



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

FRANCISCA TATIANA REGIS PINTO

**OBTENÇÃO DE ÁLCOOIS E ÉSTERES QUIRAIS UTILIZANDO LIPASES E
RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA DA KETAMINA E ANÁLOGOS**

FORTALEZA

2018

FRANCISCA TATIANA REGIS PINTO

OBTENÇÃO DE ÁLCOOIS E ÉSTERES QUIRAIS UTILIZANDO LIPASES E
RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA DA KETAMINA E ANÁLOGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de mestre em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Dávila Zampieri.
Coorientador: Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P728o Pinto, Francisca Tatiana Regis.

Obtenção de álcoois e ésteres quirais utilizando lipases e resolução cinética enzimática da ketamina e análogos / Francisca Tatiana Regis Pinto. – 2018.
129 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2018.

Orientação: Profa. Dra. Dávila Zampieri.

Coorientação: Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos.

1. Resolução cinética. 2. Lipases. 3. Acetofenonas e derivados. I. Título.

CDD 540

FRANCISCA TATIANA REGIS PINTO

OBTENÇÃO DE ÁLCOOIS E ÉSTERES QUIRAIS UTILIZANDO LIPASES E
RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA DA KETAMINA E ANÁLOGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de mestre em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovada em: 26/07/2018.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Dávila Zampieri (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Maria da Conceição Tavares Cavalcanti Liberato
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus.

Aos meus pais, ao meu namorado, familiares,
amigos e professores.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pelo dom da vida e por sempre ter guiado meus caminhos, me dando forças pra superar as dificuldades.

A minha família, em especial meus pais Luzia e José, por todo amor e por estarem sempre ao meu lado me dando apoio e carinho.

Ao meu namorado Leonardo, por todo apoio, compreensão e por estar sempre presente.

A minha orientadora Dra Dávila Zampieri, pela excelente orientação, pelos ensinamentos, atenção, amizade e dedicação ao longo deste período.

Ao professor Dr. Marcos Carlos de Mattos por toda ajuda e pelos seus ensinamentos.

As professoras participantes da banca examinadora Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan e Profa. Dra. Maria da Conceição Tavares Cavalcanti Liberato pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

A todos os professores do departamento de Química da UFC, por toda dedicação e ensinamentos.

Aos meus amigos e amigas, Marília, Hortência, Paulo, Sávia, Glemilson, Nayana, Dalila e Alana, por todo carinho.

Aos meus amigos do LABS, Bruna, Daniele, Carol, Aquino, Diana, Yana, Paulo, Fábio, Thiago, Reinaldo, Tell, Alysson, Artur e Kim por acompanhar toda essa jornada, e por sempre estarem dispostos a me ajudar.

Aos colegas de trabalho Vinícius, Herbert, João Fábio, por toda ajuda concedida.

Ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) pelas análises de ressonância magnética nuclear.

RESUMO

Este trabalho de mestrado estudou a obtenção de compostos enantiomericamente puros utilizando lipases. O capítulo 1 foi dedicado ao estudo da obtenção de álcoois e ésteres quirais a partir de acetofenonas e derivados utilizando a enzima comercial CAL-B para comparação com a enzima recombinante de *Bacillus coagulans*. Para tanto, os ésteres *rac*-3a-k foram inicialmente hidrolisados com a CAL-B, apresentando bons resultados de ee_s (>99%), ee_p (>99%), C (50%) e E (>200), Com exceção do *rac*-3k acetato de(2,5-dimetilfenil)etila, que apresentou baixos valores de conversão e ee_s . A reação com a carboxilesterase recombinante foi feita apenas com o substrato *rac*-3a usado como modelo, contudo a enzima não apresentou atividade. Enquanto tentava-se otimizar as condições de expressão e atividade enzimática, foi dado início ao estudo de resolução cinética via acetilação utilizando a lipase de *Pseudomonas fluorescens* em suas formas: livre, imobilizada comercialmente e imobilizada em nanopartículas magnéticas utilizando os substratos *rac*-2a, *rac*-2b e *rac*-2f. Os resultados mostraram que a resolução cinética para esses substratos, catalisada por *P. fluorescens* imobilizada em nanopartículas magnéticas foi altamente enantiosseletiva com valores de E > 200. No capítulo 2, estudou-se a resolução cinética enzimática da ketamina e análogos utilizando diferentes lipases comerciais. A princípio foi realizada a resolução cinética enzimática da ketamina via hidrólise utilizando o carbamato de ketamina *rac*-5 com 8 lipases comerciais, não sendo observada atividade em nenhuma das enzimas estudadas. Posteriormente, foi realizada a resolução cinética enzimática da ketamina via carbonatação, utilizando as enzimas CAL-B e TLL que também não apresentaram resultados satisfatórios. Por fim, foi efetuada a resolução cinética enzimática via hidrólise de um análogo da ketamina *rac*-8. Os resultados obtidos pra essa reação também não foram satisfatórios, não sendo encontrados relatos na literatura para síntese ou resolução cinética enzimática desses compostos. Os resultados negativos podem estar relacionados ao impedimento estérico que o átomo de Cl e o anel benzênico podem gerar, dificultando o encaixe da enzima-substrato e conseqüentemente impedindo a reação.

Palavras-chave: Resolução cinética. Lipases. Acetofenonas e derivados.

ABSTRACT

In this work the enantiomerically pure compounds were obtained using lipases. Chapter 1 was dedicated to the study of obtaining chiral alcohols and esters from acetophenones and derivatives using the commercial CAL-B for comparison with the recombinant enzyme of *Bacillus coagulans*. For this, the esters *rac*-3a-k were initially hydrolyzed with CAL-B, presenting good results of ee_s (>99%), ee_p (>99%), C (50%) e E (>200), With the exception of *rac*-3k (2,5-dimethylphenyl) ethyl acetate, which showed low conversion values and *e.e.s.* The reaction with the recombinant carboxylesterase was done only with the substrate *rac*-3a used as model, however it did not present activity. While attempting to optimize expression conditions and enzymatic activity, the study of kinetic resolution via acetylation using *Pseudomonas fluorescens* lipase in its forms: free, commercially immobilized and immobilized on magnetic nanoparticles using the substrates *rac*-2a, *rac*-2b and *rac*-2f. The results showed that the kinetic resolution for these substrates catalyzed by *P. fluorescens* immobilized on magnetic nanoparticles was highly enantioselective with $E > 200$ values. In Chapter 2, the enzymatic kinetic resolution of ketamine and the analogue was studied using different commercial lipases. At first, enzymatic kinetic resolution of ketamine was achieved by hydrolysis using the carbamate of ketamine *rac*-5 with 8 commercial lipases, and no activity was observed in any of the enzymes studied. Subsequently, enzymatic kinetic resolution of ketamine via carbonation was performed using the CAL-B and TLL enzymes, which also did not present satisfactory results. Finally, enzymatic kinetic resolution was performed via hydrolysis of a ketamine analog *rac*-8. The results obtained for this reaction were also not satisfactory, and no reports were found in the literature for the synthesis or enzymatic kinetic resolution of this compound. The negative results may be related to the steric hindrance that the Cl atom and the benzene ring can generate, making it difficult to fit the enzyme-substrate and consequently preventing the reaction.

Keywords: Kinetic resolution. Lipases. Acetophenones and derivatives.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Vantagens da química verde	16
Figura 2 – Ilustração esquemática de processo recombinante de DNA	19
Figura 3 – Esquema das três técnicas mais comuns de imobilização enzimática: (A) adsorção física, (B) aprisionamento e (C) ligação covalente/ <i>cross-linking</i>	21
Figura 4 – Compostos bioativos contendo a porção de ácido 3-amilglutárico como bloco construtor quiral	29
Figura 5 – Cromatograma em coluna quiral CP-Chiralsil-Dex CB do <i>rac</i> -1-feniletanol 2a	31
Figura 6 – Cromatograma em coluna quiral CP-Chiralsil-Dex CB do <i>rac</i> -acetato de 1-feniletila 3a	33
Figura 7 – Cromatograma em coluna quiral CP-Chiralsil-Dex CB da reação de hidrólise do <i>rac</i> -acetato de 1-feniletila 3a utilizando CAL-B	34
Figura 8 – Cromatograma em coluna quiral CP-Chiralsil-Dex CB da reação de hidrólise do <i>rac</i> -acetato de 1-feniletila 3k utilizando CAL-B	35
Figura 9 – Cromatograma em coluna quiral CP-Chiralsil-Dex CB da reação de hidrólise do <i>rac</i> -1-acetato de feniletila 3a utilizando carboxilesterase recombinante	37
Figura 10 – Estrutura química da ketamina	44
Figura 11 – Estrutura química da fenciclidina	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das enzimas	17
Tabela 2 – Rendimento dos alcoóis racêmicos 2a-k	30
Tabela 3 – Rendimento dos ésteres racêmicos 3a-k	32
Tabela 4 – Resultados obtidos da reação de hidrólise do <i>rac</i> - 3a-k utilizando a CAL-B	35
Tabela 5 – Resolução cinética do <i>rac</i> -feniletanol (2a), via acetilação, utilizando <i>P. fluorescens</i> livre	38
Tabela 6 – Resolução cinética do <i>rac</i> -(3-metilfenil)etanol (2b), via acetilação, utilizando <i>P. fluorescens</i> livre	38
Tabela 7 – Resolução cinética do <i>rac</i> -(3-bromofenil)etanol (2f), via acetilação, utilizando <i>P. fluorescens</i> livre	39
Tabela 8 – Resolução cinética de <i>rac</i> - 2a , <i>rac</i> - 2b e <i>rac</i> - 2f , via acetilação, usando <i>P. fluorescens</i> imobilizada em imobead 150 na temperatura de 40°C	40
Tabela 9 – Resolução cinética de <i>rac</i> - 2a , <i>rac</i> - 2b e <i>rac</i> - 2f , via acetilação, usando <i>P. fluorescens</i> imobilizada em nanopartículas magnéticas (Fe ₃ O ₄ @APTES-GLU-PF)	41
Tabela 10 – Resolução cinética via hidrólise do carbamato da ketamina	48
Tabela 11 – Resolução cinética via carbonatação da ketamina <i>rac</i> - 4	50
Tabela 12 – Rotações ópticas específicas dos álcoois (<i>R</i> -2 a-k) e dos ésteres (<i>S</i> -3 a-k)	62

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	– Função natural da maioria das hidrolases	18
Esquema 2	– Mecanismo de reação de lipases	25
Esquema 3	– Representação geral de uma resolução cinética enzimática	26
Esquema 4	– Síntese quimioenzimática utilizando Novozym 435®	26
Esquema 5	– Representação esquemática de uma resolução cinética dinâmica	27
Esquema 6	– Preparação da pregabalina por meio de resolução cinética utilizando a lipase de <i>T. lanuginosus</i>	28
Esquema 7	– Dessimetrização de diésteres via lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>	28
Esquema 8	– Reação de redução da acetofenona e derivados	30
Esquema 9	– Reação de acetilação dos álcoois racêmicos 2a-k	32
Esquema 10	– Reação de hidrólise de rac-3a-k com CAL-B	33
Esquema 11	– Síntese da ketamina	45
Esquema 12	– Obtenção da ketamina a partir do cloridrato de ketamina	46
Esquema 13	– Produção do carbamato de ketamina	46
Esquema 14	– Resolução cinética via de hidrólise do carbamato da ketamina rac-5	47
Esquema 15	– Resolução cinética do carboxilato de metil 2-indolina	49
Esquema 16	– Resolução cinética da ketamina	49
Esquema 17	– Síntese do rac-6 e o rac-7	50
Esquema 18	– Síntese do rac-8	51
Esquema 19	– Resolução cinética, via reação de hidrólise, do rac-8 na presença de CAL-B e TLL	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Enzimas	17
1.2	Enzimas recombinantes	18
1.3	Enzimas imobilizadas	20
2	OBJETIVOS	22
3	CAPÍTULO 1: OBTENÇÃO DE ÁLCOOIS E ÉSTERES QUIRAIS UTILIZANDO LIPASES	24
3.1	Aspectos gerais	24
3.1.1	<i>Lipases</i>	24
3.1.1.2	<i>Resolução cinética</i>	25
3.1.1.2	<i>Resolução cinética dinâmica</i>	27
3.1.1.3	<i>Dessimetrização enzimática</i>	28
3.2	Resultados e discussão	30
3.2.1	<i>Síntese dos alcoóis racêmicos 2a-k</i>	30
3.2.2	<i>Síntese dos ésteres racêmicos 3a-k</i>	31
3.2.3	<i>Reações enzimáticas</i>	33
3.2.3.1	<i>Reações de hidrólise utilizando lipase de Candida antarctica B (CAL-B)</i>	33
3.2.3.2	<i>Reações de hidrólise utilizando carboxliesterase recombinante</i>	36
3.2.3.3	<i>Resolução cinética, via acetilação, utilizando Pseudomonas fluorescens livre, imobilizada comercial e imobilizada em nanopartículas magnéticas (Fe₃O₄@APTES-GLU-PF)</i>	37
3.3	Conclusão	42
4	CAPITULO 2: RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA DA KETAMINA E ANÁLOGOS	44
4.1	Aspectos gerais	44
4.2	Ketamina: antidepressivo	44
4.3	Resultados e discussão	46
4.3.1	<i>Resolução cinética enzimática da ketamina via hidrólise e carbonatação</i>	46
4.3.1.1	<i>Obtenção da ketamina</i>	46
4.3.1.2	<i>Reação de carbamatação da ketamina</i>	46
4.3.1.3	<i>Resolução cinética via de hidrólise do carbamato da ketamina utilizando diferentes lipases</i>	47

4.3.1.4	<i>Resolução cinética via carbonatação da ketamina</i>	48
4.3.2	Síntese de análogos da ketamina	50
4.3.2.1	<i>Resolução cinética enzimática via hidrólise do rac-8</i>	51
4.4	Conclusão	52
5	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	53
5.1	Instrumentos	53
5.2	Métodos de análise por cromatografia gasosa com coluna quirál acoplado ao detector de ionização	54
5.3	Métodos de análise por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna quirál acoplado ao detector UV	55
5.4	Reagente utilizados	56
5.5	Solventes utilizados	56
5.6	Enzimas utilizadas	56
5.7	Adsorventes utilizados	57
5.8	Compostos utilizados como padrão no Capítulo 1	57
5.8.1	<i>Síntese geral dos álcoois racêmicos rac-2a-k</i>	57
5.8.2	<i>Síntese geral dos ésteres racêmicos rac-3a-k</i>	60
5.9	Compostos utilizados como padrão no Capítulo 2	66
5.9.1	<i>Obtenção da ketamina (rac-4)</i>	66
5.9.2	<i>Síntese do carbamato de ketamina (rac-5)</i>	67
5.9.3	<i>Síntese do (rac-6 e do rac-7)</i>	67
5.9.4	<i>Síntese do (rac-8)</i>	68
5.10	Produção das enzimas recombinantes utilizadas no Capítulo 1	68
5.10.1	<i>Produção da carboxilesterase</i>	68
5.11	Reações de resolução cinética enzimáticas do Capítulo 1	69
5.11.1	<i>Resolução cinética enzimática dos ésteres racêmicos (rac-3a-k) via reação de hidrólise empregando lipase comercial (CAL-B)</i>	69
5.11.2	<i>Resolução cinética enzimática via reação de acetilação empregando <i>P. fluorescens</i> livre e imobilizada comerciais e imobilizada em nanopartículas magnéticas ($Fe_3O_4@APTES-GLU-PF$)</i>	69
5.11.3	<i>Resolução cinética enzimática dos ésteres racêmicos via reação de hidrólise empregando carboxilesteras recombinante</i>	70
5.12	Reações de resolução cinética enzimáticas do Capítulo 2	70
5.12.1	<i>Resolução cinética enzimática do carbamato de ketamina (rac-5) via reação de hidrólise empregando lipases comerciais</i>	70

5.12.2	<i>Resolução cinética enzimática da ketamina (rac-4) via reação de acetilação empregando lipases comerciais (CAL-B e TLL)</i>	70
5.12.3	<i>Resolução cinética enzimática do análogo da ketamina (rac-8)</i>	71
	REFERÊNCIAS	72
	ANEXO A – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-2A-FENILETANOL	76
	ANEXO B – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-2B-(3-METILFENIL)ETANOL	78
	ANEXO C – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-2C-(3-FLUOROFENIL)ETANOL	80
	ANEXO D – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-2D-(3-METÓXIFENIL)ETANOL	82
	ANEXO E – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-2E-(4-METILFENIL)ETANOL	84
	ANEXO F – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-2F(3-BROMOFENIL)ETANOL	86
	ANEXO G – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-2G-(2-METILFENIL)ETANOL	88
	ANEXO H – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-2H-(4-BROMOFENIL)ETANOL	90
	ANEXO I – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-2I-(2-METÓXIFENIL)ETANOL	92
	ANEXO J – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-2J-(4-FLUOROFENIL)ETANOL	94
	ANEXO K – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-2K-(2,5-DIMETILFENIL)ETANOL	96
	ANEXO L – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-3A-ACETATO DE 1-FENILETILA	98
	ANEXO M – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-3B-ACETATO DE (3-METILFENIL)ETILA	100
	ANEXO N – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-3C-ACETATO DE (3-FLUOROFENIL)ETILA	102
	ANEXO O – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-3D-ACETATO DE (3-METÓXIFENIL)ETILA	104

ANEXO P – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-3E-ACETATO DE (4-METILFENIL)ETILA	106
ANEXO Q – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-3F-ACETATO DE (3-BROMOFENIL)ETILA	108
ANEXO R – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-3G-ACETATO DE (2-METILFENIL)ETILA	110
ANEXO S – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-3H-ACETATO DE (4-BROMOFENIL)ETILA	112
ANEXO T – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-3I-ACETATO DE (2-METÓXIFENIL)ETILA	114
ANEXO U – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-3J-ACETATO DE (4-FLUOROFENIL)ETILA	116
ANEXO V – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-3K-ACETATO DE (2,5-DIMETILFENIL)ETILA	118
ANEXO W – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-4-2-(2-CLOROFENIL)-2-(METILAMINO)CICLOEXANONA (KETAMINA)	120
ANEXO X – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-5-ALIL (1-(2-CLOROFENIL)-2 OXOCICLOHEXIL) (METIL) CARBAMATO (CARBAMATO DE KETAMINA)	122
ANEXO Y – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-6-(1S, 2S)-2-(2-CLOROFENIL)-2-(METILAMINO) CICLO-HEXANOL E RAC-7-(1S, 2R)-2- (2-CLOROFENIL)-2-(METILAMINO) CICLO-HEXANOL	124
ANEXO Z – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-8- ACETATO DE 2-(2-CLOROFENIL)-2-(METILAMINO)CICLO-HEXILA	128

1 INTRODUÇÃO

A separação de racematos é essencial na produção de compostos enantiomericamente puros. Tornando-se fundamental na síntese de alguns compostos farmacêuticos, pois muitas vezes os enantiômeros possuem atividade biológica distinta. Em muitos casos, por exemplo, apenas um dos enantiômeros tem a atividade desejada, enquanto o outro enantiômero pode produzir efeitos colaterais indesejáveis. Assim, a produção de intermediários e compostos quirais enantiomericamente puros possuem grande relevância (BHUSHAN *et al.*, 2011).

O desenvolvimento de métodos que utilizam enzimas como catalisadores traz elegância em rotas sintéticas clássicas e além disso, benefícios ambientais com a redução de etapas e do custo na produção (ALDRIDGE, 2013). Essas características estão relacionadas com a química verde, onde os processos empregados visam diminuir e/ou eliminar resíduos e materiais tóxicos, metodologia sustentável e fontes renováveis de matéria prima (Figura 1).

Figura 1 – Vantagens da química verde



Fonte: Elaborado pelo autor

No intuito de se obter metodologias cada vez mais sustentáveis, processos que utilizam catalisadores biológicos tornam-se atrativos, pois, empregam enzimas que podem ser provenientes de microrganismos, células vegetais e animais.

Dentro desse contexto, a biocatálise surgiu e se estabeleceu como uma metodologia eficiente que utiliza enzimas como catalisadores, levando a produção de compostos alvo com alta quimio-, régio- e estereosseletividade. As condições reacionais são brandas, ocorrem à temperatura ambiente e à pressão atmosférica, evitando assim o uso de

condições reacionais extremas que podem causar problemas com isomerização, racemização, epimerização e rearranjos (BRAGA *et al.*, 2013).

1.1 Enzimas

Enzimas são catalisadores biológicos provenientes de proteínas que tem como principal função o controle metabólico celular. Possuem uma estrutura tridimensional contendo um sítio catalítico que caracteriza sua atividade específica (COELHO, SALGADO e RIBEIRO, 2008). Dependendo do tipo de reação que catalisam, podem ser divididas em seis classes principais conforme Tabela 1.

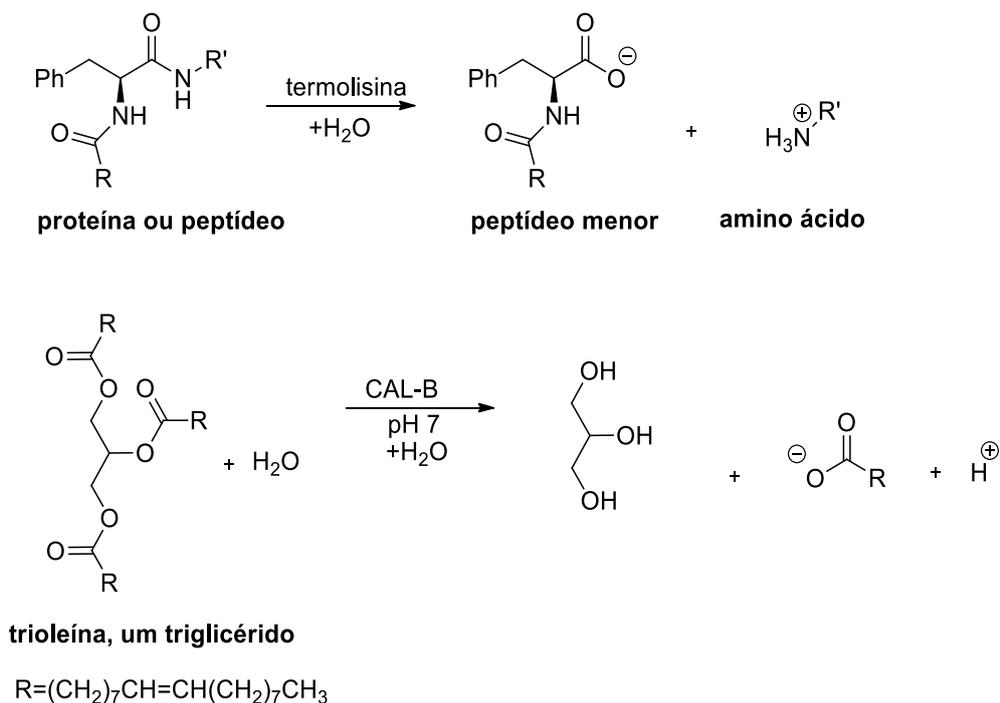
Tabela 1 – Classificação das enzimas

Classe	Função
Oxidoredutases	Catalisam reações de oxidação-redução
Transferases	Catalisam a transferência de grupo entre duas moléculas
Hidrolases	Catalisam reações de hidrólise
Liasas	Catalisam as reações envolvendo uma dupla ligação
Isomerases	Catalisam as reações envolvendo isomerização
Ligases / Sintetases	Catalisam reações envolvendo a união de duas moléculas, juntamente com a degradação de uma ligação fosfatada

Fonte: Adaptado de Dijkstra (2006).

O alvo de estudo nesse trabalho foram as hidrolases, que são uma ampla classe enzimática responsáveis por catalisar a clivagem da ligação em reações com água. Em geral, possuem função natural digestiva, como por exemplo, as proteases hidrolizam proteínas para peptídeos menores e posteriormente para aminoácidos, e as lipases, hidrolisam lipídios (triglicerídeos) para glicerol e ácidos graxos como ilustrado no Esquema 1 (BORNSCHEUER e KAZLAUSKAS, 2006).

Esquema 1 – Função natural da maioria das hidrolases



Fonte: Adaptado de Bornscheuer e Kazlauskas (2006).

A utilização de hidrolases é bastante aplicada na biocatálise, pois além de possuírem estrutura proteica simples, apresentam grande estabilidade em diversas condições reacionais, como o uso de solventes orgânicos, temperaturas elevadas e ainda podem atuar em uma ampla faixa de substratos (PITZER e STEINER, 2016).

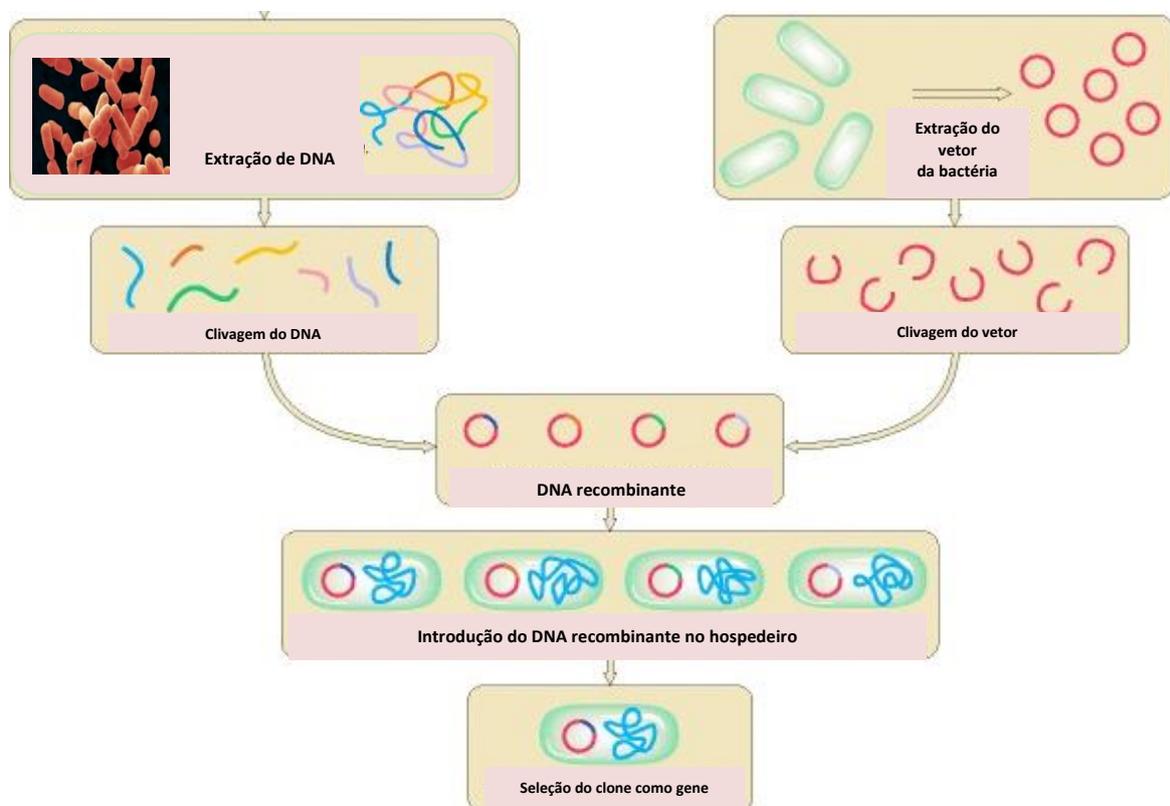
O uso de hidrolases, especialmente lipases, para a síntese de intermediários e fármacos quirais tem sido amplamente estudado e a utilização dessas enzimas é bastante reconhecida como uma metodologia eficiente e robusta (MARGOLIN, 1993). O uso de lipases também é bastante atrativo devido a não necessitarem de co-fatores e podem ser facilmente imobilizadas, em diversas matrizes, possibilitando o reuso.

1.2 Enzimas recombinantes

Nas duas últimas décadas, avanços em processos biológicos, tanto a nível molecular quanto celular, foram revolucionados pelo advento da tecnologia de DNA recombinante ou da engenharia genética. Esse campo da ciência faz parte da biotecnologia moderna, que é precisamente o uso de organismos vivos para produzir produtos aprimorados e valiosos para o consumo humano (ADRIO e DEMAIN, 2010).

Uma enzima recombinante é gerada a partir de um DNA recombinante. A primeira etapa ocorre quando gene da enzima em particular é retirado de uma fonte alvo, que pode ser bactérias, animais, plantas ou seres humanos, em seguida o gene é então ligado ao vetor de expressão, gerando um hospedeiro adequado (Figura 2). Em geral o hospedeiro escolhido é a *Escherichia coli*, pois além de ter um baixo custo de fermentação, quando comparado com o custo de fermentação dos mamíferos, ainda apresenta uma maior facilidade de manipulação (AMID, 2015).

Figura 2 – Ilustração esquemática de processo recombinante de DNA



Fonte: Adaptado de Griffiths *et al.*, (2000).

A alteração genética enzimática é uma técnica em que reduz o custo da produção das enzimas, contudo, ainda apresenta limitações, pois os substratos de interesse industrial não são naturais para essas enzimas, então mesmo que a atividade enzimática desejada seja encontrada, o rendimento ainda é bem baixo (BRAHMACHARI, DEMAINE e ADRIANO, 2016).

A utilização de enzimas recombinantes ocorre em diversas áreas, dentre elas, na indústria de alimentos, produtos de limpeza, como a LipolaseTM, utilizada em detergentes, que foi comercializada em 1988 pela atual Novozymes (NICHOLL, 2008).

1.3 Enzimas imobilizadas

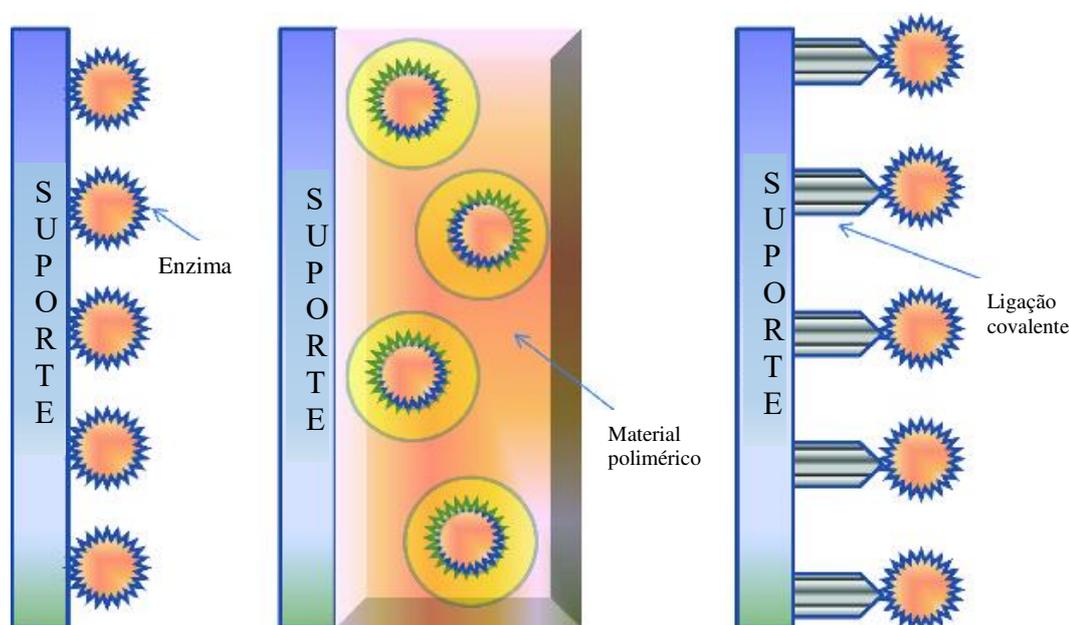
Além das diversas vantagens apresentadas no uso de enzimas, existe também alguns problemas práticos, dentre eles podemos citar sua instabilidade, o que prejudica sua aplicação industrial a longo prazo e seu processo de recuperação, que é importante para reutilização da enzima (KRAJEWSKA, 2004). A imobilização enzimática pode aumentar a vida útil do catalisador, possibilitando sua reativação após exaustão parcial de sua atividade, melhorando assim a estabilidade da enzima com a possibilidade de reuso (WILSON, ILLANES e ROMERO, 2013).

A escolha do método de imobilização apropriado é uma parte muito importante do processo de imobilização, pois desempenha o papel mais importante na determinação da atividade e das características da enzima em uma reação em particular. As especificações de processo para o catalisador, incluindo a atividade enzimática geral, a eficácia, as características de desativação e regeneração enzimática, o custo do procedimento de imobilização, a toxicidade dos reagentes de imobilização e as propriedades finais desejadas das enzimas imobilizadas são fatores que devem ser considerados (MOHAMAD *et al.*, 2015).

Basicamente, os métodos de imobilização podem ser divididos em duas classes gerais, a saber, os métodos químicos e físicos (MOHAMAD *et al.*, 2015). Os métodos físicos são caracterizados por interações mais fracas, tais como adsorção, aprisionamento e microencapsulação. Nos métodos químicos, estão envolvidas principalmente a formação de ligações covalentes (KRAJEWSKA, 2004).

Existem quatro técnicas principais para a imobilização de enzimas, a saber: adsorção, aprisionamento, ligações covalentes e *cross-linking* (Figura 3). No entanto, nenhum método é ideal para todas as moléculas ou finalidades, considerando a natureza inerentemente complexa da estrutura da proteína (MOHAMAD *et al.*, 2015).

Figura 3 – Esquema das três técnicas mais comuns de imobilização enzimática: (A) adsorção física, (B) aprisionamento e (C) ligação covalente/ *cross-linking*



Fonte: Adaptado de Mohamad *et al.*, (2015).

A nanotecnologia também ganhou importância no ramo das técnicas de imobilização enzimática, sendo utilizada na forma de diversos nanomateriais. Um dos fatores para o uso de nanopartículas é o fato de possibilitarem elevada razão volume/tamanho, reduzindo assim o tamanho dos biorreatores. Isso se torna possível devido a capacidade de carregar uma maior quantidade de biocatalisador por unidade de peso da transportadora (GUPTA *et al.*, 2011).

As propriedades de materiais nanoestruturados magnéticos também conferem fácil imobilização e separação enzimática (Li *et al.*, 2017). Além disso, em comparação com as técnicas convencionais de imobilização, a imobilização baseada em nanopartículas fornece três importantes atributos; (1) síntese fácil de partículas de nanoenzimas em alto conteúdo sólido sem o uso de surfactantes e reagentes tóxicos, (2) possível adaptação do tamanho das partículas dentro de limites efetivos de trabalho e (3) obtenção de nanopartículas com núcleo homogêneo e bem definido com uma camada de enzima espessa. Além disso, com a crescente atenção dada à reação enzimática em cascata e à biologia sintética *in vitro*, a co-imobilização de multi-enzimas nessas nanopartículas são possíveis (MOHAMAD *et al.*, 2015; ANSARI e HUSAIN, 2012).

2 OBJETIVOS

No capítulo 1 foram estudados a obtenção de álcoois enantiomericamente puros, os objetivos foram:

- Sintetizar álcoois e ésteres da acetofenona e derivados utilizados como padrão;
- Realizar resolução cinética via hidrólise dos ésteres obtidos como padrão utilizando a enzima comercial (CAL-B) para comparação com a enzima recombinante de *Bacillus coagulans*;
- Realizar resolução cinética via acetilação de três ésteres, utilizando a enzima comercial *Pseudomonas fluorescens*, livre e imobilizada disponível comercialmente, para então comparar os resultados com *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em nanopartículas magnéticas ($\text{Fe}_3\text{O}_4@$ APTES-GLU-PF)

O Capítulo 2 baseou-se no estudo da ketamina e análogos, tendo como objetivos:

- Obter a ketamina em sua forma livre, através de uma extração a partir da ketamina disponível em sua forma de cloridrato;
- Obter o carbamato de ketamina a partir de uma reação de carbamatação;
- Realizar reações de hidrólise com carbamato de ketamina utilizando diferentes lipases;
- Realizar reação de acetilação da ketamina com duas lipases;
- Sintetizar análogos da ketamina e realizar resolução cinética via hidrólise.

Capítulo 1

Obtenção de álcoois e ésteres quirais utilizando lipases

3 CAPÍTULO 1: OBTENÇÃO DE ÁLCOOIS E ÉSTERES QUIRAIS UTILIZANDO LIPASES

3.1 Aspectos gerais

Como dito anteriormente, uso de enzimas na obtenção de compostos enantiomericamente puros ou enriquecidos apresenta diversas vantagens, visto que as enzimas podem atuar em uma faixa de pH entre 5-8, temperatura entre 20 e 40°C, além de serem ambientalmente mais favoráveis pois, diferente de outros catalisadores como os metais pesados, são completamente biodegradáveis (FABER, 2011).

Dentre as enzimas utilizadas para este fim, podemos destacar as lipases, pertencentes a classe das hidrolases. Isso se deve ao fato de que existe uma grande quantidade de enzimas disponíveis para tal finalidade, além disso, não requerem o uso de um cofator (SOLANO e LOURENÇO, 2015).

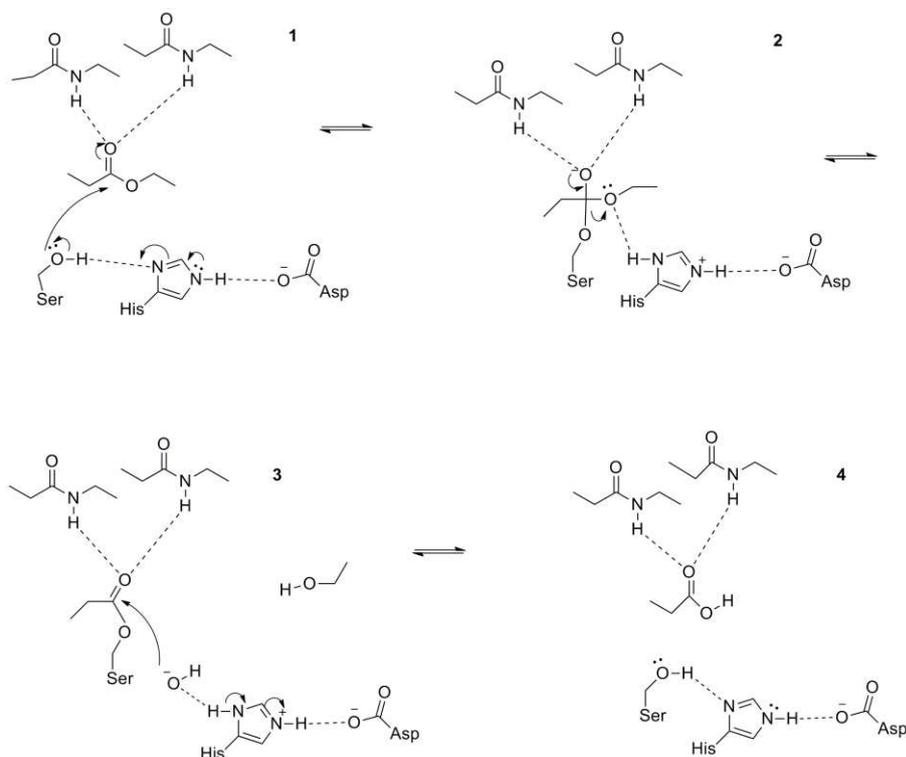
3.1.1 Lipases

Lipases são serina hidrolases definidas como triacilglicerol acilhidrolases (E.C. 3.1.1.3). Podem ser sintetizadas por animais, plantas e microrganismos. São enzimas utilizadas em diversos setores, como no ramo da farmácia, química fina, saúde em geral, alimentos, cosméticos, meio ambiente e energia (ROBIC *et al.*, 2017).

O mecanismo de ação das lipases encontra-se no Esquema 2, o processo inicia-se etapa 1, com a formação de uma ligação de hidrogênio com uma histidina adjacente o grupamento hidroxila da serina é ativado. Ocorre então um ataque nucleofílico ao átomo de carbono da carbonila do substrato com ruptura da ligação C=O e a formação de um intermediário tetraédrico. Etapa 2, o intermediário tetraédrico, tem a carga negativa no oxigênio que é estabilizada por interações com dois grupos peptídeos NH; a histidina doa então um próton para a porção álcool proveniente do substrato que é então liberado. 3) o intermediário covalente formado, denominado de acil enzima, apresenta um componente ácido que é esterificado com o resíduo de serina da enzima. A molécula de água é ativada pelo resíduo de histidina adjacente e o íon hidroxila resultante promove um ataque nucleofílico ao átomo de carbono da carbonila do intermediário covalente. 4) o resíduo de histidina doa um próton para o átomo de oxigênio da serina que está ativa, ocorre clivagem da ligação éster

entre a serina e o componente acila, gerando o produto acil (JAEGER, DIJKSTRA, e REETZ, 1999; SANDOVAL, 2012).

Esquema 2 – Mecanismo de reação de lipases



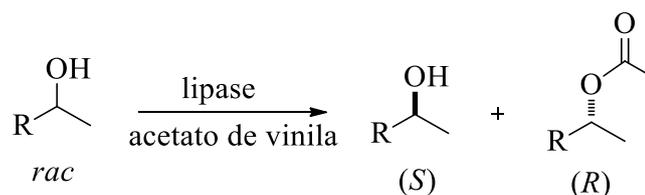
Fonte: Adaptado de Jaeger, Dijkstra e Reetz (1999).

Aplicações de lipases na síntese assimétrica incluem resolução cinética de álcoois, ácidos, amins e ésteres racêmicos, bem como a dessimetriação de compostos pró-quirais, evidenciando a versatilidade das lipases como catalisadores.

3.1.1.2 Resolução cinética

No processo de resolução cinética, ocorre a obtenção de determinada pureza óptica a partir de um racemato, através da diferença de velocidades de reação dos enantiômeros (*R* e *S*) como representado no Esquema 3 a resolução cinética de um álcool (CABRERA e PALOMO, 2011).

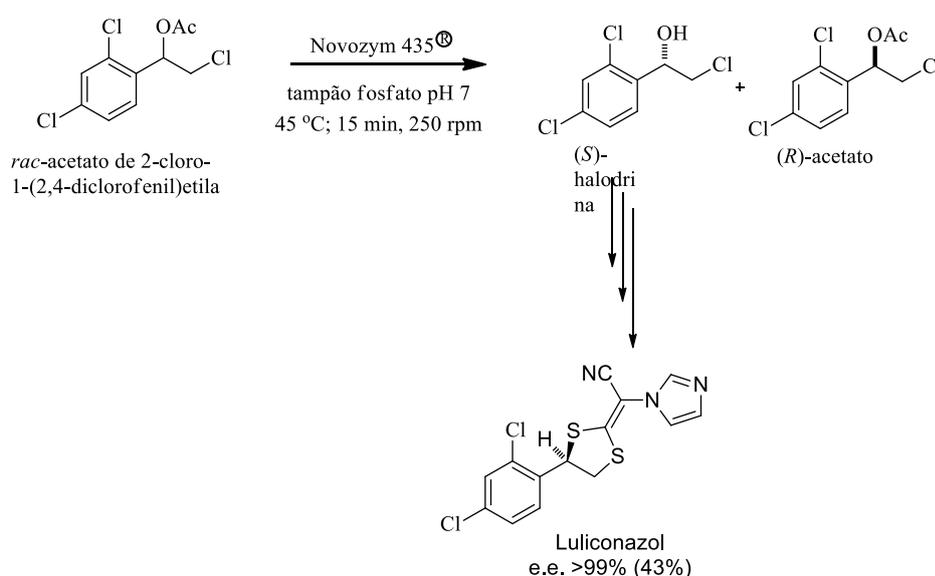
Esquema 3 – Representação geral de uma resolução cinética enzimática



Fonte: Adaptado de Cabrera e Palomo (2011).

O Luliconazol (Esquema 4), possui ação antifúngica, sendo utilizado para o tratamento da *tinea pedis*, popularmente conhecida como pé de atleta, além do tratamento da candidíase e da pitiríase. Este composto é comercializado sob a marca Luzu® (Valeant Pharmaceuticals North America) e Lulicon® (Pola Pharma). A síntese quimioenzimática direta do luliconazol foi desenvolvida utilizando a lipase de *Thermomyces lanuginosus* ou Novozym 435® e usando como material de partida o acetato de 2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etila racêmico, obtendo a respectiva (*S*)-halodrina com alta seletividade (*e.e.*> 99%, *E*>200) após apenas 15 min, a 45 °C. Após mais algumas etapas o luliconazol foi obtido com 43% de rendimento com > 99% de excesso enantiomérico (FONSECA *et al.*, 2018).

Esquema 4 – Síntese quimioenzimática utilizando Novozym 435®

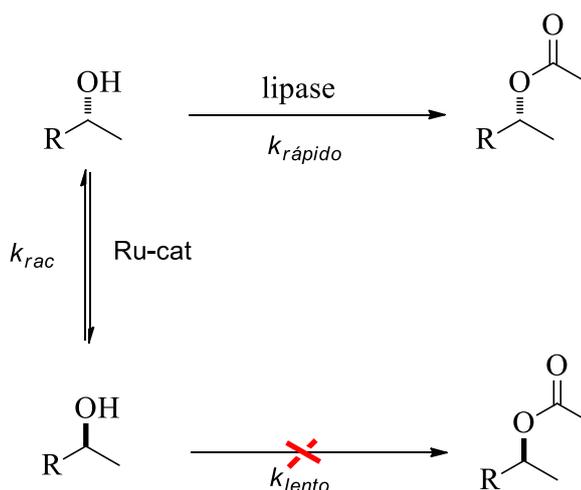


Fonte: Adaptado de Fonseca *et al.*, (2018).

3.1.1.2 Resolução cinética dinâmica

Quando apenas um enantiômero é desejado, a resolução cinética enzimática é vista como desvantagem, porém, várias estratégias foram estudadas e desenvolvidas para superar essa limitação, como por exemplo a resolução cinética dinâmica. A resolução cinética dinâmica (Esquema 5), consiste na realização de racemização contínua *in situ* do substrato, desta maneira, todo o racemato (substrato) pode ser utilizado para a transformação de apenas um dos enantiômeros. Na última década, essa estratégia é amplamente utilizada na catálise assimétrica sendo uma abordagem comum o uso de lipases e catalisadores organometálicos, ou ainda modificações nas condições reacionais, como meio básico e controle de temperatura para realizar a racemização do substrato (CABRERA e PALOMO, 2011).

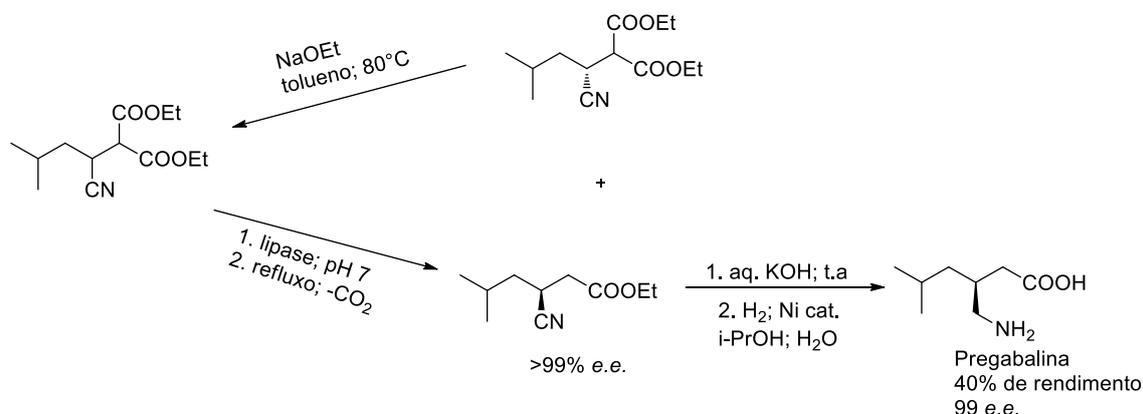
Esquema 5 – Representação esquemática de uma resolução cinética dinâmica



Fonte: Adaptado de Cabrera e Palomo (2011).

Um exemplo específico de aplicação de lipases em resolução cinética enzimática dinâmica, está descrito no Esquema 6, onde pode-se observar a eficiência do processo na resolução cinética dinâmica do diéster (racemato) utilizando a lipase proveniente de *Thermomyces lanuginosus* na separação dos enantiômeros. O enantiômero que possui a constante de velocidade mais lenta (k_{lento}), passa pelo processo de racemização empregando uma quantidade catalítica de etóxido de sódio em tolueno a 80° C, possibilitando o reuso do substrato (diéster) para a etapa resolução cinética. O produto final da reação, a pregabalina, foi obtida com um rendimento global de 40 % e excesso enantiomérico de 99% (DUNN, WELLS e WILLIAMS, 2010).

Esquema 6 – Preparação da pregabalina por meio de resolução cinética utilizando a lipase de *T. lanuginosus*



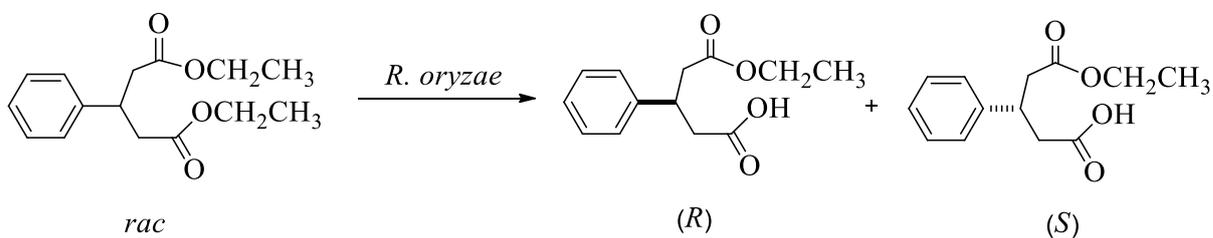
Fonte: Adaptado de Dunn, Wells e Williams (2010).

