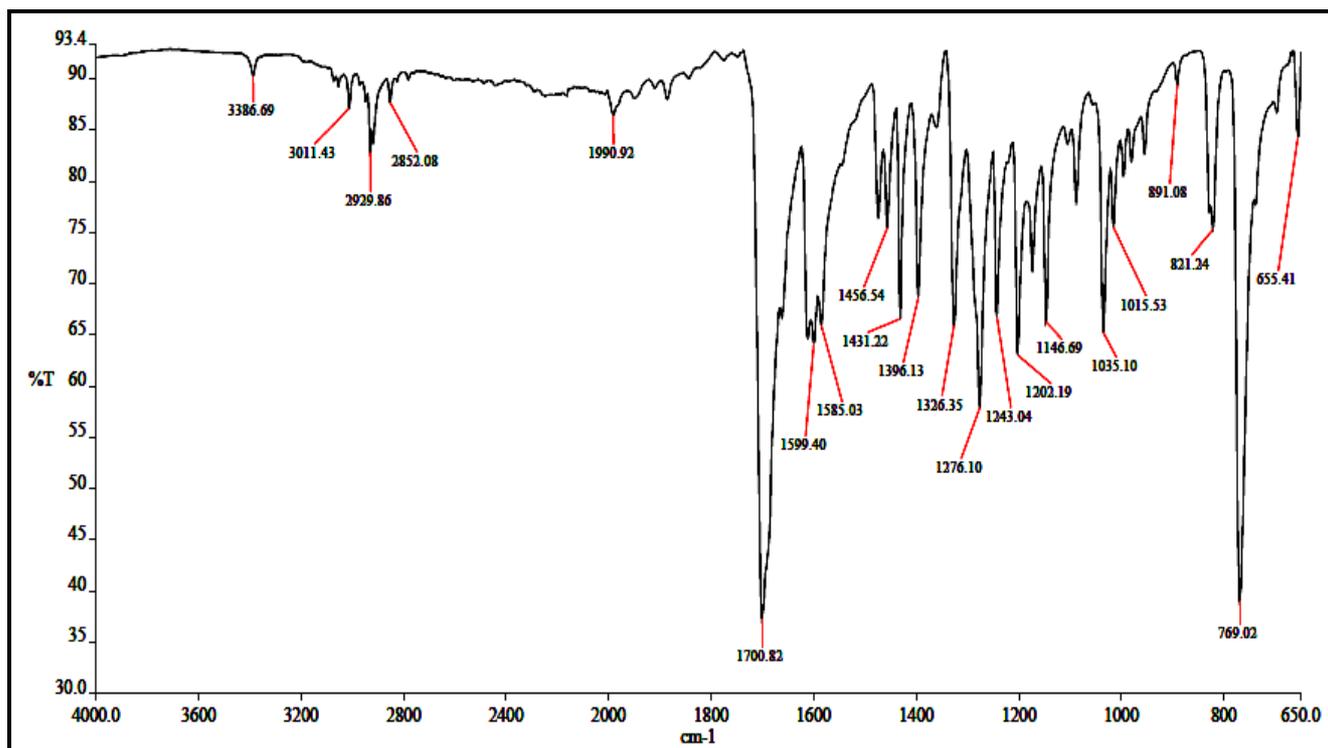


## ANEXO 6

Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da indanona.Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da indanona.

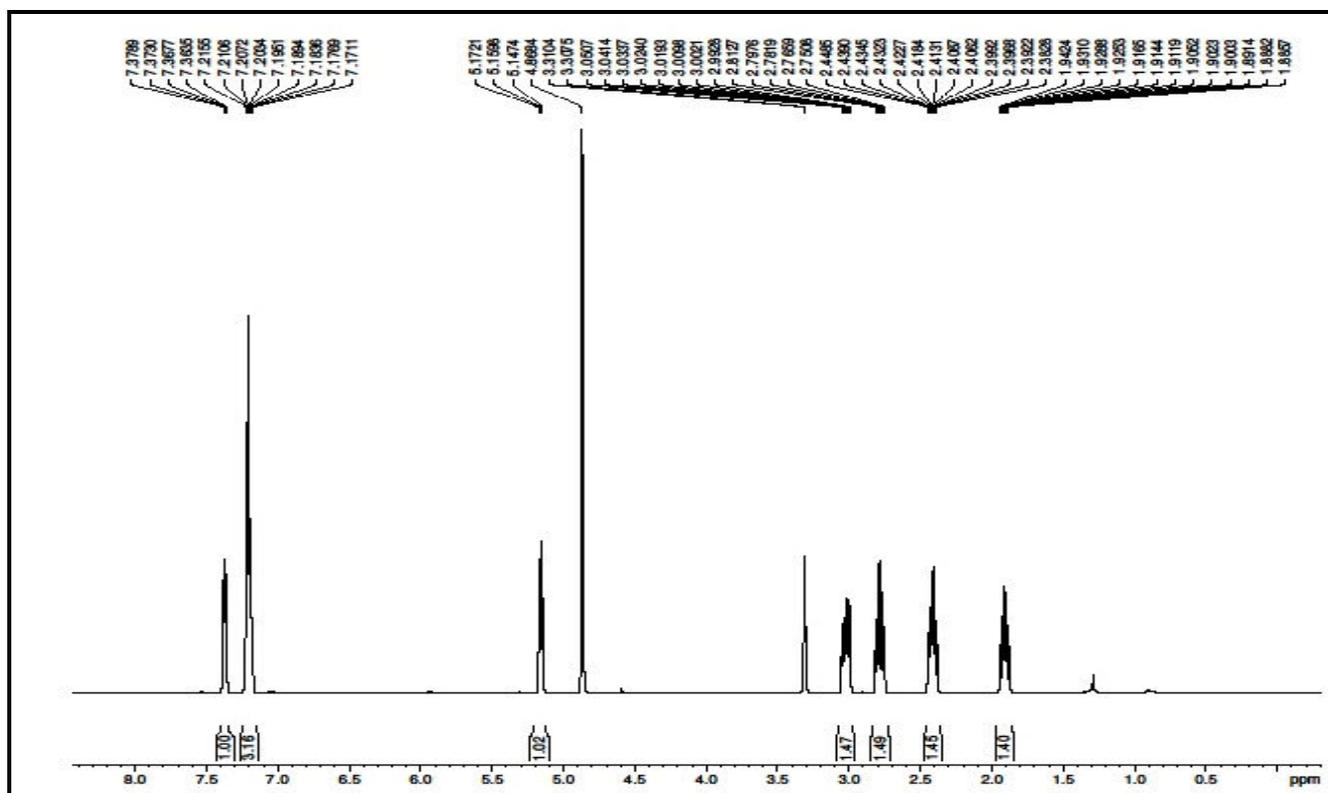
Espectro de DEPT 135° (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da indanona.

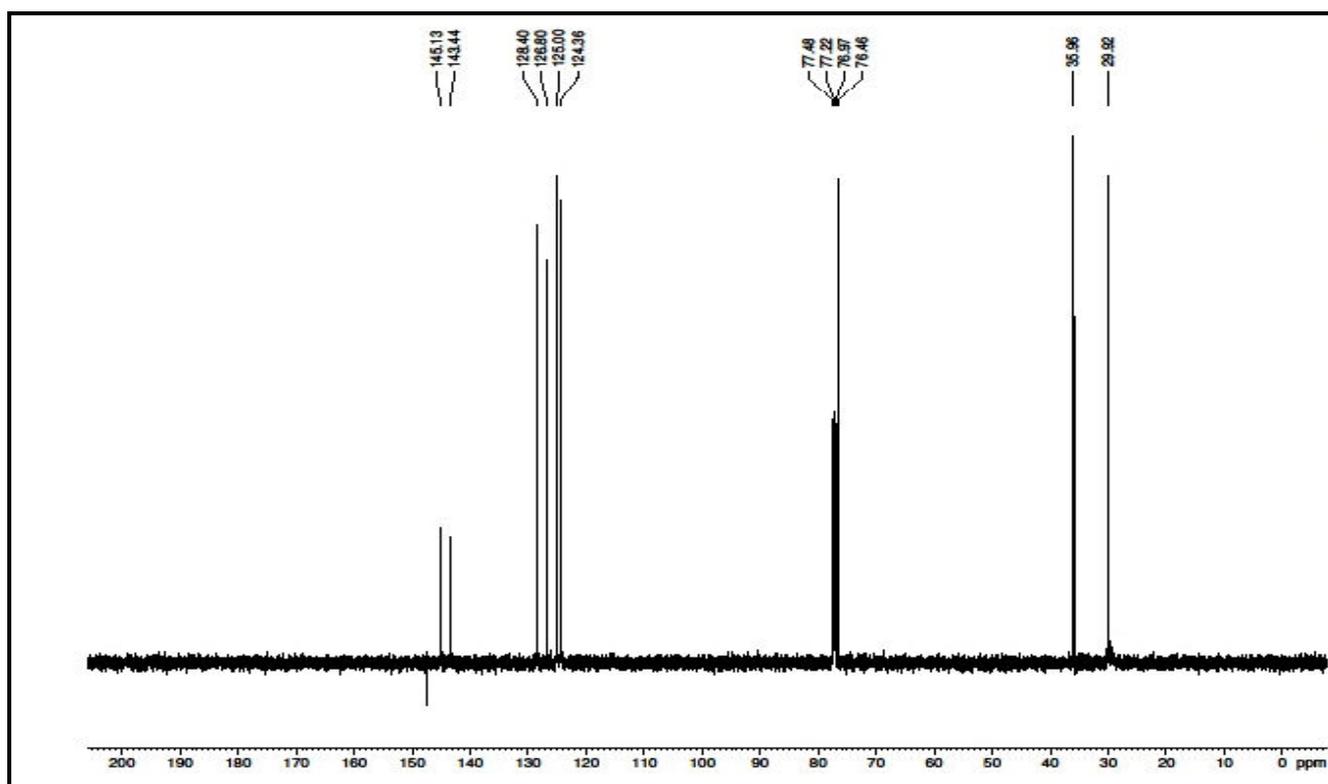
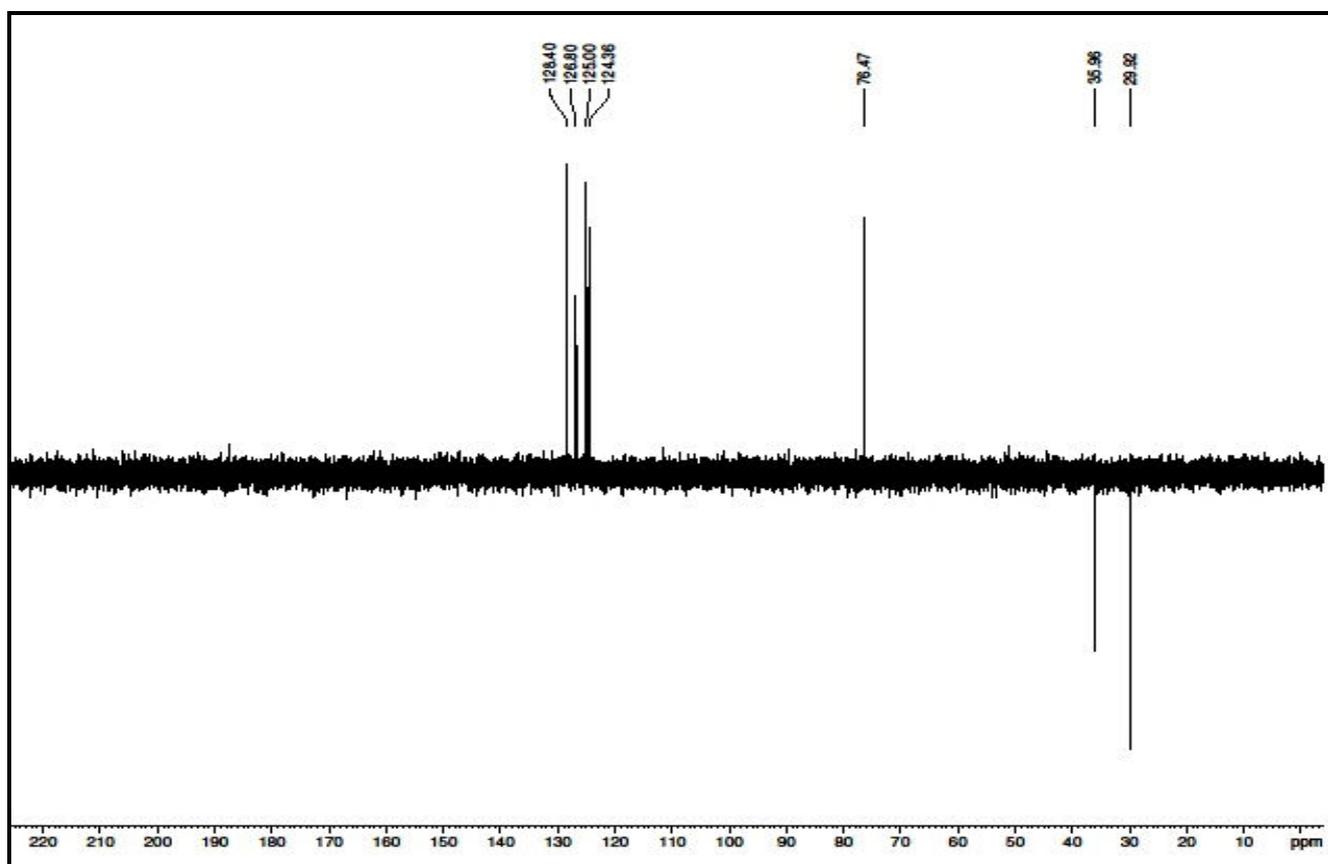
Espectro de massas da indanona.

