

ADEMIR ZIMMERMANN

**APLICAÇÃO DE RESOLUÇÃO ENZIMÁTICA NA SÍNTESE ESTEREOSSELETIVA
DE FEROMÔNIOS DE AGREGAÇÃO DE INSETOS-PRAGA DE PALMÁCEAS**

**Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de mestre em Química,
Curso de Pós-Graduação em Química, Setor de
Ciências Exatas, Universidade Federal do
Paraná.**

Orientador: Prof. Francisco de Assis Marques

**Curitiba
2005**

***Dedico este trabalho a meus
pais, Anilso e Ilse, também
minha esposa Rosmari e filhos
Phelip e Susan***

AGRADECIMENTOS

Ao professor Francisco de Assis Marques pela orientação, motivação, amizade e auxílio nas dificuldades durante todo o trabalho.

Aos professores do departamento que participaram durante toda minha formação acadêmica, intelectual e profissional.

Aos “eternos amigos e colegas” do LEQSO.

A todos os discentes do programa de Pós-Graduação pela amizade convívio e reuniões de discussão.

Aos funcionários do departamento (técnicos e técnicos administrativos) pelos auxílios durante dificuldades enfrentadas durante a Graduação e Pós-Graduação.

Ao Hialotécnico Paulo Andrade pela amizade, companheirismo e principalmente pela manutenção das vidrarias necessárias para meus trabalhos.

Aos funcionários da manutenção de equipamentos: Oscar, Gerson, Joelson e Douglas pelos auxílios e soluções de dificuldades enfrentadas durante iniciação científica e Pós-Graduação.

As professoras Nádia Krieger e Ana Luísa Lacava Lordello, pelas importantes observações e correções durante Exame de Qualificação.

Aos professores Euzébio Goulart Sant’ana e Ana Luísa Lacava Lordello pelas importantes observações e avaliações durante defesa de Dissertação.

As professoras Fanny e Carmen do departamento de Bioquímica pela utilização do polarímetro.

A todos que de alguma forma contribuíram com a minha formação pessoal e profissional.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

RESUMO.....	ii
-------------	----

ABSTRACT.....	iv
---------------	----

I- INTRODUÇÃO

I.1 – Conceitos Gerais.....	02
I.2 – Lipases.....	02
I.3 - Fontes de obtenção.....	04
I.4 - Resolução de racematos através de lípases.....	05
I.5 - Aspectos físico-químicos sobre a influência do solvente na enantiosseletividade de uma biotransformação.....	08
I.5.1 - Efeito do solvente na enantiosseletividade de lípases.....	12
I.5.2 - Variação conformacional induzida por solvente.....	14
I.5.3 - Hidrofobicidade do solvente.....	17
I.5.4 - Estrutura do solvente.....	20
I.6 - Emprego de lipases em síntese orgânica.....	22
I.6.1 - A Enzima NOVOZYME 435.....	22
I.7 – Semioquímicos.....	23
I.7.1 – Aleloquímicos.....	25
I.7.2 – Feromônios.....	25
I.7.3 - <i>Rhynchophorus palmarum</i>	26
I.7.4 – Síntese do rincoforol.....	29
I.7.5 – <i>Metamasius hemipterus sericeus</i> (Coleoptera: Curculionidae).....	32
I.7.5.1 - <i>Metamasius hemipterus</i>	32
I.7.5.2 - Sínteses do 2-metil-4-octanol.....	34

II. OBJETIVOS

II.1 – Objetivos.....	36
-----------------------	----

SUMÁRIO

III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.1 - Testes iniciais.....	38
III.1.1 - Síntese racêmica do rincoforol.....	38
III.1.2 - Resolução enzimática na síntese estereosseletiva do rincoforol (15)...	41
III.2 - Tentativa de resolução do (\pm)-6-metil-2-heptin-4-ol (14).....	42
III.3 - Tentativa de resolução do (\pm)-6-metil-(2 <i>E</i>)-hepten-4-ol (rincoforol) (15)..	44
III.4 - Tentativa de resolução do (\pm)-5-metil-1-hexin-3-ol (16).....	47

IV – CONCLUSÃO

IV – Conclusão.....	59
---------------------	----

V - PERSPECTIVAS

V – Perspectivas.....	61
-----------------------	----

VI – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

VI.1 – Conceitos Gerais.....	63
------------------------------	----

VI.2 – PROCEDIMENTOS

VI.2.1 – Preparação do 1-fenil-2-butin-1-ol (13) a partir do acetileno.....	65
VI.2.2 – Preparação do 1-fenil-2-butin-1-ol (13) a partir (<i>E/Z</i>) 1-bromopropeno.	66
VI.2.3 - Preparação do acetato de 1-fenil-2-butin-1-ol (13).....	67
VI.2.4 - Preparação do (\pm)-6-metil-2-heptin-4-ol (14).....	68
VI.2.5 - Preparação do acetato de (\pm)-6-metil-2-heptin-4-ol (14).....	69
VI.2.6 - Resolução Enzimática do (\pm)-6-metil-2-heptin-4-ol (14).....	70
VI.2.7 - Preparação do (\pm)-6-metil-(2 <i>E</i>)-hepten-4-ol – Rincoforol (15).....	70
VI.2.8 - Preparação do acetato de (\pm)-6-metil-2 <i>E</i> -hepten-4-ol.....	71
VI.2.9 - Resolução Enzimática do (\pm)-6-metil-(2 <i>E</i>)-hepten-4-ol - (rincoforol) (15). 72	
VI.2.10 - Preparação do (\pm)-5-metil-1-hexin-3-ol (16).....	73
VI.2.11 - Preparação do acetato de (\pm)-5-metil-1-hexin-3-ol.....	74

SUMÁRIO

VI.2.12.1 - Resolução Enzimática do (\pm)-5-metil-1-hexin-3-ol (16).....	75
VI.2.12.2 – Separação dos compostos da resolução enzimática de (16).....	75
VI.2.12.3 – Hidrólise do enantiômero de (16) acetilado.....	76
VI.2.13 – Preparação das amostra para Polarimetria.....	76

VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
---------------------------------	----

ANEXOS

ESPECTROS SELECIONADOS.....	87
-----------------------------	----

Esquemas

Esquema	Descrição	Pág.
01	Reação de transesterificação do 1-(2-furfuril)-etanol catalisada pela lípase do pâncreas do porco (PPL).....	13
02	Reação de butirilação enzimática do 1-feniletanol (3).....	15
03	Reação de transesterificação entre o éster N-acetil-2-cloroetilalanina (6) e propanol, catalisada pela <i>subtilisina</i>	17
04	Reação de transesterificação entre N –acetil-2-cloroetilfenilalanina (8) e propanol, catalisada por <i>Aspergillus oryzae</i>	18
05	Reação entre 1-nitropropanol (10) e acetato de vinila, catalisada por <i>Pseudomonas sp.</i>	21
06	Reação de esterificação entre o sulcatol (12) e acetato de vinila, catalisada pela lípase de <i>Pseudomonas sp.</i>	21
07	Síntese do rincoforol seguida por Oehlschlager e colaboradores	29
08	Síntese do rincoforol seguida por Navarro e colaboradores.....	30

SUMÁRIO

09	Síntese do Intermediário (14) utilizada por Chan e colaboradores.....	30
10	Resolução química usada por Chan e colaboradores para obter o (S)-(-)-rincoforol.....	31
11	Resolução enzimática para obtenção do (4S,2E)-(-)-6-metil-2-hepten-4-ol; (S)-rincoforol.....	32
12	Síntese enantioseletiva seguida por Baraldi e colaboradores para obtenção do (R)- e (S)-2-metil-4-octanol.....	34
13	Rota teste para preparação do rincoforol	38
14	Proposta para gerar propileto de lítio em “ <i>situ</i> ” na reação e adição nucleofílica a carbonila do isovaleraldeído.....	39
15	Método de síntese “one pot” usada para fazer o (±) rincoforol...	41
16	Preparação química dos acetatos para padrões cromatográficos nas reações de resolução enzimática.....	41
17	Proposta de resolução enzimática do (±)-6-metil-2-heptin-4-ol (14)	42
18	Proposta de resolução enzimática do (±)-6-metil-2E-hepten-4-ol (15)	44
19	Preparação do (±)-5-metil-1-hexin-3-ol (16)	45
20	Proposta de resolução enzimática do (±)-5-metil-1-hexin-3-ol (16)	46
21	Preparação do derivado acetilado do álcool (16)	48
22	Proposta de síntese estereosseletiva para obtenção do (S)-rincoforol e do (S)-2-metil-4-octanol em fase do conclusão.....	57
23	Potencial para síntese de produtos naturais.....	61

SUMÁRIO

FIGURAS

Figura	Descrição	Pág.
01	Alternativas biossintéticas que podem ser empregadas na resolução enantiomérica de um álcool racêmico através de hidrolases.....	5
02	Representação esquemática do mecanismo de uma reação de transesterificação entre um álcool e um éster vinílico catalisada por uma lipase de <i>Humicola lanuginosa</i> . (Baseado em Holmquist et al, 1995).....	6
03	Representação esquemática de um possível complexo tetraédrico enzima-substrato para uma reação de hidrólise de um éster ou transesterificação de um álcool catalisada por uma lipase de <i>Candida rugosa</i> . (Baseado em Cygler et al., 1997).....	8
04	Diagrama de energia livre para um processo hipotético enantiosseletivo (Baseado em Lazló e Novák, 1992).....	9
05	Modelo de mecanismo para catálise interfacial enzimática.....	10
06	Representação esquemática para os modos de ligação dos enantiômeros <i>R</i> e <i>S</i> do álcool sec-feniletanol (3) e o sítio da subtilisina acilado (Fitzpatrick e Klibanov, 1991).....	16
07	Representação esquemática dos modos de ligação dos enantiômeros <i>R</i> e <i>S</i> de (8) ao sítio ativo de <i>Aspergillus oryzae</i> (Tawaki e Klibanov, 1992).....	20
08	Mecanismo de inibição enantiosseletiva para a reação de transesterificação entre sulcatol (12) e acetato de vinila catalisada pela lipase OS (Nakamura, et al., 1995).....	22
09	Estrutura do feromônio de agregação do <i>Rhynchophorus palmarum</i> L.....	27
10	Macho do <i>R. palmarum</i> , responsável pela liberação de feromônios de agregação.....	27
11	Sintomas interno (a) e externo (b) da doença do anel-vermelho..	28