O exemplo supracitado (Esquema 6), demonstra o porquê do interesse de indústrias farmacêuticas em lipases na obtenção de intermediários e fármacos enantiometricamente puros, a partir de estereoisômeros isolados.

3.1.1.3 Dessimetração enzimática

Além da separação de racematos, as lipases também são capazes de realizar a dessimetração enzimática enantiosseletiva partindo de compostos pró-quirais (Esquema 7) (DUNN, WELLS e WILLIAMS, 2010).

Esquema 7 – Dessimetração de diésteres via lipase de *Rhizopus oryzae*

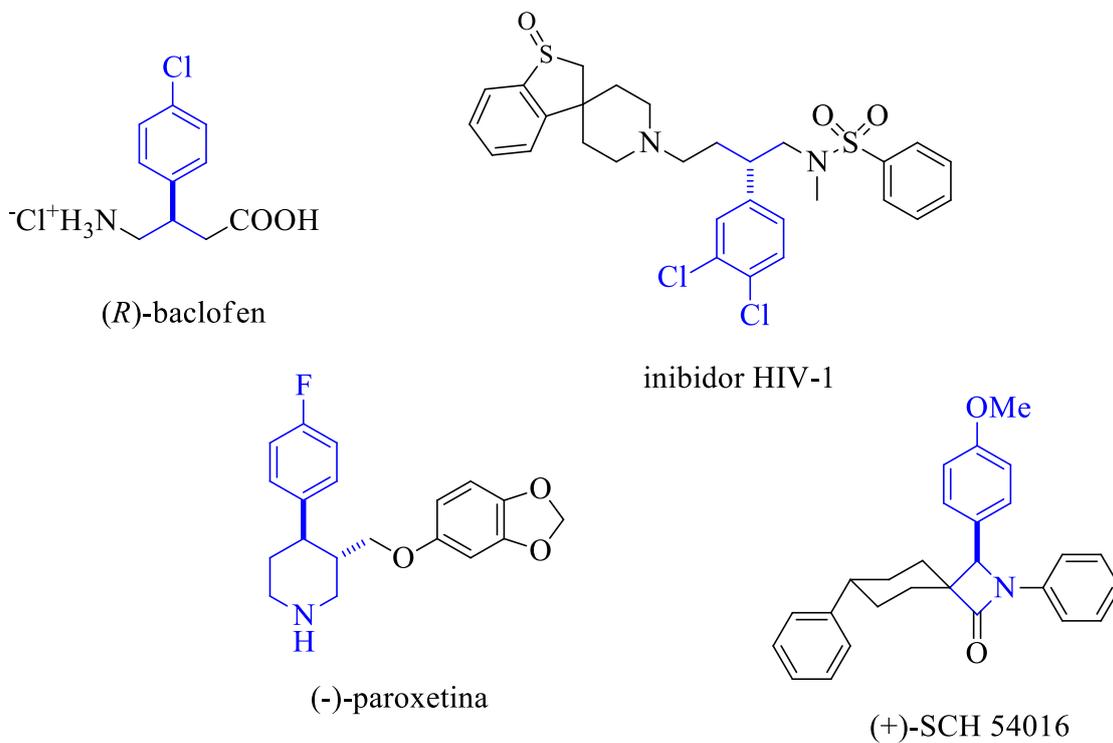


Fonte: Adaptado de Cabrera e Palomo (2011).

A dessimetração de compostos pró-quirais, por exemplo, os compostos de ácido fenilglutárico, importantes blocos de construção para a síntese de vários compostos

biologicamente ativos (Figura 4). Essa estratégia tem a vantagem de permitir a conversão de 100% composto desejado, em vez do máximo de 50% na resolução cinética de racematos.

Figura 4 – Compostos bioativos contendo a porção de ácido 3-arylglutárico como bloco construtor quiral



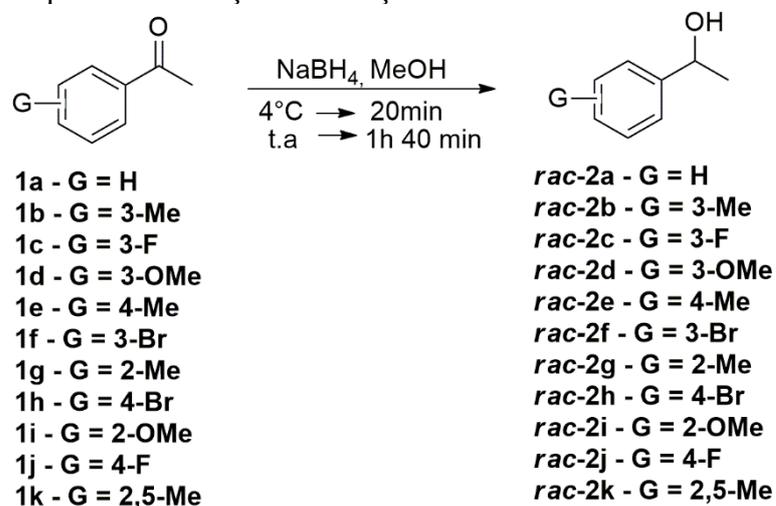
Fonte: Adaptado de Cabrera e Palomo (2011).

3. 2 Resultados e discussão

3.2.1 Síntese dos alcoóis racêmicos 2a-k

Inicialmente, foram utilizados como substratos a acetofenona e derivados (**1a-k**, Esquema 8). A partir de **1a-k**, os álcoois racêmicos (**2a-k**, Esquema 5) foram obtidos utilizando 0,5 eq. de NaBH₄ em metanol por 2 horas, todo material de partida (**1a-k**) foi consumido e os rendimentos foram superiores a 80%. Os álcoois foram purificados por cromatografia em coluna.

Esquema 8 – Reação de redução da acetofenona e derivados



Fonte: Elaborado pelo autor

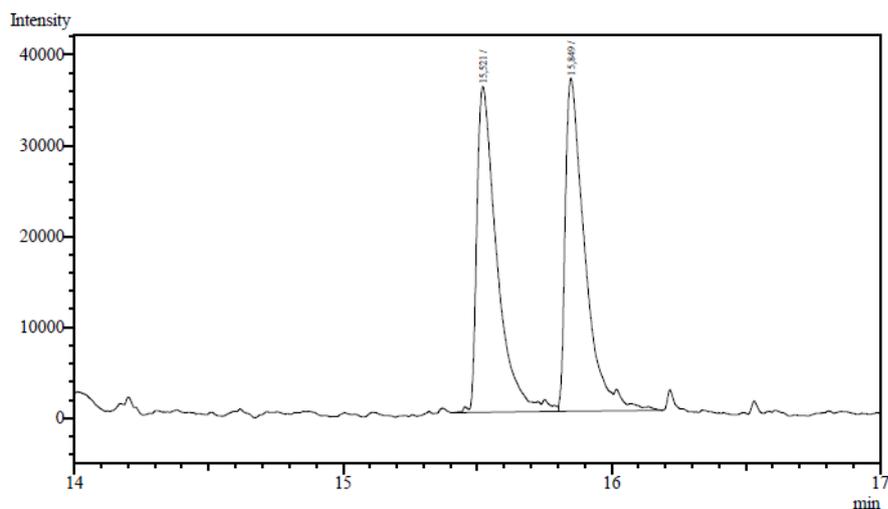
Os rendimentos das reações de redução foram considerados entre bons e ótimos. Os resultados desses rendimentos estão ilustrados Tabela 2, com valores no intervalo de 83 % e maiores que 99%.

Tabela 2 – Rendimento dos alcoóis racêmicos 2a-k

Entrada	Álcoois padrões	Rendimento (%)
1	<i>rac-2a</i>	96
2	<i>rac-2b</i>	90
3	<i>rac-2c</i>	88
4	<i>rac-2d</i>	83
5	<i>rac-2e</i>	95
6	<i>rac-2f</i>	>99
7	<i>rac-2g</i>	98
8	<i>rac-2h</i>	96
9	<i>rac-2i</i>	98
10	<i>rac-2j</i>	86
11	<i>rac-2k</i>	86

Os padrões dos álcoois foram analisados por RMN ^1H e ^{13}C para a confirmação de suas estruturas (anexo) e posteriormente foram analisados através de cromatografia gasosa (CG-FID), equipado com coluna quiral CP-Chiralsil-Dex CB. Na Figura 5 pode-se observar o cromatograma *rac*-1-feniletanol **2a**, em que os pares de enantiômeros apresentaram tempos de retenção de 15,5 e 15,8 minutos, e áreas equivalentes, o que é esperado para um racemato.

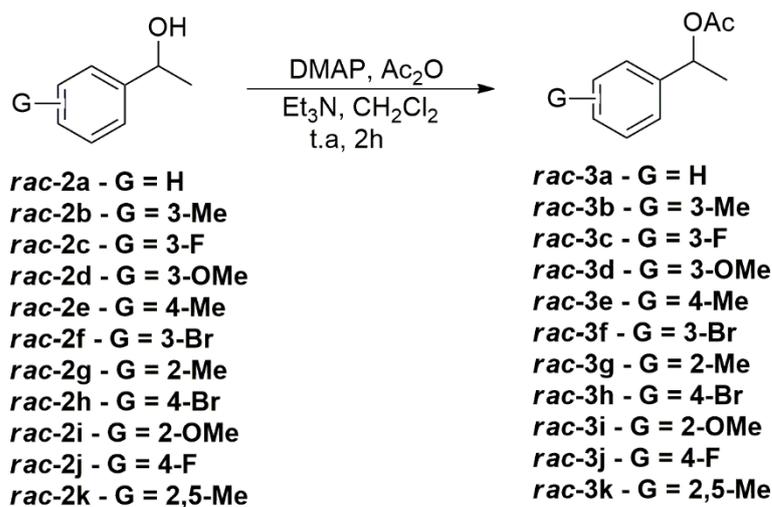
Figura 5 – Cromatograma em coluna quiral CP-Chiralsil-Dex CB do *rac*-1-feniletanol **2a**



Fonte: Elaborado pelo autor

3.2.2 Síntese dos ésteres racêmicos **3a-k**

Visando realizar reações de hidrólise utilizando a enzima comercial CAL-B para posterior comparação com a enzima recombinante de *Bacillus coagulans*, foram realizadas reações de acetilação partindo-se dos álcoois racêmicos **2a-k**, usando anidrido acético como doador de acila, 4-dimetilaminopiridina (DMAP) e trietilamina em diclorometano por um período de 2 horas, produzindo os ésteres racêmicos **3a-k** como ilustrado no Esquema 9. Em seguida, foi feita cromatografia em coluna para purificação do produto.

Esquema 9 – Reação de acetilação dos álcoois racêmicos **2a-k**

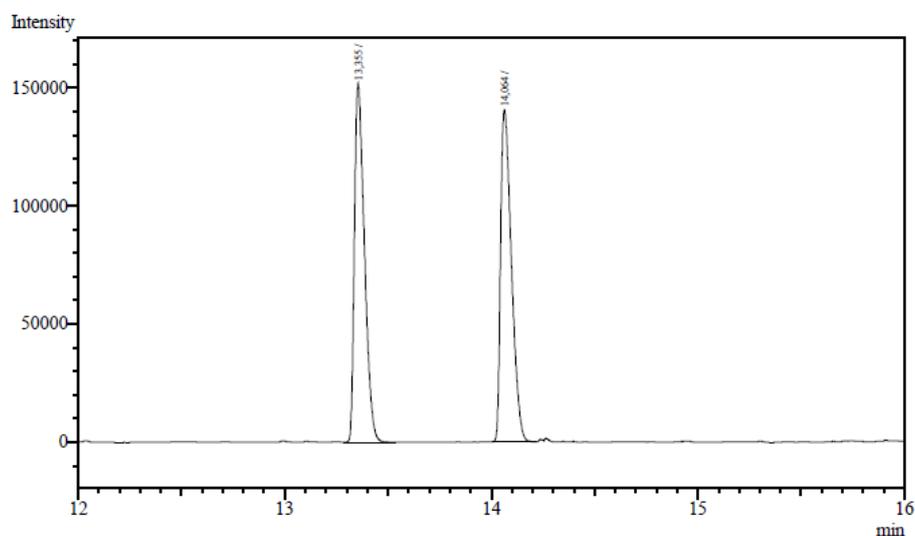
Fonte: Elaborado pelo autor

Os rendimentos dos ésteres racêmicos **3a-k** foram entre bons e ótimos e estão representados na Tabela 3. Os padrões dos ésteres foram analisados por RMN ^1H e ^{13}C (ver anexo) para a confirmação de suas estruturas, e em seguida avaliados através de cromatografia gasosa (CG-FID), equipado com coluna quiral CP-Chiralsil-Dex CB. Na Figura 6 pode-se observar o cromatograma do acetato de 1-feniletila **3a**, em que os enantiômeros apresentaram tempos de retenção de 13,4 e 14,1 minutos, e áreas proporcionais, o que é esperado para um racemato.

Tabela 3 – Rendimento dos ésteres racêmicos **3a-k**

Entrada	Ésteres padrões	Rendimento (%)
1	<i>rac-3a</i>	82
2	<i>rac-3b</i>	75
3	<i>rac-3c</i>	78
4	<i>rac-3d</i>	>99
5	<i>rac-3e</i>	80
6	<i>rac-3f</i>	88
7	<i>rac-3g</i>	70
8	<i>rac-3h</i>	>99
9	<i>rac-3i</i>	>99
10	<i>rac-3j</i>	90
11	<i>rac-3k</i>	87

Figura 6 – Cromatograma em coluna quiral CP-Chiralsil-Dex CB do *rac*-acetato de 1-feniletila **3a**



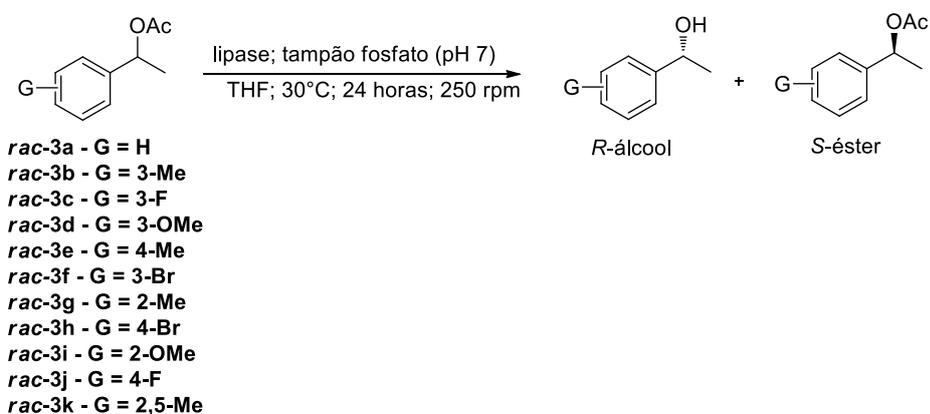
Fonte: Elaborado pelo autor

3.2.3 Reações enzimáticas

3.2.3.1 Reações de hidrólise utilizando lipase de *Candida antarctica B* (CAL-B)

O experimento utilizado nas reações de hidrólise foi realizado utilizando 30 mg dos ésteres *rac*-**3a-k**, 60mg da CAL-B (enzima comercial) em solução tampão fosfato pH 7 e THF como cossolvente (Esquema 10).

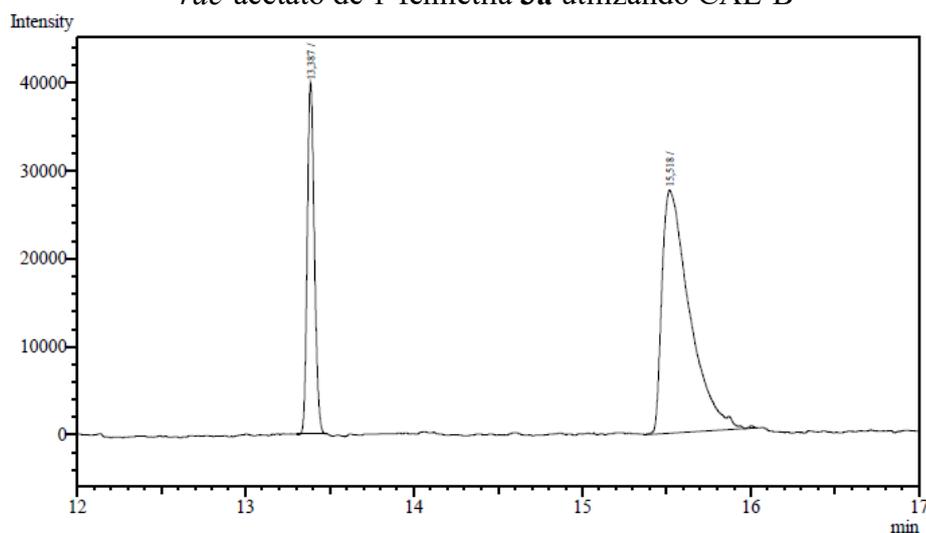
Esquema 10 – Reação de hidrólise de *rac*-**3a-k** com CAL-B



Fonte: Elaborado pelo autor

Os produtos obtidos foram analisados por CG-FID com coluna quiral (CP-Chiralsil-Dex CB) usando o mesmo método já estabelecido para os padrões dos álcoois *rac-2a-k* e dos ésteres *rac-3a-k*. O cromatograma da reação com o éster *rac-3a* está representado na Figura 7, como se pode observar o pico com tempo de retenção 13,3 minutos é referente ao acetato de (*S*)-1-feniletila, e com tempo de retenção 15,5 minutos foi observado o (*R*)-1-feniletanol.

Figura 7 – Cromatograma em coluna quiral CP-Chiralsil-Dex CB da reação de hidrólise do *rac*-acetato de 1-feniletila **3a** utilizando CAL-B



Fonte: Elaborado pelo autor

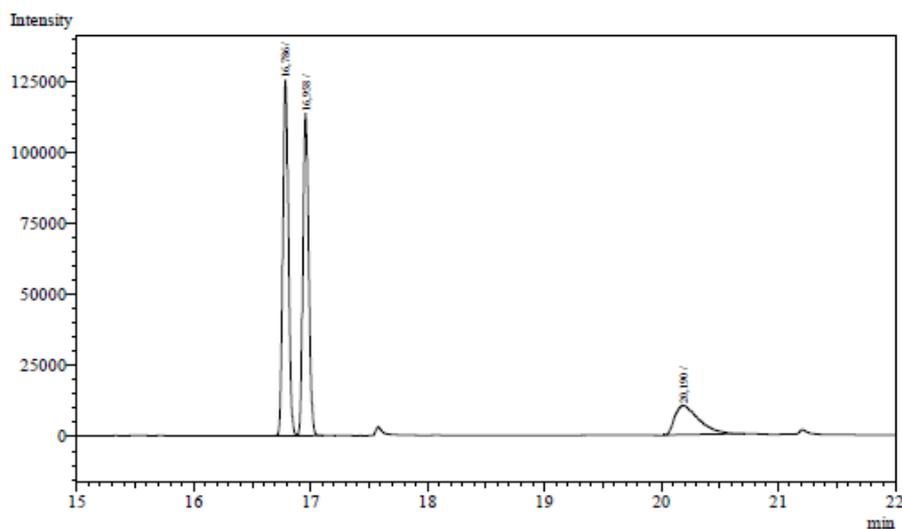
De acordo com o cromatograma, pode-se perceber ainda que a enzima mostrou-se bastante eficaz frente a esse substrato, já que a conversão foi de 50%, enquanto que a enantiosseletividade foi >200 e os excessos enantioméricos, tanto dos álcoois obtidos via hidrólise quanto do éster remanescente foram >99%. O excesso enantiomérico (*e.e.*), conversão (C) e a enantiosseletividade (E) obtidos para os outros substratos estão representados na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados obtidos da reação de hidrólise do *rac-3a-k* utilizando a CAL-B

Entrada	Éster	<i>e.e.</i> éster(%) ¹	<i>e.e.</i> álcool(%) ¹	<i>c</i> (%) ²	<i>E</i> ³
1	<i>rac-3a</i>	>99	>99	50	>200
2	<i>rac-3b</i>	>99	>99	50	>200
3	<i>rac-3c</i>	90	>99	48	>200
4	<i>rac-3d</i>	>99	>99	50	>200
5	<i>rac-3e</i>	94	>99	49	>200
6	<i>rac-3f</i>	>99	>99	50	>200
7	<i>rac-3g</i>	69	>99	41	>200
8	<i>rac-3h</i>	>99	>99	50	>200
9	<i>rac-3i</i>	99	99	50	>200
10	<i>rac-3j</i>	>99	>99	50	>200
11	<i>rac-3k</i>	3,70	>99	0,036	>200

¹ Determinado por GC; ² Conversão, $c = e.e. \text{ cetilado} / (e.e. \text{ acetilado} + e.e. \text{ álcool})$; ³ Razão enantiomérica, $E = \ln[1 - c(1 + e.e. \text{ álcool})] / \ln[1 - c(1 - e.e. \text{ álcool})]$.

Todas as reações com a CAL-B mostraram bons resultados de excesso enantiomérico, conversão e enantiosseletividade com exceção do substrato *rac-3k*. Provavelmente devido a efeitos estéricos nesse substrato, já que o mesmo apresenta duas metilas nas posições 2 e 5, o que dificulta o acoplamento enzima-substrato (Figura 8).

Figura 8 – Cromatograma em coluna quiral CP-Chirasil-Dex CB da reação de hidrólise do *rac*-acetato de 1-feniletila **3k** utilizando CAL-B

Fonte: Elaborado pelo autor

As configurações dos centros estereogênicos dos álcoois (**R**)-**2 a-k** e dos ésteres remanescentes (**S**)-**3 a-k** obedeceram a regra empírica de Kazlauskas (KAZLAUSKAS *et al.*, 1991). Tais configurações foram realizadas através da comparação das medidas das rotações ópticas, pelo método da polarimetria (Tabela 12, ver procedimento experimental página 60), com os valores já descritos na literatura; ou ainda baseadas na regra de Kazlauskas, que sugere nas reações de hidrólise utilizando lipases, a formação do álcool com configuração (*R*) e do éster remanescente com configuração (*S*). Em reações de acetilação, ocorrerá a formação do éster com configuração (*R*) e o álcool remanescente terá configuração (*S*) (MACHADO *et al.*, 2008).

3.2.3.2 Reações de hidrólise utilizando carboxilesterase recombinante

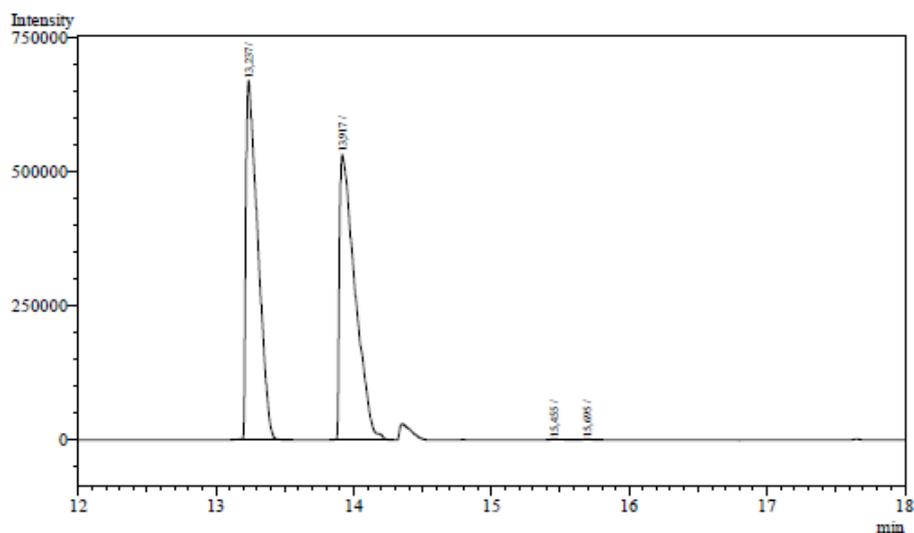
Em parceria com o professor Molinari, da Universidade de Milão, realizou-se a resolução cinética, via hidrólise, utilizando uma carboxilesterase recombinante de *Bacillus coagulans*.

Carboxilesterases (éster carboxílico hidrolase, EC 3.1.1.1) são um grupo de enzimas que hidrolisam ligações de ésteres com especificidade de substrato relativamente ampla. Essas enzimas são membros da família α/β hidrolase e podem hidrolisar alifáticos de cadeia curta e ésteres aromáticos (BORNSCHEUER e KAZLAUSKAS 2006). Tanto as carboxilesterases de mamíferos quanto as de bactérias têm enorme interesse por causa de sua importância fisiológica, papéis industriais e médicos na síntese e hidrólise de compostos estereoespecíficos incluindo o processamento metabólico de fármacos e agentes antimicrobianos (BORNSCHEUER e KAZLAUSKAS 2006).

Com base na literatura e com todo o estudo realizado com a CALB, iniciou-se os testes com a carboxilesterase recombinante de *B. Coagulans*. As reações foram realizadas nas melhores condições de temperatura, agitação, pH e tempo de reação vistas para o substrato modelo **3a**, utilizando a CALB.

Na Figura 9, tem-se o cromatograma da reação de hidrólise utilizando a carboxilesterase recombinante, e podemos observar no espectro os sinais correspondentes ao material de partida **3a** e quase não se obteve o álcool correspondente ao produto de hidrólise na faixa de 15-16 minutos de corrida cromatográfica.

Figura 9 – Cromatograma em coluna quiral CP-Chiralsil-Dex CB da reação de hidrólise do *rac*-1-acetato de feniletila **3a** utilizando carboxilesterase recombinante



Fonte: Elaborado pelo autor

As reações foram repetidas utilizando as células em crescimento e não mais o sobrenadante, visto a possibilidade de expressão dessas enzimas ocorrerem de forma intracelular e não extracelular (YIKE, ZHANG e DEARBORN, 1996; O'CONNOR e TIMMIS, 1987). Contudo, as enzimas não apresentaram atividade, enquanto tentava-se otimizar as condições de expressão e atividade enzimática, foi dado início ao estudo de resolução cinética via acetilação utilizando a lipase de *Pseudomonas fluorescens* em suas formas: livre, imobilizada comercialmente e imobilizada em nanopartículas magnéticas.

3.2.3.3 Resolução cinética, via acetilação, utilizando *Pseudomonas fluorescens* livre, imobilizada comercial e imobilizada em nanopartículas magnéticas ($Fe_3O_4@APTES-GLU-PF$)

Além do uso da CAL-B, foi realizada a resolução cinética enzimática do **2a**, **2b** e **2f** empregando a enzima *P. fluorescens* com o intuito de comparar sua atividade na forma livre e na forma imobilizada em imobead 150 disponível comercialmente, frente a sua atividade quando imobilizada em nanopartículas magnéticas ($Fe_3O_4@APTES-GLU-PF$).

Inicialmente, a reação ocorreu com a *P. fluorescens* em sua forma livre, utilizando as seguintes condições: relação 2:1 (m/m) enzima/substrato, hexano previamente seco como solvente orgânico e acetato de vinila como doador de acila. Para os três substratos, as reações foram feitas nas temperaturas de 30, 40 e 50°C (Tabela 5, 6 e 7).

Tabela 5 – Resolução cinética do *rac*-feniletanol (**2a**), via acetilação, utilizando *P. fluorescens* livre

Entrada	Temperatura (°C)	Tempo (h)	<i>e.e.s</i> (%) ¹	<i>e.e.p</i> (%) ¹	<i>c</i> (%) ²	E ³
1	30	1	63	>99	39	>200
2		2	91	>99	48	>200
3		3	>99	>99	50	>200
4	40	1	81	>99	45	>200
5		2	>99	>99	50	>200
6	50	1	94	97	49	>200
7		2	>99	95	51	>200

¹ Determinado por GC; ² Conversão, $c = e.e.\text{acetilado}/(e.e.\text{acetilado} + e.e.\text{álcool})$; ³ Razão enantiomérica, $E = \ln[1-c(1+e.e.\text{álcool})]/\ln[1-c(1-e.e.\text{álcool})]$.

Tabela 6 – Resolução cinética do *rac*-(3-metilfenil)etanol (**2b**), via acetilação, utilizando *P. fluorescens* livre

Entrada	Temperatura (°C)	Tempo (h)	<i>e.e.s</i> (%) ¹	<i>e.e.p</i> (%) ¹	<i>c</i> (%) ²	E ³
1	30	1	69	>99	41	>200
2		2	92	>99	48	>200
3		3	99	99	50	>200
4	40	1	86	>99	47	>200
5		2	>99	>99	50	>200
6	50	1	80	>99	45	>200
7		2	97	98	50	>200

¹ Determinado por GC; ² Conversão, $c = e.e.\text{acetilado}/(e.e.\text{acetilado} + e.e.\text{álcool})$; ³ Razão enantiomérica, $E = \ln[1-c(1+e.e.\text{álcool})]/\ln[1-c(1-e.e.\text{álcool})]$.

Tabela 7 – Resolução cinética do *rac*-(3-bromofenil)etanol (**2f**), via acetilação, utilizando *P. fluorescens* livre

Entrada	Temperatura (°C)	Tempo (h)	<i>e.e.s</i> (%) ¹	<i>e.e.p</i> (%) ¹	<i>c</i> (%) ²	E ³
1		1	63	>99	39	>200
2	30	2	93	>99	48	>200
3		3	>99	>99	50	>200
4	40	1	78	>99	44	>200
5		2	98	>99	50	>200
6		1	65	>99	40	>200
7	50	2	90	99	48	>200
8		3	98	98	50	>200

¹ Determinado por GC; ² Conversão, $c = e.e.\text{acetilado}/(e.e.\text{acetilado} + e.e.\text{álcool})$; ³ Razão enantiomérica, $E = \ln[1-c(1+e.e.\text{álcool})]/\ln[1-c(1-e.e.\text{álcool})]$.

O estudo da resolução cinética de *rac-2a*, *rac-2b* e *rac-2f* foi realizado na presença da lipase de *P. fluorescens* na forma livre, em hexano, via reação de acetilação, variando a temperatura de 30 a 50°C. Verificou-se que em todos os casos, a 40°C, as conversões atingiram 50% em 2 h de reação, levando aos respectivos produtos (*R*)-acetatos e correspondentes (*S*)-álcoois remanescentes com valores excessos enantioméricos >99% e valores de E>200.

Esses experimentos mostram as melhores condições reacionais na temperatura de 40°C e tempo de 2 horas. Encontrando-se o máximo de conversão (50%), *e.e.* do substrato e do produto >99 e enantiosseletividade >200.

A partir desses dados, foram realizadas as reações com *rac-2a*, *rac-2b* e *rac-2f*, utilizando: a) A *P. fluorescens* imobilizada em imobead 150, disponível comercialmente b) *P. fluorescens* imobilizada em nanopartículas magnéticas (Fe₃O₄@APTES-GLU-PF) cedida pelo grupo de química de materiais avançados (GQMAT), coordenado pelo Prof. Pierre Fachine. Os resultados podem ser vistos nas Tabelas 8 e 9 respectivamente.

Na Tabela 8, encontram-se os resultados do estudo realizado utilizando a enzima imobilizada comercialmente, indicando que o tempo de reação aumentou de 2 horas para 19 horas. Contudo, as conversões foram 48-50%, levando aos respectivos produtos (*R*)-acetatos e

correspondentes (*S*)-álcoois remanescentes com valores excessos enantioméricos >99% e valore de E >200.

Tabela 8 – Resolução cinética de *rac-2a*, *rac-2b* e *rac-2f*, via acetilação, usando *P. fluorescens* imobilizada em imobead 150 na temperatura de 40°C

Entrada	Substrato	Tempo (h)	<i>e.e.s</i> (%) ¹	<i>e.e.p</i> (%) ¹	<i>c</i> (%) ²	E ³
1		1	62	>99	38	>200
2		3	86	>99	46	>200
3		6	92	>99	48	>200
4	<i>rac-2a</i>	8	94	>99	49	>200
5		19	93	99	48	>200
6		1	22	>99	18	>200
7		3	46	>99	31	>200
8		6	73	>99	42	>200
9	<i>rac-2b</i>	8	94	>99	49	>200
10		19	98	>99	50	>200
11		1	18	>99	15	>200
12		3	41	>99	29	>200
13	<i>rac-2f</i>	6	65	>99	40	>200
14		8	74	>99	43	>200
15		19	91	>99	48	>200
16		24	93	>99	48	>200

¹ Determinado por GC; ² Conversão, $c = e.e. \text{ acetilado} / (e.e. \text{ acetilado} + e.e. \text{ álcool})$; ³ Razão enantiomérica, $E = \ln[1-c(1+e.e. \text{ álcool})] / \ln[1-c(1-e.e. \text{ álcool})]$.

Na Tabela 9, tem-se os resultados da avaliação de desempenho da lipase de *P. fluorescens* imobilizada em nanopartículas magnéticas (Fe₃O₄ @ APTES-GLU-PF) na resolução cinética de *rac-2a*, *rac-2b* e *rac-2f*. As reações foram realizadas em hexano a 40°C,

250 rpm e usando acetato de vinila como doador de acila. Alíquotas foram regularmente retiradas para monitorar as reações, que foram analisadas por cromatografia gasosa com coluna quiral.

Tabela 9 – Resolução cinética de *rac-2a*, *rac-2b* e *rac-2f*, via acetilação, usando *P. fluorescens* imobilizada em nanopartículas magnéticas (Fe₃O₄@APTES-GLU-PF)

Entrada	Substrato	Tempo (h)	<i>e.e.s</i> (%) ¹	<i>e.e.p</i> (%) ¹	<i>c</i> (%) ²	E ³
1		12	80	>99	45	>200
2		19	89	>99	47	>200
3	<i>rac-2a</i>	24	91	>99	48	>200
4		48	94	>99	49	>200
5		12	51	>99	34	>200
6	<i>rac-2b</i>	19	65	>99	40	>200
7		24	69	>99	41	>200
8		48	79	>99	44	>200
9		12	61	>99	38	>200
10	<i>rac-2f</i>	19	69	>99	41	>200
11		24	73	>99	42	>200
12		48	7	>99	44	>200

¹ Determinado por GC; ² Conversão, $c = e.e.\text{acetilado}/(e.e.\text{acetilado} + e.e.\text{álcool})$; ³ Razão enantiomérica, $E = \ln[1-c(1+e.e.\text{álcool})]/\ln[1-c(1-e.e.\text{álcool})]$.

A lipase de *P. fluorescens* imobilizada em nanopartículas magnéticas foi mais ativa contra *rac*-feniletanol (*rac-2a*), já que em 12 h de reação a conversão alcançou um valor de 45% (Tabela 9, entrada 1) comparada aos valores de 38% e 34% para análogos contendo substituintes na porção do anel aromático (Tabela 9, entradas 5 e 9). Em todos os casos, as reações foram monitoradas por até 48 horas e os valores de conversão mostraram um leve aumento, culminando em 49% para *rac-2a* e 44% para *rac-2b* e *rac-2f* (Tabela 9, entradas 4, 8 e 12), respectivamente. Deve-se notar que a resolução cinética desses substratos catalisada por *P. fluorescens* imobilizada em nanopartículas magnéticas foi altamente enantiosseletiva

com valores de $E > 200$. Os estereocentros do acetato de (*R*)-1-feniletila e (*S*)-1-feniletanol e análogos foram determinados por rotação óptica utilizando um polarímetro e os valores obtidos foram comparados com a literatura. As reações de acetilação seguiram a regra de Kazlauskas conduzido aos correspondentes (*R*)-acetatos e os restantes (*S*)-álcoois.

3.3 Conclusão

Em conclusão desse capítulo, os acetatos e álcoois racêmicos foram obtidos com ótimos rendimentos, assim como as reações de hidrólise utilizando a CAL-B levou a produção dos (*R*)-álcoois em sua maioria com 50% de conversão e excesso enantiomérico $>99\%$ em 24 horas de reação na temperatura de 30°C. Os resultados das reações de hidrólise com a carboxilesterase recombinante não foram satisfatórios uma vez que não se obteve o produto desejado.

Para as reações de resolução cinética, via acetilação, utilizando *P. fluorescens* as reações na forma livre em apenas 2 horas de reação, forneceu conversão de 50% e excesso enantiomérico $>99\%$ do (*S*)-álcoois. Nas reações utilizando a *P. fluorescens* imobilizada comercial o tempo de reação aumentou para 19 horas, porém manteve-se excessos enantioméricos $>99\%$.

A imobilização da lipase de *P. fluorescens* em nanopartículas magnéticas, foi o diferencial desse estudo, já que foi a primeira vez que se utilizou essa nanopartícula magnética na resolução cinética de álcoois secundários como *rac*-feniletanol, *rac*-(3-metilfenil)etanol e *rac*-(3-bromofenil)etanol. A imobilização da enzima neste suporte ocorreu via ligação covalente e produziu um catalisador termoestável mesmo na presença de solvente orgânico.

A resolução cinética do *rac*-feniletanol alcançou um valor de conversão de 49% após 48h de reação com alta seletividade ($E > 200$). Análogos com substituintes na posição meta no anel aromático como *rac*-(3-metilfenil)etanol e *rac*-(3-bromofenil)etanol reagiram mais lentamente em comparação com *rac*-feniletanol, com um valor de conversão de 44% após 48h de reação, embora com alta seletividade ($E > 200$). Deve-se notar que as propriedades magnéticas do núcleo de suporte (Fe_3O_4) permitem que sejam facilmente preparadas e removidas do meio de reação pela aplicação de um campo magnético externo. A lipase de *P. fluorescens* imobilizada em nanopartículas magnéticas mostrou-se um biocatalizador robusto na resolução cinética de álcoois racêmicos com potencial aplicação em catálise heterogênea.

Capítulo 2

Resolução cinética enzimática da ketamina e análogos

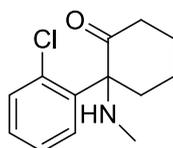
4 CAPÍTULO 2: RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA DA KETAMINA E ANÁLOGOS

4.1 Aspectos gerais

A Ketamina (Figura 10) é um excelente exemplo de reaproveitamento de um medicamento que possui características peculiares, devido ao seu potencial para múltiplos usos em algumas situações clínicas desafiadoras que envolvem a necessidade de anestesia parenteral "segura", bem como alívio da dor (ARONI 2009) e depressão (HIROTA e LAMBERT 2011).

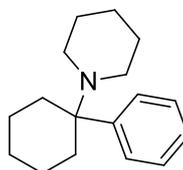
Na década de 50, estudos indicaram que a ketamina poderia ser um melhor candidato que a fenciclidina (Figura 11) e seus derivados, que foram testados como potenciais anestésicos parenterais em primatas, porém, ocasionou uma série de efeitos psicológicos adversos (PAI e HEINING, 2007; GAO, REJAEI e LIU, 2016). Em meados da década de 1960, a ketamina foi avaliada como um agente anestésico intravenoso em seres humanos e foi aprovado para uso clínico em 1970 (PAI e HEINING, 2007; GAO, REJAEI e LIU, 2016).

Figura 10 – Estrutura química da ketamina



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 11 – Estrutura química da fenciclidina



Fonte: Elaborado pelo autor

4.2 Ketamina: antidepressivo

Os antidepressivos atuais demoram cerca de várias semanas para obtenção do efeito esperado. Além disso, estudos clínicos indicam que eles não são eficazes em pelo

menos um terço dos pacientes. Dessa forma, há uma busca por antidepressivos que apresentem rápida ação, principalmente em pacientes que correm risco de suicídio ou ainda não respondem a tratamentos convencionais (MONTEGGIA e ZARATEJR, 2015).

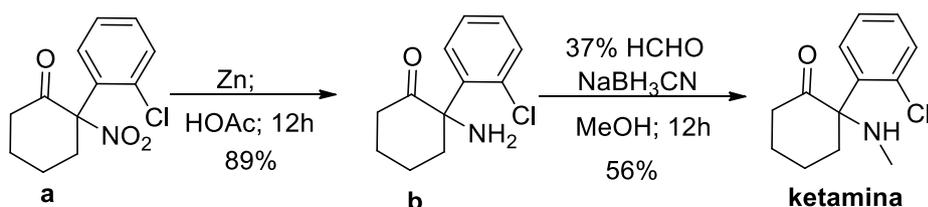
Dessa forma, o uso de medicamentos de rápida eficácia seria uma alternativa em pacientes suicidas, até que os antidepressivos habituais fizessem efeito. Ketamina, normalmente é usada como anestésico (TUCK e GHAZALI,2017).No entanto, pode apresentar-se como um antidepressivo de ação rápida, com o potencial para tratar depressão grave que é resistente a outras terapias (SALVADORE e SINGH 2013), além de ser um analgésico que pode ser administrado por múltiplas vias (incluindo usos tópicos), sozinho ou em combinação com outros fármacos (SAWYNOK 2014; KRONENBERG 2002).

Além disso, estudos clínicos sugerem que a ketamina é "indiscutivelmente um dos desenvolvimentos mais estimulantes da farmacologia antidepressiva em mais de 50 anos", sendo um mecanismo potencialmente novo capaz de mediar a ação antidepressiva (PRESKORN, 2012).

A ketamina é comercializada como Ketalar® na forma de um racemato. No entanto, o enantiômero (*S*)-ketamina apresenta-se mais ativo, sendo duas vezes mais forte quando comparado a sua forma racêmica e quatro vezes mais forte que o enantiômero (*R*)-ketamina (MION e VILLEVIELLE, 2013). Ketamina já está disponível como Ketanesth® em alguns países como Alemanha, Áustria, Itália e Holanda (MION e VILLEVIELLE, 2013).

Inicialmente foi estudada uma reação de redução do composto 2-(2-clorofenil)-2-nitrociclohexanona (**a**) utilizando zinco em ácido acético sob atmosfera de argônio, gerando o composto 2-amino-2-(2-clorofenil)ciclo-hexanona (**b**) que por sua vez sofre uma reação de metilação usando uma solução aquosa HCHO a 37%, ácido acético e NaBH₃CN produzindo a ketamina com 56% de rendimento (Esquema 11) (ZHANG, CHEN E ZHANG, 2017).

Esquema 11 – Síntese da ketamina



Fonte: Adaptado de Zhang, Chen E Zhang (2017).

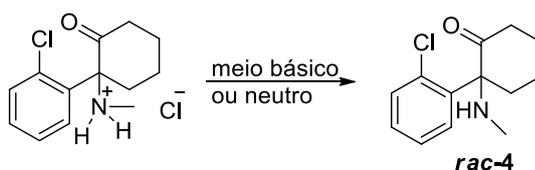
4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Resolução cinética enzimática da ketamina via hidrólise e carbonatação

4.3.1.1 Obtenção da ketamina

A ketamina **rac-4** é comercializada como um sal cloridrato, sendo realizada apenas uma extração para obtenção do composto puro conforme descrito no subitem 5.9.1 (Esquema 12). Após extração líquido-líquido, o composto foi obtido com um rendimento de 96%.

Esquema 12 – Obtenção da ketamina a partir do cloridrato de ketamina

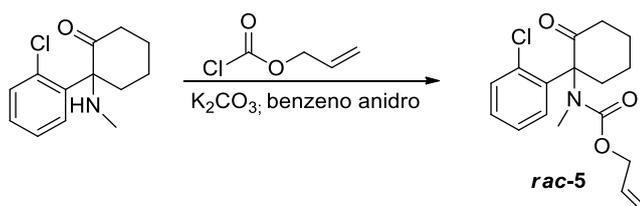


Fonte: Elaborado pelo autor

4.3.1.2 Reação de carbamatação da ketamina

A reação de carbamatação da ketamina foi feita através de uma adaptação da metodologia proposta por WOOLF e colaboradores (1984), conforme procedimento descrito no subitem 5.9.2. A reação ocorreu com um rendimento de 90%, sendo a estrutura do produto **rac-5** confirmado com RMN ^1H e ^{13}C (ver Anexos). O Esquema 13 representa essa reação.

Esquema 13 – produção do carbamato de ketamina

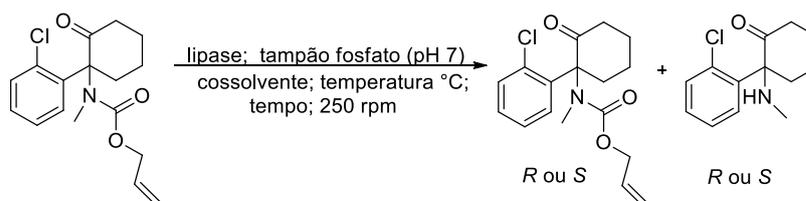


Fonte: Elaborado pelo autor

4.3.1.3 Resolução cinética via hidrólise do carbamato da ketamina utilizando diferentes lipases

Após preparação do carbamato de ketamina **rac-5**, foram estabelecidas condições de separação dos respectivos enantiômeros em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando coluna quiral. Em seguida, realizamos reações de resolução cinética via hidrólise enzimática (Esquema 14), empregando oito lipases comerciais, são elas: lipase de *Candida antarctica* do tipo B imobilizada em resina acrílica (CAL-B), lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em immovead-150 (TLL), lipase de *Candida rugosa*, Amano lipase AK de *P. fluorescens*, lipase de *Rhizopus niveus*, lipase de *Aspergillus niger*, lipase de *Penicillium camemberti* e Amano lipase *Mucor javanicus*.

Esquema 14 – Resolução cinética via de hidrólise do carbamato da ketamina **rac-5**



Fonte: Elaborado pelo autor

As reações de hidrólise foram realizadas com diferentes enzimas, e condições reacionais distintas, a saber: temperatura, tempo, cossolvente e relação enzima:substrato (m/m). Os dados encontram-se na Tabela 10. Após análise das reações por CLAE, verificou-se que nenhuma das lipases estudadas hidrolisou o carbamato de ketamina, então decidiu-se realizar resolução cinética enzimática da ketamina via carbonatação.

Tabela 10 – Resolução cinética via hidrólise do carbamato da ketamina

Entrada	Enzima	Cossolvente	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Relação (m/m)*
1		THF	35	24	2:1
2		THF	35	24	3:1
3	CAL-B	CH ₃ CN	40	24	3:1
4		-	40	24	3:1
5		THF	40	168	3:1
6		THF	45	24	2:1
7		THF	50	24	2:1
8	TLL	THF	35	24	2:1
9		THF	45	24	2:1
10	<i>C. rugosa</i>	THF	35	24	2:1
11		THF	45	24	2:1
12	<i>P.</i>	THF	35	24	2:1
13	<i>fluorescens</i>	THF	45	24	2:1
14	<i>R. niveus</i>	THF	35	24	3:1
15	<i>A. niger</i>	THF	35	24	3:1
16	<i>P.</i> <i>camemberti</i>	THF	35	24	3:1
17	<i>M. javanicus</i>	THF	35	24	3:1

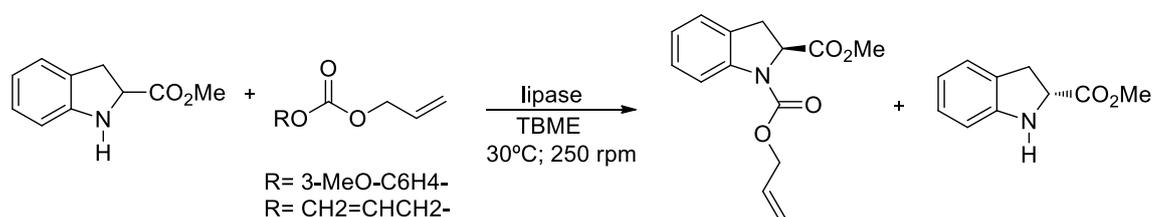
*enzima/substrato

4.3.1.4 Resolução cinética via carbonatação da ketamina

A resolução cinética via carbonatação foi realizada com o objetivo de verificar a atividade de enzimas frente a ketamina, tendo como intuito encontrar condições favoráveis para obtenção da ketamina enantiomericamente pura. ALATORRE-SANTAMARÍA e colaboradores (2008) realizaram a resolução cinética do carboxilato de metil 2-indolina usando inicialmente o 3-metoxifenil alil carbonato como reagente de alcoxicarbonilação. Para

triagem de atividade enzimática foram utilizadas as lipases de *C. antarctica* lipase tipo A (CAL-A) de diferentes fontes e *C. antarctica* tipo B (CAL-B), que foi realizada a 30°C usando éter terc-butílico e metílico seco (TBME) como solvente (Esquema 15). Para todas as enzimas testadas foram observados excelentes valores de enantiosseletividade e conversão. No entanto para Cal-B foi necessário um tempo bem mais longo. Quando a reação ocorreu na presença do carbonato de dialila (sendo testado somente uma enzima CAL-A), pode-se perceber uma menor cinética da reação.

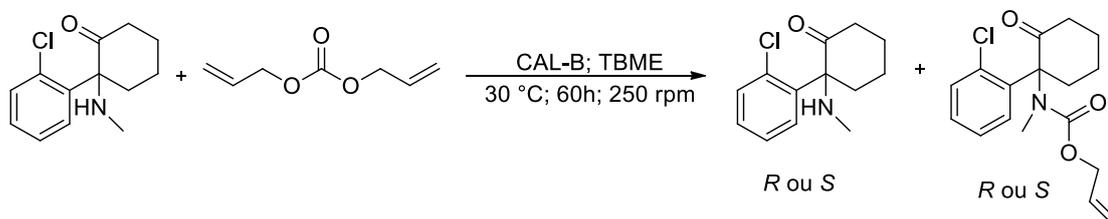
Esquema 15 – Resolução cinética do carboxilato de metil 2-indolína



Fonte: Adaptado de Alatorre-Santamaría *et al.*, (2008).