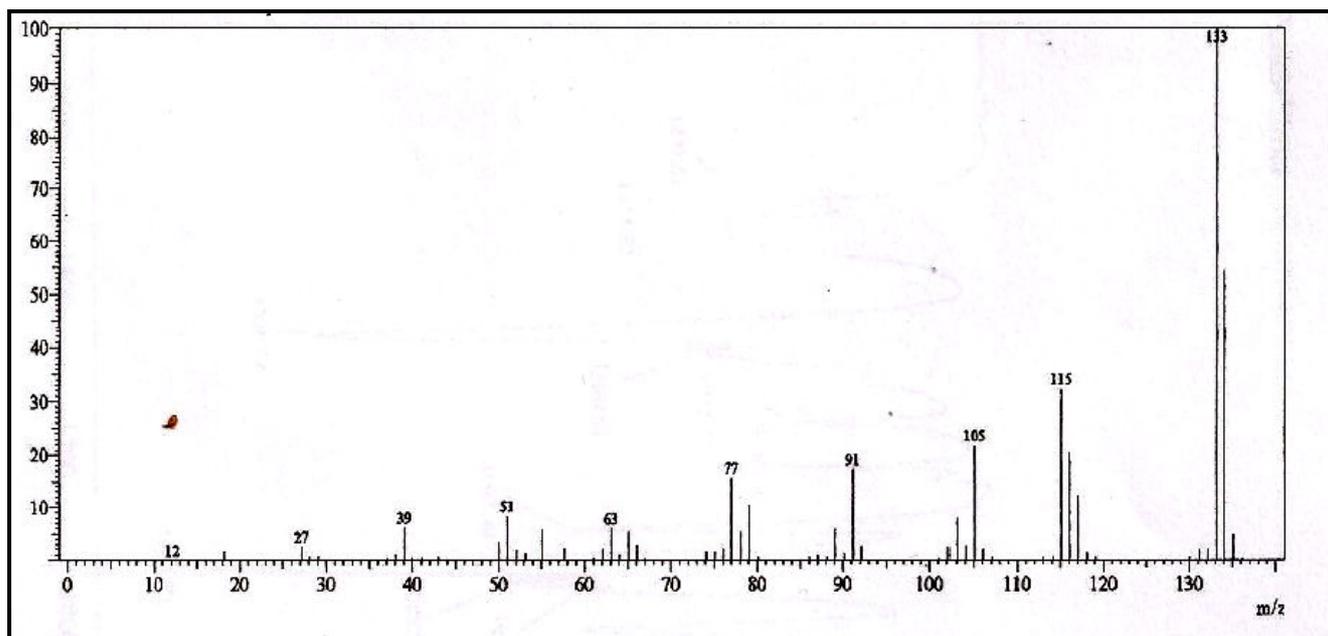


Espectro de I.V. da indanona.

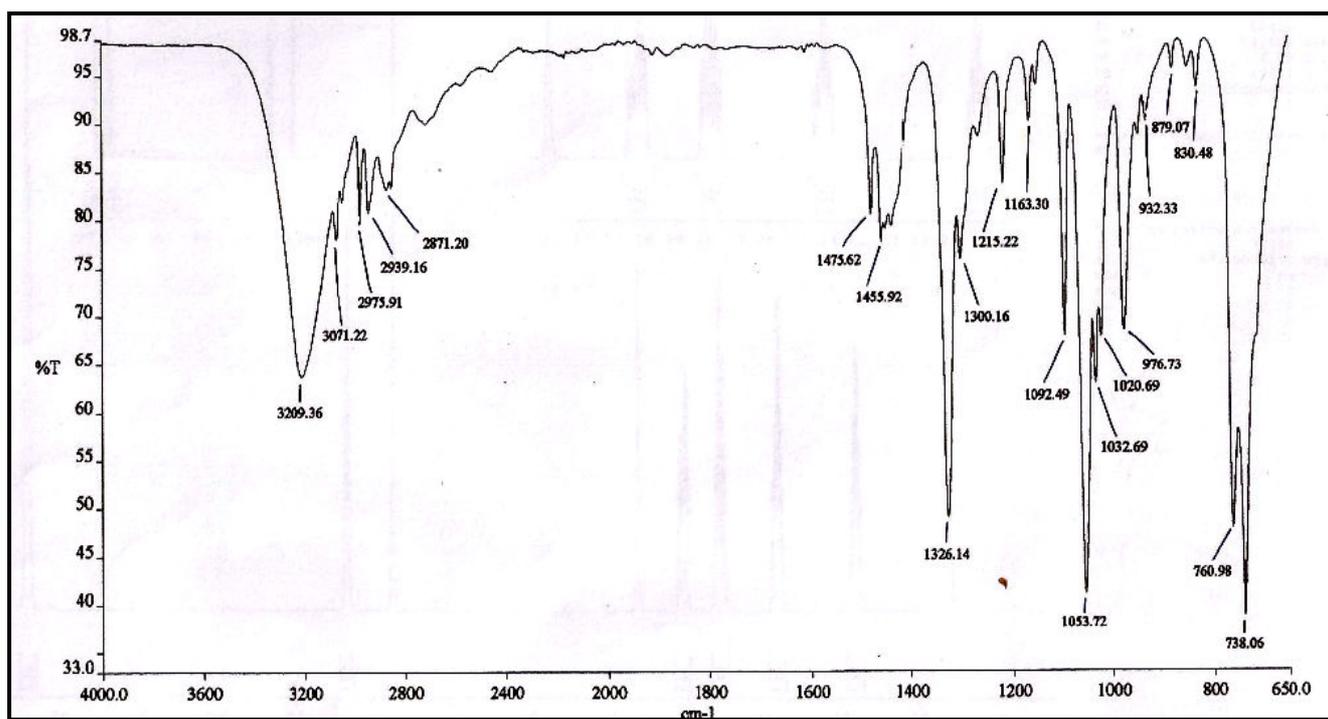
## ANEXO 7

Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do indanol.

Espectro de  $^{13}\text{C}$ -BB (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do indanol.Espectro de DEPT 135° (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do indanol.