SUMÁRIO

12	Macho de <i>Metamasius hemipterus sericeus</i>	33
13	Enantiômeros do (<i>R</i>)- e (<i>S</i>)-2-metil-4-octanol.....	34
14	Região do espectro de RMN ¹ H que mostra o acoplamento entre os hidrogênios vinílicos do rincoforol racêmico.....	40
15	Espectro de hidrogênio do álcool (16).....	46
16	Espectro de carbono do álcool (16).....	47
17	Cromatograma do álcool (±)-5-metil-1-hexin-3-ol (16) com zero hora de resolução enzimática.....	49
18	Cromatograma do álcool (±)-5-metil-1-hexin-3-ol (16) com uma hora de resolução enzimática.....	49
19	Cromatograma do álcool (±)-5-metil-1-hexin-3-ol (16) com duas horas de resolução enzimática.....	50
20	Cromatograma do álcool (±)-5-metil-1-hexin-3-ol (16) com três horas de resolução enzimática.....	50
21	Cromatograma do álcool (±)-5-metil-1-hexin-3-ol (16) com quatro horas de resolução enzimática.....	51
22	Cromatograma do álcool (±)-5-metil-1-hexin-3-ol (16) com cinco horas de resolução enzimática.....	51
23	Cromatograma do álcool (±)-5-metil-1-hexin-3-ol (16) com seis horas de resolução enzimática.....	52
24	Cromatograma da mistura enantiomérica dos álcoois (16) obtida após hidrólise química da mistura enantiomérica dos acetatos derivados.....	55
25	Cromatograma da resolução enzimática dos enantiômeros dos álcoois (16) após três horas de reação.....	55

SUMÁRIO

TABELAS

Tabela	Descrição	Pág.
01	Influência do solvente na enantiosseletividade da reação de transesterificação entre 1 e acetato de vinila catalisada pela lipase do pâncreas do porco (PPL) e pela <i>lipozima</i> IM (KAMINSKA et al, 1996).....	14
02	Enantiosseletividade da <i>subtilisina</i> na reação de transesterificação de 3 em vários solventes orgânicos. Valores de momento de dipolo e constante dielétrica não foram apresentados. ^a Enantiômero R; ^b enantiômero S.....	15
03	Enantiosseletividade da <i>subtilisina</i> da Calrsberg na reação de transesterificação de 8 em vários solventes orgânicos. ^a Enantiômero R; ^b enantiômero S.....	19
04	Representação esquemática dos semioquímicos e suas subclasses.....	24
05	Resultados da resolução enzimática do (±) 6-metil-2-heptin-4-ol (14), com tempo de resolução.....	43
06	Resultados da resolução enzimática do rincoforol (15).....	44
07	Resultados obtidos na resolução enzimática do álcool (±)-5-metil-1-hexin-3-ol (16).....	53
08	Rotação específica do álcool resolvido e do acetato com valor corrigido para 100% pureza ótica.....	54

SUMÁRIO

ANEXO

ESPECTROS SELECIONADOS

Espectro	Descrição	pág.
01	Espectro de infravermelho do (\pm)-1-fenil-2-butin-1-ol (13).....	87
02	Espectro RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3) (\pm)-1-fenil-2-butin-1-ol, álcool (13).....	88
03	Espectro RMN de ^{13}C (50MHz, CDCl_3) (\pm)-1-fenil-2-butin-1-ol álcool (13).....	89
04	Espectro de Infravermelho do (\pm)-6-metil-2-heptin-4-ol (14).....	90
05	Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) (\pm) 6-metil-2-heptin-4-ol (14).....	91
06	Espectro de RMN ^{13}C (50MHz, CDCl_3) (\pm) 6-metil-2-heptin-4-ol (14).....	92
07	Espectro de RMN DEPT135 (50MHz, CDCl_3) do (\pm)-6-metil-2-heptin-4-ol (14).....	93
08	Espectro de massa do (\pm)-6-metil-2-heptin-4-ol (14).....	94
09	Espectro de infravermelho do (\pm)-6-metil-2E-hepten-4-ol (15).....	95
10	Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) (\pm) 6-metil-2E-hepten-4-ol (15).....	96
11	Espectro de RMN ^{13}C (50MHz, CDCl_3) (\pm) 6-metil-2E-hepten-4-ol (15).....	97
12	Espectro de massa do (\pm)-6-metil-2E-hepten-4-ol (15).....	98
13	Espectro de infravermelho do (\pm)-5-metil-1-hexin-3-ol (16).....	99
14	Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) do (\pm)-5-metil-1-hexin-3-ol (16).....	100
15	Espectro de RMN ^{13}C (50MHz, CDCl_3) do (\pm)-5-metil-1-hexin-3-ol (16).....	101
16	Espectro de Massa do (\pm)-5-metil-1-hexin-3-ol (16).....	102

RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia de síntese estereosseletiva do (2*E*, 4*S*)-6-metil-2-hepten-4-ol, feromônio de agregação do *Rhynchophorus palmarum* (L.) uma importante praga das plantações de coqueiro bem como do (S)-2-metil-4-octanol. O 2-metil-4-octanol é descrito como feromônio de agregação de várias espécies de coleópteros: curculionidae, entre eles o *Sphenophorus levis*, *Metamasius hemipterus sericeus* e *Rhabdocelus obscurus*. A etapa chave na síntese dos compostos em questão envolveu a resolução enzimática de um álcool secundário com tripla ligação terminal. Ressalta-se que a resolução enzimática foi efetuada em hexano anidro e com emprego de enzima imobilizada em resina macrorreticulada o que facilitou o processo de purificação. Os intermediários quirais foram obtidos em bons rendimentos químicos e em excelentes excessos enantioméricos.

A estereoquímica absoluta do 2-metil-4-octanol liberado pelos machos de *Metamasius hemipterus sericeus* no Brasil será determinada através de análise de cromatografia gasosa em coluna quiral do produto sintético com o do extrato natural.

ABSTRACT

In this work we have developed a methodology which allow the stereoselective synthesis of (2*E*, 4*S*)-6-methyl-2-hepten-4-ol and (*S*)-2-methyl-4-octanol, aggregation pheromones of important palm weevil trees, *Rhynchophorus palmarum* (L.) and *Metamasius hemipterus sericeus*.

The key step of both synthesis is based upon an enzymatic resolution of an acetylenic alcohol which lead to the synthesis of the chiral intermediates in good chemical yield and excellent enantiomeric excess.

The enantioselective synthesis of (*S*)-2-methyl-4-octanol will permit the determination of the absolute stereochemistry of the natural compound by chiral gas chromatography analysis.

INTRODUÇÃO

I.1 – Conceitos Gerais

A utilização de enzimas isoladas na transformação de compostos orgânicos é conhecida há mais de cem anos, apesar deste potencial ter sido mais intensamente explorado a partir da segunda metade da última década. Durante este período um grande número de reações catalisadas por enzimas foram desenvolvidas e tornaram-se familiares aos químicos orgânicos. Uma das principais contribuições deste tipo de metodologia quimiométrica tem sido na obtenção de compostos enantiomericamente puros ou enriquecidos, geralmente intermediários ou produtos finais de rotas sintéticas estereocontroladas (Sih e Wu, 1989; Santaniello *et al.*, 1990; Theil, 1995; Stecher e Faber, 1997).

A tecnologia enzimática é hoje uma das áreas mais promissoras entre as novas tecnologias para a síntese de compostos com alto valor agregado. Nos países desenvolvidos, os projetos nesta área são considerados prioritários e executados por grupos de pesquisa com alto potencial de produção de conhecimento e geração de tecnologias de ponta. No Brasil, por outro lado, a tecnologia de produção e de aplicação de enzimas em nível industrial está em poder de algumas companhias internacionais, que não desenvolvem pesquisas no país, limitando a participação do Brasil como consumidor de tais produtos. Os altos custos envolvidos nos processos de produção e purificação de enzimas fazem com que poucos grupos de pesquisas no país sejam competitivos na área de tecnologia enzimática.

I.2 – Lipases

As enzimas são classificadas e codificadas pela NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) de acordo com a reação catalisada. A nomenclatura utiliza a abreviação E.C. (Enzyme Commission) seguida de até 4 dígitos referentes à classe e subclasses a que pertence a enzima.

Entre as enzimas mais empregadas tanto em nível industrial (indústria alimentícia, de cosméticos e perfumes, biomédica, pesticidas, detergentes, entre

outras) como acadêmico, encontram-se as lipases (Pandey *et al.*, 1999). Lípase é o nome genérico para um grupo de enzimas pertencentes à classe das hidrolases (E.C.3.1) e que atuam sobre ligações éster (E.C. 3.1.1). São capazes de catalisar não apenas reações de hidrólise, mas também de síntese em meios aquo-restritos, como reações de esterificação, interesterificação, transesterificação, alcoólise e aminólise, e por atuar sobre substratos não naturais (Jaeger e Eggert, 2002).