Foi seguida a metodologia proposta por ALATORRE-SANTAMARÍA *et al.*, 2008, usando a relação enzima substrato 2:1 (m/m), carbonato de dialila, temperatura de 30°C e TBME seco (Esquema 16). No entanto, não foi obtido êxito. Decidimos então testar outras condições reacionais, usando o carbonato de dialila. As condições reacionais estão apresentadas na Tabela 11.

Esquema 16 – Resolução cinética da ketamina



Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 11 – Resolução cinética via carbonatação da ketamina *rac-4*

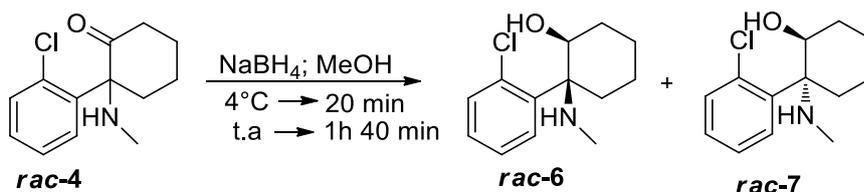
Entrada	Enzima	Solvente	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Relação (m/m)*
1		ACETONITRILA	40	30	3:1
2	CAL-B	TBME	40	60	3:1
3			30	60	2:1
4	TLL	TBME	40	60	3:1

*enzima/substrato

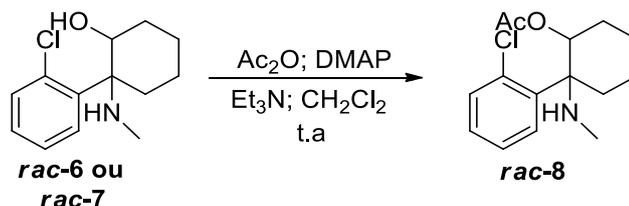
Os resultados das reações nas condições especificadas na Tabela 11 para carbonatação da ketamina também não foram satisfatórios. Diante das adversidades encontradas na execução da resolução cinética da ketamina e do carbamato de ketamina, decidiu-se realizar a síntese de dois análogos da ketamina, a fim de posteriormente realizar resolução cinética enzimática.

4.3.2 Síntese de análogos da ketamina

O primeiro análogo foi preparado a partir da redução química com boridreto de sódio (NaBH_4) do *rac-4* produzindo o *rac-6* e o *rac-7* (Esquema 17) com rendimento total da reação de 96%. Posteriormente, separamos o *rac-6* e o *rac-7* por coluna cromatográfica, obtendo um dos diastereoisômeros em maior quantidade, sendo esse diastereoisômero submetido a uma reação de acetilação na presença de AC_2O , DMAP, Et_3N e CH_2Cl_2 , em um tempo reacional de 2h, à temperatura ambiente para síntese do *rac-8*. (Esquema 18)

Esquema 17 – Síntese do *rac-6* e o *rac-7*

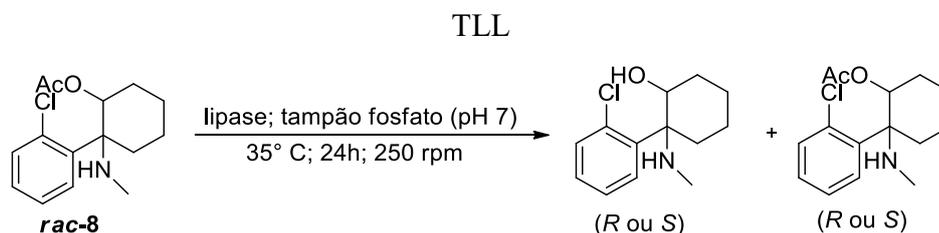
Fonte: Elaborado pelo autor

Esquema 18 – Síntese do *rac-8*

Fonte: Elaborado pelo autor

4.3.2.1 Resolução cinética enzimática via hidrólise do *rac-8*

As reações de resolução cinética, via hidrólise enzimática, do *rac-8* foram realizadas usando algumas condições já utilizadas para o carbamato da ketamina. Inicialmente, o biocatalisador foi a enzima CAL-B, numa temperatura de 35°C, tampão fosfato pH 7, THF como cossolvente, tempo reacional de 24 h e razão enzima:substrato 2:1 (m/m). Posteriormente a reação também foi realizada com a enzima TLL (Esquema 19).

Esquema 19 – Resolução cinética, via reação de hidrólise, do *rac-8* na presença de CAL-B e

Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados obtidos nas reações supracitadas não foram satisfatórios, não sendo encontrados relatos na literatura para síntese ou resolução cinética enzimática desse composto. Os resultados negativos podem estar relacionados ao impedimento estérico que o átomo de Cl e o anel benzênico podem gerar, dificultando o encaixe da enzima-substrato e consequentemente impedindo a reação. Acredita-se que esse mesmo efeito seja o responsável pelos resultados insatisfatórios que ocorreram na resolução cinética da ketamina via carbonatação e do carbamato de ketamina via hidrólise.

4.4 Conclusão

A resolução cinética, via hidrólise, do carbamato *rac-5*, ocorreu empregando oito lipases comerciais com variação nas condições reacionais. Após análises verificou-se que o material de partida havia sido totalmente recuperado, não ocorrendo a formação do produto desejado. Em seguida, foi realizada a resolução cinética enzimática da ketamina *rac-4* via carbonatação, não sendo observada a síntese do produto. Outra tentativa de resolução cinética, foi a preparação de análogos da ketamina *rac-6* e o *rac-7*, precursores do éster *rac-8*, que foi submetido a reação de resolução cinética, via hidrólise. Após análises observou-se somente o material de partida totalmente inalterado.

Levando a uma busca na literatura de uma explicação para falta de êxito nessas reações. Não há relatos da preparação da ketamina e análogos na literatura utilizando biocatálise. Uma possível explicação está vinculada ao volume do cloro e do anel aromático, causando impedimento estérico e fazendo com que os substratos *rac-4*, *rac-5* e *rac-8*, não se localizassem adequadamente no sítio ativo enzimático, para que ocorressem as reações de hidrólise e carbonatação.

Contudo, a síntese dos compostos *rac-5*, *rac-6*, *rac-7* e *rac-8*, que foram sintetizados com altos valores de rendimentos, ainda não está descrita na literatura, podendo esses compostos, assim como a ketamina, apresentarem atividade biológica mesmo em suas formas racêmicas.

5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1 Instrumentos

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará (CENAUREM/UFC), utilizando-se Espectrômetros Bruker, modelo Avance DPX-300 que opera na frequência de 300 MHz para hidrogênio e 75 MHz para o carbono.

As reações de hidrólise e acetilação na resolução cinética enzimática da acetofenona e derivados foram acompanhadas em um cromatógrafo gasoso da marca Shimadzu de modelo GC 2010, com um detector DIC e um injetor automático da marca Shimadzu de modelo AOC-20i.

A resolução cinética enzimática da ketamina e do carbamato de ketamina foi acompanhada através de um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) da marca Shimadzu de modelo LC-20AT acoplado a um detector UV da marca Shimadzu de modelo SPD-M20A. A coluna utilizada foi da marca Daicel Chiral OD-H com diâmetro interno de 4,6 mm, comprimento de 15 cm e 5 μm da espessura de filme para separação dos enantiômeros.

Os espectros de massas foram analisados em um Shimadzu de modelo GC/MS-QP2010 SE equipado com uma coluna RTx®-5MS (0,25 μm x 0,25 mm x 30 m). As condições de injeção foram (métodos acetofenona e ponto de fusão elevado).

As determinações de rotações ópticas específicas foram realizadas em um polarímetro Jasco P-2000 digital.

Os pontos de fusões da Ketamina e do carbamato de Ketamina foram determinados em um aparelho da marca Microquímica de modelo MQAPF-302.

As reações com agitação foram feitas em uma mesa orbitalar com uma incubação refrigerada da marca Analítica de modelo SI-300R.

5.2 Métodos de análise por cromatografia gasosa com coluna quiral acoplado ao detector de ionização

Utilizou-se como fase móvel gás nitrogênio 0,5 bar, sendo usada como fase estacionária uma coluna quiral do tipo CP-ChiralSil-DEX CB com um comprimento de 25 m, diâmetro interno de 0,25 mm, diâmetro externo de 0,39 mm e 0,25 μm da espessura de filme para a separação dos seguintes enantiômeros:

- *rac*-2a-1-feniletanol – rampa de temperatura: 80°C (7 min.); 10°C/min. 120°C; 4°C/min. 160°C (5 min.). Tempos de retenção: (*R*) = 15,52 min.; (*S*) = 15,85 min.
- *rac*-2b-(3-metilfenil)etanol – rampa de temperatura: 100°C (5 min.); 2°C/min. 140°C (20 min). Tempos de retenção: (*R*) = 18,69 min.; (*S*) = 19,34 min.
- *rac*-2c-(3-fluorofenil)etanol – rampa de temperatura: 80°C (7 min.); 10°C/min. 120°C; 4°C/min. 160°C (5 min.). Tempos de retenção: (*R*) = 16,30 min.; (*S*) = 16,73 min.
- *rac*-2d-(3-metóxifenil)etanol – rampa de temperatura: 100°C (5 min.); 1°C/min. 140°C (20 min). Tempos de retenção: (*R*) = 36,5 min.; (*S*) = 37,87 min.
- *rac*-2e-(4-metilfenil)etanol – rampa de temperatura: 100°C (5 min.); 2°C/min. 140°C (20 min). Tempos de retenção: (*R*) = 18,36 min.; (*S*) = 19,52 min.
- *rac*-2f-(3-bromofenil)etanol – rampa de temperatura: 100°C (5 min.); 4°C/min. 140°C (20 min). Tempos de retenção: (*R*) = 25,94 min.; (*S*) = 27,28 min.
- *rac*-2g-(2-metilfenil)etanol – rampa de temperatura: 80°C (7 min.); 10°C/min. 120°C; 4°C/min. 160°C (5 min.). Tempos de retenção: (*R*) = 18,41 min.; (*S*) = 19,18 min.
- *rac*-2h-(4-bromofenil)etanol – rampa de temperatura: 80°C (7 min.); 10°C/min. 120°C; 4°C/min. 160°C (5 min.). Tempos de retenção: (*R*) = 24,12 min.; (*S*) = 24,76 min.
- *rac*-2i-(2-metóxifenil)etanol – rampa de temperatura: 80°C (7 min.); 10°C/min. 120°C; 4°C/min. 160°C (5 min.). Tempos de retenção: (*R*) = 20,35 min.; (*S*) = 19,95 min.
- *rac*-2j-(4-fluorofenil)etanol – rampa de temperatura: 80°C (7 min.); 10°C/min. 120°C; 4°C/min. 160°C (5 min.). Tempos de retenção: (*R*) = 16,07 min.; (*S*) = 16,56 min.
- *rac*-2k(2,5-dimetilfenil)etanol – rampa de temperatura: 80°C (7 min.); 10°C/min. 120°C; 4°C/min. 160°C (5 min.). Tempos de retenção: (*R*) = 19,96 min.; (*S*) = 20,82 min.
- *rac*-3a-acetato de feniletila – rampa de temperatura: 80°C (7 min.); 10°C/min. 120°C; 4°C/min. 160°C (5 min.). Tempos de retenção: (*R*) = 14,06 min.; (*S*) = 13,36 min.

- *rac*-3b-acetato de (3-metilfenil)etila – rampa de temperatura: 100°C (5 min.); 2°C/min. 140°C (20 min). Tempos de retenção: (*R*) = 14,70 min; (*S*) = 13,51 min.
- *rac*-3c-acetato de (3-fluorofenil)etila – rampa de temperatura: 80°C (7 min.); 10°C/min. 120°C; 4°C/min. 160°C (5 min.). Tempos de retenção: (*R*) = 14,18 min; (*S*) = 13,30 min.
- *rac*-3d-acetato de (3-metoxifenil)etila – rampa de temperatura: 100°C (5 min.); 1°C/min. 140°C (20 min). Tempos de retenção: (*R*) = 28,95 min; (*S*) = 26,96 min.
- *rac*-3e-acetato de (4-metilfenil)etila – rampa de temperatura: 100°C (5 min.); 2°C/min. 140°C (20 min). Tempos de retenção: (*R*) = 17,49 min; (*S*) = 16,05 min.
- *rac*-3f-acetato de (3-bromofenil)etila – rampa de temperatura: 100°C (5 min.); 4°C/min. 140°C (20 min). Tempos de retenção: (*R*) = 18,88 min; (*S*) = 17,78 min.;
- *rac*-3g-acetato de (2-metilfenil)etila – rampa de temperatura: 80°C (7 min.); 10°C/min. 120°C; 4°C/min. 160°C (5 min.). Tempos de retenção: (*R*) = 14,92 min; (*S*) = 14,75 min.
- *rac*-3h-acetato de (4-bromofenil)etila – rampa de temperatura: 80°C (7 min.); 10°C/min. 120°C; 4°C/min. 160°C (5 min.). Tempos de retenção: (*R*) = 21,81; (*S*) = 21,18 min.
- *rac*-3i-acetato de (2-metoxifenil)etila – rampa de temperatura: 80°C (7 min.); 10°C/min. 120°C; 4°C/min. 160°C (5 min.). Tempos de retenção: (*R*) = 17,88 min.; (*S*) = 18,12 min.
- *rac*-3j-acetato de (4-fluorofenil)etila – rampa de temperatura: 80°C (7 min.); 10°C/min. 120°C; 4°C/min. 160°C (5 min.). Tempos de retenção: (*R*) = 13,87 min.; (*S*) = 14,71min.
- *rac*-3k-acetato de (2,5-dimetilfenil)etila – rampa de temperatura: 80°C (7 min.); 10°C/min. 120°C; 4°C/min. 160°C (5 min.). Tempos de retenção: (*R*) = 16,76 min.; (*S*) = 16,92 min.

5.3 Métodos de análise por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna quiral acoplado ao detector UV

A coluna utilizada foi da marca Daicel Chiralcel OD-H com diâmetro interno de 4,6 mm, comprimento de 15 cm e 5 µm da espessura de filme para a separação dos enantiômeros do:

- *rac*-4-ketamina: hexano/isopropanol/dimetilamina (90:10:0,2), fluxo: 1 mL/min, 210nm. Tempos de retenção foram: 4,03 e 4,62 min.

- *rac*-5- carbamato de ketamina: hexano/metanol (97:3), fluxo: 0,8mL/min, 210nm. Tempos de retenção foram: 10,71 e 12,24 min.

5.4 Reagentes utilizados

Sulfato de sódio anidro e anidrido acético foram de procedência Vetec[®]. Boridreto de sódio, dimetilaminopiridina, trietilamina, 3-metil acetofenona, 3-fluor acetofenona, 3-metóxi acetofenona, 4-metil acetofenona, 3-bromo acetofenona, 2-metil acetofenona, 4-bromo acetofenona, 2-metóxi acetofenona e 4-fluor acetofenona, cloroformiato de alila, carbonato de dialila todos de procedência da Sigma-Aldrich[®]. Acetofenona de procedência Merck[®]. Carbonato de potássio e bicarbonato de sódio da dinâmica, HCl da Vetec e cloridrato de ketamina da Syntec.

5.5 Solventes utilizados

Metanol, diclorometano, triclorometano, acetato de etila, acetona foram provenientes da marca Synth[®]. Benzeno de procedência da marca dinâmica. TBME e acetato de vinilada Sigma-Aldrich[®]. Acetato de etila, hexano, isopropanol, metanol, THF, CH₃CN grau HPLC todos da marca Tedia.

5.6 Enzimas utilizadas

Lipase a partir de *Candida antartica* B (CAL-B, Novozym 435[®]) imobilizada em resina acrílica de procedência Novozyme e Sigma-Aldrich[®]. Lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em immobead-150 (TLL), lipase de *C.rugosa*, Amano lipase AK de *P. fluorescens*, lipase de *R. niveus*, lipase de *A. niger*, Amano lipase G de *P. camemberti* e Amano lipase M de *M. javanicus* todas de procedência Sigma-Aldrich[®]. A carboxilesterase recombinante foi cedida pelo Prof. Francesco Molinari da Universidade de Milão, Milão, Itália.

5.7 Adsorventes utilizados

As cromatografias em coluna vertical foram efetuadas utilizando sílica gel 60-230 mesh, comercial, de procedência Vetec[®]. Nas análises por CCD foram empregadas em cromatoplasmas de sílica gel 60 G 5-40 μ m comercial, sobre poliéster T-6145 provenientes da marca Sigma chemicalco[®] com camada de 250 μ m de espessura e dimensões de 10 x 5cm.

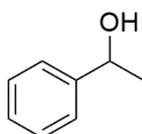
Após eluição das substâncias, as cromatoplasmas foram reveladas por pulverização com solução de vanilina (5g) e ácido perclórico (0,75mol/L, 100mL) em etanol (C₂H₅O, 100 mL), seguida de aquecimento a 100°C com pistola aquecedora da marca Dekel modelo DK 1060, por aproximadamente 1 min.

5.8 Compostos utilizados como padrão no Capítulo 1

5.8.1 Síntese geral dos álcoois racêmicos *rac-2a-k*

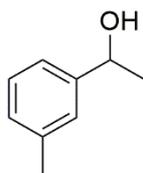
Em um balão de fundo redondo de 250mL, dissolveu-se 1 eq. de cetona (**1a-k**) em MeOH (0,1M). Posteriormente, foi adicionado lentamente e sob agitação 0.5 eq. de NaBH₄, à temperatura de 4°C durante 20 minutos. A reação ficou sob agitação por 1 hora e 40 minutos. Em seguida, o MeOH foi evaporado a pressão reduzida e adicionou-se 10mL de água destilada. O produto foi extraído com acetato de etila (4x de 60mL), sendo a fase orgânica tratada com Na₂SO₄ anidro e filtrada. O acetato de etila foi evaporado a pressão reduzida. O produto foi purificado utilizando uma coluna cromatográfica, com fase móvel CHCl₃ 100% e fase estacionária gel de sílica. Foram obtidos os seguintes álcoois racêmicos:

- *rac-2a-feniletanol*



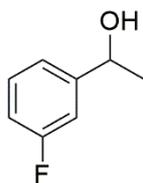
Líquido incolor

- ***rac-2b*-(3-metilfenil)etanol**



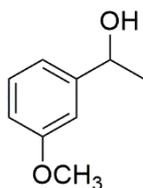
Líquido incolor

- ***rac-2c*-(3-fluorofenil)etanol**



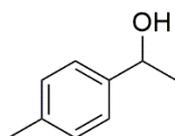
Líquido incolor

- ***rac-2d*-(3-metóxfenil)etanol**



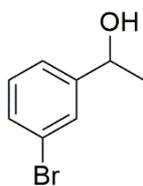
Líquido incolor

- ***rac-2e*-(4-metilfenil)etanol**



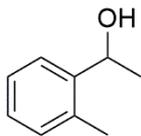
Líquido incolor

- ***rac-2f*-(3-bromofenil)etanol**



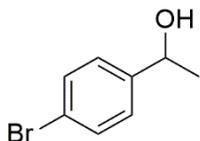
Líquido incolor

- ***rac-2g*-(2-metilfenil)etanol**



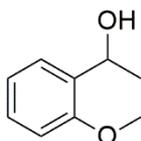
Líquido incolor

- ***rac-2h*-(4-bromofenil)etanol**



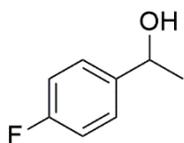
Líquido amarelo

- ***rac-2i*-(2-metóxfenil)etanol**



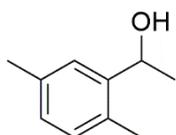
Óleo amarelo

- ***rac-2j*-(4-fluorofenil)etanol**



Líquido amarelo

- ***rac-2k*-(2,5-dimetilfenil)etanol**

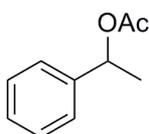


Óleo incolor

5.8.2 Síntese geral dos ésteres racêmicos *rac-3a-k*

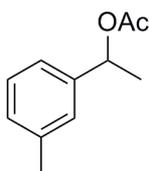
Em um balão de 125mL, foi adicionado 0,5 eq. de DMAP em CH₂Cl₂ (0,1 M) e 3 eq. Ac₂O, deixando-se sob agitação por um período de 20 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1 eq. do álcool racêmico e em seguida adicionou-se 1 eq. de Et₃N. Após o término da reação, (2h depois), adicionou-se 10mL de água destilada e extraiu-se a fase aquosa com CH₂Cl₂ (3 x 50mL), sendo a fase orgânica tratada com Na₂SO₄ anidro e filtrada. Logo após, o solvente foi evaporado a pressão reduzida e o produto purificado com coluna cromatográfica de gel de sílica, utilizando CHCl₃ 100% como fase móvel. Foram obtidos os seguintes ésteres racêmicos:

- ***rac-3a*-acetato de 1-feniletila**



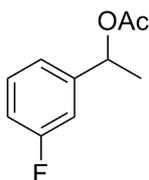
Líquido amarelo

- ***rac-3b*-acetato de (3-metilfenil)etila**



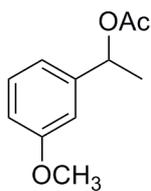
Líquido amarelo claro

- ***rac-3c*-acetato de (3-fluorofenil)etila**



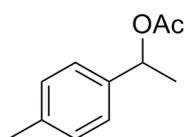
Líquido amarelo

- ***rac*-3d-acetato de (3-metóxfenil)etila**



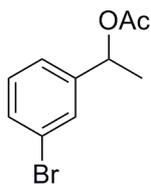
Líquido amarelo

- ***rac*-3e-acetato de (4-metil-fenil)etila**



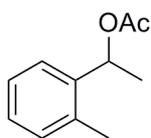
Líquido incolor

- ***rac*-3f-acetato de (3-bromofenil)etila**



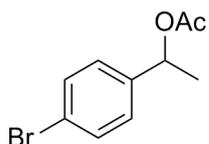
Líquido amarelo claro

- ***rac*-3g-acetato de (2-metil-fenil)etila**



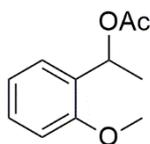
Líquido amarelo claro

- ***rac*-3h-acetato de (4-bromofenil)etila**



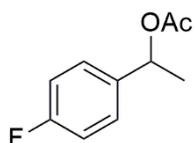
Líquido amarelo

- ***rac*-3i-acetato de (2-metóxfenil)etila**



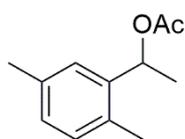
Líquido amarelo

- ***rac*-3j-acetato de (4-fluorofenil)etila**



Líquido amarelo

- ***rac*-3k-acetato de (2,5-dimetilfenil)etila**

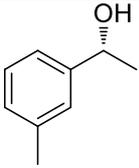
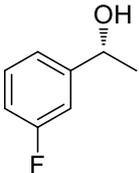
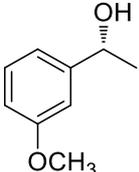
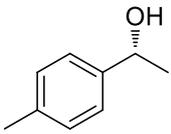
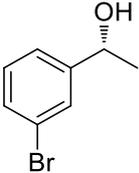
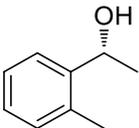
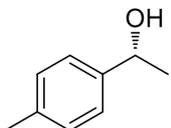


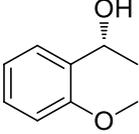
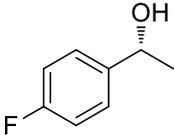
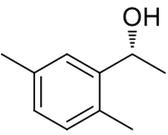
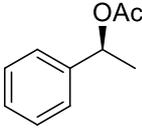
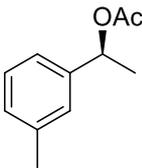
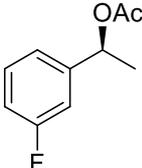
Líquido amarelo claro

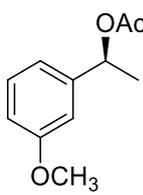
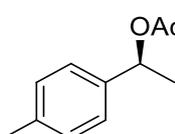
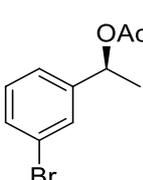
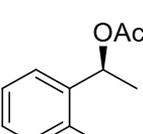
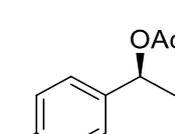
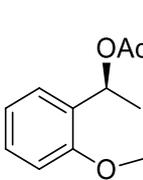
Na Tabela 12, encontram-se os valores de rotação óptica, obtidos e da literatura para os álcoois (*R*-2 a-k) e ésteres (*S*-3 a-k). Infelizmente, devido a problemas no polarímetro não possível finalizar a medição dos valores para todos os produtos obtidos.

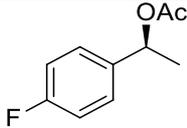
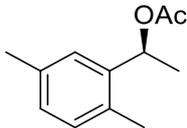
Tabela 12 – Rotações ópticas específicas dos álcoois (*R*-2 a-k) e dos ésteres (*S*-3 a-k)

Entrada	Molécula	Valor calculado	Valor da literatura	Ref.
1	 (<i>R</i>)-2 a	$[\alpha]_{D}^{18} = +39$ (c = 0,55; CHCl ₃), <i>e.e.</i> > 99%	$[\alpha]_{D}^{26} = +45,4$ (c = 0,5; CHCl ₃), <i>e.e.</i> = 98%	MATHARU <i>et al.</i> , 2005.

2	 <p>(R)-2 b</p>	$[\alpha]_{\text{D}}^{19} = +50,28$ (c = 0,66; CHCl ₃), <i>e.e.</i> > 99%	$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +54,2$ (c = 0,66; CHCl ₃), <i>e.e.</i> = 94%	MARTINS, CONTRERAS REDONDO E WILLS, 2010.
3	 <p>(R)*-2 c</p>	-	-	-
4	 <p>(R)-2 d</p>	$[\alpha]_{\text{D}}^{19} = +17,45$ (c = 0,50; CHCl ₃), <i>e.e.</i> > 99%	$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +44,4$ (c = 0,50; CHCl ₃), <i>e.e.</i> = 99%	INOUE, MAKINO e ITOH, 2005
5	 <p>(R)*-2 e</p>	-	-	-
6	 <p>(R)-2 f</p>	$[\alpha]_{\text{D}}^{18} = +23,58$ (c = 0,7; CHCl ₃), <i>e.e.</i> > 99%	$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +31,7$ (c = 0,7; CHCl ₃), <i>e.e.</i> = 89%	MARTINS, CONTRERAS REDONDO E WILLS, 2010.
7	 <p>(R)*-2 g</p>	-	-	-
8		-	-	-

(R)*-2 h				
9		-	-	-
(R)*-2 i				
10		-	-	-
(R)*-2 j				
11		-	-	-
(R)*-2 k				
12		$[\alpha]^{18}_D = -28,82$ (c = 0,5; CHCl ₃), <i>e.e.</i> > 99%	$[\alpha]^{23}_D = +43$ (c = 2,1; CHCl ₃), <i>e.e.</i> ≥ 98%, para <i>R.</i>	CHÊNEVERT, PELCHAT e MORIN, 2009.
13		$[\alpha]^{18}_D = -36,78$ (c = 1,0; CHCl ₃), <i>e.e.</i> > 99%	$[\alpha]^{26}_D = +215$ (c = 1,0; CHCl ₃), <i>e.e.</i> = 97%; para <i>R.</i>	KIM <i>et al.</i> , 2004.
(S)-3 b				
14		-	-	-
(S)*-3 c				

15	 (S)-3 d	$[\alpha]_{\text{D}}^{18} = -105,17$ (c = 1,0; CH ₂ Cl ₂), <i>e.e.</i> > 99%	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +93,6$ (c=1,0; CH ₂ Cl ₂), <i>e.e.</i> > 99% para o <i>R.</i>	MANGAS-SANCHEZ <i>et al.</i> , 2009.
16	 (S)*-3 e	-	-	
17	 (S)-3 f	$[\alpha]_{\text{D}}^{19} = -84,86$ (c = 0,75; CHCl ₃), <i>e.e.</i> > 99%	$[\alpha]_{\text{D}}^{19} = +85$ (c = 1,0; CHCl ₃), <i>e.e.</i> > 99%; para <i>R</i>	PÄIVIÖ <i>et al.</i> , 2011
18	 (S)*-3 g	-	-	-
19	 (S)*-3 h	-	-	-
20	 (S)*-3 i	-	-	-

21	 (S)*-3 j	-	-	-
22	 (S)*-3 k	-	-	-

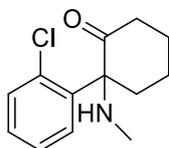
*configuração absoluta inferida através da regra empírica de kazlauskas

5.9 Compostos utilizados como padrão no Capítulo 2

5.9.1 Obtenção da ketamina (*rac*-4)

A partir da ketamina comercial cedida pela Professora Danielle Macedo, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia; e Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará. A solução de cloridrato de ketamina foi adicionada uma solução de bicarbonato de sódio a 10% até pH 7.0. Em seguida, foi realizada uma extração líquido-líquido com acetato de etila (3 x de 20mL), para cada 10 ml de solução de cloridrato de ketamina.

- ***rac*-4-2-(2-clorofenil)-2-(metilamino)ciclohexanona: ketamina**

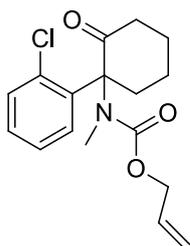


Sólido branco com p.f. = 90,1° C

5.9.2 Síntese do carbamato de ketamina (*rac-5*)

Em um frasco schlenk foi adicionado 2 eq. de carbonato de sódio em benzeno anidro (0,1 M) e 1 eq. de ketamina. Em seguida adicionou-se 1,5 eq. de cloroformiato de alila. A reação ficou sob agitação e sob refluxo por um período de 12 h. Após o término da reação, resfriou-se a temperatura ambiente e adicionou-se 1,25 eq. de trimetilamina. A mistura reacional foi então lavada com H₂O destilada, uma solução de HCl 10% e uma solução de NaHCO₃ 10%. Após esse processo, a fase orgânica foi tratada com Na₂SO₄ anidro e filtrada. Logo após, o solvente foi evaporado a pressão reduzida e o produto purificado com coluna cromatográfica de gel de sílica, utilizando hexano/acetato de etila (70:30) como fase móvel.

- ***rac-5* carbamato de alil (1-(2-clorofenil)-2-oxociclohexil)(metil):carbamato de ketamina**

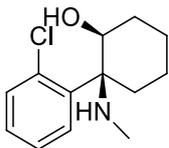


Sólido branco com p.f. = 72,1° C

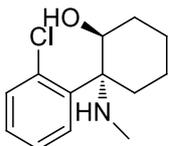
5.9.3 Síntese do (*rac-6* e do *rac-7*)

Em um balão de fundo redondo de 50 mL, dissolveu-se 1 eq. da ketamina (*rac-4*) em MeOH (0,1M). Posteriormente, foi adicionado lentamente e sob agitação 0.5 eq. de NaBH₄, à temperatura de 4°C durante 20 minutos. A reação ficou sob agitação por 1 hora e 40 minutos. Em seguida, o MeOH foi evaporado a pressão reduzida e adicionou-se 10mL de água destilada. O produto foi extraído com acetato de etila (4 x de 60mL), sendo a fase orgânica tratada com Na₂SO₄ anidro e filtrada. O acetato de etila foi evaporado a pressão reduzida. O produto foi purificado utilizando uma coluna cromatográfica, com fase móvel hexano/acetato de etila (70:30) e fase estacionária gel de sílica. Foram obtidos os seguintes álcoois racêmicos:

- ***rac*-6-(1*S*, 2*S*)-2-(2-clorofenil)-2-(metilamino)ciclo-hexanol**



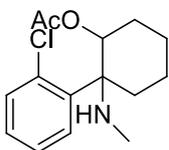
- ***rac*-7-(1*S*, 2*R*)-2-(2-clorofenil)-2-(metilamino)ciclo-hexanol**



5.9.4 Síntese do (*rac*-8)

Em um balão de 125mL, foi adicionado 0,5 eq. de DMAP em CH₂Cl₂ (0,1 M) e 3 eq. Ac₂O, deixando-se sob agitação por um período de 20 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1 eq. do álcool racêmico e em seguida adicionou-se 1 eq. de Et₃N. Após o término da reação, (2h depois), adicionou-se 10mL de água destilada e extraiu-se a fase aquosa com CH₂Cl₂ (3 x 50mL), sendo a fase orgânica tratada com Na₂SO₄ anidro e filtrada. Logo após, o solvente foi evaporado a pressão reduzida e o produto purificado com coluna cromatográfica de gel de sílica, utilizando CHCl₃ 100% como fase móvel. Foi obtido o seguinte éster racêmico:

- ***rac*-8-Acetato de 2-(2-clorofenil)-2-(metilamino)ciclo-hexila**



5.10 Produção das enzimas recombinantes utilizadas no Capítulo 1

5.10.1 Produção da carboxiesterase

A cepa de *E. coli* BL21 DE3 pET100/EST foi cultivada em 20mL de caldo Luria Bertani (LB) suplementado de 100 µg/mL a 37 °C, 150 rpm até uma densidade ótica de 0,8 em 600nm. Para a indução da esterase EIT foi utilizado 0,1 mM de Isopropil-β-D-

tiogalactosídeo (IPTG) por 24 horas a 30°C. As células foram então centrifugadas a 7000G por 5 min e ressolubilizadas em tampão Tris-HCl pH 8,0. Depois disso as células foram lisadas por sonicação (2 ciclos: 3 segon/3 segoff, amplitude de 30%) (QsonicaQ125, EUA) e centrifugadas a 15000 G, 4°C por 45 min. O sobrenadante contendo o extrato proteico foi utilizado nas reações enzimáticas.

5.11 Reações de resolução cinética enzimáticas do Capítulo 1

5.11.1 Resolução cinética enzimática dos ésteres racêmicos (*rac-3a-k*) via reação de hidrólise empregando lipase comercial (*CAL-B*)

Em um erlenmeyer de 5mL, dissolveu-se 1 eq. de éster (*rac-3 a-j*) em 20% de THF e 80% de tampão fosfato (PO_4^{2-}), 0,1 M, pH 7, e por último, foi adicionado 2 eq. de lipase. A reação foi processada em temperatura 30°C e tempo reacional de 24h, com rotação 250 rpm. Em seguida, realizou-se uma extração do produto com AcOEt (3 x 5mL), sendo a fase orgânica tratada com Na_2SO_4 anidro. O AcOEt foi evaporado a pressão reduzida. Posteriormente, o produto foi purificado em uma coluna cromatográfica, utilizando gel de sílica como fase estacionária, e CHCl_3 100% como fase móvel. Para realizar a análise no CG, retirou-se 1 mg da amostra pura e diluiu-se em 1 mL de AcOEt grau HPLC.

5.11.2 Resolução cinética enzimática via reação de acetilação empregando *P. fluorescens* livre e imobilizada comerciais e imobilizada em nanopartículas magnéticas (*Fe3O4@APTES-GLU-PF*)

Em um erlenmeyer de 5ml, adicionou-se 1 eq. de éster (*rac-2 a, b e f*) 2 eq. de lipase. Em seguida, o erlenmeyer foi vedado com um septo e submetido a vácuo seguido de purga com N_2 . Posteriormente foi adicionado o solvente hexano (0,1M), previamente seco e então adicionou-se 5 eq. de AcOVin. A reação foi realizada em uma agitação de 250 rpm, variando-se a temperatura (no caso da enzima em sua forma livre) e tempo reacional. Retirou-se alíquota de 10 μ L em diferentes tempos do meio reacional a fim de realizar análise no CG.

5.11.3 Resolução cinética enzimática dos ésteres racêmicos via reação de hidrólise empregando carboxilesterase recombinante

Cada enzima recombinante encontrava-se em cepas de *E. coli*. Estas cepas tiveram crescimento a 37°C por 6 horas. Após o período de crescimento as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para reações enzimáticas, sendo as células devidamente descartadas. Em um tubo Falcon de 15mL, dissolveu-se 30mg de **3a** em 0,5mL de THF 4,5mL do sobrenadante. A mistura reacional foi deixada 30°C sob agitação orbitalar por 24h. Em seguida, realizou-se uma extração do produto com AcOEt (3 x 5mL), sendo a fase orgânica tratada com Na₂SO₄ anidro. O AcOEt foi evaporado a pressão reduzida.

5.12 Reações de resolução cinética enzimáticas do Capítulo 2

5.12.1 Resolução cinética enzimática do carbamato de ketamina (rac-5) via reação de hidrólise empregando lipases comerciais

Em um erlenmeyer de 5mL, dissolveu-se 1 eq. carbamato de ketamina (**rac-5**) em 20% de THF ou CH₃CN e 80% de tampão fosfato (PO₄²⁻), 0,1 M, pH 7, e por último, foi adicionado 2 ou 3 eq. de lipase. A reação foi processada em diferentes temperaturas (35, 40, 45 e 50°C) e tempo reacional de 24h e 168h, com rotação 250rpm. Em seguida, realizou-se uma extração do produto com AcOEt (3 x 5mL), sendo a fase orgânica tratada com Na₂SO₄ anidro. O AcOEt foi evaporado a pressão reduzida. Posteriormente, o produto foi purificado em uma coluna cromatográfica, utilizando gel de sílica como fase estacionária, e hexano/acetato de etila (70/30), como fase móvel.

5.12.2 Resolução cinética enzimática da ketamina(rac-4) via reação de acetilação empregando lipases comerciais (CAL-B e TLL)

Em um erlenmeyer de 5 ml, adicionou-se 1 eq. da ketamina (**rac-4**) e 2 eq. de lipase. Em seguida, o erlenmeyer foi vedado com um septo e submetido a vácuo seguido de purga com N₂. Posteriormente foi adicionado o solvente TBME OU CH₃CN (0,1M), previamente seco e então adicionou-se 2,5 eq. de carbonato de dialila. A reação foi realizada em uma agitação de 250 rpm, variando-se a temperatura e tempo reacional.

5.12.3 Resolução cinética enzimática do análogo da ketamina (*rac*-8)

Em um erlenmeyer de 5mL, dissolveu-se 1 eq. do (*rac*-8) em 20% de THF ou e 80% de tampão fosfato (PO_4^{2-}), 0,1 M, pH 7, e por último, foi adicionado 2 eq. de lipase. A reação foi processada em temperatura de 35°C e tempo reacional de 24h, com rotação 250 rpm. Em seguida, realizou-se uma extração do produto com AcOEt (3 x 5mL), sendo a fase orgânica tratada com Na_2SO_4 anidro. O AcOEt foi evaporado a pressão reduzida. Posteriormente, o produto foi purificado em uma coluna cromatográfica, utilizando gel de sílica como fase estacionária, e hexano/acetato de etila (70/30) como fase móvel.

REFERÊNCIAS

ADRIO, J.-L.; DEMAIN, A. L. Recombinant organism for production of industrial products. **Bioengineered Bugs**, Austin, v. 1, n.2, p. 116-131, 2010.

ALATORRE-SANTAMARÍA, S.; RODRIGUEZ-MATA, M.; GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; MATTOS, M. C.; SAYAGO, F. J.; JIMÉNEZ, A. I.; CATIVIELA, C.; GOTOR, V. Efficient access to enantiomerically pure cyclic α -amino esters through alipase-catalyzed kinetic resolution. **Tetrahedron: Asymmetry**, Londres, v. 19, p.1714–1719, 2008.

ALDRIDGE, S. Industry backs biocatalysis for greener manufacturing. **Nature Biotechnology**, Londres, v. 31, n. 2, p. 95-96, 2013.

AMID, A. **Recombinant Enzymes—From Basic Science to Commercialization**. 1. Ed.; Suíça: Springer, 2015. 188p.

ANSARI, S. A.; HUSAIN Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: a review. **Biotechnology Advances**, Londres, v.30, p.512-523, 2012.

ARONI, F. Pharmacological aspects and potencial new clinical applications of ketamine: reevaluation of an old drug. **Journal Clinical Pharmacology**, Hoboken, v. 49, p. 957-964, 2009.

BHUSHAN, I. KUMAR, A. MODI, G. JAMWAL, S. Chiral resolution of differently substituted racemic acetyl-1-phenyl ethanol using lipase from *Bacillus subtilis*. **Chemical Tecnology and Biotechnology**, Hoboken, v. 86, n.2, p. 315-318, 2011.

BORNSCHEUER, U.T.; KAZLAUSKAS, R.J. **Hydrolases in organic synthesis – regio- and stereoselective biotransformations**. 2. ed.; Weinheim: Wiley-VCH, 2006.368 p.

BRAGA, A. L.; LÜDTKE, D. S.; SCHNEIDER, P. H.; ANDRADE, L. H.; PAIXÃO, M. W. Catálise assimétrica no brasil: desenvolvimento e potencialidades para o avanço da indústria química brasileira. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 36, n. 10, p.1591-1599, 2013.

BRAHMACHARI, G.; DEMAIN, A. L.; ADRIO, J. L. **Biotechnology of Microbial Enzymes**. Londres: Academic Press, 2016. 634 p.

CHÊNEVER, R.; PELCHAT, N.; MORIN, P. Lipase-mediated enantioselective acylation of alcohols with functionalized vinyl esters: acyl donor tolerance and applications. **Tetrahedron: Asymmetry**, Londres, v.20, p.1191–1196, 2009.

CABRERA, Z. PALOMO, J. M. Enantioselective desymmetrization of prochiral diesters catalyzed by immobilized *Rhizopus oryzae* lipase. **Tetrahedron: Asymmetry**, Londres, v. 22, p. 2080-2084, 2011.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia Enzimatica**. RJ: EPUB, 2008. 288 p.

DIJKSTRA, Z. J. **The potential of enzymatic catalysis in supercritical fluids**. Eindhoven: Technische Universiteit Eindhoven. 2006. 126 p.

DUNN, P. J.; WELLS, A. S.; WILLIAMS, M. T. **Green Chemistry in the Pharmaceutical Industry**. Weinheim: Wiley-Vch, 2010. 370p.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**. 6. ed.; Berlin: Springer-Verlag, 2011. 468 p.

FONSECA, T. S.; LIMA, L. D.; OLIVEIRA, M. C. F.; LEMOS, T. L. G.; ZAMPIERI, D.; MOLINARI, F.; MATTOS, M. C. Chemoenzymatic synthesis of luliconazole mediated by lipases. **European Journal of Organic Chemistry**, Weinheim, v. p. 2110-2116, 2018.

GAO, M.; REJAEI, D.; LIU, H. Ketamine use in current clinical practice. **Acta Pharmacologica Sinica**, Londres, v.37, p.865–872, 2016.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. **An introduction to genetic analysis**, 7th edition, New York, W. H. Freeman, 2000.

GUPTA, M, N.; KALOTI, M.; KAPOOR, M.; SOLANKI, K. Nanomaterials as Matrices for Enzyme Immobilization. **Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology**, Londres, v. 39 p.98–109, 2011.

HIROTA, K.; LAMBERT, D.G. Ketamine: new uses for an old drugs? **British of Anaesthesia**, Nova Iorque, v. 107, p. 123-126, 2011.

INOUE, K.; MAKINO, Y.; ITOH, N. Production of (*R*)-chiral alcohols by a hydrogen-transfer bioreduction with NADH-dependent Leifsonia alcohol dehydrogenase (LSADH). **Tetrahedron: Asymmetry**. Londres, v.16, p. 2539–2549, 2005.

JAEGER, K-E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, MT: Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annu Rev Microbiol**, Palo Alto, v.53, p.315-351, 1999.

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**, Washington, D.C., 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**, Londres, v. 6, p. 471–474, 2004.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, Nova Iorque, v. 35 p.126–139, 2004.

KRONENBERG, R. H. Ketamine as an analgesic: parenteral, oral, rectal, subcutaneous,

transdermal and intranasal administration. **Journal of Pain & Palliative Care Pharmacotherapy**, Londres, v. 16, I.3, p. 27-35, 2002.

LI, C.; JIANG, S.; ZHAO, X.; LIANG, H. Co-Immobilization of Enzymes and Magnetic Nanoparticles by Metal-Nucleotide Hydrogelnanofibers for Improving Stability and Recycling. **Molecules**, Basileia, v.22, 179; p.1-11, 2017.

MACHADO, L. L.; LEMOS, T. L. G.; MATTOS, M. C.; OLIVEIRA, M. C. F.; GONZALO, G.; GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; GOTOR, V. Immobilized *Manihot* esculent preparation as a novel biocatalyst in the enantioselective acetylation of racemic alcohols. **Tetrahedron: Asymmetry**, Londres, v.19, p.1419–1424, 2008.

MANGAS-SÁNCHEZ, J.; RODRÍGUEZ-MATA, M., BUSTO, E.; GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; GOTOR, V. Chemoenzymatic synthesis of rivastigmine based on lipase-catalyzed processes. **J. Org. Chem.**, Washington, D.C., v. 74, p. 5304–5310, 2009.

MARGOLIN, A. L. Enzymes in the synthesis of chiral drugs. **Enzyme and Microbial Technology**, Nova Iorque, v. 15, n.4, p. 266-280, 1993.

MARTINS, J. E. D.; Contreras Redondo, M. A.; Wills, M. Applications of *N'*-alkylated derivatives of TsDPEN in the asymmetric transfer hydrogenation of C=O and C=N bonds. **Tetrahedron: Asymmetry**, Londres, v. 21, p. 2258–2264, 2010.

MATHARU, D. S.; MORRIS, D. J.; KAWAMOTO, A. M.; CLARKSON, G.J.; WILLS, M. A. Stereochemically Well-Defined Rhodium (III) Catalyst for Asymmetric Transfer Hydrogenation of Ketones. **Organic Letters**, Washington, D.C., v. 7, n. 24, p.5489–5491, 2005.

MION, G.; VILLEVIELLE, T. Ketamine pharmacology: An update (pharmacodynamics and molecular aspects, recent findings. **CNS Neurosci. Ther.**, Hoboken, v.19, p.370–380, 2013.

MOHAMAD, N. R.; MARZUKI, N. H. C.; BUANG, N. A.; HUYOP, F.; WAHAB, R. A. An overview of Technologies for immobilization of enzymes and surfaces analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology, Biotechnological Equipment**, Londres, v. 29, n.2, p. 205-220, 2015.

MONTEGGIA, L. M.; ZARATE JR, C. Antidepressant actions of ketamine: from molecular mechanisms to clinical practice. **Current Opinion in Neurobiology.**, Londres, v.30, p.139–143, 2015.

NICHOLL, D. S. T. **An Introduction to Genetic Engineering**. 3 ed., New York: cambridge university press, 2008. 350p.

O'CONNOR, C. D., and TIMMIS, K. N. Highly repressible expression system for cloning genes that specify potentially toxic proteins. **J. Bacteriol.**, Washington D.C., v. 169, P. 4457–4462, 1987.

PAI, A.; HEINING, M. Ketamine. **British Journal of Anaesthesia.**, Nova Iorque, v.7, n.2, p.

59-63, 2007.

PÄIVIÖ, M.; MAVRYNSKY, D.; LEINO, R.; KANERVA, L. T. Dynamic Kinetic Resolution of a Wide Range of Secondary Alcohols: Cooperation of Dicarboxylchlorido(pentabenzylcyclopentadienyl)ruthenium and CAL-B. **Eur. J. Org. Chem**, Weinheim, P. 1452–1457, 2011.

PITZER, J.; STEINER, K. Amides in Nature and Biocatalysis. **Journal of Biotechnology**., Londres, v. 235, p. 32–46, 2016.

PRESKORN, S. H. Ketamine: The Hopes and the Hurdles. **Biol Psychiatry**, Nova Iorque, v.72, p.522–523, 2012.

ROBIC, A.; ULLMANN, C.; AUFRAY, P.; PERSILLON, C.; MARTIN, J. Enzymes for industrial applications. **OCL**, Londres, v.24, n.4, p.1-6, 2017.

SALVADORE, G. SINGH, J. Ketamine as a Fast Acting Antidepressant: Current Knowledge and Open Questions. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, Hoboken, v.19, p.428–436, 2013.

SANDOVAL, G. **Lipases and Phospholipases Methods and Protocols**. 1.ed; Nova York: Humana Press, 2012. 547 p.

SAWYNOK, J. Topical and Peripheral Ketamine as an Analgesic. **Anesthesia & Analgesia**, San Francisco, v.119, n.1, p. 170-178, 2014.

SOLANO, L. M. R.; LOURENÇO, N. M. T. Enzymatic resolution of antidepressant drug precursors in an undergraduate laboratory. **Quím. Nova**, São Paulo, v.38, n.2, p. 285-287, 2015.

TUCK, A. N.; GHAZALI, D. H. Ketamine as a Rapid-Acting Antidepressant: Promising Clinical and Basic Research. **The American Journal of Psychiatry Residents' Journal**, Washington, D.C., v. 12, p.3-5, 2017.

WILSON, L.; ILLANES, A.; ROMERO, O. Effect of inactivation and reactivation conditions on activity recovery of enzyme catalysts. **Electronic Journal of Biotechnology**, Londres, v. 16, n. 3, 2013.

WOOLF, T.; TREVOR, A.; BAILLIE, T.; CASTAGNOLI, N. Synthesis of (Z)-and (E)-6-Hydroxyketamine. **J. Org. Chem.**, Washington, D.C., v. 49, n. 18, p. 3305-3310, 1984.

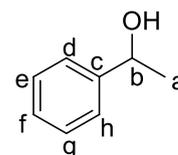
YIKE, I., Y. ZHANG, J. Ye; D. G. DEARBORN, Expression in Escherichia coli of cytoplasmic portions of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: apparent bacterial toxicity of peptides containing R-domain sequences. **Protein Expression Purif.** Londres, v. 7, p. 45–50, 1996.

