



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

**KIMBERLY BENEDETTI VEGA**

**SÍNTESE QUIMIOENZIMÁTICA DO APREMILAST USANDO LIPASES E  
CETORREDUTASES**

**FORTALEZA**

**2020**

KIMBERLY BENEDETTI VEGA

SÍNTESE QUIMIOENZIMÁTICA DO APREMILAST USANDO LIPASES E  
CETORREDUTASES

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos  
Coorientador: Prof. Dr. Marcos Reinaldo da Silva

FORTALEZA

2020

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)

---

- V525s Vega, Kimberly Benedetti.  
Síntese quimioenzimática do apremilast usando lipases e cetorredutases / Kimberly Benedetti Vega. –  
2020.  
88 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação  
em Química, Fortaleza, 2020.  
Orientação: Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos.  
Coorientação: Prof. Dr. Marcos Reinaldo da Silva.
1. Apremilast. 2. Biocatálise. 3. Cetorredutases. 4. Lipases. 5. Resolução cinética enzimática. I. Título.  
CDD 540
-

KIMBERLY BENEDETTI VEGA

SÍNTESE QUIMIOENZIMÁTICA DO APREMILAST USANDO LIPASES E  
CETORREDUTASES

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

Aprovada em: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profª. Dra. Mary Anne Sousa Lima  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Thiago de Sousa Fonseca  
Instituto Federal de Educação do Ceará de Crateús (IFCE)

---

Prof. Dr. Marcos Reinaldo da Silva  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

## AGRADECIMENTOS

Agradezco en principio, al universo por conspirar a mi favor, por permitirme llegar hasta donde he llegado a pesar de todos los obstáculos en el camino que, para mal o para bien, me han enseñado a darle valor a lo que realmente lo tiene.

Agradezco al universo por permitirme nacer bajo el techo que algún día mis padres, Ofir Alicia Vega Obregón, Alberto Enrique Benedetti Fernández construyeron. A ellos les debo mucho, en especial el apoyo, el aliento y el valor cuando este último me faltó.

A mis hermanos Maria del Mar Benedetti Vega y Daniel Felipe Gómez Vega porque, en definitiva, son mis almas gemelas, en ellos encontré palabras de reconforto, ánimo y amor. Ellos siempre serán mi motivo de orgullo.

A Natalia Rojas Botero, por su compañía en la distancia, por el amor que hasta el día de hoy me ha brindado, por hacerme sentir fuerte cuando creí que las fuerzas ya no eran lo mío, por todos los “buenos días” y las “buenas noches” en los últimos 5 años. Gracias a ella por hacerme confiar aún más en mis capacidades para la investigación y por incentivar me de la forma que solo ella sabe.

A mis grandes de amigos de siempre, Viviana Arias, Daniel Bustos y Jeferson Montenegro, en especial a este último, pues gracias a él tuve la oportunidad de hallar y acceder a esta beca educativa y esta gran experiencia de vida. A él, gracias por contagiarme un poco de su instinto aventurero y de superación. Muchas Gracias, Jeff.

A mi orientador, Profesor Marcos Carlos de Mattos, espero llegar a ser algún día la mitad de la persona, investigador y maestro que él es. Gracias por el apoyo, por contribuir con mi formación profesional, por confiar en mí y por las charlas leves y tranquilas que alguna vez tuvimos, las cuales me ayudaron a despejar la mente.

A mi coorientador, Marcos Reinaldo da Silva, por todos los consejos académicos y personales que alguna vez me dió, porque él fue la primera persona que me hizo sentir en casa, el primero en mis dos años de maestría en interesarse por las personas que más amo en el mundo, mi familia. Porque siempre me hizo sentir mucha confianza en mí y en la amistad que construimos. Aprovecho este espacio para decirle: eres un gran amigo y me siento feliz de haberte conocido.

A Daniel Morais (Dani), estudiante de iniciación científica, mi mano derecha en todo este proceso; una persona incondicional, inteligente, altruista, noble y cariñosa. A él, gracias por permitirme conocerlo y ser parte de su experiencia en la investigación. Gracias por toda la ayuda brindada, pues sin ella no hubiese conseguido todo lo que conseguí en todos estos

dos años. Su participación en mi proyecto fue sustancial.

A Artur Ramon Oliveira (Arturo), mi mejor amigo de Brasil, mi colega de trabajo. Muchas gracias por estar conmigo cuando te necesité, por todos los abrazos, palabras de ánimo, por la confianza. Gracias sobre todo por cuidarme, por preocuparte por mí, por acompañarme hasta altas horas de la noche en el laboratorio, por todas las conversaciones profundas acerca de investigación y también de la vida. Gracias por hacerme enojar, reír, llorar (de emoción)... por ser el mejor amigo que nadie podría ser. Posdata: Gracias por todos los desayunos, almuerzos y cenas que preparaste para mí.

A Bruna Rocha (Bru), por toda su colaboración en este proyecto, pues ella fue quien analizó la gran mayoría de los espectros de RMN de las sustancias orgánicas que sintetice. Es importante dejar claro que algunos análisis fueron hechos en horario extra laboral, lo que hace que este agradecimiento tenga un valor agregado. Bruna, eres de las personas más colaboradoras que ya conocí. Gracias, entre tantas cosas, por la confianza financiera. Me salvaste de muchas.

A Diana Kelly Castro (Di), por enseñarme el proceso de purificación de sustancias, por la complicidad, por confiar y estimarme lo suficiente para invitarme a su hogar y presentarme su familia, por escucharme y apoyarme cuando lo necesité.

A mis amigos Gabriella Lima (Gabbi) y Paulo Gonçalves (Paulinho), por todas las salidas y despejadas de mente en compañía de ellos. Por todos aquellos parches inolvidables y lanches super deliciosos. Gracias a Gabbi por todos los “cheiros” y abrazos, y a Paulinho por hacerme reír mucho e invitarme a ser parte de una familia en mi primer “año nuevo” en Brasil.

A Renan Oliveira (Hernan) y Yolanda, por toda su colaboración y amistad. En especial, gracias a Renan, por todas las discusiones académicas, por las dudas resueltas y por su amistad incondicional.

A Lucas Barbosa (Luquinhas) e Yana Leticia (Criança) de Castro, por la ayuda en la lengua portuguesa. No pude encontrar mejores maestros que ustedes dos. Gracias sobre todo por ayudarme corregir algunas partes de mi cualificación. Ustedes fueron un gran norte para mí. Gracias por permitirme contar con su ayuda.

A Aquino Bezerra (Aquino), por todos los consejos y claves enseñadas, por escucharme y alentarme cuando lo necesité, a él, gracias por tener mucha paciencia, pues en un principio, no sabía seguir algunas reglas de convivencia, sin embargo, el con toda su profesión, me enseñó el camino apropiado para caminar.

A Tellin Dino, por la compañía en el laboratorio los fines de semana, porque siempre estuvo dispuesto a ayudar. Por ser una gran persona.

A Naara, Dalila y Jonathas, por renovar las energías del grupo LABS, por todas las chistes, abrazos y conversaciones científicas.

A Taynara Matos (Tay), por abrirme las puertas de su casa en la ciudad de Campinas, por darme abrigo, por hacer que mis días en aquella ciudad se tornaran más fáciles y llevaderos, por las conversaciones políticas y por los chistes satíricos.

A la profesora Anita J. Marsaioli, por permitirme trabajar en las instalaciones de LaBioChem: nivel de biossegurança 2 de la Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Gracias por permitirme aprender y trabajar con Fábio Domingues Nasário, un excelente orientador, profesional y persona.

A Charlene Sousa dos Anjos, por incentivar me a ser mejor en todos los aspectos de la vida, por preocuparse por mí, ayudarme cuando lo necesité. Gracias mi Chay por ser quien eres y por permitirme ser como soy, (3T), sin duda, haces parte de las cosas que no olvidaré en esta experiencia. Gracias por todo.

A los chicos de iniciación científica: Sabrina y Stephanie y los chicos técnicos de EEP Alan Pino Tabosa: Milton y Cassia por toda la ayuda en algunos procesos de mi proyecto.

A Ricardo Douglas, Wellinson Gadelha, João Avila, Vinicius, Emerson y Gledson por toda la asistencia y ayuda en los momentos que el personal de LABS los necesitó.

Finalmente, gracias al grupo LABS en general, la familia que me acogió con amor y cariño. Al personal administrativo del programa de posgraduación en Química: Celia y el profesor Luis por su ayuda en los procedimientos burocráticos, a la OEA por proporcionar la beca para química de posgrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) com o Código de Financiamento PVE 400171/2014-7.

## RESUMO

O apremilast (*S*)-**1** é um fármaco conhecido, comercialmente, pela marca Otezla<sup>®</sup> e é utilizado para o tratamento de pacientes com psoríase moderada a grave ou com artrite psoriática ativa. Este fármaco é relativamente recente, sendo aprovado pelo FDA somente em 2014. Neste projeto, descrevemos o desenvolvimento de uma abordagem biocatalítica para a síntese do apremilast, através uma rota sintética com 5 etapas e rendimento global de 20%. A etapa chave do processo, foi a obtenção de um intermediário quiral, o álcool (*R*)-1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etanol ((*R*)-**14**). O álcool (*R*)-**14** foi obtido *via* duas abordagens enzimáticas, uma utilizando cetorredutases e outra utilizando lipases. A biorredução da cetona 1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etanona (**12**), na presença da enzima KRED-P2-D12, levou ao álcool (*R*)-**14** com conversão de 48% e excesso enantiomérico de 93%. A resolução cinética do éster racêmico acetato de 1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etila (*rac*-**15**), por processo hidrolítico, catalisada pela lipase de *Aspergillus niger* levou ao álcool (*R*)-**14** com excesso enantiomérico > 99%, conversão de 50% e enantiosseletividade (*E*) > 200. A resolução cinética de *rac*-**15** somente foi eficiente na presença de 20% de *n*-butanol em relação ao meio de tampão fosfato (pH 7) 0,1 M. A lipase de *Aspergillus niger* provou ser um biocatalisador robusto na obtenção do intermediário álcool (*R*)-**14** na forma enantiomericamente pura e com a máxima conversão de 50%. A melhor condição para a resolução de *rac*-**15** foi lipase/substrato 3:1 (massa/massa), em tampão PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (pH 7) 0,1 M com 20% de *n*-butanol, 6 h de reação a 45 °C. Subsequentemente, o álcool (*R*)-**14**, enantiomericamente puro, reagiu com 4-acetilaminoisindol-1,3-diona (**19**), *via* reação de Mitsunobu, produzindo o apremilast com 65% de rendimento e 51% de excesso enantiomérico.

**Palavras-chave:** Apremilast. Biocatálise. Cetorredutases. Lipases. Resolução cinética enzimática.



## ABSTRACT

Apremilast (**S**)-**1** is a commercially known drug under the brand name Otezla® and is used to treat patients with moderate to severe psoriasis or active psoriatic arthritis. This drug is relatively recent and was approved by the FDA only in 2014. In this project, we describe the development of a biocatalytic approach for the synthesis of apremilast and the key step was to obtain a chiral intermediate, the alcohol (*R*)-**14**, (*R*)-1-(3-ethoxy)4-methoxyphenyl)-2-(methylsulfonyl)ethanol. The alcohol (*R*)-**14** was obtained *via* two enzymatic approaches, one using ketoreductases and one using lipases. Bioreduction of ketone **12**, 1-(3-ethoxy-4-methoxyphenyl)-2-(methylsulfonyl)ethanone, in the presence of KRED-P2-D12, led to alcohol (*R*)-**14** with 48% conversion and enantiomeric excess 93%. Kinetic resolution of racemic ester *rac*-**15**, 1-(3-ethoxy-4-methoxyphenyl)-2-(methylsulfonyl)ethyl acetate, by hydrolytic process catalyzed by lipase from *Aspergillus niger* led to alcohol (*R*)-**14** with enantiomeric excess > 99%, 50% conversion and enantioselectivity (*E*) > 200. Kinetic resolution of *rac*-**15** was only effective in the presence of 20% *n*-butanol relative to phosphate buffer medium (pH 7). Lipase from *Aspergillus niger* has proven to be a robust biocatalyst because it provides the intermediate alcohol (*R*)-**14** in enantiomerically pure form and with a maximum conversion of 50%. The best condition for resolution of *rac*-**15** was lipase/substrate 3:1, in PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (pH 7) buffer with 20% *n*-butanol, 6 h of reaction time at 45 ° C. Subsequently, enantiomerically pure alcohol (*R*)-**14** reacted with phthalimide **19**, 4-acetylamino-isoindol-1,3-dione, *via* Mitsunobu reaction, yielding apremilast in 65% yield and enantiomeric excess 51%.

**Keywords:** Apremilast. Biocatalysis. Ketoreductases. Lipases. Enzymatic kinetic resolution.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Representação da fórmula estrutural do apremilast.....	14
Figura 2-	Mecanismo de ação do apremilast.....	15
Figura 3-	Mecanismo de reação de transesterificação mediada por lipase.....	21
Figura 4-	Resolução cinética de ésteres e álcoois secundários <i>via</i> reação de hidrólise e transesterificação, na presença de lipases, de acordo com a regra de Kazlauskas.....	22
Figura 5-	Redução da 3-tiaciclopentanona mediada por <i>Lactobacillus kefir</i> , uma cetorreductase desenvolvida pela Codexis <sup>®</sup> , para a síntese do antibiótico sulopenem.....	23
Figura 6-	Redução assimétrica de cetonas seguindo a regra Prelog ou <i>anti</i> -Prelog.....	24

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1-	Síntese do apremilast usando resolução cinética na presença da <i>N</i> -acetil-L-leucina.....	17
Esquema 2-	Síntese do apremilast usando um catalisador quiral de ródio.....	18
Esquema 3-	Síntese do apremilast usando auxiliar quiral de ferro e um catalisador de ródio.....	19
Esquema 4-	Resolução cinética dinâmica da amina <i>rac</i> - <b>3</b> usando a lipase Novozym <sup>®</sup> 435 e o catalisador de Shvo.....	25
Esquema 5-	Biorredução da cetona <b>11</b> e <b>12</b> usando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	26
Esquema 6-	Síntese quimioenzimática do fármaco apremilast usando lipases e cetorredutases.....	27
Esquema 7-	Rotas sintéticas para a obtenção do álcool <i>rac</i> - <b>14</b> .....	30
Esquema 8-	Rota sintética para obtenção da cetona <b>12</b> <i>via</i> hidrólise básica da nitrila <b>5</b> .....	31
Esquema 9-	Obtenção do álcool <i>rac</i> - <b>14</b> a partir do aldeído <b>2</b> (rota sintética 2).....	32
Esquema 10-	Obtenção do álcool <i>rac</i> - <b>14</b> a partir da nitrila <b>5</b> (rota sintética 3).....	33
Esquema 11-	Reação de acetilação do álcool <i>rac</i> - <b>15</b> .....	34
Esquema 12-	Triagem de lipases na resolução cinética do éster <i>rac</i> - <b>15</b> .....	35
Esquema 13-	Triagem de cetorredutases na biorredução da cetona <b>12</b> .....	43
Esquema 14-	Mecanismo de regeneração do cofator NAD(P)H.....	45
Esquema 15-	Obtenção da 4-acetilamino-isoindol-1,3-diona ( <b>19</b> ).....	48
Esquema 16-	Obtenção do apremilast.....	49
Esquema 17-	Mecanismo da obtenção do apremilast <i>via</i> reação S <sub>N</sub> 1.....	50
Esquema 18-	Síntese quimioenzimática do fármaco apremilast, desenvolvida neste projeto.....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Valores de rendimento (%) dos produtos obtidos entre o cloreto de ácido <b>21</b> e o carbânion da dimetilsulfona, após variação da temperatura e a proporção molar substrato/ <i>n</i> -butil-lítio.....	31
Tabela 2-	Efeito do cossolvente na resolução cinética do acetato <i>rac</i> - <b>15</b> via hidrólise, catalisada por lipase de <i>Aspergillus niger</i> .....	36
Tabela 3-	Efeito da temperatura na lipase de <i>Aspergillus niger</i> na resolução cinética de <i>rac</i> - <b>15</b> via hidrólise.....	38
Tabela 4-	Efeito da proporção tampão:cossolvente (v/v) na resolução cinética do <i>rac</i> - <b>15</b> via hidrólise.....	40
Tabela 5-	Efeito da proporção enzima:substrato (m/m) na resolução cinética <i>rac</i> - <b>15</b> , via hidrólise.....	41
Tabela 6-	Triagem de cetorredutases na redução da cetona <b>12</b> , em um tempo reacional de 24 h.....	44
Tabela 7-	Influência do regenerador do cofator na biorredução da cetona <b>12</b> , usando a KRED-P2-D12, em 24 h de reação.....	46
Tabela 8-	Efeito do cossolvente na biorredução da cetona <b>12</b> catalisada pela KRED-P2-D12.....	47
Tabela 9-	Reagentes e solventes utilizados no desenvolvimento deste projeto.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$[\alpha]_D^T$	Rotação óptica específica
$J$	Constante de acoplamento
$\delta$	Deslocamento químico
$R_f$	Fator de Retenção
s	Simpleto
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
t	Tripleto
q	Quarteto
m	Multipeto
CENAUREMN	Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear
DEPT 135°	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer 135°
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrômetro de Massas
nm	Nanômetro
Hz	Hertz
$m/z$	Relação massa/carga
ppm	Partes por milhão
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1
UV	Ultravioleta
<i>e.e.</i>	Excesso enantiomérico
<i>e.e.s</i>	Excesso enantiomérico do substrato
<i>e.e.p</i>	Excesso enantiomérico do produto
rpm	Rotação por minuto
p.f	Ponto de fusão
pH	Potencial Hidrogeniônico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1</b>	<b>Generalidades do apremilast.....</b>	<b>14</b>
<b>1.2</b>	<b>Mecanismo de ação do apremilast.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3</b>	<b>Relevância do apremilast na indústria farmacêutica.....</b>	<b>15</b>
<b>1.4</b>	<b>Estratégias sintéticas para obter o apremilast.....</b>	<b>16</b>
<b>1.4.1</b>	<i>Estratégias convencionais.....</i>	<i>16</i>
<b>1.4.2</b>	<i>Estratégias alternativas.....</i>	<i>19</i>
<b>1.4.2.1</b>	<i>Lipases.....</i>	<i>20</i>
<b>1.4.2.2</b>	<i>Cetorreductases.....</i>	<i>22</i>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>29</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1</b>	<b>Obtenção do 1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etanol (<i>rac</i>-14).....</b>	<b>30</b>
<b>3.2</b>	<b>Obtenção do acetato de 1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etila (<i>rac</i>-15) .....</b>	<b>33</b>
<b>3.3</b>	<b>Obtenção do (<i>R</i>)-1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etanol, (<i>R</i>)-14, via resolução cinética do éster <i>rac</i>-15, na presença de lipases.....</b>	<b>34</b>
<b>3.3.1</b>	<i>Efeito do cossolvente na resolução cinética do acetato de 1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etila (<i>rac</i>-15) utilizando lipase de <i>Aspergillus niger</i>.....</i>	<i>35</i>
<b>3.3.2</b>	<i>Efeito da temperatura na atividade e seletividade enzimática.....</i>	<i>38</i>
<b>3.3.3</b>	<i>Efeito da proporção tampão:cossolvente (v/v) .....</i>	<i>40</i>
<b>3.3.4</b>	<i>Efeito da razão enzima:substrato (m/m) .....</i>	<i>41</i>
<b>3.4</b>	<b>Síntese enzimática do (<i>R</i>)-1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etanol, (<i>R</i>)-14, via biorredução da 1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etanona (12) na presença de cetorreductases.....</b>	<b>43</b>
<b>3.4.1</b>	<i>Influência do regenerador do cofator na biorredução da cetona 12.....</i>	<i>45</i>
<b>3.4.2</b>	<i>Efeito do cossolvente na biorredução da cetona 12 utilizando a KRED-P2-D12.....</i>	<i>46</i>
<b>3.4.3</b>	<i>Efeito da temperatura na atividade enzimática.....</i>	<i>47</i>

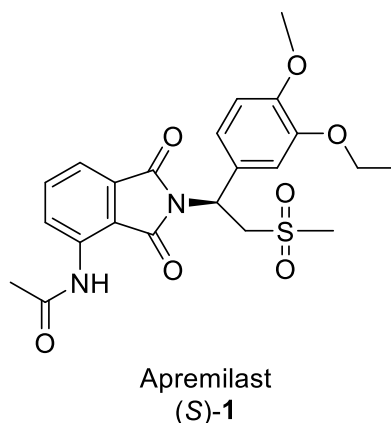
3.5	Síntese da 4-acetilamino-isoindol-1,3-diona (19) .....	48
3.6	Obtenção do fármaco apremilast [(S)-1] .....	49
3.7	Síntese quimioenzimática do apremilast.....	50
4	<b>PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	52
4.1	<b>Instrumentos</b> .....	52
4.1.1	<i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i> .....	52
4.1.2	<i>Ponto de Fusão</i> .....	53
4.1.3	<i>Rotação óptica <math>[\alpha]_D^{20}</math></i> .....	53
4.1.4	<i>Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE)</i> .....	53
4.1.5	<i>Cromatógrafo a Gás-Espectrometro de Massas (CG-EM)</i> .....	53
4.2	<b>Cromatografia líquida de adsorção</b> .....	54
4.3	<b>Solventes e reagentes</b> .....	54
4.3.1	<i>Secagem dos solventes</i> .....	55
4.4	<b>Enzimas</b> .....	56
4.5	Síntese da 1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonyl)etanona (12) .....	56
4.6	Síntese do 1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonyl)etanol ( <i>rac</i> -14) .....	56
4.7	Síntese do acetato de 1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonyl)etila ( <i>rac</i> -15) .....	57
4.8	Hidrólise de <i>rac</i> -15 catalisada por lipase de <i>Aspergillus niger</i> .....	57
4.9	Biorredução da cetona 12 catalisada pela cetorreductase KRED-P2-D12.....	57
4.10	Síntese da 4-nitro-1 <i>H</i> -isoindol-1,3(2 <i>H</i> )-diona (17) .....	58
4.11	Síntese da 4-aminoisoindolina-1,3-diona (18) .....	58
4.12	Síntese da 4-acetilamino-isoindol-1,3-diona (19) .....	58
4.13	Síntese do apremilast [(S)-1] .....	59
5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	60
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	61
	<b>ANEXO A- CÁLCULO DO EXCESSO ENANTIOMÉRICO E DADOS FÍSICOS E ESPECTROSCÓPICOS</b> .....	70
	<b>ANEXO B- CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE E CG-EM</b> .....	85

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Generalidades do apremilast

O apremilast (*S*)-1, Figura 1, é uma substância orgânica que apresenta um centro estereogênico com configuração *S*, uma fórmula estrutural relativamente simples, e com um peso molecular de 460 g.mol<sup>-1</sup>. Segundo a IUPAC, o nome oficial para a referida substância é (*S*)-*N*-(2-(1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonyl)etil)-1,3-dioxoisindolin-4-il)acetamida, sendo comercialmente conhecido como Otezla<sup>®</sup>, um inibidor seletivo da enzima fosfodiesterase 4 (PDE-4). Este fármaco foi desenvolvido pela empresa farmacêutica Celgene Corporation para o tratamento da psoríase ativa de moderada a grave e para a artrite psoriásica, sendo aprovado para sua comercialização nos Estados Unidos no dia 21 de março de 2014 pela *Food and Drug Administration* (FDA) (DU, LIANCHAO e JIEGEN, 2016), na União Europeia no dia 15 de janeiro de 2015 pela *European Medicines Agency* (EMA) (EMA, 2015) e no Brasil no dia 28 de março de 2018 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (ANVISA, 2019).

**Figura 1.** Representação da fórmula estrutural do apremilast



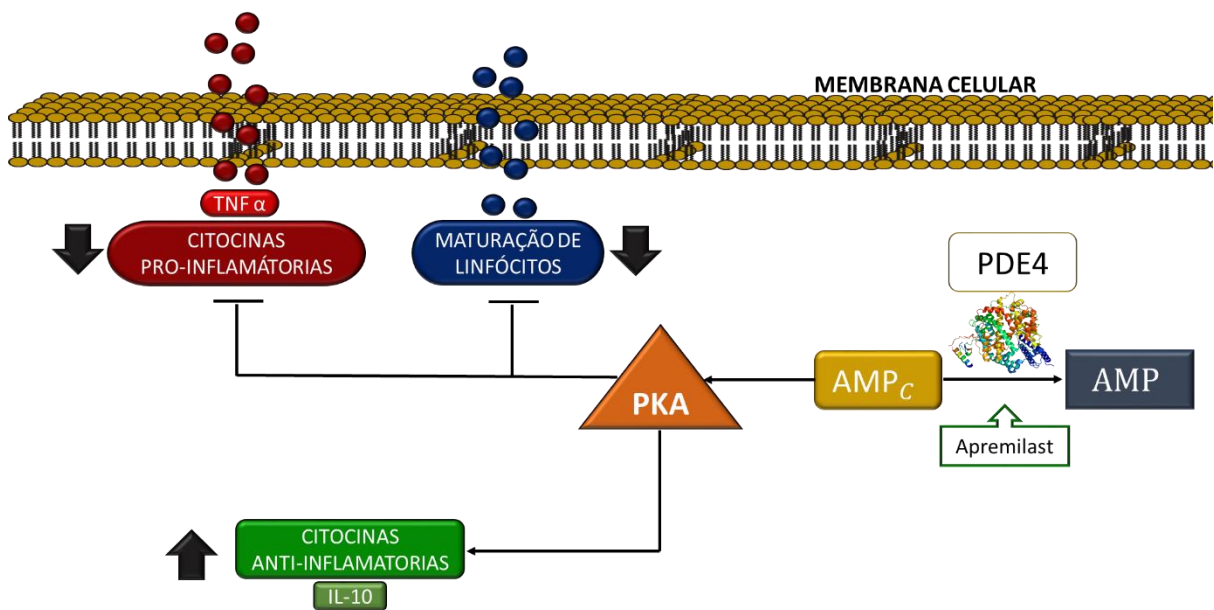
### 1.2 Mecanismo de ação do apremilast

O monofosfato de adenosina cíclico (AMP<sub>c</sub>), é um modulador chave das respostas de células imunes e predominantemente regulado pela enzima fosfodiesterase 4 (PDE-4). A inibição desta enzima, resulta em elevados níveis de AMP<sub>c</sub>, que regula a ativação da proteína quinase A (PKA). A PKA induz a diminuição da produção de citocinas, proteínas responsáveis



pelas respostas pró-inflamatórias, como por exemplo, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), bem como o aumento de citocinas anti-inflamatórias, incluindo a interleucina (IL)-10 (IMAM, *et al.*, 2019) (CAULI, *et al.*, 2014) (**Figura 2**). A PDE-4 é um agente que atua de forma intracelular na regulação desses mediadores inflamatórios (PAPP, *et al.*, 2015), sendo, portanto, relevante em um ciclo para a patogênese da psoríase, inibindo e/ou regulando a AMPc.

**Figura 2.** Mecanismo de ação do apremilast



### 1.3 Relevância do apremilast na indústria farmacêutica

O apremilast tornou-se um fármaco de alto valor medicinal, uma vez que é considerado um tratamento aceitável para pacientes com certas comorbidades médicas, especialmente renais, hepáticas ou hematológicas, na qual algumas terapias biológicas ou tradicionais para psoríase sistêmica podem ser contraindicadas. Também é uma terapia eficiente para pacientes com imunidade comprometida, como aqueles com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (OM, HILL e FELDMAN, 2018).

O apremilast é uma alternativa ao tratamento com medicamentos biológicos, com um perfil de segurança diferente; permite tratamento continuado em uma doença crônica devido à não toxicidade acumulada (VÉLEZ, 2016). Além disso, demonstrou ter potencial para o tratamento de outras enfermidades, incluindo a lesão pulmonar aguda (IMAM, *et al.*, 2019), hidradenite supurativa (VOSSSEN, *et al.*, 2019), dermatite atópica (ABROUK, *et al.*, 2017),

estomatite aftosa (SCHIBLER, *et al.*, 2017), apoptose induzida por doxorrubicina e inflamação no coração (IMAM, *et al.*, 2018), pioderma gangrenoso (LAIRD, *et al.*, 2017) e o mal de Alzheimer (WU, *et al.*, 2018).

Todas essas vantagens, fazem com que o apremilast seja um fármaco versátil e relevante a nível industrial, com uma possibilidade elevada de se tornar um recurso terapêutico, altamente prescrito por médicos dermatologistas para o tratamento de enfermidades associadas à inibição da PDE-4.

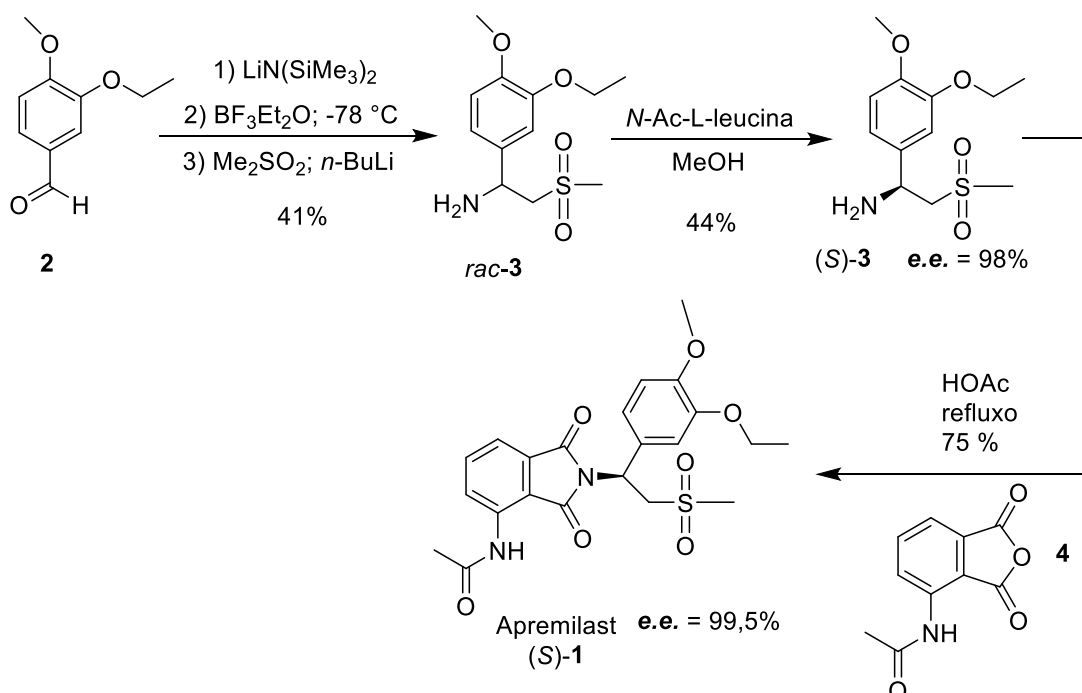
#### 1.4 Estratégias sintéticas para obter o apremilast

Devido ao apremilast consistir no (*S*)-enantiômero, vários autores têm investido seus esforços na proposta de diversas alternativas para a obtenção de intermediários enantiomericamente puros, para posterior utilização na síntese do referido fármaco. Em seguida, serão descritas as estratégias sintéticas mais relevantes relatadas na literatura. Estas foram classificadas em: convencionais (utilizando substancias orgânicas como agentes de resolução cinética ou catalisadores químicos quirais) (1.4.1) e alternativas (1.4.2).

##### 1.4.1 Estratégias convencionais

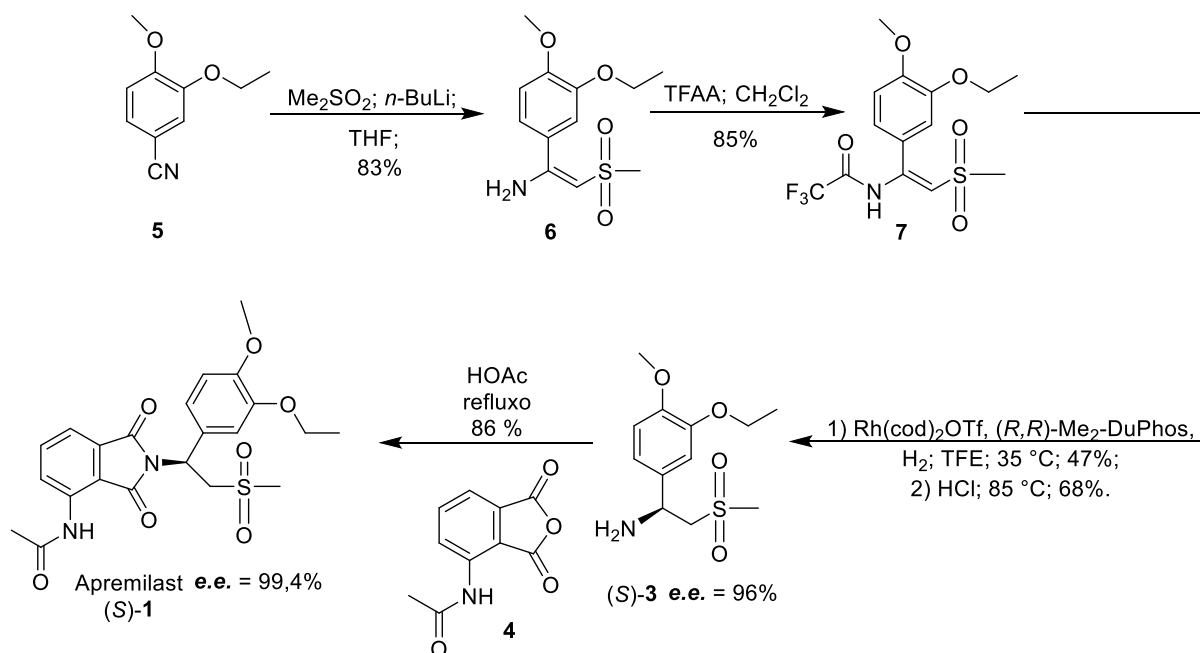
Uma das estratégias convencionais utilizadas foi a resolução cinética usando derivados de aminoácidos como agente de resolução (MAN, *et al.*, 2009) (LAHOTI, *et al.*, 2017). No **Esquema 1** é representada uma das rotas sintéticas propostas para introduzir a quiralidade em um intermediário do apremilast, usando o derivado de aminoácido *N*-acetil-*L*-leucina. Neste caso, o 3-etóxi-4-metoxibenzaldeído (**2**) foi tratado com *bis*(trimetilsilil)amido lítio (LiHMDS) e dietileterato de trifluoreto de boro (BF<sub>3</sub>Et<sub>2</sub>O), seguido da adição de dimetilsulfona (Me<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>), *n*-butil-lítio (*n*-BuLi), a -78 °C, obtendo o 1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonyl)etanamina (*rac*-**3**) com 41% de rendimento. Em seguida, **3** foi tratado com *N*-acetil-*L*-leucina em metanol, com formação do (*S*)-1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonyl)etanamina [(*S*)-**3**], com rendimento de 44% e excesso enantiomérico (*e.e.*) de 98%. A reação entre (*S*)-**3** e a *N*-(1,3-diidro-1,3-dioxoisindolin-4-il)acetamida (**4**), em meio ácido e sob refluxo, levou ao fármaco apremilast (*S*)-**1** com 75% de rendimento (MAN, *et al.*, 2009).