As esterases (E.C. 3.1.1.1) que muitas vezes são difíceis de diferenciar das lipases, são carboxil éster hidrolases amplamente distribuídas na natureza, pois atuam essencialmente catalisando a hidrólise de ésteres. Porém, sua atividade enzimática está restrita à hidrólise de ligações ésteres em substratos solúveis em água (Alvarez-Macarie *et al.*, 1999).

O problema da diferenciação entre lipases (E.C.3.1.1.3) e esterases (E.C.3.1.1.1) foi estudado por vários autores e ainda existem controvérsias. Em 1958, Sarda e Desnuelle propuseram definir as lipases a partir de sua característica cinética: a propriedade de ativação na presença de substratos pouco solúveis em água e emulsionados, ou seja, na presença de uma interface lipídeo/água. Segundo estes autores, as lipases seriam ativadas na presença de ésteres emulsionados, enquanto as esterases não apresentariam esta ativação, exercendo sua função hidrolítica sobre substratos solúveis em água. A determinação da estrutura tridimensional das lipases de *Rhizomucor michei* (Brady *et al.*, 1990), *Geotrichum candidum* (Schrag *et al.*, 1991) e da lípase pancreática humana (Winkler *et al.*, 1990), propiciou uma explicação para o fenômeno da ativação interfacial: o sítio ativo destas enzimas apresentava recoberto por uma “tampa” hidrofóbica ou *lid*, que ao interagir com a interface lipídeo/água sofreria uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo. A presença da “tampa” na estrutura da enzima e a propriedade de ativação interfacial passaram a ser fatores determinantes para a caracterização de lipases.

Entretanto, mais recentemente foi observado que a presença da “tampa” não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial, tendo sido descritas lipases, como a de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Cândida antartica* B que apresentam a *lid* em suas estruturas, mas não sofrem ativação interfacial (Jaeger e Reetz, 1998). Por outro lado, as cutinases, enzimas

consideradas lipases “verdadeiras”, não apresentam a *lid* e não precisam da interface para exercer sua atividade hidrolítica (Cygler e Schrag, 1997). Além disso, a ocorrência ou não da ativação interfacial pode ser influenciada pelas condições experimentais e pelos substratos utilizados (Ferrato *et al.*, 1997).

As lipases têm sido definidas nos trabalhos mais recentes, simplesmente como carboxilesterases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila com mais de 10 átomos de carbono. Enzimas que apresentam a capacidade de hidrolisar apenas acilgliceróis de cadeia com menos de 10 carbonos são tidas genericamente como esterases (Jaeger *et al.*, 1999; Ferrato *et al.*, 1997; Verger, 1997; Jaeger *et al.*, 1994).

A diferenciação entre lipases e esterases também tem sido feita pela diferença de especificidade preferencial das duas enzimas. Os substratos naturais para lipases são óleos e gorduras contendo triacilgliceróis constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, ligações éster tríplices, enquanto esterases atuam sobre ligações éster únicas, liberando ácidos graxos de baixa massa molar (Bier, 1955; Brockman, 1984). Deve-se enfatizar, entretanto, que a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (Jaeger *et al.*, 1999).

I.3 - Fontes de obtenção

Entre as lipases de vegetais, animais e microbianas, estas últimas são as mais utilizadas por sua facilidade de produção e abundância de microrganismos capazes de sintetizá-las. As fontes fúngicas têm sido preferencialmente utilizadas, não devido as suas melhores características em relação as lipases bacterianas, mas sim porque na sua grande maioria não são nocivas à saúde humana (Jaeger *et al.*, 1994).

Fungos de diversos gêneros demonstraram ser bons produtores de lipases e as suas enzimas têm sido estudadas sob o ponto de vista acadêmico e industrial, como lipases de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium camembertii*, *Penicillium roqueforti* e da

levedura *Candida rugosa* que estão sendo comercializadas pela Amano (Amano Europe Enzyme Ltda., UK) para processamento de óleos, gorduras e queijos, para a determinação de triglicérides, como aditivo em preparações digestivas e para síntese quiral.

Dentre as bactérias produtoras de lipases estão disponíveis comercialmente as enzimas de *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas fluorescens* e *Burkholderia cepacia*, que vêm sendo empregadas na síntese de compostos quirais e as lipases *Burkholderia sp.* e *Arthrobacter sp.*, utilizadas na determinação diagnóstica de triacilgliceróis. O rápido crescimento celular, em relação aos fungos, se constitui em uma das vantagens das fontes bacterianas como produtoras destas enzimas (Jaeger *et al.*, 1999).

I.4 - Resolução de racematos através de lipases

Existem duas metodologias biossintéticas que podem ser empregadas na resolução de compostos racêmicos através de lipases e outras hidrolases. Por exemplo, conforme o esquema apresentado abaixo, o álcool ROH* e o acetato ROAc*, opticamente enriquecidos, podem ser obtidos através de transesterificação enzimática entre ROH racêmico e acetato de vinila, seguida de hidrólise química ou, alternativamente, através de esterificação química seguida de hidrólise enzimática.

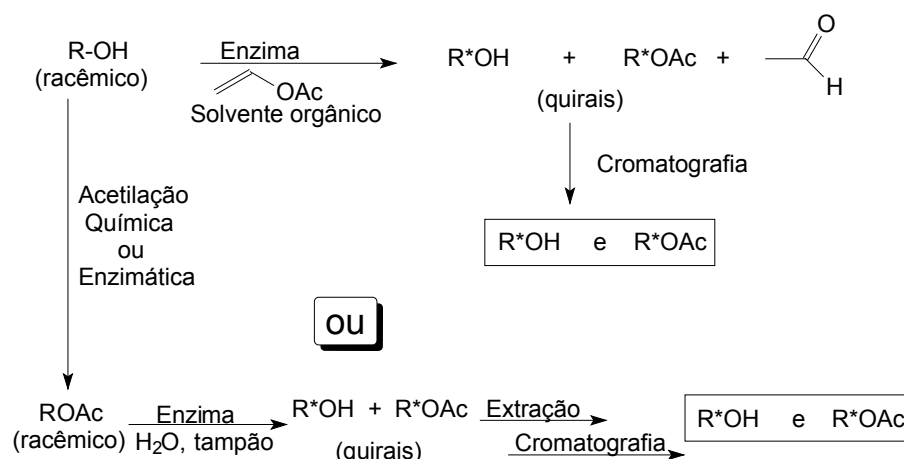


FIGURA 1: Alternativas biossintéticas que podem ser empregadas na resolução enantiomérica de um álcool racêmico através de hidrolases.

Em ambos os casos, a resolução enantiomérica é realizada na etapa biocatalítica. Dependendo da enzima, substrato e condições experimentais utilizadas, podem ser obtidos diferentes enantiômeros de ROH* e ROAc* através do emprego das duas técnicas.

Na figura 2 abaixo é mostrado o mecanismo geral para reação de transesterificação de um álcool catalisada por uma lipase de *Humicola lanuginosa*.

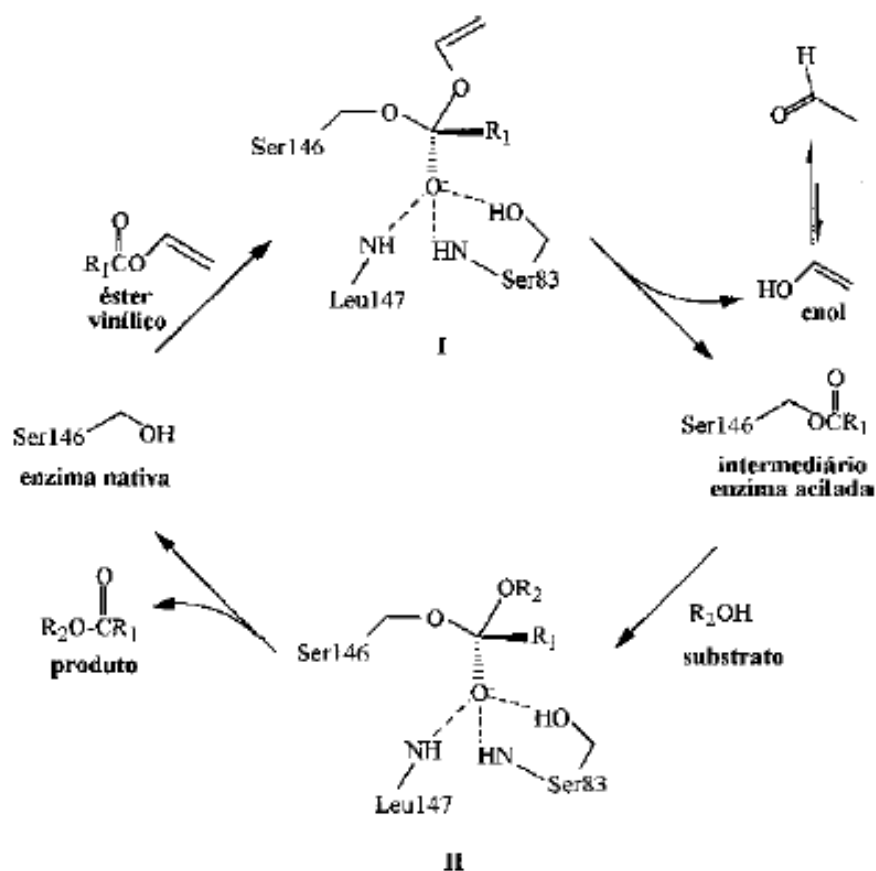


FIGURA 2: Representação esquemática do mecanismo de uma reação de transesterificação entre um álcool e um éster vinílico catalisada por uma lipase de *Humicola lanuginosa*. (Baseado em Holmquist *et al.*, 1995).