ZHANG, Z-Q.; CHEN, T.; ZHANG, F-M. Copper-Assisted Direct Nitration of Cyclic Ketones with Ceric Ammonium Nitrate for the Synthesis of Tertiary α -Nitro- α -substituted Scaffolds. **Organic Letters**, Washington, D.C., v. 19, p. 1124–1127, 2017.

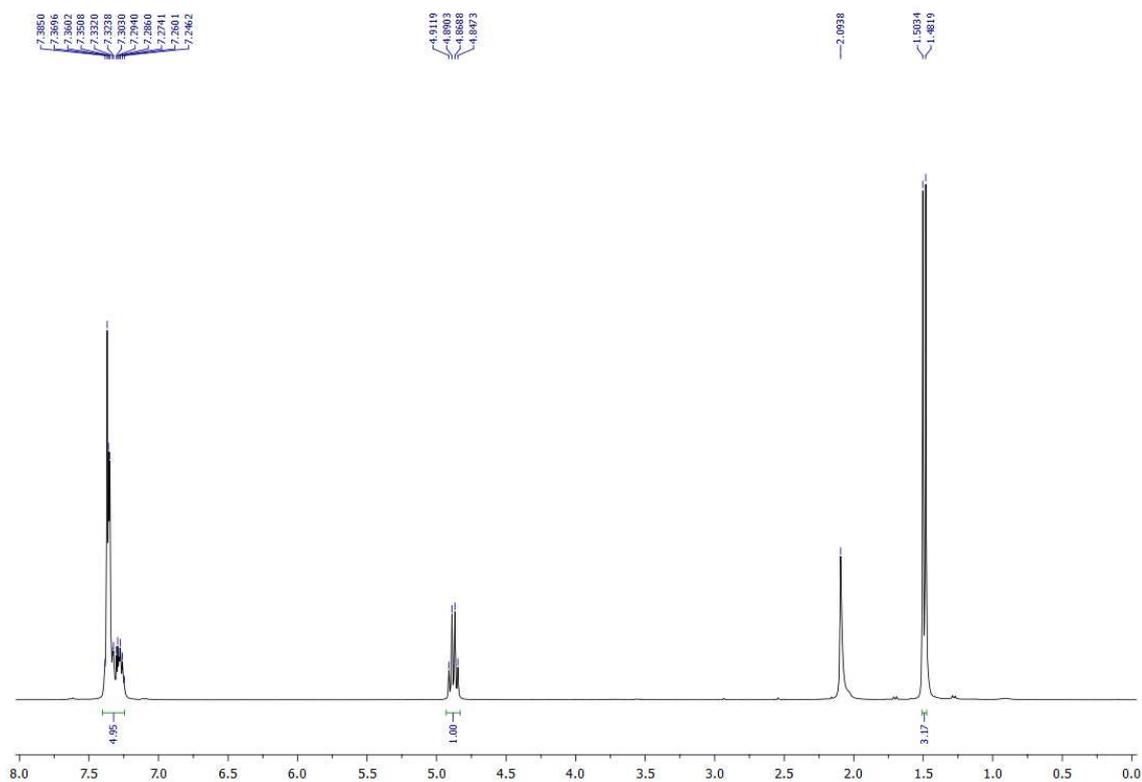
ANEXO A – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-2A-FENILETANOL

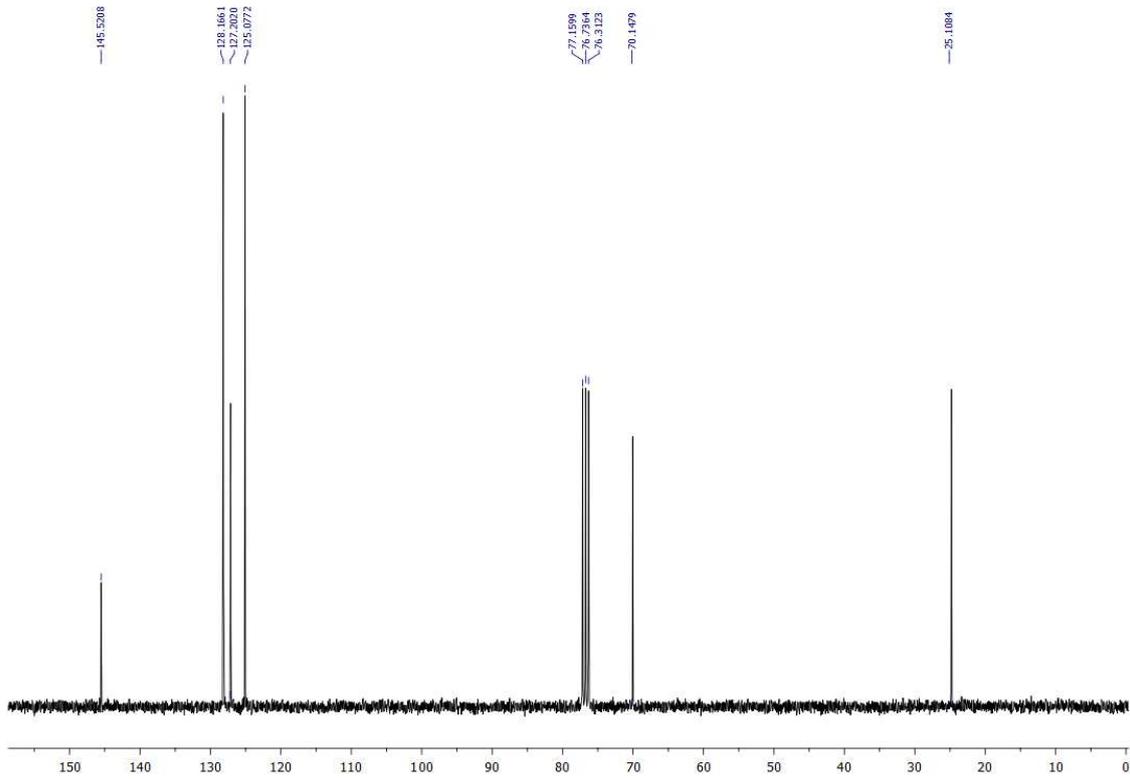
RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 1,49 (d, 3H_a, J= 6,5 Hz); δ : 4,88 (q, 1H_b, J= 6,5 Hz); δ : 7,25-7,40 (m, 5H_{defgh}).

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 25,11 (C_a); δ : 70,15 (C_b); δ :125,08 (C_d, C_h); δ :127,20 (C_f); δ :128,17 (C_e, C_g); δ :145,52 (C_c).

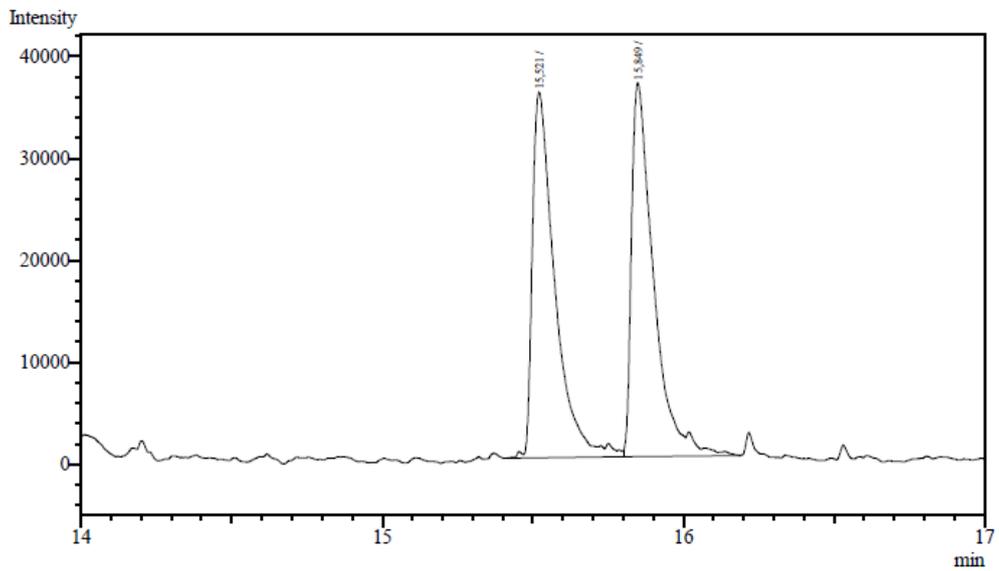


Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

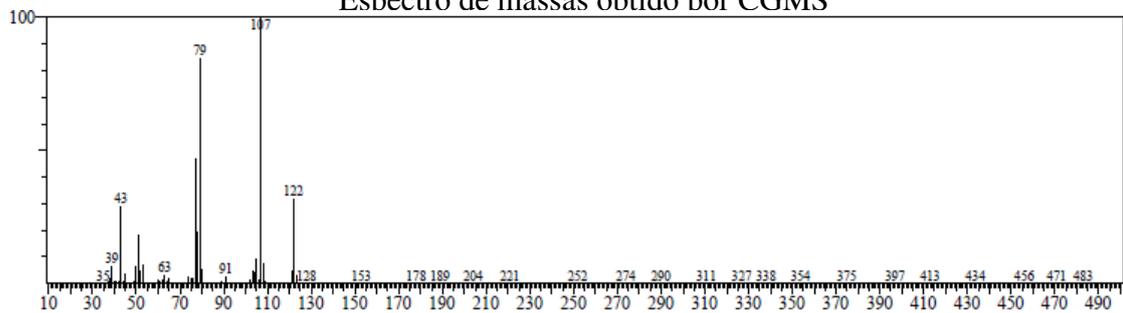


Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3)

Cromatograma obtido por CG-FID



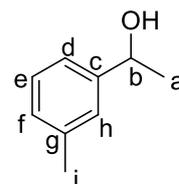
Espectro de massas obtido por CGMS



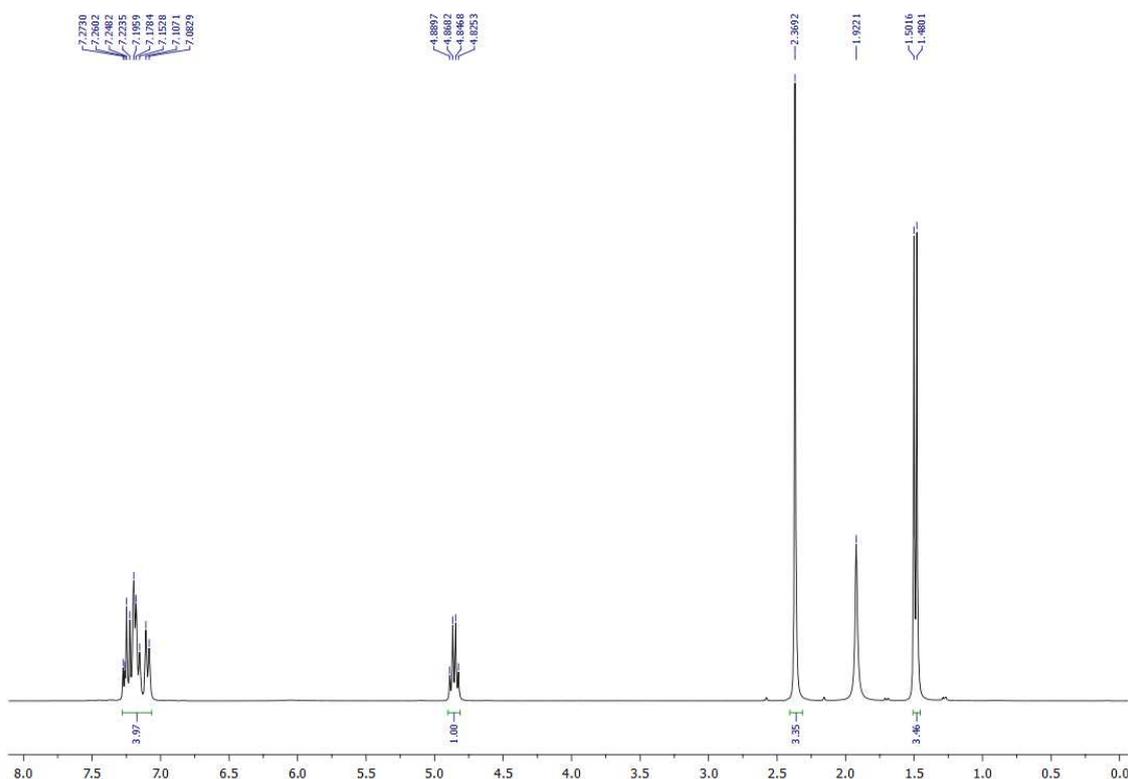
ANEXO B – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-2B-(3-METILFENIL)ETANOL

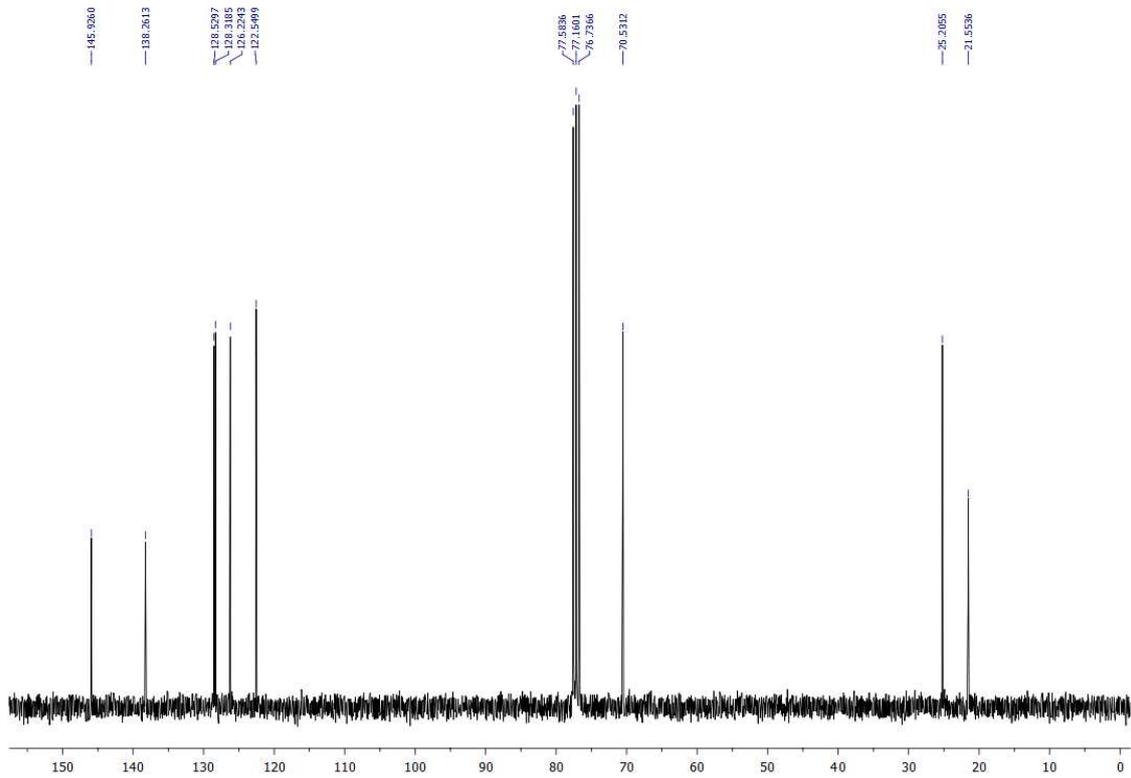
RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 1,49 (d, 3H_a, J= 6,5Hz); δ: 2,37 (s, 3H_i); δ: 4,86 (q, 1H_b, J= 6,4 Hz); δ: 7,04-7,30 (m, 4H_{defh}).

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ: 21,55 (C_i); δ:25,20 (C_a); δ:70,53 (C_b); δ:122,55 (C_d); δ:126,22 (C_f); δ:128,32 (C_e); δ:128,53 (C_h); δ:138,26 (C_g); δ:145,93 (C_c).

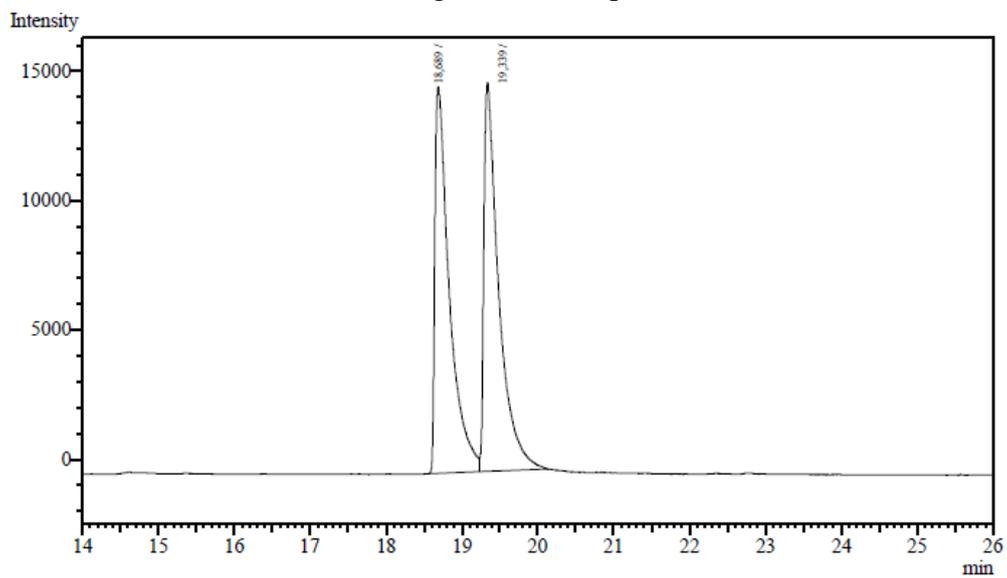


Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

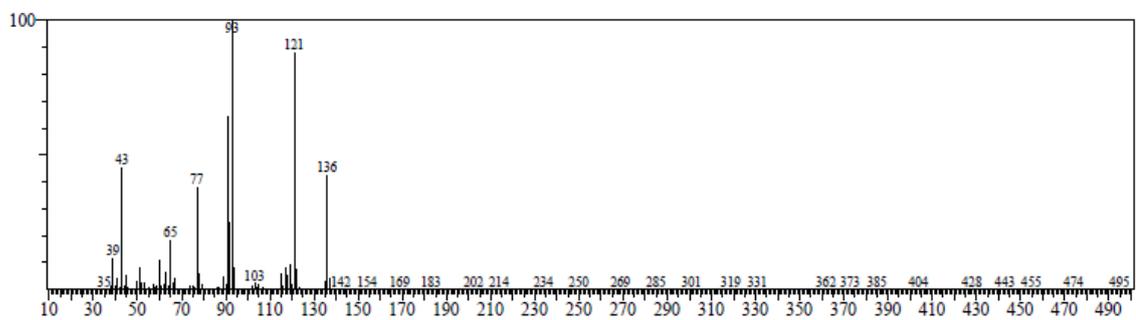


Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3)

Cromatograma obtido por CG-FID



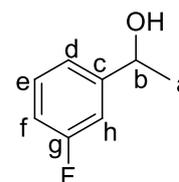
Espectro de massas obtido por CGMS



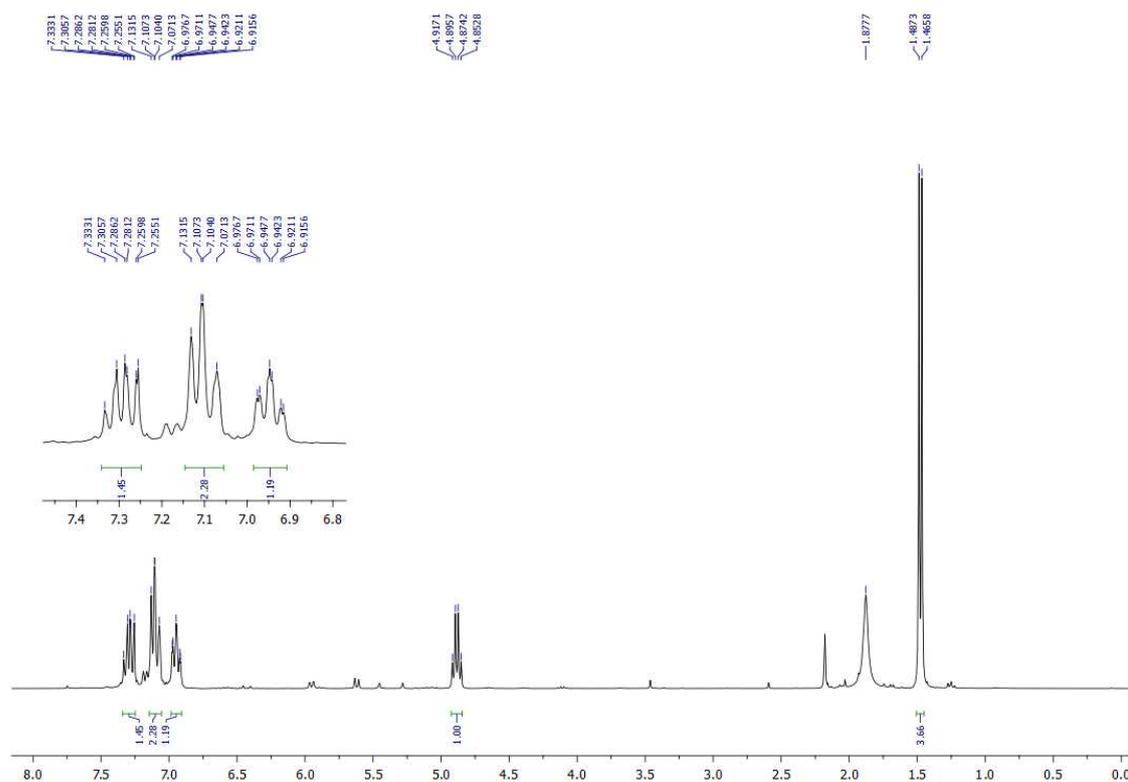
ANEXO C – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-2C-(3-FLUOROFENIL)ETANOL

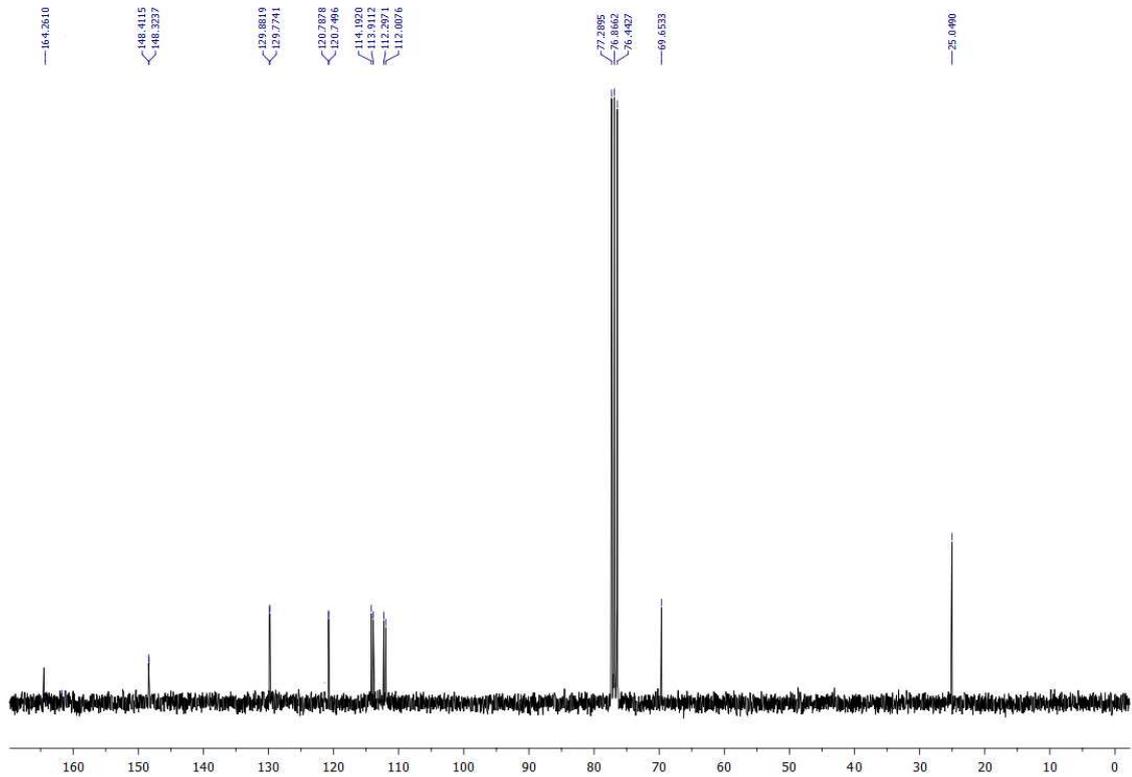
RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 1,48 (d, 3H_a, J= 6,5 Hz); δ: 4,89 (q, 1H_b, J= 6,4 Hz); δ: 6,95 (td, J = 8,4, 1,7 Hz 1H_h); δ: 7,04-7,21 (m, 2H_{df}); δ: 7,24-7,35 (m, 1H_e).

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ: 25,05 (C_a); δ: 69,65 (C_b); δ: 112,15 (C_h); δ: 114,05 (C_f); δ: 120,77 (C_d); δ: 129,82 (C_e); δ: 148,37 (C_c); δ: 164,26 (C_g).

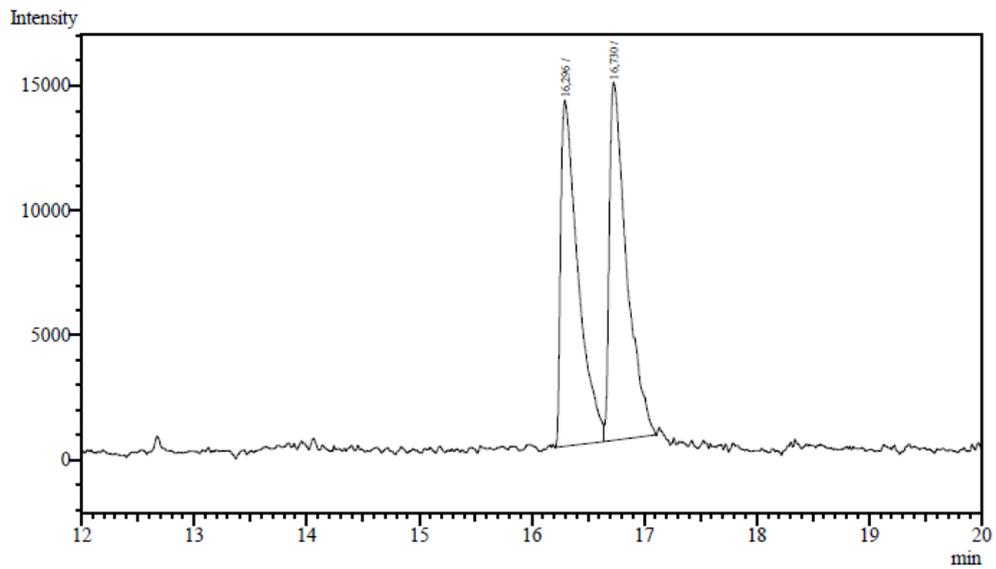


Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

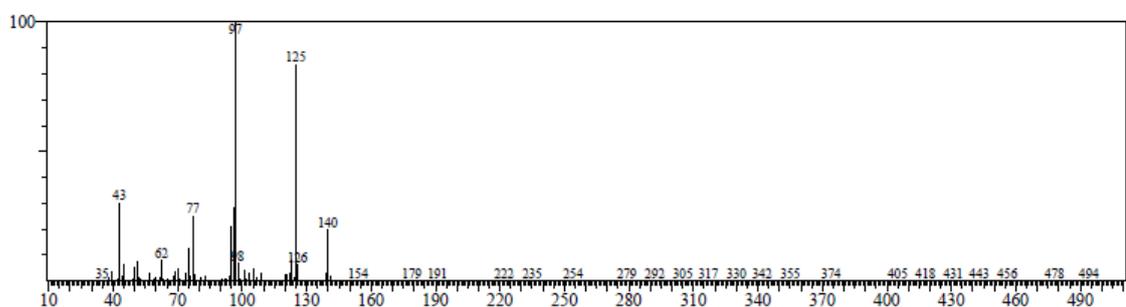


Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3)

Cromatograma obtido por CG-FID



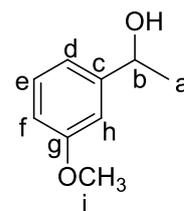
Espectro de massas obtido por CGMS



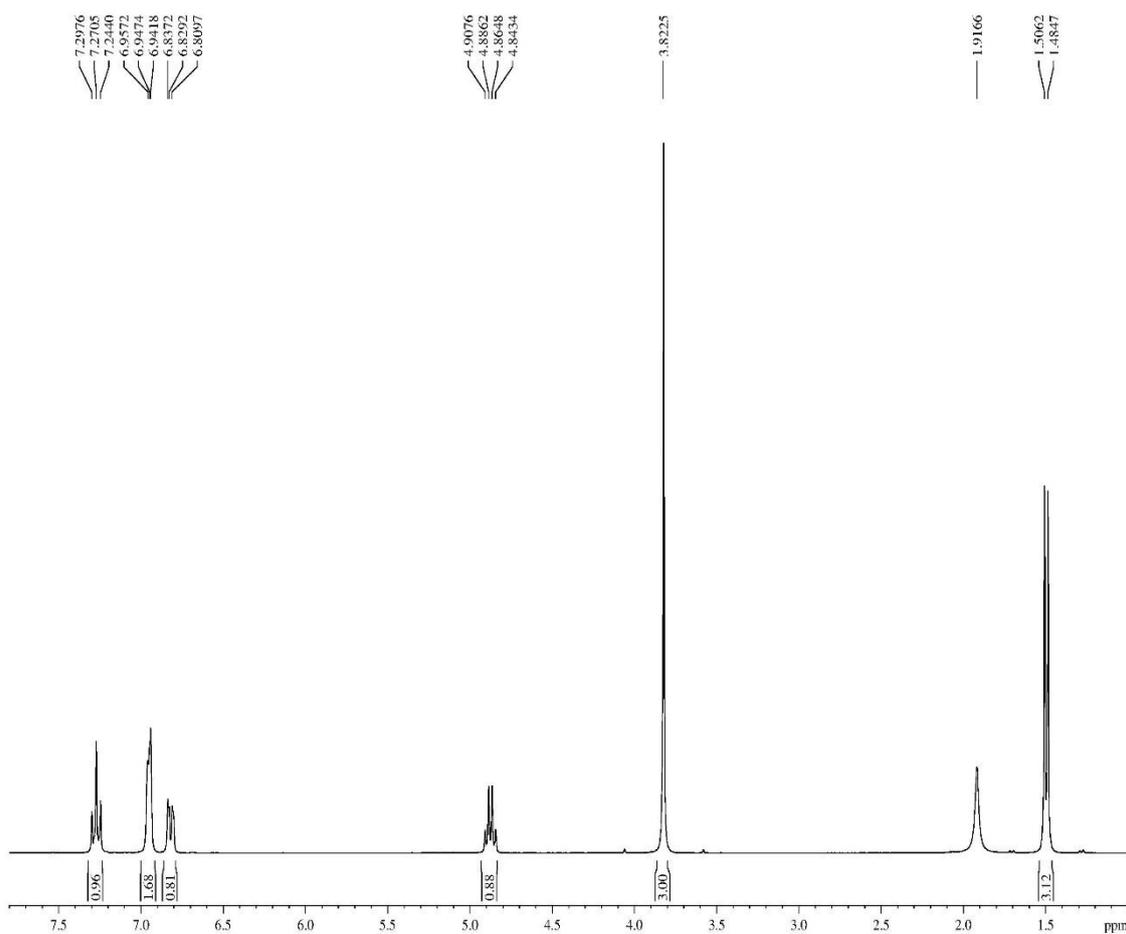
ANEXO D – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-2D-(3-METÓXIFENIL)ETANOL

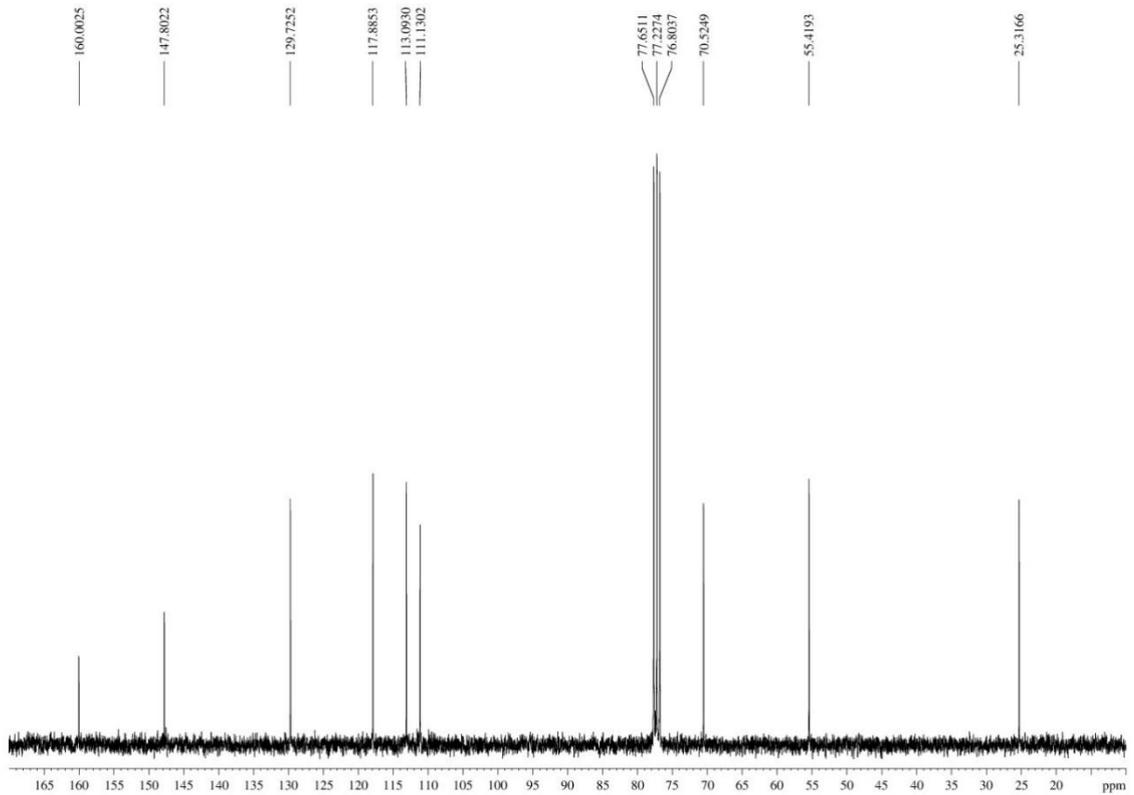
RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 1,48 (d, 3H_a, J= 6,50 Hz); δ : 3,82 (s, 3H_i); δ : 4,87 (q, 1H_b, J= 6,50 Hz); δ : 6,80-6,83 (m, 1H_f); δ : 6,94-6,95 (m, 2H_{hd}) δ : 7,27 (t, 1H_e, J= 8Hz).

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 25,32 (C_a); δ : 55,42 (C_i); δ : 70,52 (C_b); δ : 111,13 (C_h); δ : 113,09 (C_f); δ : 117,88 (C_d); δ : 129,72 (C_e); δ : 147,80 (C_c); δ : 160,00 (C_g).

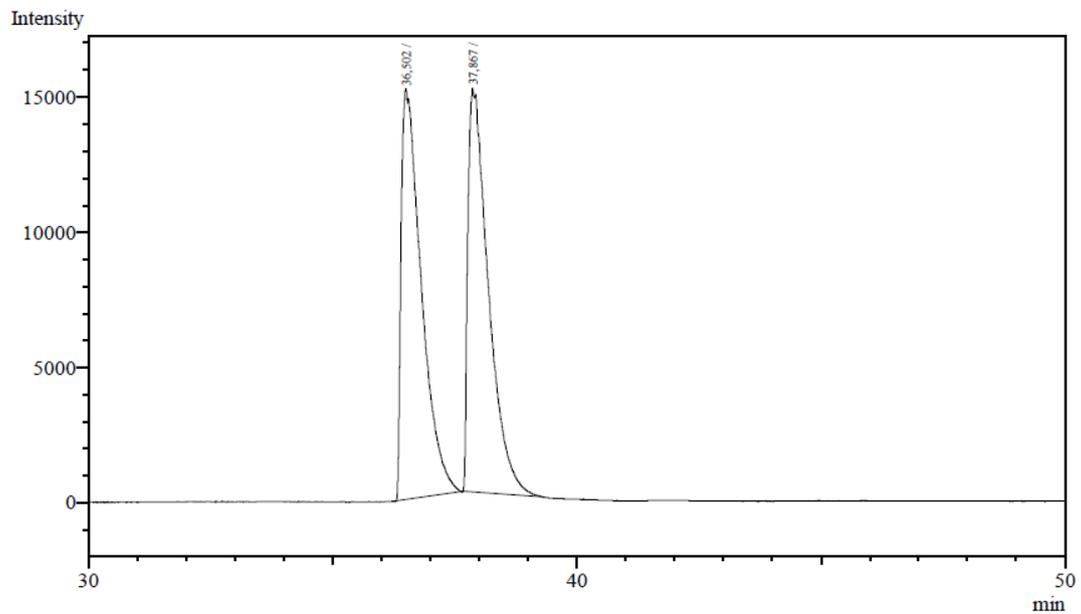


Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

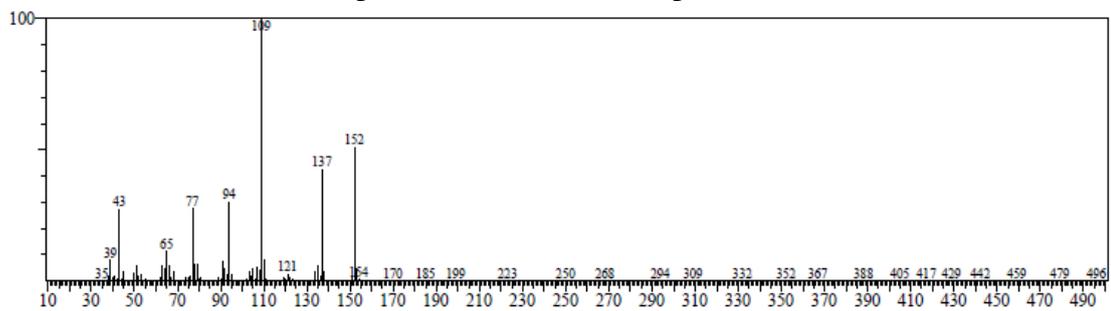


Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3)

Cromatograma obtido por CG-FID



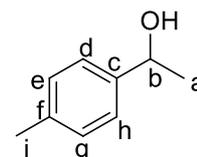
Espectro de massas obtido por CGMS



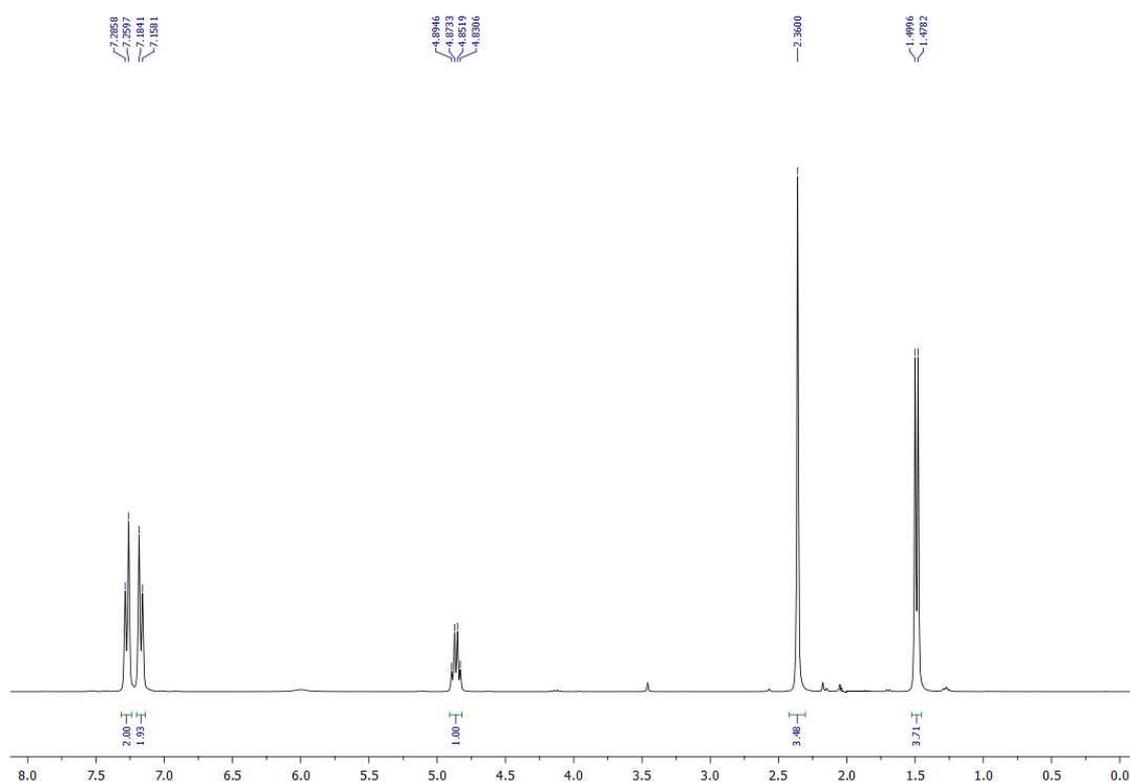
ANEXO E – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-2E-(4-METILFENIL)ETANOL

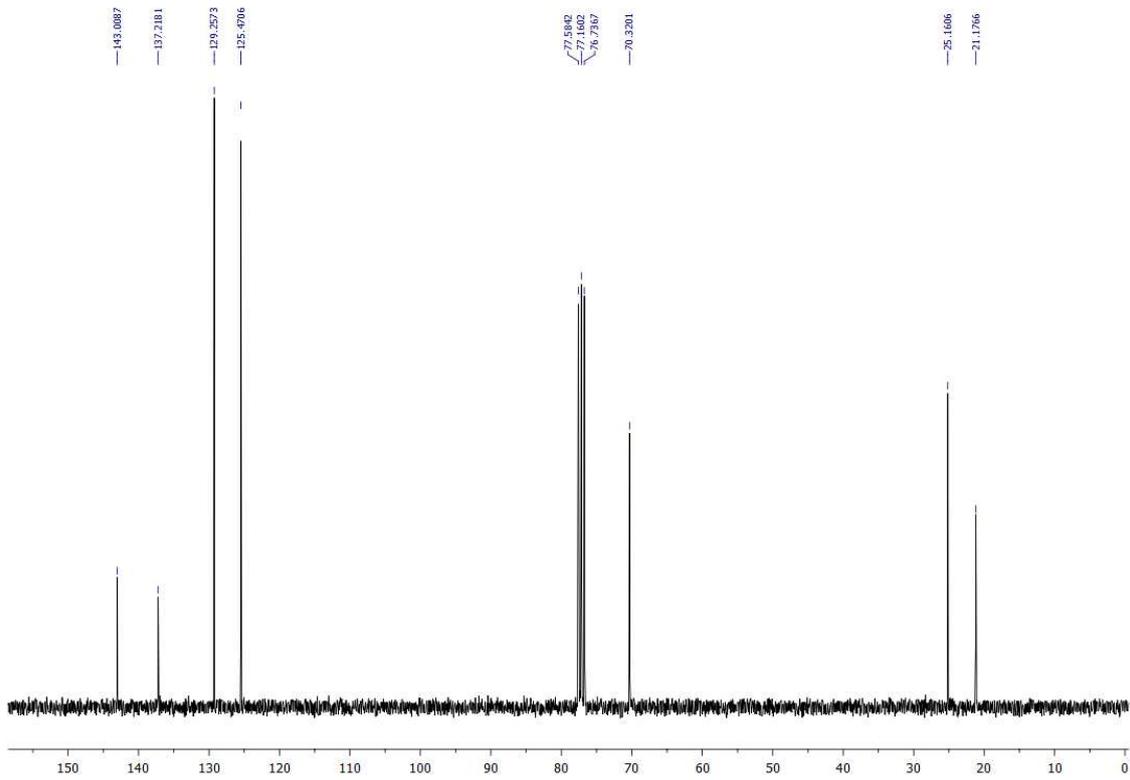
RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 1,49 (d, 3H_a, J= 6,4 Hz); δ: 2,36 (s, 3H_i); δ: 4,86 (q, 1H_b, J= 6,4 Hz); δ: 7,17 (d, 2H_{eg}, J= 7,8 Hz); δ: 7,27 (d, 2H_{dh}, J= 7,8 Hz).

RMN¹³C (300 MHz, CDCl₃) δ: 21,18 (C_i); δ: 25,16(C_a); δ: 70,32(C_b); δ: 125,57(C_d,C_h); δ: 129,26(C_e, C_g); δ: 137,22(C_f); δ: 143,01(C_c)

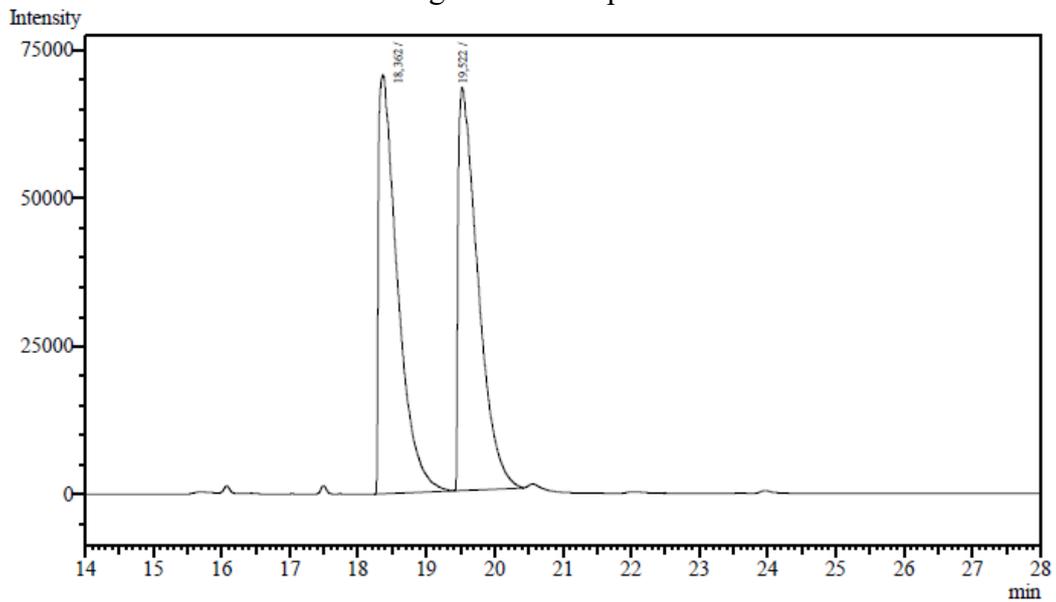


Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

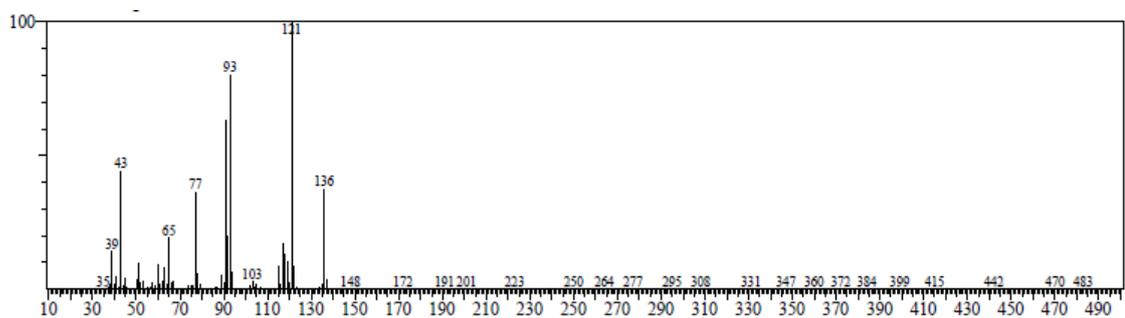


Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3)

Cromatograma obtido por CG-FID



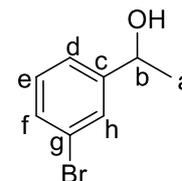
Espectro de massas obtido por CGMS



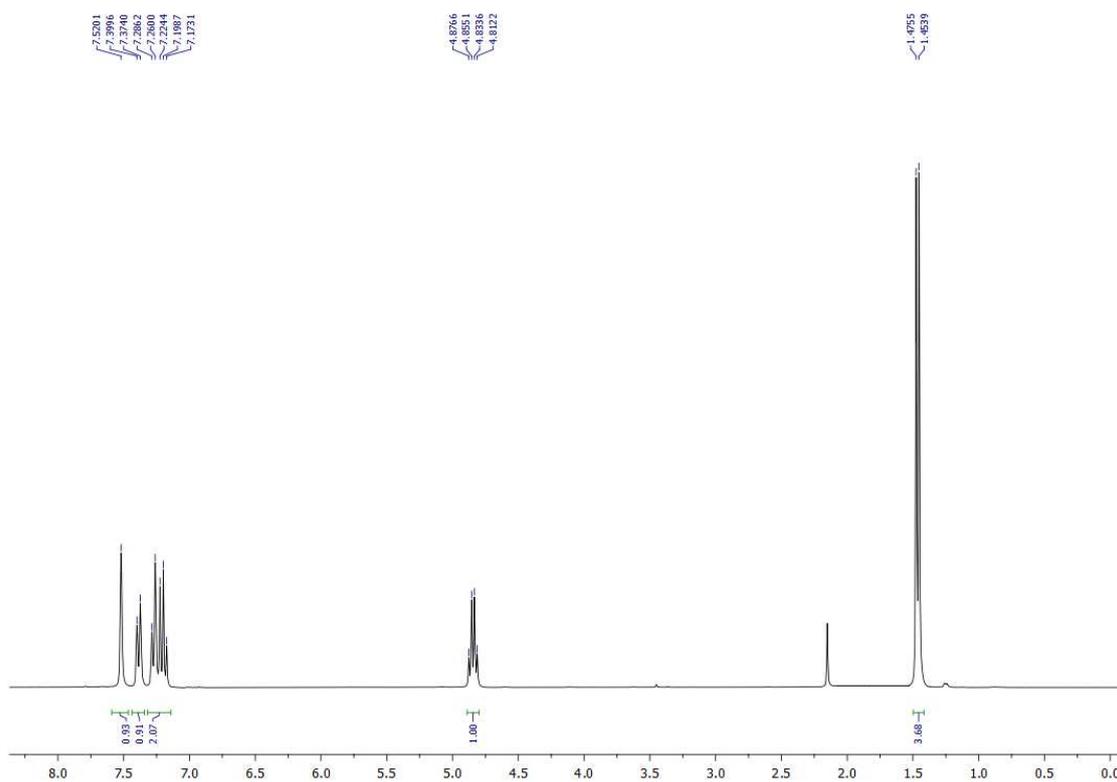
ANEXO F – DADOS EXPERIMENTAIS DO *RAC*-2F(3-BROMOFENIL)ETANOL

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 1,46 (d, 3H_a, J= 6,5 Hz); δ: 4,84 (q, 1H_b, J= 6,4 Hz); δ: 7,13-7,29 (m, 2H_{d,f}); δ: 7,39 (d, 1H_e, J= 7,7 Hz); δ: 7,52 (s, 1H_h).