**Esquema 1.** Síntese do apremilast usando resolução cinética na presença da *N*-acetil-*L*-leucina.



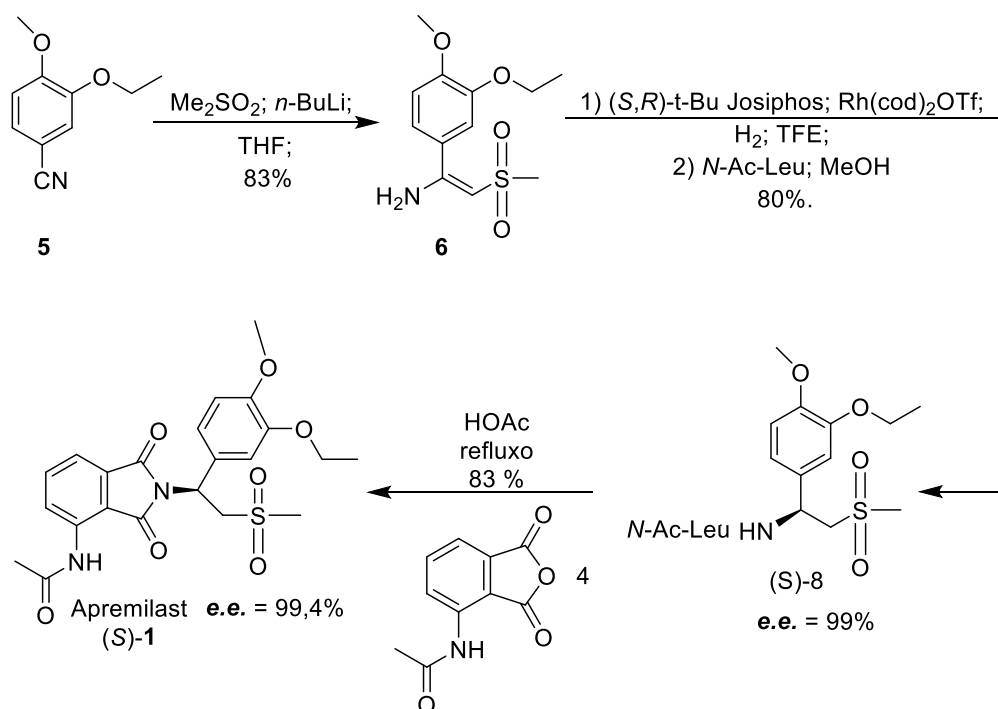
Outra estratégias para introduzir a quiralidade na molécula alvo utilizaram ligantes quirais a base de ferro (GAJ, 2016), catalisadores quirais a base de rutênio (CHEN, *et al.*, 2015) (CONNOLLY, LEONG e RUCHELMAN, 2015) e ródio (CONNOLLY, *et al.*, 2014). Um exemplo do uso de catalisador quiral de ródio é representado no **Esquema 2**, em uma rota sintética proposta por Ruchelman e Connolly (2015), a qual consiste na síntese da (*E*)-1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonyl)etanamina (**6**) com 83% de rendimento, através da reação da 3-etóxi-4-metoxibenzonitrila (**5**) com dimetilsulfona ( $\text{Me}_2\text{SO}_2$ ) e *n*-butil-lítio (*n*-BuLi) em tetraidrofurano (THF). Em seguida, **6** reagiu com anidrido trifluoroacético (TFAA) em diclorometano, para obtenção da *N*-(*E*)-1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonyl)vinil-2,2,2-trifluoroacetamida (**7**) com 85% de rendimento. Posteriormente, **7** foi submetido à hidrogenação assimétrica na presença do auxiliar quiral 1,2-bis-[(2*R*,5*R*)-2,5-dimetilfosfolano]benzeno [(*R,R*)- $\text{Me}_2\text{-DuPhos}$ ] e do catalisador trifluorometanosulfonato de *bis*(1,5-ciclooctadieno)ródio(I) ( $\text{Rh}(\text{cod})_2\text{OTf}$ ) em 2,2,2-trifluoroetanol (TFE), com a obtenção do produto intermediário com 47% de rendimento, o qual posteriormente, foi tratado com uma solução de ácido clorídrico (6 M), para a obtenção da amina (*S*)-**3** com rendimento de 68% e *e.e.* = 96%. Finalmente, (*S*)-**3** reagiu com o anidrido **4** em meio ácido, sob refluxo, levando a formação do apremilast (*S*)-**1** com 86% de rendimento (CONNOLLY, LEONG e RUCHELMAN, 2015).

**Esquema 2.** Síntese do apremilast usando um catalisador quiral de ródio.



Ruchelman e Connolly (2015), realizaram outro procedimento para a síntese do referido fármaco descrito representado no **Esquema 3**, o qual consiste na hidrogenação assimétrica de **6** (obtido anteriormente através da benzonitrila **5**), empregando o auxiliar quiral  $(S)$ -1-[( $R$ )-2-(difenilfosfino)ferrocenil]etil-di-*tert*-butilfosfina [( $S,R$ )-*t*-Bu Josiphos] e do catalisador  $\text{Rh}(\text{cod})_2\text{OTf}$  em TFE, seguido de tratamento com *N*-Acetil-L-leucina em metanol, para a obtenção de um sal de *N*-acetil leucina da  $(S)$ -1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etanamina [( $S$ )-**8**], com 80% de rendimento e  $e.e. > 99\%$ . Por último, o  $(S)$ -**8** reagiu com o anidrido **4**, em meio ácido e sob refluxo, levando à formação do apremilast  $(S)$ -**1** com 83% de rendimento e  $e.e. > 99\%$  (CONNOLLY, LEONG e RUCHELMAN, 2015).

**Esquema 3.** Síntese do apremilast usando auxiliar quiral de ferro e um catalisador de ródio.



#### 1.4.2 Estratégias alternativas

A biocatálise surgiu como uma das mais promissoras alternativas para solucionar algumas desvantagens causadas pelo uso dos auxiliares e catalisadores quirais, tais como a disponibilidade limitada, alto custo, toxicidade e elevados tempos de degradação no meio ambiente.

Os biocatalisadores possuem características atraentes no contexto da Química Verde e do desenvolvimento sustentável (PATEL, 2018); já que possuem benefícios em relação à síntese química convencional na produção de intermediários farmacêuticos. As reações realizadas na presença de biocatalisadores são executadas em condições brandas e podem encurtar a rota sintética. Além disso, evita-se o uso de reagentes tóxicos, gerando menos subprodutos e resíduos, possibilitando a obtenção de altos rendimentos com excelentes quimio-, regio- e enantiosseletividade (RIVA e FESSNER, 2014) (SUN, *et al.*, 2018). Desta forma, os biocatalisadores permitem contornar dificuldades em algumas etapas sintéticas, as quais muitas vezes, exigem processos de proteção e desproteção (POLLARD e WOODLEY, 2007).

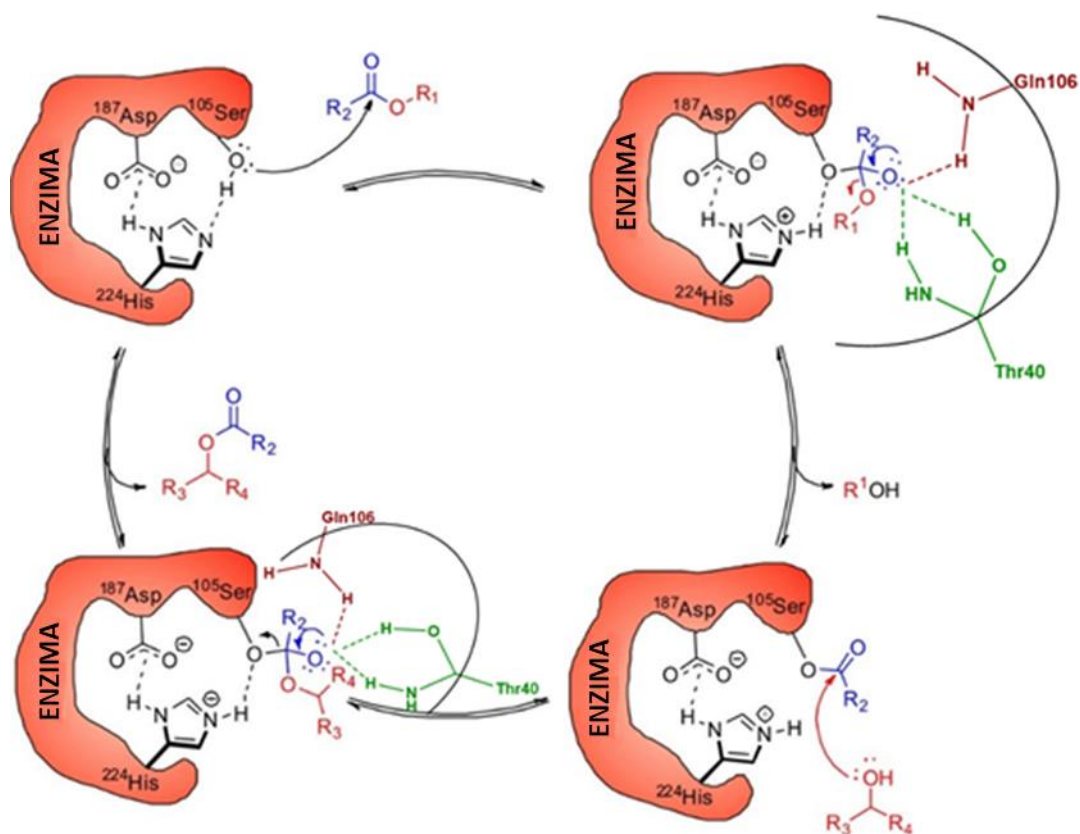
Dentre os biocatalisadores mais utilizados para a obtenção de compostos enantiopuros, estão as lipases e as cetorredutases.

### 1.4.2.1 Lipases

As lipases (glicerol éster hidrolase EC 3.1.1.3) aparecem como um dos biocatalisadores mais utilizados em vários campos industriais, como nas indústrias alimentícia, têxtil, de celulose e papel, cosmética e farmacêutica, por serem altamente disponíveis e com alta seletividade e especificidade (BARBOSA, SANTOS, *et al.*, 2019). São consideradas enzimas versáteis, principalmente devido ao uso de condições de reação moderadas e pela capacidade de atuar em uma ampla gama de substratos. Além de apresentarem alta estabilidade em temperaturas e pH extremos. As lipases são frequentemente utilizadas nas sínteses de vários fármacos, tanto em meio aquoso, como em solvente orgânico e não necessitam de nenhum cofator para sua ação catalítica. Geralmente, as lipases catalisam a hidrólise de um éster na interfase entre um substrato insolúvel e o meio aquoso (CARVALHO, *et al.*, 2015) (ANGAJALA, PAVAN e SUBASHINI, 2016).

O mecanismo catalítico das lipases ocorre no sítio ativo formado pelos resíduos de aminoácidos serina (Ser), histidina (His) e ácido aspártico (na forma de aspártato) (Asp) ou ácido glutâmico (na forma de glutamato) (Glu). Inicialmente, o Asp forma uma ligação de hidrogênio com His, aumentando o pKa do nitrogênio da histidina. Isso permite que a His forme uma ligação de hidrogênio efetiva com a Ser. Essa ativação permite que a hidroxila da Ser realize um ataque nucleofílico ao grupo carboxílico do éster, formando um intermediário tetraédrico, o qual é estabilizado pela cavidade oxianiónica *via* ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos glutamina (Gln) e treonina (Thr). Com a expulsão de uma molécula de R<sub>1</sub>OH, é formado o complexo acil-enzima que sofre um ataque nucleofílico de uma molécula de água, no caso de uma hidrólise enzimática, ou de uma molécula de um álcool, no caso de uma transesterificação enzimática, formando um segundo intermediário tetraédrico, o qual colapsa para formação do produto, regenerando a enzima (BANDEIRA, *et al.*, 2017) (STEFANUCCI, *et al.*, 2019) (**Figura 3**).

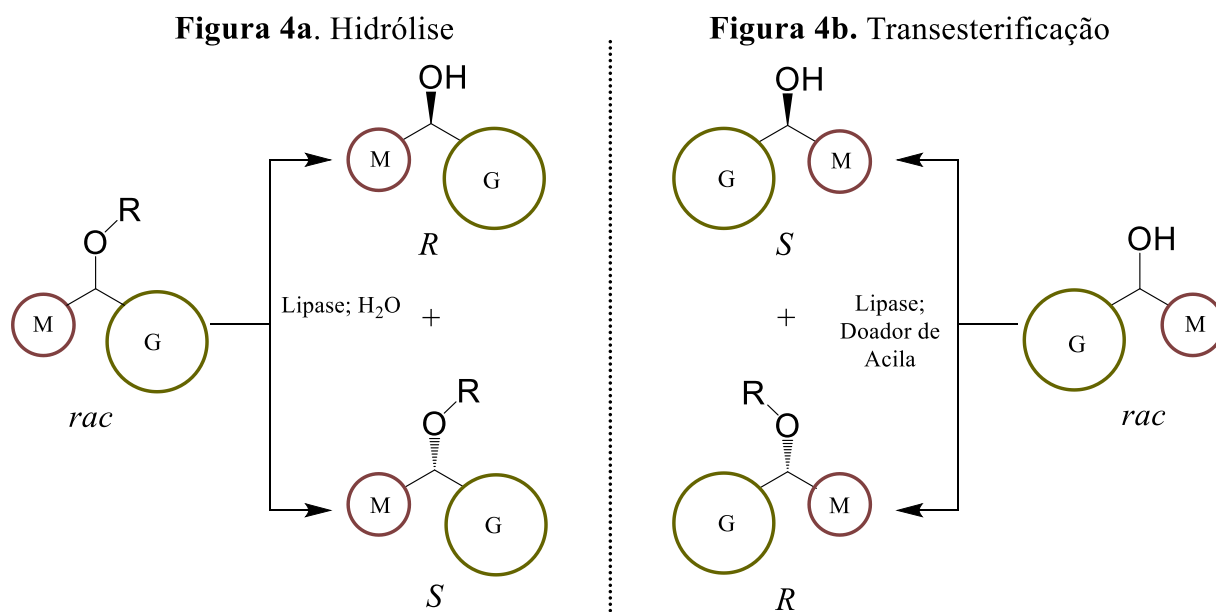
**Figura 3.** Mecanismo de reação de transesterificação mediada por lipase.



Fonte: Bandeira, Thomas *et al.* (2017, com adaptações)

Existe uma regra empírica que consegue prever qual enantiômero de um álcool secundário racêmico, ou do correspondente éster, reagirá mais rapidamente em uma resolução cinética (RC), catalisada por uma lipase. Esta última é conhecida como regra de Kazlauskas e prevê que o enantiômero que reage mais rapidamente na acilação de álcoois racêmicos secundários é o de configuração (*R*). O modelo é representado na **Figura 4b** e classifica os substituintes do centro estereogênico do substrato em mais volumoso (G) e menos volumoso (M). Neste caso, se o grupo de maior tamanho (G) tiver prioridade em relação ao substituinte menos volumoso (M), o (*R*)-álcool reagirá mais rápido para produzir o (*R*)-éster correspondente. A mesma enantiopreferência é observada para a hidrólise de ésteres, **Figura 4a**, neste caso o (*R*)-álcool (produto) será obtido mais rapidamente que o (*S*)-enantiômero (GOTOR FERNÁNDEZ, BRIEVA e GOTOR, 2006).

**Figura 4.** Resolução cinética de ésteres e álcoois secundários *via* reação de hidrólise (4a) e de transesterificação (4b) na presença de lipases, de acordo com a regra de Kazlauskas.



Fonte: Gotor Fernández, Brieva e Gotor (2006, com adaptações)

#### 1.4.2.2 Cetorredutases

As biorreduções estereosseletivas de cetonas tornaram-se uma alternativa ecológica útil na indústria farmacêutica (PATEL, 2016). As álcoois desidrogenases (ADHs), também conhecidas como cetorredutases (KREDs), pertencem à classe das desidrogenases dependentes da coenzima NAD(P)H para promover a redução de cetonas e aldeídos, ou da coenzima oxidada, NAD(P)<sup>+</sup> para catalisar a oxidação de álcoois primários e secundários.

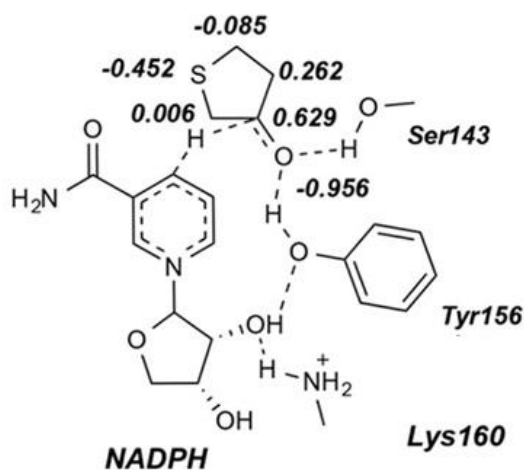
As KREDs estão envolvidas na catálise da redução assimétrica de cetonas nos álcoois quirais correspondentes. Tais enzimas têm sido muito usadas devido a sua alta eficiência catalítica, capacidade de atuar em uma ampla gama de substratos e habilidade em propiciar estereopreferência oposta, algumas produzem apenas o (*R*)-álcool, enquanto que outras produzem apenas o (*S*)-álcool (ROSENTHAL e LÜTZ, 2018). O uso destas enzimas como catalisador é vantajoso em relação aos métodos químicos convencionais para a redução de cetonas pró-quirais, devido à sua alta seletividade e natureza ambientalmente benigna (SEHAJPAL, *et al.*, 2018). Além disso, apresentam eficiência e produtividade tão altas que, para algumas empresas farmacêuticas, se tornaram a primeira opção ao projetar rotas sintéticas que envolvam a obtenção de álcoois quirais (ROSENTHAL e LÜTZ, 2018).

A catálise mediada pela maioria das redutases, ocorre no sítio ativo formado por



três resíduos de aminoácidos, serina-tirosina-lisina (Ser-Tyr- Lys), como ilustrado na **Figura 5**. A carbonila do substrato encontra-se posicionada de modo a interagir por ligação de hidrogênio com o resíduo da Ser143 e a catálise é iniciada pela formação da ligação de hidrogênio da hidroxila da Tyr156 com oxigênio da carbonila do substrato, seguida pela transferência de hidreto proveniente da coenzima NAD(P)H ao carbono da carbonila. A Lys160 participa da catálise ao formar uma ligação de hidrogênio com a hidroxila da ribose do NADPH (OSUNA, *et al.*, 2015) (NASÁRIO, 2017).

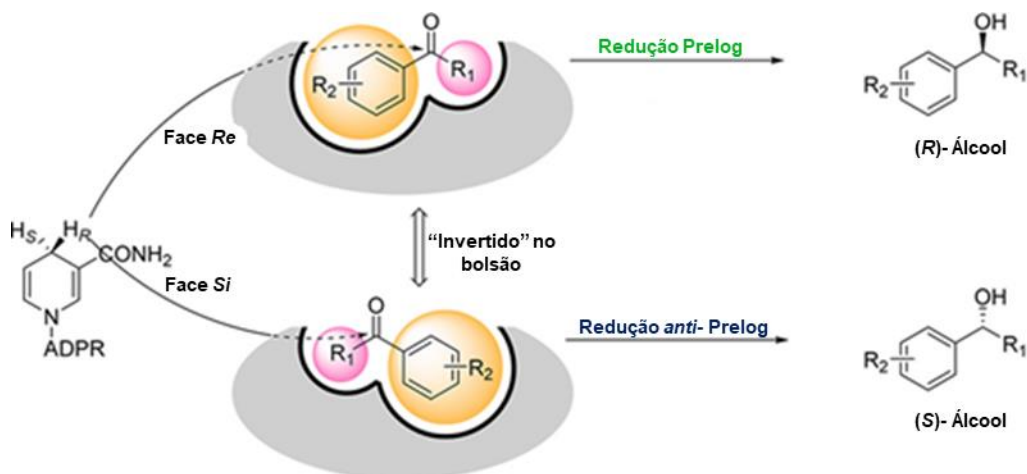
**Figura 5.** Redução da 3-tiaciclopentanona mediada por *Lactobacillus kefir*, uma cetorredutase desenvolvida pela Codexis<sup>®</sup>, para a síntese do antibiótico sulopenem.



Fonte: Osuna, Jiménenez *et al.* (2015, com adaptações)

Durante a redução, as cetorredutases podem adicionar o hidreto proveniente do NAD(P)H preferencialmente pela face *Re* ou pela face *Si* da cetona para fornecer o (*S*)-álcool (tendência Prelog) ou o (*R*)-álcool (tendência *anti*-Prelog), respectivamente (QIN, *et al.*, 2018) (**Figura 6**).

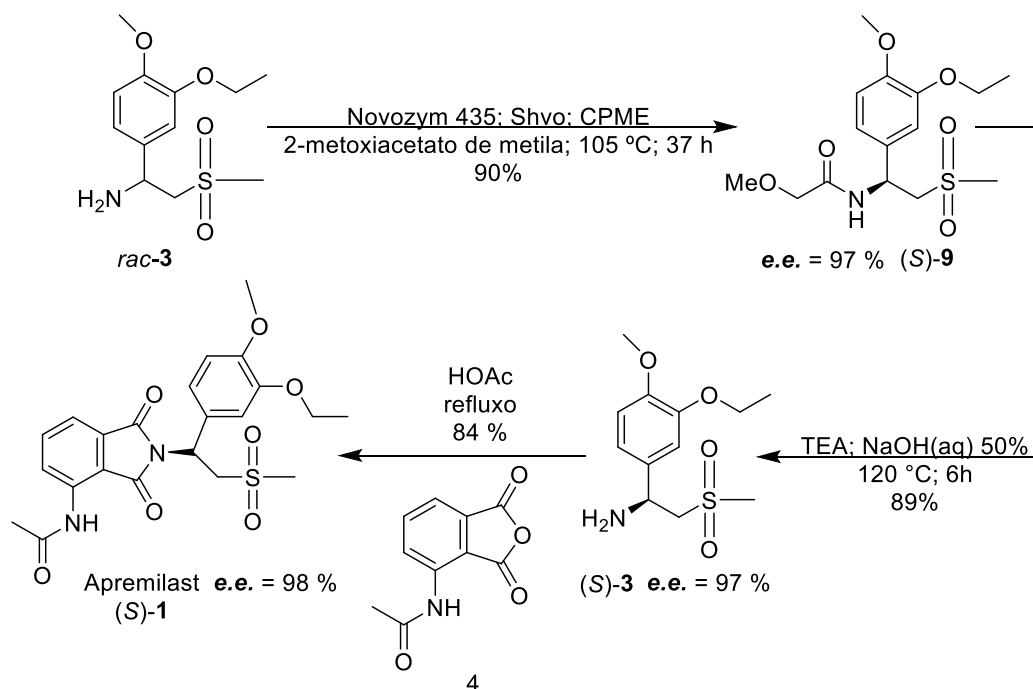
**Figura 6.** Redução assimétrica de cetonas seguindo a regra Prelog ou anti-Prelog.



Fonte: Qun, Bin *et al.* (2018, com adaptações)

Recentemente, foram relatadas duas metodologias biocatalíticas para a síntese do apremilast. Na primeira abordagem, foi realizada uma resolução cinética dinâmica da amina *rac*-**3**, usando a lipase Novozym<sup>®</sup> 435 e para racemização, o catalisador de Shvo, em éter ciclopentilmetílico (CPME) e 2-metoxiacetato de metila, a 105 °C por 37 h, com a obtenção da (*S*)-*N*-(1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)-etil)-2-metoxiacetamida [(*S*)-**9**] com rendimento de 90% e *e.e.* de 97%. Posteriormente, a amida (*S*)-**9** foi tratada com uma solução de hidróxido de sódio 50% e trietanolamina (TEA) para a obtenção da amina (*S*)-**3** com um rendimento de 89% e *e.e.* de 97%. Finalmente, (*S*)-**3** reagiu com o anidrido **4**, em meio ácido e sob refluxo, levando a formação do apremilast (*S*)-**1** com 84% de rendimento e *e.e.* de 97% (DOUBSKY, *et al.*, 2016) (**Esquema 4**).

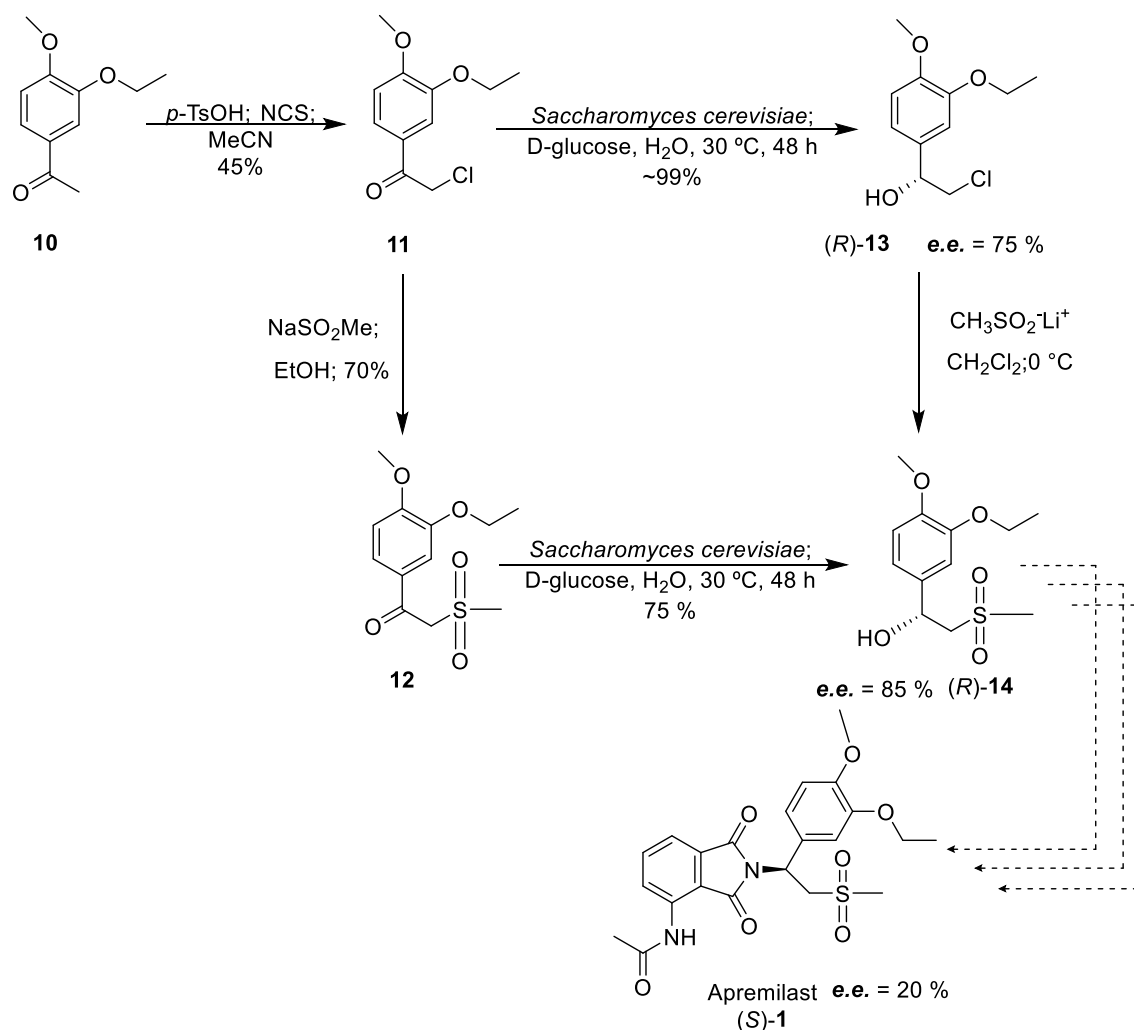
**Esquema 4.** Resolução cinética dinâmica da amina *rac*-**3** usando a lipase Novozym<sup>®</sup> 435 e o catalisador de Shvo.



Na segunda abordagem, sintetizou-se a 2-cloro-1-(3-etóxi-4-metoxifenil)etanona (**11**) a partir do tratamento da 3-etóxi-4-metoxi-acetofenona (**10**) com ácido *p*-toluenosulfônico (*p*-TsOH) e *N*-clorosuccinimida (NCS) em acetonitrila. Posteriormente, realizou-se a biorredução da cetona **11** usando levedura de pão (*Saccharomyces cerevisiae*) e D-glucose, em água, a 30 °C por 48 h, com a obtenção do (*R*)-2-cloro-1-(3-etoxi-4-metoxifenil) etanol [(*R*)-**13**] com conversão de, aproximadamente, 99% e *e.e.* de 75 % (GAZIC e STAVBER, 2017) (**Esquema 5**).

Outra alternativa proposta pelos mesmos autores consistiu na biorredução da 1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonyl)etanona (**12**), obtida entre a reação da cetona **11** com metanosulfonato de sódio em etanol, sob refluxo. A biorredução foi realizada na presença de levedura de pão (*Saccharomyces cerevisiae*) e D-glucose, em água, a 30 °C por 48 h, com a obtenção do (*R*)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonyl)etanol [(*R*)-**14**] com conversão de 75% e um *e.e.* de 85 % (GAZIC e STAVBER, 2017) (**Esquema 5**).

**Esquema 5.** Biorredução da cetona **11** e **12** usando *Saccharomyces cerevisiae*.

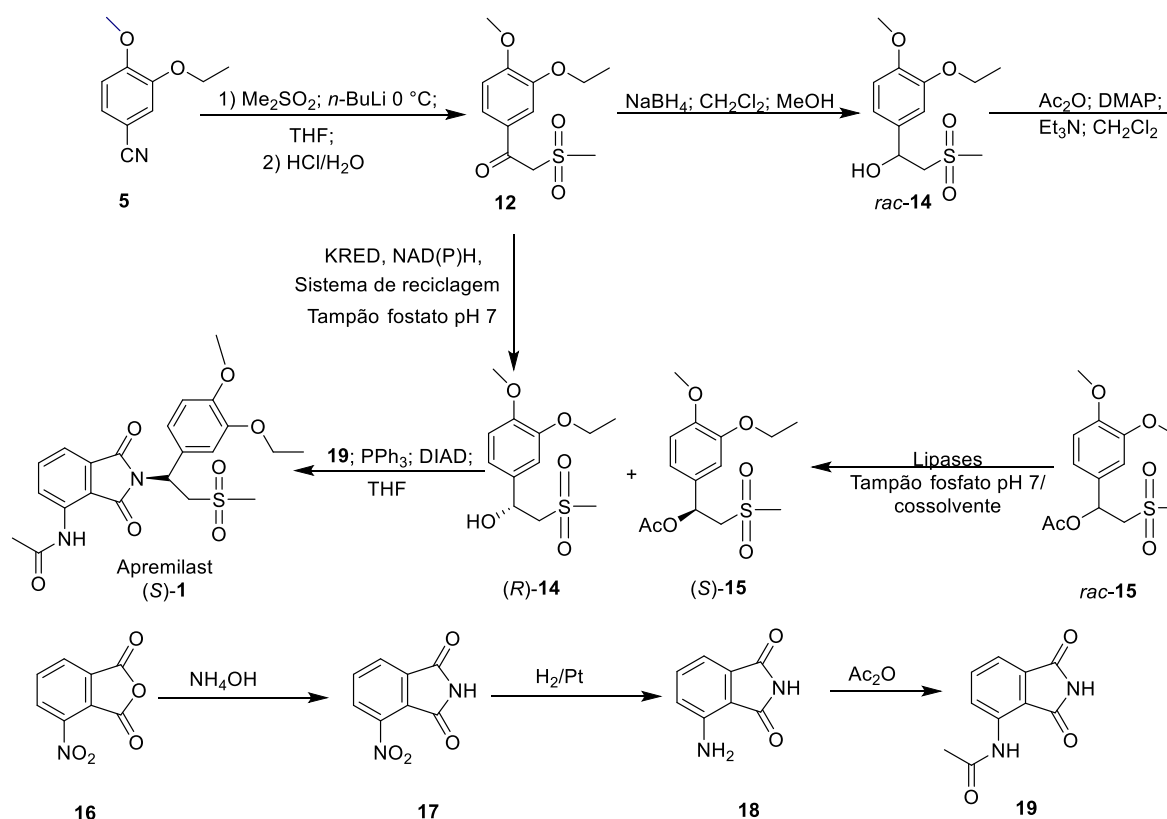


Em ambas as abordagens, apesar dos autores terem feito uso de processos biocatalíticos, observou-se que as condições reacionais envolviam elevadas temperaturas (105 e 120 °C na 1ª abordagem), tempos reacionais extensos (37 h na 1ª abordagem e 48 h na 2ª abordagem), uso de reagentes de alto custo (catalisador de Shvo na 1ª abordagem), além da obtenção de baixos valores de excesso enantiomérico dos intermediários (75 e 85% na 2ª abordagem).

Neste contexto, propusemos desenvolver processos biocatalíticos, para a obtenção de um intermediário quiral na síntese do fármaco apremilast, o álcool secundário **(R)-14**, por duas metodologias enzimáticas, uma, empregando lipases e outra, usando cetorredutases (KREDs).