Dois estados de transição diferentes estão envolvidos no rearranjo de ligações que ocorre durante o processo catalítico. O primeiro estado de transição (I) é gerado durante a transformação do complexo de Michaelis-Menten entre a enzima e o doador acila (éster vinílico) em uma espécie intermediária denominada enzima

acilada. Normalmente, são empregados ésteres vinílicos como doadores acila. Nestes casos, o enol formado após acilação do resíduo reativo da tríade catalítica é rapidamente transformado em seu tautômero (acetaldeído), que é mais estável e volátil. Esta estratégia desloca o equilíbrio da reação na direção dos produtos por impedir uma possível competição nucleofílica entre o álcool formado nesta etapa e o substrato.

Reações de transesterificação realizadas com excesso de doador acila (éster vinílico) e em solventes orgânicos anidros são irreversíveis. O segundo estado de transição (II) mostrado na figura 2, ocorre quando a espécie intermediária enzima-acilada é clivada pelo álcool R_2OH , formando um éster como produto. Nos estados de transição (I) e (II), a carga negativa gerada sobre o oxigênio após o ataque nucleofílico, é estabilizada através de ligações de hidrogênio pelos resíduos Ser⁸³ e Leu¹⁴⁷, que formam o bolsão do oxiânion na lipase de *Humicola lanuginosa* (Lawson *et al.*, 1994).

As lipases são especialmente estáveis em solventes orgânicos (Klibanov, 1989; Zaks e Klibanov, 1988). A facilidade com que estas enzimas aceitam uma variedade de substratos não naturais e de tamanhos diversos, sugere que a espinha dorsal polipeptídica é flexível e pode adotar diferentes conformações. Como consequência, a baixa barreira de energia que é necessária para que ocorram mudanças conformacionais dificulta a modelagem e a previsão das interações estereoquímicas para este grupo de biocatalisadores (Sih e Chen, 1989). Outra característica das lipases é de que as esterificações por elas catalisadas em solventes orgânicos são freqüentemente mais enantiosseletivas que as reações hidrolíticas correspondentes em água (Chen, *et al.*, 1987; Yamamoto *et al.*, 1988; Bianchi *et al.*, 1988).

O fato de enzimas manterem atividade catalítica em solventes orgânicos não possui explicação simples. A hipótese correntemente aceita é de que, quando a enzima é colocada em um solvente orgânico anidro, esta é cineticamente “congelada” no estado nativo. Isto ocorre em parte devido à baixa constante dielétrica do meio, que produz uma maior efetividade nas forças eletrostáticas responsáveis pela manutenção da estrutura enzimática. (Zaks e Klibanov, 1988; Secundo *et al.*, 1992).

Uma maior compreensão sobre os mecanismos de ação de lipases foi obtida a partir da resolução da estrutura cristalina de várias destas enzimas como a da pancreática humana (Winkler *et al.*, 1990), do cavalo (Bourne *et al.*, 1994), do porco (Hermoso *et al.*, 1996); além de lipases fúngicas de *Rhizomucor miechei* (Brady *et al.*, 1990), *Geotrichum candidum* (Schrag e Cygler, 1993), *Humicola lanuginosa* (Derewenda *et al.*, 1994), *Penicillium camembertii* (Derewenda *et al.*, 1994), *Rhizopus delemar* (Derewenda *et al.*, 1994), *Candida rugosa* (Grochulski *et al.*, 1993), *Candida antarctica* (Uppenberg *et al.*, 1994) e de lipases bacterianas de *Pseudomonas glumae* (Noble *et al.*, 1993), *Chromobacterium viscosum* (Lang e Schomburg, 1996) e *Pseudomonas cepacea* (Kim *et al.*, 1997).

I.5 - Aspectos físico-químicos sobre a influência do solvente na enantiosseletividade de uma biotransformação.

Em uma biotransformação os substratos e os estados de transição gerados durante o processo catalítico deverão ser ligados por interações múltiplas não-covalentes com a superfície da enzima. Como conseqüência, a força de todas estas interações será fortemente dependente da distância e dos ângulos de interação da enzima com o substrato, resultando na formação de um sítio de ligação altamente seletivo. A discriminação entre dois enantiômeros é realizada pela enzima através de um sítio catalítico, contendo três pontos de ligação com o substrato, onde será gerado um intermediário tetraédrico, como ilustrado na figura 3. Qualquer impedimento estérico devido à arquitetura ou conformação da estrutura enzimática poderá auxiliar a enzima a diferenciar estruturas semelhantes durante o processo de interação com o substrato.

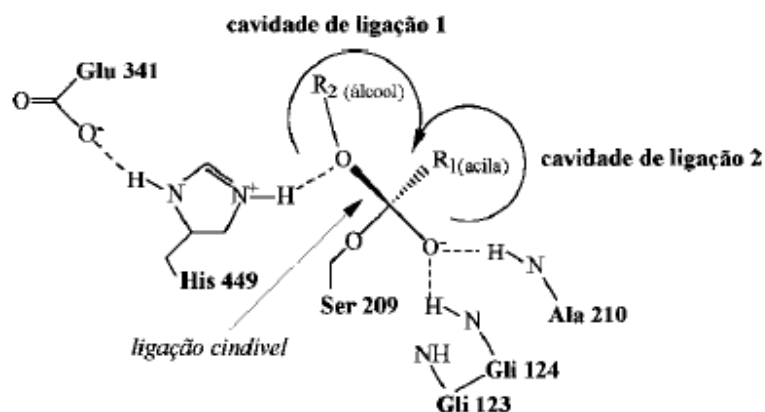


FIGURA 3: Representação esquemática de um possível complexo tetraédrico enzima-substrato para uma reação de hidrólise de um éster ou transesterificação de um álcool catalisada por uma lipase de *Candida rugosa*. (Baseado em Cygler *et al.*, 1997).

A resolução cinética de um álcool ou éster por lipase envolve a formação e colapso de diferentes pares de intermediários diastereoisoméricos enzima-substrato, relacionados aos dois enantiômeros. Assim, o estado de transição que determinará a enantiosseletividade de uma enzima ocorre durante a formação ou colapso do primeiro intermediário formado na etapa lenta. Para os casos onde a condição de irreversibilidade é obedecida, a enantiosseletividade da biotransformação dependerá somente da diferença de energia ($\Delta\Delta G^\ddagger$) entre os estados de transição dos complexos ativados Enz-S e Enz-S' (Lazló e Novák, 1992), conforme a relação de energia livre estabelecida na figura 4.

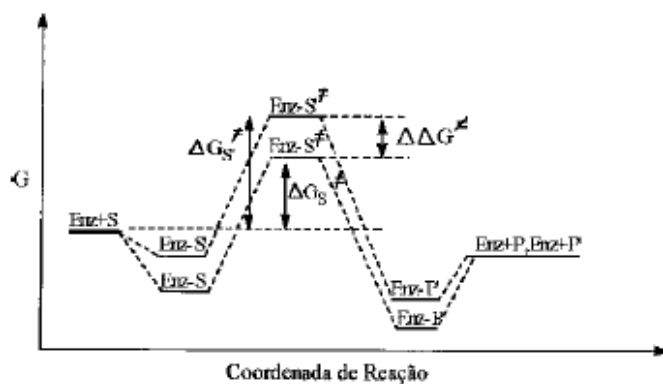


FIGURA 4: Diagrama de energia livre para um processo hipotético enantiosseletivo (Baseado em Lazló e Novák, 1992).

Em seu ambiente natural as lipases são ativadas por uma interface lipídeo-água onde a fase apolar é formada pelos próprios substratos (Sarda e Desnuelle, 1958; Desnuelle, 1972; Pieterse *et al.*, 1974). Em geral, o aumento da atividade de uma lipase está associado ao aumento da área da interface (ou concentração do substrato na interface) (Verger *et al.*, 1973; Bernard *et al.*, 1996). O mecanismo de catálise enzimática em solventes orgânicos, onde a enzima permanece pouco solúvel, obedece um modelo de catálise interfacial, mostrado na figura 5.

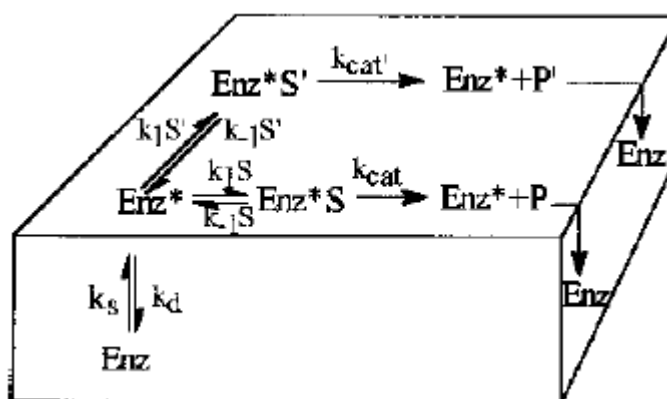


FIGURA 5: Modelo de mecanismo para catálise interfacial enzimática.