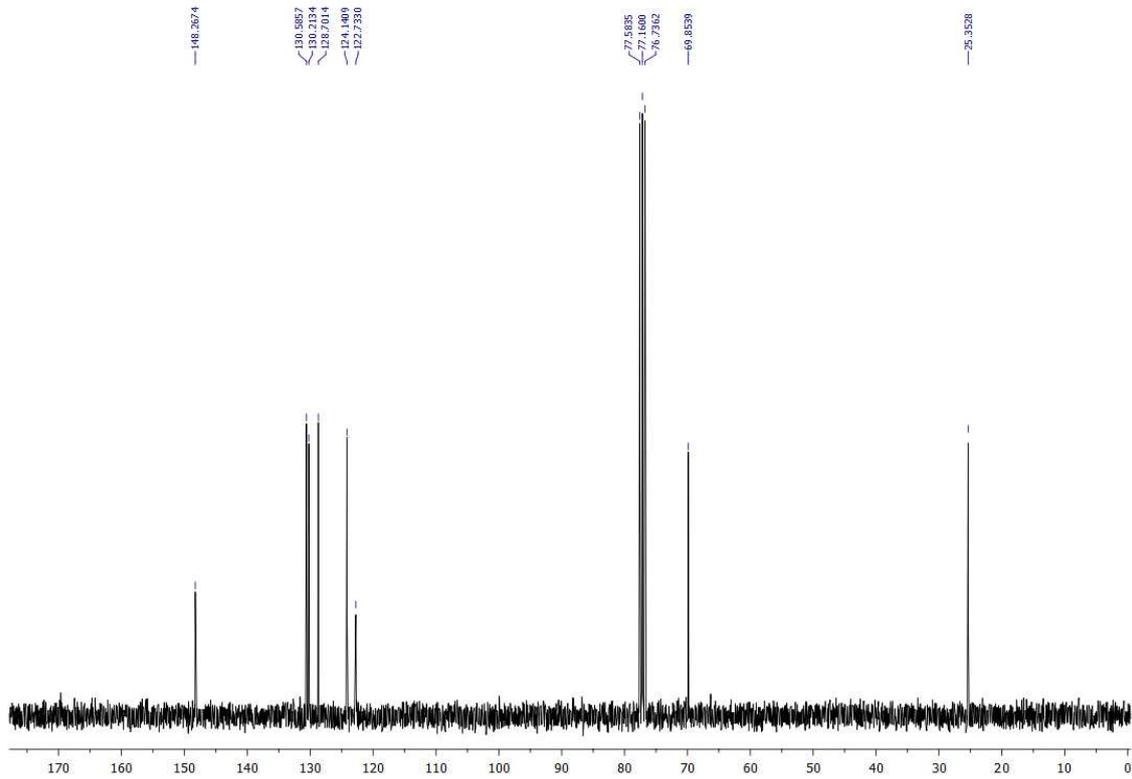
RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ: 25,35 (C_a); δ: 69,85 (C_b); δ: 122,73 (C_g); δ: 124,14 (C_d); δ: 128,70 (C_e); δ: 130,21 (C_f); δ: 130,59 (C_h); δ: 148,27 (C_c).



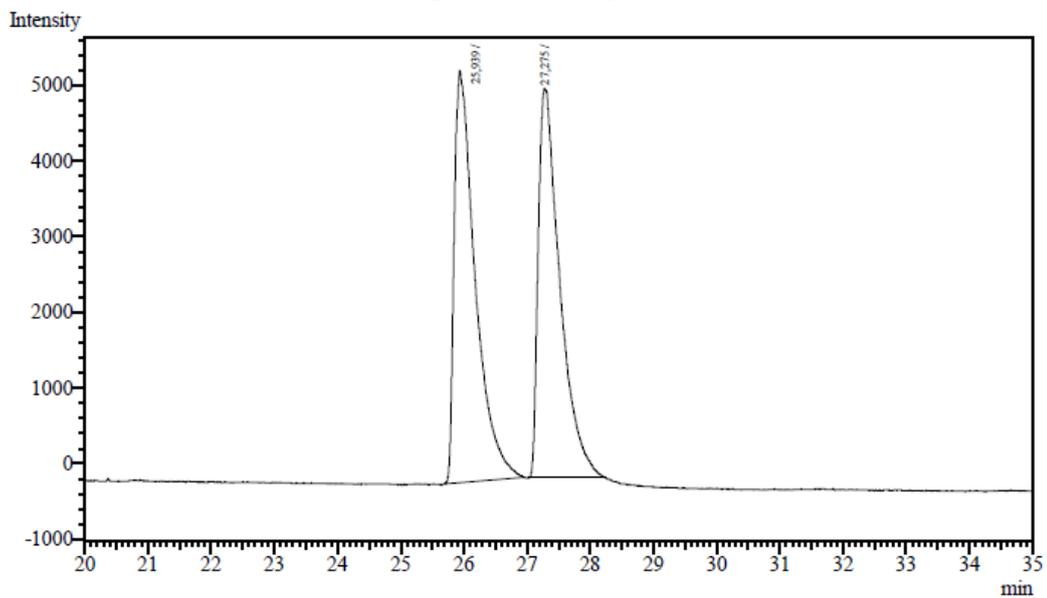
Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)



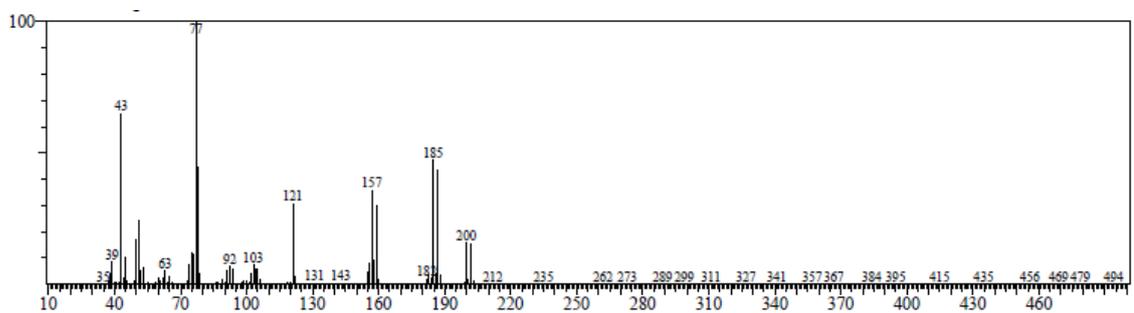
Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3)



Cromatograma obtido por CG-FID



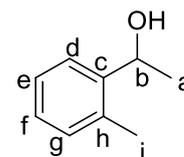
Espectro de massas obtido por CGMS



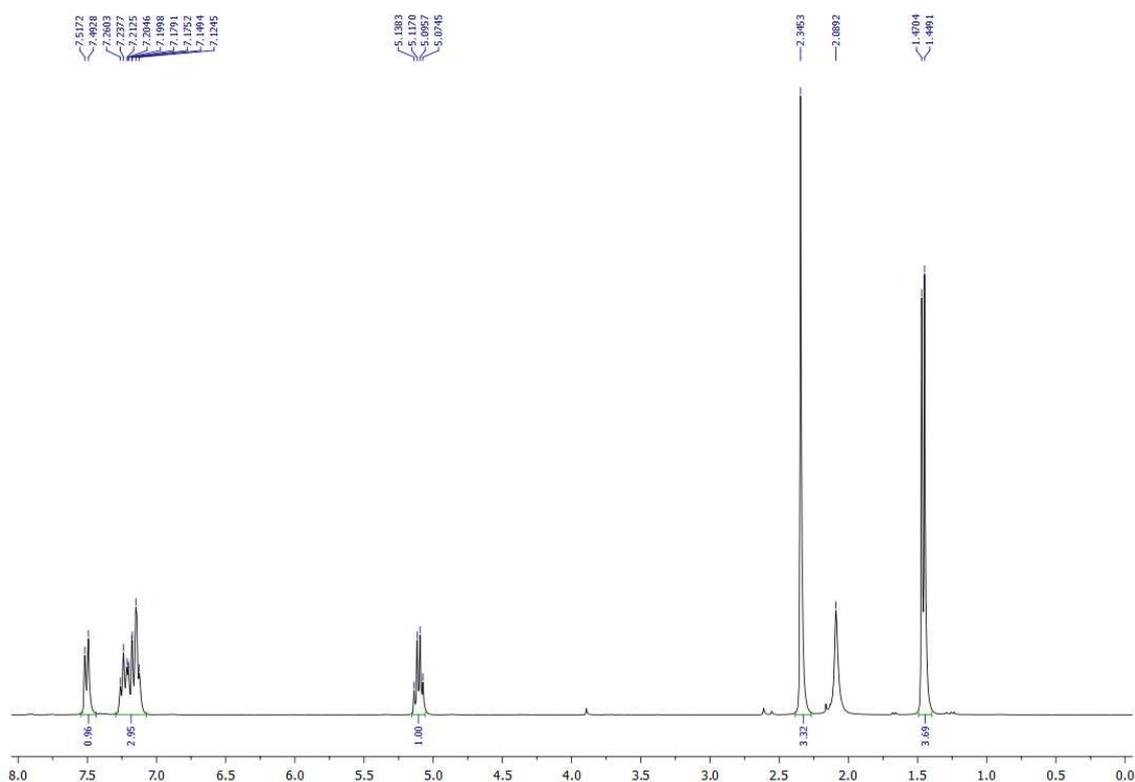
ANEXO G – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-2G-(2-METILFENIL)ETANOL

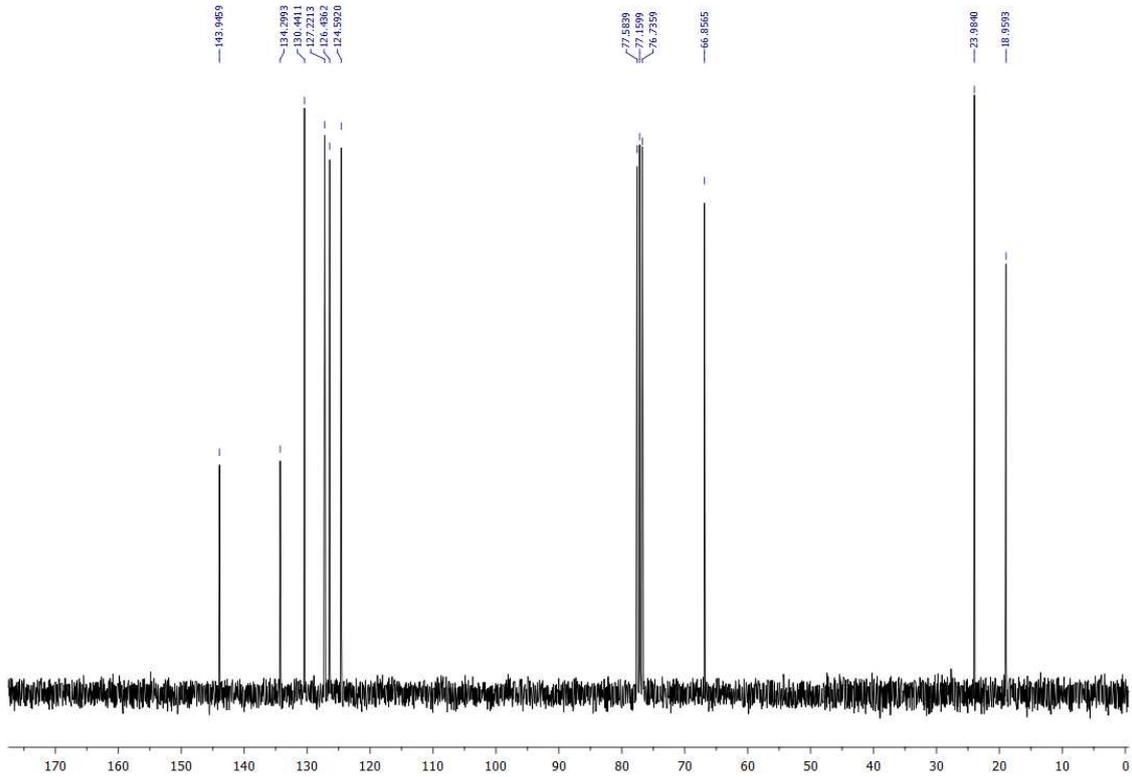
RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 1,46 (d, 3H_a, J= 6,4 Hz); δ : 2,35 (s, 3H_i); δ : 5,11 (q, 1H_b, J= 6,4 Hz); δ : 7,07-7,30 (m, 3H_{dfg}); δ : 7,50 (d, 1H_e, J= 7,3 Hz).

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 18,96 (C_i); δ : 23,98 (C_a); δ : 66,86 (C_b); δ : 124,59 (C_d); δ : 126,44 (C_e); δ : 127,22 (C_g); δ : 130,44 (C_f); δ : 134,30 (C_h); δ : 143,94 (C_c).

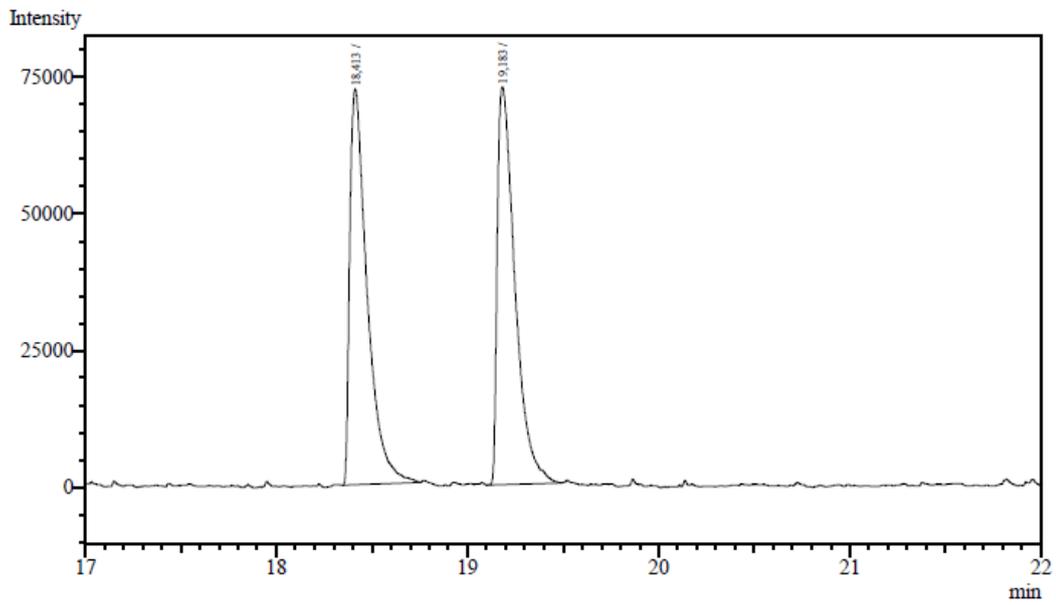


Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

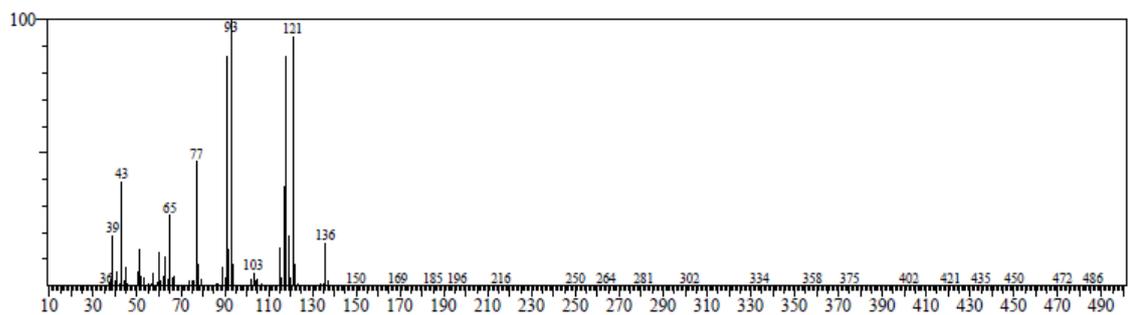


Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3)

Cromatograma obtido por CG-FID



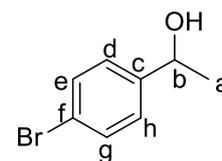
Espectro de massas obtido por CGMS



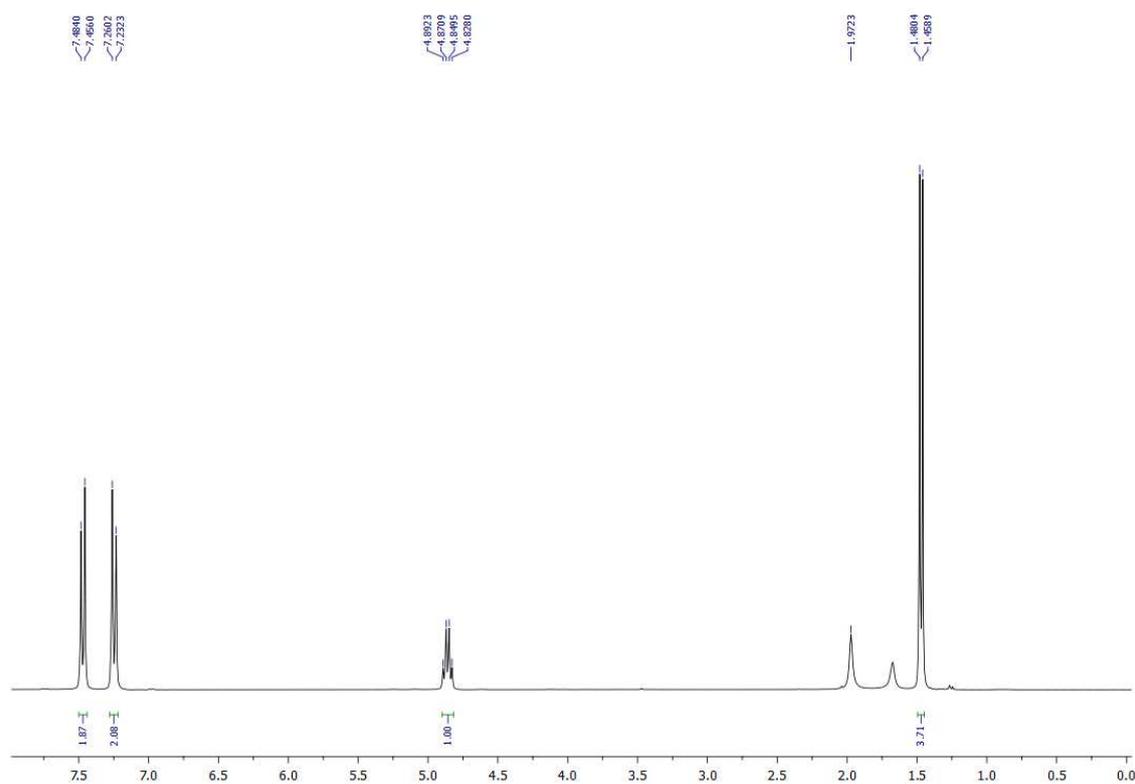
ANEXO H – DADOS EXPERIMENTAIS DO *RAC*-2H-(4-BROMOFENIL)ETANOL

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 1,47 (d, 3H_a, J= 6,5 Hz); δ : 4,86 (q, 1H_b, J= 6,4 Hz); δ : 7,25 (d, 2H_{eg}, J= 8,4Hz); δ : 7,47 (d, 2H_{dh}, J= 8,4Hz).

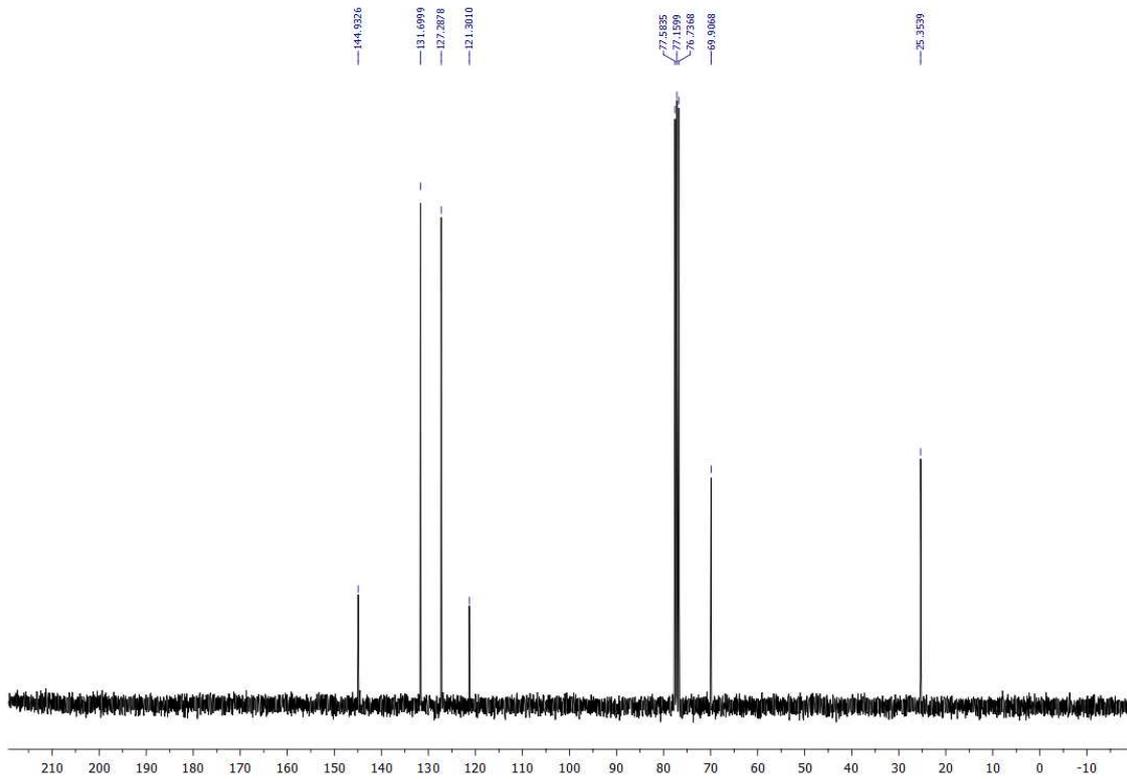
RMN¹³C (300 MHz, CDCl₃) δ : 25,35 (C_a); δ : 69,91(C_b); δ : 121,30(C_f); δ : 127,29(C_d, C_h); δ : 131,70(C_e, C_g); δ : 144,93(C_c).



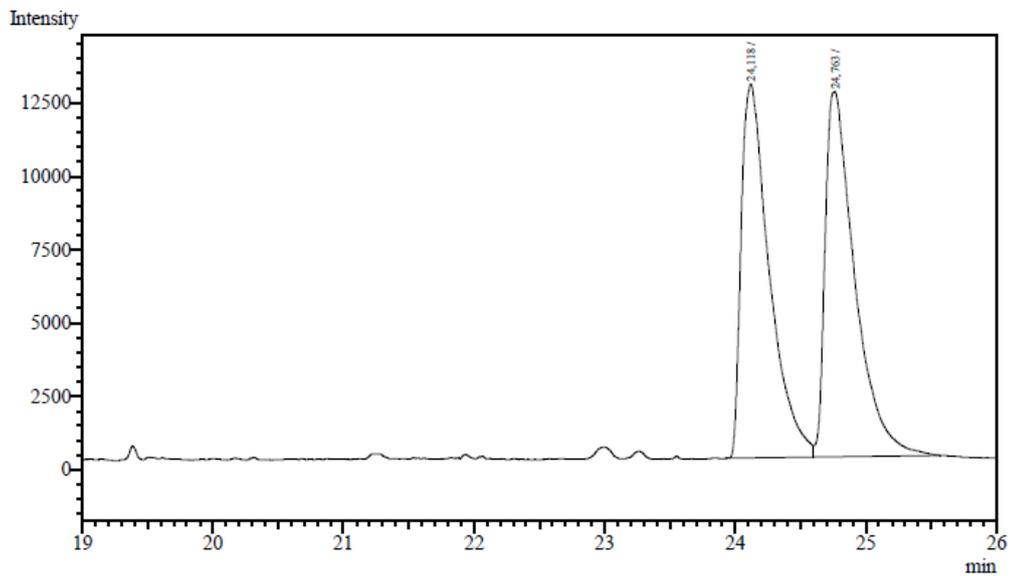
Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)



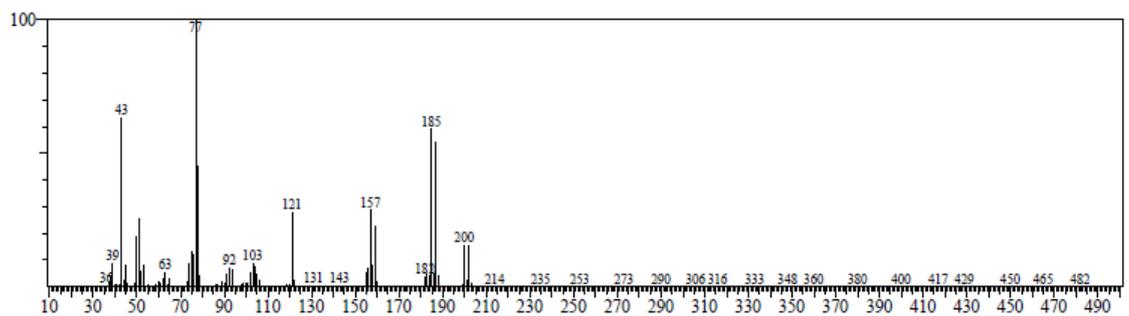
Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3)



Cromatograma obtido por CG-FID



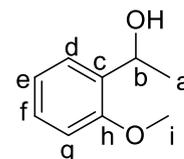
Espectro de massas obtido por CGMS



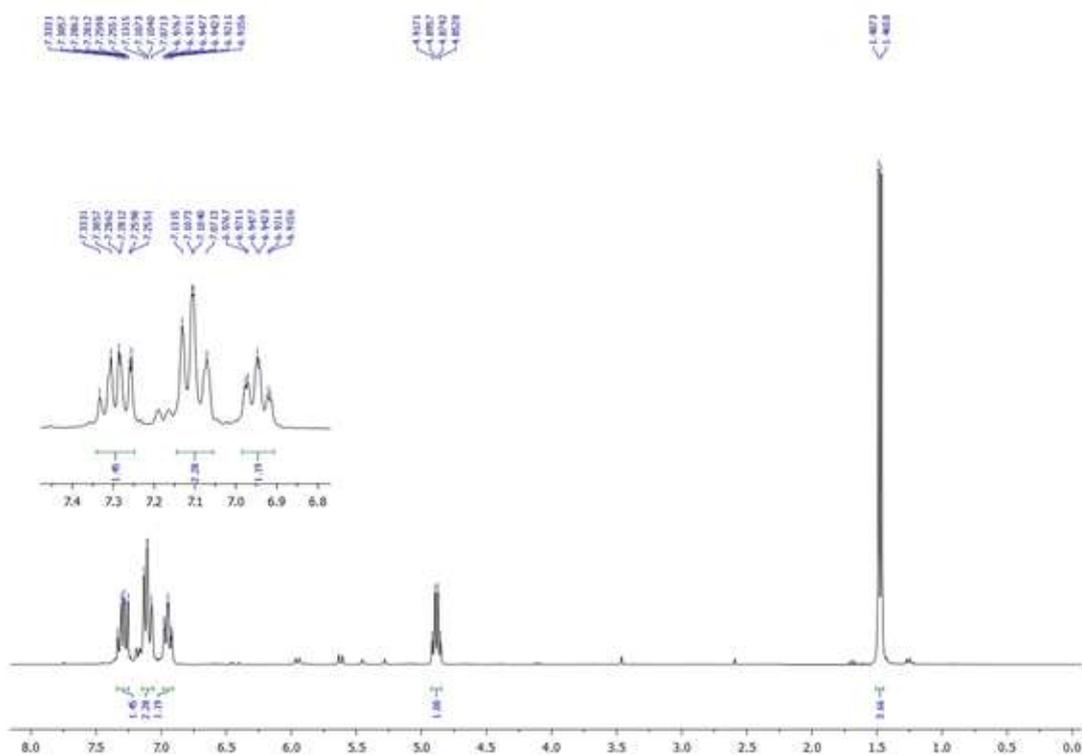
ANEXO I – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-2I-(2-METÓXIFENIL)ETANOL

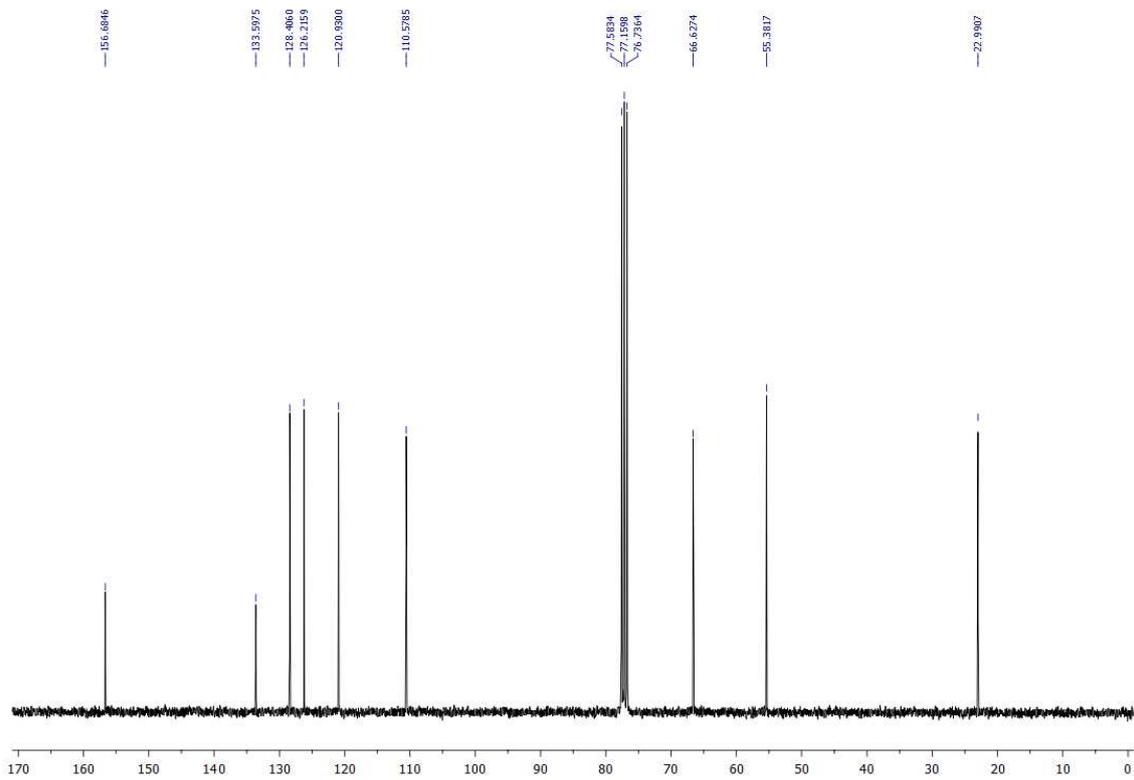
RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 1,55 (d, 3H_a, J= 6,5 Hz); δ: 3,90 (s, 3H_i); δ: 5,14 (q, 1H_b, J= 6,5Hz) δ: 6,92 (d, 1H_g, J= 8,2 Hz); δ: 7,00 (t, 1H_f, J= 7,4Hz); δ: 7,29 (td, J=8,0; 1,6 Hz 1H_e); δ: 7,38 (dd, J=7,5; 1,3 Hz, 1H_d).

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ: 23,99 (C_a); δ: 55,38 (C_i); δ: 66,63 (C_b); δ: 110,58 (C_g); δ: 120,93 (C_e); δ: 126,21(C_d); δ: 128,41(C_c); δ: 133,60(C_f); δ: 156,68(C_h).

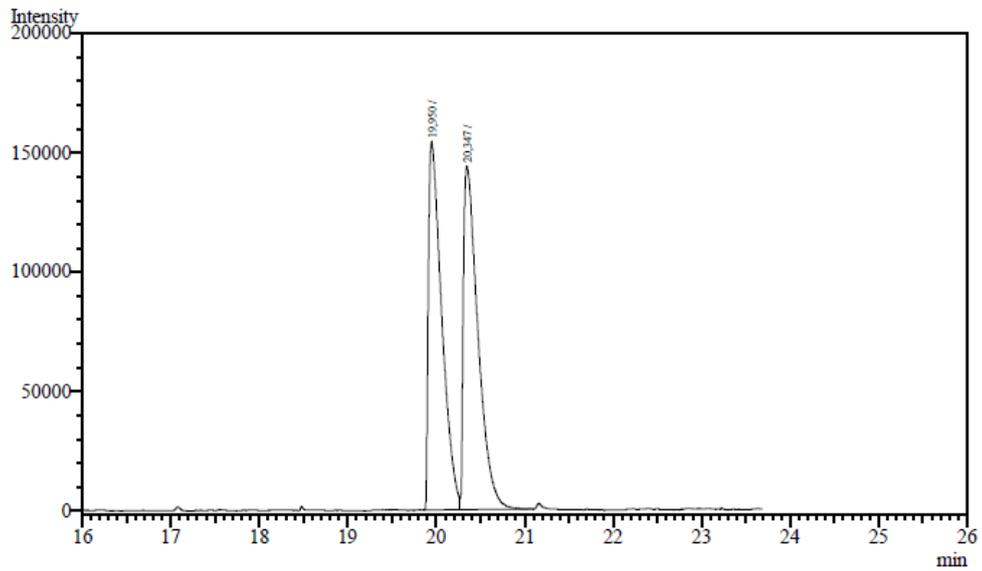


Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

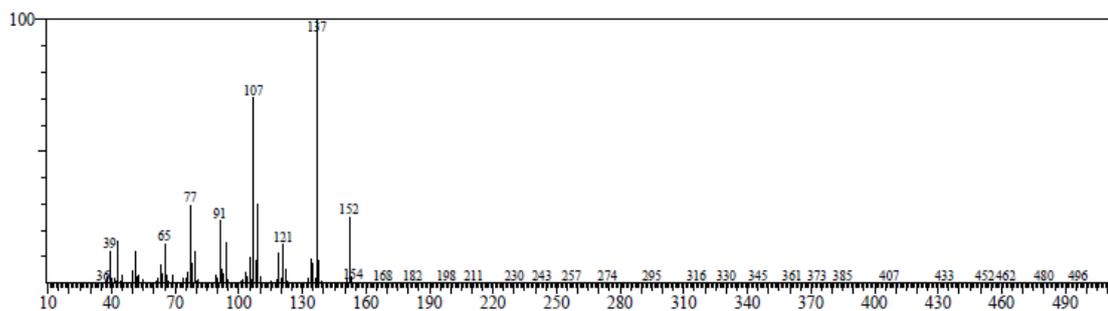


Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3)

Cromatograma obtido por CG-FID



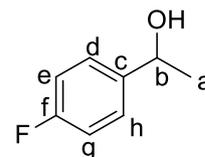
Espectro de massas obtido por CGMS



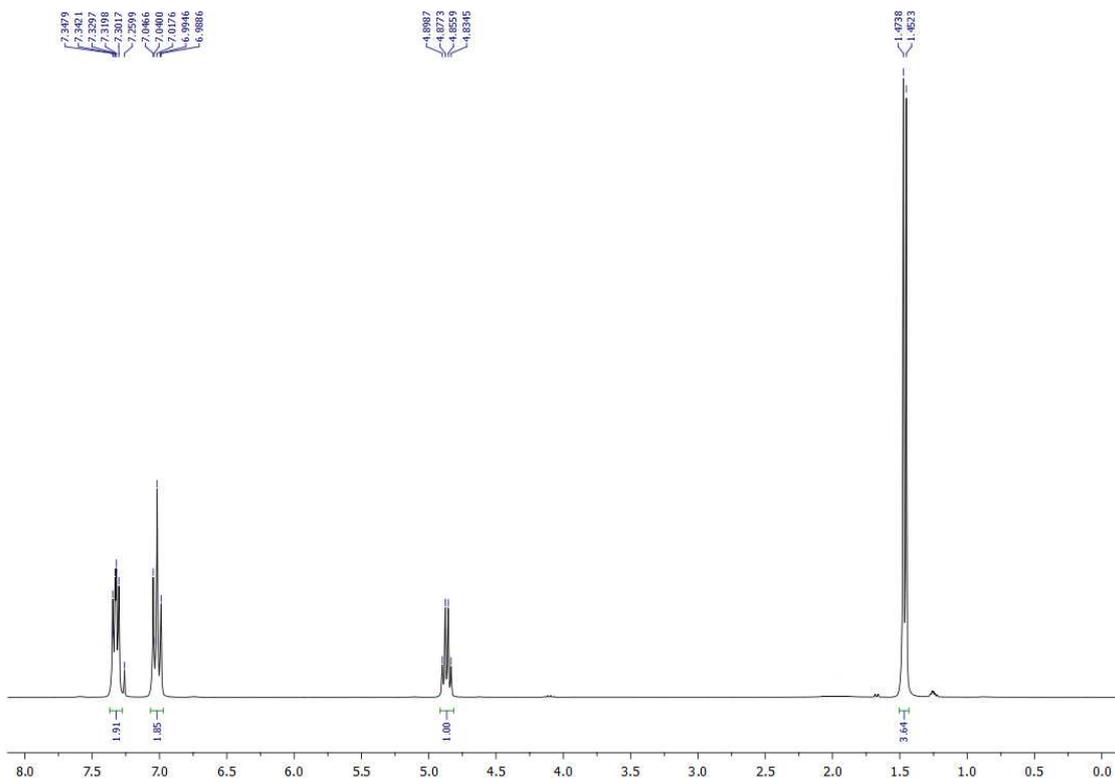
ANEXO J – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-2J-(4-FLUOROFENIL)ETANOL

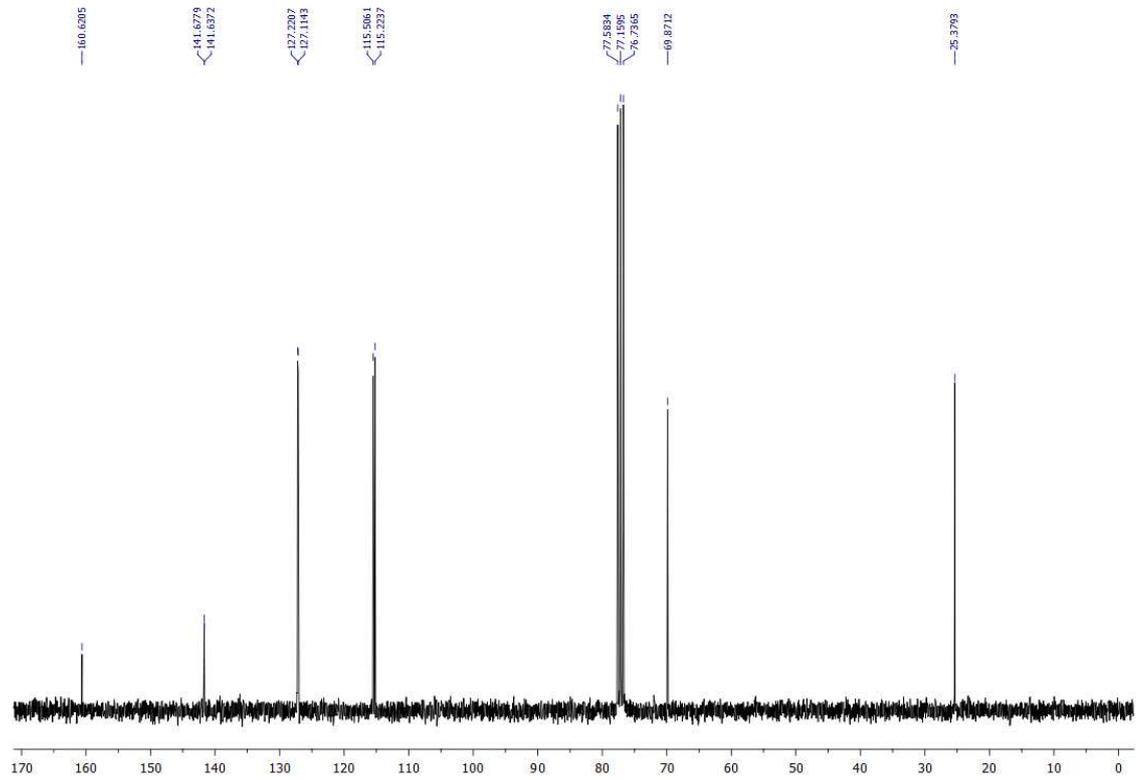
RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 1,46 (d, 3H_a, J= 6,4 Hz); δ : 4,87 (q, 1H_b, J= 6,4Hz); 6,97-7,07 (m, 2H_{dh}); 7,29-7,38 (m, 2H_{eg}).

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 25,38 (C_a); δ : 69,87(C_b); δ : 115,36(C_e,C_g); δ : 127,17(C_d, C_h); δ : 141,73(C_c); δ : 160,62(C_f).

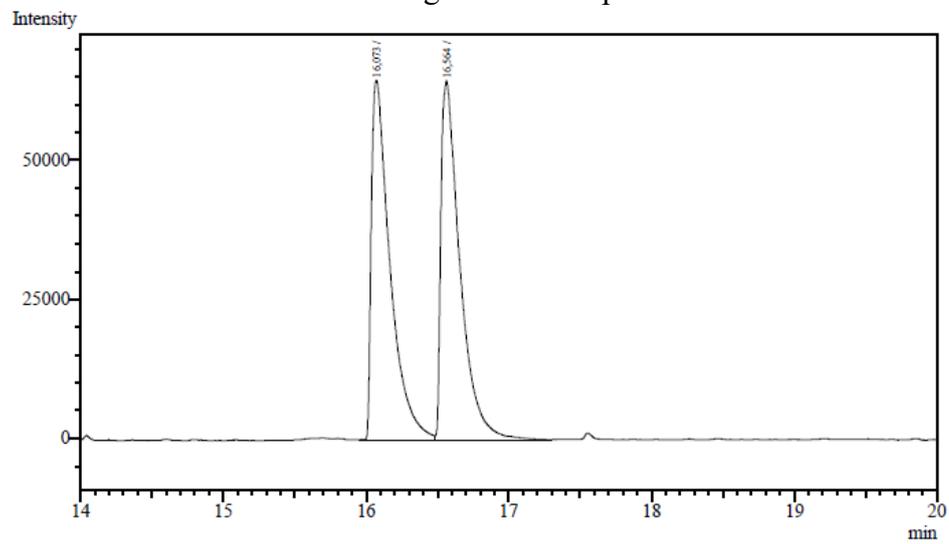


Espectro de RMN 1H (300 MHz, CDCl₃)

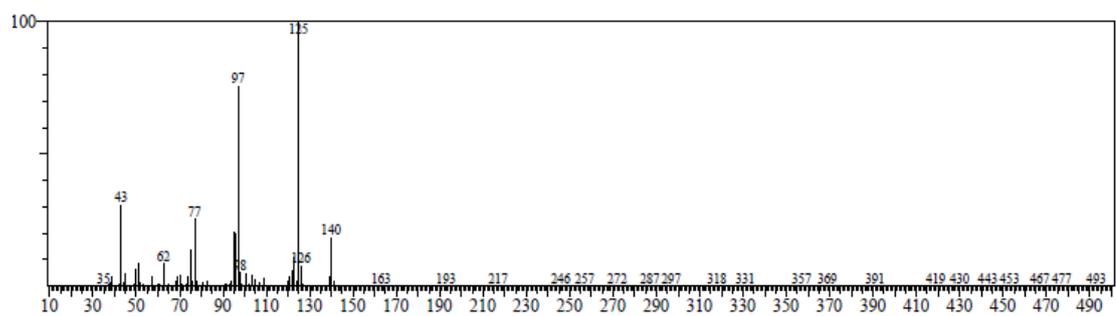


Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3)

Cromatograma obtido por CG-FID



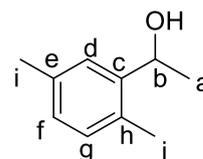
Espectro de massas obtido por CGMS



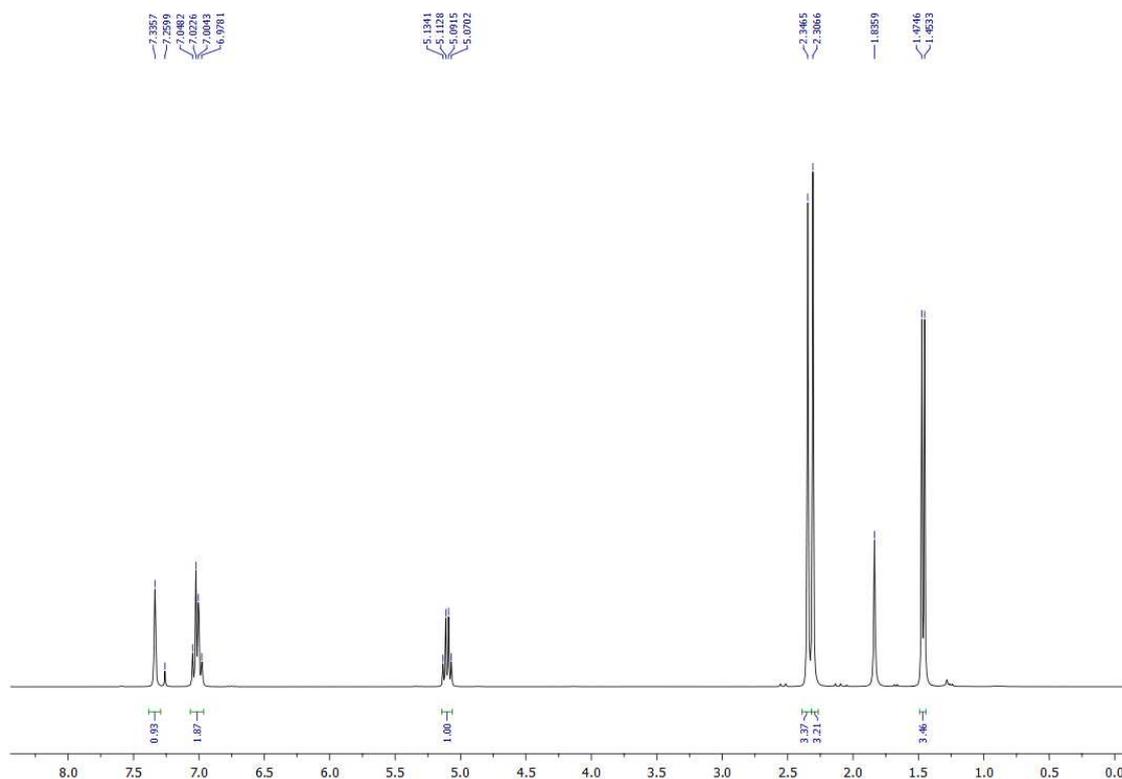
ANEXO K – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-2K-(2,5-DIMETILFENIL)ETANOL

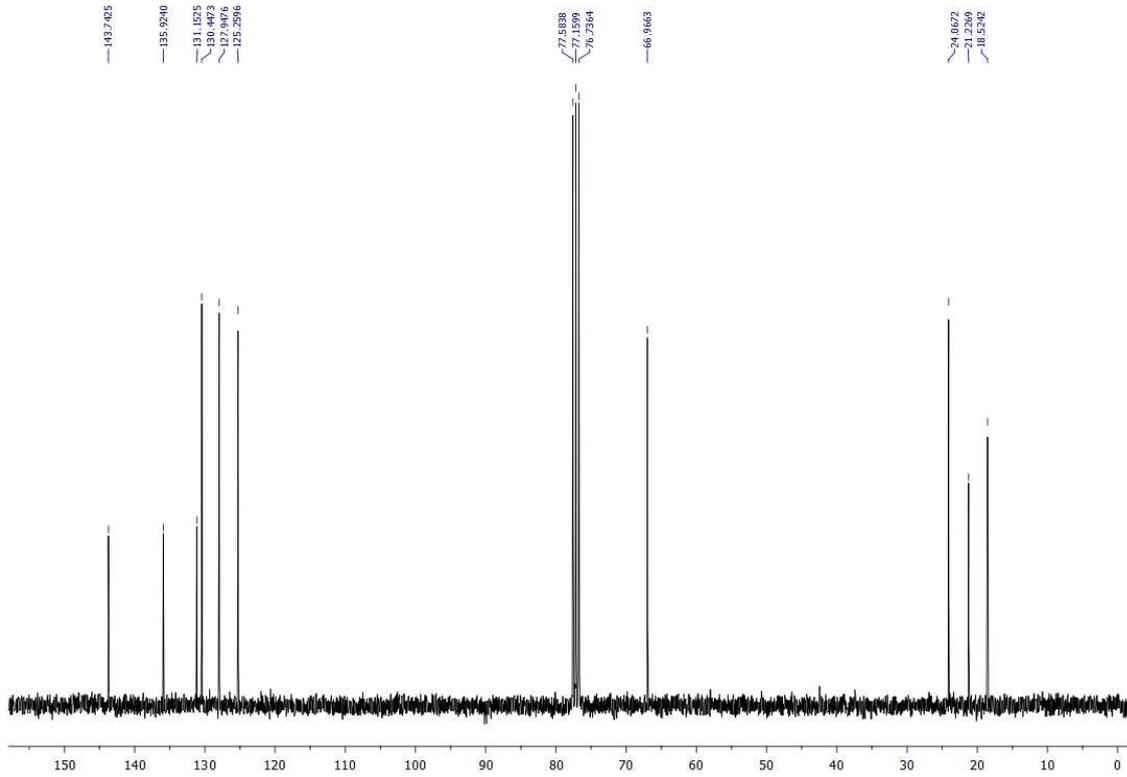
RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 1,46 (d, 3H_a, J= 6,4 Hz); δ: 2,31 (s, 3H_i); δ: 2,35 (s, 3H_j); δ: 5,10 (q, 1H_b, J= 6,4 Hz); δ: 6,98-7,05 (m, 2H_{f,g}); δ: 7,34 (s, 1H_d).