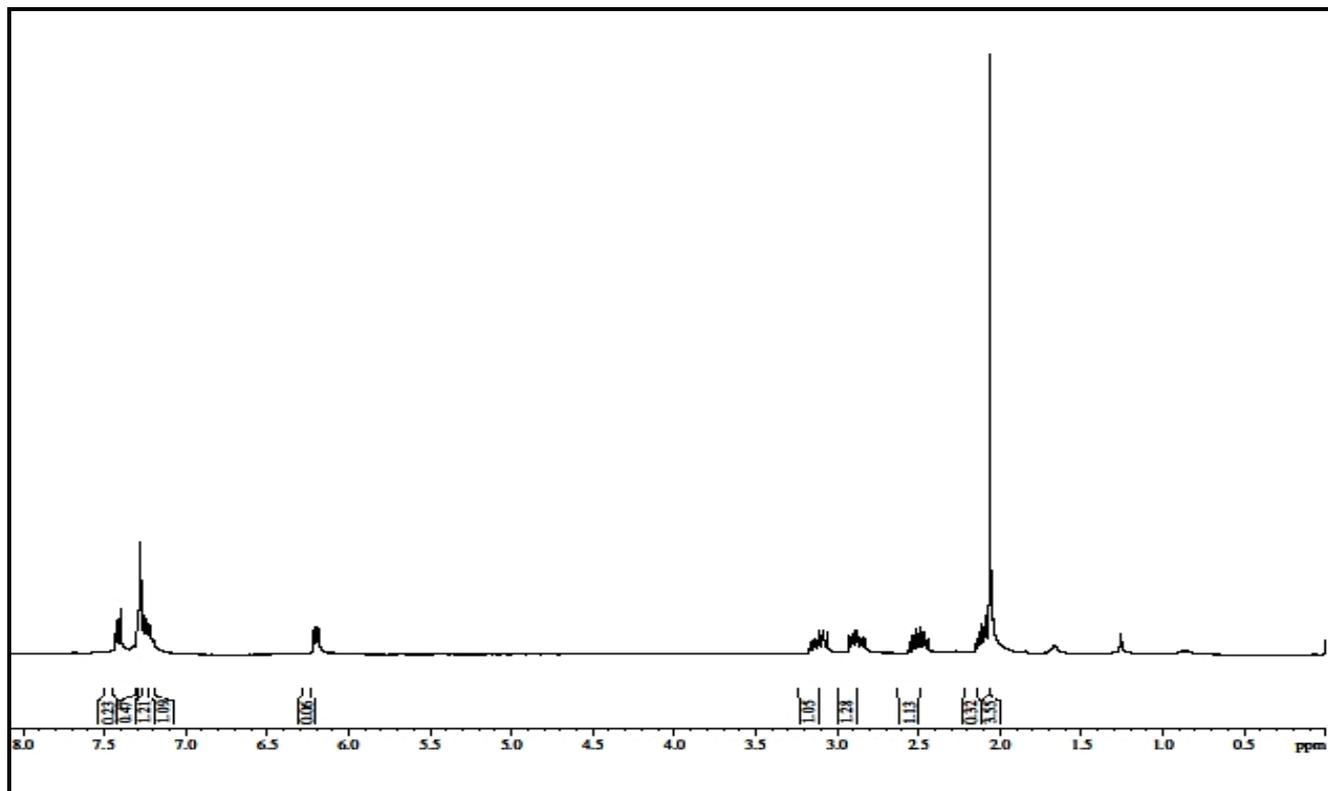
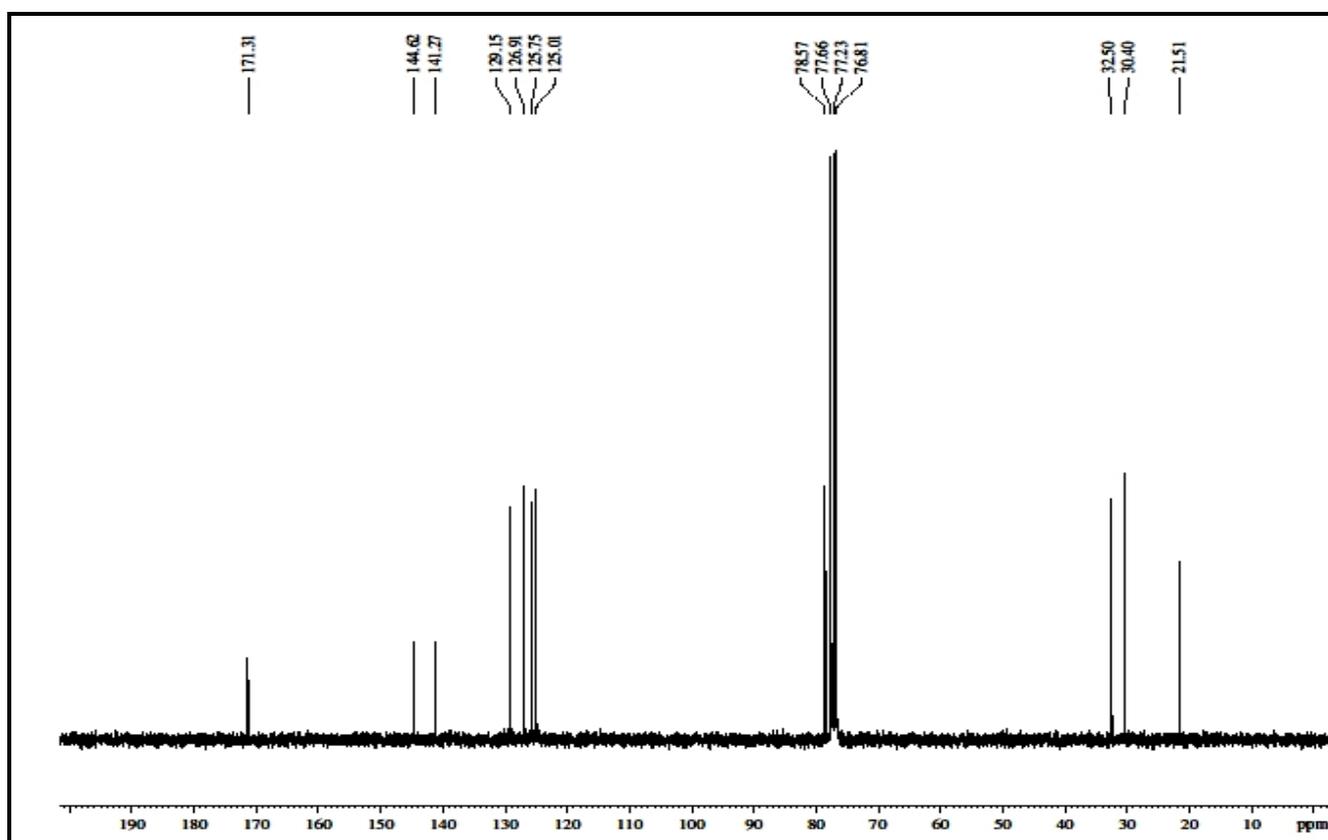


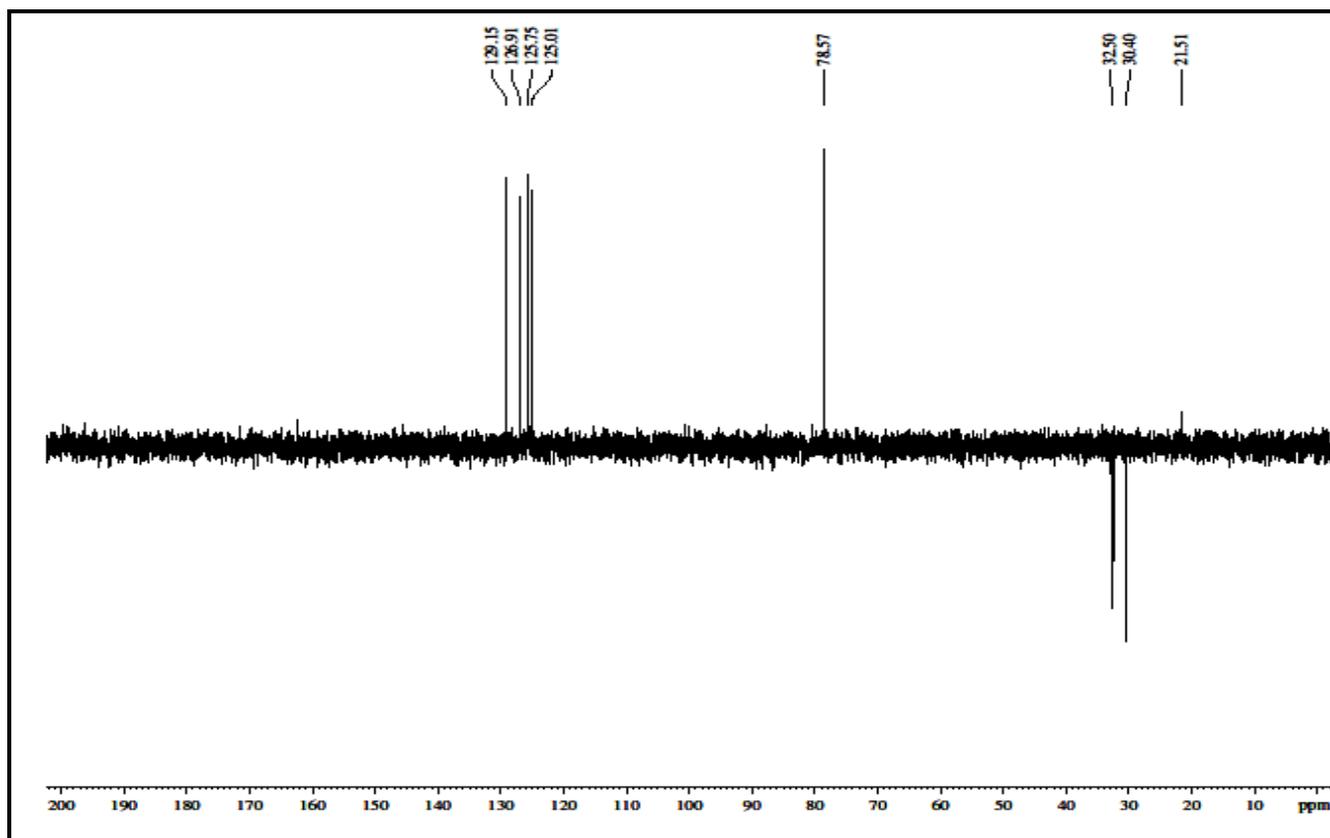
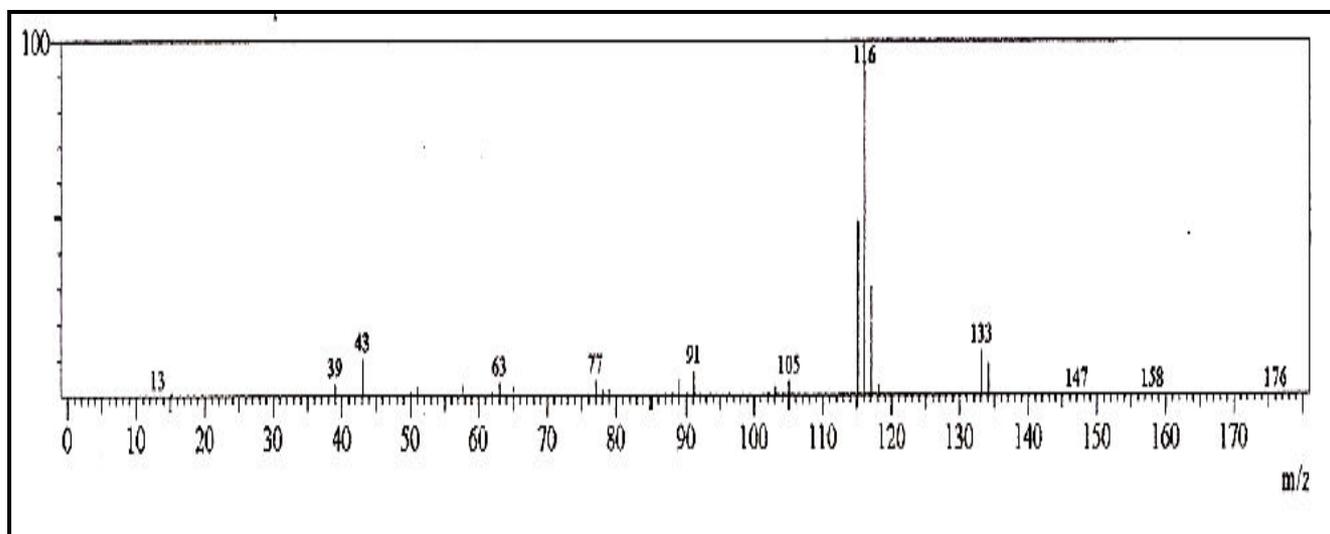
Espectro de massas do indanol.