Este modelo representa a ação da enzima sobre dois enantiômeros competidores S e S' e assume que a etapa catalítica é irreversível. Desde que as propriedades ativas de superfícies dos dois enantiômeros são idênticas, a razão K_s/K_d é constante e independente das concentrações relativas dos enantiômeros na interface. Como consequência, a etapa onde a enzima penetra na interface adquirindo uma nova conformação Enz^* não participa do processo de discriminação do biocatalisador pelo enantiômero. Assim, a enantiosseletividade de uma bioconversão irreversível em solventes orgânicos anidros obedecerá um processo homoc competitivo clássico, descrito pela equação 1.

$$\frac{\ln([S]/[S_0])}{\ln([S']/[S'_0])} = E \frac{(K_{cat}/K_m)s}{(K_{cat'}/K_m)s'} \quad (\text{Equação 1})$$

Na equação 1 k_{cat}/K_m representa a constante de velocidade aparente de segunda ordem para a reação entre uma enzima e um substrato em uma concentração infinitamente pequena; k_{cat} é a constante catalítica, K_m é a constante de Michaelis e E é a razão enantiomérica (Sih *et al.*, 1982), um parâmetro quantitativo da enantiosseletividade do sistema. Embora a qualidade do produto da resolução de um racemato seja caracterizada pelo excesso enantiomérico, a razão enantiomérica E é um parâmetro muito importante. Um valor elevado de E para um dado par enzima-substrato é essencial para o sucesso de uma resolução cinética, já que isto assegura não apenas um excesso enantiomérico elevado, mas também um rendimento proporcionalmente alto (Sih *et al.*, 1982). Para propósitos práticos, um valor de E abaixo de 10 para qualquer biotransformação torna-a inviável como um processo enantiosseletivo. Por outro lado, este pode ser considerado bom se estiver situado entre 10 a 30 e, acima disto, excelente. Os valores de $E > 200$ não podem ser precisamente atribuídos como consequência das incertezas intrínsecas aos métodos analíticos de determinação do excesso enantiomérico [por exemplo: Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou Cromatografia Gasosa (CG)].

Dependendo do tipo de estudo realizado, a enantiosseletividade de biocatalisadores têm sido também expressa através da razão entre as velocidades iniciais, $n_S/n_{S'}$, ou razão entre as constantes de especificidade, $\frac{\ln([S]/[S_0])}{\ln([S']/[S'_0])} = E \frac{(K_{cat}/K_m)_S}{(K_{cat'}/K_m)_{S'}}$, para os dois enantiômeros competidores. A relação entre os termos cinético, termodinâmico e a enantiosseletividade E de uma biotransformação é dada pela equação abaixo.

$$E = \frac{(K_{cat}/K_m)_S}{(K_{cat'}/K_m)_{S'}} = e^{\frac{\Delta\Delta G^\ddagger}{RT}} \quad \text{(Equação 2)}$$

Para a energia de ligação enzima-substrato (Enz-S e Enz-S', na figura 3) há a contribuição de vários componentes. No caso de reações enantiosseletivas irreversíveis, a magnitude de $\Delta\Delta G^\ddagger$, que será a medida da discriminação da enzima pelos enantiômeros, deve possuir um componente espacial e outro eletrônico,

relacionados exclusivamente à enzima, já que durante o estado de transição o substrato é removido do solvente. Portanto, as enzimas que possuem barreiras energéticas baixas para transições conformacionais, isto é, enzimas que possuem um comportamento do tipo encaixe induzido (*induced-fit*) (Herschlag, 1987), como as lipases, devem sofrer alterações no seu perfil enantiosseletivo em solventes com características físico-químicas diferentes, já que a capacidade de mobilidade conformacional e a conformação desta deverão experimentar variações. As enzimas que possuem conformações mais rígidas (isto é, barreiras de energia elevadas para a quebra das ligações não-covalentes), não devem passar por grandes transformações conformacionais ao adotarem a conformação catalítica ativa. Estas enzimas, que não seguem um modelo do tipo encaixe induzido (*non induced fit*), devem sofrer um grau menor de influência do solvente no seu potencial enantiosseletivo.

1.5.1 - Efeito do solvente na enantiosseletividade de lipases

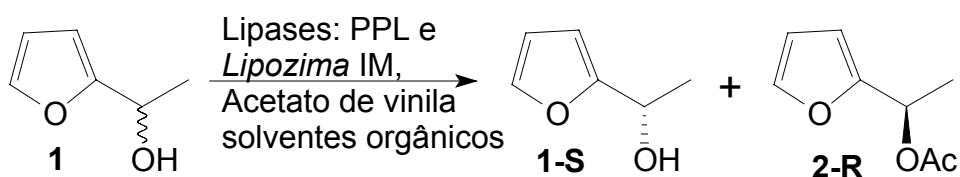
O efeito do solvente sobre a enantiosseletividade de lipases vem sendo objeto de estudo de vários grupos de pesquisa. O solvente pode alterar a especificidade, quimiosseletividade, regiosseletividade, seletividade proquiral e enantiosseletividade das lipases e outras hidrolases. Vários modelos foram propostos para explicar a mudança da seletividade destas enzimas em função do solvente, os quais foram baseados na alteração da flexibilidade conformacional do sítio ativo, na partição de grupos funcionais do substrato ou de moléculas de solvente para fora ou para dentro das cavidades do sítio ativo, e na estrutura do solvente.

Dependendo do substrato, estudos revelaram comportamentos diferentes para a mesma enzima, sugerindo a existência de mais de uma possibilidade de ligação do substrato com a superfície da enzima. O evento primário da atividade catalítica das lipases é a ativação interfacial. Existem várias indicações de que a competência catalítica destas enzimas é governada principalmente pela interação entre a tampa do sítio ativo e o meio. Observou-se também que arranjos

conformacionais que ocorrem durante a reorganização da tampa causam mudanças estruturais em setores da proteína responsáveis pela ligação do substrato e estabilização dos estados de transição dos intermediários de reação.

Estes indicativos sugerem forte influência da tampa na cavidade de discriminação da enzima por diferentes substratos. A dinâmica destas interações ainda não foi esclarecida. O fato de que o tipo de reorganização molecular, que ocorre devido ao movimento da tampa, varia conforme a lipase, é sugestivo de que o solvente afeta estas enzimas segundo um mecanismo particular para cada uma delas.

A magnitude do efeito do solvente sobre a enantioselectividade das lipases pode ser ilustrada em um trabalho que envolveu a transesterificação entre 1-(2-furfuril)-etanol (1) e acetato de vinila, catalisada pela lipase do pâncreas do porco (PPL) e pela lipozima IM, uma lipase de *Rizhomucor miechi* imobilizada conforme mostrado no esquema 1 (Kaminska, *et al.*, 1996).



Esquema 1: Reação de transesterificação do 1-(2-furfuril)-etanol catalisada pela lipase do pâncreas do porco (PPL) e *Lipozima* IM.

Os resultados obtidos, ilustrados na tabela abaixo, mostram que nas reações em que se empregou a PPL como biocatalisador, dentre os 8 solventes utilizados, a enantioselectividade (E) para a reação variou entre 5, quando a reação foi conduzida em cicloexano, a 266, para a reação que foi conduzida em THF.

Tabela 1: Influência do solvente na enantiosseletividade da reação de transesterificação entre 1-(2-furfuril)-etanol e acetato de vinila catalisada pela lipase do pâncreas do porco (PPL) e pela *lipozima* IM (Kaminska et al., 1996).

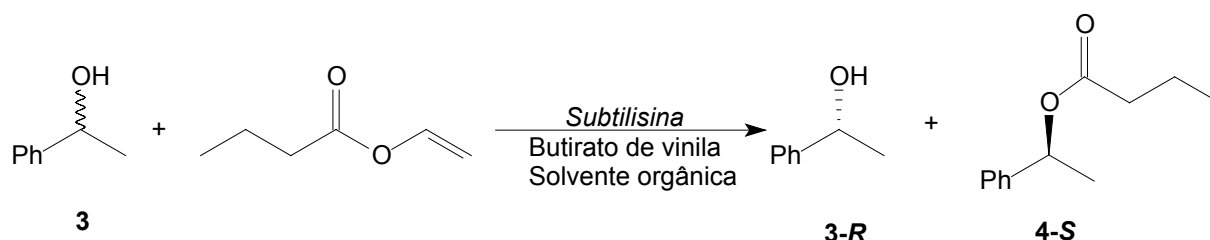
Lipozima IM			PPL			
	[%] ee			[%] ee		
E	1-S	2-R	Solvente	1-S	2-R	E
83	46	96	THF	30	>99	266
82	59	96	Hexano	8	70	86
57	79	92	Ciclohexano	6	66	5
50	71	92	Tolueno	18	94	39
94	22	97	CH ₂ Cl ₂	8	>99	214
106	48	97	CHCl ₃	12	>99	225
64	>99	87	CCl ₄	14	>99	227
70	92	90	Benzeno	-	-	-
83	35	97	Dioxano	26	>99	258
69	71	94	Iso-octano	-	-	-

Quando a mesma reação foi catalisada pela *lipozima* IM, dentre os 10 solventes utilizados a enantiosseletividade E variou entre 50, em tolueno, a 106, em clorofórmio. Estes resultados mostram que houve uma forte dependência da enantiosseletividade das enzimas em função do solvente utilizado. Além disso verificou-se que as lipases apresentaram comportamentos distintos, sendo que a PPL foi consideravelmente mais influenciada pela variação do solvente.

1.5.2 - Variação conformacional induzida por solvente

O primeiro estudo dinâmico de sítio ativo, elaborado com a finalidade de racionalizar o efeito das características físico-químicas do solvente e da estrutura do substrato sobre a enantiosseletividade de reações catalisadas por lipases em solventes não aquosos, foi proposto em 1991 por Fitzpatrick e Klivanov conforme

esquema 2. Neste trabalho procurou-se estabelecer um modelo que permitisse prever a enantiosseletividade da subtilisina, uma serino-proteinase de *Bacillus licheniformis*, em função do solvente na reação de transesterificação entre o álcool 1-feniletanol (3) e butirato de vinila (Figura 6).



Esquema 2: Reação de butirilação enzimática do 1-feniletanol (3).

Neste estudo observou-se uma correlação entre o aumento da enantiosseletividade da subtilisina e a diminuição do momento de dipolo e da constante dielétrica dos solventes empregados (Tabela 2).

TABELA 2: Enantiosseletividade da subtilisina na reação de transesterificação de 3 em vários solventes orgânicos. ^a Enantiômero R; ^b enantiômero S.