A proposta poderá ser mais bem compreendida com uma descrição detalhada, em consonância com o **Esquema 6**.

**Esquema 6.** Síntese quimioenzimática do fármaco apremilast usando lipases e cetorredutases.



Inicialmente, a cetona **12** será sintetizada a partir da reação da 3-etóxi-4-metoxibenzonitrila (**5**) com dimetilsulfona ( $\text{Me}_2\text{SO}_2$ ) na presença de *n*-butil-lítio (*n*-BuLi), seguido de hidrólise em meio ácido. Posteriormente, a cetona **12** será reduzida com  $\text{NaBH}_4$ , para a obtenção do álcool 1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etanol (**rac-14**). Subsequentemente, o álcool **rac-14** será acetilado na presença de  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{DMAP}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , com a obtenção do acetato de 1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etila (**rac-15**). Uma vez sintetizada a cetona **12** e o éster **rac-15**, será realizada uma triagem com cetorredutases (adquiridas da Codexis<sup>®</sup>), para a biorredução da cetona **12**, e lipases comerciais livres e imobilizadas, para a hidrólise do éster **rac-15**, até encontrar enzimas que proporcionem a obtenção do intermediário quiral **(R)-14** com o maior valor de excesso enantiomérico possível. Tanto a reação de hidrólise como a biorredução serão otimizadas, avaliando parâmetros como cossolvente, temperatura, razão enzima:substrato (massa/massa) e proporção tampão:cossolvente (volume/volume).

Posteriormente, será sintetizada a 4-nitro-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (**17**) a partir do aquecimento do anidrido 3-nitroftálico (**16**), com hidróxido de amônio. Em seguida, será realizada a hidrogenação do grupo nitro usando  $\text{Pt}/\text{C}$  (10%  $\text{Pt}/\text{C}$ ) como catalisador para

obtenção do 4-aminoisindolina-1,3-diona (**18**). Esta última será acetilada para obtenção da 4-acetilamino-isindol-1,3-diona (**19**).

Finalmente, o álcool (*R*)-**14** será tratado com trifetilfosina (PPh<sub>3</sub>), azodicarboxilato de diisopropila (DIAD) e a ftalimida **19**, em THF, para a obtenção do fármaco apremilast [(*S*)-*N*-2-[1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisindolina-1,3-diona].

Nesse sentido, fica demonstrado que a presente proposta oferece uma alternativa exequível e promissora para a síntese do fármaco apremilast, capaz de superar problemas associados à síntese orgânica convencional, que incluem a eco incompatibilidade dos catalisadores químicos quirais a base de metais. Portanto, a referida proposta apresenta-se bastante atraente do ponto de vista econômico e ambiental.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Realizar a síntese quimioenzimática do fármaco apremilast utilizando as enzimas lipases e cetorredutases.

### 2.2 Objetivos específicos

- Investigar a resolução cinética enzimática do éster *rac*-**15**, *via* reação de hidrólise catalisada por lipases;
- Investigar a redução assimétrica da cetona **12**, *via* biorredução enzimática catalisada por cetorredutases;
- Otimizar as condições reacionais da reação enzimática através das variações do tempo reacional, temperatura, meio reacional e proporção biocatalisador/substrato (massa/massa), visando o alto excesso enantiomérico;
- Desenvolver uma rota de síntese do apremilast em condições de reação brandas que permita a obtenção do referido fármaco em alto rendimento e excesso enantiomérico.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Obtenção do 1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etanol (*rac*-14)

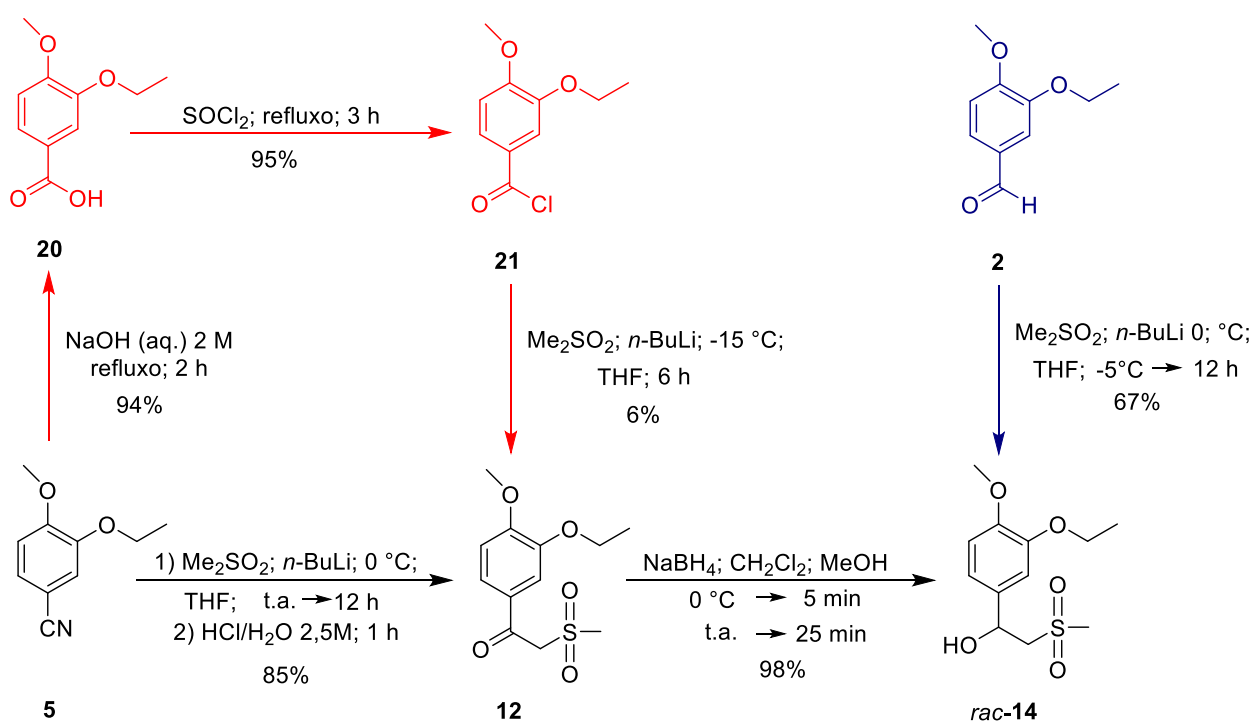
O álcool *rac*-14 é um dos intermediários chave na síntese do apremilast mediada por lipases. Desta forma foram avaliadas três rotas sintéticas, ilustradas no **Esquema 7**.

**Esquema 7.** Rotas sintéticas para a obtenção do álcool *rac*-14.

■ **Rota sintética 1**

■ **Rota sintética 2**

■ **Rota sintética 3**

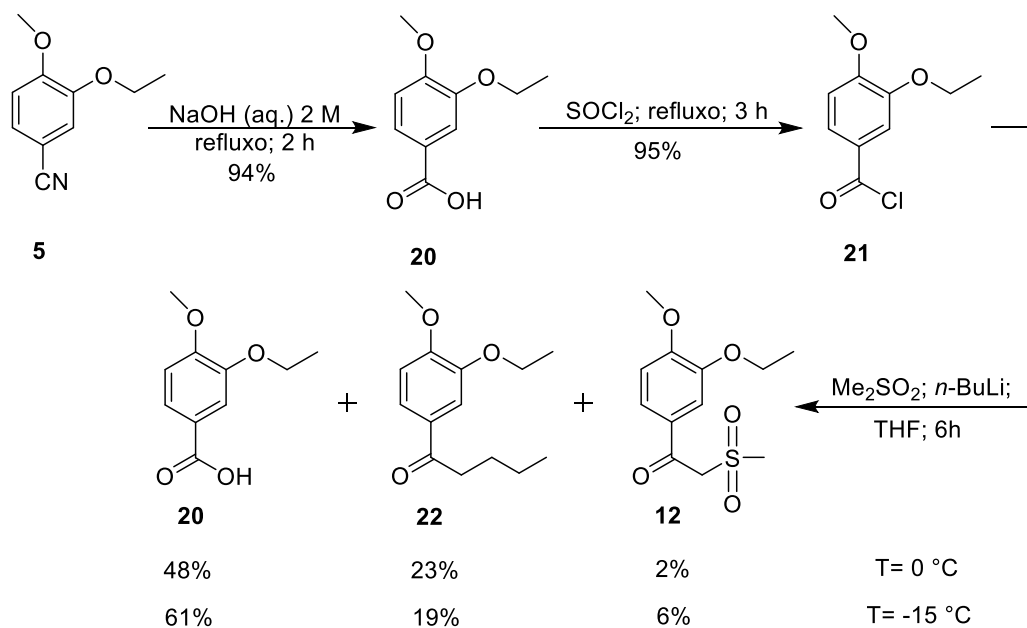


A **rota sintética 1** consistiu na formação do ácido 3-etóxi-4-metoxibenzoico (**20**) via hidrólise básica da 3-etóxi-4-metoxibenzonitrila (**5**). Após 2 h de reação, o pH do sistema reacional foi ajustado a 4 com uma solução de HCl 1 M e o ácido **20** foi obtido com 94% de rendimento. Em seguida, o ácido **20** foi submetido a uma reação com cloreto de tionila (SOCl<sub>2</sub>) sob refluxo, para a obtenção do cloreto de 3-etóxi-4-metoxibenzoila (**21**) com 95% de rendimento. Posteriormente, adicionou-se uma solução do cloreto de ácido **21**, em THF anidro, a 0 °C, ao carbânion da dimetilsulfona (formado entre a dimetilsulfona e *n*-butil-lítio, em THF anidro) utilizando a razão molar substrato/dimetilsulfona/*n*-BuLi de 1:2:1,3. Após o tratamento do meio reacional com água, a cetona **12** foi obtida com um rendimento de apenas 2% e o



produto majoritário foi o ácido carboxílico **20** com rendimento de 48%, seguido da formação do subproduto 1-(4-etóxi-3-metoxifenil)pentan-1-ona (**22**), com rendimento de 23% (**Anexo 7.9, p. 77**)(**Esquema 8, Tabela 1, entrada 1**).

**Esquema 8.** Rota sintética para obtenção da cetona **12** *via* hidrólise básica da nitrila **5**.



**Tabela 1.** Valores de rendimento (%) dos produtos obtidos entre o cloreto de ácido **21** e o carbânion da dimetilsulfona, após variação da temperatura e a proporção substrato/*n*-butil-lítio

Entrada	Proporção substrato/dimetilsulfona/ <i>n</i> -BuLi	T (°C)	Resultados	
			Produto	Rendimento (%)
1	1:2:1,3	0	22	23
			20	48
			12	2
2	1:2:0,9	-15	22	19
			20	61
			12	6

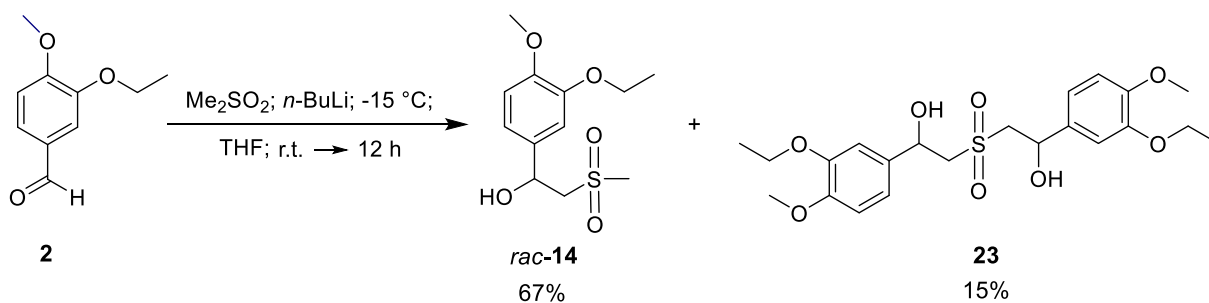
Com a finalidade de aumentar o rendimento da cetona **12**, variou-se a temperatura (passando de 0 °C para -15 °C) e a proporção substrato/*n*-butil-lítio (passando de 1:1,3 para 1:0,9). Tais alterações foram realizadas pois verificou-se que a adição de excesso de *n*-BuLi em relação ao substrato **21** propiciou a formação da cetona **22**, assim, com a diminuição da temperatura reacional esperava-se uma reação mais lenta e mais seletiva para a formação do

produto desejado. Sob estas condições, observou-se um ligeiro aumento no rendimento da cetona desejada **12** (6%), porém o produto majoritário continuou sendo o ácido **20** com 61% de rendimento, seguido da obtenção da cetona **22** com 19% (Tabela 1, entrada 2).

Devido às dificuldades encontradas na obtenção do álcool *rac*-**14**, via **rota sintética 1**, optou-se por realizar a **rota sintética 2**. Neste caso, seguiu-se o protocolo relatado por Zhang *et al.* (Esquema 9, **rota sintética 2**), o qual consistiu na reação entre o 3-etoxi-4-metoxibenzaldeído **2** e o (metilsulfonil)metanídeo (formado entre a dimetilsulfona e *n*-butil-lítio) em tolueno anidro, utilizando a razão molar substrato/dimetilsulfona/*n*-butil-lítio de 1:1,6:0,6, respectivamente. O 3-etoxi-4-metoxibenzaldeído **2** foi adicionado ao (metilsulfonil)metanídeo a -5 °C e o sistema reacional foi agitado por 1h. Após este tempo, foi permitido que o sistema reacional atingisse a temperatura ambiente, sendo mantido sob agitação por 12 h. Os autores relataram que após 12 h de reação, o álcool *rac*-**14** foi obtido com 65% de rendimento (JINGXIA e LIANTAO, 2018). Cabe ressaltar que foi observado uma baixa solubilidade da dimetilsulfona em tolueno e ao final de 12 h o álcool *rac*-**14** foi obtido com apenas 21% de rendimento, além de apresentar a formação do subproduto identificado como 2,2'-sulfonilbis(1-(3-etoxi-4-metoxifenil) etan-1-ol (**23**) com 18% de rendimento.

Em outro experimento, verificou-se que a dimetilsulfona foi mais solúvel em THF do que em tolueno. Portanto, decidiu-se utilizar THF em detrimento ao uso de tolueno, bem como diminuir a temperatura do sistema reacional para -15 °C. Nestas condições, a formação do (metilsulfonil)metanídeo foi favorecida, e após 12 h de reação foi possível obter o álcool *rac*-**14** com 67% de rendimento, além do dímero **23** como subproduto, com 15% de rendimento (Esquema 9).

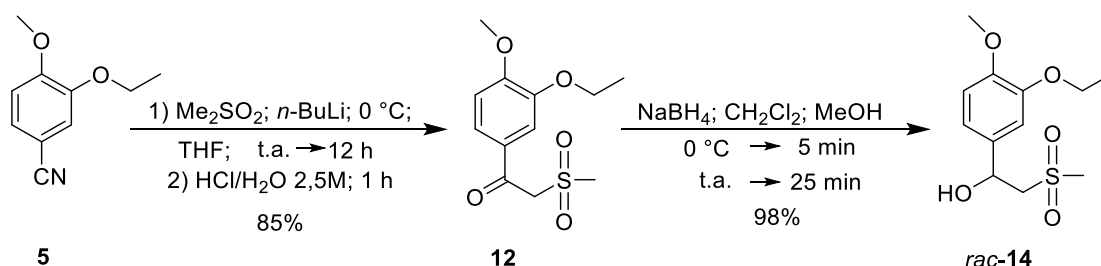
**Esquema 9.** Obtenção do álcool *rac*-**14** a partir do aldeído **2** (**rota sintética 2**).



É importante destacar que tanto o álcool *rac*-**14** como o dímero **23** apresentaram o mesmo fator de retenção em eluentes binários. Portanto, só foi possível isolá-los usando uma mistura ternária de isopropanol/clorofórmio/hexano (0,1:4,9:5), porém com fator de retenção próximos. A purificação das duas substâncias somente foi efetiva após derivatização *via* reação de acetilação, obtendo o diacetato de sulfonilbis[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)etano-2,1-diila] (**Anexo 7.10, p. 78**).

Diante da dificuldade no processo de purificação de *rac*-**14** obtido *via* **rota sintética 2**, optou-se por executar a **rota sintética 3** (**Esquema 7**), a qual consistiu na síntese da 1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonyl)etanona (**12**) usando a metodologia proposta por Connolly *et al.* (2013). Neste protocolo, a benzonitrila **5** reagiu com o carbânion da dimetilsulfona, em THF anidro, para formar a enamina (*E*)-1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonyl)etanamina, a qual não foi isolada do sistema reacional. A reação seguiu *one-pot* com a hidrólise ácida da referida enamina, para a obtenção da cetona **12** com 85% de rendimento global (CONNOLLY, *et al.*, 2013). Posteriormente, a cetona **12** foi reduzida com NaBH<sub>4</sub>, com a obtenção de um sólido branco identificado como 1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonyl)etanol (*rac*-**14**), com rendimento de 98% (**Esquema 10**). Devido aos altos valores de rendimento e facilidade na purificação de ambas as substâncias, a cetona **12** e o álcool *rac*-**14**, a **rota sintética 3** foi escolhida para síntese quimioenzimática do apremilast. Além do mais, esta rota permite a obtenção da cetona **12**, um intermediário necessário para a abordagem que faz uso das KREDs para obtenção do álcool (*R*)-**14** (**Esquema 6**).

**Esquema 10.** Obtenção do álcool *rac*-**14** a partir da nitrila **5** (**rota sintética 3**).

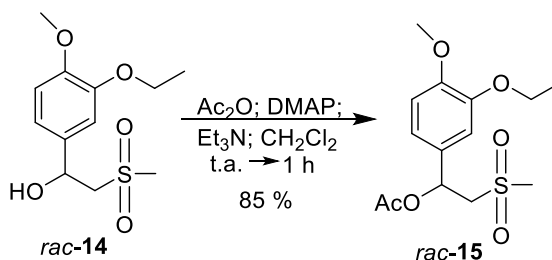


### 3.2 Obtenção do acetato de 1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonyl)etila (*rac*-**15**)

A obtenção do éster *rac*-**15** é crucial para a realização da etapa de resolução cinética, *via* reação de hidrólise, catalisada por lipases (**Esquema 6**). Portanto, o álcool *rac*-**14** foi

submetido a uma reação convencional de acetilação na presença de  $\text{Ac}_2\text{O}$ , DMAP,  $\text{Et}_3\text{N}$  em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , em um tempo reacional de 1 h, à temperatura ambiente. Nestas condições, o acetato de 1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etila (*rac*-15) foi obtido com 85% de rendimento (Esquema 11).

**Esquema 11.** Reação de acetilação do álcool *rac*-15.



### 3.3 Obtenção do (*R*)-1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etanol (*R*)-14, via resolução cinética do éster *rac*-15 na presença de lipases

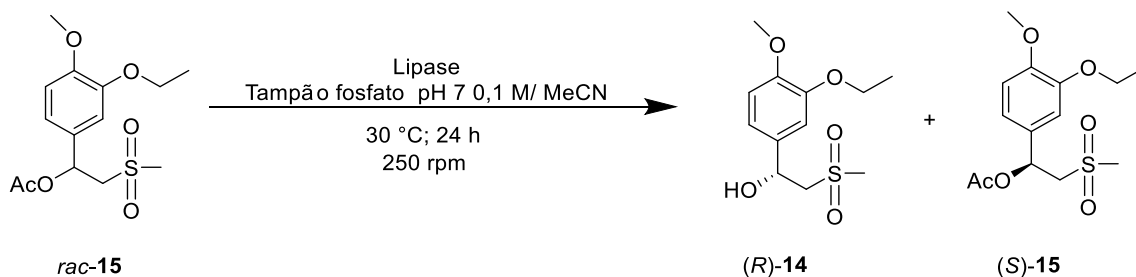
Uma vez sintetizados o álcool *rac*-14 e o seu correspondente éster *rac*-15, desenvolveu-se um método de separação e análise dos respectivos enantiômeros de ambos os racematos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Testaram-se várias colunas quirais (AS-H, CB-H, IA, OB-H e OD-H) e analisaram-se diferentes parâmetros, incluindo: temperatura da coluna, fluxo e proporção dos eluentes. Após estabelecidas as condições de análise (item 4.1.4, p. 52), realizou-se uma triagem com 15 lipases comerciais [Amano lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em imobead 150, Amano lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em imobead 150 sol gel AK em pumice, Amano lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em sol gel AK, Lipozyme RM IM, Amano lipase PS-IM imobilizada em terra diatomácea, lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em imobead 150, lipase de *Candida antarctica* do tipo B imobilizada em resina acrílica (Novozym<sup>®</sup> 435), lipase de *Candida rugosa*, Amano lipase *Burkholderia cepacia* (anteriormente *Pseudomonas cepacia*), lipase de *Rhizopus niveus*, Amano lipase G de *Penicillium camemberti*, Amano lipase M de *Mucor javanicus*, lipase de *Aspergillus niger*, lipase de pâncreas de porco (PPL) e Amano lipase de *Pseudomonas fluorescens*] na resolução cinética de *rac*-15, via reação de hidrólise. As reações de hidrólise do éster *rac*-15 foram realizadas em condições previamente estabelecidas em nosso grupo de pesquisa, para a resolução cinética de racematos (SILVA, *et al.*, 2014), utilizando: tampão fosfato 0,1M (pH 7),

20% de MeCN como cossolvente, a 30 °C por 24 h a 250 rpm (**Esquema 12**).

Os produtos obtidos foram analisados por CLAE, utilizando as condições descritas no **item 4.1.4**. Os excessos enantioméricos (*e.e.*), conversão (*c*) e enantiosseletividade (*E*) foram calculados através da obtenção das áreas dos cromatogramas, aplicando as equações relatadas no anexo **7.1, p. 65**.

Após as análises, verificou-se que apenas a lipase de *Aspergillus niger* foi ativa, proporcionando uma conversão de 51%, após 24 h de reação, excesso enantiomérico do álcool (*R*)-**14** de 93% e do acetato remanescente (*S*)-**15** de 98% com enantiosseletividade de 126,85. Os cromatogramas obtidos por CLAE referentes a *rac*-**14** e *rac*-**15**, bem como do produto (*R*)-**14** e do substrato remanescente (*S*)-**15**, encontram-se nos anexos **7.11 e 7.14, p. 80- 81**, respectivamente.

**Esquema 12.** Triagem de lipases na resolução cinética do éster *rac*-**15**.



A resolução cinética de *rac*-**15** obedeceu a regra empírica de Kazlauskas (KAZLAUSKAS, *et al.*, 1991), levando ao álcool (*R*)-**14**. A configuração foi estabelecida por comparação pelo método da polarimetria, com obtenção da seguinte rotação óptica específica: (*R*)-**14** =  $[\alpha]_D^{20} = -27^\circ$  (*c* = 0.65, AcOEt), com *e.e.* de 93%, enquanto que o valor descrito na literatura é:  $[\alpha]_D^{25} = -23,19^\circ$  (*c* = 0.42, AcOEt) (QIANG e SHENGYIN, 2016).

### 3.3.1 Efeito do cossolvente na resolução cinética do acetato de 1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonyl)etila (*rac*-**15**) utilizando lipase de *Aspergillus niger*

Inicialmente, a resolução de *rac*-**15** foi realizada sob condições pré-estabelecidas pelo nosso grupo de pesquisa, a qual incluiu o uso de uma solução tampão (80%) e uma pequena quantidade de um cossolvente orgânico, neste caso acetonitrila (20%). Nestas condições, foi possível obter o álcool (*R*)-**14** com alto valor de excesso enantiomérico (93%). Porém, ainda não estava claro a influência da acetonitrila como cossolvente na resolução cinética de *rac*-**15**.

Com o objetivo de racionalizar a influência do cossolvente na resolução cinética de *rac-15*, catalisada pela lipase de *Aspergillus niger*, decidimos avaliar a reação de hidrólise na ausência de cossolvente (tampão fosfato 0,1M (pH 7) a 30 °C e 250 rpm), e na presença de cossolventes como 1,4-dioxano, isopropanol, THF, *n*-butanol e *terc*-butilmetileter (TBME). Os resultados encontram-se sumariados na **Tabela 2**. As reações de resolução cinética do éster *rac-15*, foram acompanhadas até a conversão atingir um valor próximo de 50%.

**Tabela 2.** Efeito do cossolvente na resolução cinética do acetato *rac-15*, via hidrólise, catalisada por lipase de *Aspergillus niger*

Entrada	Cossolvente	log <i>P</i>	$\epsilon$	Tempo (h)	<i>e.e.</i> <sub>s</sub> (%) <sup>a</sup>	<i>e.e.</i> <sub>p</sub> (%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>
1	Nenhum	-	85	13	44	42	51	4
2	Acetonitrila	-0,33	38	13	98	93	51	127
3	1,4-Dioxano	-0,27	2,21	24	98	87	51	60
4	Isopropanol	0,05	18,3	9	72	75	49	15
5	THF	0,46	7,6	11	90	91	50	62
6	<i>n</i> -Butanol	0,88	17,6	13	99	96	51	>200
7	TBME	1,06	2,6	13	88	92	49	67

<sup>a</sup> Determinado por CLAE;

<sup>b</sup> Conversão,  $c = e.e._{(s)}/(e.e._{(s)}+e.e._{(p)})$ ;

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

No caso da reação de hidrólise na ausência de cossolvente, observou-se que com 13 h de reação, a conversão atingiu um valor de 51%, porém com *E*= 4, (**tabela 2, entrada 1**). Portanto, em tais condições, a lipase de *Aspergillus niger* catalisa a hidrólise dos dois enantiômeros de *rac-15* com velocidades semelhantes. Desta forma, a enzima é ativa, mas não enantiosseletiva.

Convencionalmente, a água participa direta ou indiretamente nas interações não covalentes, mantendo a conformação da enzima ativa (ZAKS e KLIBANOV, 1985). No entanto, observou-se que a lipase de *Aspergillus niger* no meio aquoso e na ausência de cossolvente não é enantiosseletiva na resolução cinética de *rac-15*. Este comportamento poderia ser atribuído a uma maior flexibilidade da enzima em um microambiente totalmente aquoso, em que as moléculas de água induzem uma mudança conformacional no sítio ativo, aumentando a flexibilidade e conduzindo a um ajuste favorável dos dois enantiômeros de *rac-15* (TSOU, 1998) (RARIY e KLIBANOV, 2009) (BROOS, 2009). Em seguida, analisamos a influência dos cossolventes orgânicos na resolução cinética de *rac-15* catalisada por lipase de *Aspergillus niger*.

O cossolvente orgânico geralmente tem um efeito decisivo nas reações enzimáticas.

Atualmente, não existe uma regra que indique quais são, exatamente, as propriedades físico-químicas de um solvente, responsáveis por produzir uma alteração da atividade e enantiosseletividade enzimática, pois cada biocatalisador possui um comportamento diferenciado. Ainda assim, as propriedades físico-químicas mais estudadas são  $\log P$  ( $P$  é o coeficiente de partição octanol-água) (SALIHU e ALAM, 2015) (FAN, KE, *et al.*, 2017), constante dielétrica (SAKAI, SAKURAI e HIRAYAMA, 2004) e tamanho das moléculas do solvente, expresso através do parâmetro de volume de van der Waals.

Neste sentido, realizou-se uma triagem de cossolventes, com a finalidade de tentar analisar a correlação entre a polaridade do solvente e a enantiosseletividade produzida na resolução cinética de *rac-15*, catalisada pela lipase de *Aspergillus niger*.

A polaridade do solvente pode ser representada pela da medida do coeficiente de partição octanol/água ( $\log P$ ) ou pela constante dielétrica ( $\epsilon$ ). Os testes foram realizados nas seguintes condições: tampão fosfato 0,1M (pH 7), 20% de cossolvente, 30 °C e 250 rpm, **Tabela 2**.

Observou-se que na presença dos cossolventes com  $\log P < 0$  foram obtidos dois valores distintos de enantiosseletividade ( $E$ ). Enquanto em acetonitrila o valor de enantiosseletividade foi alto ( $E = 127$ ), em 1,4-dioxano foi apenas moderado ( $E = 60$ ), (**tabela 2, entradas 2 e 3**). No caso da acetonitrila, a alta enantiosseletividade enzimática poderia ser atribuída à capacidade deste cossolvente em atuar em algum grau de estabilização das cargas da enzima, já que apresenta uma alta constante dielétrica ( $\epsilon = 38$ ), proporcionando uma conformação adequada do sítio catalítico e favorecendo a hidrólise preferencial de um dos enantiômeros de *rac-15*. Cabe ressaltar que este efeito não é observado quando o cossolvente é o 1,4-dioxano, o qual apresenta uma baixa constante dielétrica ( $\epsilon = 2,21$ ), (**tabela 2, entrada 3**).

Entre os cossolventes com  $\log P > 0$  (isopropanol, THF, *n*-butanol e TBME), o único que proporcionou um valor elevado de enantiosseletividade enzimática foi o *n*-butanol ( $E > 200$ ), (**tabela 2, entrada 6**). Aparentemente, o *n*-butanol seria o cossolvente que apresenta um equilíbrio ideal entre os valores de  $\log P$  (**0,88**) e constante dielétrica ( $\epsilon = 17,6$ ) para proporcionar uma alta enantiosseletividade enzimática da lipase de *Aspergillus niger*. O isopropanol apresenta um valor de constante dielétrica ( $\epsilon = 18,3$ ) similar ao do *n*-butanol, mas um valor menor de  $\log P$  (**0,05**). Desta forma, a análise de  $\log P$  e constante dielétrica dos cossolventes avaliados não são suficientes para explicar a alta enantiosseletividade observada na presença de *n*-butanol. Ainda assim, é possível presumir que tanto a acetonitrila, quanto o *n*-butanol modificam o microambiente do sítio catalítico e induzem a uma conformação que resultou em uma alta enantiosseletividade enzimática, com destaque para a ação do *n*-butanol

que levou a uma enantiosseletividade > 200.

### 3.3.2 Efeito da temperatura na atividade e seletividade enzimática

O controle de temperatura na resolução cinética, catalisada por lipase, é aceito como um método confiável e geralmente aplicável, uma vez que a atividade catalítica das enzimas é afetada pela temperatura. Se a temperatura for muito baixa, a taxa de reação será reduzida. No entanto, o uso de uma temperatura extrema terá como resultado a desnaturação irreversível da enzima e a diminuição da atividade enzimática. Portanto, é necessário encontrar uma temperatura na qual as condições de reação sejam ideais em termos de velocidade, sem afetar a atividade e enantiosseletividade da lipase.

Estudou-se o efeito da temperatura no comportamento da lipase de *Aspergillus niger* nas seguintes condições: tampão fosfato 0,1M (pH 7), 20% de *n*-butanol, [enzima/substrato 2:1 (massa/massa)], a 250 rpm, nas temperaturas de 25 °C, 30 °C, 40 °C, 45 °C e 50 °C. Os resultados encontram-se sumariados na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Efeito da temperatura na lipase de *Aspergillus niger* na resolução cinética de *rac*-**15** via hidrólise.

Entrada	Temperatura (° C)	Tempo (h)	<i>e.e.</i> <sub>s</sub> (%) <sup>a</sup>	<i>e.e.</i> <sub>p</sub> (%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>
<b>1</b>	25	24	96	86	53	52
<b>2</b>	30	13	99	96	51	>200
<b>3</b>	40	11	>99	>99	50	>200
<b>4</b>	45	9	>99	>99	50	>200
<b>5</b>	50	7	3	91	3	21

<sup>a</sup> Determinado por CLAE;

<sup>b</sup> Conversão,  $c = e.e._{(s)}/(e.e._{(s)}+e.e._{(p)})$ ;

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

Os resultados apresentados na **Tabela 3** indicam que a 25 °C foram necessárias 24 h para a resolução cinética de *rac*-**15** apresentar um valor de conversão próximo de 50%, porém com uma enantiosseletividade moderada ( $E=52$ ), (**tabela 3, entrada 1**). O aumento da temperatura de 25 °C para 30 °C teve um impacto significativo na atividade e enantiosseletividade da lipase de *Aspergillus niger*, pois a 30 °C foram necessárias apenas 13 h de reação para atingir uma conversão de 51%, com uma alta enantiosseletividade ( $E > 200$ ), (**tabela 3, entrada 2**). Com o aumento da temperatura para 40 °C, a resolução cinética de *rac*-**15** foi realizada de forma ideal em apenas 11 h de reação, levando ao produto álcool (*R*)-**14** e o



acetato remanescente (*S*)-**15** com valores de excesso enantiomérico >99%, 50% de conversão e uma enantiosseletividade >200 (**tabela 3, entrada 3**). Quando se aumentou a temperatura para 45 °C, os valores ideais de excesso enantiomérico, conversão e enantiosseletividade foram mantidos, com a vantagem da diminuição do tempo reacional para 9 h (**tabela 3, entrada 4**). Contudo, observou-se que a 50 °C a enzima desnaturou-se, o que foi evidenciado pela diminuição da atividade (conversão de 3%), com conseqüente diminuição no valor de enantiosseletividade (**E= 21**), (**tabela 3, entrada 5**).

Com respeito à termoestabilidade enzimática, Mahadik *et al.* (2002) e Silva *et al.* (2008) relataram um comportamento semelhante aos obtidos neste trabalho para a lipase de *Aspergillus niger*. Estes autores observaram que a estabilidade e atividade da enzima se mantinham até a uma temperatura de 40 °C (MAHADIK, *et al.*, 2002) (SILVA, CONTESINI e CARVALHO, 2008). Em um estudo mais recente, Pilissão *et al.* (2010) relataram que a lipase de *Aspergillus niger* apresentou valores de  $E > 200$  até 45 °C (PILISSÃO, CARVALHO e NASCIMENTO, 2010).

É sabido que a enantiosseletividade promovida pelas enzimas se origina da diferença de energia entre os estados de transição dos complexos diastereoisoméricos formados entre a interação dos diferentes enantiômeros de um substrato com o sítio ativo da enzima. A relação enantiomérica está relacionada com a diferença de barreira de energia ( $\Delta G_S - \Delta G_R$ ) das duas reações paralelas, **equação 1**.

$$-RT \ln E = \Delta G_R - \Delta G_S \quad (1)$$

Onde,  $\Delta G_R$  e  $\Delta G_S$  corresponde à energia livre de Gibbs do enantiômero *R* e *S* respectivamente.