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ: 18,52 (C_j); δ:21,23 (C_i); δ: 24,07 (C_a); δ:66,97 (C_b); δ: 125,26 (C_f); δ: 127,95 (C_d); δ: 130,45 (C_g); δ:131,15 (C_h); δ:135,93 (C_e); δ: 143,74 (C_c).

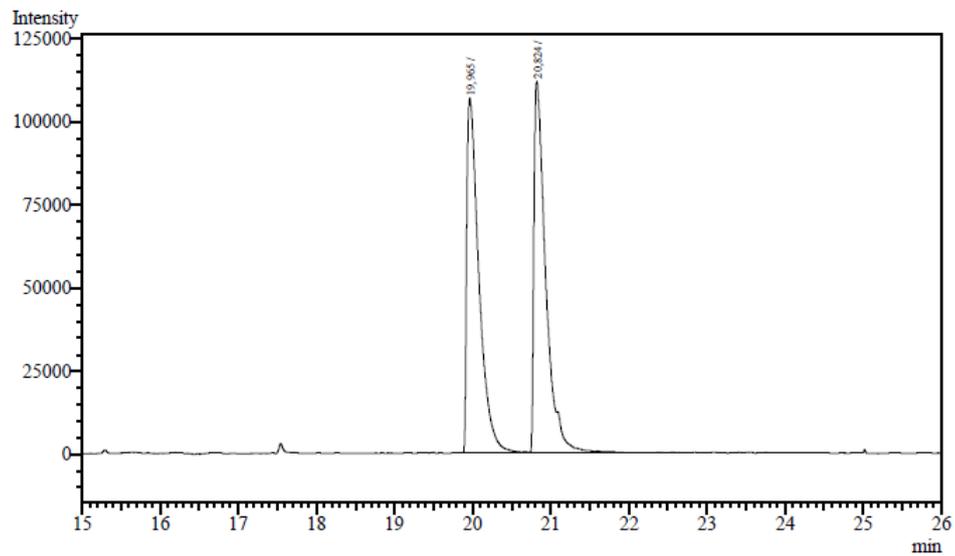


Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

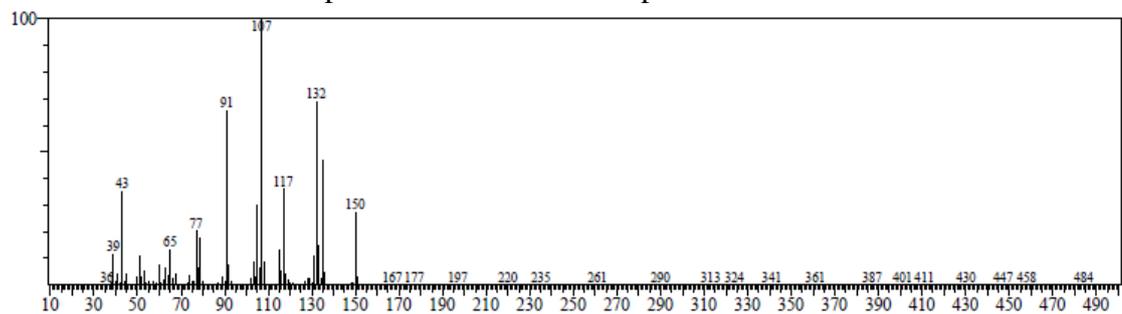


Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3)

Cromatograma obtido por CG-FID



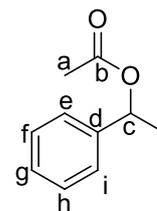
Espectro de massas obtido por CGMS



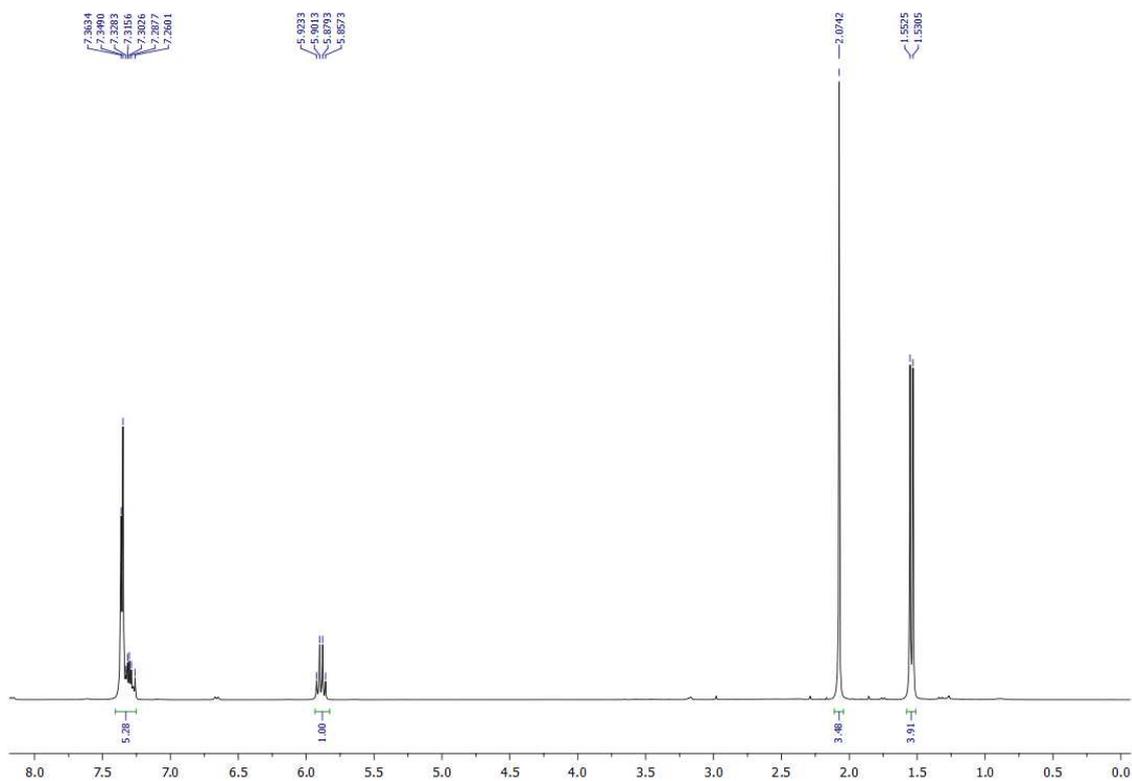
ANEXO L – DADOS EXPERIMENTAIS DO *RAC*-3A-ACETATO DE 1-FENILETILA

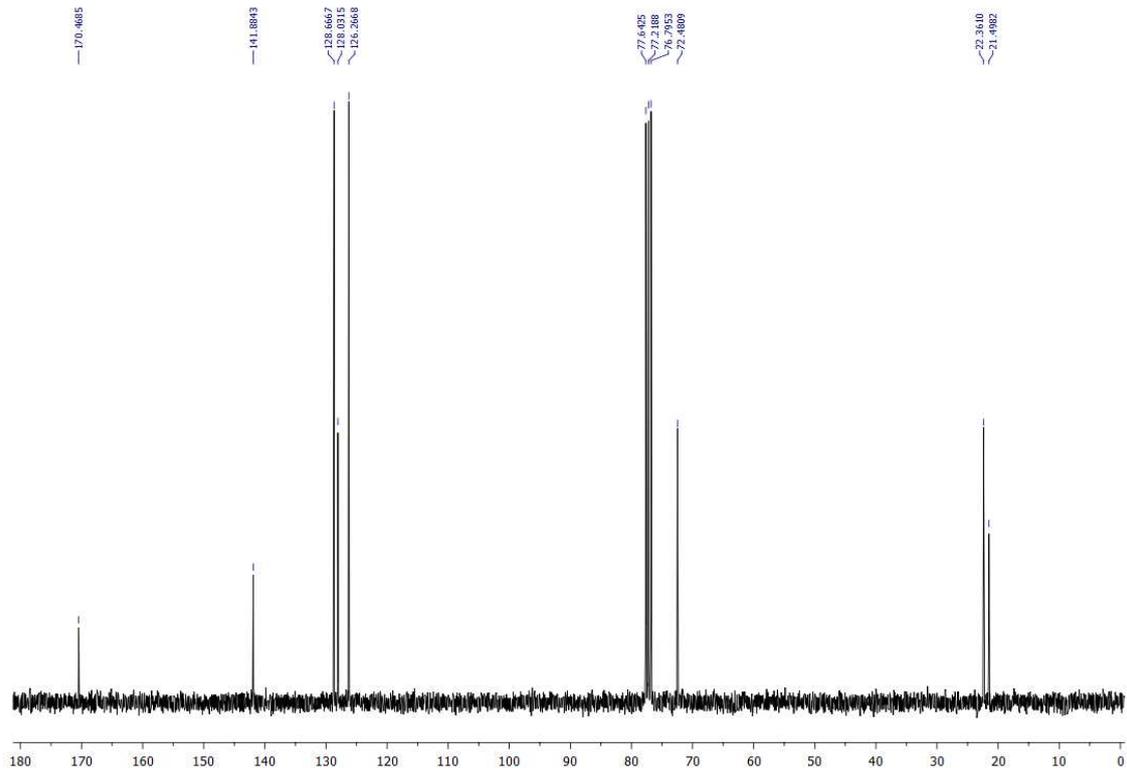
RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 1,54 (d, 3H_j, J= 6,6 Hz); δ: 2,07 (s, 3H_a); δ: 5,89 (q, 1H_c, J= 6,6 Hz); δ: 7,25-7,41 (m, 5H_{efghi}).

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ: 21,50 (C_a); δ: 22,36 (C_j); δ: 72,48 (C_c); δ: 126,27 (C_e, C_i); δ: 128,03 (C_g); δ: 128,67 (C_f, C_h); δ: 141,88 (C_d); δ: 170,47 (C_b).

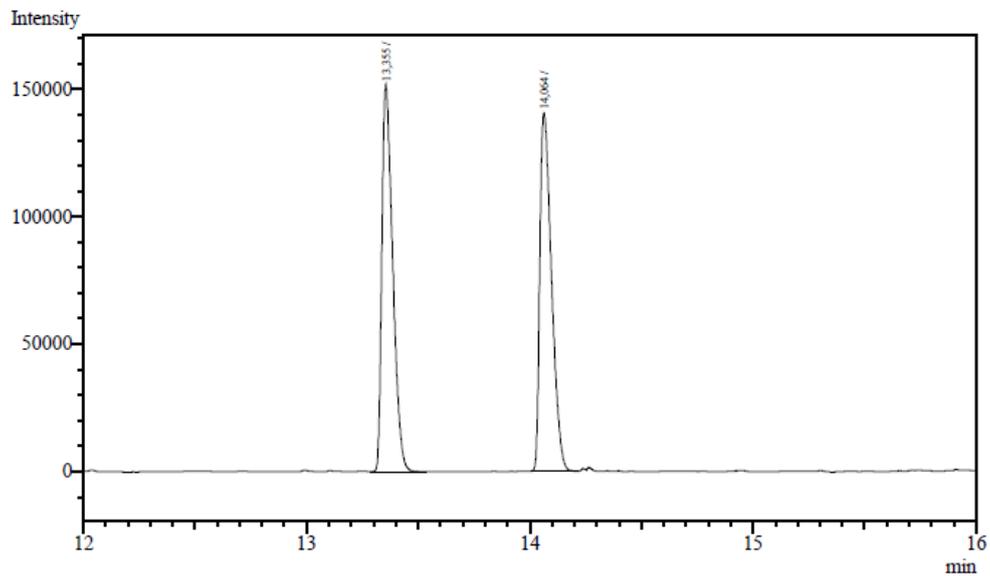


Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

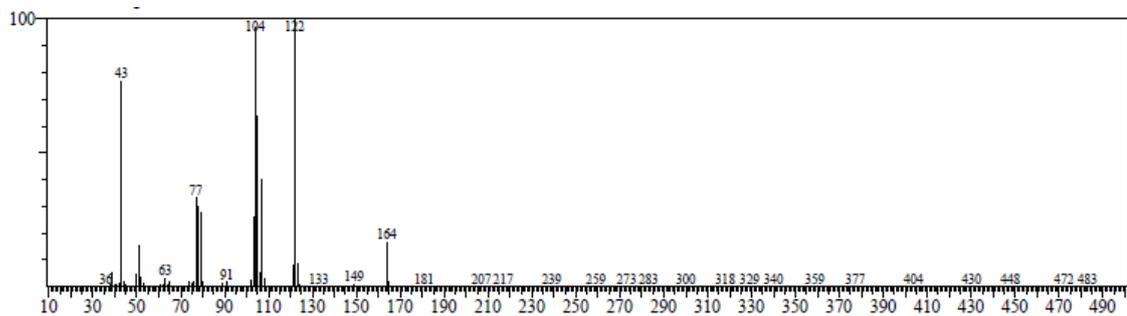


Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3)

Cromatograma obtido por CG-FID



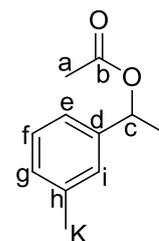
Espectro de massas obtido por CGMS



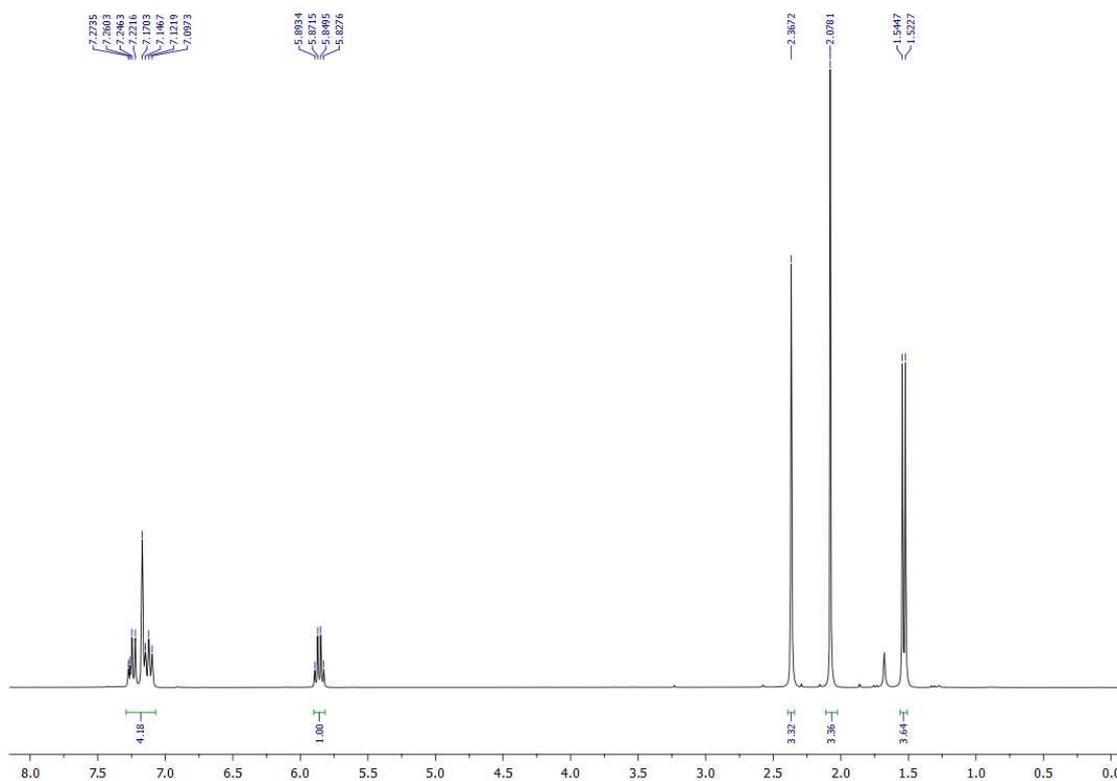
ANEXO M – DADOS EXPERIMENTAIS DO *RAC*-3B-ACETATO DE (3-METILFENIL)ETILA

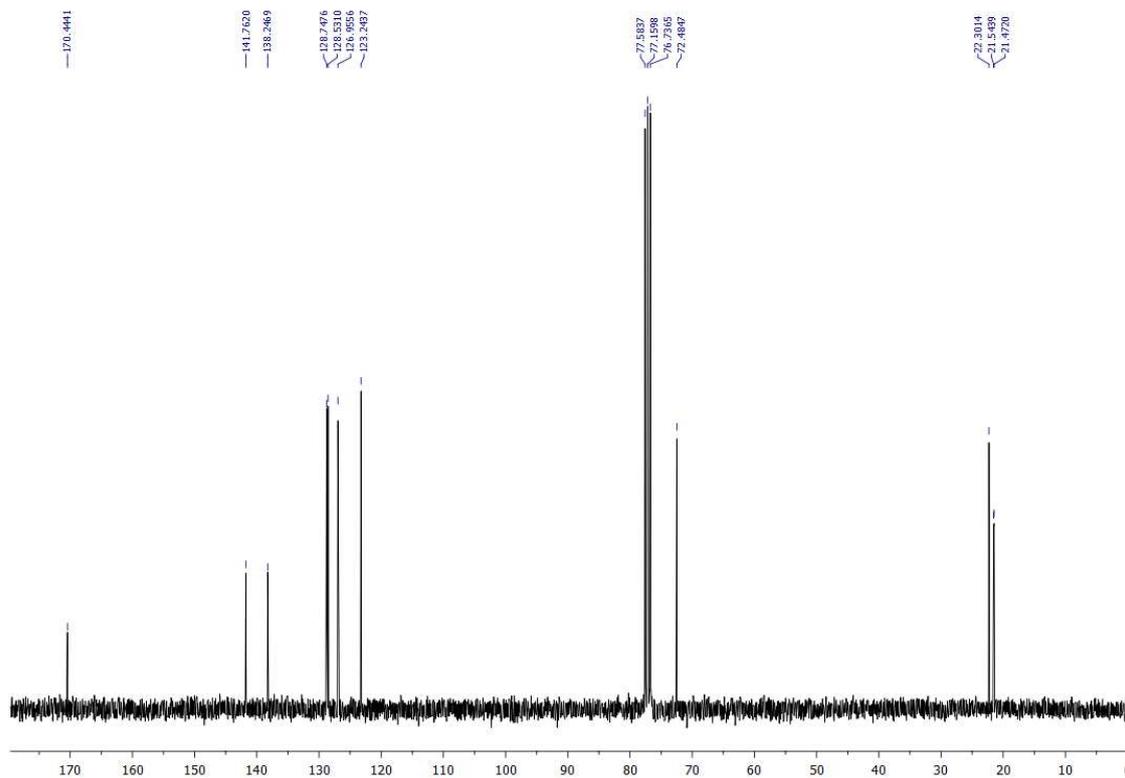
RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 1,53 (d, 3H_j, J= 6,6 Hz); δ: 2,08 (s, 3H_a); δ: 2,37 (s, 3H_k); δ: 5,86 (q, 1H_b, J= 6,6 Hz); δ: 7,07-7,30 (m, 4H_{efgi}).

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ: 21,47 (C_a); δ: 21,54 (C_k); δ: 22,30 (C_j); δ: 72,48 (C_c); δ: 123,24 (C_e); δ: 126,95 (C_g); δ: 128,53 (C_f); δ: 128,75 (C_i); δ: 138,25 (C_h); δ: 141,76 (C_d); δ: 170,44 (C_b).

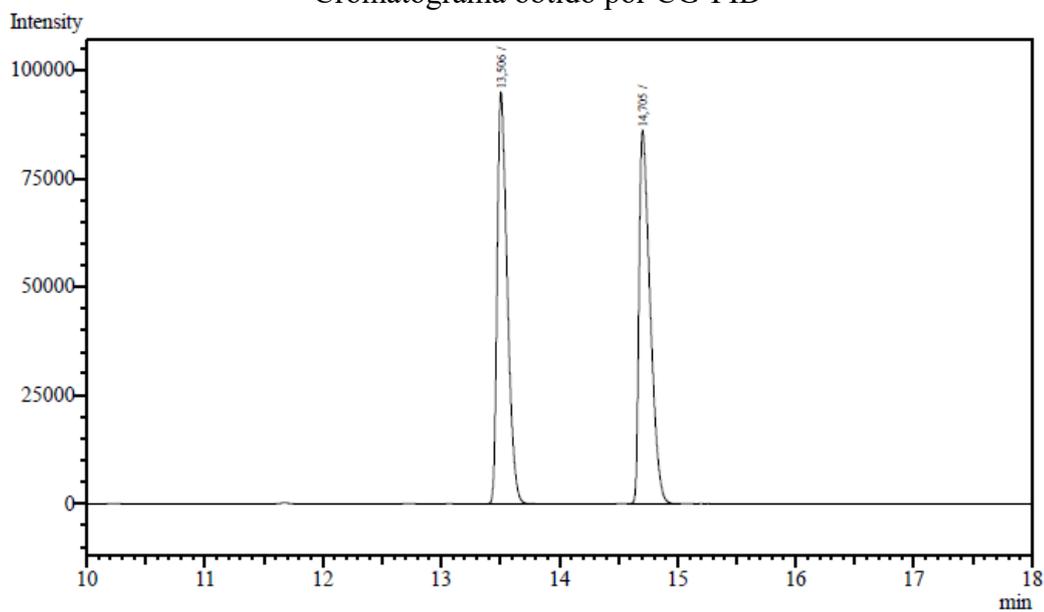


Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

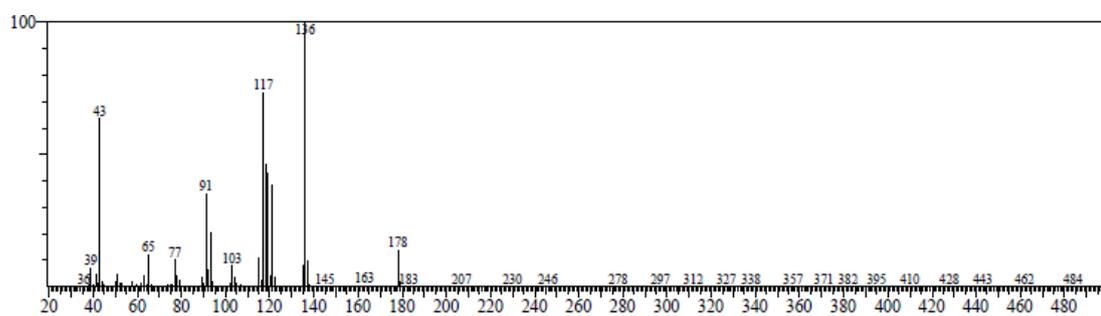


Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3)

Cromatograma obtido por CG-FID



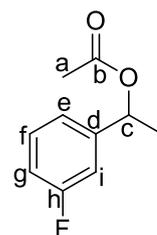
Espectro de massas obtido por CGMS



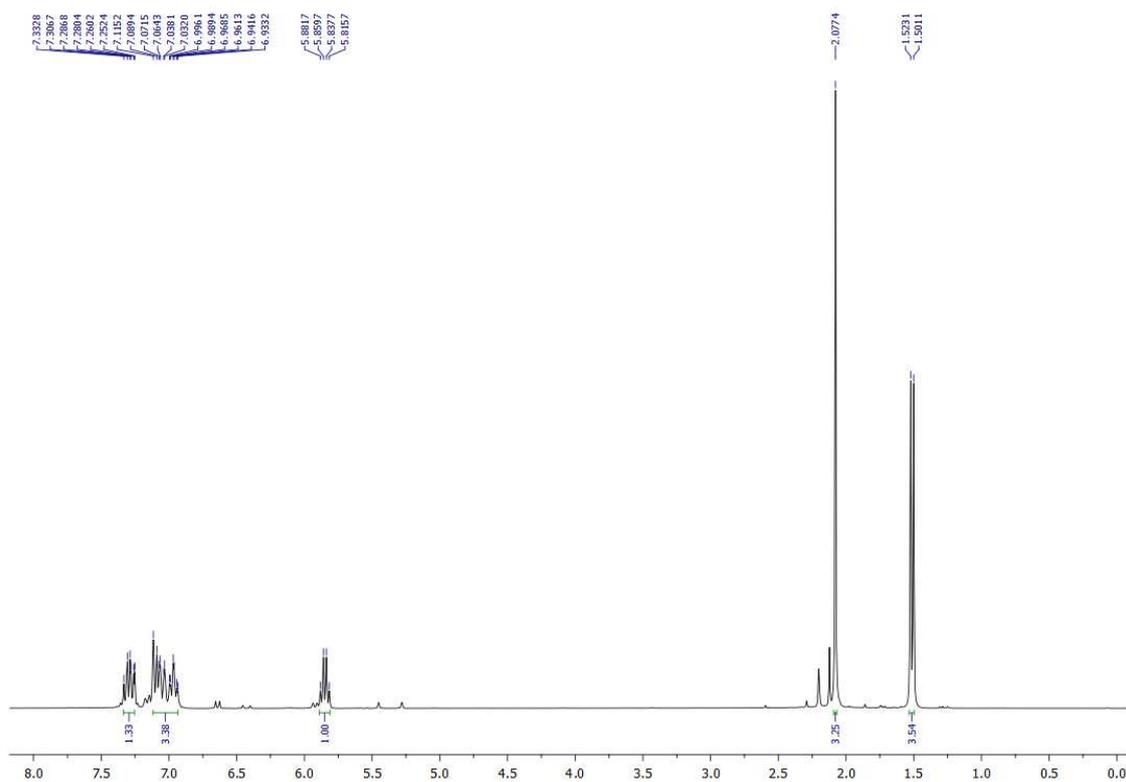
ANEXO N – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-3C-ACETATO DE (3-FLUOROFENIL)ETILA

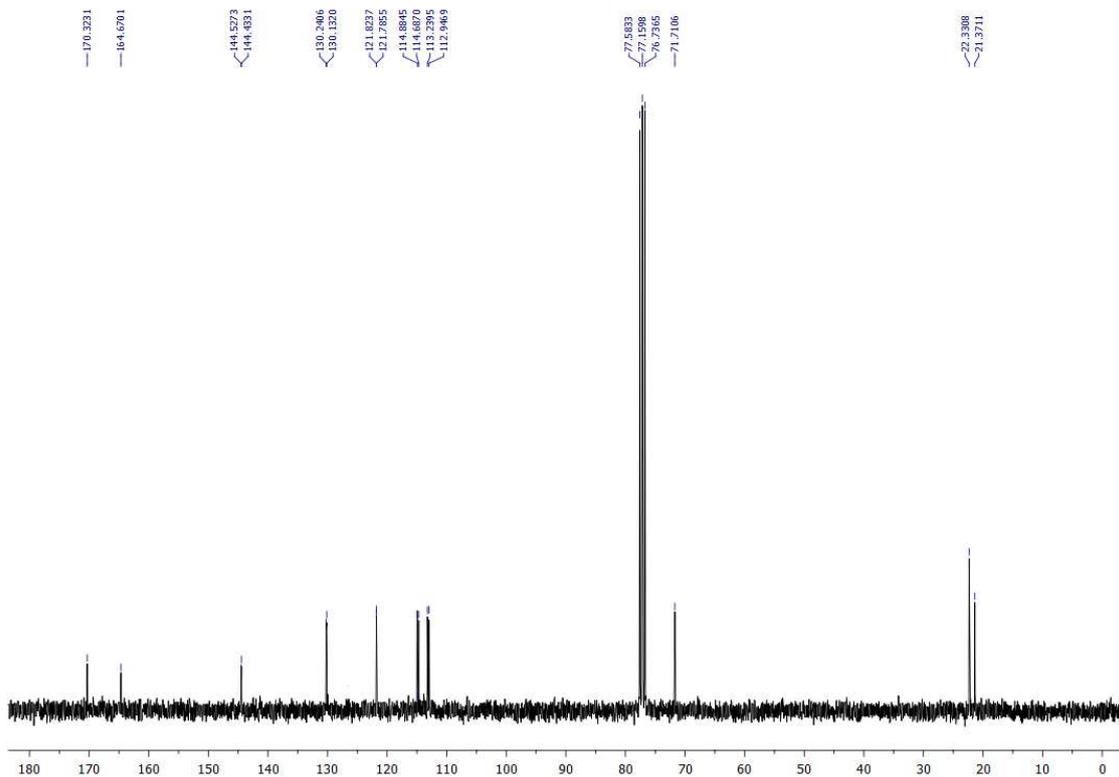
RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 1,51 (d, 3H_j, J= 6,6 Hz); δ: 2,08 (s, 3H_a); δ: 5,85 (q, 1H_c, J= 6,6 Hz); δ: 6,93-7,13 (m, 3H_{efg}); δ: 7,24-7,34 (m, 1H_i).

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ: 21,37 (C_a); δ: 22,33 (C_j); δ: 71,71 (C_c); δ: 113,09 (C_i); δ: 114,78 (C_g); δ: 121,80 (C_e); δ: 130,19 (C_f); δ: 144,48 (C_d); δ: 164,67 (C_h); δ: 170,32 (C_b).

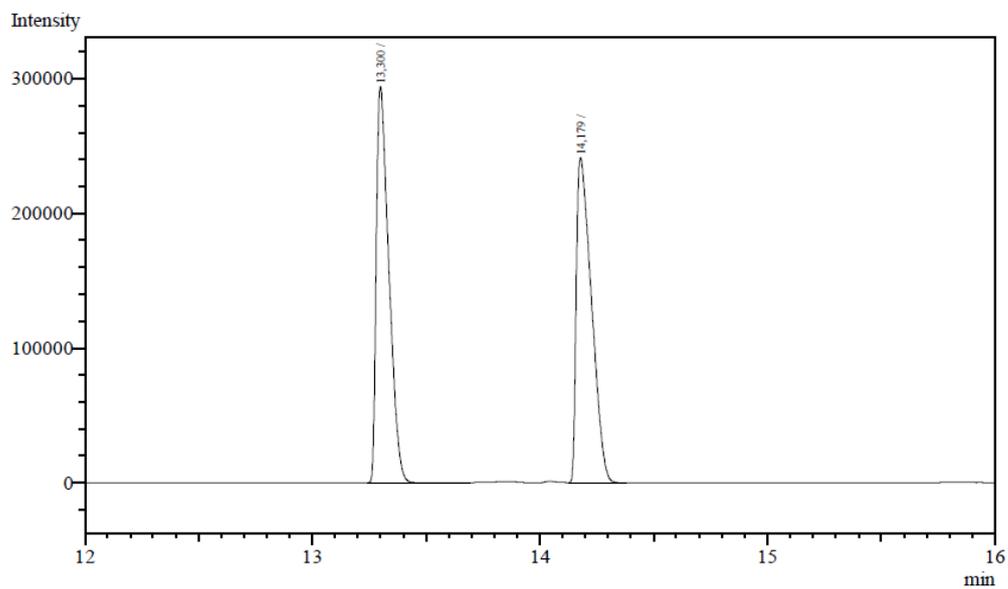


Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

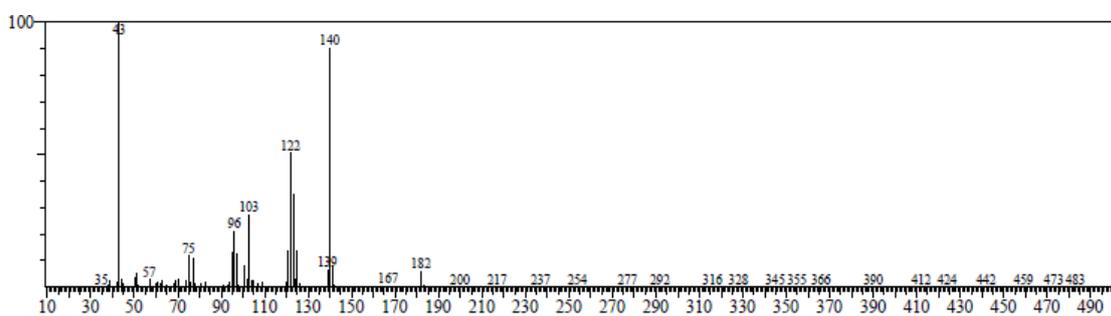


Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3)

Cromatograma obtido por CG-FID



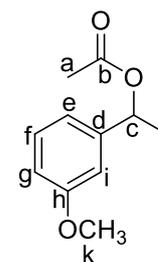
Espectro de massas obtido por CGMS



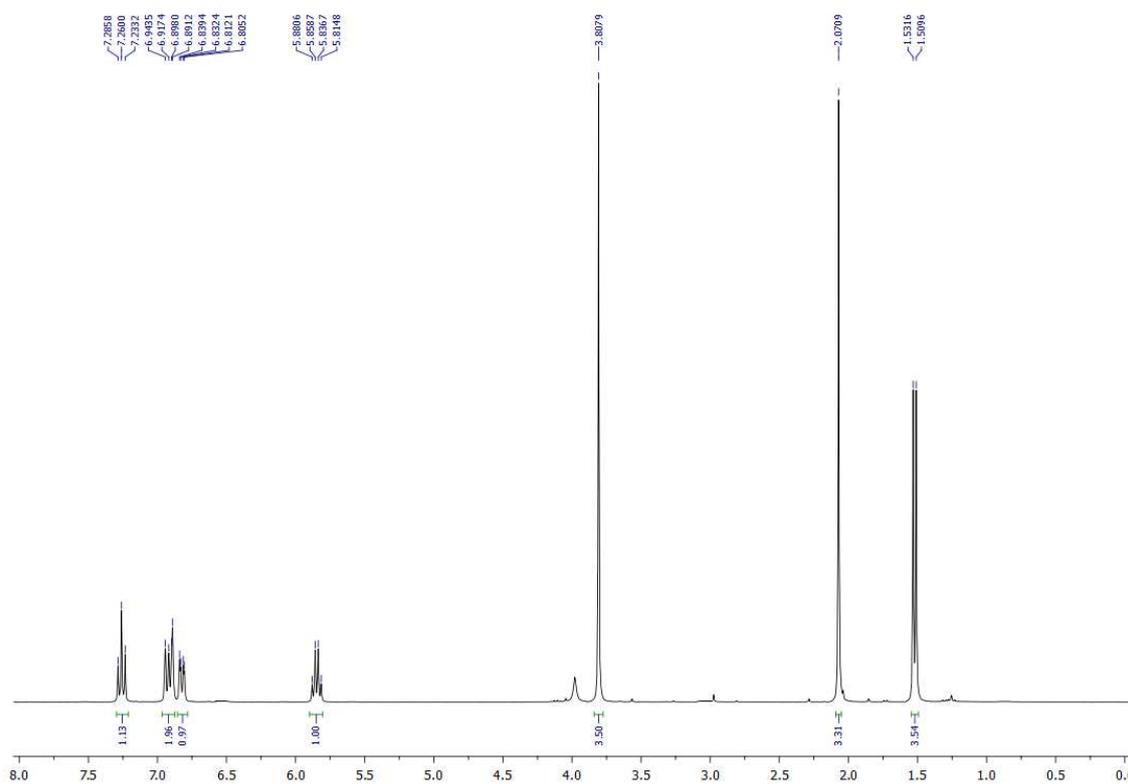
ANEXO O – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-3D-ACETATO DE (3-METÓXIFENIL)ETILA

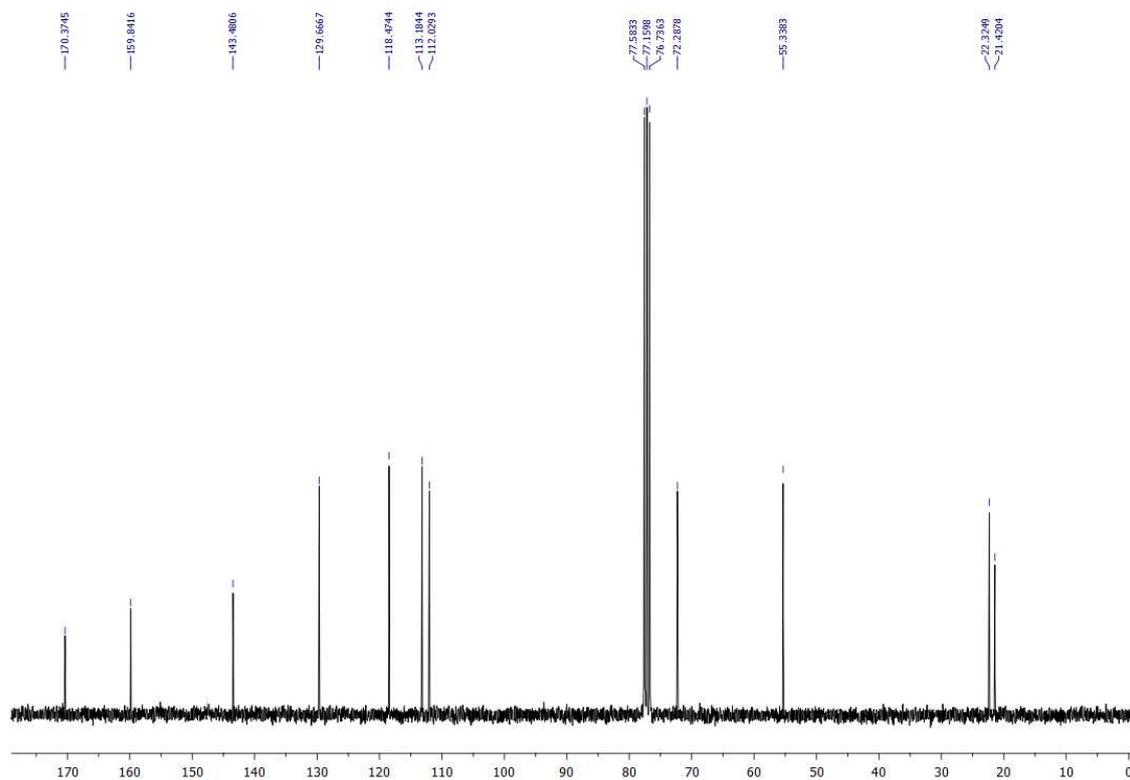
RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 1,52 (d, 3H_j, J= 6,6 Hz); δ: 2,07 (s, 3H_a); δ: 3,81 (s, 3H_j); δ: 5,85 (q, 1H_c, J= 6,6 Hz); δ: 6,82 (m, 1H_i); δ: 6,91 (m, 2H_{eg}); δ: 7,26 (t, 1H_f, J= 7,9 Hz) .

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ: 21,42 (C_a); δ: 22,32 (C_j); δ: 55,38 (C_k); δ: 72,28 (C_c); δ: 112,09 (C_i); δ: 113,18 (C_g); δ: 118,47 (C_e); δ: 129,67 (C_f); δ: 143,48 (C_d); δ: 159,84 (C_h); δ: 170,37 (C_b).

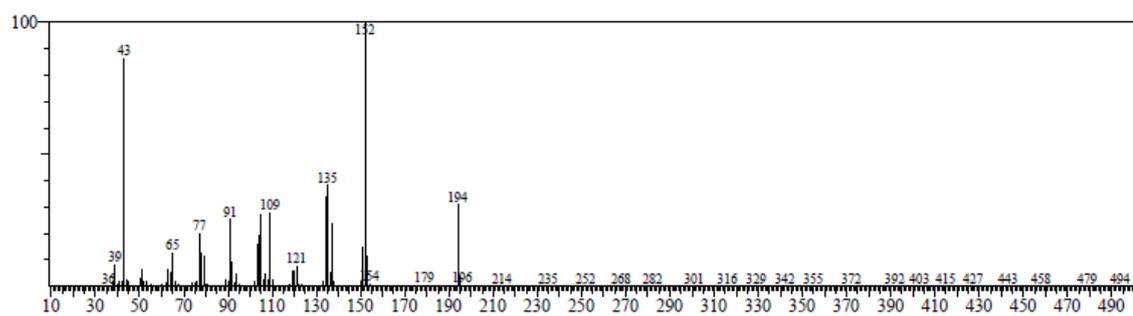
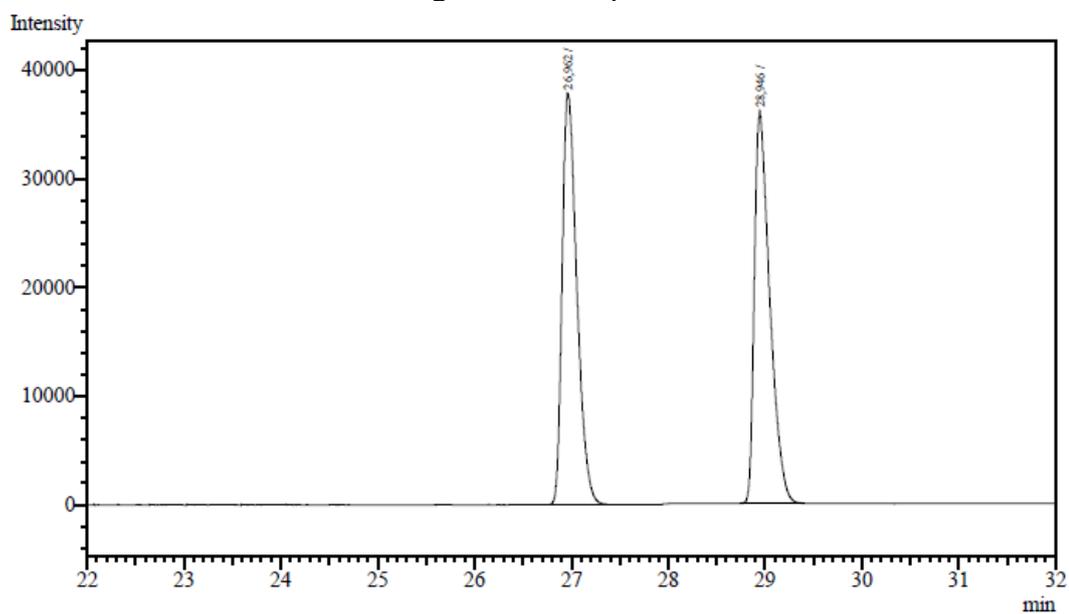


Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)



Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3)

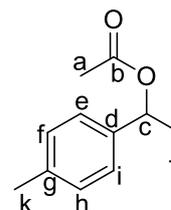
Cromatograma obtenido por CG-FID



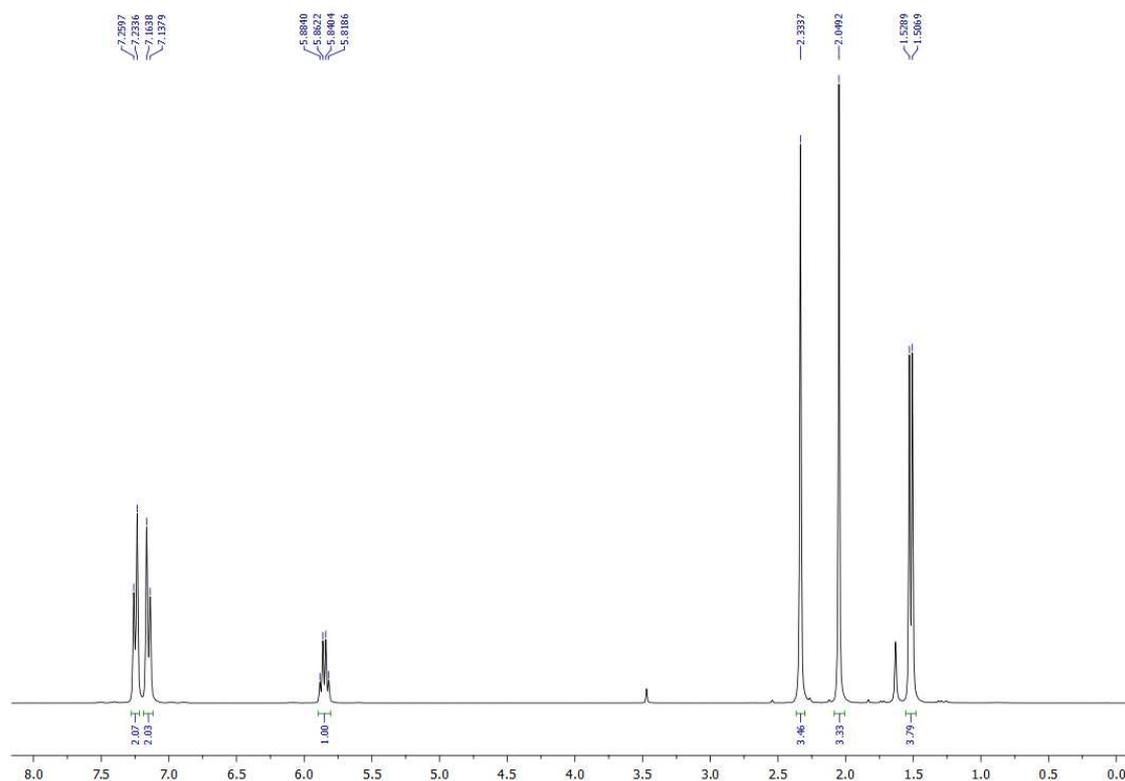
ANEXO P – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-3E-ACETATO DE (4-METILFENIL)ETILA

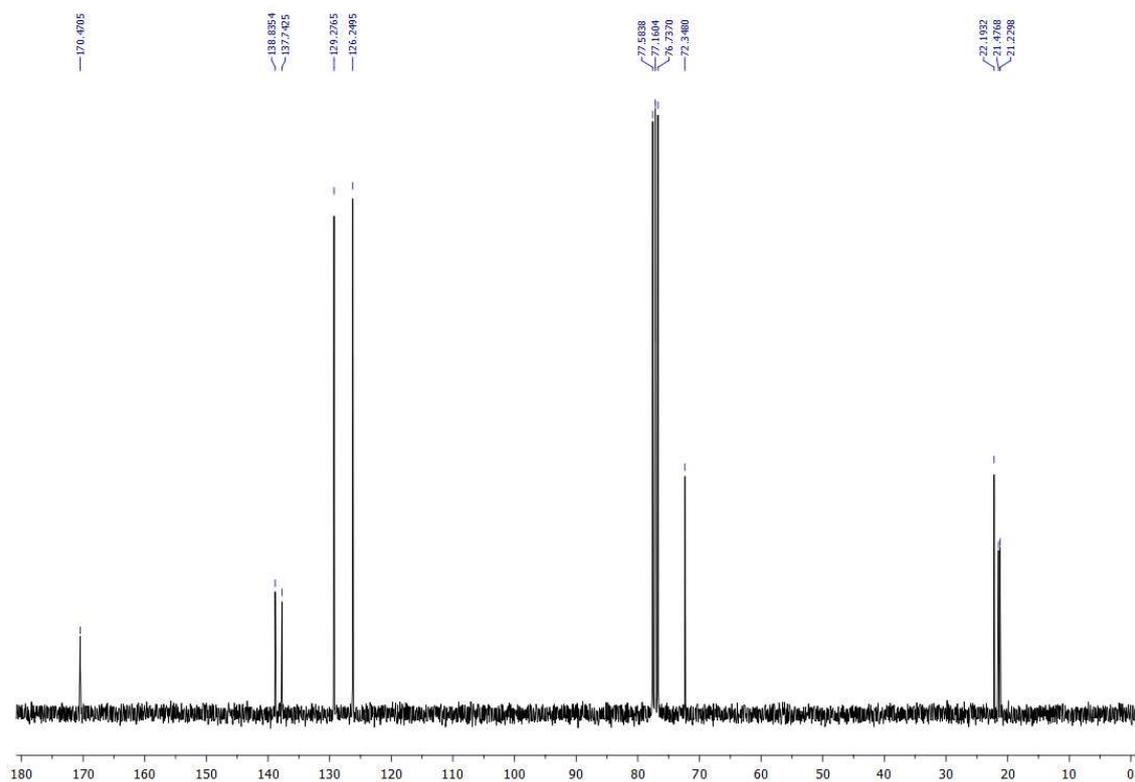
RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 1,52 (d, 3H_j, J= 6,6 Hz); δ: 2,05 (s, 3H_a); δ: 2,33 (s, 3H_k); δ: 5,85 (q, 1H_c, J= 6,5 Hz); δ: 7,15 (d, 2H_{fh}, J= 7,8 Hz); δ: 7,25 (d, 2H_{ei}, J= 7,8 Hz).