Solvente	$K_{cat}/K_M,$	$M^{-1}min^{-1}$	Enantiosseletividade (K_{cat}/K_M) _S / (K_{cat}/K_M) _R
	S ^a	R ^b	
1,4-dioxano	170	2,8	61
Benzeno	13	0,24	54
Trietilamina	330	6,9	48
THF	230	5,8	40
Piridina	43	1,4	31
DMF	1,4	0,16	9
Nitrometano	16	3,3	5
n-metil-acetamida	1,3	0,38	3
Acetonitrila	48	16	3

Este resultado foi interpretado com base no efeito do solvente sobre a mobilidade conformacional da proteína, segundo o modelo de sítio ativo apresentado na figura 6

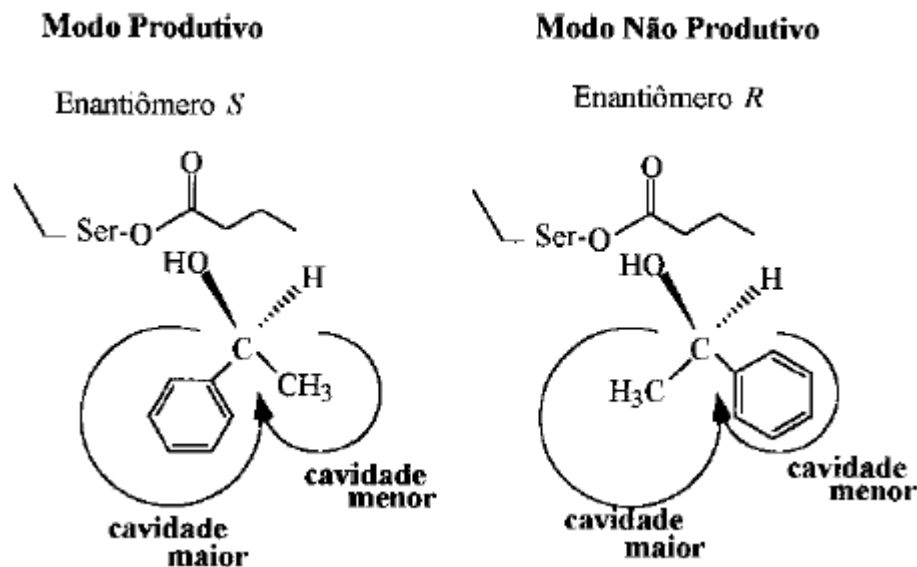
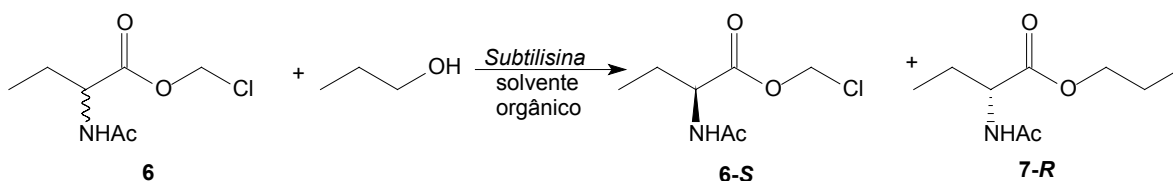


FIGURA 6: Representação esquemática para os modos de ligação dos enantiômeros *R* e *S* do álcool sec-feniletanol (**3**) e o sítio da subtilisina acilado (Fitzpatrick e Klibanov, 1991).

Neste modelo o enantiômero *S* do substrato é ligado à enzima segundo uma geometria denominada “modo produtivo”, onde o grupo fenila, mais volumoso, ocupa a cavidade maior e o grupo metila a cavidade menor. Já o enantiômero *R* necessita, para reagir, ocupar o sítio de ligação conforme um “modo não produtivo”, isto é, com o grupo fenila ocupando a cavidade menor e o metila a maior. A eficiência enantiosseletiva de processos como o descrito depende da rigidez do sítio ativo. Quando a flexibilidade da proteína aumenta, devido ao aumento da constante dielétrica do solvente, o impedimento estérico exerce menor influência, permitindo um aumento na reatividade do enantiômero *R*, com conseqüente diminuição da estereosseletividade. O suposto modo de ligação do 1-feniletanol no sítio ativo da subtilisina foi posteriormente também previsto por estudos de modelagem molecular (Fitzpatrick e Klibanov, 1992).

1.5.3 - Hidrofobicidade do solvente

De uma maneira geral o efeito da hidrofobicidade do solvente sobre a enantiosseletividade de biotransformações tem sido analisado em termos de partição, ou das moléculas de água presentes nas cavidades do sítio ativo (Sakurai *et al.*, 1988), ou dos grupos funcionais do substrato (Tawaki e Klibanov, 1992). Foi observado uma correlação linear entre a diferença de energia livre de ativação ($\Delta\Delta G^\ddagger$) para a reação de transesterificação entre o éster *N*-acetil-2-cloroetilalanina (6) e propanol, catalisada pela subtilisina em 13 solventes orgânicos, e o logaritmo do coeficiente de partição em água-octanol destes ($\log P$) conforme esquema 3 (Sakurai *et al.*, 1988). Para este sistema, foi verificada uma relação inversa entre o valor de $\Delta\Delta G^\ddagger$ e, conseqüentemente, da enantiosseletividade, e a hidrofobicidade dos solventes empregados, expressa em valores de $\log P$ conforme resultados expressos na tabela 3.

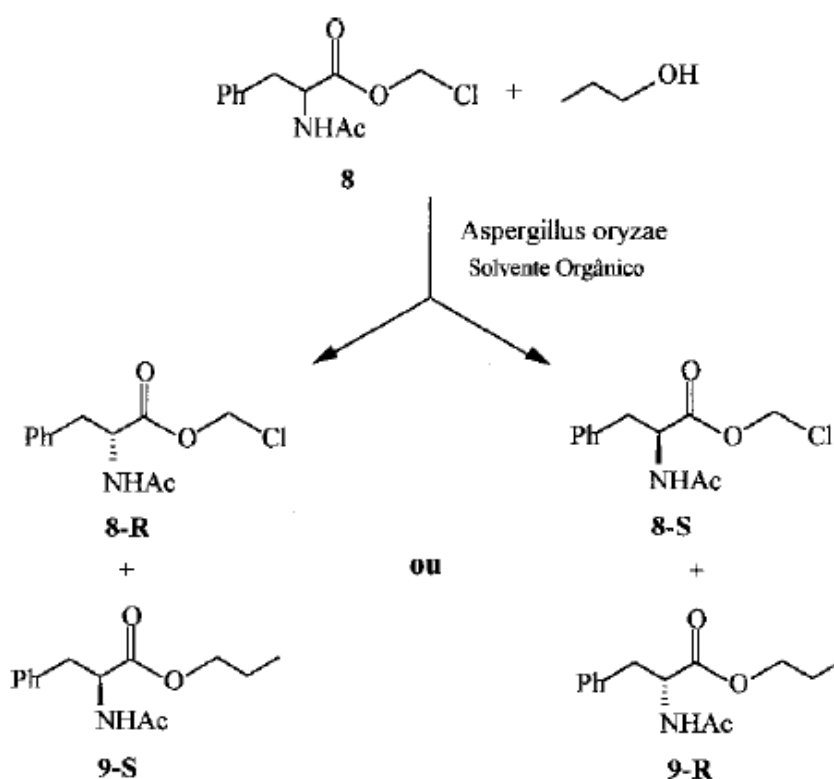


Esquema 3: Reação de transesterificação entre o éster *N*-acetil-2-cloroetilalanina (6) e propanol, catalisada pela subtilisina.

Esta dependência foi interpretada como sendo derivada da maior dificuldade encontrada no deslocamento de moléculas de água, presentes na cavidade hidrófoba do sítio de ligação da enzima, em solventes hidrófobos durante o processo de ligação enzima-substrato, ou seja, aumento de entropia. A força condutora deste processo surge do deslocamento das moléculas de água que estão presentes dentro da cavidade hidrófoba do sítio de ligação da enzima, tendo como conseqüência um processo termodinamicamente menos favorecido quando efetuado em solventes hidrofílicos. O enantiômero menos reativo precisa, para reagir, estar ligado ao sítio ativo de uma maneira mais energética, conseqüentemente ele deverá deslocar menos moléculas de água que o enantiômero que reage mais rapidamente,

resultando numa maior diminuição da reatividade deste último enantiômero com conseqüente diminuição da estereosseletividade da reação.

Dependendo das características estruturais e dos grupos funcionais ligados ao estereocentro, este tipo de fenômeno pode estar associado aos efeitos de partição dos grupos funcionais do próprio substrato (Tawaki e Klivanov, 1992). Na reação de transesterificação entre *N*-acetil-2-cloroetilfenilalanina (8) e propanol, catalisada por *Aspergillus oryzae* (Esquema 4), observou-se uma reversão completa da enantiosseletividade da enzima, induzida a partir da mudança do solvente (Tawaki e Klivanov, 1992).



Esquema 4: Reação de transesterificação entre *N*-acetil-2-cloroetilfenilalanina (8) e propanol, catalisada por *Aspergillus oryzae*.

Conforme ilustrado na tabela 3, enquanto em solventes hidrofílicos, como acetonitrila e DMF, o enantiômero *S* de (8) é mais reativo, uma inversão na

reatividade é constatada quando se trabalha em solventes hidrófobos como tolueno e tetracloreto de carbono.

Tabela 03: Enantiosseletividade da subtilisina da Calrsberg na reação de transesterificação de **8** em vários solventes orgânicos. ^aEnantiômero *R*; ^benantiômero *S*.