Neste sentido, tanto a entalpia diferencial como a entropia contribuem para o valor da razão enantiomérica, **equação 2**:

$$-RT \ln E = (\Delta H_R - \Delta H_S) - T(\Delta S_R - \Delta S_S) = \Delta_{R-S} \Delta G^\ddagger \quad (2)$$

Onde,  $\Delta H_R$ ,  $\Delta H_S$ ,  $\Delta S_R$  e  $\Delta S_S$  corresponde à energia entálpica e entrópica dos enantiômeros *R* e *S* respectivamente.

A temperatura na qual não ocorre enantiosseletividade ( $E= 1$  e  $\Delta_{R-S} \Delta G= 0$ ) é conhecida como temperatura racêmica,  $T_r$ . Quando a temperatura experimental for menor do

que a  $T_r$ , a enzima catalisará preferencialmente o enantiômero favorecido pela entalpia, e consequentemente a enantiosseletividade diminuirá com o aumento da temperatura. Por outro lado, quando a temperatura experimental é maior do que a  $T_r$ , a enantiopreferência da enzima é alterada para o enantiômero favorecido pela entropia e a enantiosseletividade aumenta com o aumento da temperatura (OTTOSSON e HÖGSKOLAN, 2001).

Os resultados obtidos na análise do efeito da temperatura na atividade e enantiosseletividade da *Aspergillus niger* indicam que a enantiosseletividade da mesma aumenta com a temperatura, por conseguinte, o enantiômero (*R*)-**15** é favorecido pela entropia. Têm sido relatados numerosos casos em que o aumento da temperatura foi diretamente proporcional ao aumento da enantiosseletividade da enzima (BADGUJAR e BHANAGE, 2014); (ZHANG, *et al.*, 2018); (PANG, *et al.*, 2013); (EMMA, *et al.*, 2003); (MOURE, *et al.*, 2014).

### 3.3.3 Efeito da proporção tampão:cossolvente (v/v)

Com o objetivo de verificar a influência do *n*-butanol na resolução cinética de *rac*-**15**, variou-se a proporção tampão:*n*-butanol (v/v) nas seguintes condições: tampão fosfato 0,1M (pH 7), *n*-butanol, enzima/substrato 2:1, 40 °C a 250 rpm. Os resultados encontram-se sumariados na **Tabela 4**.

**Tabela 4.** Efeito da proporção tampão:cossolvente (v/v) na resolução cinética do *rac*-**15** via hidrólise.

Entrada	Proporção tampão: <i>n</i> -butanol	<i>e.e.s</i> (%) <sup>a</sup>	<i>e.e.p</i> (%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>
<b>1</b>	9:1	>99	98,8	50,3	>200
<b>2</b>	8:2	>99	>99	50	>200
<b>3</b>	7:3	>99	>99	50	>200

<sup>a</sup> Determinado por CLAE;

<sup>b</sup> Conversão,  $c = e.e.(s)/(e.e.(s)+e.e.(p))$ ;

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

Observou-se que a medida que a quantidade de cossolvente diminui (proporção tampão: *n*-butanol de 9:1), ocorreu um ligeiro decréscimo no excesso enantiomérico do produto que passou de > 99% (para uma proporção tampão: *n*-butanol de 8:2) para 98,8% (**tabela 4, entrada 1**), o que indica que a lipase precisa de pelo menos 20% (v/v) de *n*-butanol como cossolvente, para diminuir a flexibilidade do sítio ativo e maximizar a interação entre a enzima

e o acetato (*R*)-**15**. Por outro lado, o aumento da quantidade de *n*-butanol em relação à quantidade de tampão (7:3), não levou a nenhuma alteração nos valores de conversão e enantiosseletividade (**tabela 4, entrada 3**).

Tendo em vista que um dos objetivos deste projeto é desenvolver uma rota sintética para a obtenção do apremilast em consonância com os preceitos da Química Verde, escolheu-se a razão tampão:cossolvente (v/v) 8:2 (**tabela 4, entrada 2**), considerada como uma proporção ideal devido a sua baixa concentração de solvente orgânico.

### 3.3.4 Efeito da razão enzima:substrato (m/m)

O último parâmetro analisado na resolução cinética do éster *rac*-**15**, catalisada por lipase de *Aspergillus niger*, foi a razão enzima:substrato (m/m). Neste caso, variou-se a quantidade de enzima em relação a uma quantidade fixa de substrato. Os testes foram realizados usando as condições otimizadas anteriormente, a saber: tampão fosfato 0,1M (pH 7), 20% de *n*-butanol, 40 °C ou 45 °C a 250 rpm. Os resultados encontram-se sumariados na **Tabela 5**.

**Tabela 5** Efeito da proporção enzima:substrato (m/m) na resolução cinética *rac*-**15**, via hidrólise.

Entrada	Razão Enzima-Substrato	Tempo (h)	<i>e.e.s</i> (%) <sup>a</sup>	<i>e.e.p</i> (%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	E <sup>c</sup>
<b>1</b> <sup>d</sup>	3:1	6	>99	>99	50	>200
<b>2</b> <sup>e</sup>		10	>99	>99	50	>200
<b>3</b> <sup>d</sup>	2:1	9	>99	>99	50	>200
<b>4</b> <sup>e</sup>		11	>99	>99	50	>200
<b>5</b> <sup>e</sup>	1,5:1	23	>99	>99	50	>200

<sup>a</sup> Determinado por CLAE;

<sup>b</sup> Conversão,  $c = e.e.(s)/(e.e.(s)+e.e.(p))$ ;

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

<sup>d</sup> Temperatura: 45 °C

<sup>e</sup> Temperatura: 40 °C

Na **tabela 5**, pode-se observar que utilizando a proporção enzima/substrato de 3:1, a 40 °C, foi possível obter uma conversão de 50% em 10 h de reação (**tabela 5, entrada 2**). Com a diminuição da proporção enzima substrato para 2:1, o tempo reacional para uma conversão de 50% aumentou para 11 h, com manutenção da enantiosseletividade (**tabela 5, entrada 4**). Logo após, com mais uma diminuição da quantidade da enzima para uma proporção enzima/substrato 1,5:1, foram necessárias 23 h para atingir uma conversão de 50% (**tabela 5, entrada 5**).

Finalmente, utilizando a proporção enzima/substrato de 3:1 a 45 °C, foi possível obter uma conversão de 50% em apenas 6 h de reação (**tabela 5, entrada 1**). Com uma diminuição da proporção enzima substrato para 2:1, o tempo reacional para uma conversão de 50% aumentou para 9 h, com manutenção da enantiosseletividade (**tabela 5, entrada 3**).

Do ponto de vista industrial, o equilíbrio entre o tempo operacional e a quantidade de matéria-prima utilizada é um dos caminhos para a otimização operacional. Por esse motivo, as condições ideais para a resolução cinética do acetato *rac*-**15** incluem a utilização de uma solução 0,1M de 80% de tampão fosfato (pH 7) e 20% de *n*-butanol, com uma proporção enzima/substrato de 3:1 massa/massa, a 45 °C por 6 h a 250 rpm.

Sob tais condições a resolução cinética de *rac*-**15** ocorreu com um alto valor de enantiosseletividade ( $E > 200$ ), resultando em ambos, o álcool (*R*)-**14** e acetato (*S*)-**15** enantiomericamente puros. É evidente que a enantiosseletividade obtida pela ação da lipase comercial de *Aspergillus niger* na hidrólise do éster racêmico *rac*-**15** está diretamente relacionado a fatores que influenciaram na flexibilidade do sítio ativo da referida enzima, tais como adição de um cossolvente ao meio aquoso e um aumento na temperatura do meio reacional.

É sabido que, de uma forma geral, as enzimas possuem uma maior flexibilidade em meio aquoso (PERSSON, *et al.*, 2002). Esta alta flexibilidade no sítio ativo enzimático pode ser, em alguns casos, desfavorável a uma alta enantiosseletividade, visto que pode não ocorrer suficiente discriminação entre a interação da enzima com somente um dos enantiômeros de um determinado racemato. Neste caso, a adição de uma pequena quantidade de um cossolvente mais apolar que a água, como por exemplo, o *n*-butanol (20%), pode diminuir a flexibilidade do sítio ativo da enzima (BANIK, *et al.*, 2016). Esta diminuição de flexibilidade do sítio ativo seria um dos motivos pelos quais o éster (*R*)-**15** reagiu mais rapidamente no sítio catalítico da lipase de *Aspergillus niger*, em relação ao éster (*S*)-**15**.

No caso específico, em estudo, a adição de *n*-butanol como cossolvente aumentou drasticamente a enantiosseletividade na resolução cinética de *rac*-**15**, visto que em meio totalmente aquoso o álcool (*R*)-**14** foi obtido com excesso enantiomérico de 42% e  $E = 4$  (**tabela 2, entrada 1**), enquanto em meio tampão/*n*-butanol 8:2 (v/v), o referido álcool foi obtido com excesso enantiomérico de 96% e  $E > 200$  (**tabela 2, entrada 6**). Portanto, apenas a adição de *n*-butanol não foi suficiente para obter o álcool intermediário (*R*)-**14** na forma enantiomericamente pura. Porém, ao aumentarmos a temperatura do meio reacional de 30 °C para 40 °C ou 45 °C, foi possível obter (*R*)-**14** com excesso  $> 99\%$  (**tabela 3, entradas 3 e 4**).

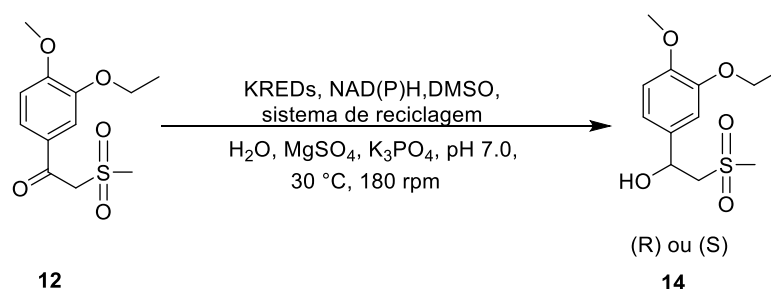
O aumento de temperatura exerceu um papel importante na termodinâmica do

sistema reacional mediante dois efeitos distintos, um relacionado com a diminuição da polaridade do *n*-butanol [ $\epsilon$  (30 °C) 17,6 e  $\epsilon$  (45 °C) 14,7] (DORTMUND DATA BANK) e outro relacionado com um incremento na flexibilização no sítio catalítico da lipase. Ao diminuir a polaridade do *n*-butanol, deveria ocorrer um incremento na rigidez do sítio ativo da enzima, ao mesmo tempo que ocorreria um incremento de flexibilidade pelo aumento dos graus de liberdade promovido pelo aumento de temperatura. Desta forma, consideramos que a alta enantiosseletividade observada na resolução cinética de *rac*-**15** foi uma combinação de fatores que incluíram o efeito do cossolvente e o efeito do aumento da temperatura para se alcançar uma conformação ideal no sítio ativo da lipase de *Aspergillus niger* para um perfeito encaixe do acetato (*R*)-**15**.

Uma vez alcançado o objetivo de se obter o intermediário álcool (*R*)-**14**, enantiomericamente puro, na presença de lipases, voltamos nossa atenção para a obtenção do referido intermediário quiral, na presença das KREDs (**Esquema 6**).

### **3.4 Síntese enzimática do (*R*)-1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonyl)etanol, (*R*)-**14**, via biorredução da 1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonyl)etanona (**12**) na presença de cetorredutases**

Com a obtenção da cetona **12** e do álcool *rac*-**14**, desenvolveu-se um método de separação e análise *via* cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (CG-EM). Após estabelecidas as condições de separação dos respectivos compostos (**item 4.1.5, p. 52**), realizou-se uma triagem catalítica com as KREDs adquiridas da Codexis® (Codex KRED Screening Kit), contendo 24 KREDs. As reações de biorredução da cetona **12** foram realizadas em condições pré-estabelecidas no grupo de pesquisa LaBioChem (UNICAMP) (NASÁRIO, MORAN e RODRIGUES, 2018), a saber: 30 °C, 24 h, sob agitação orbital de 180 rpm (**Esquema 13**). Os resultados encontram-se sumariados na **Tabela 6**.

**Esquema 13.** Triagem de cetorredutases na biorredução da cetona **12**.

As conversões (*c*) das reações enzimáticas foram obtidas em um CG-EM, utilizando as condições descritas anteriormente. Por outro lado, os excessos enantioméricos (*e.e.*) foram analisados em um CLAE utilizando as condições descritas no **item 4.1.5, p. 52** e calculados através da obtenção das áreas dos cromatogramas, aplicando as equações relatadas no **Anexo 7.1 p. 66**.

**Tabela 6.** Triagem de cetorredutases na redução da cetona **12**, em um tempo reacional de 24 h

Entrada	KRED	Cofator	Reciclagem do cofator	<i>c</i> (%) <sup>a</sup>	<i>e.e.</i> (%) <sup>b</sup>
1	KRED-P1-A04	NADPH	isopropanol	-	-
2	KRED-P1-B02	NADPH	isopropanol	15	90 ( <i>S</i> )
3	KRED-P1-B05	NADPH	isopropanol	-	-
4	KRED-P1-B10	NADPH	isopropanol	-	-
5	KRED-P1-B12	NADPH	isopropanol	-	-
6	KRED-P1-C01	NADPH	isopropanol	94	98 ( <i>S</i> )
7	KRED-P1-H08	NADPH	isopropanol	-	-
8	KRED-P1-H10	NADPH	isopropanol	-	-
9	KRED-P2-B02	NADPH	isopropanol	90	48 ( <i>S</i> )
10	KRED-P2-C02	NADPH	isopropanol	18	27 ( <i>S</i> )
11	KRED-P2-C11	NADPH	isopropanol	-	-
12	KRED-P2-DO3	NADPH	isopropanol	15	95 ( <i>R</i> )
13	KRED-P2-D11	NADPH	isopropanol	90	93 ( <i>S</i> )
14	KRED-P2-D12	NADPH	isopropanol	25	91 ( <i>R</i> )
15	KRED-P2-G03	NADPH	isopropanol	15	42 ( <i>S</i> )
16	KRED-P2-H07	NADPH	isopropanol	-	-
17	KRED-P3-B03	NADPH	isopropanol	-	-
18	KRED-P3-G09	NADPH	isopropanol	-	-
19	KRED-P3-H12	NADPH	isopropanol	-	-
20	KRED-101	NADPH	GDH/glicose	-	-
21	KRED-119	NADPH	GDH/glicose	-	-
22	KRED-130	NADPH	GDH/glicose	-	-
23	KRED-NADH-101	NADH	GDH/glicose	-	-
24	KRED-NADH-110	NADH	GDH/glicose	-	-

<sup>a</sup> Determinado por CG-EM;

<sup>b</sup> Determinado por CLAE.

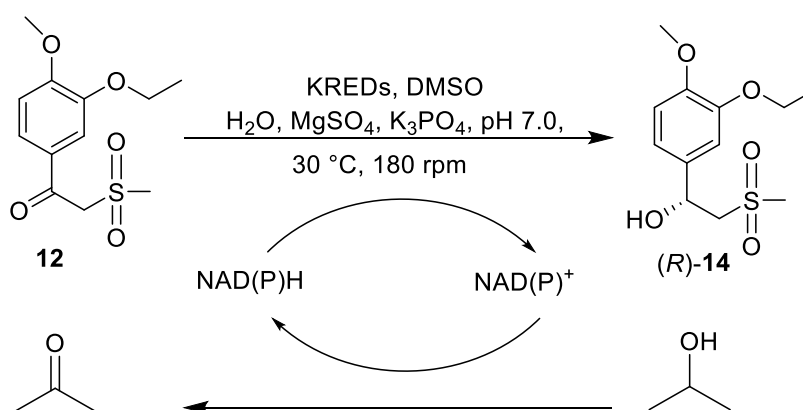
Após as análises, verificou-se que 8 das 24 enzimas testadas foram ativas na redução da cetona **12**, apresentando conversões entre 15 e 94%, sendo 6 delas Prelog [produziram o álcool (*S*)-**14**] (tabela 6, entradas 2, 6, 9, 10, 13 e 15) e as outras 2 *anti*-Prelog [produziram o álcool (*R*)-**14**] (tabela 6, entradas 12 e 14).

A enzima selecionada, nesta etapa, para o prosseguimento do estudo da biorredução da cetona **12** foi a KRED-P2-D12 (tabela 6, entrada 14), pois entre as duas KREDs que apresentaram atividade *anti*-Prelog foi a que proporcionou o maior valor de conversão (25%), levando ao (*R*)-**14** com 91% de *e.e.*. Cabe ressaltar que este último é o intermediário chave na síntese do fármaco apremilast.

### 3.4.1 Influência do regenerador do cofator na biorredução da cetona 12

Uma grande vantagem da enzima KRED-P2-D12 é sua tolerância a uma alta concentração de isopropanol (IPA) na reciclagem do cofator (semelhante às enzimas do kit listadas nas entradas de 1 a 19), evitando o uso de um processo de reciclagem mais dispendioso como o GDH/glicose e, portanto, diminuindo o custo operacional do sistema (GARCÍA *et al.*, 2017). O Mecanismo de regeneração do cofator NAD(P)H, usando isopropanol encontra-se ilustrado no Esquema 14.

**Esquema 14.** Mecanismo de regeneração do cofator NAD(P)H.



A redução da carbonila ocorre sob controle termodinâmico e, geralmente, requer um grande excesso de isopropanol para obter altas conversões (DASCIER, *et al.*, 2014). Portanto, foi feita uma tentativa de encontrar a concentração ideal de isopropanol, estudando diferentes proporções para conduzir o equilíbrio para o produto desejado.

Inicialmente, os testes enzimáticos da cetona **12** foram realizados seguindo o

protocolo supracitado, o que incluiu o uso de uma solução 85,7% KRED Recyle Mix P, 9,5% de isopropanol e 4,8% de DMSO. Porém, ainda não estava claro a influência da quantidade de isopropanol como regenerador do cofator na biorredução da cetona **12**. Assim, decidiu-se avaliar a proporção KRED Recyle Mix P/isopropanol nas reações enzimáticas. Os testes foram realizados nas seguintes condições: 4,8% de DMSO, 30 °C a 180 rpm. Os resultados encontram-se sumariados na **Tabela 7**.

**Tabela 7.** Influência do regenerador do cofator na biorredução da cetona **12**, usando a KRED-P2-D12, em 24 h de reação

<b>Entrada</b>	<b>isopropanol (%)</b>	<b>KRED Recyle Mix P (%)</b>	<b>c (%)<sup>a</sup></b>
<b>1</b>	9,5	85,7	25
<b>2</b>	14,3	80,9	33
<b>3</b>	23,8	71,4	26
<b>4</b>	33,3	61,9	19
<b>5</b>	47,5	47,6	16

<sup>a</sup> Determinado por CG-EM;

Após 24 h de reação, observou-se um incremento na conversão quando a porcentagem de isopropanol aumentou de 9,5% ( $c= 25\%$ ) para 14,3% ( $c= 33\%$ ) (**tabela 7, entrada 1 e 2**). Por outro lado, com o progressivo aumento da proporção de isopropanol de 23,8% a 47,5% (**tabela 7, entrada 3, 4 e 5**), ocorreu uma diminuição da conversão de 26% a 16%. Tal resultado pode ser devido ao fato de que a concentração de cofator e outros aditivos (Mix P) diminuem à medida que a quantidade de isopropanol aumenta. Um caso similar foi relatado por Guo *et al.* (2017) referente à otimização do sistema de reciclagem do NADPH, aumentando a concentração de isopropanol. Estes autores observaram que a atividade enzimática diminuiu, gradualmente, com o aumento da quantidade de IPA (GUO, *et al.*, 2017).

Portanto, a proporção KRED Recyle Mix P:IPA:cossolvente que levou ao melhor resultado de conversão (33%) foi de 80,9%:14,3%:4,8% (**tabela 7, entrada 2**). Neste caso, foi necessário utilizar o DMSO como cossolvente, pois a cetona **12** foi insolúvel em IPA. Contudo, não estava claro se o cossolvente exercia alguma influência sobre a porcentagem de conversão. Desta forma, decidiu-se avaliar a influência do cossolvente na conversão da cetona **12** ao álcool (*R*)-**14**. Além do DMSO, foram avaliados mais 12 cossolventes (**tabela 8**).



### 3.4.2 Efeito do cossolvente na biorredução da cetona **12** utilizando a KRED-P2-D12

Realizou-se uma triagem de cossolventes, com a finalidade de tentar analisar a correlação entre a polaridade do solvente e a atividade da enzima KRED-P2-D12, na biorredução da cetona **12**. A polaridade do solvente pode ser representada pela medida do coeficiente de partição octanol/água ( $\log P$ ).

Os testes foram realizados nas seguintes condições: 80,9% KRED Recyle Mix P, 14,3% de isopropanol e 4,8% de cossolvente, 30 °C a 180 rpm. Os resultados encontram-se sumariados na **Tabela 8**.

**Tabela 8.** Efeito do cossolvente na biorredução da cetona **12** catalisada pela KRED-P2-D12.

Entrada	Cossolvente	Log $P$	$c$ (%) <sup>a</sup>
1	DMF	-0.63	8
2	Metanol	-0.74	29
3	Acetonitrila	-0.33	15
4	Etanol	-0.31	48
5	THF	0.46	0
6	<i>n</i> -Butanol	0.88	0
7	Álcool isoamílico	1.16	0
8	Diclorometano	1.19	0
9	Cicloexano	2.67	26
10	Tolueno	2.73	15
11	Hexano	3.764	36
12	Heptano	4.66	28

<sup>a</sup> Determinado por CG-EM;

Observou-se que na presença dos cossolventes com  $\log P < 0$ , foram obtidos conversões que variaram de 8%, no caso da *N,N*-dimetilformamida (**tabela 7, entrada 1**) a 48%, no caso do etanol (**tabela 7, entrada 4**). Por outro lado, os cossolvente com  $\log P$  entre 0,46 e 1,19 (**tabela 7, entrada 5-8**) inativaram a enzima KRED-P2-D12. Finalmente, os cossolventes com  $\log P$  entre 2,67 e 4,66 apresentaram valores de conversão que variaram entre 15% a 36% (**tabela 7, entrada 9-12**). Neste caso, o etanol ( $c= 48\%$ ,  $e.e.= 93\%$ ) e o hexano ( $c= 36\%$ ,  $e.e.= 91\%$ ) foram os cossolventes que levaram aos maiores valores de conversão, na presença da KRED-P2-D12.

### 3.4.3 Efeito da temperatura na atividade enzimática

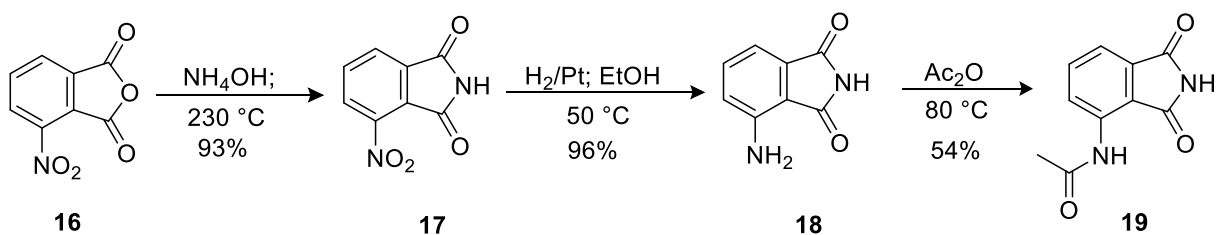
Por último, estudou-se o efeito da temperatura no comportamento da KRED-P2-D12 nas seguintes condições: 80,9% KRED Recyle Mix P, 14,3% de isopropanol e 4,8% de etanol, 35 °C (um incremento de 5 °C em relação aos testes preliminares) a 180 rpm por 72 h. Após o término da reação, verificou-se uma perda da atividade enzimática da KRED-P2-D12, pois a conversão diminuiu de 48% para 23%.

Com este teste, finalizamos os estudos para a obtenção do intermediário chave para a síntese do apremilast, o álcool quiral (*R*)-**14**, o qual pode ser obtido *via* duas abordagens enzimáticas, a primeira utilizando lipases e a segunda na presença das KREDs. Cabe ressaltar que a primeira abordagem foi mais promissora em relação à segunda, visto que o referido intermediário quiral foi obtido com uma conversão de 50% e na sua forma enantiopura, na presença da lipase de *Aspergillus niger*. Desta forma, focamos os nossos esforços para concluir as etapas necessárias para a obtenção do fármaco apremilast.

### 3.5 Síntese da 4-acetilamino-isoindol-1,3-diona (**19**)

De posse do álcool quiral (*R*)-**14**, foi necessário preparar a 4-acetil-isoindol-1,3-diona (**19**). O reagente de partida, comercialmente disponível, foi o anidrido 3-nitroftálico (**16**), o qual foi transformado na ftalimida **19**, após 3 etapas reacionais (**Esquema 15**).

**Esquema 15.** Obtenção da 4-acetilamino-isoindol-1,3-diona (**19**).



Inicialmente, sintetizou-se a 4-nitro-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (**17**) com 93% de rendimento, a partir do aquecimento do anidrido **16** com hidróxido de amônio (GEORGE e SNOW, 1995). Posteriormente, realizou-se uma ligeira modificação na metodologia relatada por Zhou *et al.*, na redução do grupo nitro da ftalimida **17**, usando Pt/C (10% Pt/C) em lugar de Pd/C (10% Pd/C) como catalisador, com obtenção da 4-aminoisoindol-1,3-diona (**18**) com

96% de rendimento (ZHOU, *et al.*, 2016). Finalmente, o composto **18** foi submetido a uma reação de acetilação, com a obtenção da 4-acetilamino-isoindol-1,3-diona (**19**) com 54% de rendimento (DREW e PEARMAN, 1937).

Conforme ilustrado no **esquema 6**, a reação entre a ftalimida **19** e o álcool (*R*)-**14**, na presença de trifenilfosfina e DIAD, deve levar à molécula alvo, o fármaco apremilast.

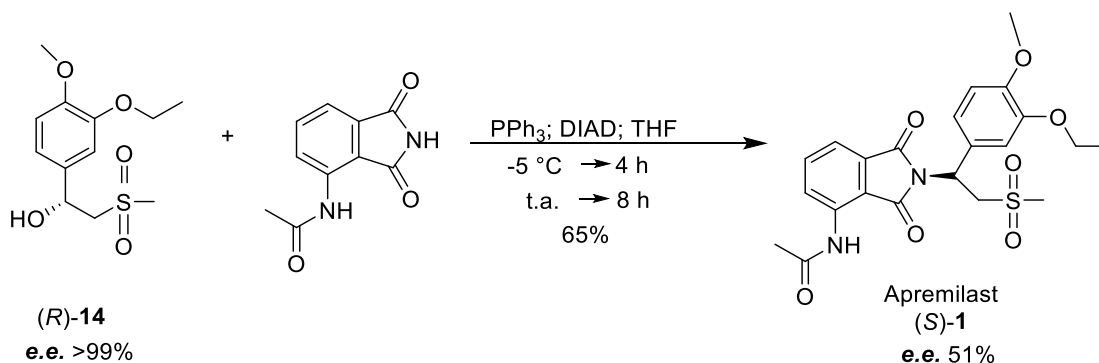
### 3.6 Obtenção do fármaco apremilast [(*S*)-1]

Para esta etapa foi utilizada a reação de Mitsunobu, em que o álcool (*R*)-**14** é submetido a uma inversão de configuração com o ataque nucleofílico da ftalimida **19**.

O primeiro protocolo avaliado na obtenção do apremilast consistiu na formação do intermediário de fosfônio (formado entre a trifenilfosfina e o azodicarboxilato de diisopropila, em tolueno anidro), seguido da adição do álcool (*R*)-**14** e da ftalimida **19**, em THF, à temperatura ambiente (JINGXIA e LIANTAO, 2018). Após 15 h de reação, o apremilast foi obtido com, apenas, 14% de rendimento.

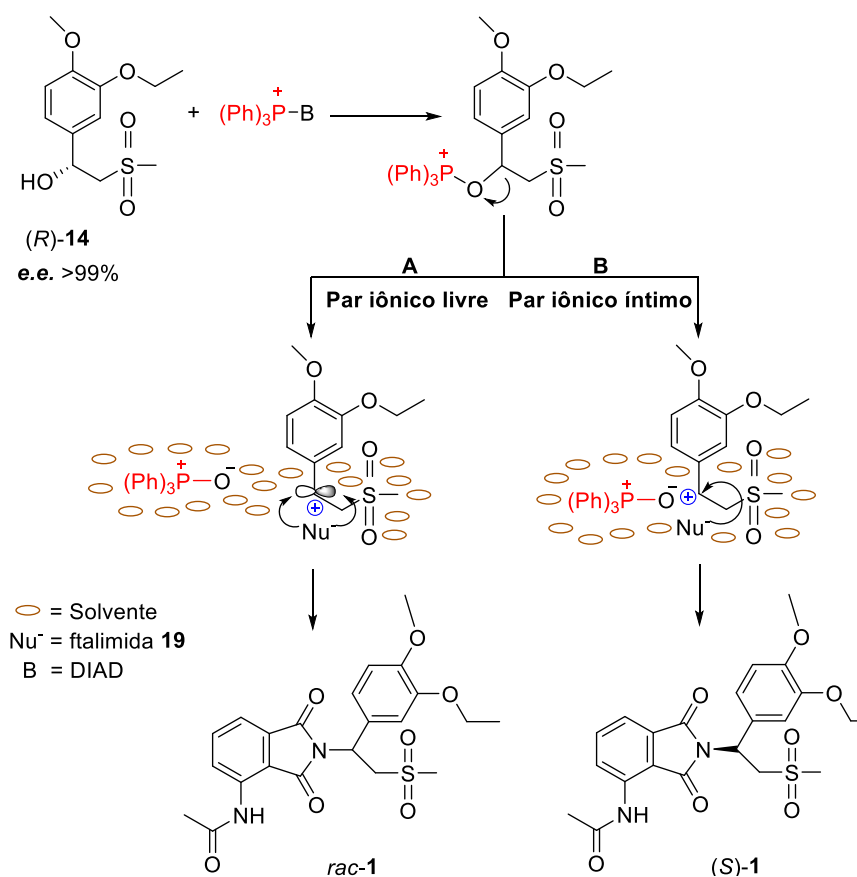
Devido ao baixo valor de rendimento, optou-se por realizar um protocolo alternativo, em que a reação é processada apenas em THF anidro como solvente (SHENGYIN e QIANG, 2016). Neste caso, o álcool (*R*)-**14** foi adicionado ao intermediário de fosfônio (formado entre trifenilfosfina e azodicarboxilato de diisopropila, em THF anidro, a -5 °C). Em seguida, adicionou-se a ftalimida **19** e o sistema reacional foi agitado por 4 h, a -5 °C. Após este tempo, o sistema reacional foi agitado por mais 8 h, à temperatura ambiente. Com a execução deste último protocolo, o apremilast [(*S*)-1] foi obtido com 65% de rendimento (**esquema 16**).

**Esquema 16.** Obtenção do apremilast.



Esperava-se que a reação de Mitsunobu entre o álcool enantiomericamente puro *R*-**14** (*e.e.* > 99%) e a ftalimida **19**, proporcionasse o apremilast com inversão total da configuração *via* reação de substituição nucleofílica bimolecular ( $S_N2$ ). Contudo, ocorreu um grau de racemização no sistema reacional e o apremilast foi produzido com um excesso enantiomérico de 51%. A perda na pureza óptica do produto final, pode ter sido consequência da ionização do intermediário de fosfônio (formado na reação entre a trifenilfosfina e o álcool *R*-**14**), devido ao álcool ser benzílico e formar um carbocátion estabilizado por ressonância. Neste caso, a reação ocorreria *via* substituição nucleofílica unimolecular  $S_N1$ , formando pares iônicos livres e pares iônicos íntimos. Neste caso, o nucleófilo (ftalimida **19**) deve reagir diferentemente com os dois tipos de pares iônicos do meio reacional. A reação com os pares iônicos livres ocorre na mesma proporção pelas duas faces do carbocátion benzílico, tendo como resultado, a racemização (**Esquema 17, item A**). Por outro lado, o ataque nucleofílico da ftalimida **19** ao par iônico íntimo do carbocátion benzílico resulta na inversão da configuração, já que ocorre na pela face contrária à saída do “leaving group” (**Esquema 17, item B**). Portanto o resultado final é a inversão de configuração acompanhado de um grau de racemização.

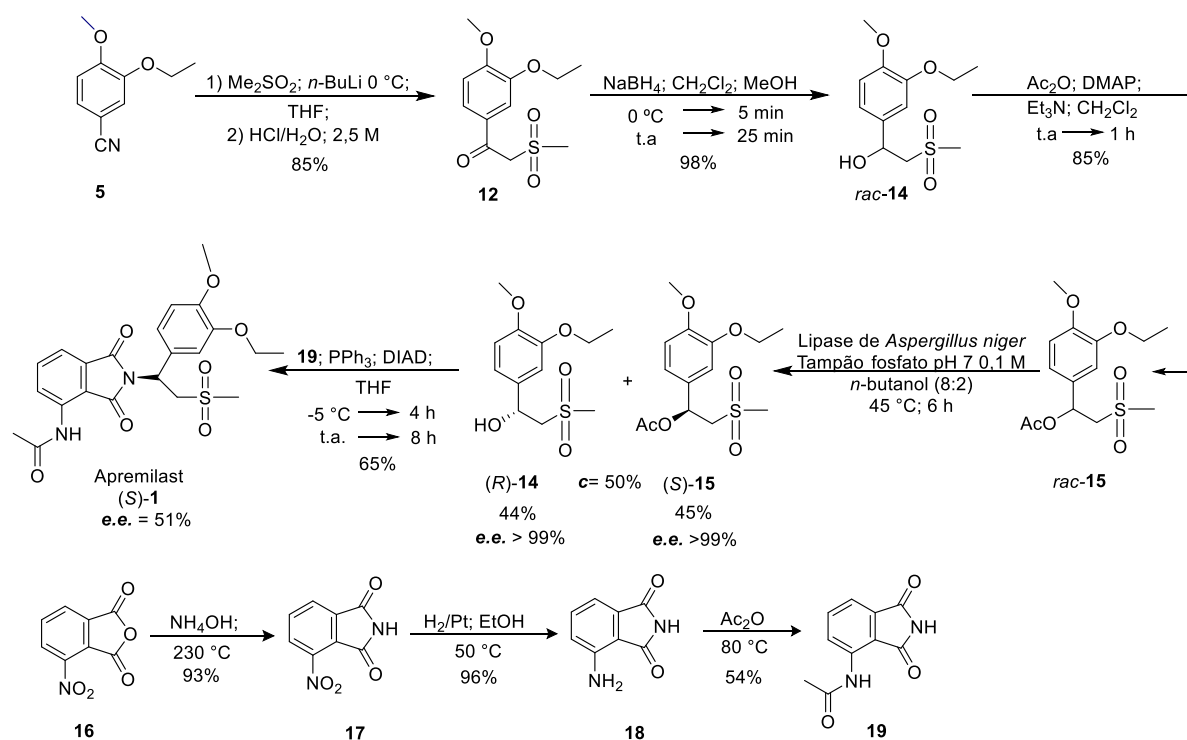
**Esquema 17.** Mecanismo da obtenção do apremilast *via* reação  $S_N1$ .