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ: 21,23 (C_a); δ: 21,45 (C_k); δ: 22,19 (C_j); δ: 72,35 (C_c); δ: 126,25 (C_e,C_i); δ: 129,28 (C_f, C_h); δ: 137,74 (C_g); δ: 138,83 (C_d); δ: 170,47 (C_b).

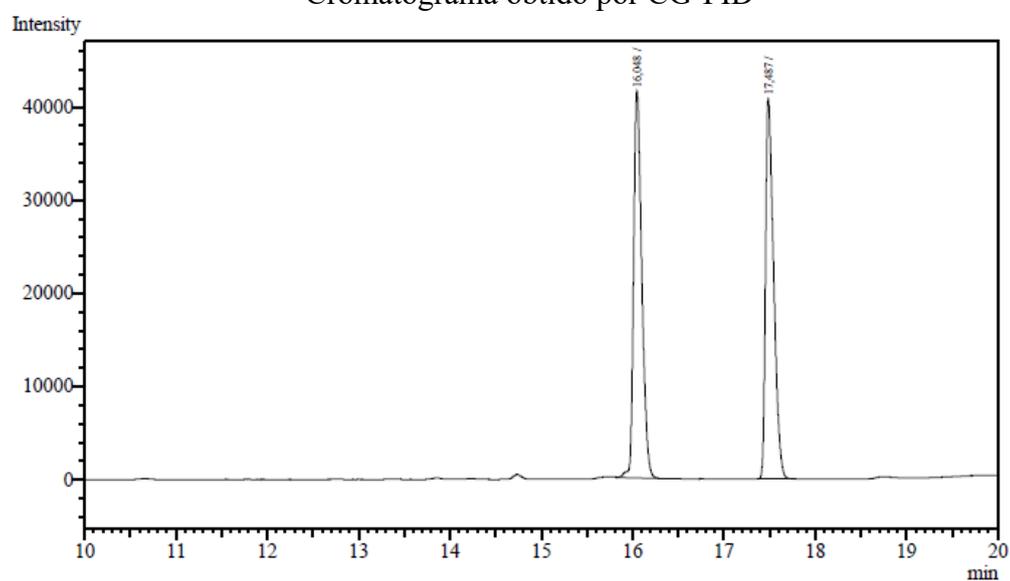


Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

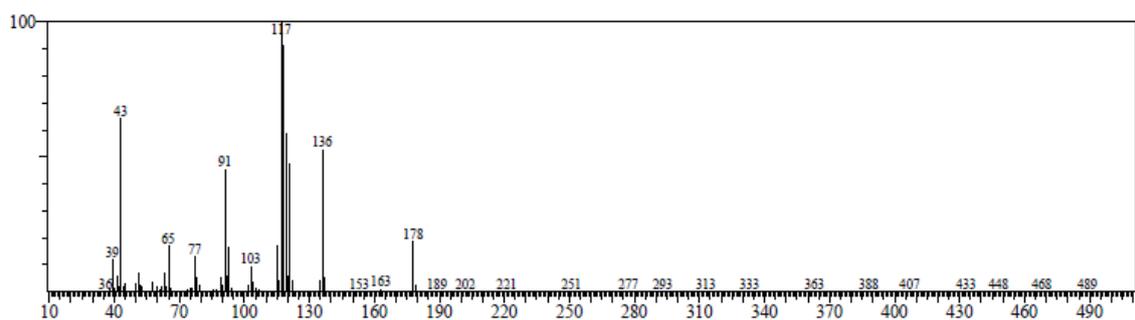


Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3)

Cromatograma obtido por CG-FID



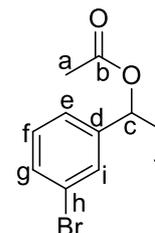
Espectro de massas obtido por CGMS



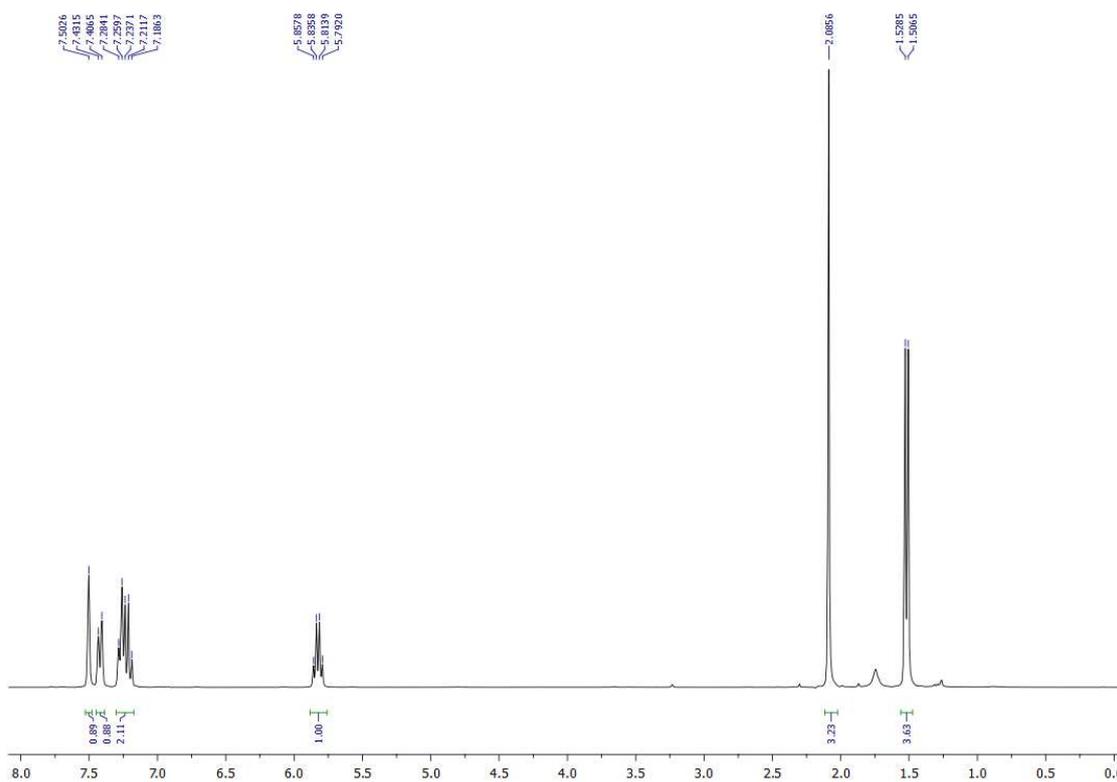
ANEXO Q – DADOS EXPERIMENTAIS DO *RAC*-3F-ACETATO DE (3-BROMOFENIL)ETILA

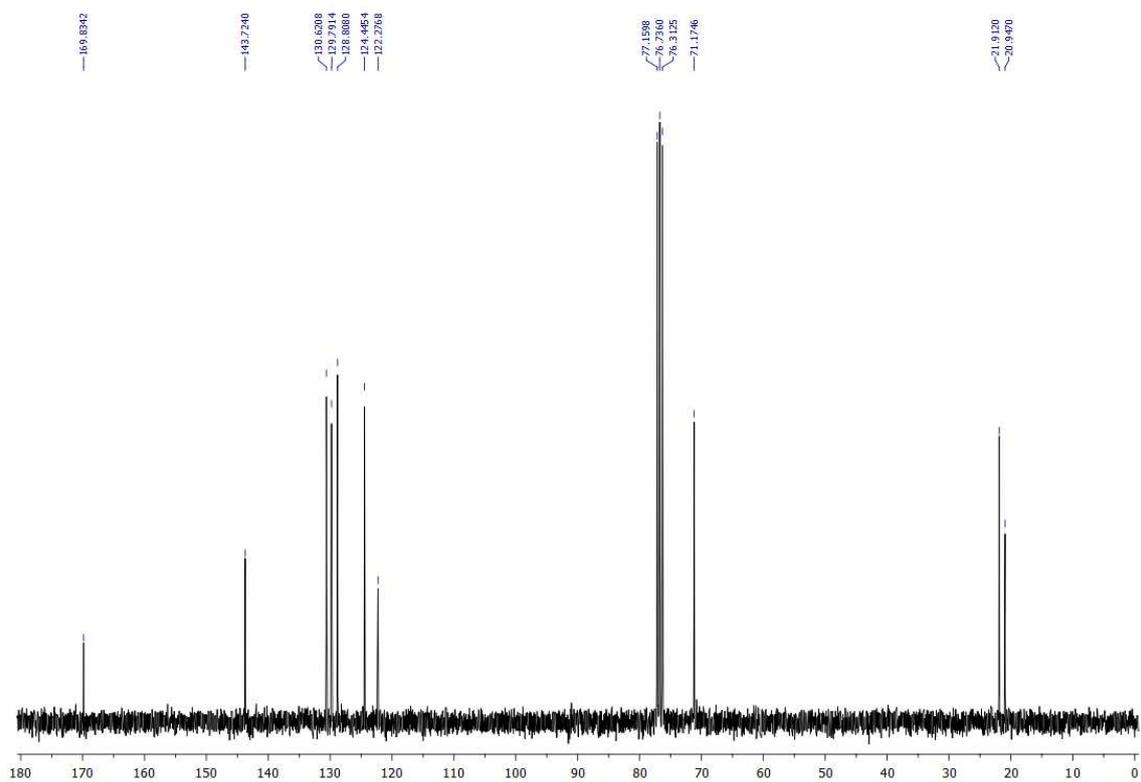
RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 1,52 (d, 3H_j, J= 6,6 Hz); δ: 2,09 (s, 3H_a); δ: 5,82 (q, 1H_c, J= 6,6 Hz); δ: 7,19-7,28 (m, 2H_{e,f}); δ: 7,42 (d, 1H_g, J= 7,5 Hz); δ: 7,50 (s, 1H_i).

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ: 20,95 (C_a); δ: 21,91 (C_j); δ: 71,17 (C_c); δ: 122,28 (C_h); δ: 124,44 (C_e); δ: 128,81 (C_f); δ: 129,79 (C_g); δ: 130,62 (C_i); δ: 143,72 (C_d); δ: 169,83 (C_b).

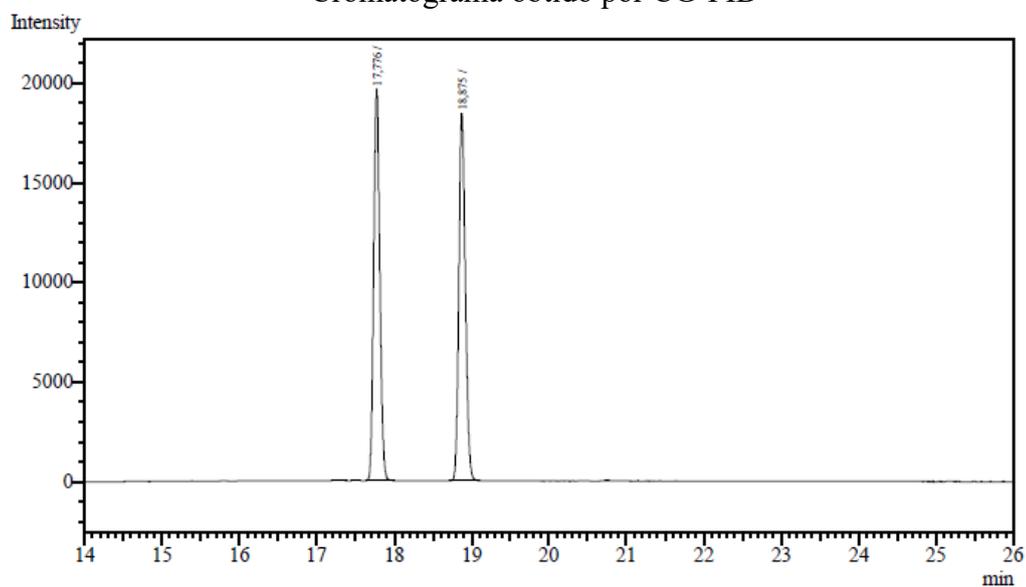


Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

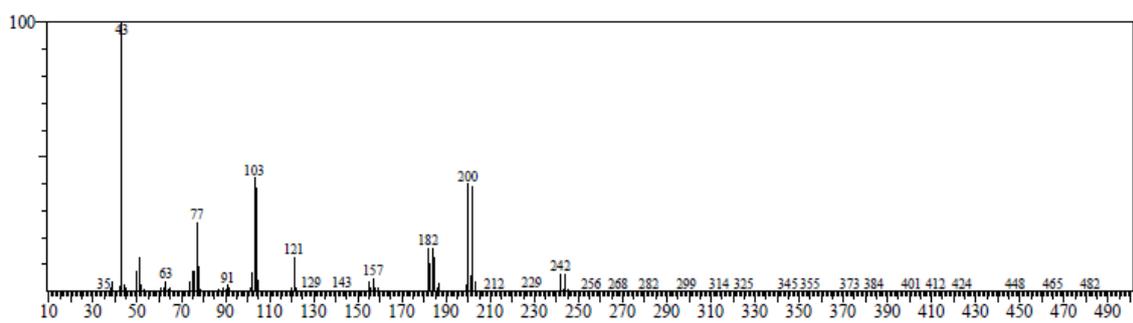


Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3)

Cromatograma obtido por CG-FID



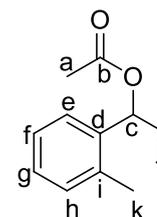
Espectro de massas obtido por CGMS



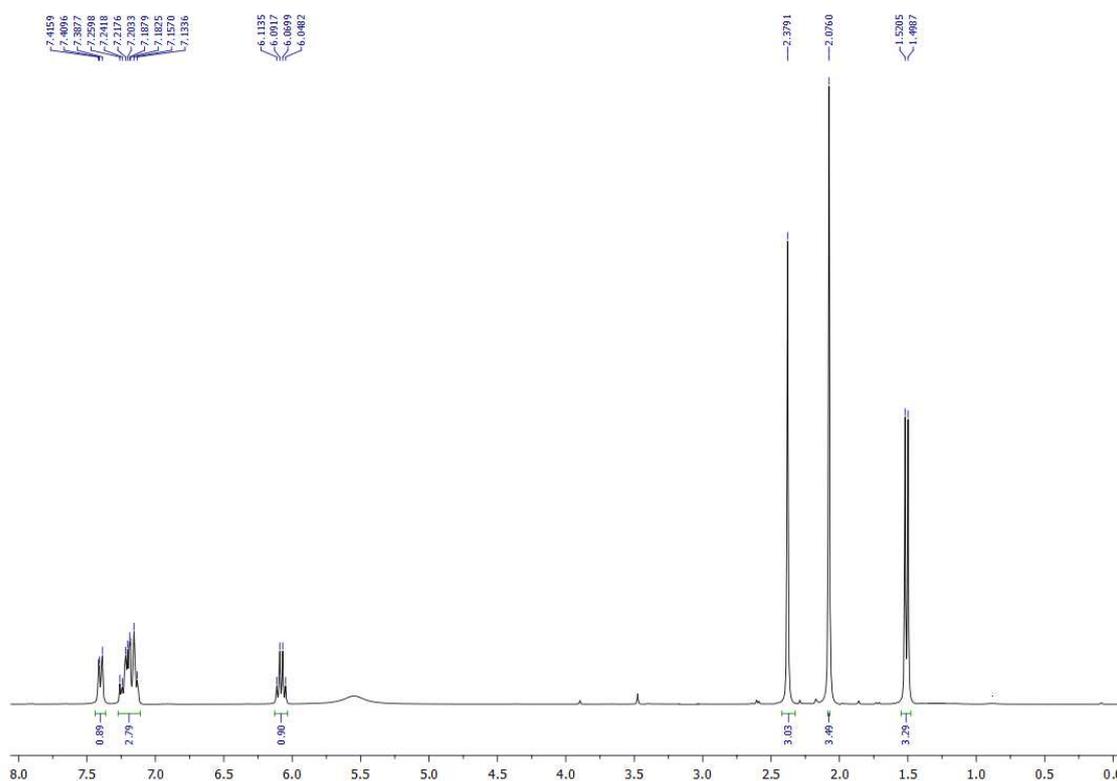
ANEXO R – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-3G-ACETATO DE (2-METILFENIL)ETILA

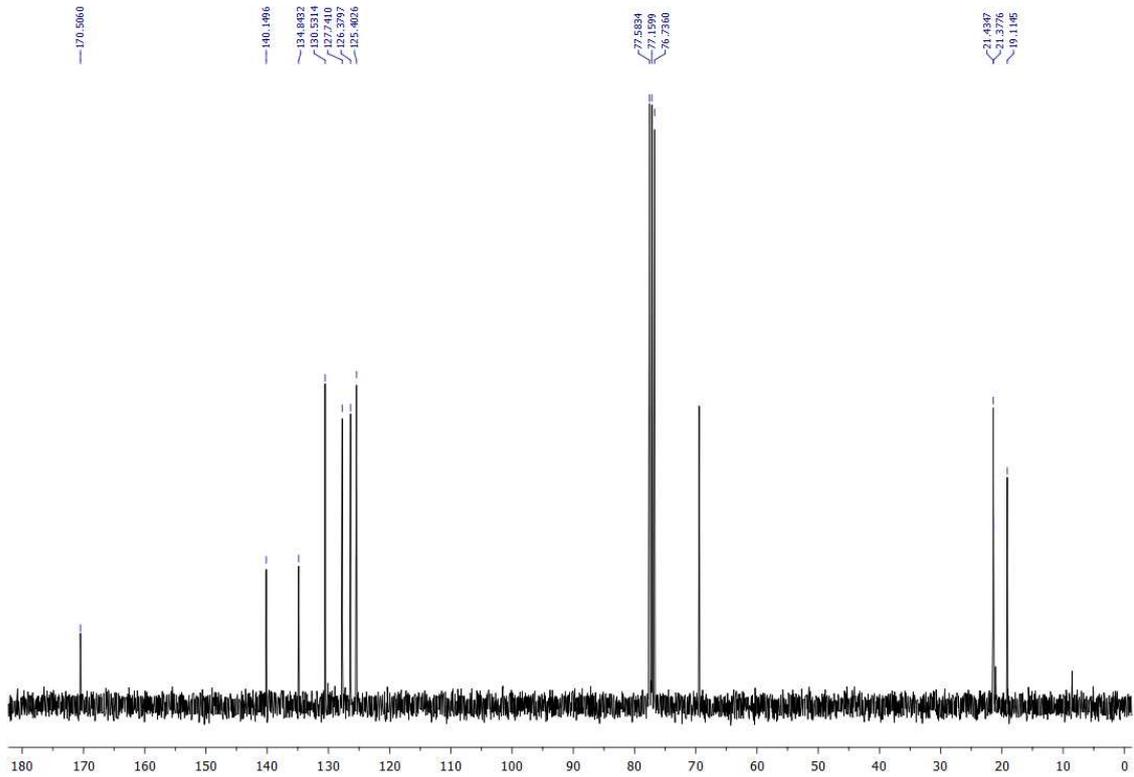
RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 1,51 (d, 3H_j, J= 6,5 Hz); δ : 2,08 (s, 3H_a); δ : 2,38 (s, 3H_k); δ : 6,08 (q, 1H_c, J= 6,5 Hz); δ : 7,11-7,27 (m, 3H_{fgh}); δ : 7,36-7,47 (m, 1H_e).

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 19,17 (C_k); δ : 21,44 (C_j); δ : 21,49 (C_a); δ : 69,48 (C_c); δ : 125,46 (C_e); δ : 126,44 (C_f); δ : 127,80 (C_h); δ : 130,59 (C_g); δ : 134,90 (C_i); δ : 140,21 (C_d); δ : 170,56 (C_b).

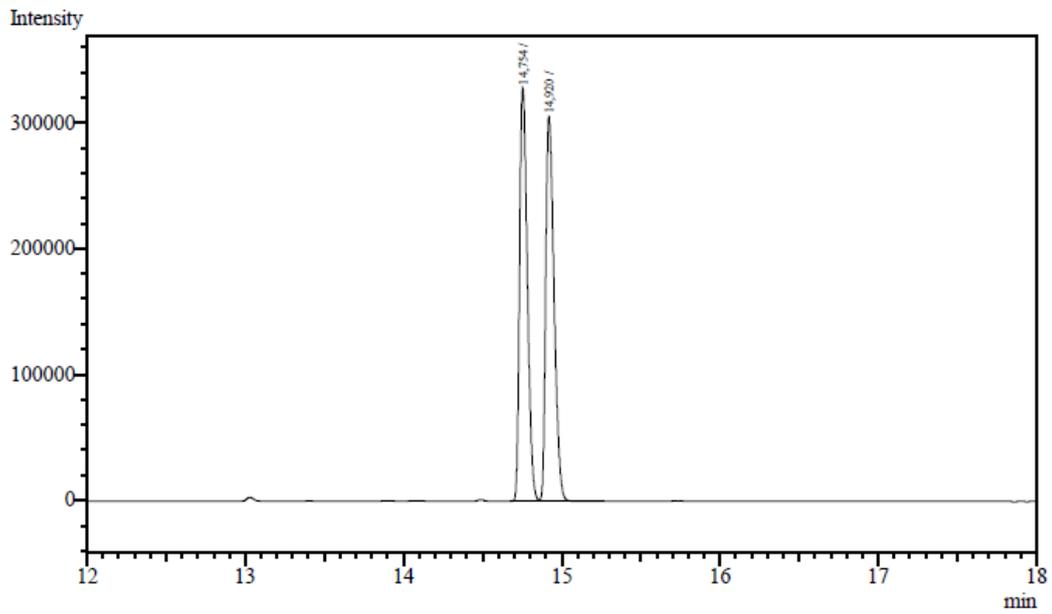


Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

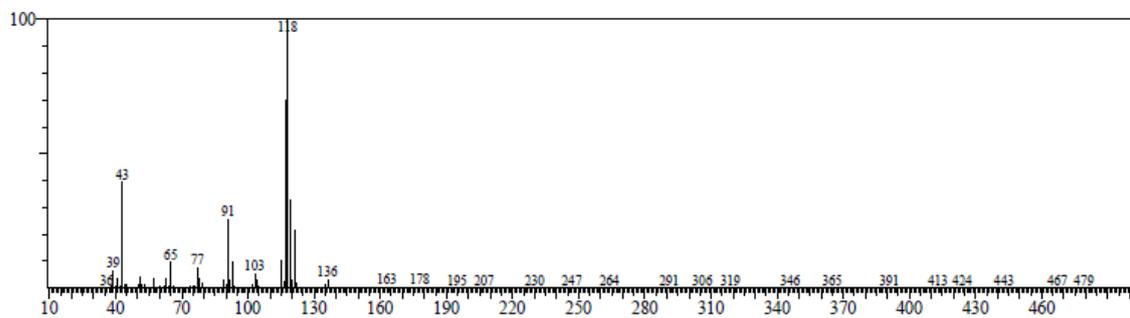


Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3)

Cromatograma obtido por CG-FID



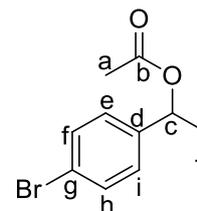
Espectro de massas obtido por CGMS



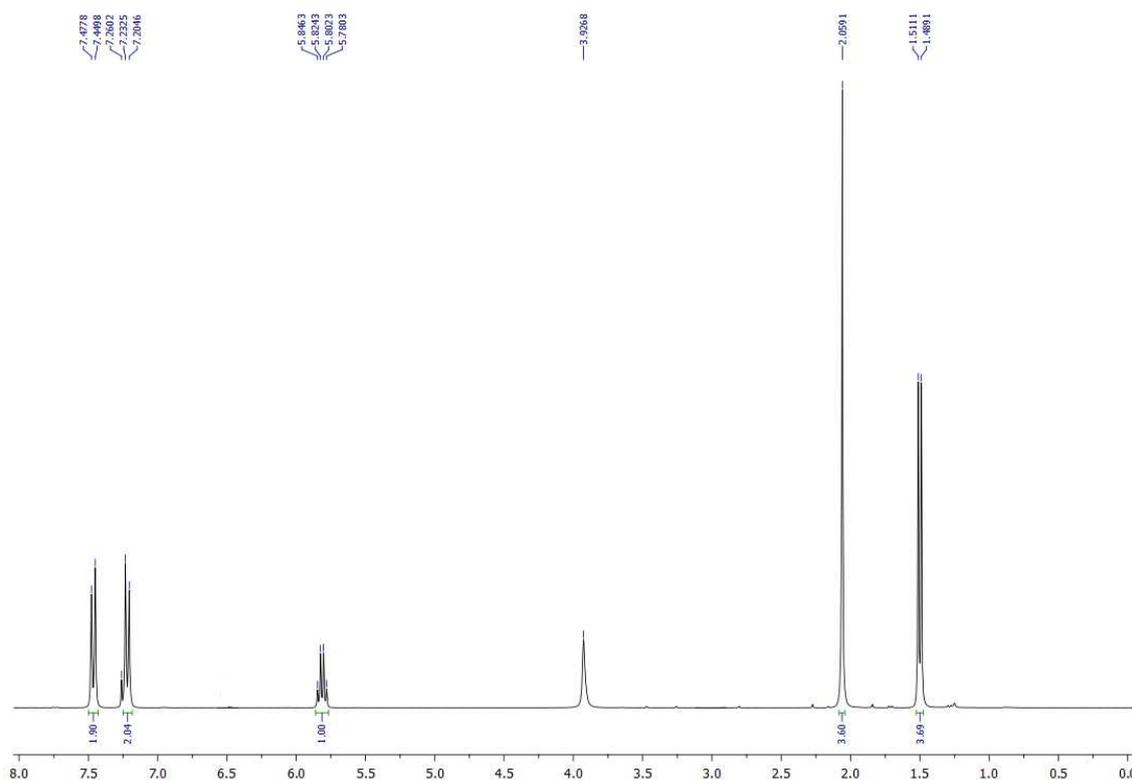
ANEXO S – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-3H-ACETATO DE (4-BROMOFENIL)ETILA

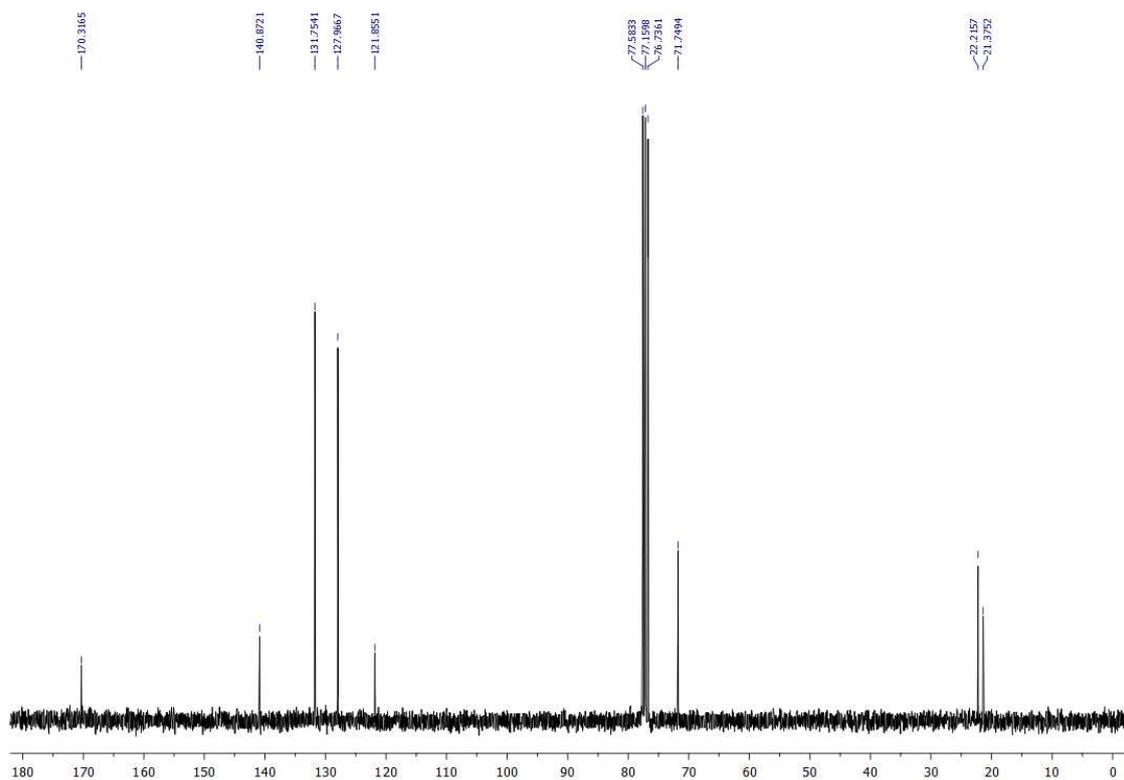
RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 1,50 (d, 3H_j, J= 6,6 Hz); δ : 2,06 (s, 3H_a); δ : 5,81 (q, 1H_c, J= 9 Hz); δ : 7,22 (d, 2H_{ei}, J= 8,4 Hz); δ : 7,46 (d, 2H_{fh}, J= 8,4 Hz).

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 21,37 (C_a); δ : 22,21 (C_j); δ : 71,75 (C_c); δ : 121,85 (C_g); δ : 127,97 (C_e,C_i); δ : 131,75 (C_f,C_h); δ : 140,87 (C_d); δ : 170,32 (C_b).

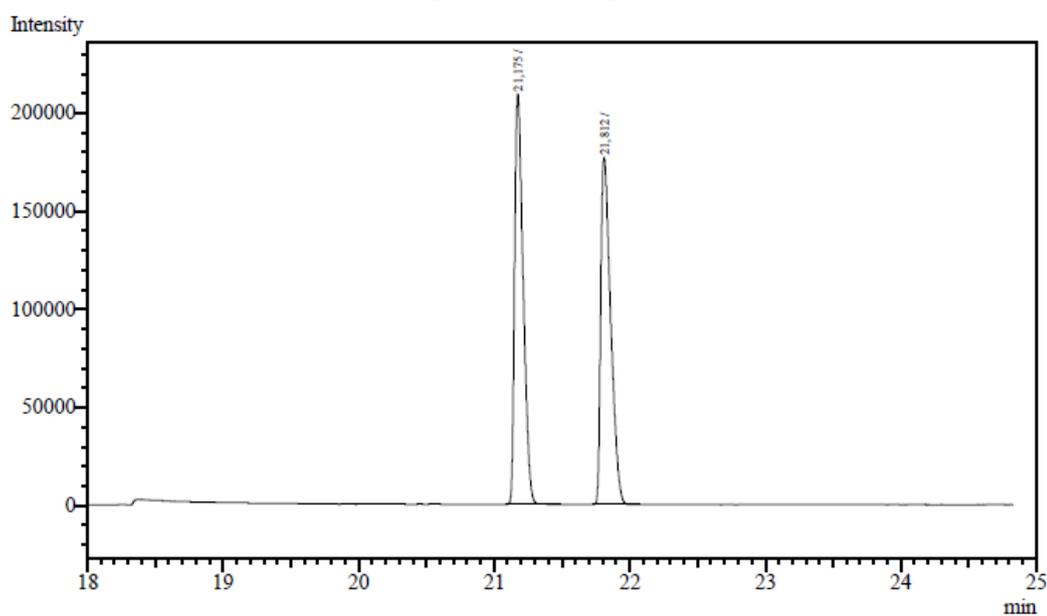


Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

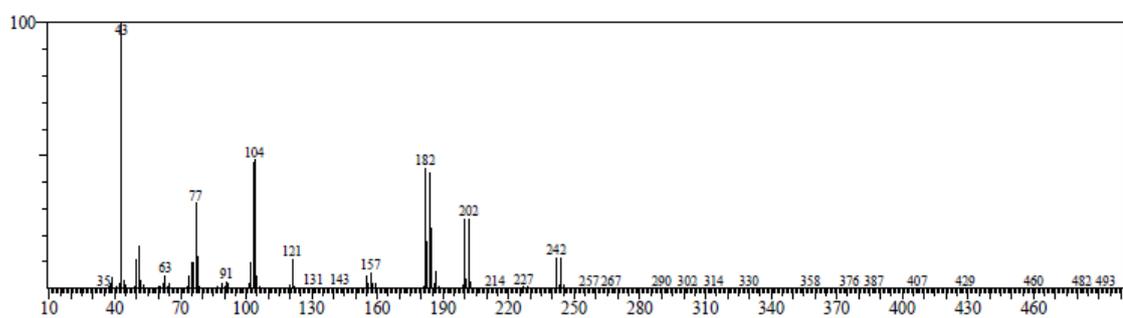


Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3)

Cromatograma obtido por CG-FID



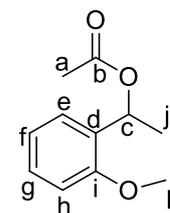
Espectro de massas obtido por CGMS



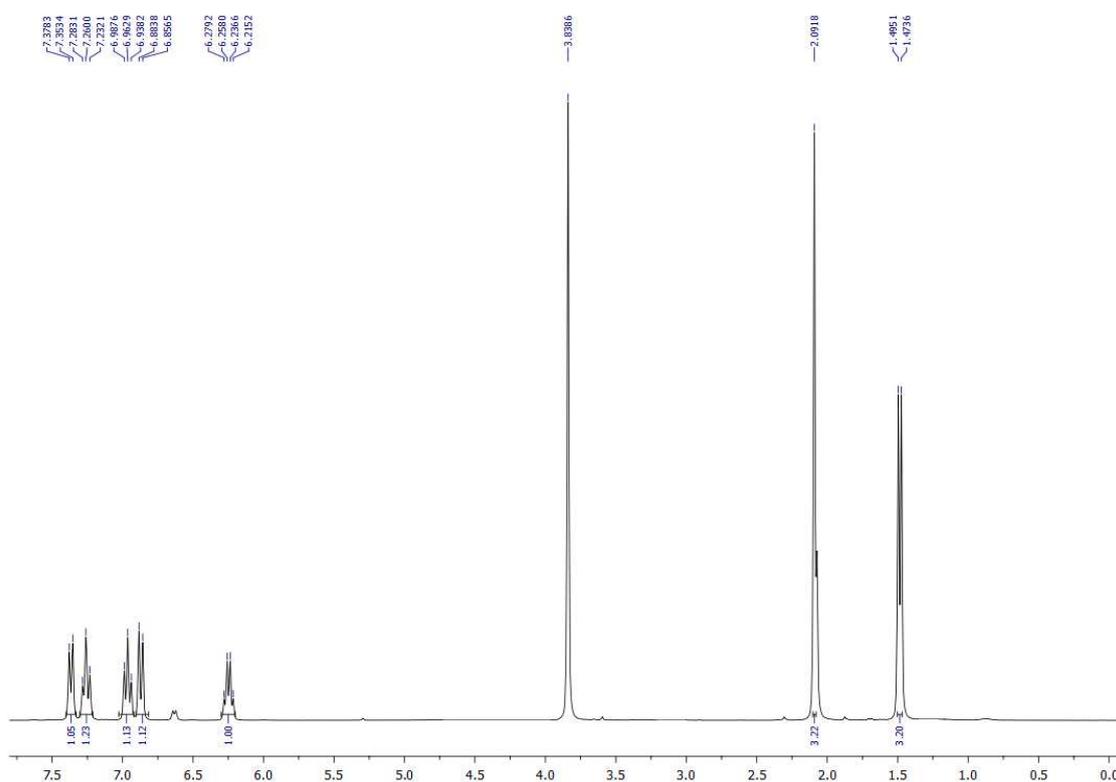
ANEXO T – DADOS EXPERIMENTAIS DO *RAC*-3I-ACETATO DE (2-METÓXIFENIL)ETILA

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 1,48 (d, 3H_j, J= 6,5 Hz); δ: 2,09 (s, 3H_a); δ: 3,84 (s, 3H_k); δ: 6,25 (q, 1H_c, J= 6,4 Hz); δ: 6,87 (d, 1H_h, J= 8,2 Hz); δ: 6,96 (t, 1H_f, J= 7,4 Hz); 7,26 (t, 1H_g, J= 7,7 Hz); δ: 7,37 (d, 1H_e, J= 7,5Hz).

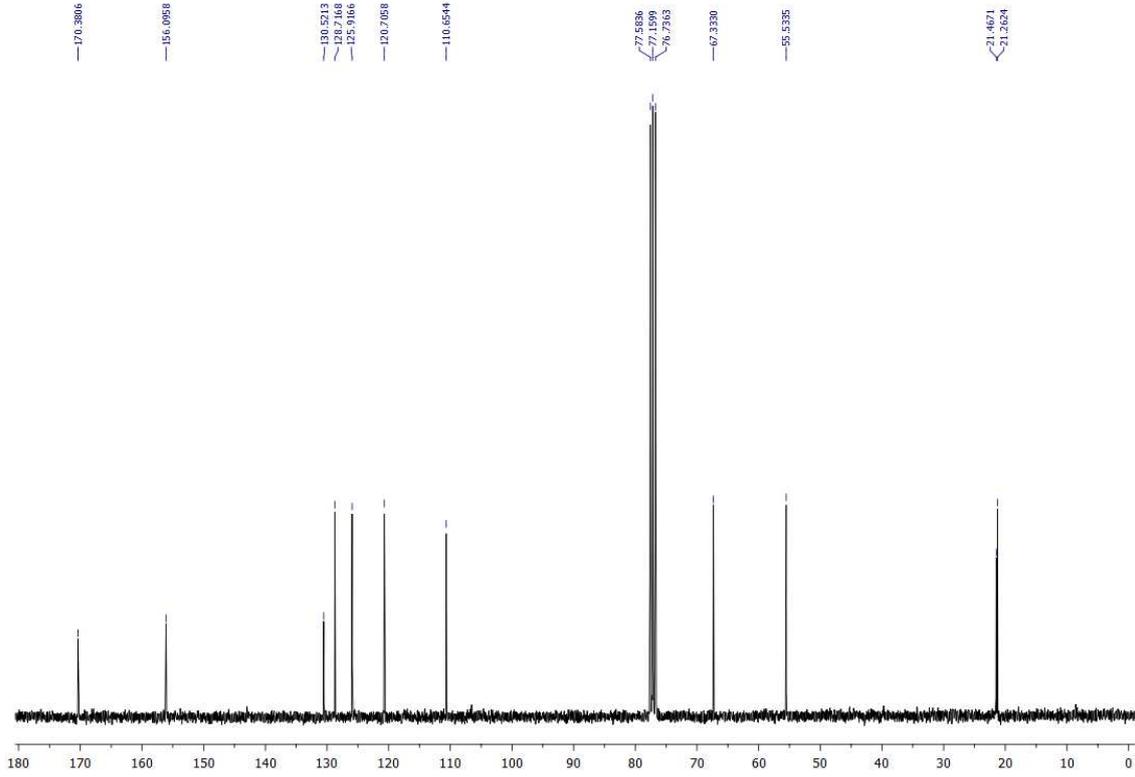
RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ: 21,26 (C_j); δ: 21,47 (C_a); δ: 55,53 (C_k); δ: 67,33 (C_c); δ: 110,65 (C_h); δ: 120,70 (C_f); δ: 125,92 (C_e); δ: 128,72 (C_d); δ: 130,52 (C_g); δ: 156,09 (C_i); δ: 170,38 (C_b).



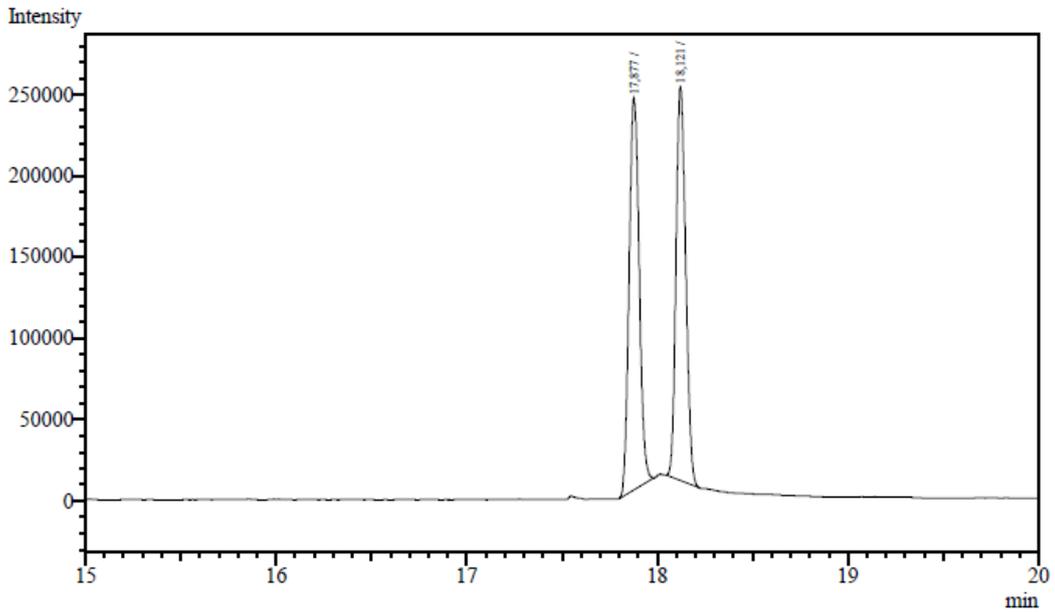
Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)



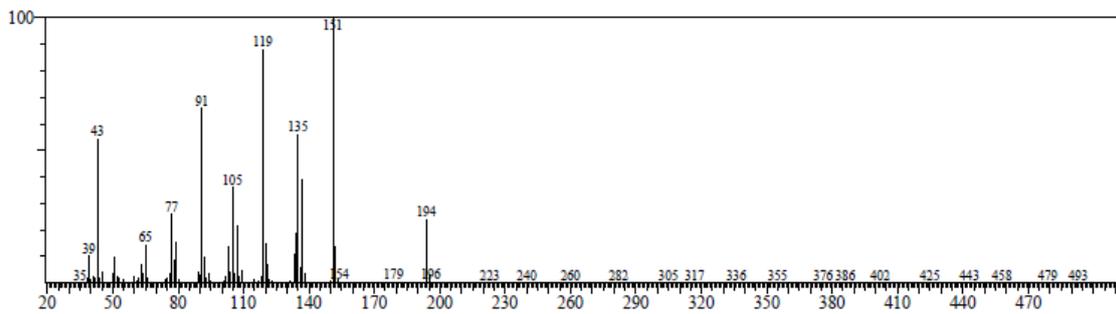
Espectro de RMN ¹³C-BB (75 MHz, CDCl₃)



Cromatograma obtido por CG-FID



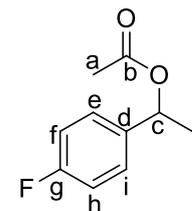
Espectro de massas obtido por CGMS



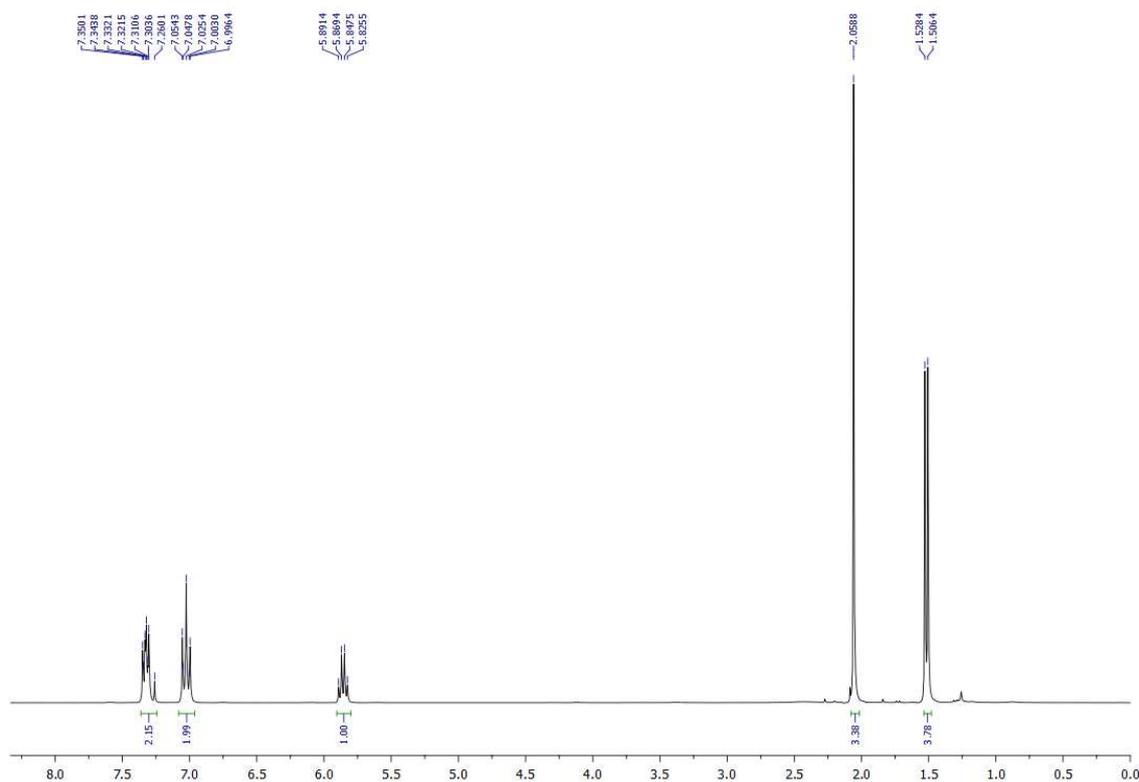
ANEXO U – DADOS EXPERIMENTAIS DO *RAC*-3J-ACETATO DE (4-FLUOROFENIL)ETILA

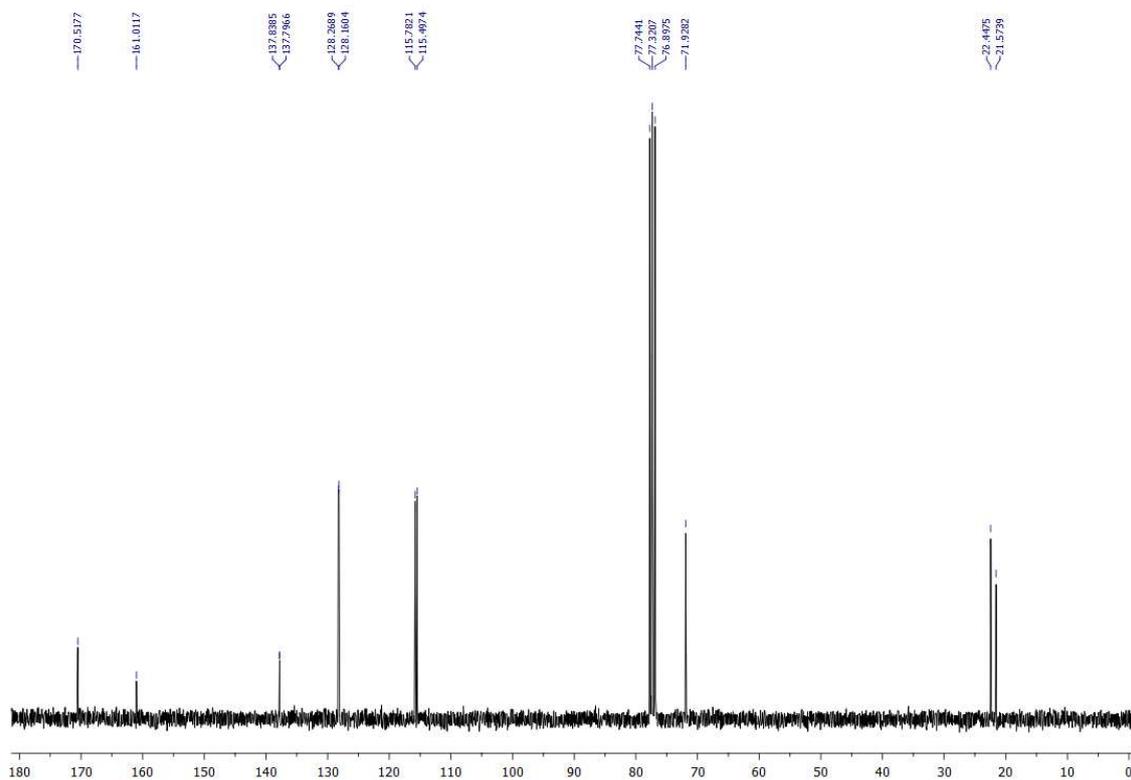
RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 1,52 (d, 3H_j, J= 6,6 Hz); δ: 2,06 (s, 3H_a); δ: 5,86 (q, 1H_c, J= 6,6 Hz); δ: 6,95-7,10 (m, 2H_{ei}); δ: 7,23-7,41 (m, 2H_{fh}).