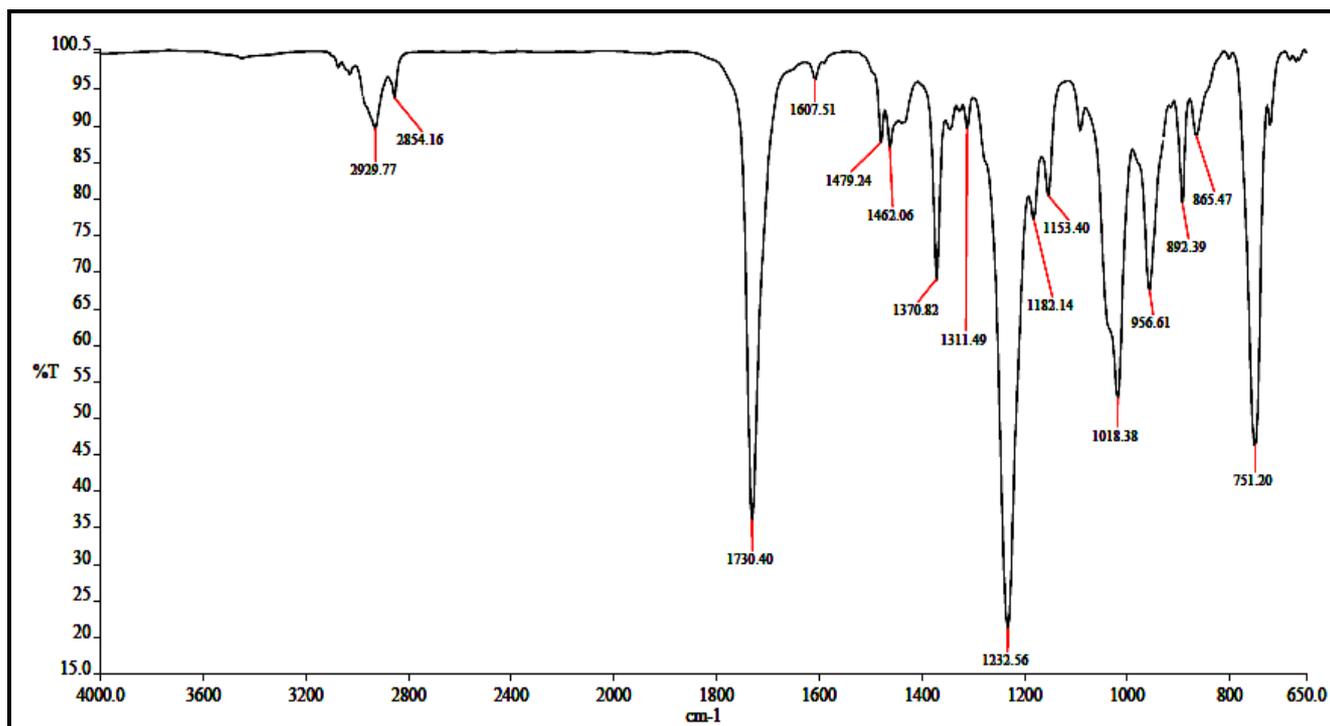
Espectro de I.V. do indanol.

## ANEXO 8

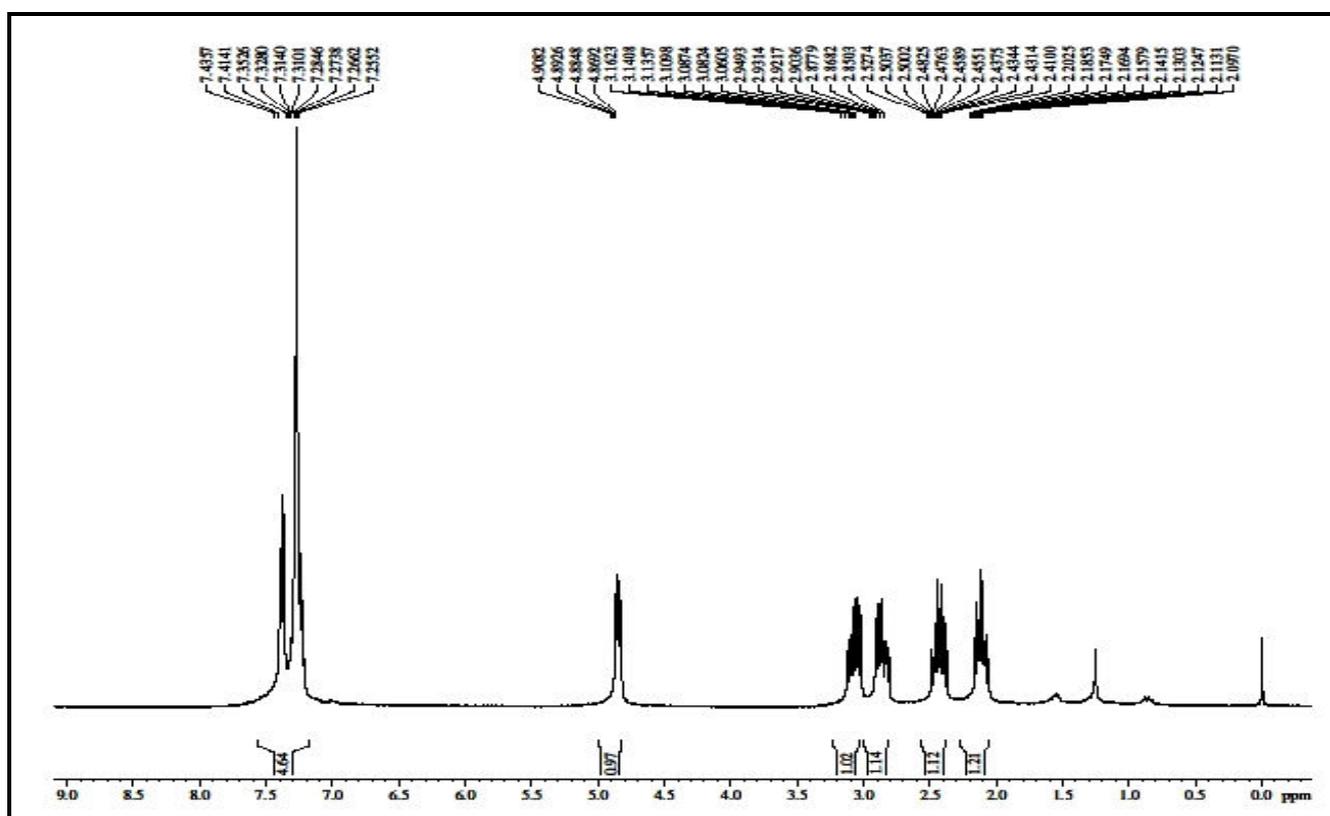
Espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do acetato de indanila.Espectro de <sup>13</sup>C-BB (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do acetato de indanila .

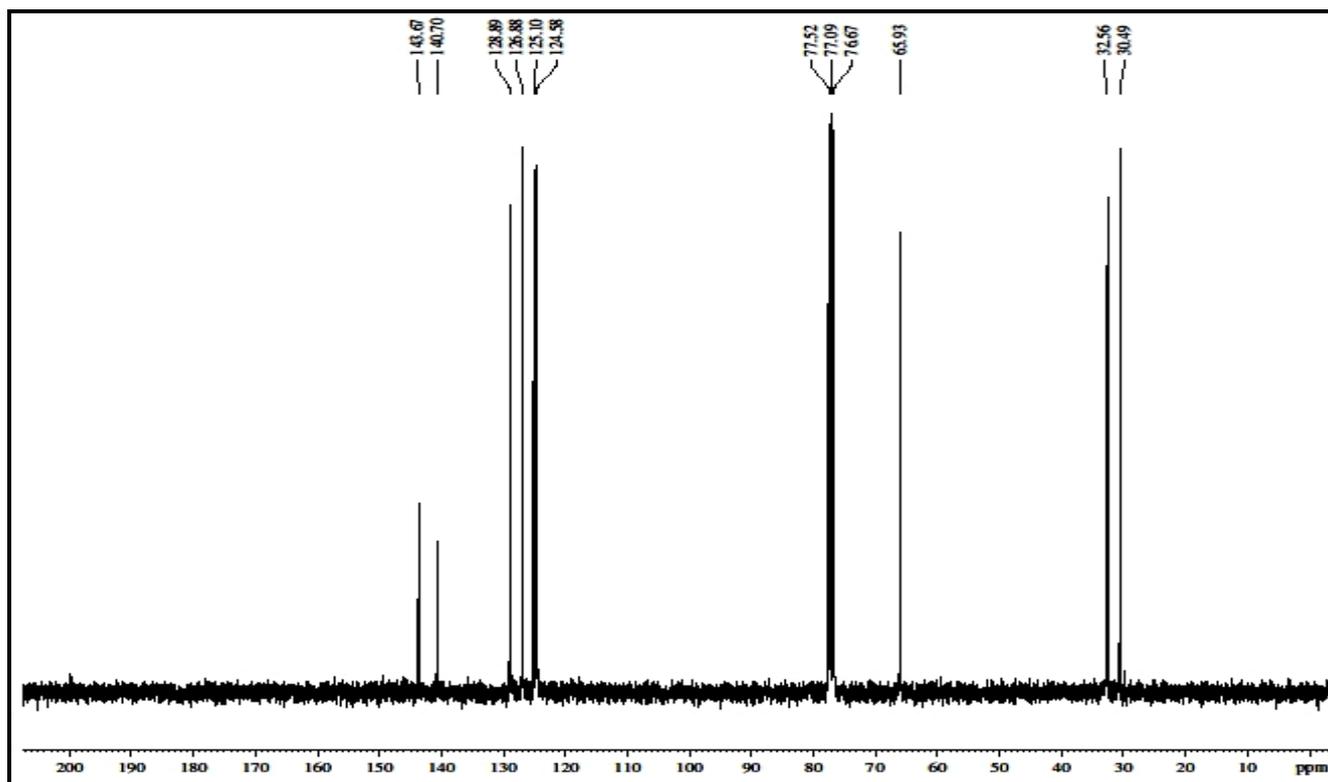
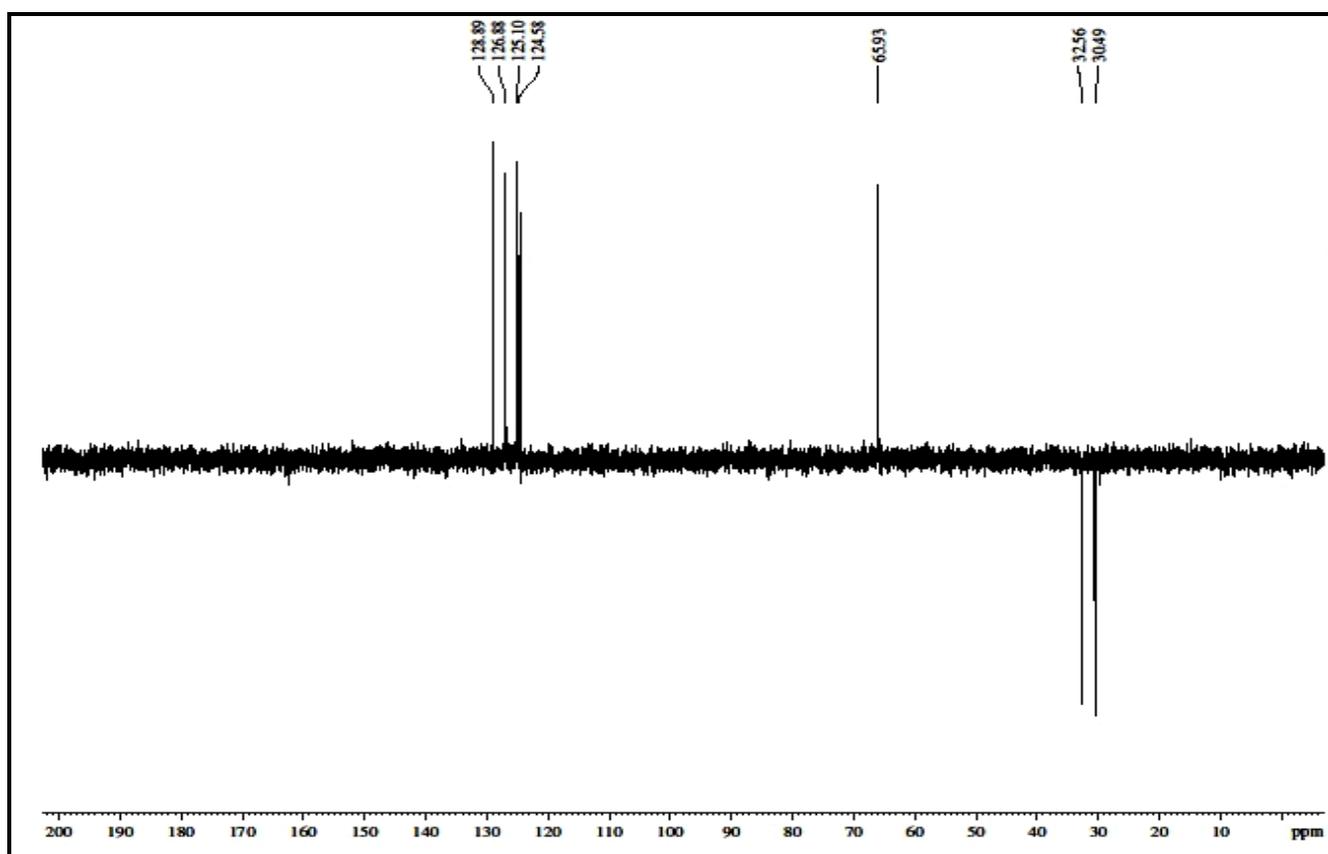
Espectro de DEPT 135° (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do acetato de indanila.