### 3.7 Síntese quimioenzimática do apremilast

Após um estudo detalhado de etapas químicas convencionais e enzimáticas, foi possível desenvolver uma rota quimioenzimática com rendimento global de 20%, para a preparação do fármaco apremilast. A etapa chave consistiu na obtenção do álcool quiral (*R*)-**14** na forma enantiopura, *via* resolução cinética do éster *rac*-**15**, na presença da lipase de *Aspergillus niger*. No **esquema 17** encontra-se representada a rota quimioenzimática para a obtenção do apremilast, desenvolvida neste projeto.

**Esquema 18.** Síntese quimioenzimática do fármaco apremilast, desenvolvida neste projeto.



## 4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 4.1 Instrumentos

#### 4.1.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ) unidimensionais, foram obtidos em um espectrômetro Bruker, modelo Advance DRX-300, pertencente ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN-UFC). Os espectros foram obtidos na frequência do hidrogênio a 300 MHz e na frequência do carbono a 75 MHz.

O solvente utilizado na dissolução das amostras para obtenção dos espectros foi clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) e dimetilsulfoxido deuterado ( $\text{DMSO-d}_6$ ). As amostras foram analisadas em tubos de 5mm (WilmaLabglass, New Jersey, EUA).

Os deslocamentos ( $\delta$ ) foram expressos em parte por milhão (ppm) e referenciados no caso dos espectros de RMN $^1\text{H}$ , pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não deuteradas do solvente deuterado utilizado: clorofórmio ( $\delta$  7,27) e dimetilsulfoxido ( $\delta$  2,5). Nos espectros de carbono  $^{13}\text{C}$ , os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram referenciados pelos picos dos carbonos  $^{13}\text{C}$  do solvente: clorofórmio ( $\delta$  77,23) e dimetilsulfoxido ( $\delta$  39).

A multiplicidade das bandas de absorção dos prótons nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  foi indicada da seguinte forma: s (simpleto), d (duplete), t (triplete), q (quarteto), dd (duplo de duplete), dq (duplo de quarteto) e m (multiplete).

O padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN  $^{13}\text{C}$  foi determinado através do emprego da técnica DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) com ângulo de nutação ( $\theta$ ) de  $135^\circ$ , CH e  $\text{CH}_3$  com amplitude em oposição aos  $\text{CH}_2$ , e foi descrito conforme a convenção: C (carbono não hidrogenado), CH (carbono metínico),  $\text{CH}_2$  (carbono metilênico) e  $\text{CH}_3$  (carbono metílico). Os carbonos não hidrogenados foram caracterizados pela subtração do espectro DEPT  $135^\circ$  do espectro BBD/ $^1\text{H}$  (*Broadband Decoupled*).

#### 4.1.2 Ponto de Fusão

Os pontos de fusão foram determinados no equipamento de Microquímica modelo

APF-301 (LABS), a uma taxa de aquecimento de 2°C/min e não foram corrigidos.

#### 4.1.3. Rotação óptica $[\alpha]_D^{20}$

As rotações ópticas específicas  $[\alpha]_D^{20}$  foram obtidas em polarímetro PerkinElmer Modelo 341, na função OROT, caminho ótico de 10 mm, lâmpada de sódio 582 nm pertencente à central analítica do departamento de Química Orgânica do IQ-UNICAMP.

#### 4.1.4 Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE)

As análises das reações enzimáticas foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) da marca Shimadzu de modelo LC-20AT acoplado a um detector de UV da marca Shimadzu de modelo SPD-M20A (LABS). A coluna utilizada foi Chiracel® OD-H (150 m x 4,6 mm D.I.) com o forno ajustado a 40 ° C. O volume de injeção da amostra foi de 20 µL. Para o seguimento dos tempos de reação, o fluxo foi de 1,0 mL/min usando hexano: IPA como eluente e detector de UV a 207 nm. As condições de eluição foram as seguintes: gradiente de eluição hexano-IPA (95:5) a hexano-IPA (90:10) em 41 min. Em seguida, hexano-IPA (97:3) em 4 min com manutenção em 10 min. Finalmente, hexano-IPA (95:5) em 5 min com manutenção por mais 5 min. Os tempos de retenção foram: (S)-acetato (S)-**15** 36.69 min; (R)-acetato (R)-**15** 42.42 min; (S)-álcool (S)-**14** 33.72 min; (R)-álcool (R)-**14** 30.86 min.

#### 4.1.5 Cromatógrafo a Gás-Espectrometro de Massas (CG-EM)

As análises por CG-EM foram feitas em um cromatógrafo a gás (CG Agilent 6890 Series/ MS- HP 5973) equipado com um amostrador de injeção automática 7863 (Agilent) (IQ-UNICAMP). As separações foram realizadas em uma coluna capilar de sílica fundida (DB-5MS 5%-fenil-95%-dimetil arileno siloxano (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno), 0,25 mm de espessura de filme).

As amostras foram injetadas com fluxo constante de gás hélio 1,0 mL min<sup>-1</sup>. A temperatura do injetor foi de 250 °C e utilizou-se 1,0 µL de amostra. O espectro de massas foi obtido pela análise em aparelho quadrupolo com filtro de fragmentos  $m/z$  de 50 a 550 u.m.a. A temperatura da fonte de íons permaneceu em 250 °C e da interface a 280 °C.

A programação da temperatura do forno iniciou-se a partir de 60 °C e foi mantida

durante 0,5 min. Em seguida, a temperatura foi elevada a 290 °C na taxa de 25 °C. min<sup>-1</sup> e mantida nesta temperatura por 5 min. O tempo total de análise foi de 14,20 min. Os tempos de retenção dos compostos foram: cetona **12** (8,9 min) e álcool **14** (9 min).

## 4.2 Cromatografia líquida de adsorção

Para a realização das análises cromatográficas de adsorção em colunas foi utilizada como fase estacionária gel de sílica 60 ( $\phi$  mm 0,063 – 0,200)- VETEC<sup>®</sup>. Os comprimentos e diâmetros das colunas variaram de acordo com as quantidades das amostras a serem purificadas e com as quantidades de adsorventes usados.

As análises cromatográficas em camada delgada (CCD) foram realizadas sobre cromatofolhas de alumínio cobertas com gel de sílica 60 F<sub>254</sub>- MERCK<sup>®</sup> (espessura de 0,2 mm). As cromatofolhas foram submetidas à radiação ultravioleta (UV) em dois comprimentos de onda (254nm - 365nm), emitidas por lâmpada modelo UVSL – 25 da MINERAL LIGHT<sup>®</sup>.

Os solventes P.A. utilizados para eluição das amostras nas colunas e placas cromatográficas foram: hexano, acetato de etila, metanol, isopropanol e clorofórmio puros ou em misturas binárias numa ordem crescente de polaridade.

Os sistemas reacionais ou fases orgânicas tratadas foram concentrados, sob pressão reduzida, em rotoevaporador Büchi Waterbath B- 480, com sistema de refrigeração circulatório, mantendo-se a temperatura do banho em torno de 40 °C.

## 4.3 Solventes e reagentes

Os reagentes e solventes utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão listados na **Tabela 9**.



**Tabela 9.** Reagentes e solventes utilizados no desenvolvimento deste projeto

<b>Reagente e/ou Solventes</b>	<b>Procedência</b>	<b>Pureza (%)</b>
Acetato de etila	BIO-GRADE	99
Acetona	BIO-GRADE	99
Álcool metílico	BIO-GRADE	99
Clorofórmio	BIO-GRADE	99,8
Diclorometano	BIO-GRADE	99,5
Tetrahidrofurano	SIGMA-ALDRICH	99
Hexano	BIO-GRADE	98,5
<i>n</i> -butanol	Dinâmica	99,4
Isopropanol	BIO-GRADE	99,8
Metanol	BIO-GRADE	99,9
Etanol	Synth	99,5
TBME	SIGMA-ALDRICH	99,8
Acetonitrila	Tedia	99,9
Ciclohexano	SIGMA-ALDRICH	99,5
Heptano	SIGMA-ALDRICH	99
Tolueno	Synth	99,5
Éter de petróleo	NEON	-
Dimetilsulfona	SIGMA-ALDRICH	98
3-etoxi-4-metoxibenzaldeído	SIGMA-ALDRICH	99
3-etoxi-4-metoxibenzonitrila	Ark Pharm	98
Solução de <i>n</i> -Butillítio 2.5 M em hexano	SIGMA-ALDRICH	-
Ácido clorídrico	Vetec	-
Borohidreto de sódio	SIGMA-ALDRICH	96
4-Dimetilaminopiridina	ALDRICH	>99,9
Anidrido acético	Dinâmica	99
Trietilamina	SIGMA-ALDRICH	99
Anidrido 3-nitroftálico	SIGMA-ALDRICH	98
Hidróxido de amônia	Dinâmica	-
Pt/C (10% Pt/C)	Riedel-de Haën	-
Trifenilfosfina	SIGMA-ALDRICH	98,5
Azodicarboxilato de diisopropila	SIGMA-ALDRICH	-

#### 4.3.1 Secagem dos solventes

A pré-secagem do THF foi processada mediante o tratamento com  $\text{CaH}_2$ , sob refluxo, em atmosfera inerte de  $\text{N}_2$ . Posteriormente, foi realizado a adição de sódio metálico na presença de benzofenona, sob refluxo, em atmosfera inerte de  $\text{N}_2$ . O tratamento teve seu término com o aparecimento de uma coloração azul escura (LI, LIMBERAKIS e PFLUM, 2007)

#### 4.4 Enzimas

Lipases imobilizadas: A Amano lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em imobead 150, Amano lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em imobead 150 sol gel AK em pumice, Amano lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em sol gel AK, Lipozyme RM IM, Amano lipase PS-IM imobilizada em terra diatomácea, *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em imobead 150 e lipase de *Candida antarctica* do tipo B imobilizada em resina acrílica (Novozym<sup>®</sup> 435), foram adquiridos da Sigma<sup>®</sup>.

Lipases livres: A Lipase de *Candida rugosa*, Amano lipase *Burkholdeira cepacia*, lipase de *Rhizopus niveus*, Amano lipase G de *Penicillium camemberti*, Amano lipase M de *Mucor javanicus*, lipase de *Aspergillus niger*, lipase de pâncreas de porco (PPL) e Amano lipase de *Pseudomonas fluorescens*, foram adquiridos da Sigma<sup>®</sup>.

As KREDs foram adquiridas da Codexis<sup>®</sup>, consistindo no Codex KRED Screening Kit, contendo 24 KREDs.

#### 4.5 Síntese da 1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etanona (**12**)

Em um balão de 25 mL, adicionou-se dimetilsulfona (926 mg, 9,85 mmol) e 7 mL de THF seco a 0 °C. Em seguida, adicionou-se uma solução 2,5 M de *n*-butil-lítio em hexano (3,8 mL, 9,45 mmol). Agitou-se a mistura resultante entre 0 e 10 °C durante 1 h. Posteriormente, dissolveu-se a 3-etoxi-4-metoxibenzonitrila (**5**) (700 mg, 3,94 mmol) em 2,3 mL de THF seco a 0 °C e adicionou-se gota a gota à mistura reacional, mantendo essa temperatura durante 1 h. Após este período, elevou-se a temperatura do sistema reacional até a temperatura ambiente e agitou-se durante 12 h. A reação foi finalizada pela adição de 6 mL de HCl 2,5 M e a mistura foi agitada durante 1 h. Em seguida, filtrou-se o sólido formado e recristalizou-se com éter de petróleo/AcOEt, obtendo um sólido branco identificado como 1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etanona (910,5 mg, 85%) com  $R_f$  hexano:AcOEt (1:1)= 0,47 e p.f. 144-145 °C.

#### 4.6 Síntese do 1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etanol (*rac*-**14**)

Em um balão de 20 mL, dissolveu-se (**12**) (300 mg, 1,1 mmol) em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e MeOH (1:4; 0.1M). Em seguida adicionou-se, NaBH<sub>4</sub> (50,1 mg, 1,32 mmol), à temperatura de 0 °C. A reação ocorreu por 30 min. Ao término, evaporou-se o MeOH à pressão reduzida. Adicionou-se 10 mL de uma solução de HCl 1 M e extraiu-se o produto com AcOEt (3 x 30 mL), sendo a

fase orgânica tratada com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. Após filtração, evaporou-se o AcOEt à pressão reduzida e o produto bruto foi purificado em coluna cromatográfica filtrante com gel de sílica *flash* usando hexano:AcOEt (1:1) como eluente, obtendo um sólido branco identificado como 1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etanol (*rac-4*) (295 mg, 98%) com R<sub>f</sub> hexano:AcOEt (1:1)= 0,33 e p.f. 115-117 °C.

#### 4.7 Síntese do acetato de 1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etila (*rac-15*)

Em um balão de 10 mL, dissolveu-se DMAP (55,7 mg, 0,456 mmol) e Ac<sub>2</sub>O (259,8 µL, 2,735 mmol) em 4 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Em seguida, adicionou-se *rac-14* (250 mg, 0,912 mmol) e Et<sub>3</sub>N (55 µL, 0,456 mmol). A mistura reacional foi agitada por 1 h, logo após, adicionou-se 2 mL de uma solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> e extraiu-se a fase aquosa com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 20 mL), sendo a fase orgânica tratada com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. Após filtração, evaporou-se o solvente à pressão reduzida e purificou-se o produto bruto em coluna cromatográfica com gel de sílica *flash* usando hexano:AcOEt (1:1) como eluente, obtendo o produto acetato de 1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etila (*rac-15*) (246 mg, 85%) como um sólido branco com R<sub>f</sub> (hexano:AcOEt (1:1) = 0.43. e p.f. = 99-100 °C.

#### 4.8 Hidrólise de *rac-15* catalisada por lipase de *Aspergillus niger*

Preparou-se uma suspensão de *rac-15* (72,8 mg, 0,229 mmol) em 2,3 mL de tampão fosfato pH 7 0,1 M/*n*-butanol (8:2) (v/v). Posteriormente, adicionou-se a lipase de *Aspergillus niger* (3:1 massa/massa) e agitou-se a mistura reacional a 250 rpm no agitador orbital à 45 °C por 6 h. Finalizou-se a reação com a adição de 3 mL de AcOEt, seguido da centrifugação por 5 minutos a 1000 rpm. Em seguida, tratou-se a fase orgânica com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. Após filtração, evaporou-se o AcOEt à pressão reduzida e purificou-se o produto bruto em coluna cromatográfica com gel de sílica *flash* usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (9.7:0.3) como eluente, obtendo 32 mg de (*R*)-**14** e 30,1 mg de (*S*)-**15**, com valores de *e.e.* > 99%.

#### 4.9 Biorredução da cetona **12** catalisada pela ceterredutase KRED-P2-D12

Adicionou-se 2 mg da KRED-P2-D12 da Codexis® e 1,3 mg da cetona **12** em um *ependorf* de 2 mL. Em seguida, adicionou-se 425 µL de uma solução estoque de KRED Recycle Mix P, composta por 125 mmol/L de fosfato de potássio, 1,25 mmol/L de MgSO<sub>4</sub>, 1 mmol/L de

NADP<sup>+</sup>, 80 mmol/L, pH 7.0 a partir de 0,15 g de Mix P disperso em 5 mL de água mili-Q. Posteriormente, adicionou-se 75 µL de isopropanol e agitou-se a 180 rpm no agitador orbital a 30 °C por 24 h. Finalizou-se a reação com a adição de 1 mL de AcOEt, seguido da centrifugação por 5 min a 4500 rpm. Logo após, tratou-se a fase orgânica com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e após filtração analisou-se a amostra no CG-EM e CLAE. Após a análise, confirmou-se a formação do (*R*)-1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonyl)etanol com uma conversão de 48% e *e.e.* de 93%.

#### 4.10 Síntese da 4-nitro-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (17)

Em um balão de 5 mL, adicionou-se anidrido 3-nitroftálico (**16**) (1,55 mmol; 300 mg) seguido de 540 µL hidróxido de amônia, posteriormente, adaptou-se um condensador ao sistema (sem corrente d'água) e aqueceu-se o sistema reacional à temperatura de ebulição até evaporar toda a água. Posteriormente, aumentou-se a temperatura até 180 °C e se manteve-se o aquecimento por 2 h. Após este tempo, foi obtido um sólido amarelo identificado como 4-nitro-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (278 mg, 93%) com *R<sub>f</sub>* (hexano:AcOEt (1:1) = 0,61 e p.f. 213-215 °C.

#### 4.11 Síntese da 4-aminoisoindolina-1,3-diona (18)

Em um tubo *schlenk*, adicionou-se Pt/C (10% Pt/C) (47,0 mg, 0,2395 mmol) e 13,5 mL de etanol. Posteriormente, adicionou-se a nitroftalimida **17** (220 mg, 1,140 mmol) à mistura reacional, sob agitação magnética. Manteve-se a reação a uma temperatura média de 55 °C e agitação magnética por 24 h em atmosfera de H<sub>2</sub> a 2 atm. Após esse período, filtrou-se o meio reacional e evaporou-se o etanol à pressão reduzida, obtendo-se um sólido de coloração verde identificado como 4-aminoisoindolina-1,3-diona (177,5 mg, 96%) com *R<sub>f</sub>* (hexano:AcOEt (1:1) = 0,59 e p.f. 265-266 °C.

#### 4.12 Síntese da 4-acetilamino-isoindol-1,3-diona (19)

Em um balão de 5 mL, adicionou-se a aminoftalimida **18** (170 mg, 1,05 mmol), anidrido acético (895 µL, 9,5 mmol), e posteriormente aqueceu-se a mistura a 80 °C. O sistema reacional foi agitado por 1 h. Em seguida, evaporou-se o anidrido acético à pressão reduzida e o sólido formado foi lavado com etanol a frio, filtrado e seco a temperatura ambiente, obtendo-se um sólido branco identificado como 4-acetilamino-isoindol-1,3-diona (116,6 mg, 54%) com

$R_f$ (hexano:AcOEt (1:1) = 0,6 e p.f. 236-237 °C.

#### 4.13 Síntese do apremilast [(S)-1]

Em um balão de 10 mL, adicionou-se trifetilfosfina (45,6 mg, 0,174 mmol) e 0,7 mL de THF seco, a -5 °C. Em seguida, adicionou-se, gota a gota, azodicarboxilato de diisopropila (27 µL, 0,139 mmol) e agitou-se até a formação do sal. Posteriormente, dissolveu-se (*R*)-**14** (32 mg, 0,116 mmol) em 0,4 mL de THF seco, a -5 °C e adicionou-se a solução formada, gota a gota, à mistura reacional. Após 10 min, adicionou-se a acetilaminoftalimida **19** (23,7 mg, 0,116 mmol), dissolvida em 0,3 mL de THF seco, a -5 °C, e manteve-se a agitação da mistura reacional por 4 h. Em seguida, elevou-se a temperatura do sistema reacional até à temperatura ambiente e agitou-se por mais 8 h. Após o término da reação, o solvente foi evaporado à pressão reduzida e o produto bruto foi purificado em coluna cromatográfica com gel de sílica *flash* usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (9,8:0,2) como eluente, com obtenção de um sólido branco identificado como (*S*)-*N*-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfonietil]-4-acetilaminoisindolina-1,3-diona [apremilast] (34 mg, 65%) com  $R_f$  CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (9.5:0.5)= 0.78 e p.f. 175-176 °C.

## 5 CONCLUSÕES

Em resumo, desenvolvemos uma rota quimioenzimática concisa para a obtenção do fármaco apremilast com rendimento global de 20%. A nitrila **5** foi o material de partida ideal, pois proporcionou a formação da cetona **12**, utilizada na abordagem com as cetorredutases, bem como a formação do álcool *rac*-**14**, utilizado na forma de acetato na abordagem com as lipases, ambos com altos valores de rendimento. A abordagem enzimática envolvendo o uso de lipases demonstrou ser mais eficiente em comparação àquela que fez uso de cetorredutases. A lipase de *Aspergillus niger* provou ser uma enzima eficaz na etapa chave da síntese quimioenzimática do apremilast, catalisando a resolução cinética do acetato *rac*-**15** e propiciando a obtenção do intermediário quiral, o álcool (*R*)-**14**, com conversão de 50%, excesso enantiomérico > 99% e  $E > 200$ .

Vale ressaltar que a resolução cinética do acetato *rac*-**15**, somente, foi eficiente quando uma quantidade ideal (tampão/cossolvente 8:2, v/v) de *n*-butanol foi usada como cossolvente e quando a temperatura da reação foi aumentada de 30 para 40 °C ou 45 °C. É possível concluir que o enantiômero (*R*)-**15** foi favorecido pela entropia, já que ocorreu um aumento da enantiosseletividade com o aumento da temperatura. Desta forma, consideramos que a alta enantiosseletividade observada na resolução cinética de *rac*-**15** foi uma combinação de fatores que incluíram o efeito do cossolvente e o efeito do aumento da temperatura para se alcançar uma conformação ideal no sítio ativo da lipase de *Aspergillus niger* para um perfeito encaixe do acetato (*R*)-**15**. Assim sendo, parâmetros como temperatura e adição de cossolvente são formas de ajustar a conformação do sítio ativo e proporcionar um aumento na enantiosseletividade de uma enzima.

## REFERÊNCIAS

- ABROUK, M.; FARAHNIK, B.; ZHU, T. H.; NAKAMURA, M.; SINGH, R.; LEE, K.; LUCKING, S-M.; BLOSSOM, J.; LIAO, W.; KOO, J.; BHUTANI, T.; SHINKAI, K.; NGUYEN.; T. Apremilast treatment of atopic dermatitis and other chronic eczematous dermatoses. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [s.l.], v. 77, n. 1, p. 177-180, jul. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2017.03.020>.
- ANGAJALA, G.; PAVAN, P.; SUBASHINI, R. Lipases: An overview of its current challenges and prospectives in the revolution of biocatalysis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s.l.], v. 7, n. 0, p. 257-270, jul. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.07.001>
- ANVISA. Registro aprovados novos medicamentos para psoríase, 2018. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset\\_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/aprovadnovos-medicamentos-para-psorise/219201/pop\\_up?inheritRedirect=false](http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/aprovadnovos-medicamentos-para-psorise/219201/pop_up?inheritRedirect=false). Acesso em: 25 jan. 2020.
- BADGUJAR, C.; BHANAGE, M. The solvent stability study with thermodynamic analysis and superior biocatalytic activity of *Burkholderia cepacia* Lipase immobilized on biocompatible hybrid matrix of polyvinyl alcohol and hypromellose. **The Journal of Physical Chemistry B**, [s.l.], v. 118, n. 51, p. 14808-19, dec. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp5093493>.
- BANDEIRA, P. T.; THOMAS, J. C.; OLIVEIRA, A. R. M.; PIOVAN, L. Lipase-mediated kinetic resolution: An introductory approach to practical biocatalysis. **Journal of Chemical Education**, [s.l.], v. 94, n. 6, p. 800-805, may. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.6b00606>.
- BANIK, S. D.; NORDBLAD, M.; WOODLEY, J. M.; PETERS, G. H. A correlation between the activity of *Candida antarctica* Lipase B and differences in binding free energies of organic solvent and substrate. **ACS Catalysis**, [s.l.], v. 6, n. 10, p. 6350-6361, aug. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1021/acscatal.6b02073>.
- BARBOSA, M. S.; SANTOS, A. J.; CARVALHO, N. B.; FIGUEIREDO, R. T.; PEREIRA, M. M.; LIMA, A. S.; FREIRE, M. G.; CABRERA-PADILLA, R. Y.; SOARES, C. M. F. Enhanced activity of immobilized Lipase by phosphonium-based ionic liquids used in the support preparation and immobilization process. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, [s.l.], v. 7, n. 18, p. 15648-15659, aug. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b03741>.
- BROOS, J. Impact of the enzyme flexibility on the enzyme enantio-selectivity in organic media towards specific and non-specific substrates. **Biocatalysis and Biotransformation**, [s.l.], v. 20, n. 4, p. 291-295, jul. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1080/10242420290004938>.
- CARVALHO, A. C.; FONSECA, T. S.; MATOS, M. C.; OLIVEIRA, M. C.; LEMOS, T. L.; MOLINARI, F.; ROMANO, D.; SERRA, I. Recent advances in Lipase-mediated preparation of pharmaceuticals and their intermediates. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 16, n. 12, p. 29682-29716, dec. 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms161226191>.

CAULI, A.; PORRU, G.; PIGA, M.; VACCA, A.; DESSOLE, G.; MATHIEU, A. Clinical potential of apremilast in the treatment of psoriatic arthritis. **Dove Medical Press**, [s.l.], v. 9, n. 3, p. 91-96, dec. 2014. DOI: <https://doi.org/10.2147/ITT.S40199>.

CONNOLLY, T. J.; ECKERT, J.; FRANK, A. J.; RAJENDIRAN, C.; REDDY, N. R.; RUCHELMAN, A.; VENKATESWARALU, J. **Processes for the preparation of (S)-1-(3-ethoxy-4-methoxyphenyl)-2-methanesulfonylethylamine**. Depositante: Celgene Corp. n. US2013217918A1. Depósito: 20 fev. 2013. Concessão: 22 agos. 2013.

CONNOLLY, T. J.; LEONG, W. W.; RUCHELMAN, A. L. **Asymmetric synthetic processes for the preparation of aminosulfone compounds**. Depositante: CONNOLLY, T. J.; LEONG, W. W.; RUCHELMAN, A. L.; CELGENE, C. n. US2013217919A1. Depósito: 02 fev. 2013. Concessão: 8 agos. 2013.

CONNOLLY, T. J.; RUCHELMAN, A. L.; YONG, K. H. Y.; ZHANG, C. **Processes for the preparation of isoindole compounds and isotopologues thereof**. Depositante: Celgene Corp. n. US2014081032A1. Depósito: 13 set. 2013. Concessão: 20 mar. 2014.

CHEN, R.; FAMING, M.; MAKI, M.; LIANG, X.; WEI, Y. **Synthetic method of apremilast chiral amine intermediate**. Depositante: Enantiotech Corp LTD. n. CN104761474 A. Depósito: 11 mar. 2015. Concessão: 8 jul. 2015.

DASCIER, D.; KAMBOURAKIS, S.; HUA, L.; ROZZELL, J. D.; STEWART, J. D. Influence of cofactor regeneration strategies on preparative-scale, asymmetric carbonyl reductions by engineered *Escherichia coli*. **Organic Process Research & Development**, [s.l.], v. 20, p. 793-800, feb. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1021/op400312n>.

DORTMUND DATA BANK. Dielectric Constant of 1-Butanol. **Dortmund Data Bank**. Disponível em: [http://www.ddbst.com/en/EED/PCP/DEC\\_C39.php](http://www.ddbst.com/en/EED/PCP/DEC_C39.php). Acesso em: 16 mai. 2019.

DOUBSKY, J.; KLVANA, R.; LEHNERT, P.; RICHTER, J. **A process for preparing the key intermediate of apremilast, using enzymatic resolution of the racemic amines**. Depositante: ZENTIVA, K. S. n. WO2016192694 A1. Depósito: 06 jun. 2016. Concessão: 08 dez. 2016.

DREW, H. D. K.; PEARMAN. Chemiluminescent organic compounds. Part II. The effect of substituents on the closure of phthalhydrazides to 5- and 6-membered rings. **Journal of the Chemical Society**, [s.l.], v. 26, n. 0, p. 26-33. jan. 1937. DOI: <https://doi.org/10.1039/JR9370000026>.

DU, X.; LIU, J.; ZHOU, L. **Methods for preparing apremilast**. Depositante: Zhejiang Huahai Pharm CO LTD. n. CN106187857A. Depósito: 30 jun. 2016. Concessão: 07 dez. 2016.

EMA. Otezla. **EMA**, 2015. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/otezla>. Acesso em: 05 nov. 2019.

EMMA, T.; YAMAGUCHI, K.; WAKASA, Y.; YABE, A.; OKADA, R.; FUKUMOTO, M.; YANO, F.; KORENAGA, T.; UTAKA, M.; SAKAI, T. Transition-state models are useful for



versatile biocatalysts: kinetics and thermodynamics of enantioselective acylations of secondary alcohols catalyzed by lipase and subtilisin. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 22, p. 181-192. 2003.

FAN, Y.; KE, C.; SU, F.; LI, K.; YAN, Y. Various types of Lipases immobilized on dendrimer-functionalized magnetic nanocomposite and application in biodiesel preparation. **Energy & Fuels**, [s.l.], v. 31, n. 3-4, p. 4372-4381, jun. 2017. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(03\)00034-1](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(03)00034-1).

GAJ, S. **A novel synthetic pathway towards apremilast**. Depositante: Lek pharmaceuticals. n. WO2016202806A1. Depósito: 14 jun. 2016. Concessão: 22 dez. 2016.

GARCÍA-CERRADA, S.; REDONDO-GALLEGO, L.; MARTÍNEZ-OLID, F.; RINCÓN, J. A.; GARCÍA-LOSADA, P. Practical manufacture of 4-alkyl-4-aminocyclohexylalcohols using ketoreductases. **Organic Process Research & Development**, [s.l.], v. 21, n. 5, p. 779-784, apr. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.7b00048>.

GAZIC, S. I.; STAVBER, G. **A synthetic pathway towards apremilast**. Depositante: Lek pharmaceuticals. n. WO2017046319A1. Depósito: 16 nov. 2016. Concessão: 23 mar. 2017.

GEORGE, R. D.; SNOW, A. W. Synthesis of 3-nitrophthalonitrile and tetra- $\alpha$ -substituted phthalocyanines. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, [s.l.], v. 32, n. 2, p. 495-498, mar. 1995. DOI: <https://doi.org/10.1002/jhet.5570320219>.

GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 40, n. 3-4, p. 111-120, jun. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.02.010>.

GUO, X.; TANG, J-W.; YANG, J-T.; NI, G-W.; ZHANG, F-L.; CHEN, S-X. Development of a practical enzymatic process for preparation of (S)-2-chloro-1-(3,4-difluorophenyl)ethanol. **Organic Process Research & Development**, [s.l.], v. 21, n. 10, p. 1595-1601, aug. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.7b00230>.

IMAM, F.; AL-HARBI, N. O.; AL-HARBI, M. M.; ANSARI, M. A.; AL-ASMARI, A. F.; ANSARI, M. N.; AL-ANAZI, W. A.; BAHASHWAN, S.; ALMUTARI, M. M.; ALSHAMMARI, M.; KHAN, M. R.; ALSAAD, A. M.; ALOTAIBI, M. R. Apremilast prevent doxorubicin-induced apoptosis and inflammation in heart through inhibition of oxidative stress mediated activation of NF- $\kappa$ B signaling pathways. **Pharmacological Reports**, [s.l.], v. 70, n. 5, p. 993-1000, out. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2019.06.009>.

IMAM, F.; AL-HARBI, N. O.; AL-HARBI, M. M.; QAMAR, W.; ALJERIAN, K.; BELALI, O. M.; ALSANEA, S.; ALANAZI, A. Z.; ALHAZZANI, K. Apremilast ameliorates carfilzomib-induced pulmonary inflammation and vascular injuries. **International Immunopharmacology**, [s.l.], v. 66, n. 0, p. 260-266, jun. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.11.023>.

JINGXIA, Z.; LIANTAO, Z. **Synthetic method of medicine apremilast for treating psoriasis arthritis disease**. Depositante: University Sun Yat Sem. n. CN108084078A. Depósito: 21 nov. 2017. Concessão: 29 Mai. 2018.

KAZLAUSKAS, R. 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*. **The Journal of Organic Chemistry**, [s.l.], v. 56, n. 8, p. 2656-2665, apr. 1991. DOI: <https://doi.org/10.1021/jo00008a016>.

LAIRD, M.; TONG, L. X.; HI, L. S.; KIM, R. H.; MEEHAN, S. A.; FRANKS, A. J. Jr. Novel use of apremilast for adjunctive treatment of recalcitrant pyoderma gangrenosum. **JAAD Case Reports**, [s.l.], v. 3, n. 3, p. 228-229, may. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jdc.2017.02.019>.

LI, J.; LIMBERAKIS, C.; PFLUM, A. **Modern organic synthesis in the laboratory: a collection of standard experimental procedures**. 3 ed. Oxford: Oxford University Press, 2007. 198 p.

LAHOTI, A. M.; NEELA, P. K.; PONNAIAH, R.; SRINIVAS, P. G. S. **Improved process for the preparation of apremilast**. Depositante: DAVULLURI, R. R. n. WO2017179065A1. Depósito: 27 jan. 2017. Concessão: 19 out. 2017.

MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic Lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 38, n. 5, p. 715-721. dec. 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00194-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00194-2).

MAN, H-W.; SCHAFER, P.; WONG, L. M.; PATTERSON, R. T.; CORRAL, L. G.; RAYMON, H.; TANG, Y.; BARBUSIS, D. M.; CHEN, R.; STIRLING, D.; MULLER, G. W. Discovery of (S)-N-(2-[1-(3-ethoxy-4-methoxyphenyl)-2-methanesulfonyl]ethyl)-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1 H -isoindol-4-yl)acetamide (Apremilast), a potent and orally active phosphodiesterase 4 and tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibitor. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 52, n. 6, p. 1522-1524, mar. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1021/jm900210d>.