Solvente	Velocidade inicial v μMh^{-1} (mg de proteína) ⁻¹		Enantiosseletividade v_S/v_R
	<i>S</i> ^a	<i>R</i> ^b	
Acetonitrila	0,85	0,12	7,1
DMF	0,017	0,003	5,7
Piridina	0,65	0,15	4,3
<i>tert</i> -Butanol	1,4	0,83	1,7
Dioxano	0,70	0,55	1,3
Acetona	0,54	0,41	1,3
THF	1,2	0,93	1,3
Cicloexanona	0,46	0,41	1,1
Diclorometano	0,29	0,33	0,88
3-Octanona	0,16	0,22	0,73
Nitrobenzeno	0,57	0,95	0,60
Acetato de <i>tert</i> -butila	1,4	3,2	0,44
Trietilamina	2,7	8,0	0,34
MTBE	2,2	6,4	0,34
Cicloexano	3,2	12	0,27
Tolueno	0,82	3,2	0,26
Octano	2,9	12	0,24
Tetraclorometano	1,4	8,9	0,19

Este efeito foi racionalizado segundo um modelo de afinidade entre os grupos do substrato e solvente (Figura 7). Neste, o “modo produtivo” de ligação representa a situação onde o grupo hidroxila do resíduo serina (Ser) da tríade catalítica está em

posição adequada para o ataque nucleofílico sobre o carbono carbonílico de (8). Conforme aumenta a hidrofobicidade do solvente, a parte hidrófoba (grupo benzila) de (8) sofre partição para fora do sítio ativo. Este modo favorece a reatividade do enantiômero *R*. Em solventes hidrofílicos, o grupo benzila é trocado por um grupo menos lipofílico, sendo que a geometria que a molécula deve adotar neste caso favorece a reatividade do enantiômero *S*.

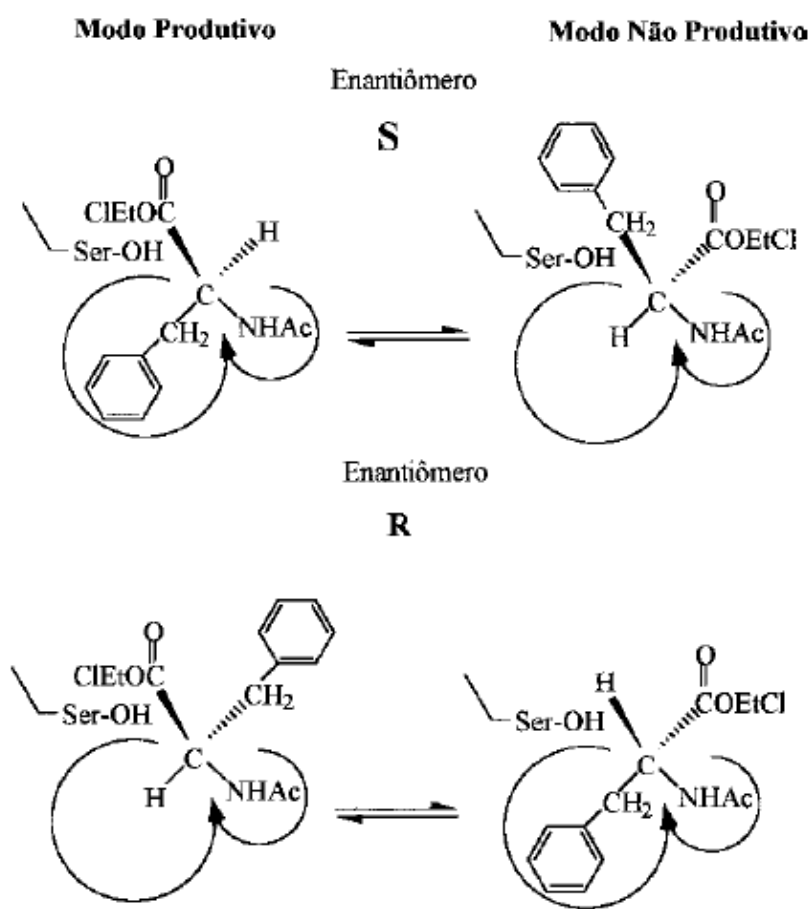
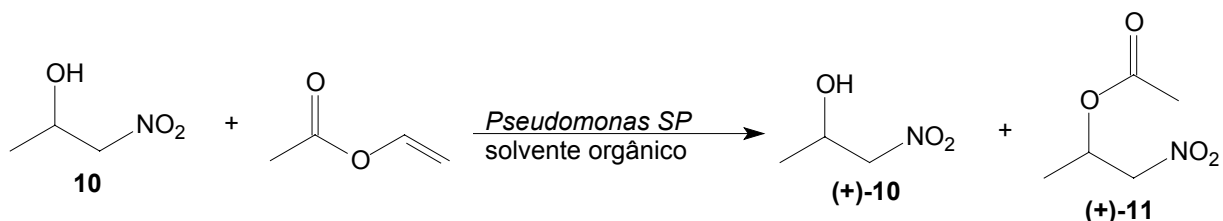


FIGURA 7. Representação esquemática dos modos de ligação dos enantiômeros *R* e *S* de (8) ao sítio ativo de *Aspergillus oryzae* (Tawaki e Klivanov, 1992).

1.5.4 - Estrutura do solvente

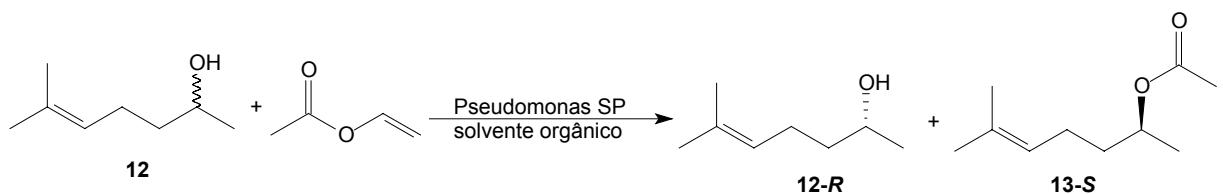
Em trabalho sobre a influência da estrutura do solvente na reação entre 1-nitropropanol (10) e acetato de vinila, catalisada por *Pseudomonas sp.* Esquema 5,

foi estabelecido um critério empírico para a escolha adequada do solvente em reações catalisadas por lipases, segundo o qual solventes cíclicos seriam mais adequados para que fossem alcançadas maiores enantiosseletividades (Nakamura *et al.*, 1991).



Esquema 5: Reação entre 1-nitropropanol (10) e acetato de vinila, catalisada por *Pseudomonas sp.*

Em outro trabalho (Nakamura *et al.*, 1995) estudou-se o efeito da estrutura da molécula do solvente na reação de esterificação entre o sulcatol (12) e acetato de vinila, catalisada pela lipase de *Pseudomonas sp.* (Esquema 6).



Esquema 6: Reação de esterificação entre o sulcatol (12) e acetato de vinila, catalisada pela lipase de *Pseudomonas sp.*

Observou-se que o emprego de alcanos e éteres lineares como solventes conduziu a biotransformação a enantiosseletividades maiores do que quando foram empregados solventes ramificados. Da mesma forma, foi constatado que, em uma série homóloga de cicloalcanos, a enantiosseletividade do sistema diminui com o aumento do número de carbonos. Estes resultados foram explicados em função da maior facilidade de incorporação das moléculas lineares, quando comparadas com os derivados ramificados, ou com menor número de carbonos, no caso de solventes cíclicos, na cavidade menor do sítio ativo da lipase. O modelo apresentado na figura

8 mostra que aqueles solventes que têm suas moléculas mais facilmente incorporadas nas cavidades do sítio ativo, tendem a retardar mais a velocidade de ligação efetiva do enantiômero que reage mais lentamente, o qual precisa se ligar segundo um “modo não produtivo”.

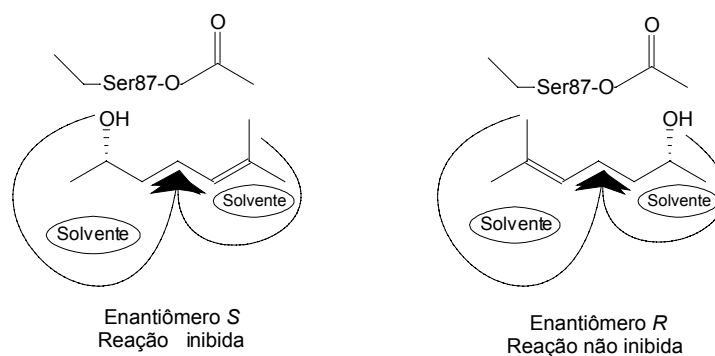


Figura 8. Mecanismo de inibição enantiosseletiva para a reação de transesterificação entre sulcatol (12) e acetato de vinila catalisada pela lipase *PS* (Nakamura, *et al.*, 1995).

I.6 - Emprego de lipases em síntese orgânica

As lipases estão entre os biocatalisadores mais empregados em síntese orgânica (Gotor, 1999; Theil 1995; Itoh *et al.* 1997; Schmid e Verger, 1998). Essa classe de enzimas é capaz de efetuar reações hidrolíticas de maneira enantiosseletiva, bem como catalisar a formação de uma ampla variedade de compostos contendo as funções éster e amida (Andersch *et al.*, 1997).

Dada a versatilidade das lipases e a alta enantiosseletividade apresentada em resoluções de tais classes de compostos orgânicos, tem crescido substancialmente seu emprego na síntese de produtos naturais e de compostos biologicamente ativos. Vários artigos de revisão foram publicados dando ênfase ao emprego de lipases na síntese de produtos naturais quirais (Roberts, 1998; Roberts, 1999; Roberts, 1999; Roberts, 2000; Davis e Boyer, 2001).

I.6.1 - A enzima NOVOZYME 435

Novozyme 435 é uma lipase do tipo CAL-B *Cândida antarctica* produzida por fermentação submersa de microorganismos *aspergillus orizae* geneticamente modificada e adsorvida sobre resina acrílica macroporosa numa concentração de 3% massa/massa.