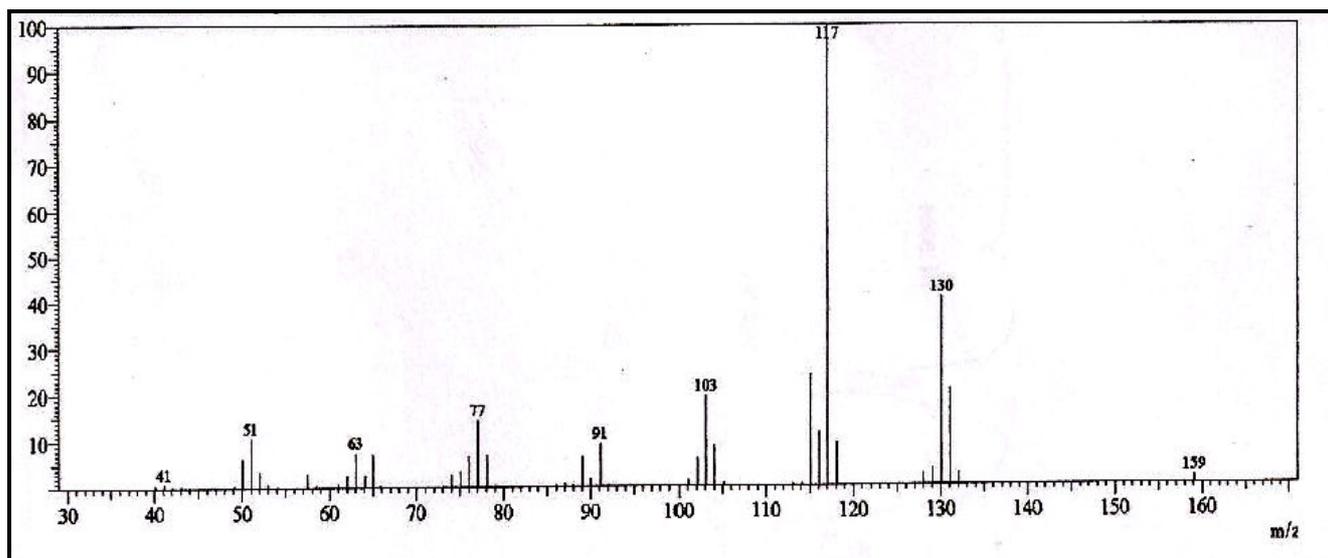
Espectro de massas do acetato de indanila.



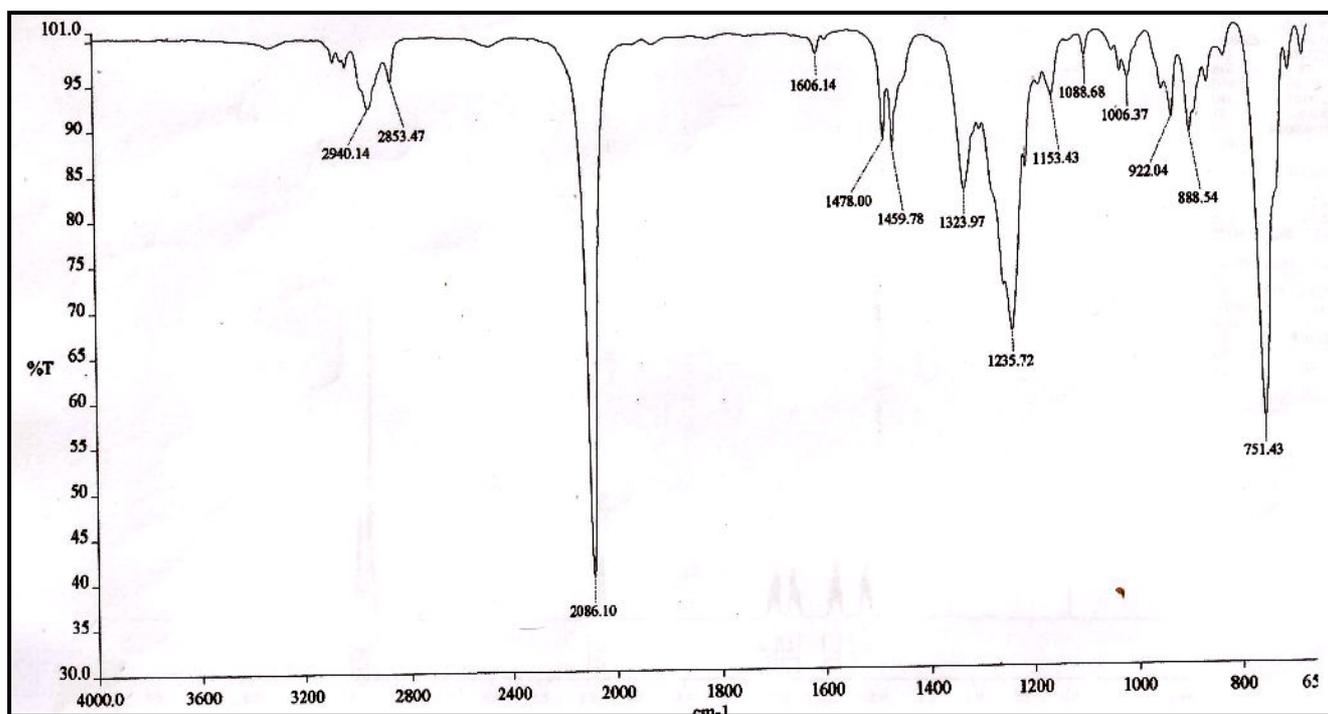
## ANEXO 9



Espectro de  $^{13}\text{C}$ -BB (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do azidoindano.Espectro de DEPT 135° (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do azidoindano.

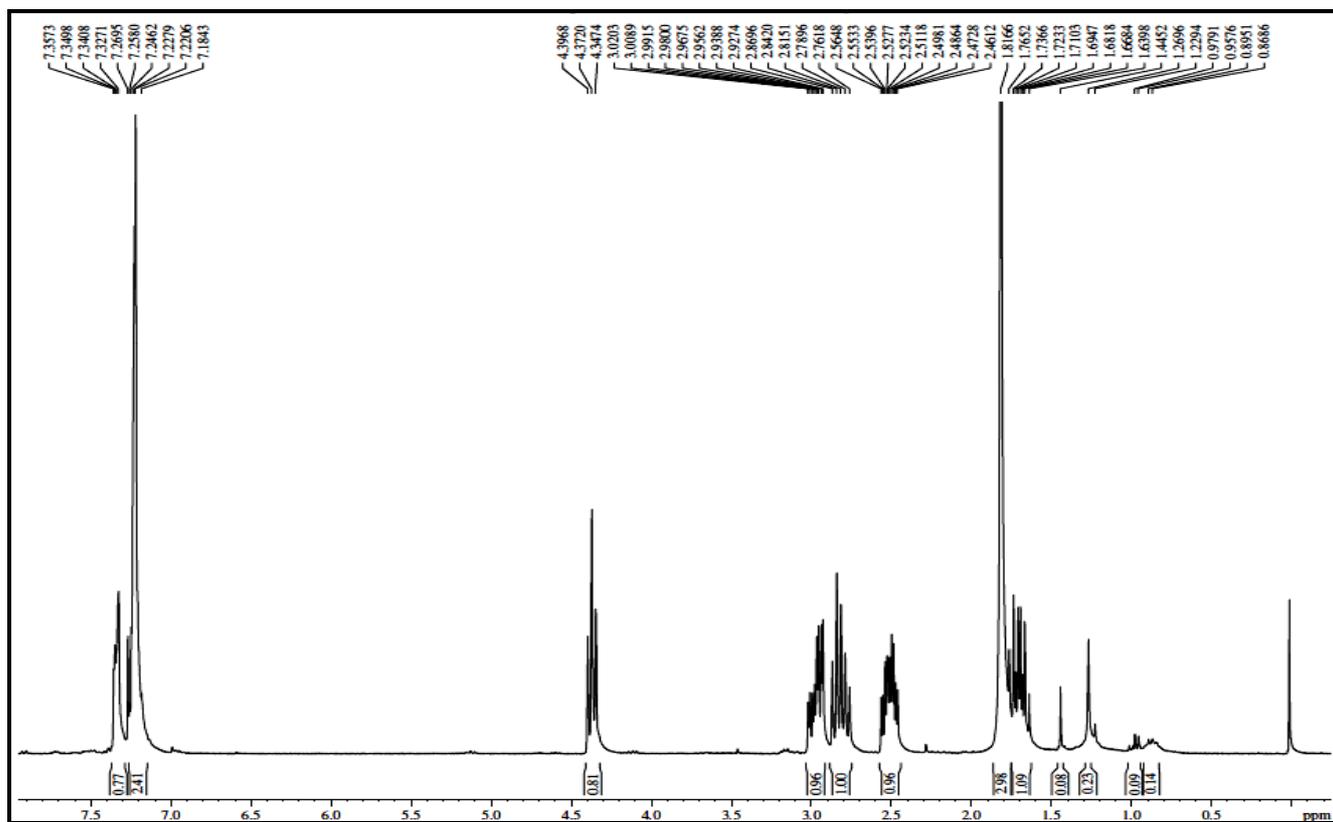
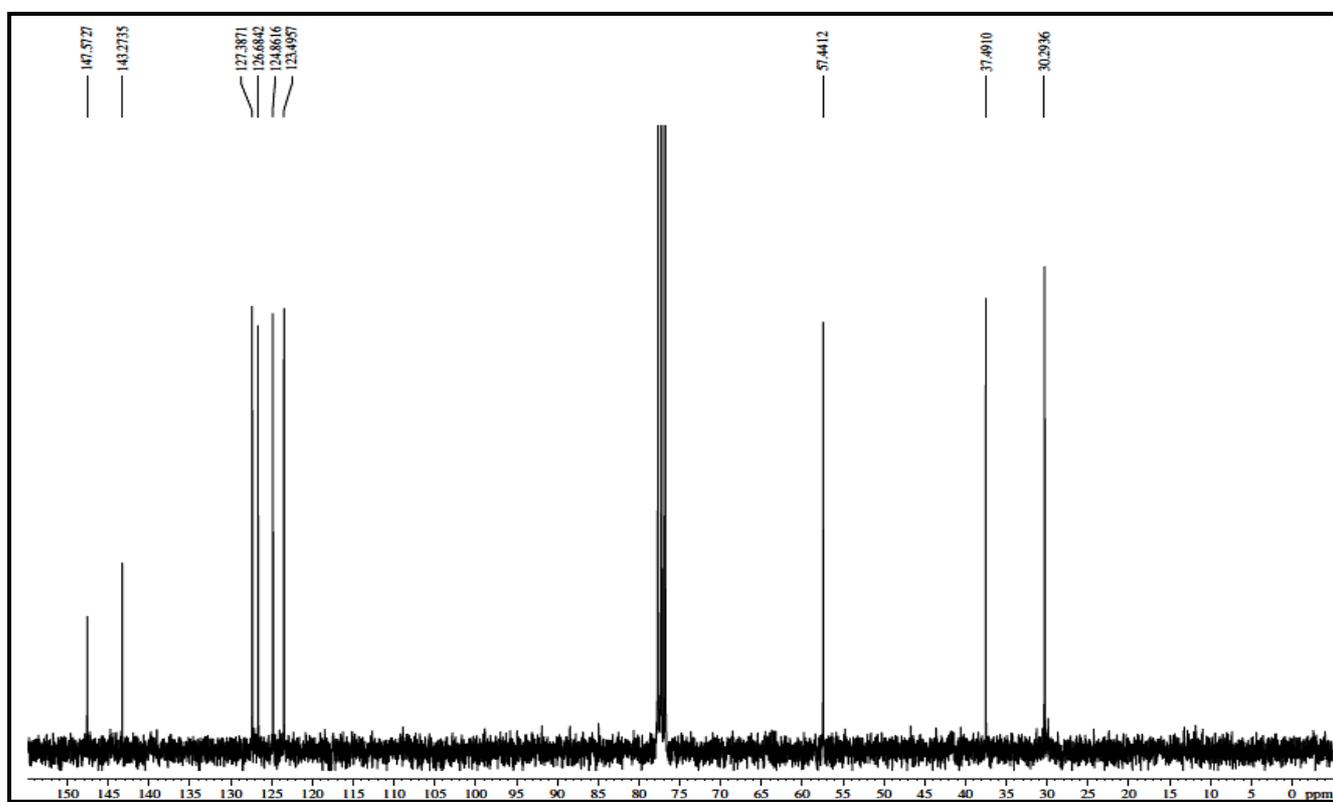