MOURE, V. R. FABRÍCIO, C.; FRENSCH, G.; MARQUES, F. A.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Enhancing the enantioselectivity of the lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11 towards the resolution of secondary allylic alcohols. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s.l.], v. 3, n. 2, p. 146-153, apr. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.011>.

NASÁRIO, ; MORAN, J. S.; RODRIGUES, A. R. Deracemization of *sec*-alcohols through sequential application of *C. albicans* and ketoreductases. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 30, n. 4, p. 1678-4790, apr. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20180205>.

NASÁRIO, F. D. **Reações redox em biocatálise: desracemização de álcoois secundários e reações multi-enzimáticas em cascata com álcoois alílicos**. Universidade Estadual De Campinas. Campinas. 2017. p. 186.

OM, A.; HILL, D.; FELDMAN, S. Apremilast. In: WU, J.; FELDMAN, S.; LEBWOHL, M. **Therapy for Severe Psoriasis**. Amsterdam: Elsevier, 2018. Cap. 7, p. 75-82.

OSUNA, S.; JIMÉNEZ-OSÉS, G.; NOEY, E. L.; HOUK, K. N. Molecular dynamics

explorations of active site structure in designed and evolved enzymes. **Accounts of Chemical Research**, [s.l.], v. 48, n. 4, p. 1080-1089, mar. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1021/ar500452q>.

OTTOSSON, J.; TEKNISKA HÖGSKOLAN, S. **Enthalpy and entropy in enzyme catalysis: a study of lipase enantioselectivity**. Estados Unidos: Stockholm, 2001. 16-19 p.

PANG, N.; GU, S. S.; WANG, J. CUI, H. S.; WANG, F. Q.; LIU, X.; ZHAO, X. Y, WU, F. A. A novel chemoenzymatic synthesis of propyl caffeate using Lipase-catalyzed transesterification in ionic liquid. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 139, n. 0, p. 337-342, jul. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.057>.

PAPP, K.; REICH, K.; LEONARDI, C. L.; KIRCIK, L.; CHIMENTI, S.; LANGLEY, R. G.; HU, C.; STEVENS, R. M.; DAY, R. M.; GORDON, K. B.; KORMAN, N. J.; GRIFFITHS, C. E. Apremilast, an oral phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitor, in patients with moderate to severe plaque psoriasis: Results of a phase III, randomized, controlled trial (Efficacy and Safety Trial evaluating the effects of apremilast in psoriasis [ESTEEM] 1). **Journal of the American Academy of Dermatology**, [s.l.], v. 73, n. 1, p. 37-49, jul. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2015.03.049>.

PATEL, R. Applications of Biocatalysis for Pharmaceuticals and Chemicals. In: **Organic Synthesis Using Biocatalysis**. Amsterdam: Elsevier, 2016. Cap. 11, p. 339-411.

PATEL, R. N. Biocatalysis for synthesis of pharmaceuticals. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 26, n. 7, p. 1252-1274, apr. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.05.023>.

PERSSON, M.; COSTES, D.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTS, P. Effects of solvent, water activity and temperature on Lipase and hydroxynitrile lyase enantioselectivity. **Enzyme and Microbial Technology**, [s.l.], v. 30, n. 7, p. 916-923, jun. 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00033-9](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00033-9).

PILISSÃO, C.; CARVALHO, P. O.; NASCIMENTO, M. G. Potential application of native Lipases in the resolution of (*RS*) - phenylethylamine. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 21, n. 6, p. 973-977, apr. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532010000600005>.

POLLARD, D. J.; WOODLEY, J. M. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. **Trends in Biotechnology**, [s.l.], v. 25, n. 2, p. 66-73, feb. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.12.005>.

QIANG, H.; SHENGYIN, Z. **Preparation method of chiral *S/R*-3-ethoxy-4-methoxy-alpha[(methylsulfonyl)methyl] benzyl alcohol**. Depositante: National Dong Hwa University. n. CN105461602A. Depósito: 27 nov. 2015. Concessão: 06 br. 2016.

QIN, F. Q.; QIN, B.; ZHANG, W.; LIU, Y.; SU, X.; ZHU, T.; OUYANG, J.; GUO, J.; LI, Y.; ZHANG, F.; TANG, J.; JIA, X.; YOU, S. Discovery of a switch between prelog and anti-prelog reduction toward halogen-substituted acetophenones in short-chain dehydrogenase/reductases. **ACS Catalysis**, [s.l.], v. 8, n. 7, p. 6012-6020, may. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b00807>.

RARIY, R. V.; KLIBANOV, A. M. On the relationship between enzymatic enantioselectivity in organic solvents and enzyme flexibility. **Biocatalysis and Biotransformation**, [s.l.], v. 18, n. 5, p. 401-407, jan. 2009. DOI: <https://doi.org/10.3109/10242420009015259>.

RIVA, S.; FESSNER, W-D. **Cascade Biocatalysis: Integrating Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions**. 3 ed. Weinheim: Wiley VCH, 2014. Cap. 1, p. 96.

ROSENTHAL, K.; LÜTZ, S. Recent developments and challenges of biocatalytic processes in the pharmaceutical industry. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, [s.l.], v. 11, n. 0, p. 58-64, jun. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.03.015>.

RUCHELM, A. L.; CONNOLLY, T. J. Enantioselective synthesis of the apremilast aminosulfone using catalytic asymmetric hydrogenation. **Tetrahedron: Asymmetry**, [s.l.], v. 26, n. 10-11, p. 553-559, may. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2015.03.010>.

SAKAI, K.; SAKURAI, R.; HIRAYAMA, N. Chiral discrimination controlled by the solvent dielectric constant. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 15, n. 7, p. 1073-1076. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2004.02.015>.

SALIHU, A.; ALAM, Z. Solvent tolerant lipases: A review. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 50, n. 1, p. 86-96, jan. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.10.019>.

SCHIBLER, F.; HEIDEMEYER, K.; KLÖGEN, H-W.; KESHAVAMURTHY, V.; YAWALKAR, N. Apremilast for treatment of recalcitrant aphthous stomatitis. **JAAD Sase Reports**, [s.l.], v. 3, n. 5, p. 410-411, sep. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jdcr.2017.06.017>.

SEHAJPAL, P. KIRAR, S.; GHOSH, S.; BANERJEE, U. C. Generation of novel family of reductases from PCR based library for the synthesis of chiral alcohols and amines. **Enzyme and Microbial Technology**, [s.l.], v. 118, n. 0, p. 83-91, nov. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.07.006>.

SHENGYIN, Z.; QIANG, H. **Preparation method of Apremilast**. Depositante: National Dong Hwa University. n. CN105330586A. Depósito:27 nov. 2015. Concessão: 17 feve. 2016.

SILVA, V. C. F.; CONTESINI, F. J.; CARVALHO, P. O. Characterization and catalytic activity of free and immobilized Lipase from *Aspergillus niger*: a comparative study. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 19, n. 8, p. 1468-1474, mar. 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532008000800005>.

SILVA, M. R.; MATTOS, M. C.; Oliveira, M. C. F.; LEMOS, T. L. G.; RICARDO, N. M. P. S.; GONZALO, G.; LAVANDERA, I.; GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; GOTOR, V. Asymmetric chemoenzymatic synthesis of *N*-acetyl- $\alpha$ -amino esters based on Lipase-catalyzed kinetic resolutions through interesterification reactions. **Tetrahedron**, [s.l.], v. 70, n. 13, p. 2264-2271, apr. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tet.2014.02.012>.

STEFANUCCI, A.; DIMMITO, M. P.; ZENGIN, G.; LUISI, G.; MIRZAIE, S.; NOVELLINO, E.; MOLLICA, A. Discovery of novel amide tripeptides as pancreatic Lipase inhibitors by virtual screening. **New Journal of Chemistry**, [s.l.], v. 43, n. 7, p. 3208-3217, jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1039/C8NJ05884A>.

SUN, H.; ZHANG, H.; ANG, E. L.; ZHAO, H. Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 26, n. 7, p. 1275-1284, apr. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.043>.

SYU, J-F.; GOPULA, B.; JIAN, J-H.; LI, W-S.; KUO, T-S.; WU, P-Y.; HENCHKE, J. P.; HSIEH, M-C.; TSAI, M-K.; WU, H-L. Asymmetric synthesis of  $\beta$ -aryl  $\beta$ -imido sulfones using rhodium catalysts with chiral diene ligands: synthesis of apremilast. **Organic Letters**, [s.l.], v. 21, n. 12, p. 4614-4618, may. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.9b01513>.

TSOU, C. L. The role of active site flexibility in enzyme catalysis. **Biochemistry**, [s.l.], v. 63, n. 3, p. 253-8, mar. 1998.

VÉLEZ, A. **Apremilast en artritis psoriásica y psoriasis en placa**. Hospital Reina Sofia Córdoba. Andalucía, p. 14. 2016.

VOSSSEN, A. R. J. V.; VAN, D. M. B. A.; VAN der ZEE, H. H.; PRENS, E. P. Apremilast for moderate hidradenitis suppurativa: Results of a randomized controlled trial. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [s.l.], v. 80, n. 1, p. 80-88, jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.06.046>.

WU, Y.; HUANG, Y. Y.; WU, D.; LUO, H. B. Novel phosphodiesterase inhibitors for cognitive improvement in Alzheimer's Disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 61, n. 13, p. 5467-5483, jan. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01370>.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s.l.], v. 82, n. 10, p. 3192-3196, may. 1985. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.82.10.3192>.

ZHANG, P-L.; CHENG, Q.; XU, W.; TANG, K-W. Enzymatic enantioselective hydrolysis of 2-(3-chlorophenyl) propionic acid ester enhanced by PEG: experiment and optimization. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, [s.l.], v. 57, n. 32, p. 11246-11256, aug. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.8b02377>.

ZHOU, W.; LI, S.; LU, W.; YUAN, J.; XU, Y.; LI, H.; HUANG, J.; ZHAO, Z. Isoindole-1,3-dione derivatives as RSK2 inhibitors: synthesis, molecular docking simulation and SAR analysis. **MedChemComm**, [s.l.], v. 7, n. 2, p. 292-296, nov. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5MD00469A>.

## ANEXO A- CÁLCULO DO EXCESSO ENANTIOMÉRICO E DADOS FÍSICOS E ESPECTROSCÓPICOS

### 7.1 Cálculo do excesso enantiomérico, conversão e razão enantiomérica

A eficiência da resolução cinética foi avaliada com base na pureza óptica dos compostos, expressa em termos de excesso enantiomérico do substrato ( $e.e.s$ ) e produto ( $e.e.p$ ), usando as seguintes equações. (1), (2) :

$$e.e.s = \frac{A - B}{A + B} \quad (1)$$

$$e.e.p = \frac{A - B}{A + B} \quad (2)$$

$A$  representa o enantiômero maioritário e  $B$  representa o enantiômero minoritário representado pelas áreas dos picos cromatográficos.

A conversão ( $c$ ) é calculada usando a equação. (3) :

$$c = \frac{e.e.s}{e.e.s + e.e.p} \quad (3)$$

A enantiosseletividade foi expressa como razão enantiomérica ( $E$ ) e calculada pela equação (4) :

$$E = \frac{\ln[1 - c(1 + e.e.p)]}{\ln[1 - c(1 - e.e.p)]} \quad (4)$$

Os resultados do  $e.e.s$  e  $e.e.p$  são expressos em porcentagem utilizando as equações (5), (6) :

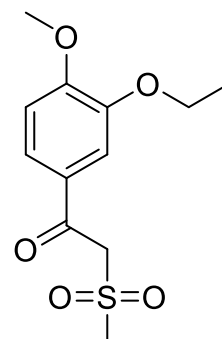
$$e.e.s = \frac{A - B}{A + B} * 100 \quad (5)$$

$$e.e.p = \frac{A - B}{A + B} * 100 \quad (6)$$

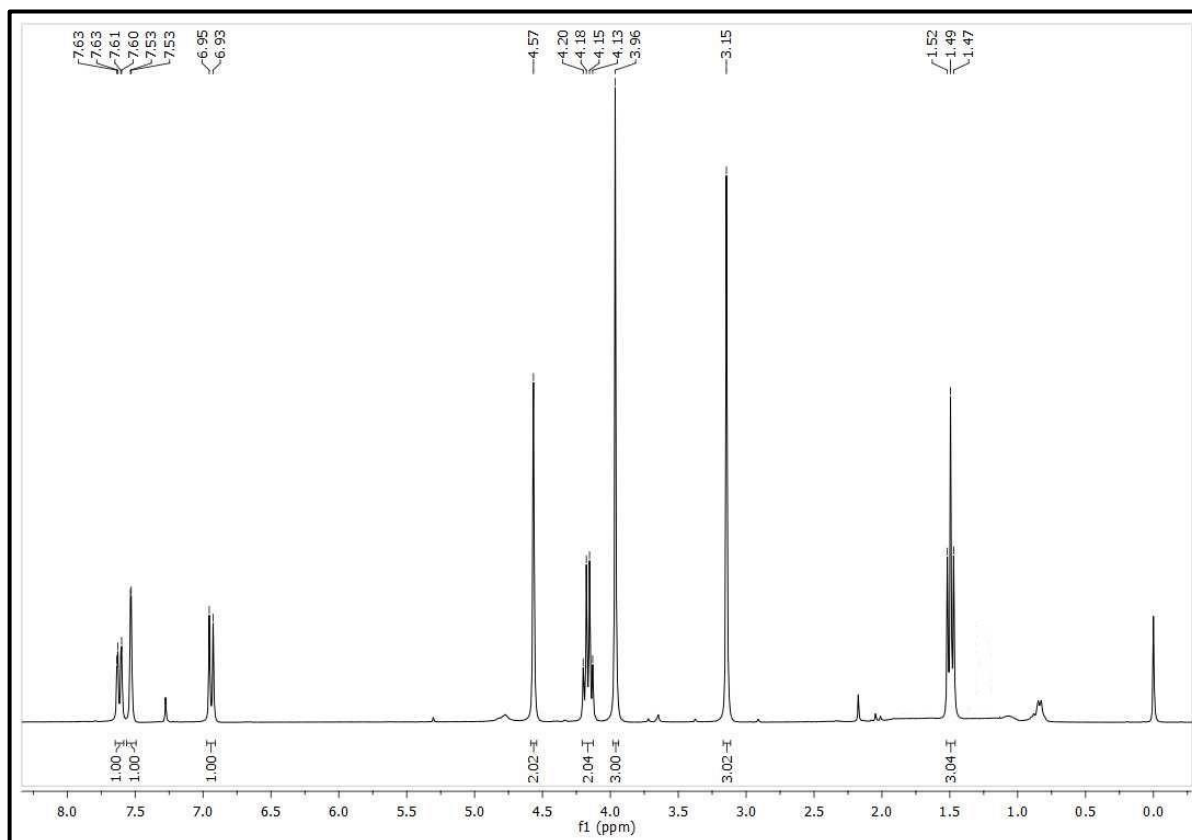
Além disso, a conversão ( $c$ ) também é calculada em porcentagem, usando (5), (6) .

## 7.2 Dados físicos e espectroscópicos do 1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etanona (12)

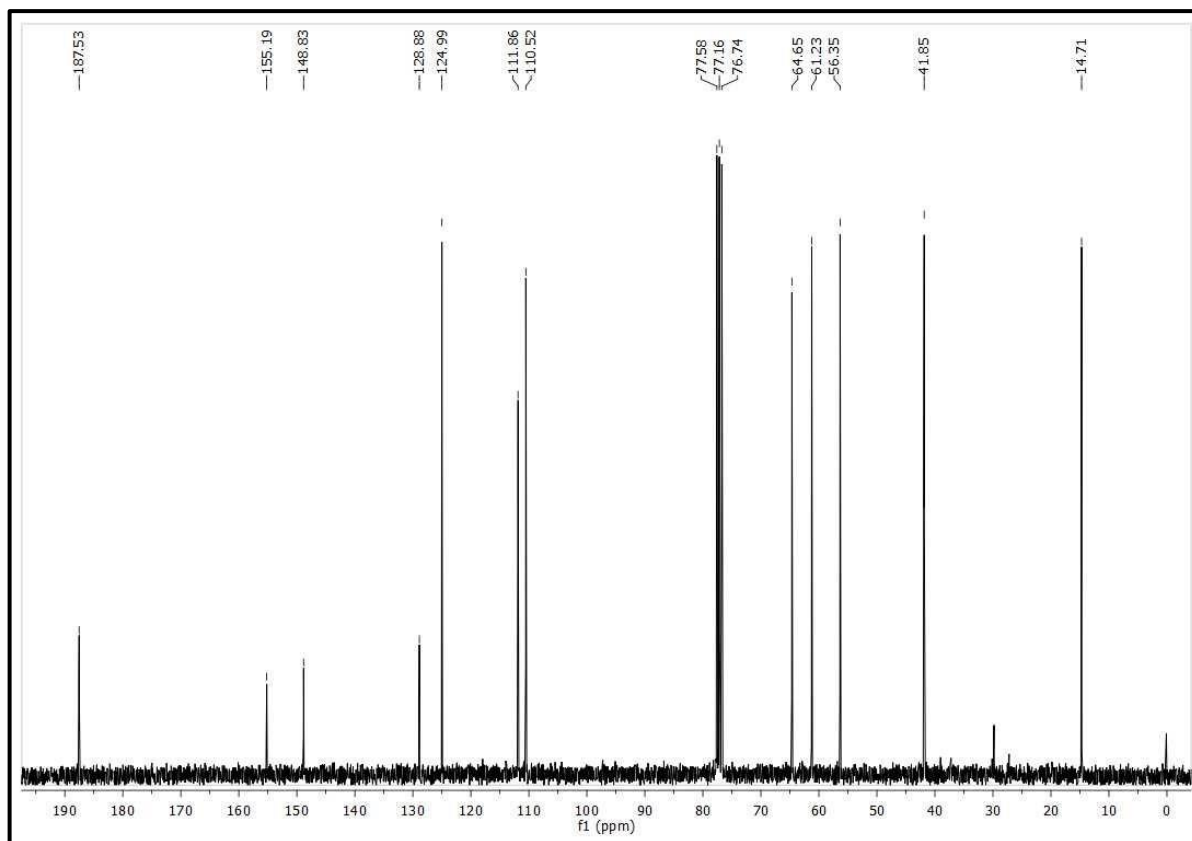
Sólido branco,  $R_f$  (Hexano/AcOEt, 1:1): 0,47, p.f.: 144-145 °C, **RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) 7,62 (dd,  $J = 8,4, 1,9$  Hz, 1H), 7,53 (d,  $J = 1,7$  Hz, 1H), 6,94 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 4,57 (s, 2H), 4,16 (q,  $J = 7,0$  Hz, 2H), 3,96 (s, 3H), 3,15 (s, 3H), 1,49 (t,  $J = 7,0$  Hz, 3H), **RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) 187,5, 155,1, 148,8, 128,8, 124,9, 111,8, 110,5, 64,6, 61,2, 56,3, 41,8, 14,7.



### RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ):

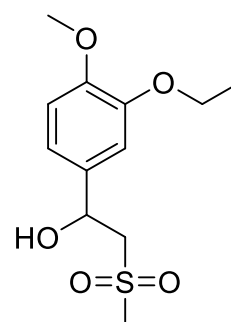


RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

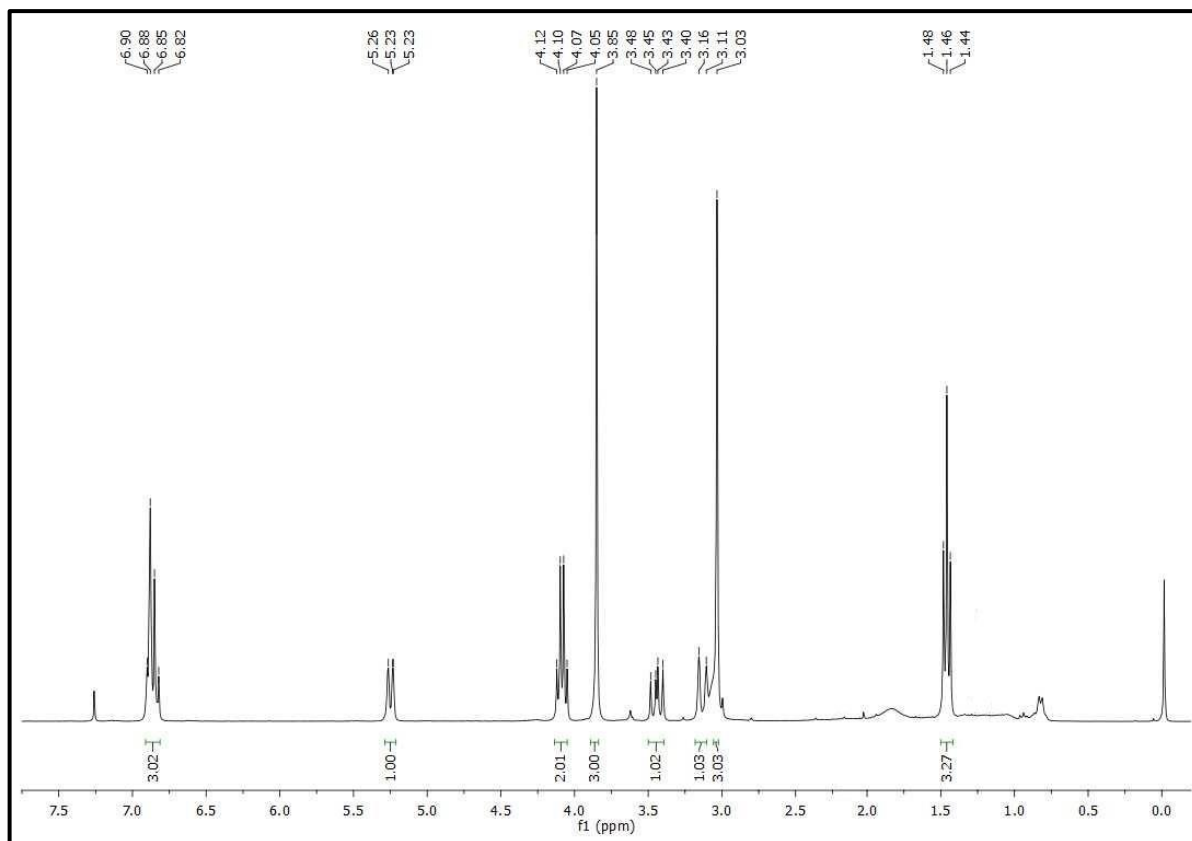
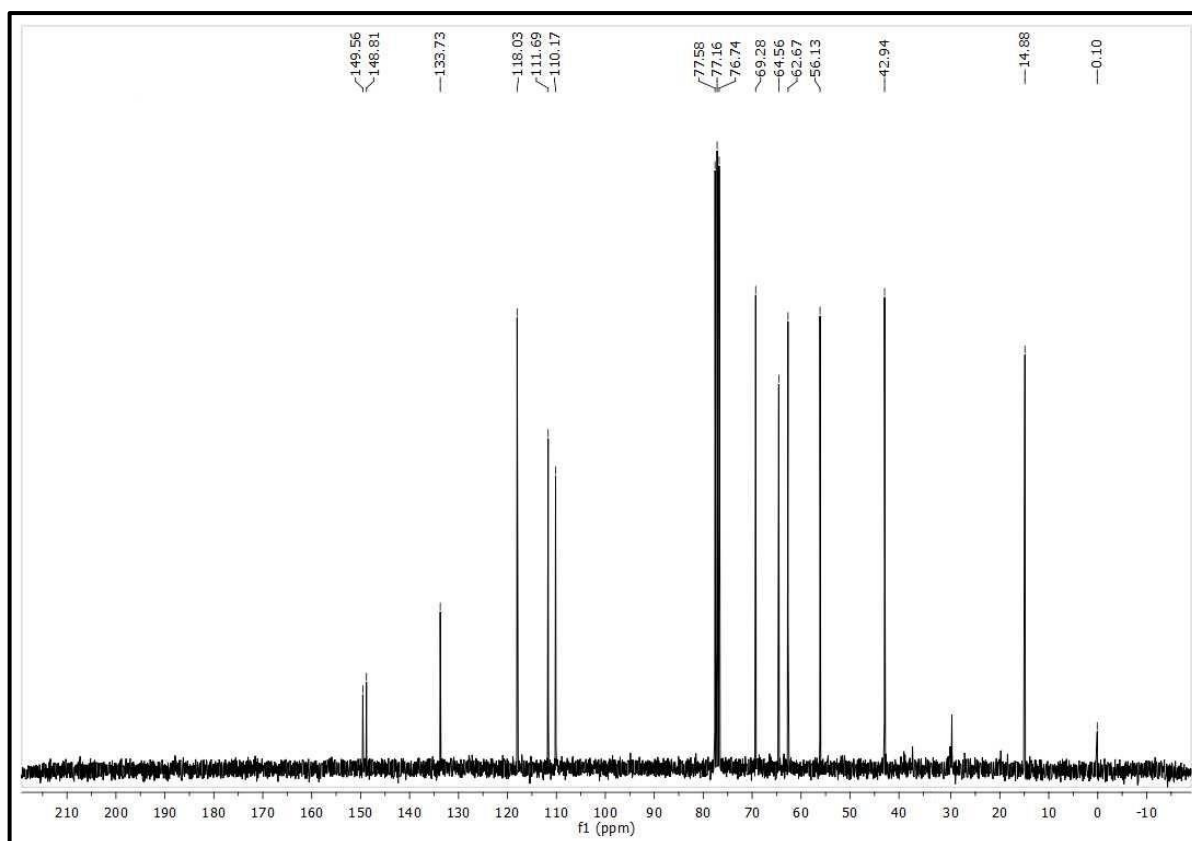


### 7.3 Dados físicos e espectroscópicos do 1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etanol (*rac*-14)

Sólido branco,  $R_f$  (Hexano/AcOEt, 1:1): 0,33, p.f.: 115-116 °C, RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 6,82-6,90 (m, 3H), 5,25 (d,  $J = 9,0$  Hz, 1H), 4,10 (q,  $J = 7,0$  Hz, 2H), 3,85 (s, 1H), 3,44 (dd,  $J = 15,0$  e  $9,0$  Hz, 1H), 3,14 (d,  $J = 15,0$  Hz, 1H), 3,03 (s, 3H), 1,46 (t,  $J = 7,0$  Hz, 3H), RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 149,5, 148,8, 133,7, 118,0, 111,6, 110,1, 69,2, 64,5, 62,6, 56,1, 42,9, 14,8.

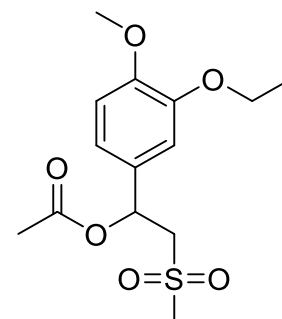




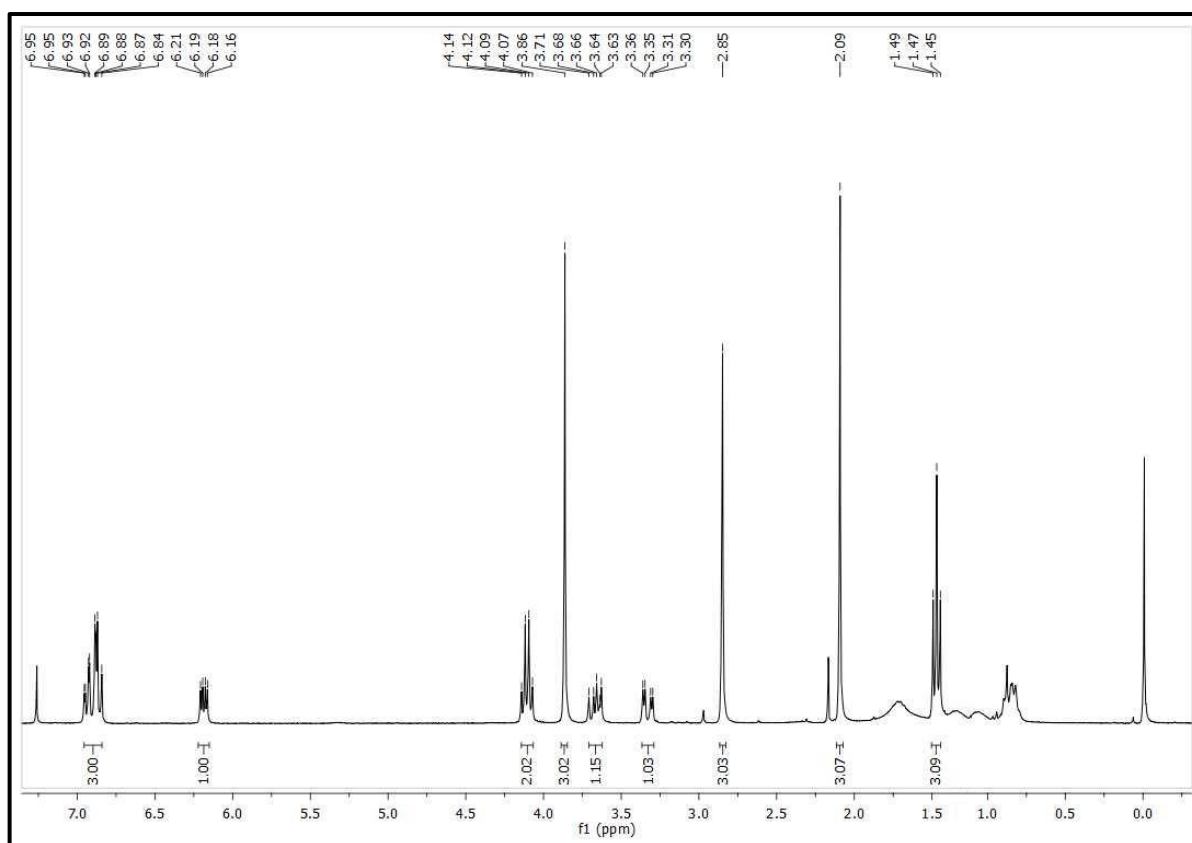
RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

#### 7.4 Dados físicos e espectroscópicos do acetato de 1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etila (*rac*-15)

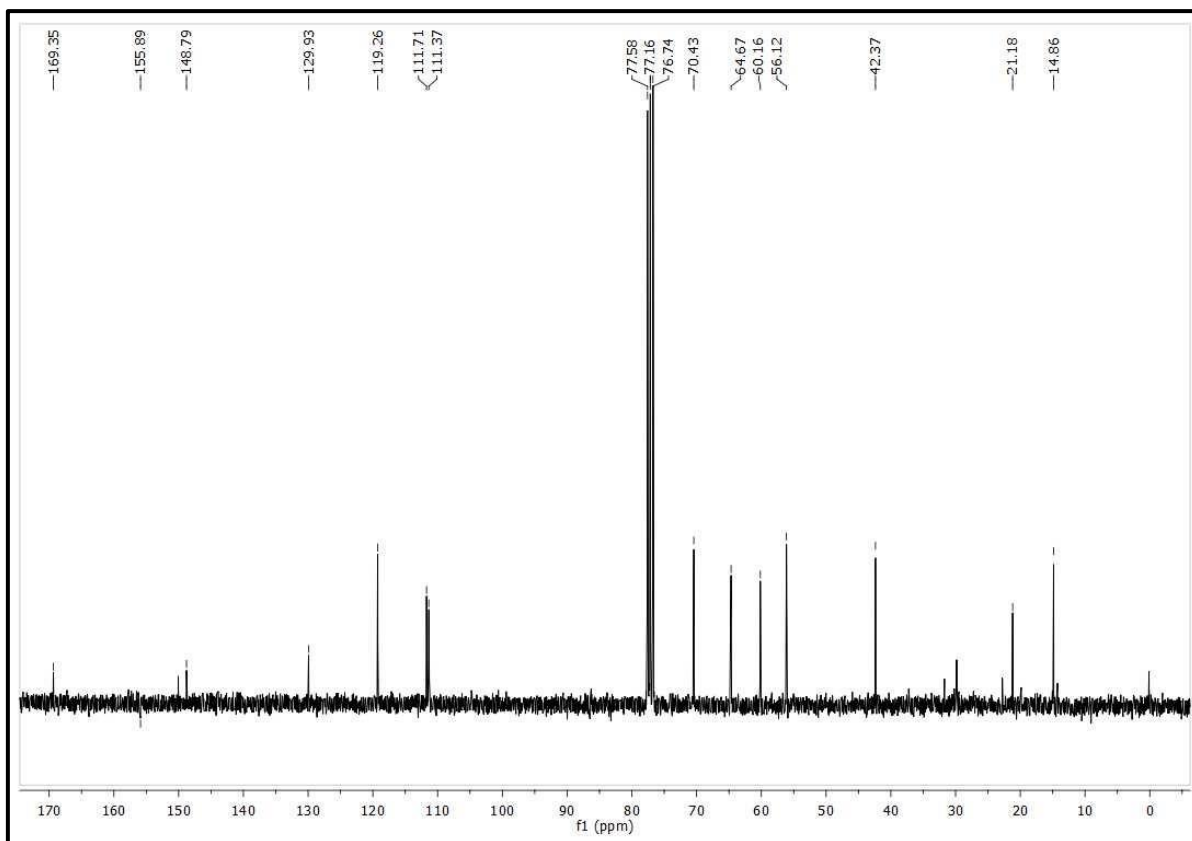
Sólido branco,  $R_f$  (Hexano/AcOEt, 5:5): 0,43, p.f.: 99-100 °C, **RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) 6,84-6,95 (m, 3H), 6,19 (dd,  $J = 9,0$  e  $6,0$  Hz, 1H), 4,2 (q,  $J = 7,0$  Hz, 2H), 3,86 (s, 1H), 3,63-3,71 (m, 1H), 3,33 (dd,  $J = 15,0$ , 3 Hz, 1H), 2,85 (s, 3H), 2,09 (s, 3H), 1,47 (t,  $J = 7,0$  Hz, 3H), **RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) 169,3, 150,1, 149,9, 148,7, 129,9, 119,2, 111,7, 111,3, 70,4, 64,6, 60,1, 56,1, 42,3, 21,1, 14,8.



#### RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ):

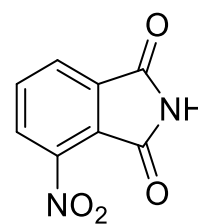


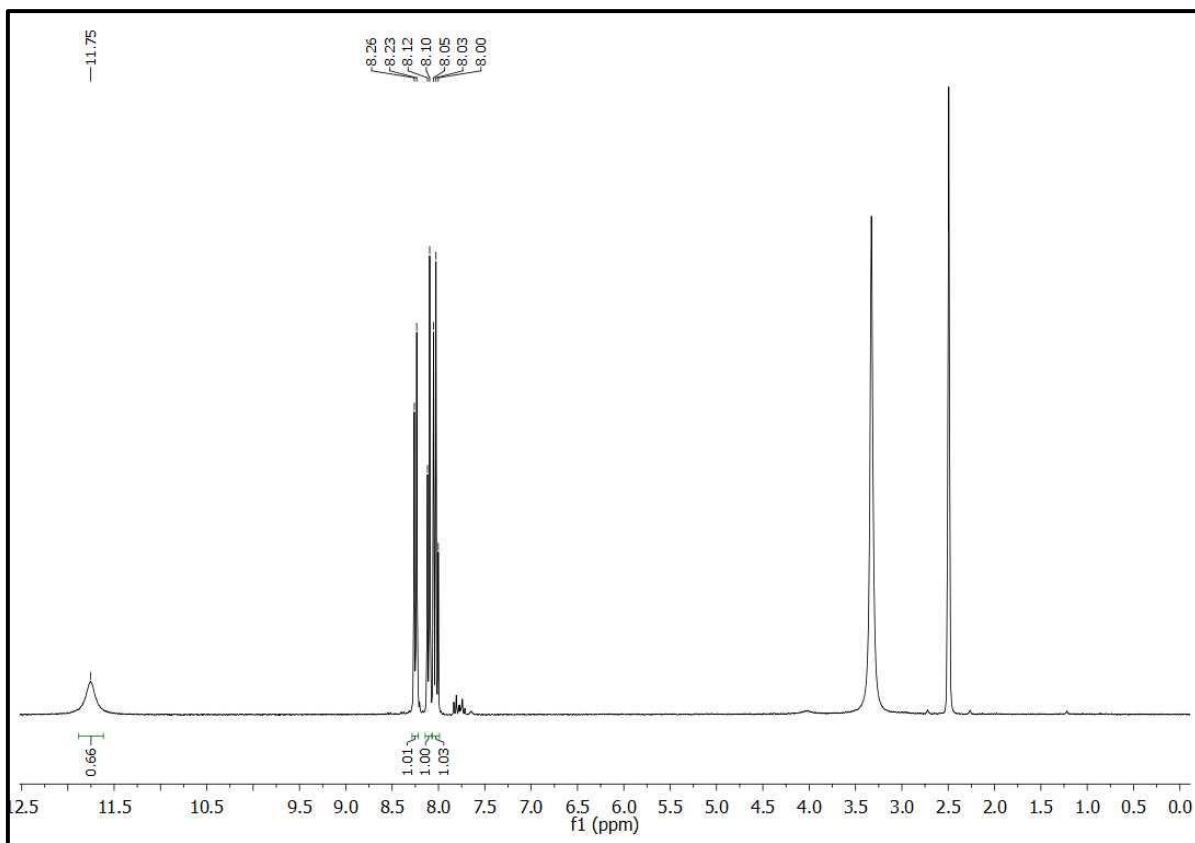
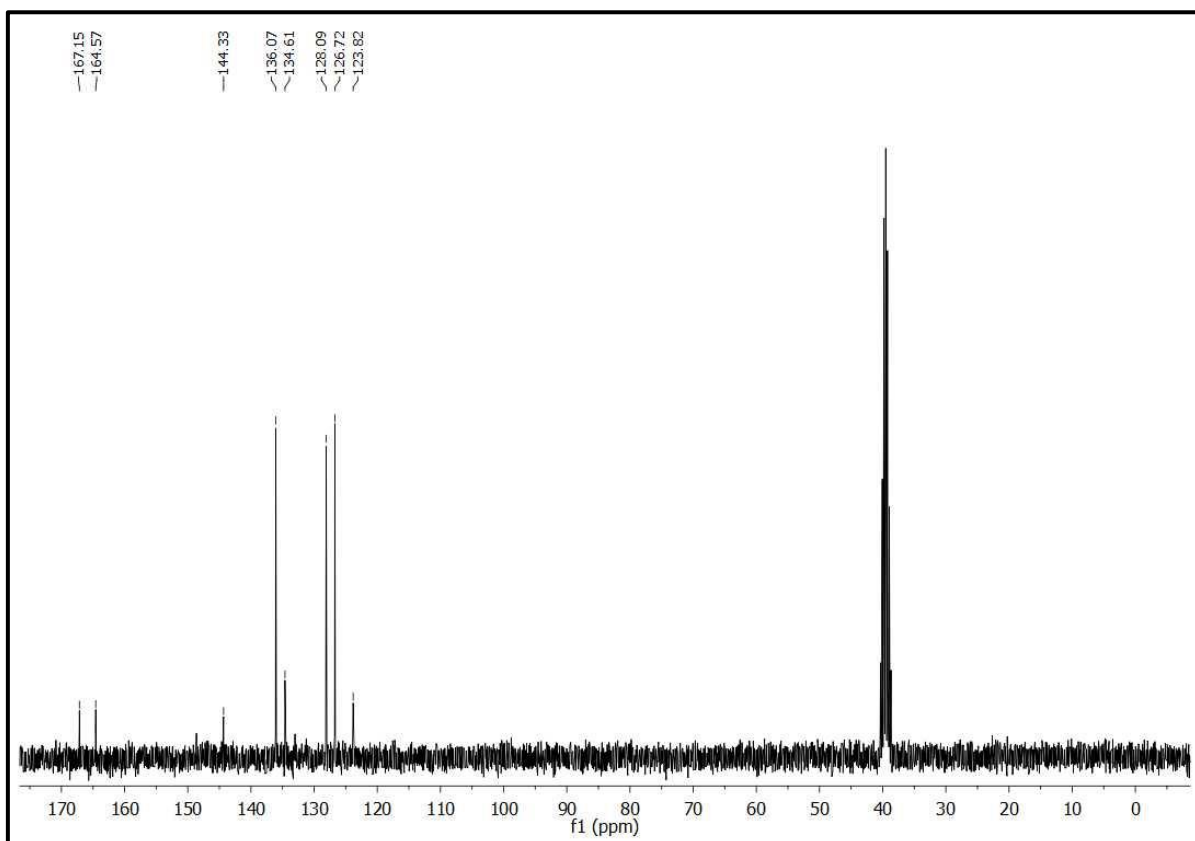
RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):



7.5 Dados físicos e espectroscópicos do 4-nitro-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (17)

Sólido amarelo,  $R_f$ (Hexano/AcOEt, 1:1): 0,61, p.f.: 213-215 °C, RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm) 11,75 (s, 1H), 8,25 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H), 8,11 (d,  $J = 7,0$  Hz, 1H), 8,03 (t,  $J = 7,7$  Hz, 1H), RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm) 167,1, 164,5, 144,3, 136,1, 134,6, 128,1, 126,7, 123,8.

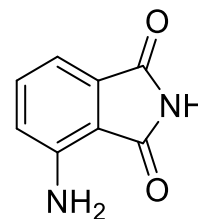


**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO):****RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO):**

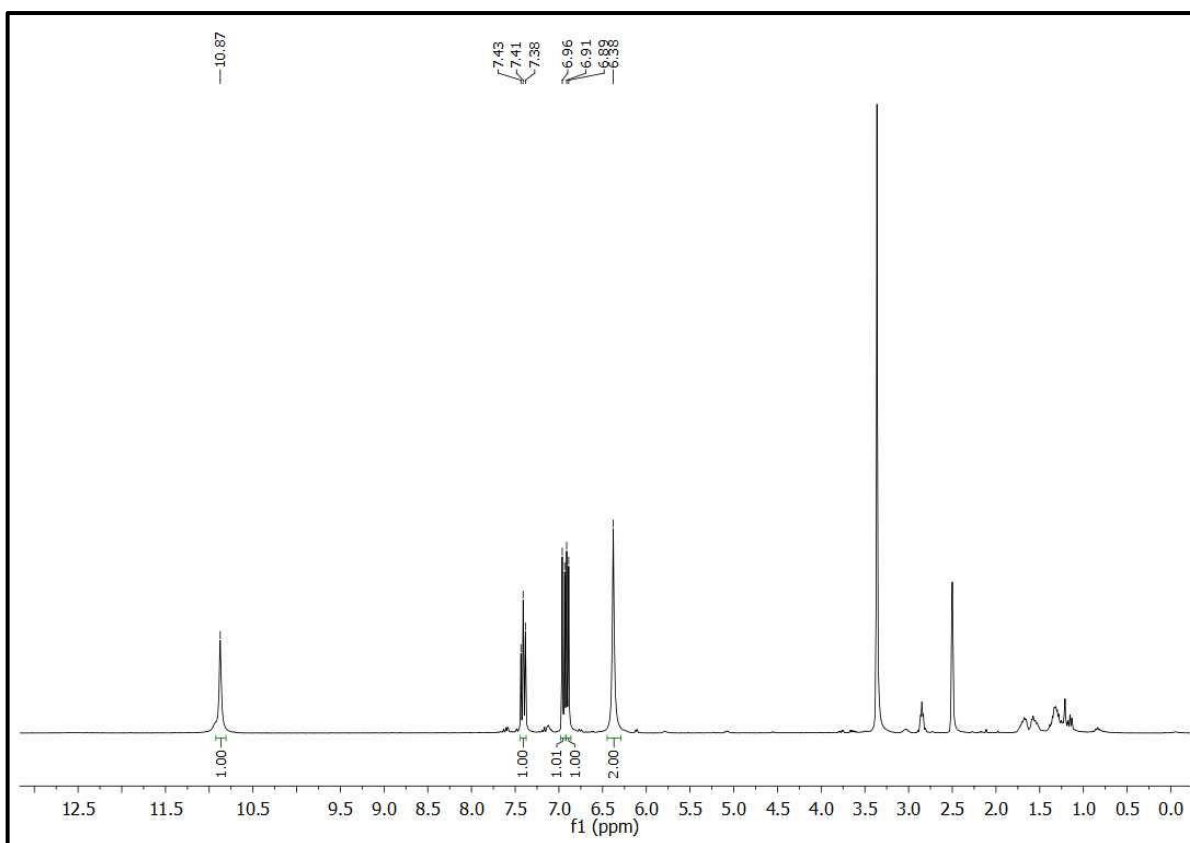
### 7.6 Dados físicos e espectroscópicos da 4-aminoisindolina-1,3-diona (18)

Sólido verde fluorescente,  $R_f$ (Hexane/AcOEt, 1:1):

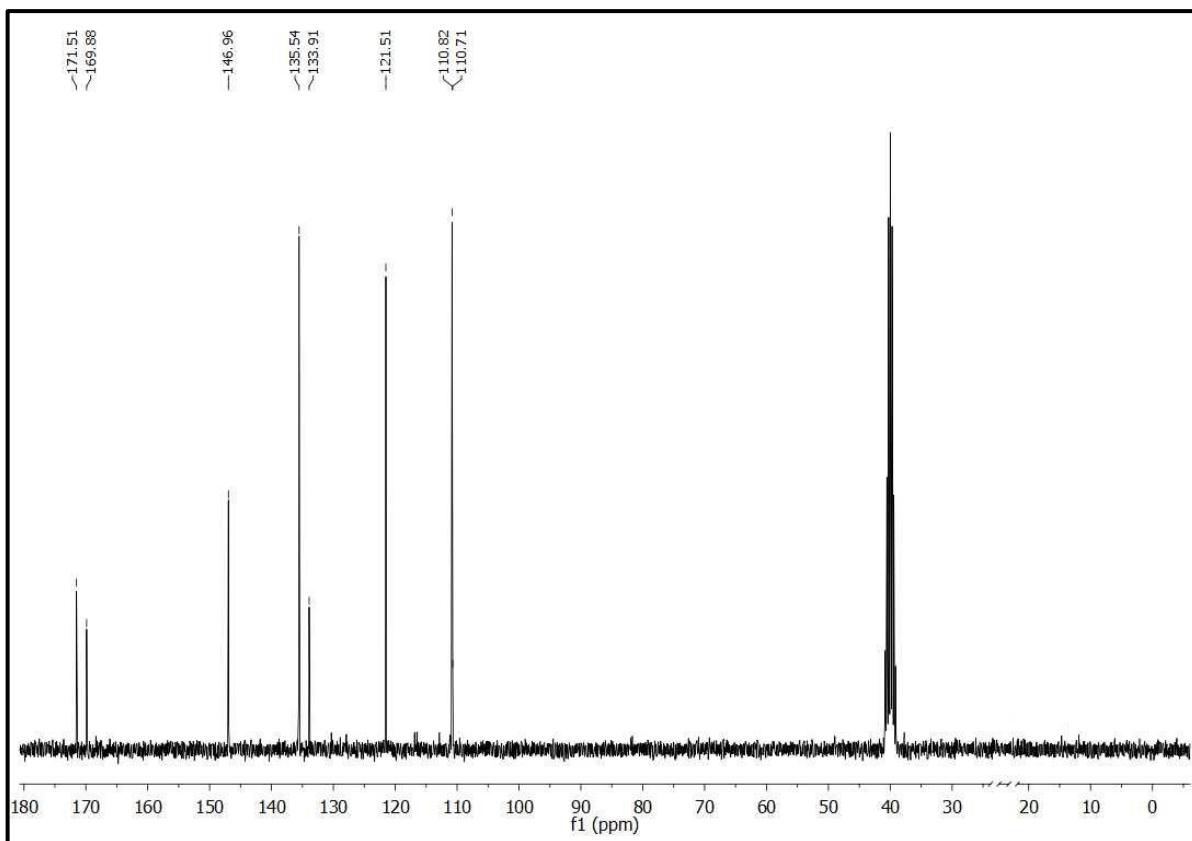
0,59, p.f.: 265-266 °C, **RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO):**  $\delta$  (ppm) 10,87 (s, 1H), 7,4 (t,  $J = 9$  Hz, 1H), 6,95 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H), 6,90 (d,  $J = 7,0$  Hz, 1H), 6,38 (s, 1H), **RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO):**  $\delta$  (ppm) 171,5, 169,8, 146,9, 135,5, 133,9, 121,5, 110,8, 110,7.



**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO):**



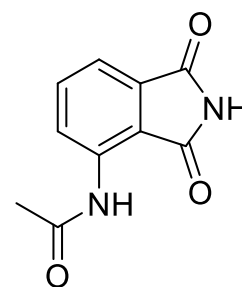
**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO):**

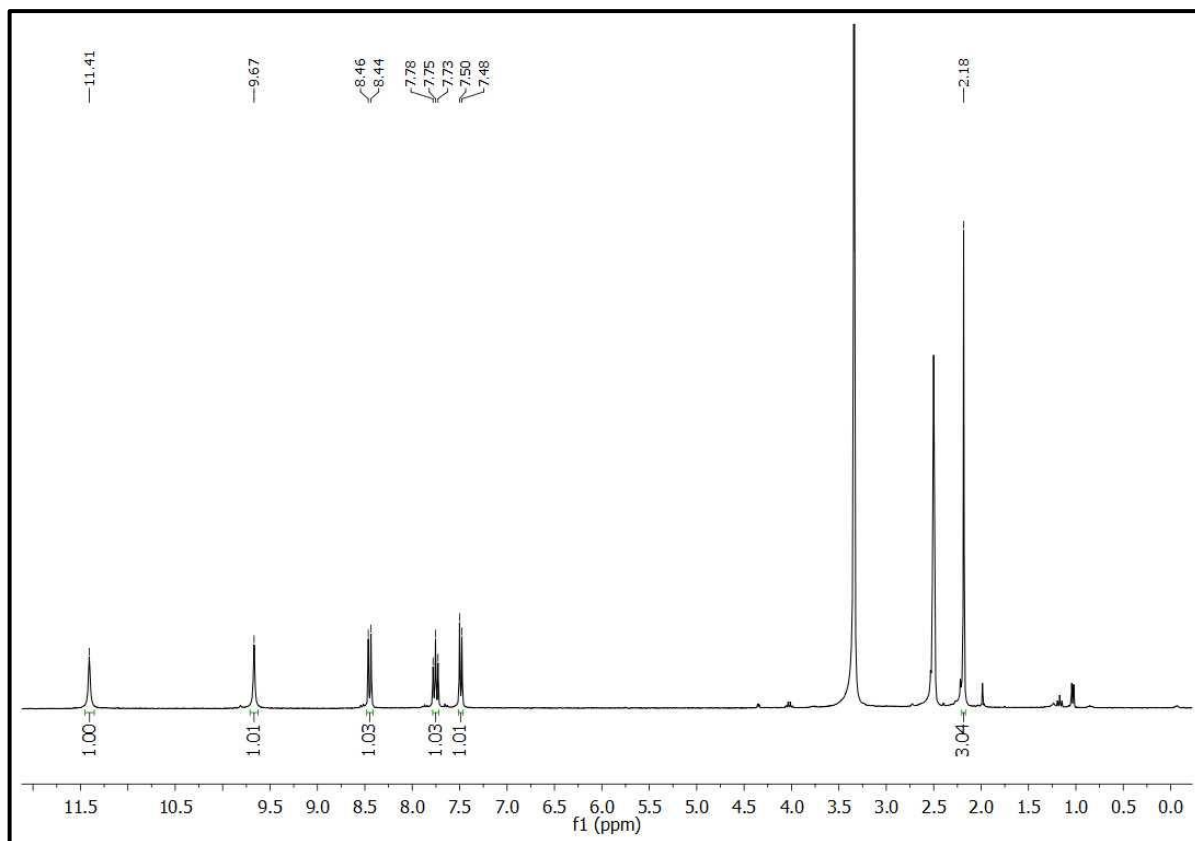
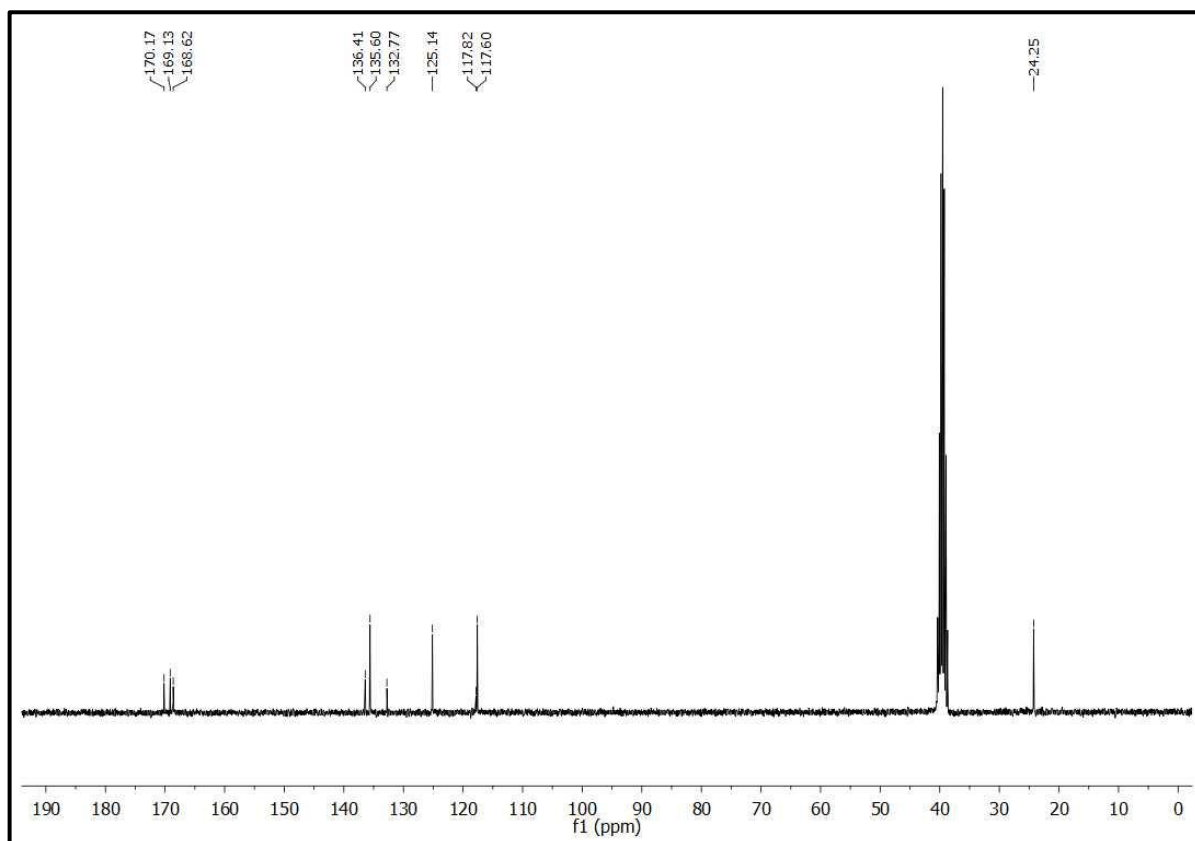


**7.7 Dados físicos e espectroscópicos da 4-acetilamino-isoindol-1,3-diona (19)**

Sólido branco,  $R_f$  (Hexano/AcOEt, 1:1): 0,6, p.f.:

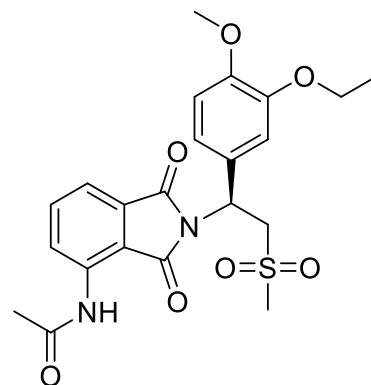
236-237 °C, **RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO):**  $\delta$  (ppm) 11,41 (s, 1H), 9,67 (s, 1H), 8,45 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H), 7,75 (t,  $J = 7,8$  Hz, 1H), 7,49 (d,  $J = 7,3$  Hz, 1H), 2,18 (s, 3H), **RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO):**  $\delta$  (ppm) 170,2, 169,1, 168,6, 136,4, 135,6, 132,7, 125,1, 117,8, 117,6, 24,2.



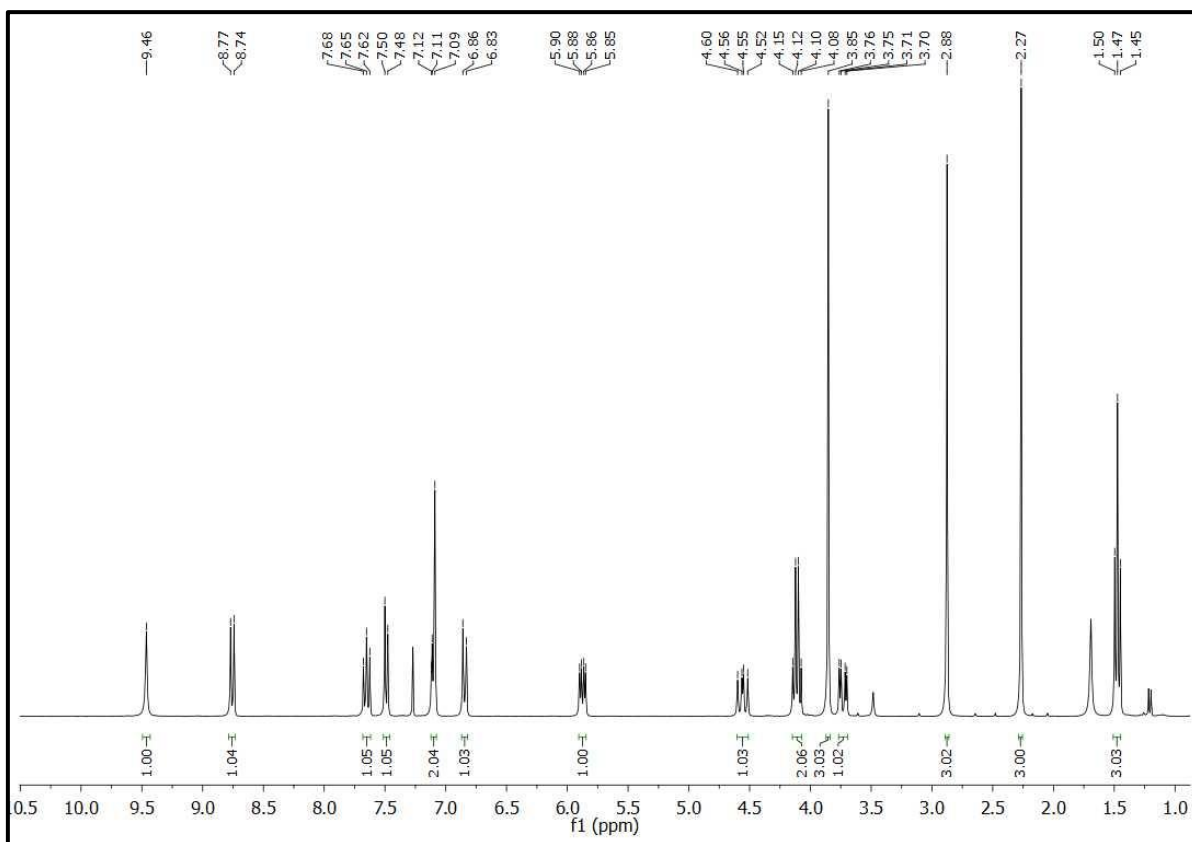
**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO):****RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO):**

## 7.8 Dados físicos e espectroscópicos do apremilast (*S*)-1

Sólido branco,  $R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 0,95:0,05) = 0,78, p.f.: 175-176 °C, **RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) 9,46 (s, 1H), 8,76 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H), 7,65 (t, 9,0 Hz, 1H), 7,49 (d,  $J = 7,3$  Hz, 1H), 7,15 – 7,05 (m, 2H), 6,84 (d,  $J = 8,9$  Hz, 1H), 5,87 (dd,  $J = 10,5, 4,3$  Hz, 1H), 4,56 (dd,  $J = 14,3, 10,6$  Hz, 1H), 4,11 (q,  $J = 7,0$  Hz, 2H), 3,85 (s, 3H), 3,73 (dd,  $J = 14,4, 4,4$  Hz, 1H), 2,88 (s, 3H), 2,27 (s, 3H), 1,47 (t,  $J = 7,0$  Hz, 3H), **RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) 169,6, 169,3, 167,6, 149,9, 148,8, 137,7, 136,2, 131,2, 129,4, 125,1, 120,4, 118,3, 115,3, 112,6, 111,6, 64,7, 56,1, 54,6, 48,7, 41,7, 25,1, 14,8.

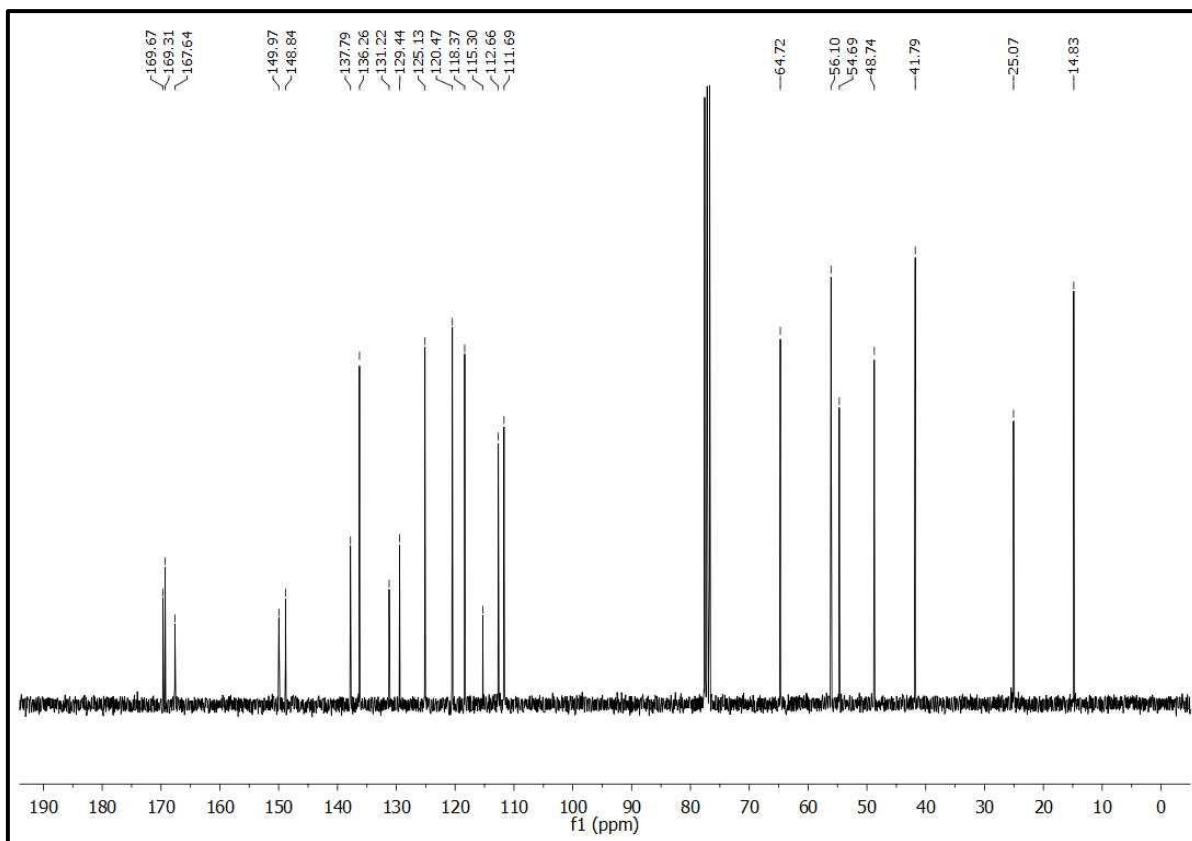


### RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ):



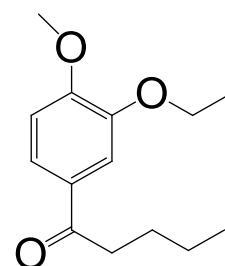


RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

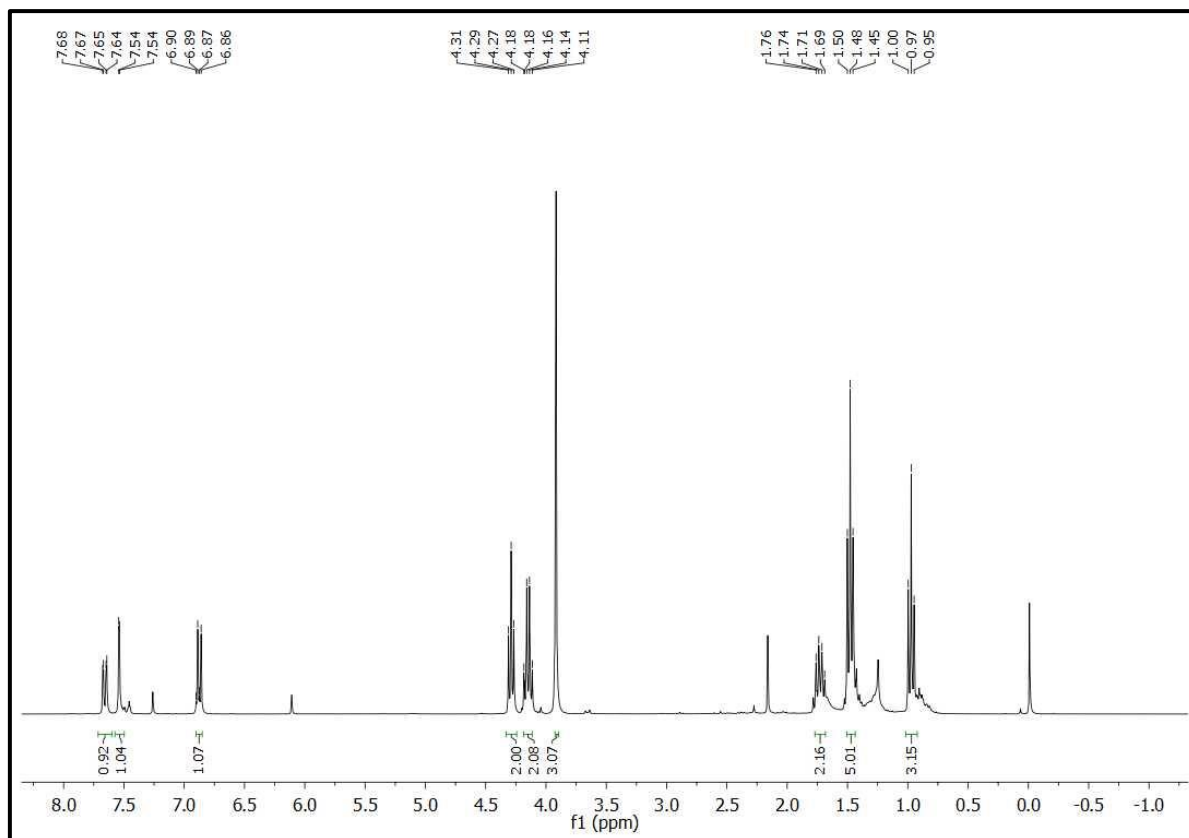


### 7.9 Espectro de ressonância magnética nuclear $^1\text{H}$ da 1-(4-etóxi-3-metoxifenil)pentan-1-ona

Óleo amarelo,  $R_f$  (Hexano/ $\text{AcOEt}$ , 0,4:0,6) = 0,85, RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 7,66 (dd,  $J = 8,4, 1,9$  Hz, 1H), 7,54 (d,  $J = 1,9$  Hz, 1H), 6,88 (dd,  $J = 8,3, 4,2$  Hz, 1H), 4,29 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H), 4,14 (q,  $J = 7,0$  Hz, 2H), 3,92 (s, 3H), 1,72 (m, 2H), 1,50 – 1,45 (m, 5H), 0,97 (t,  $J = 7,4$  Hz, 3H).