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ: 21,57 (C_a); δ: 22,45 (C_j); δ: 71,93(C_c); δ: 115,64 (C_f, C_h); δ: 128,21 (C_e, C_i); δ: 137,82 (C_d); δ: 161,01 (C_g); δ: 170,52 (C_b).

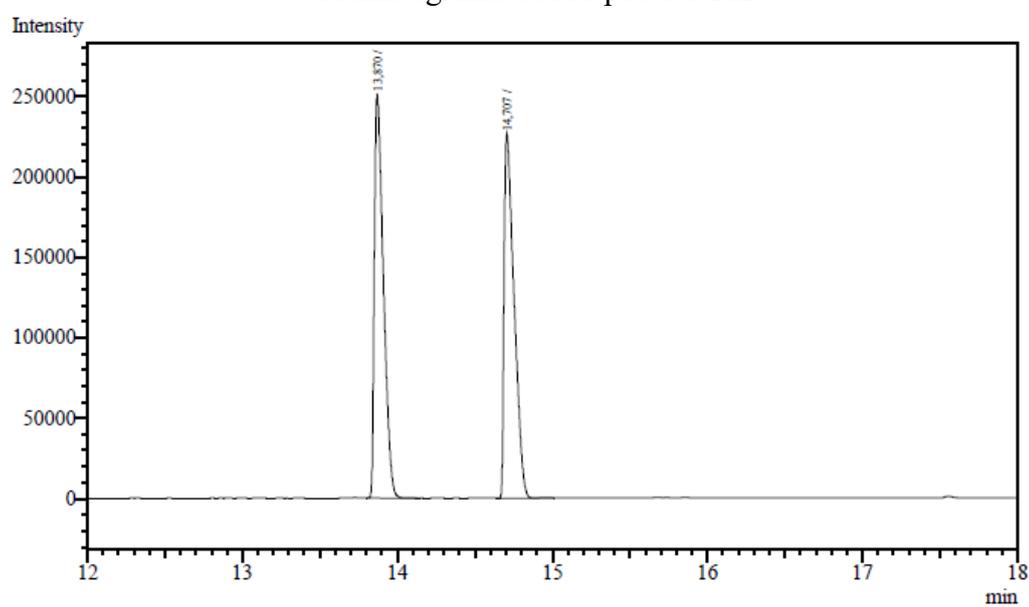


Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

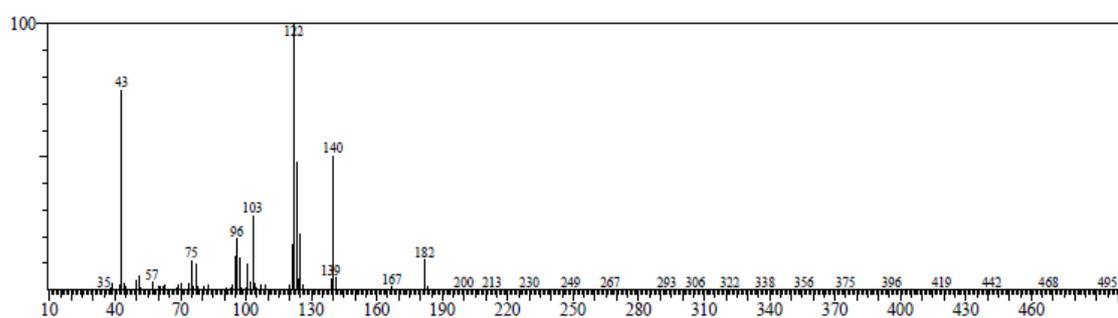


Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3)

Cromatograma obtido por CG-FID



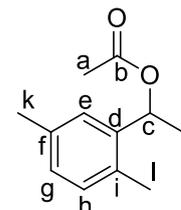
Espectro de massas obtido por CGMS



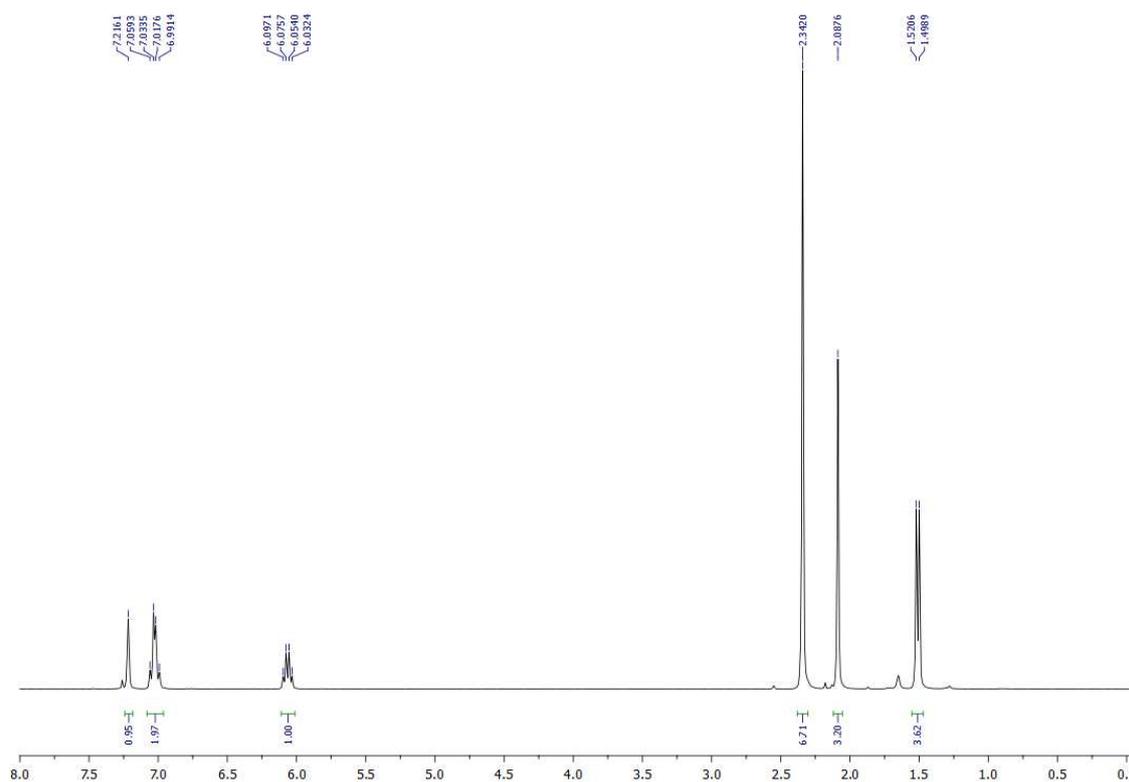
ANEXO V – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-3K-ACETATO DE (2,5-DIMETILFENIL)ETILA

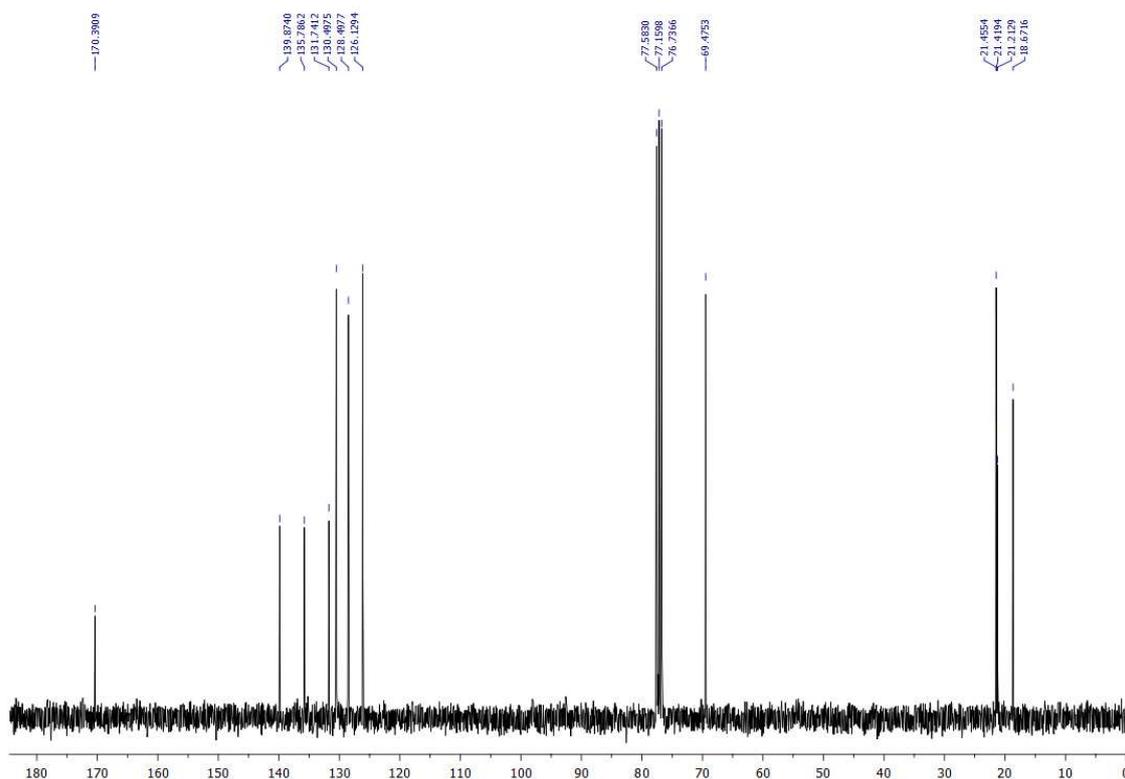
RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 1,51 (d, 3H_j, J= 6,5 Hz); δ: 2,09 (s, 3H_a); δ: 2,34 (s, 6H_{k,l}); δ: 6,06 (q, 1H_c, J= 6,5 Hz); δ: 7,00-7,07 (m, 2H_{g,h}); δ: 7,22 (s, 1H_e).

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ: 18,67 (C_i); δ: 21,21 (C_j); δ: 21,42 (C_a); δ: 21,45 (C_k); δ: 69,47 (C_b); δ: 126,13 (C_g); δ: 128,50 (C_e); δ: 130,50 (C_h); δ: 131,74 (C_i); δ: 135,79 (C_f); δ: 139,87 (C_d); δ: 170,39 (C_b).

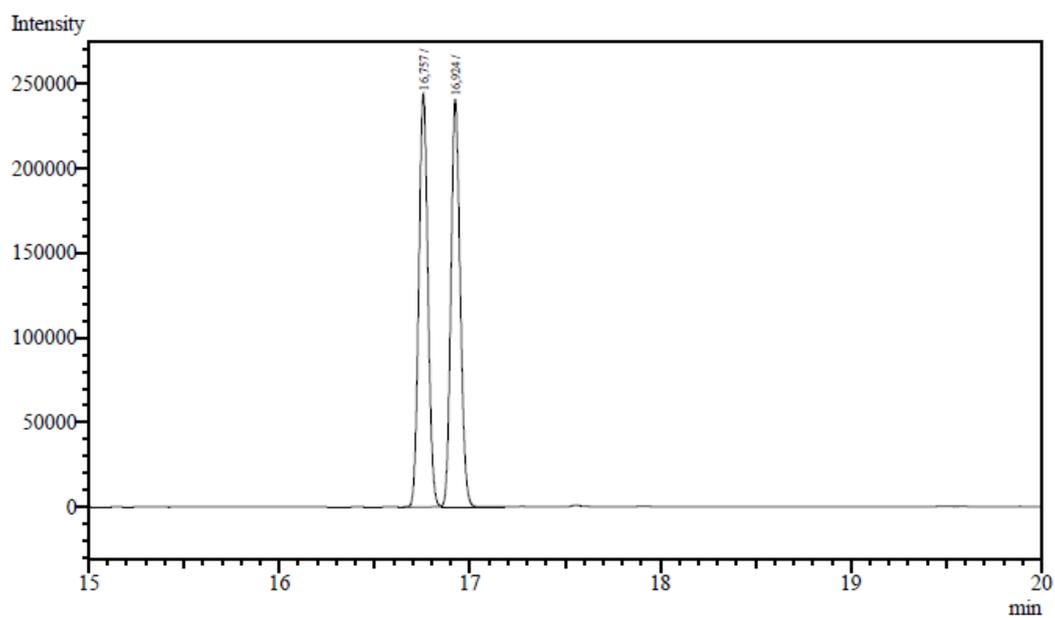


Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

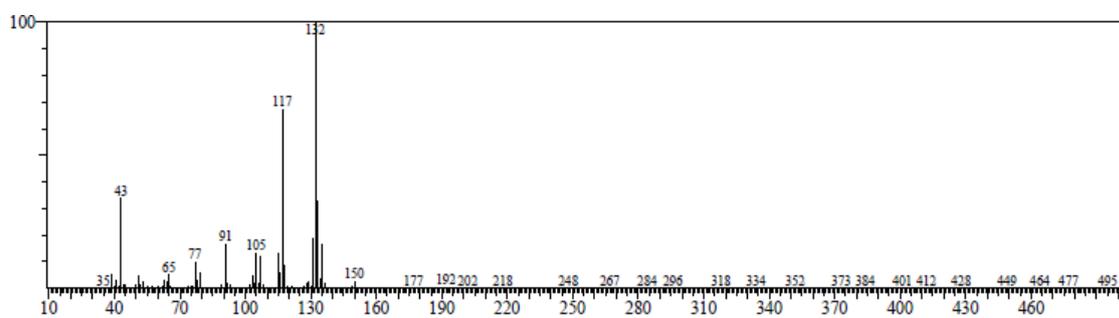


Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3)

Cromatograma obtido por CG-FID



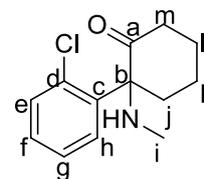
Espectro de massas obtido por CGMS



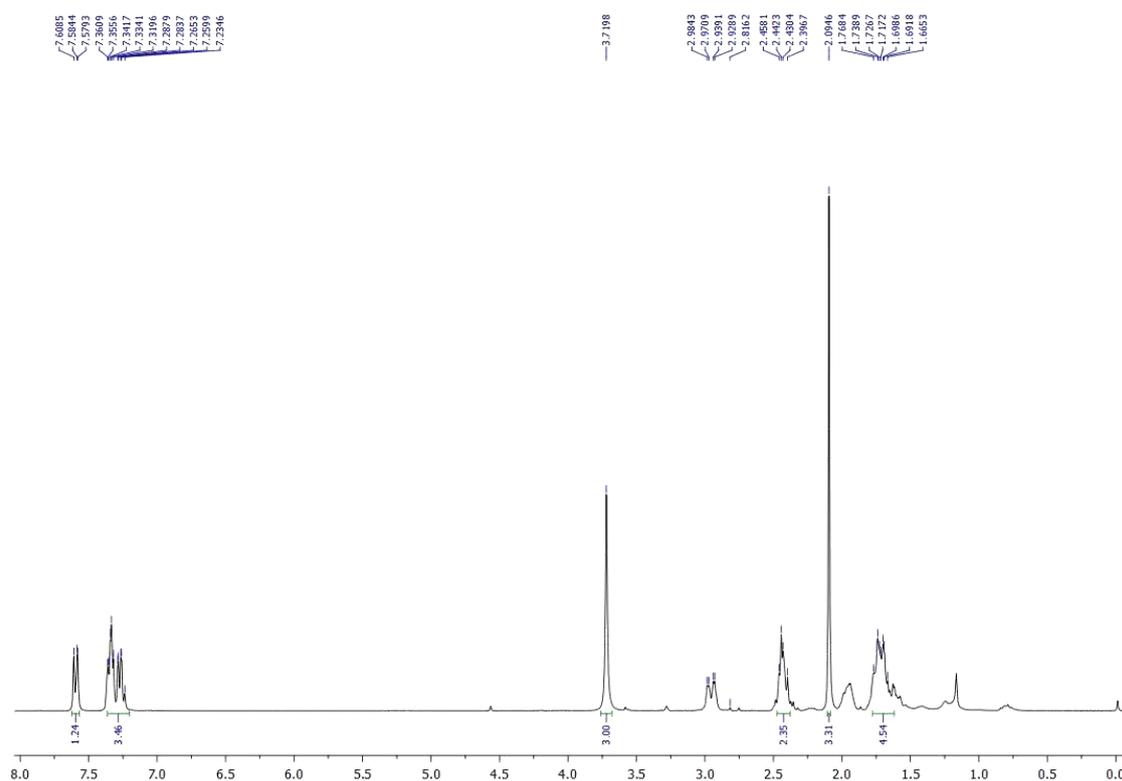
ANEXO W – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-4-2-(2-CLOROFENIL)-2-(METILAMINO)CICLOEXANONA (KETAMINA)

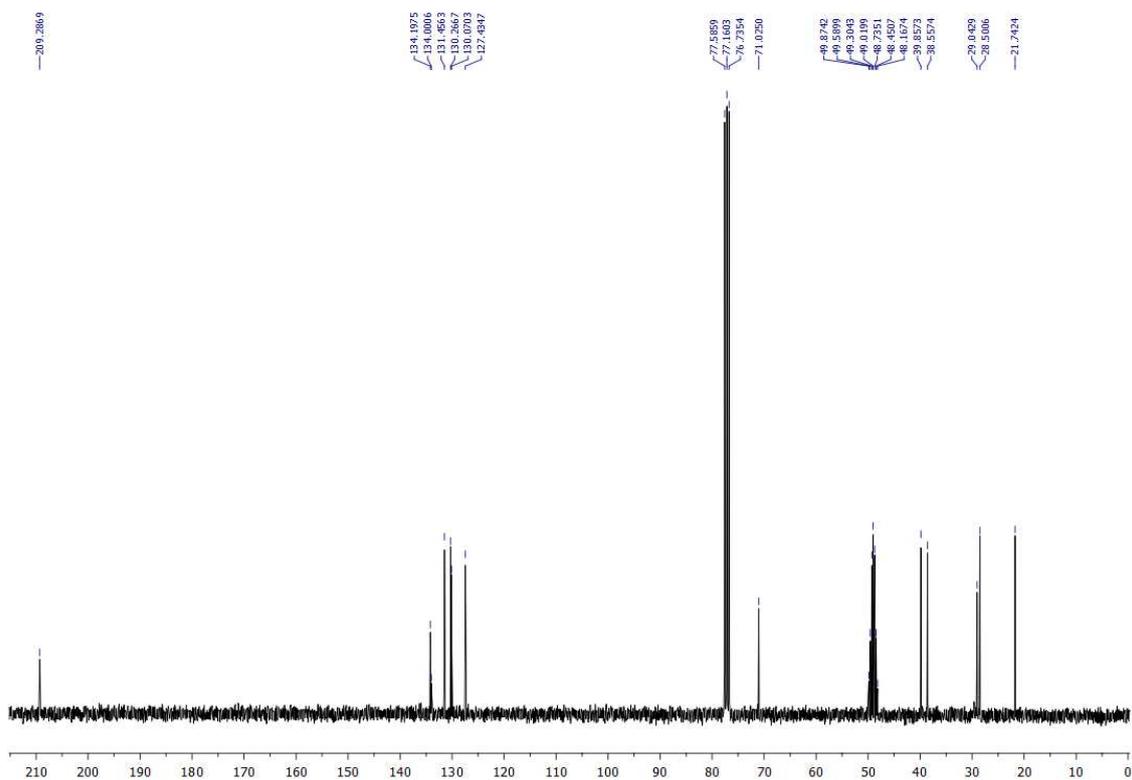
RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 1,65-2,48 (m, 8H_{amlk}); δ: 3,72 (s, 3H_i) δ: 7,23-7,36 (m, 3H_{fgh}); δ: 7,58-7,61 (m, 1H_e).

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ: 21,74 (C_k); δ: 28,50 (C_i); δ: 29,04 (C_i); δ: 38,56 (C_m); δ: δ: 39,86 (C_j); δ: 71,02 (C_b); δ: 127,43 (C_g); δ: 130,07 (C_f); δ: 130,27 (C_e); δ: 131,46 (C_h); δ: 134,00 (C_d); δ: 134,20 (C_c); δ: 209,29 (C_a).

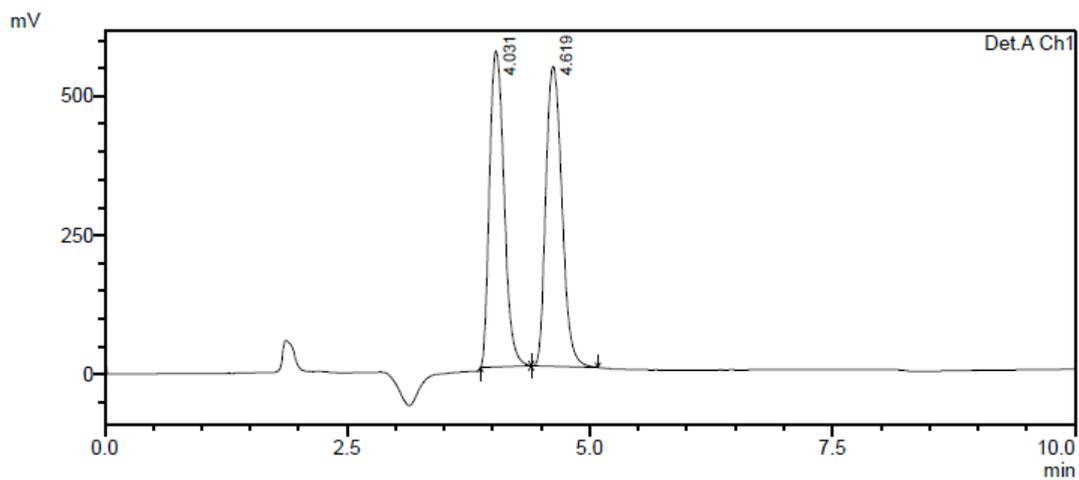


Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

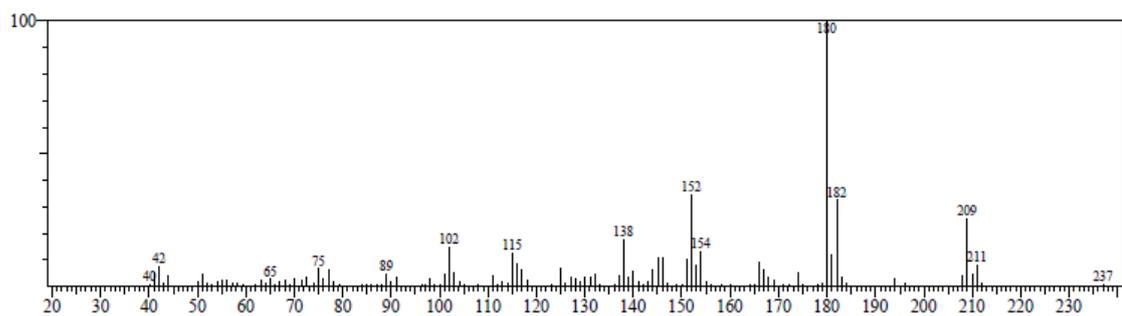


Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3)

Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)



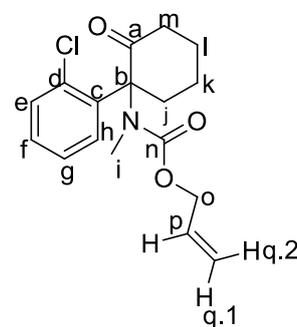
Espectro de massas obtido por CGMS



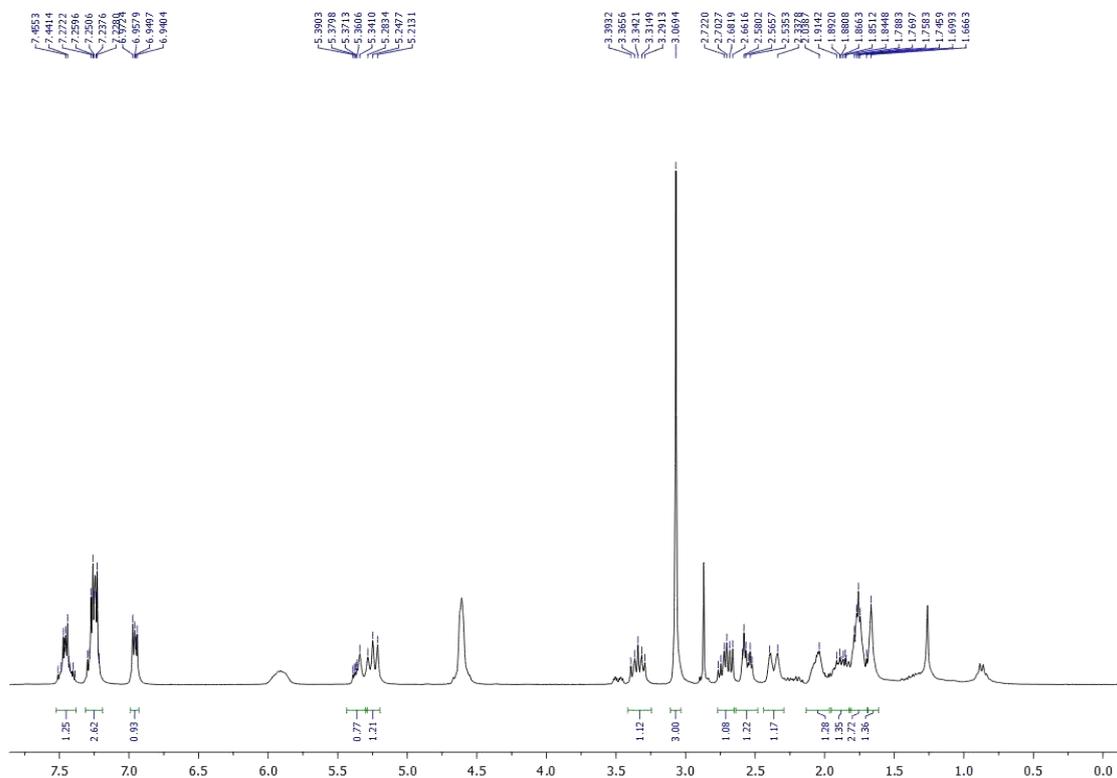
ANEXO X – DADOS EXPERIMENTAIS DO *RAC*-5-ALIL (1-(2-CLOROFENIL)-2-OXOCICLOHEXIL) (METIL) CARBAMATO (CARBAMATO DE KETAMINA)

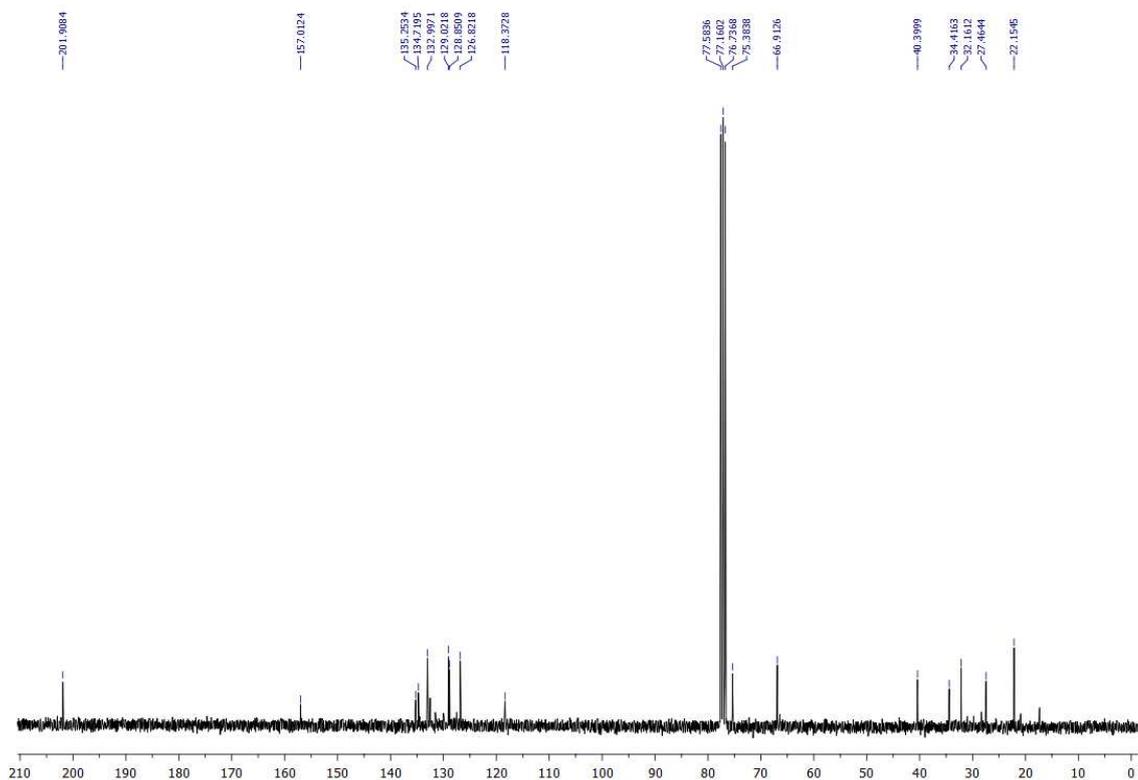
RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 1,57-2,80 (m, 8H_{ijklm}); δ: 3,05 (s, 3H_i); δ: 4,60(d, 2H_o, J= 3,7Hz); δ: 5,21 (d, 1H_{q.1}, J= 10,4 Hz); δ: 5,30 (d, 1H_{q.2}, J= 17,2 Hz); δ: 5,91 (m, 1H_p); 6,95-7,00 (m, 1H_h); 7,19-7,26 (m, 2H_{fg}); 7,38-7,55 (m, 1H_e).

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ: 22,15 (C_k); δ: 27,46 (C_i); δ: 32,16 (C_i); δ: 34,42 (C_j); δ: 40,40 (C_m); δ: 69,91 (C_o); δ: 75,38 (C_b); δ: 118,37 (C_q); δ: 126,82 (C_g); δ: 128,85 (C_f); δ: 129,02 (C_e); δ: 132,99 (C_h); δ: 134,72 (C_p); δ: 135,25(C_d); δ: 157,01(C_n), δ: 201,91 (C_a).

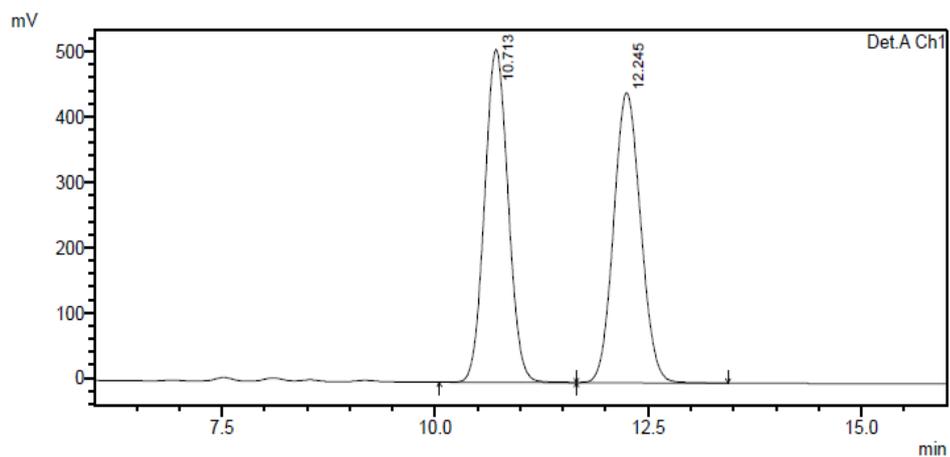


Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

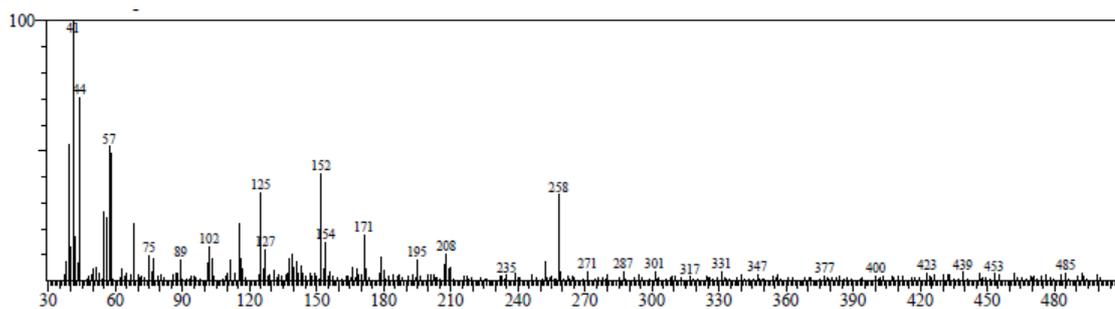


Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3)

Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)



Espectro de massas obtido por CGMS

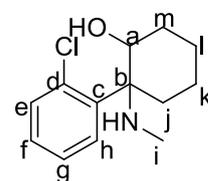


ANEXO Y – DADOS EXPERIMENTAIS DO *RAC*-6-(1S, 2S)-2-(2-CLOROFENIL)-2-(METILAMINO) CICLO-HEXANOL E *RAC*-7-(1S, 2R)-2-(2-CLOROFENIL)-2-(METILAMINO) CICLO-HEXANOL

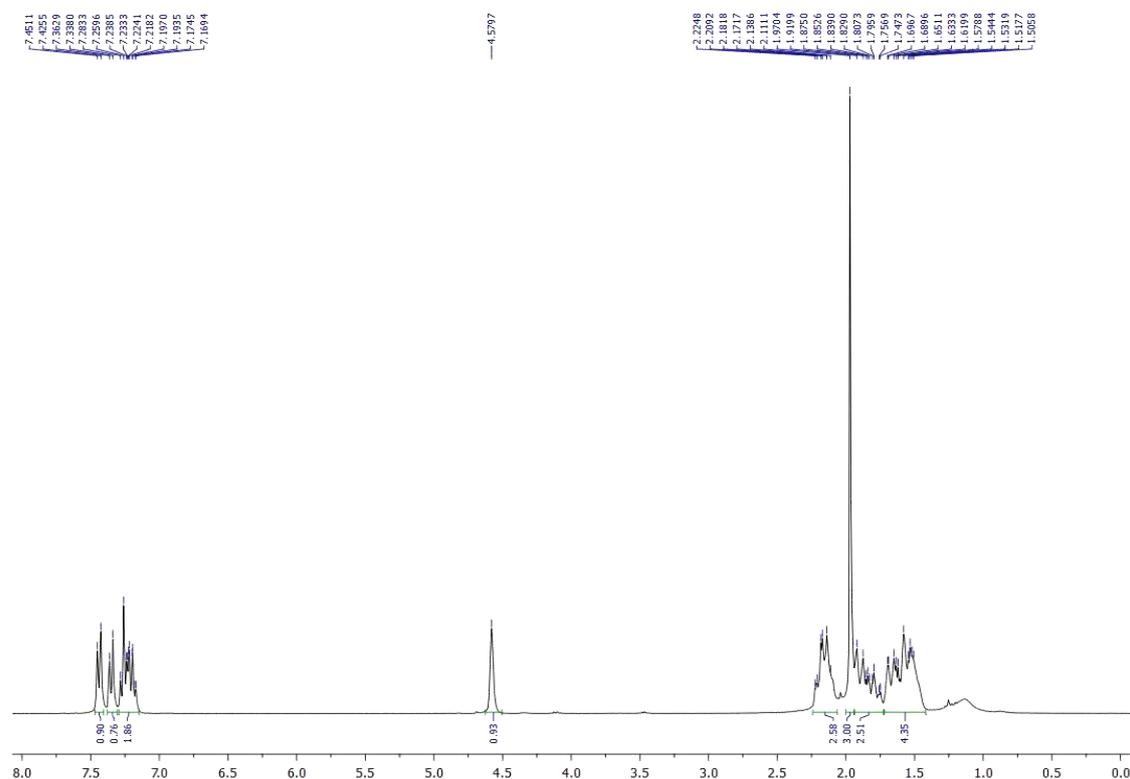
• **Diastereoisômero 1:**

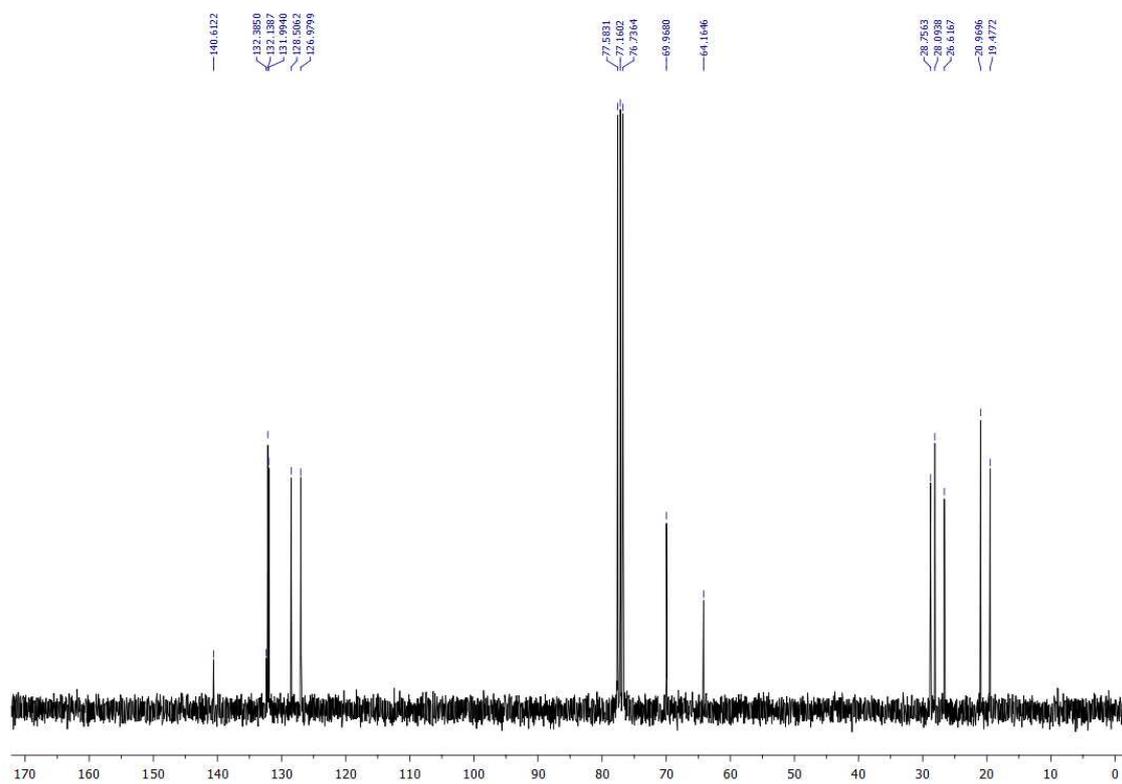
RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: Na região de δ 1,35-2,38 (m, 8H_{ijklm}); Nota: em δ 1,97 (s, 3H_i); δ: 4,58 (s, 1H_a); 7,01-7,28 (m, 2H_{fh}); 7,34-7,36 (m, 1H_g), 7,42 -7,45 (m, 1H_e).

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ: 19,47 (C_i); δ: 20,97 (C_k); δ: 26,62 (C_j); δ: 28,09 (C_i); δ: 28,76 (C_m); δ: 64,16 (C_b); δ: 69,97 (C_a); δ: 126,98 (C_g); δ: 128,51 (C_f); δ: 131,99 (C_h); δ: 132,14 (C_e); δ: 132,39 (C_d); δ: 140,61 (C_c).



Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

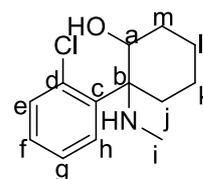


Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3)

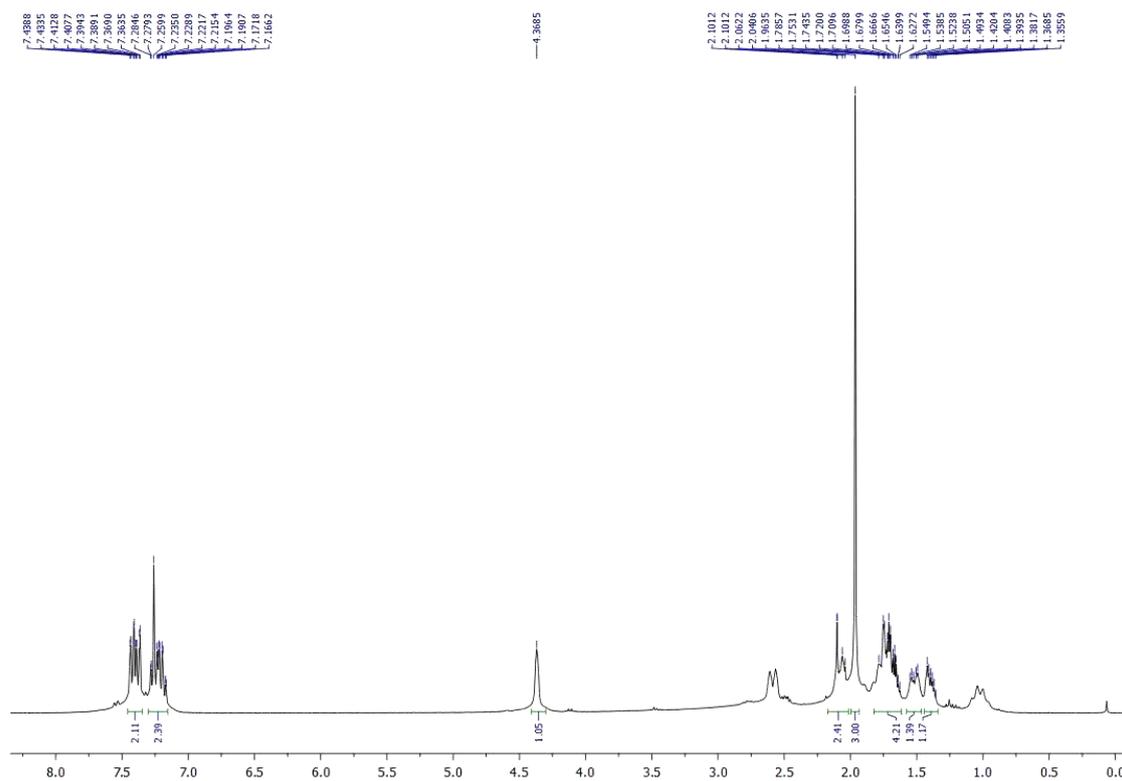
• **Diastereoisômero 2:**

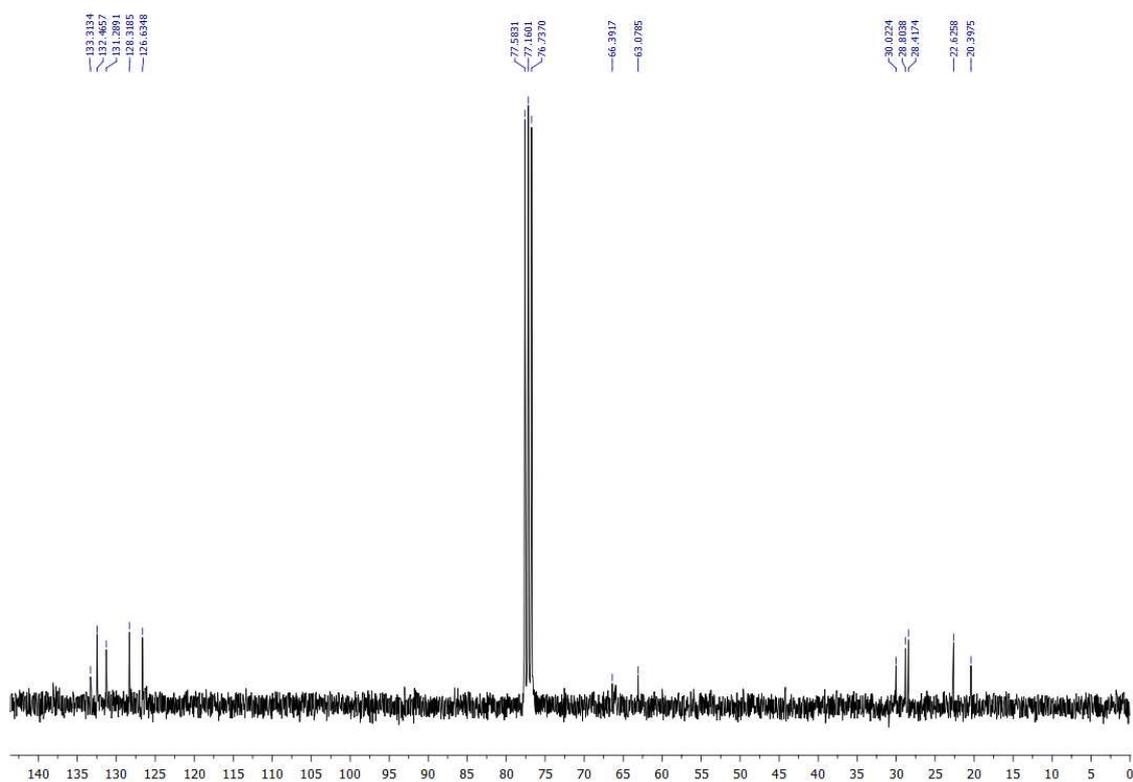
RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : Na região de δ 1,18-2,23 (m, 8H_{ijklm}); Nota: em δ 1,96 (s, 3H_i); δ : 4,37 (s, 1H_a); 7,07-7,28 (m, 2H_{fh}); 7.36-7,4 (m, 1H_{eg}).

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 20,40 (C_i); δ : 22,63 (C_k); δ : 28,42 (C_j); δ : 28,80 (C_i); δ : 30,02 (C_m); δ : 63,08 (C_b); δ : 66,39 (C_a); δ : 126,63 (C_g); δ : 128,32 (C_f); δ : 131,29 (C_h); δ : 132,47 (C_e); δ : 133,31 (C_d); δ : 140,61 (C_c).



Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

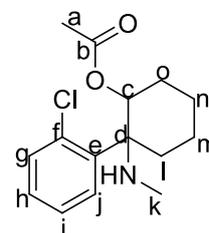


Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3)

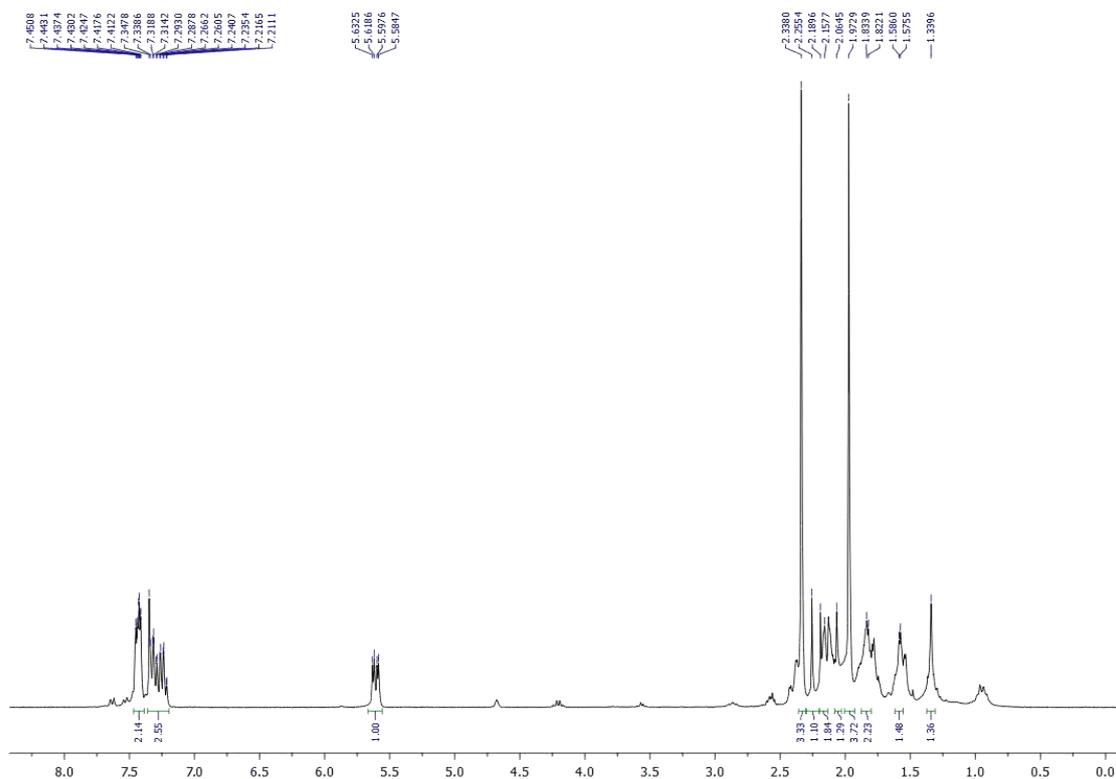
**ANEXO Z – DADOS EXPERIMENTAIS DO RAC-8- ACETATO DE 2-(2-
CLOROFENIL)-2-(METILAMINO)CICLO-HEXILA**

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : Na região de δ 1,29-2,29 (m, 8H_{lmno}); Nota: em δ 1,97 (s, 3H_k); δ : 2,34 (s, 3H_a); δ : 5,61 (dd, 1H_c, J=10,3; 4,0 Hz); δ : 7,19-7,37 (m, 2H_{jh}); δ : 7,39 -7,48 (m, 2H_{eg}).

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 20,95 (C_a); δ : 21,28 (C_n); δ : 24,18 (C_m); δ : 27,39 (C_o); δ : 29,72 (C_l); δ : 31,96 (C_k); δ : 63,67 (C_d); δ : 126,93 (C_i); δ : 128,18 (C_h); δ : 129,97 (C_j); δ : 132,60 (C_g); δ : 133,42 (C_f); δ : 139,95 (C_e); δ : 170,29 (C_b).



Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)



Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3)