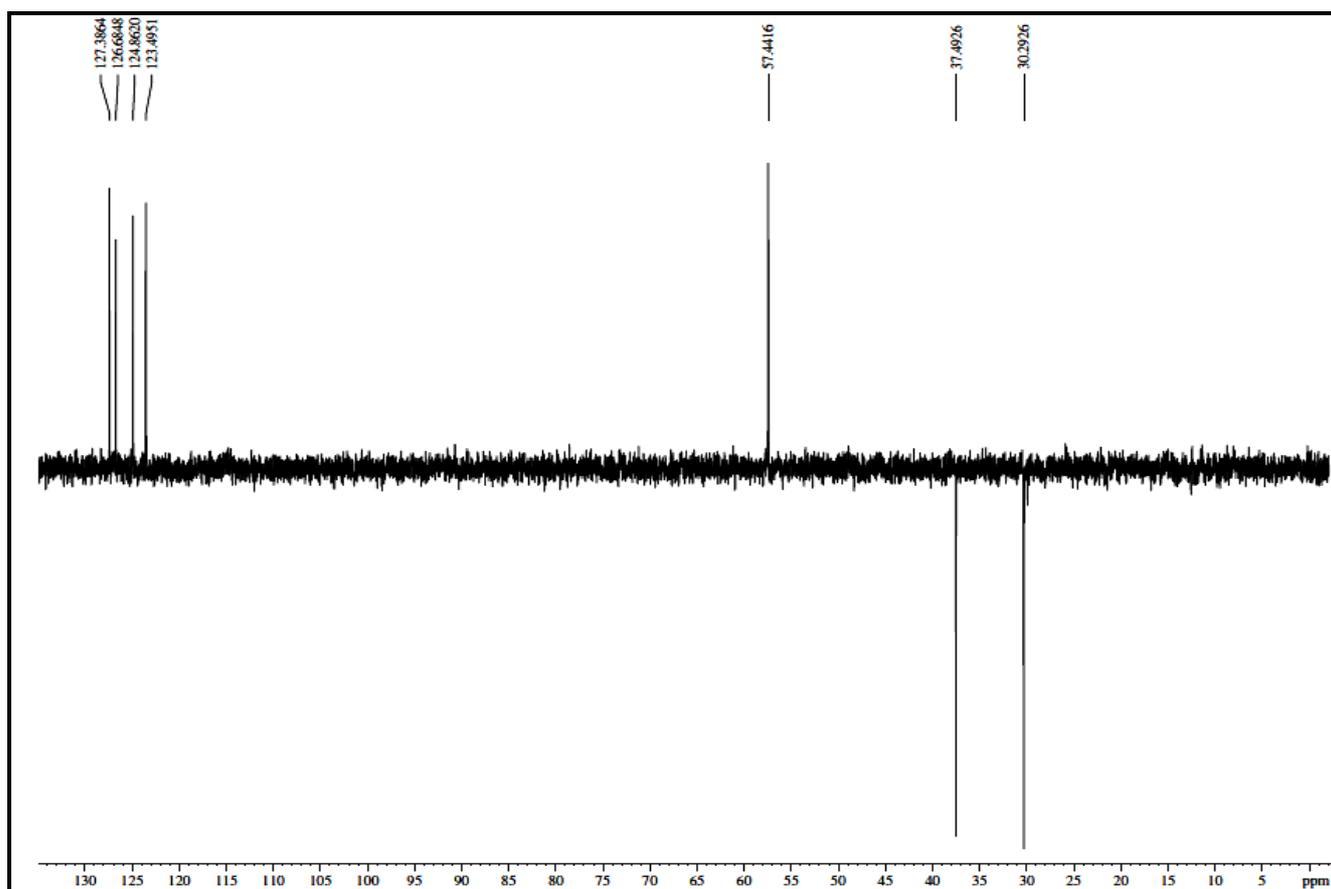
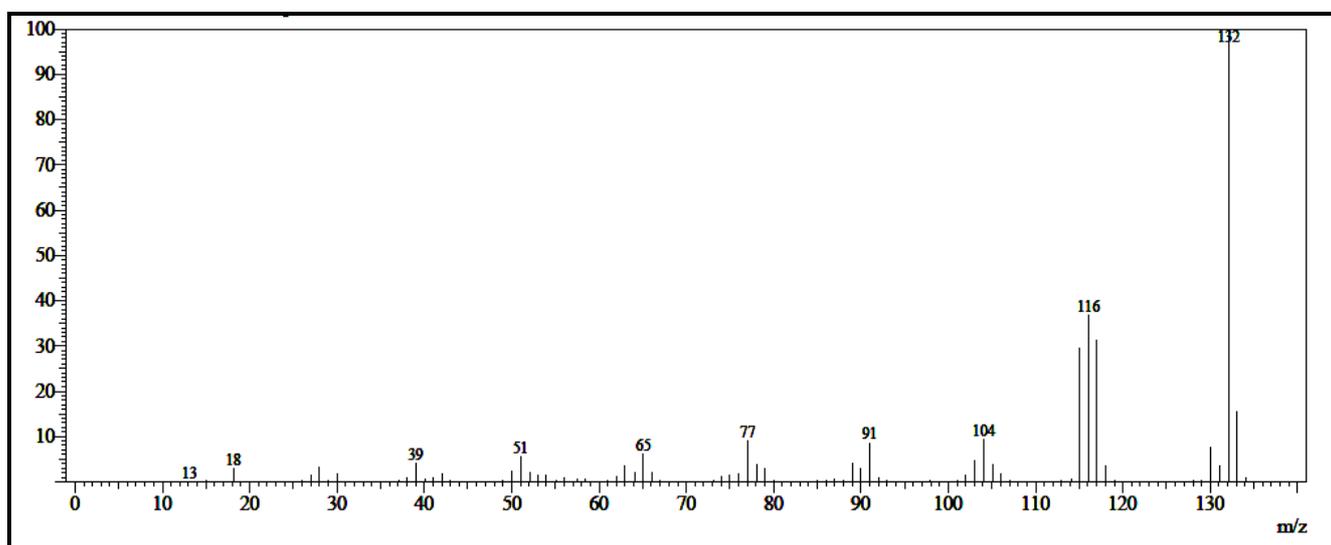
Espectro de massas do azidoindano.



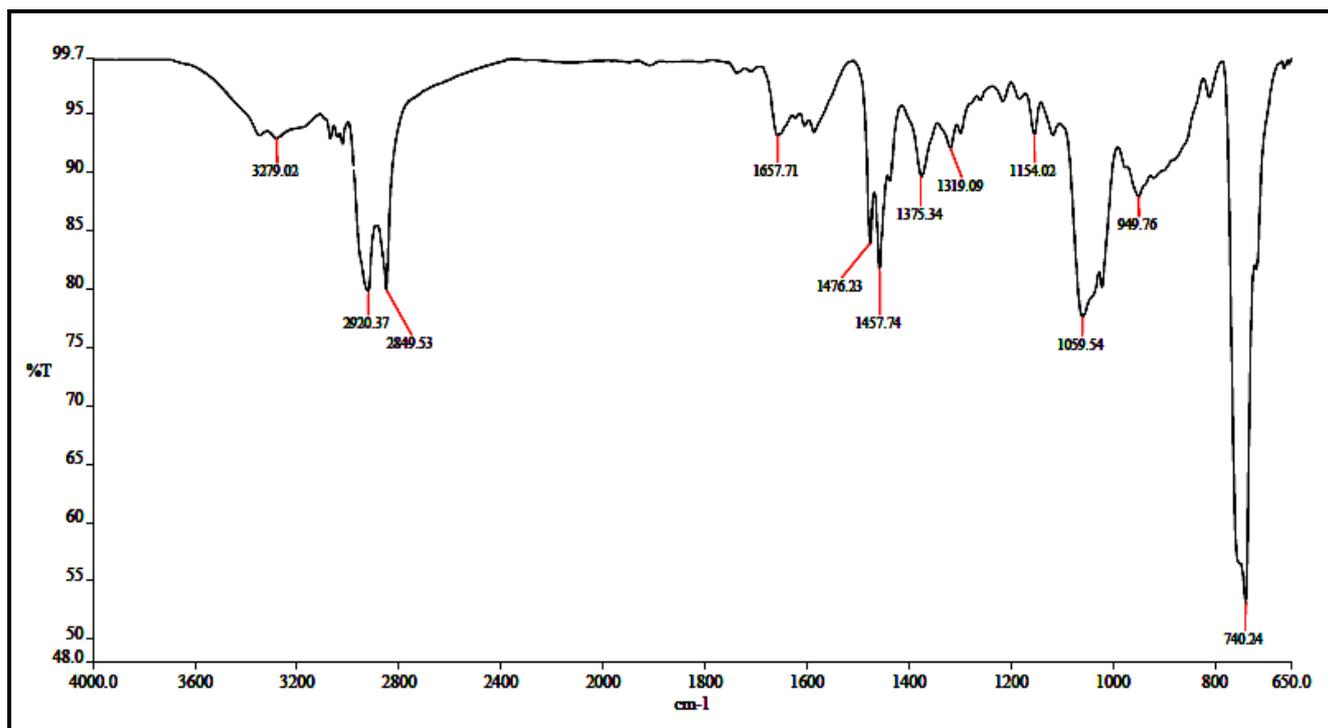
Espectro de I.V. do azidoindano.