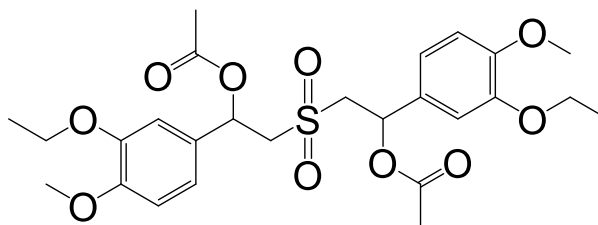


RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

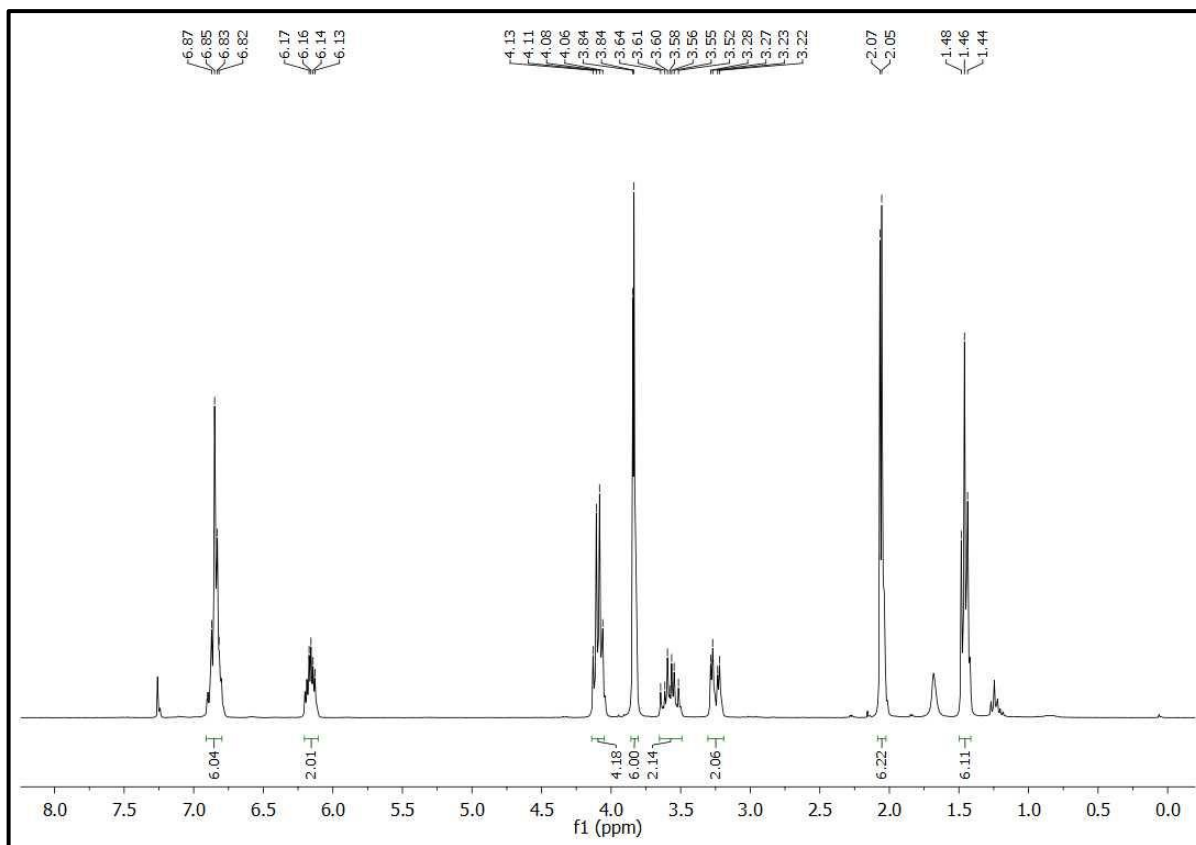


**7.10 Espectro de ressonância magnética nuclear  $^1\text{H}$  do diacetato de sulfonilbis(1-(3-etoxi-4-metoxifenil) etano-2,1-diila)**

Sólido branco,  $R_f$  (Hexano/AcOEt, 1:1) = 0,57, p.f.= 130-131 °C RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 6,87 – 6,82 (m, 6H), 6,17 – 6,13 (m, 2H), 4,09 (q,  $J$  = 6,9 Hz, 4H), 3,84 (m, 6H), 3,64 – 3,49 (m, 2H), 3,25 (dd,  $J$  = 14,8, 4,2 Hz, 2H), 2,07 (s, 3H), 2,05 (s, 3H), 1,46 (t,  $J$  = 6,9 Hz, 6H).

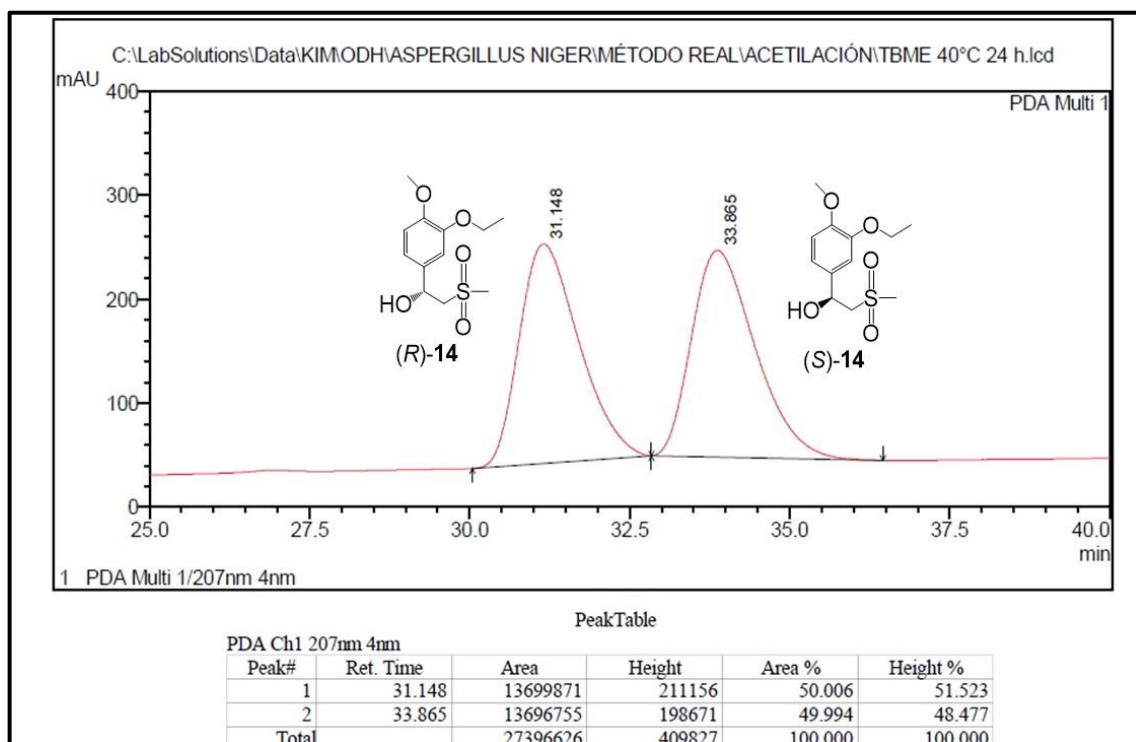


RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

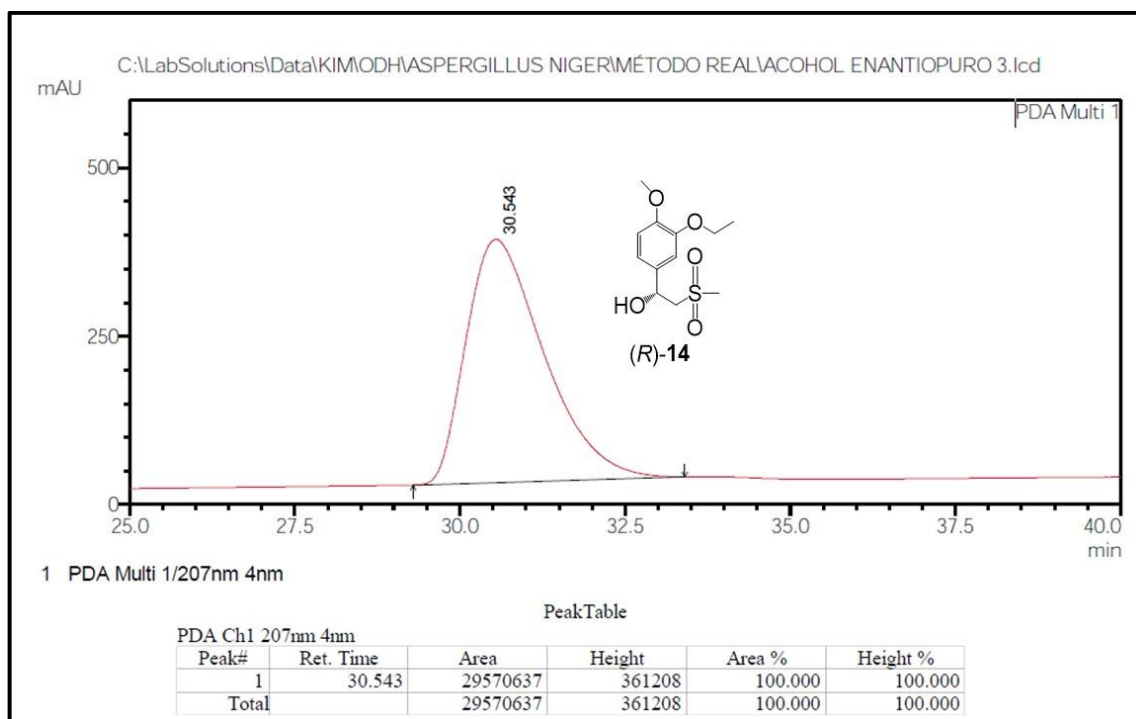


## ANEXO B- CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE E CG-EM

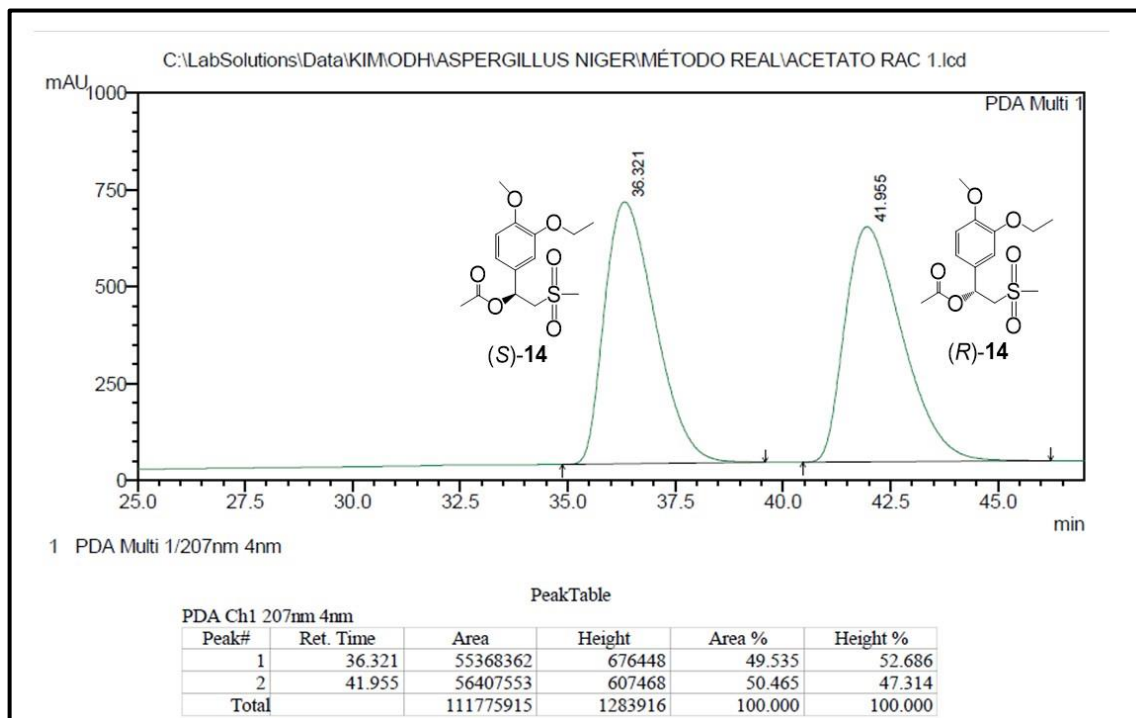
### 7.11 Cromatograma obtido por CLAE do 1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etanol (*rac*-14)



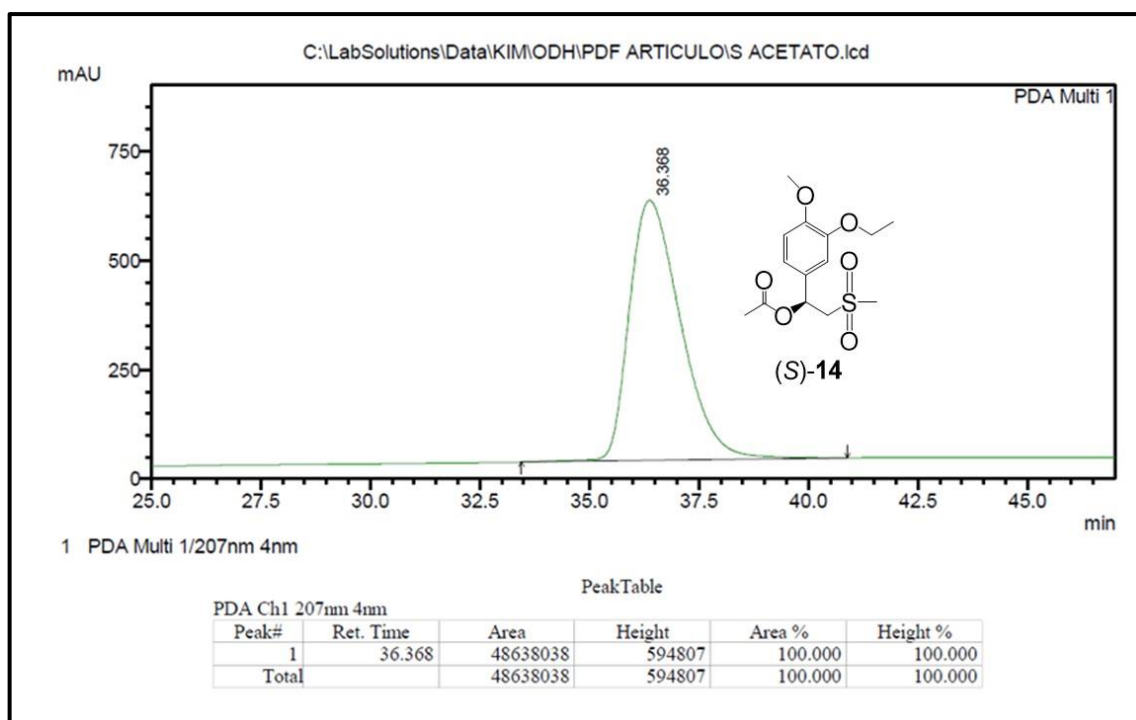
### 7.12 Cromatograma obtido por CLAE do (*R*)-1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etanol (*R*-14)



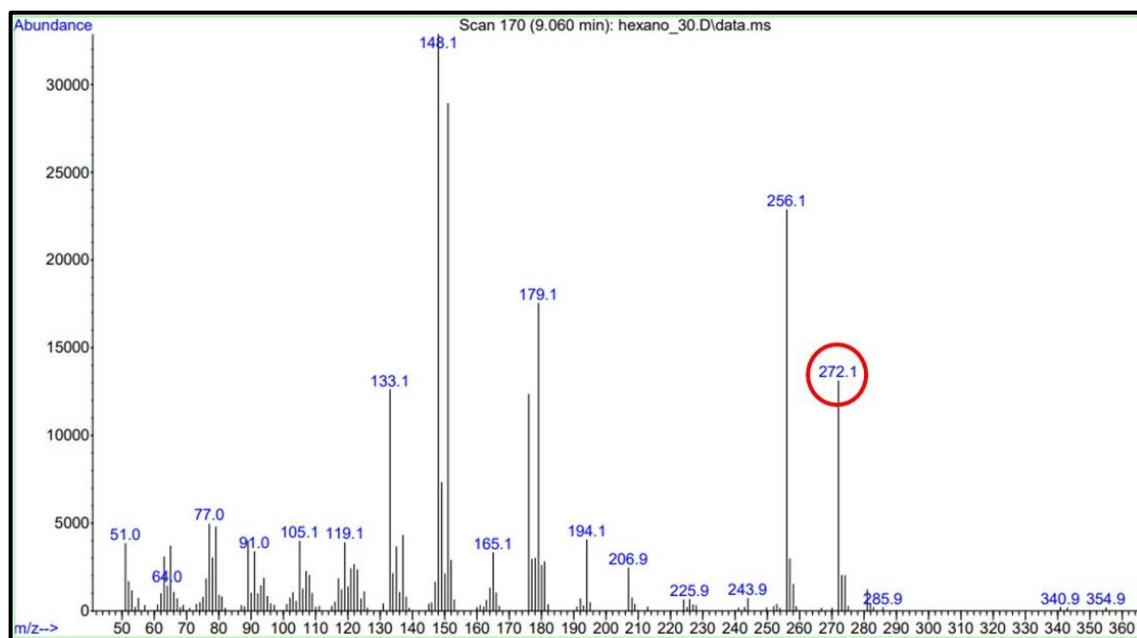
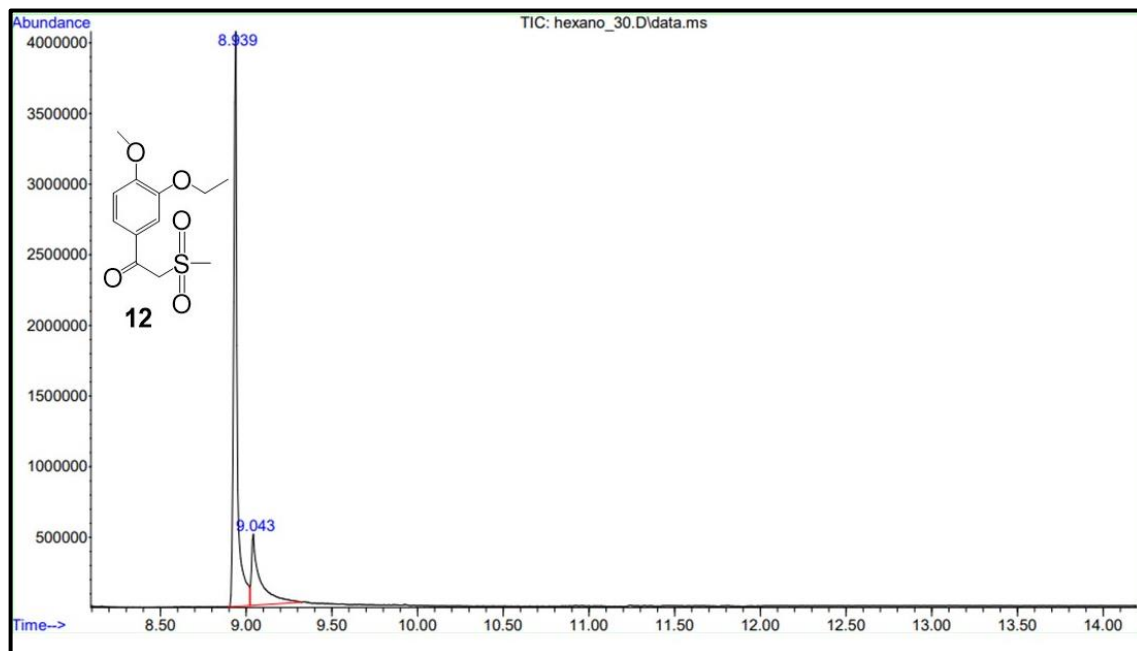
### 7.13 Cromatograma obtido por CLAE do acetato de 1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonyl)etila (*rac*-15)



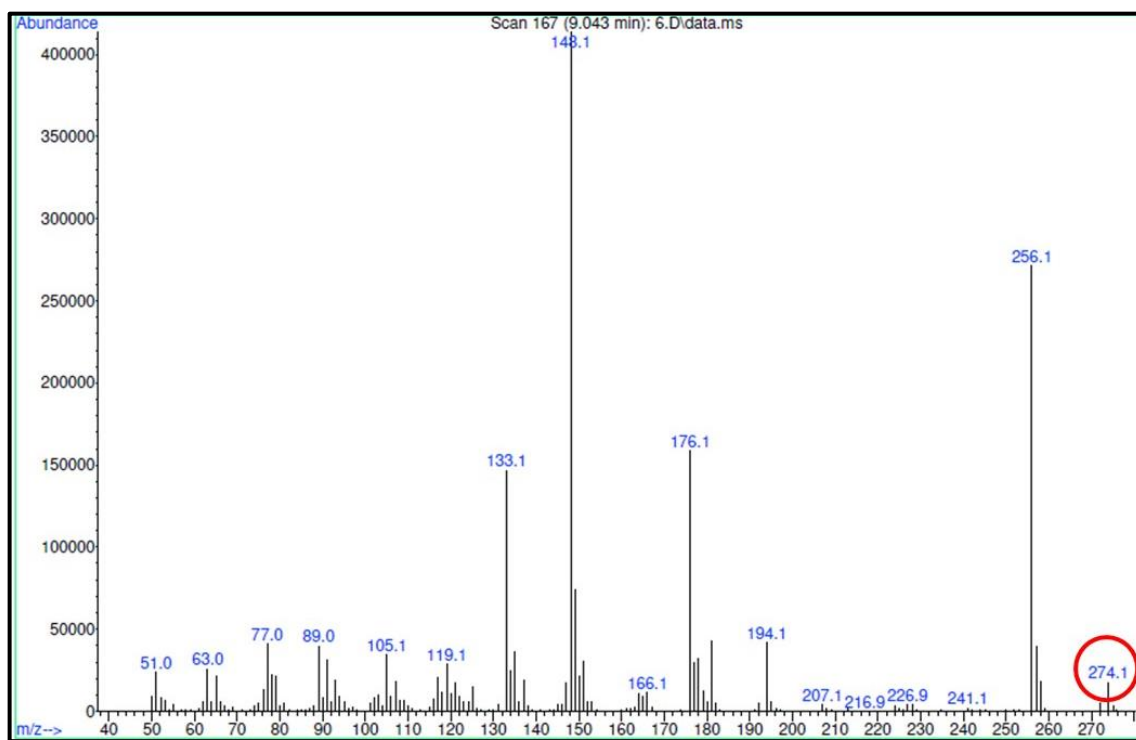
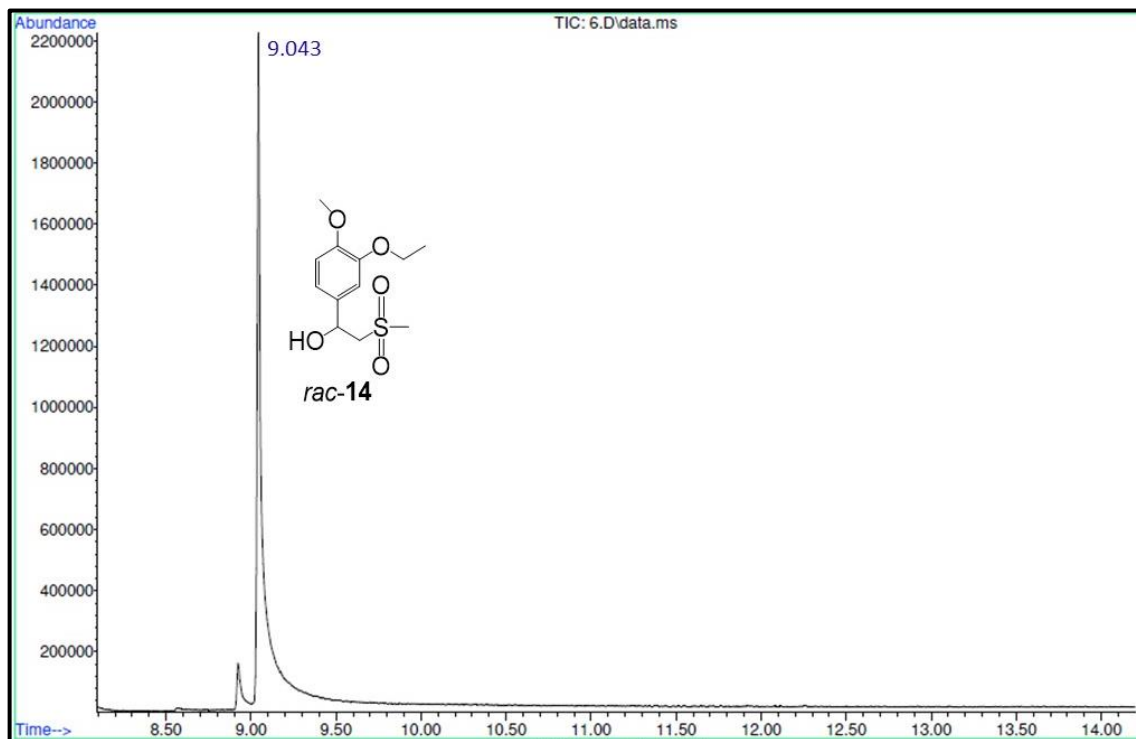
### 7.14 Cromatograma obtido por CLAE do acetato de (*S*)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonyl)etila ((*S*)-15)



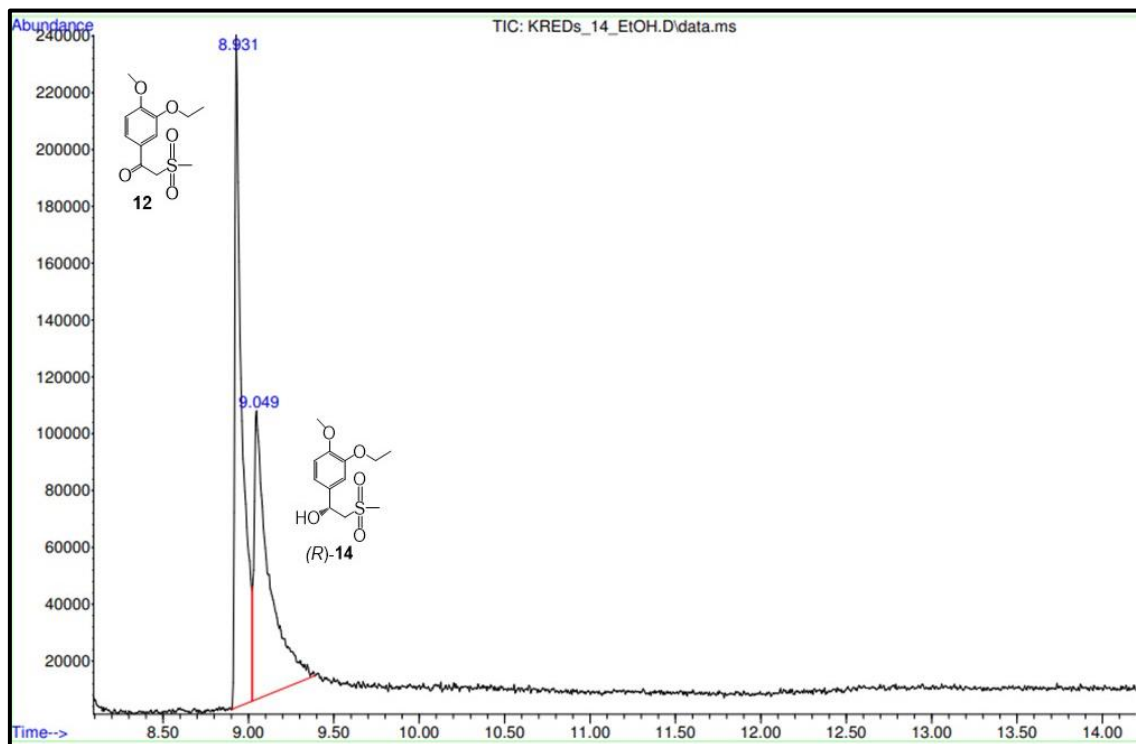
### 7.15 Cromatograma obtido por CG-EM da 1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonyl)etanona (12)



7.16 Cromatograma obtido por CG-EM do 1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etanol (*rac*-14)



**7.17 Cromatograma obtido por CG-EM da biorredução da cetona 12 usando a KRED-P2-D12 e EtOH como cossolvente (Condições do item 3.4.2)**



Data Path : E:\Kim\OPTIMIZACIÓN\SOLVENTE[S\  
 Data File : KREDS\_14\_EtOH.D  
 Acq On : 17 Oct 2019 18:20  
 Operator : KIM  
 Sample : KREDS\_14\_EtOH  
 Misc :  
 ALS Vial : 2 Sample Multiplier: 1

Integration Parameters: autoint1.e  
 Integrator: ChemStation

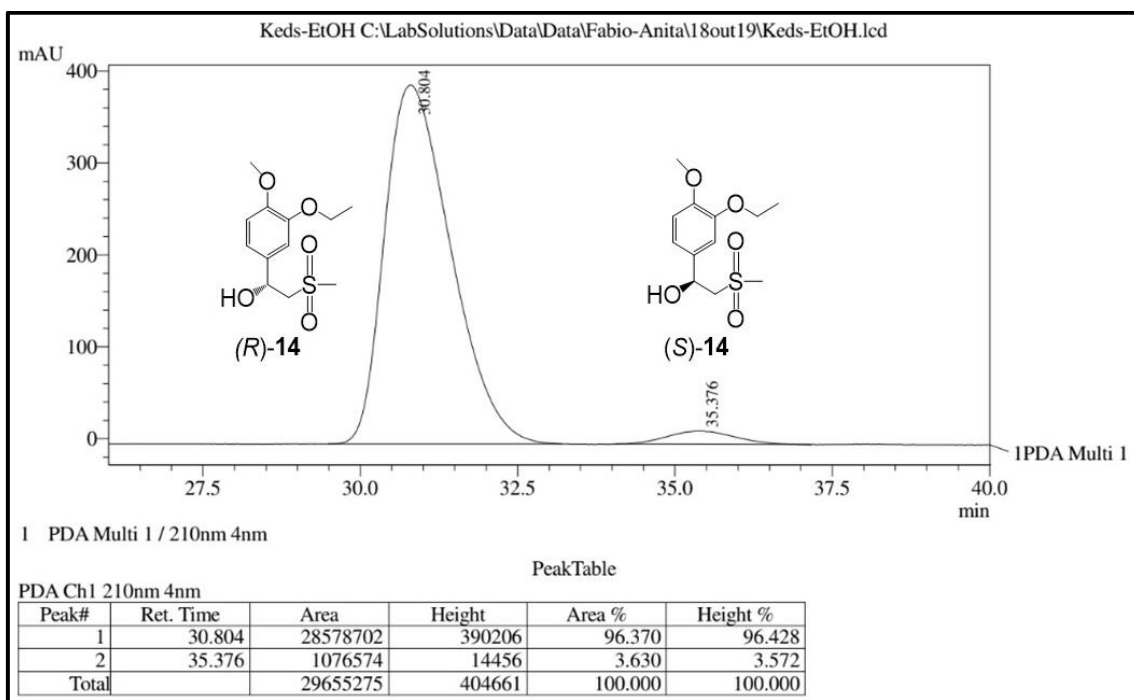
Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M  
 Title :

Signal : TIC: KREDS\_14\_EtOH.D\data.ms

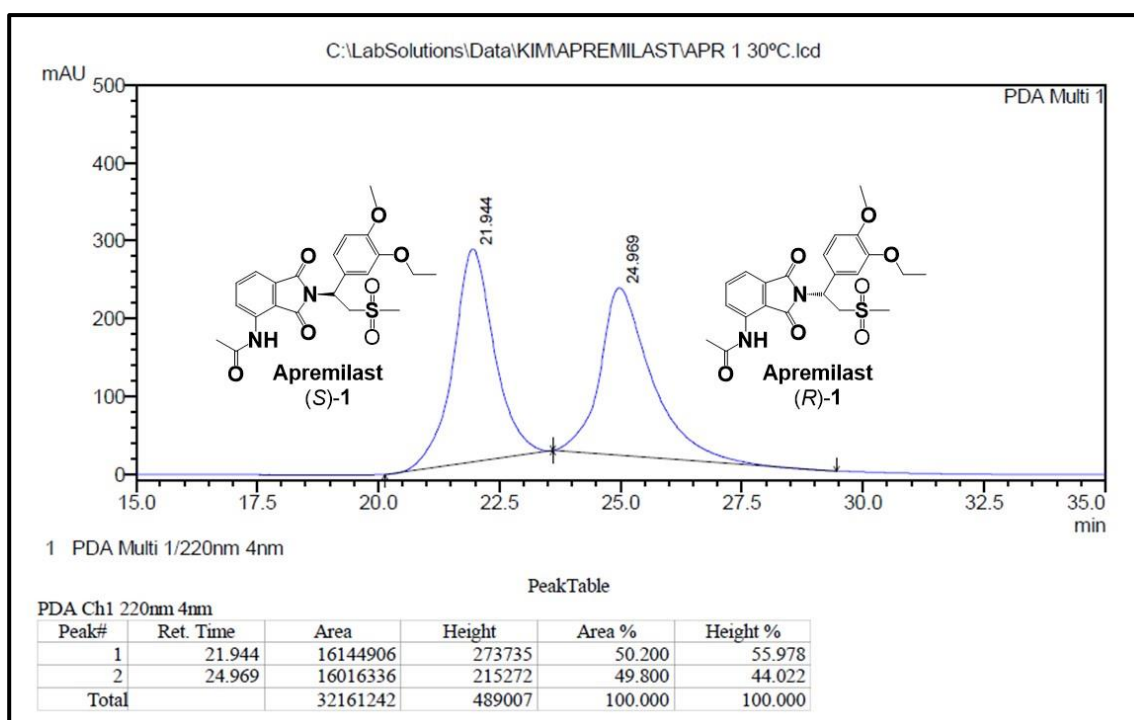
peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	8.931	142	148	164	BV	233242	6841435	100.00%	52.279%
2	9.049	164	168	229	VV 3	101385	6245022	91.28%	47.721%



**7.18 Cromatograma obtido por CLAE do (R)-1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonyl)etanol (R)-14 produzido a partir da biorredução da cetona 12 usando a KRED-P2-D12 e EtOH como cossolvente (Condições do item 3.4.2)**



**7.19 Cromatograma obtido por CLAE do apremilast racêmico**



## 7.20 Cromatograma obtido por CLAE do apremilast enantiomericamente enriquecido