## ANEXO 10

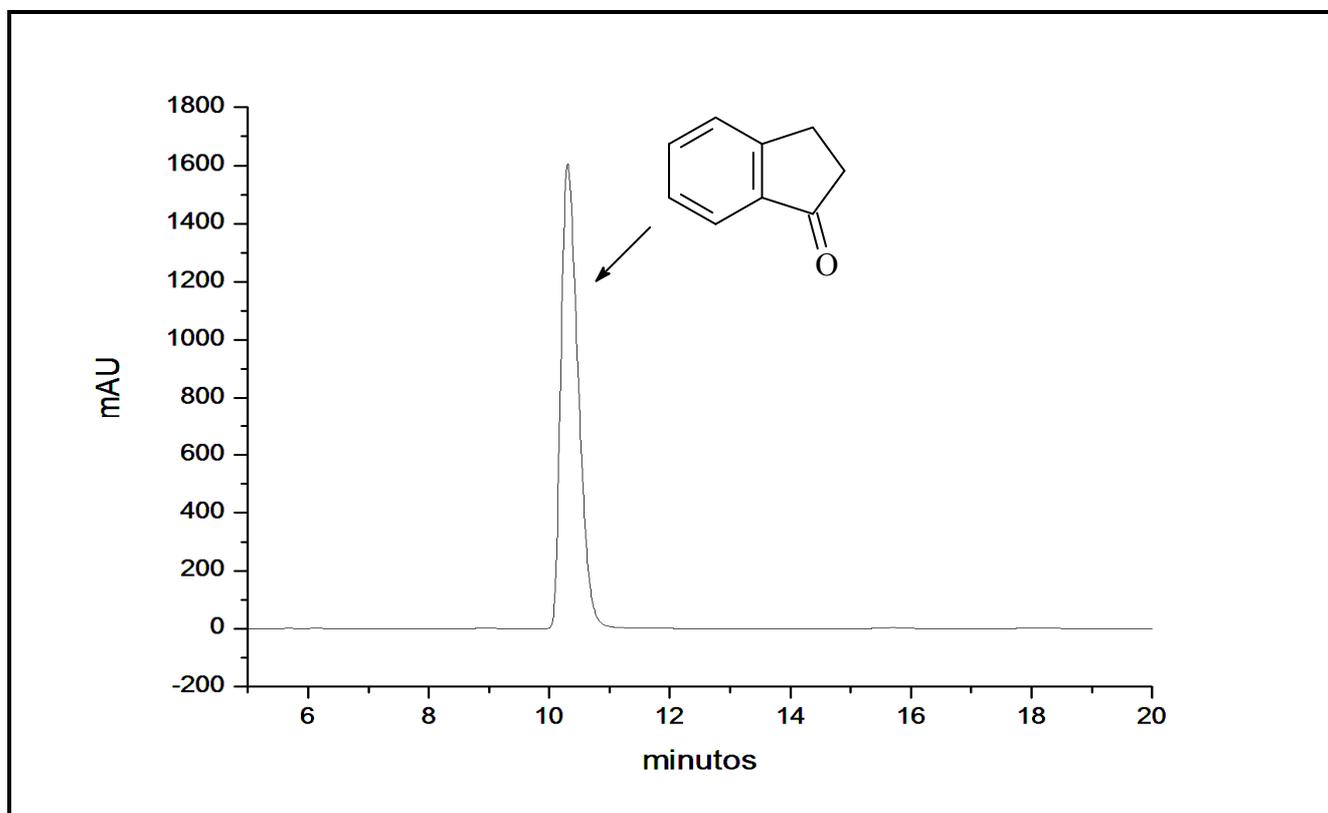
Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da indanamina.Espectro de  $^{13}\text{C}$ -BB (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da indanamina.

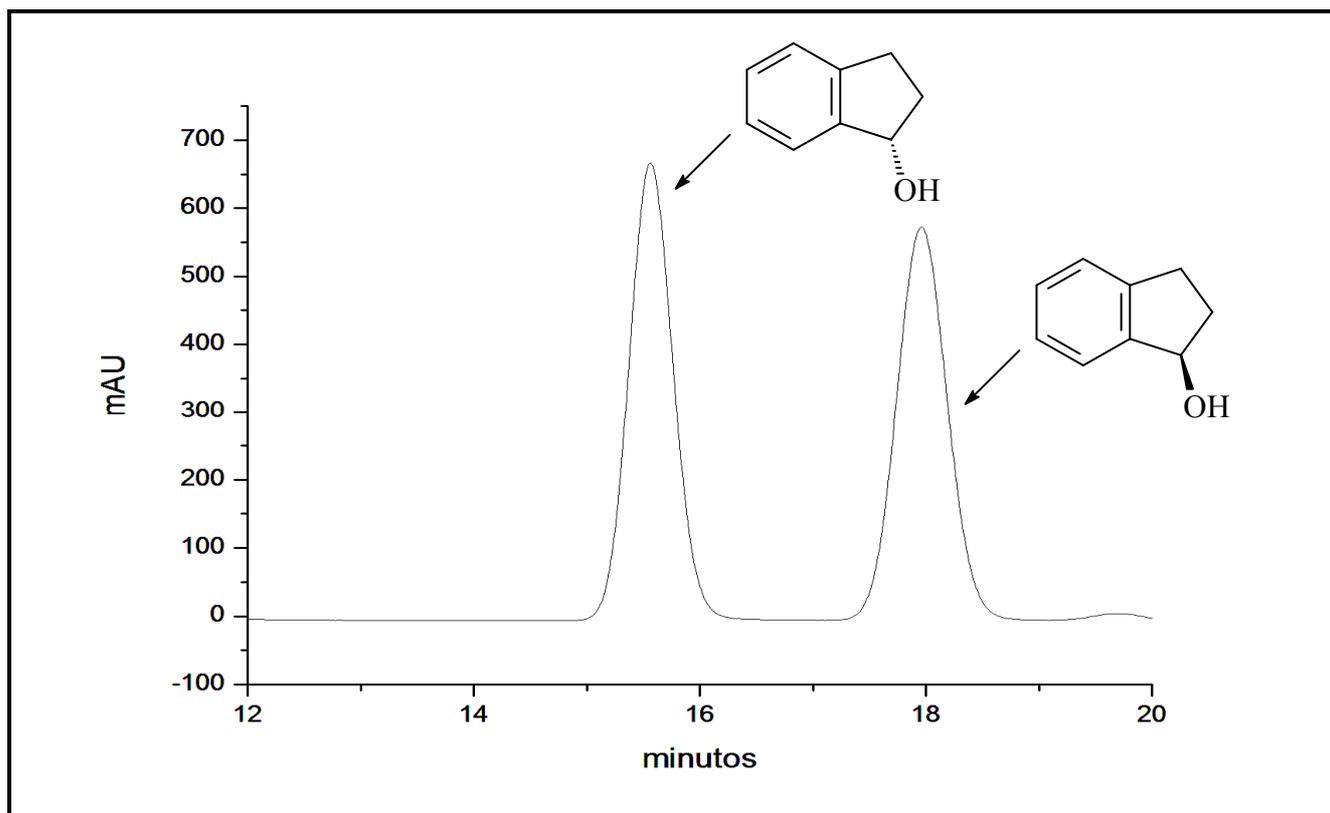
Espectro de DEPT 135° (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da indanamina.

Espectro de massas da indanamina.



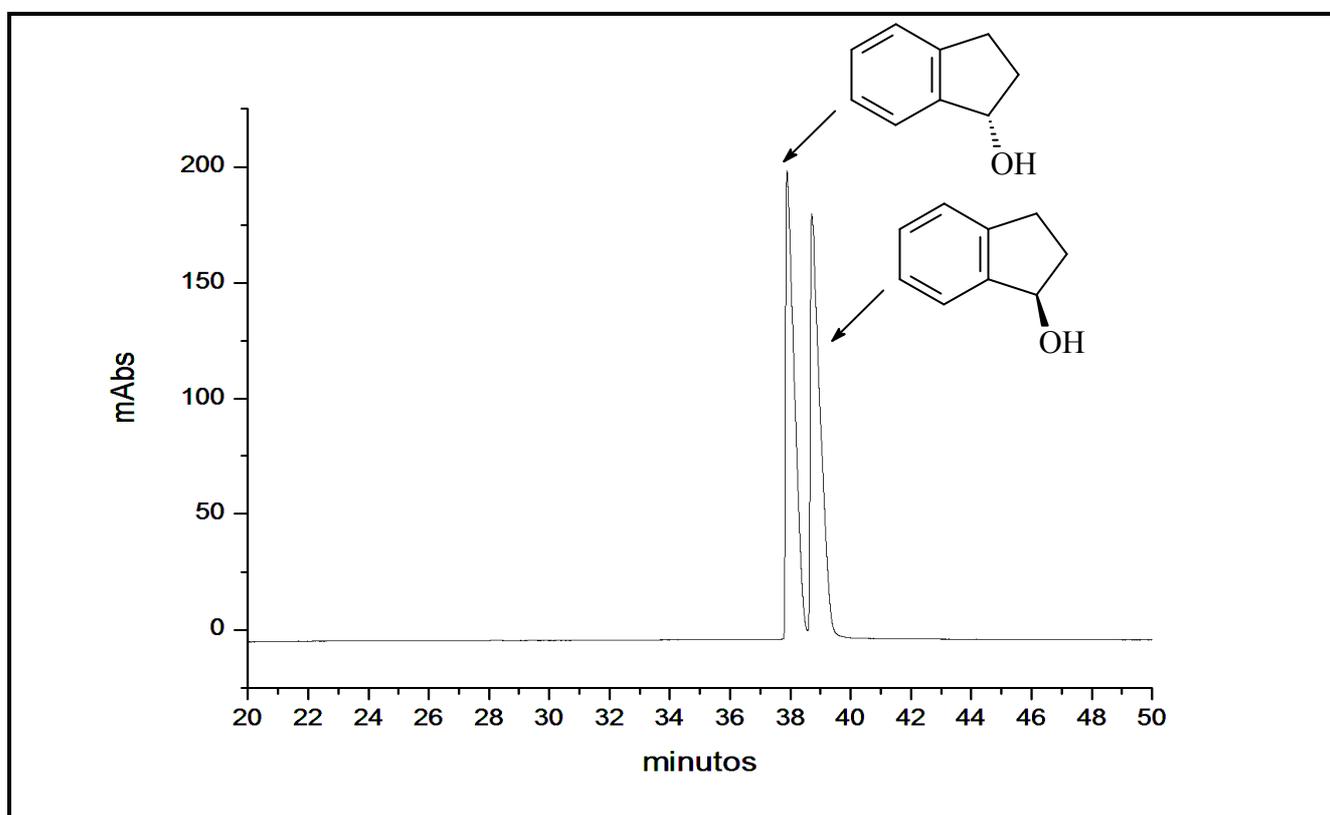
## ANEXO 11



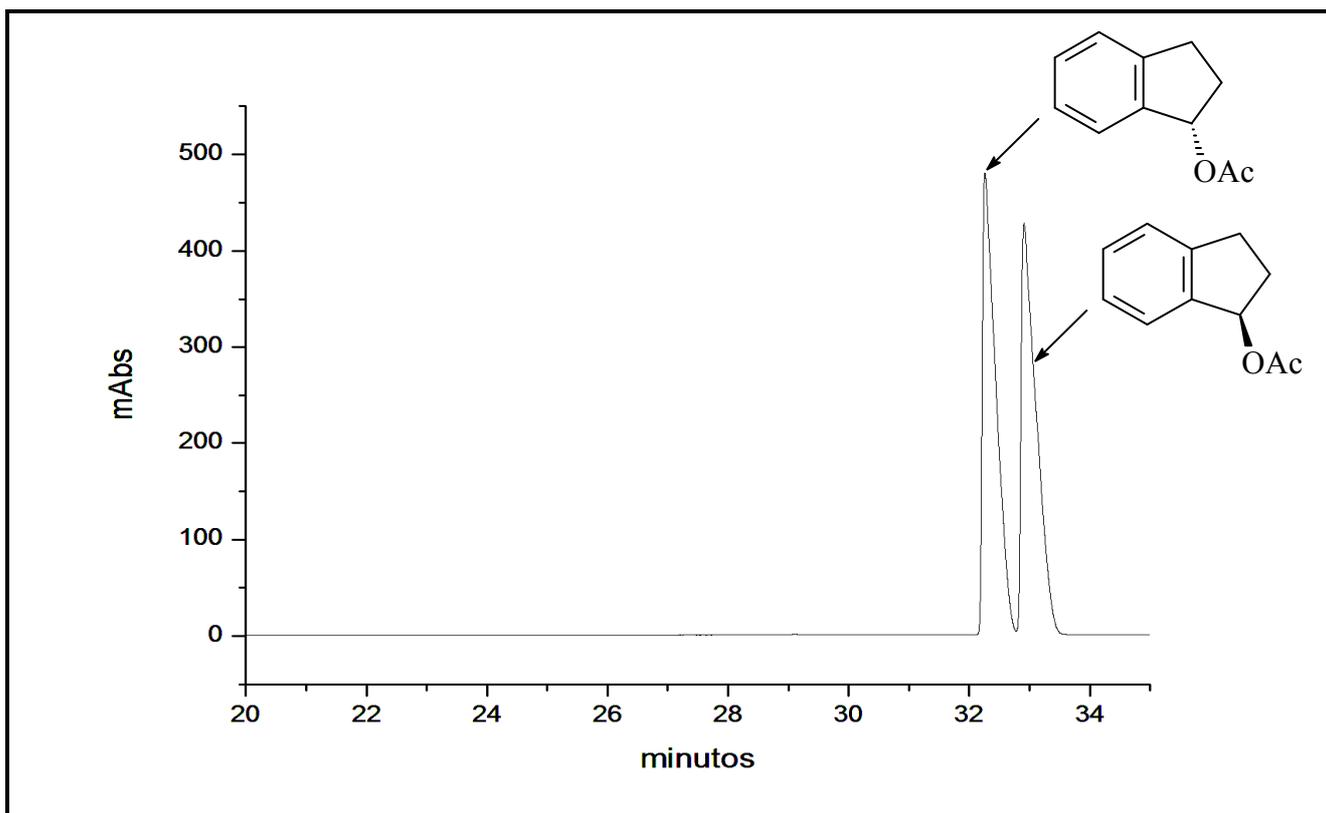


Cromatograma obtido por CLAE do *rac*-indanol  $t_R$  15,6 min. (*S*)  $t_R$  17,8 min. (*R*).

#### ANEXO 12

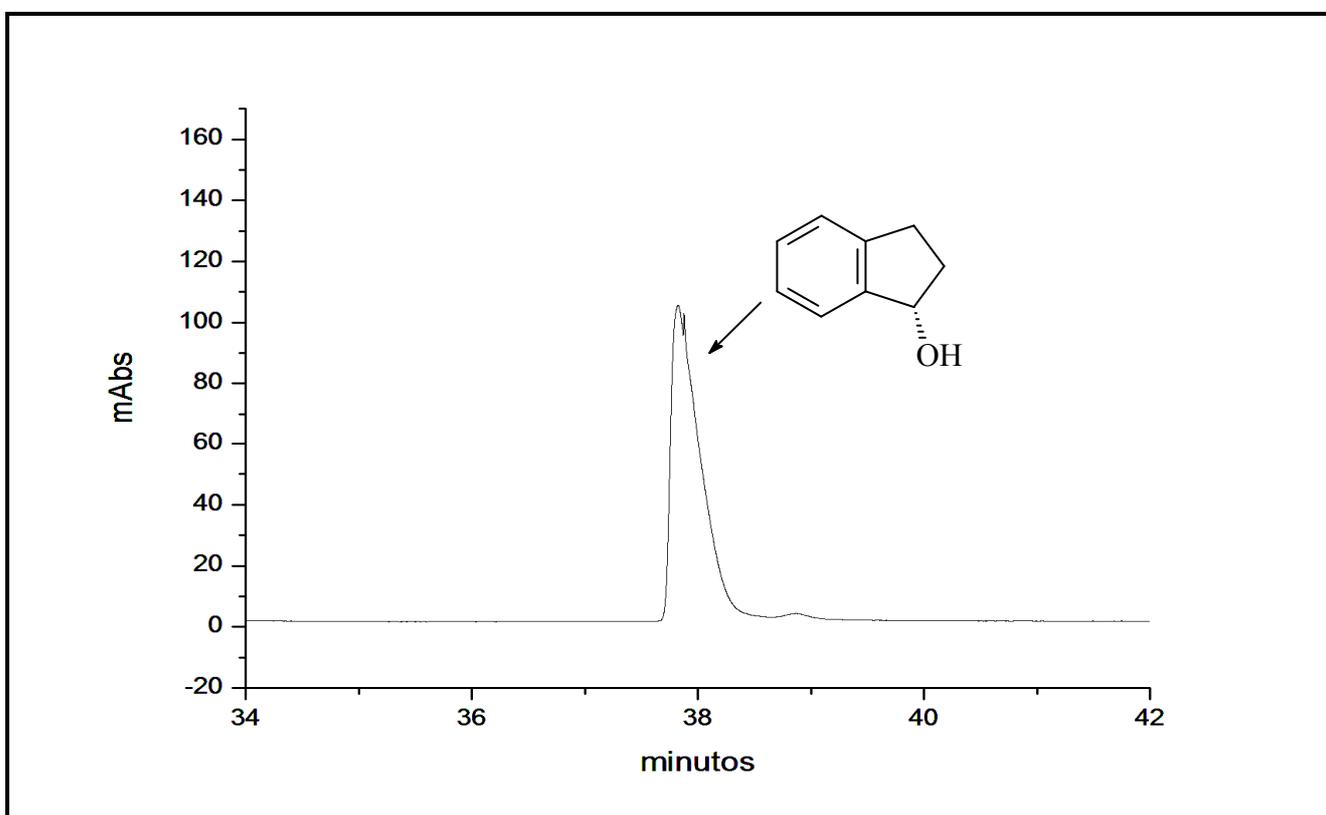


Cromatograma obtido por CG do *rac*-indanol  $t_R$  37,9 min. (*S*)  $t_R$  38,7 min. (*R*).

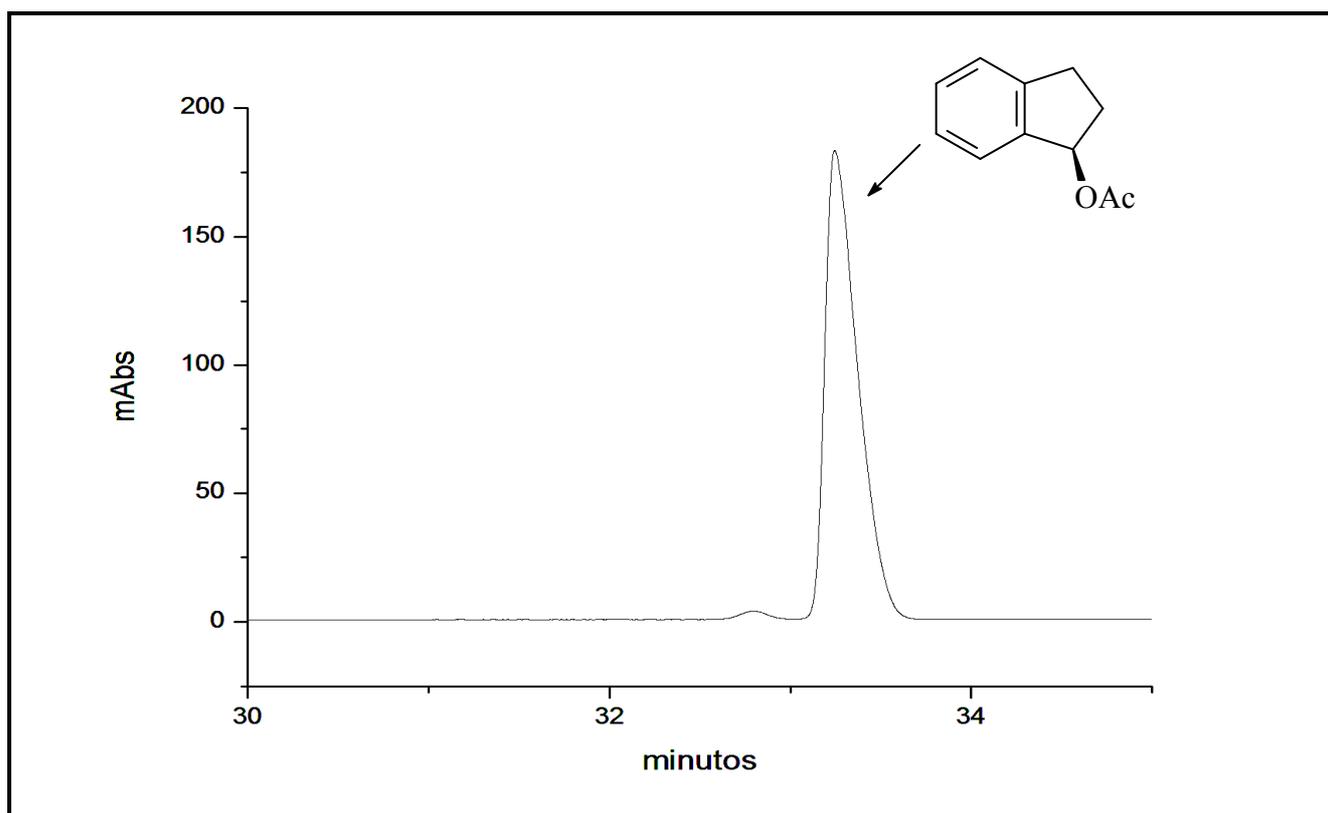


Cromatograma obtido por CG do *rac*-acetato de indanila  $t_R$  32,3 min. (*S*)  $t_R$  32,9 min. (*R*).

### ANEXO 13



Cromatograma obtido por CG do (*S*)-indanol  $t_R$  37,8 min.



Cromatograma obtido por CG do (*R*)-acetato de indanila  $t_R$  33,2 min.