Consiste de partículas com diâmetro na escala de 0,3-0,9 mm, densidade aproximada de 430 Kg/m³ contendo 1-2% de água massa/massa.

A atividade de síntese do éster pela enzima NOVOZYME 435 é expressa em laurato de propila por grama (PLU/g) e descrita no catálogo como sendo 10.000 PLU/g.

A enzima é uma hidrolase triacilglicerol (E.C. no. 3.1.1.3.) e também uma carboxilase efetiva.

A lipase é termoestável e particularmente usada na síntese de ésteres e amidas. NOVOZYME 435 tem um amplo substrato específico, isto é, promove reações entre uma grande escala de álcoois primários e secundários, bem como, ácidos carboxílicos.

Nos parâmetros de reação a enzima tem atividade máxima na faixa de 70-80 °C, mas para melhor controle da reação recomenda-se trabalhar na faixa de 40-60 °C para ótima produtividade.

Quanto ao risco que a enzima apresenta, ela é nociva à pele, olhos e mucosas quando em contato prolongado e neste caso lavar com água por um período longo.

I.7 - SEMIOQUÍMICOS

Até onde se conhece, os insetos estão entre os seres que mais utilizam os “odores” para desempenhar atividades durante sua existência, tendo esses um papel determinante na localização de presas, na defesa e na agressividade, na seleção de plantas hospedeiras, na escolha de locais para oviposição, na corte e no acasalamento, na organização das atividades sociais e em diversos outros comportamentos (Vilela, *et. al.*, 1986).

A comunicação química entre os insetos tem um papel determinante no sucesso da espécie tendo em vista que muitos deles apresentam um ciclo de vida

bastante curto. A comunicação, segundo alguns autores, pode ser definida como um processo no qual a informação é trocada entre organismos, com vantagens mutuamente adaptativas (Klopfer e Hatch, 1968) ou, em alguns casos, estabelece-se a comunicação sem que haja vantagem para um dos indivíduos envolvidos no processo (Wilson, 1971). A comunicação pode ainda ser definida como a transmissão de sinais entre dois ou mais organismos, favorecendo a seleção tanto de produção, quanto da recepção do sinal ou de sinais (Lewis e Gower, 1980). As substâncias químicas envolvidas na comunicação entre os organismos são denominadas semioquímicos, que significam “sinais químicos” (Nordlund e Lewis, 1980).

O termo semioquímico é amplo, não se referindo apenas às substâncias químicas responsáveis pelo fornecimento de informações, como também às toxinas. Assim utiliza-se o termo infoquímicos para enfatizar a diferença entre esta categoria de substâncias químicas, que transportam informações, e as toxinas e nutrientes (Dicke. e Sabelis, 1988). O termo infoquímico pode ser definido, então, como uma substância química que, em seu contexto natural, fornece informações, em uma interação entre dois indivíduos, provocando, no receptor, um comportamento ou uma resposta fisiológica. Os infoquímicos classificam-se como uma subcategoria dos semioquímicos e, com base no tipo de interação entre os indivíduos envolvidos no processo de comunicação, se intraespecífica ou interespecífica, bem como na relação custo/benefício que cada organismo da interação pode ter, dá-se a classificação desses, conforme tabela 04.

Tabela 04 – Representação esquemática dos semioquímicos e suas subclasses.

SEMIOQUÍMICOS			
(infoquímicos + toxinas + nutrientes)			
INFOQUÍMICOS			
Ação intraespecífica	Ação interespecífica		
FEROMÔNIOS	ALELOQUÍMICOS		
	ALOMÔNIOS	CAIROMÔNIOS	SINOMÔNIOS
(+ -); (- +); (+ +)	(+ -)	(- +)	(+ +)

Os sinais entre parentesis () referem-se ao custo benefício na “comunicação química” entre os insetos emissores e receptores, respectivamente. O sinal (+) é benéfico ao emissor ou receptor, ao passo que o sinal (-) não contribui significativamente para quem o emite (emissor), ou para quem o recebe (receptor).

1.7.1 – ALELOQUÍMICOS

Os infoquímicos mediadores de interação entre dois indivíduos de espécies diferentes (ação interespecífica) são designados aleloquímicos. Estas substâncias químicas exercem papel fundamental em todas as comunidades, estendendo-se, muitas vezes, além de duas categorias tróficas adjacentes, mediando interações entre três ou mais níveis tróficos (Price, *et. al.* 1988).

1.7.2 - FEROMÔNIOS

Os feromônios são definidos como infoquímicos envolvidos nos processos de comunicação estabelecidos entre indivíduos de uma mesma espécie e são, espécie-específicos. O termo surge da combinação das palavras gregas *pherein*, que significa carregar e *horman*, estimular. Os feromônios podem ser definidos, mais abrangentemente, como infoquímicos mediadores de uma interação entre organismos da mesma espécie (ação intraespecífica), produzindo uma resposta comportamental ou fisiológica adaptativa favorável ao receptor, ao emissor ou a ambos os organismos envolvidos na interação. Os feromônios podem ser subdivididos de acordo com a função que apresentam no processo de comunicação sendo os mais comuns os que se seguem (Price, *et al.*, 1988; Dicke, *et al.* 1992):

Feromônio sexual: empregados para aumentar a probabilidade de encontro entre indivíduos de sexo diferente, facilitando o acasalamento. São normalmente produzidos por apenas um dos sexos e são bastante eficientes no processo de atração do sexo oposto.

Feromônio de trilha: são comuns nos insetos sociais e utilizados para retornar à colônia, empregado para indicar a fonte de alimento ou o novo sítio onde a colônia deverá se estabelecer.

Feromônio de território ou marcação: delimita territórios, minimizando ou até evitando encontros indesejáveis e agressivos.

Feromônio de alarme: transmite uma mensagem de perigo ou assinala a presença de um inimigo.

Feromônio de postura: auxilia as fêmeas a localizarem um local adequado para postura de ovos.

Feromônio de agregação: tem como função principal atrair um elevado número de indivíduos da mesma espécie, geralmente com o objetivo de indicar a presença de alimento.

A utilização de feromônios tem contribuído para o controle de pragas agrícolas e florestais, como parte da integração de métodos químicos e biológicos (Greenway, *et al.*, 1975). Feromônios sexuais e de agregação são frequentemente empregados devido a maior eficiência na captura dos insetos em campo. Tal metodologia tem sido utilizada em momentos estratégicos procurando garantir a produção de alimentos, dentro de certos limites, isenta de pragas e agrotóxicos.

Para se explorar, com sucesso, a potencialidade do emprego de feromônios como uma efetiva metodologia de controle de pragas da agricultura, se faz necessário à determinação da mistura ou da substância atraente para o inseto alvo, o controle da pureza desta e as condições de sua aplicação no campo (Milar e Sims, 1998).

Devido a sua eficiência no processo de atração, feromônios sexuais e de agregação estão entre os mais empregados para o controle de insetos-pragas em nível mundial.

I.7.3 - *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae)

Um exemplo de sucesso no emprego de semioquímico sintético para o controle de pragas no Brasil é o uso do Rincoforol, (*E*)-6-metil-2-hepten-4-ol,

feromônio de agregação da broca-do-olho do coqueiro, *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae). Na ocasião da determinação estrutural do feromônio foi verificado que o inseto produz o estereoisômero S, com pureza ótica acima de 98% (Oehlschlager, *et al.*, 1992)

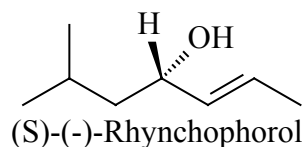


Figura 09: Estrutura do feromônio de agregação do *Rhynchophorus palmarum* L.

O *R. palmarum* é uma praga importante das plantações de coco (*Cocos nucifera*) na Venezuela, México, Brasil e áreas do Caribe (Hernández, *et al.*, 1992).

Esta cultura é uma das mais importantes no Norte e Nordeste brasileiro (Moura, *et al.*, 1990), e responde por aproximadamente 80 % da produção nacional. *R. palmarum* pode ainda utilizar como planta hospedeira, ou fonte de alimento, a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), o dendezeiro (*Elaeis guineensis*), o mamoeiro (*Carica papaya*), o abacaxizeiro (*Ananas comosus*), dentre outros, levando a perdas e danos consideráveis às respectivas plantações.



Figura 10. Macho do *R. palmarum*, responsável pela liberação de feromônios de agregação (Baseado em Navarro *et al.*, 2002).

O inseto adulto (Figura 10) é um besouro de cor negra, cabeça pequena e alongada para a frente, de hábito diurno e crepuscular. As larvas são de coloração branca e se alimentam do meristema apical da planta, o que permite a instalação de bactérias e outros microorganismos no interior desta, prejudicando, assim, o seu desenvolvimento. *R. palmarum* é um inseto que apresenta metamorfose completa, ou seja, o ovo origina a larva que passa para a fase de pupa e posteriormente atinge a fase adulta. No estágio adulto, o macho, quando na planta hospedeira, libera o feromônio de agregação que atrai tanto machos como fêmeas, geralmente para a fonte de alimento. Uma vez que ambos os sexos encontram-se no mesmo ambiente, ocorre também a cópula. As fêmeas fazem posturas em ferimentos recém abertos na planta, reiniciando todo o ciclo de vida. Este inseto é o transmissor do nematóide *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) (Griffith, 1968), agente causador da doença conhecida como anel vermelho (Figura 11 A). Esta doença é letal para o coqueiro e outras palmeiras. A doença no coqueiro pode ser detectada pelo amarelecimento das folhas mais novas (Figura 11 B). Em estágios mais avançados, ocorre apodrecimento do meristema apical e secagem da flecha, com a conseqüente morte da planta (Hernández *et al.*, 1992).

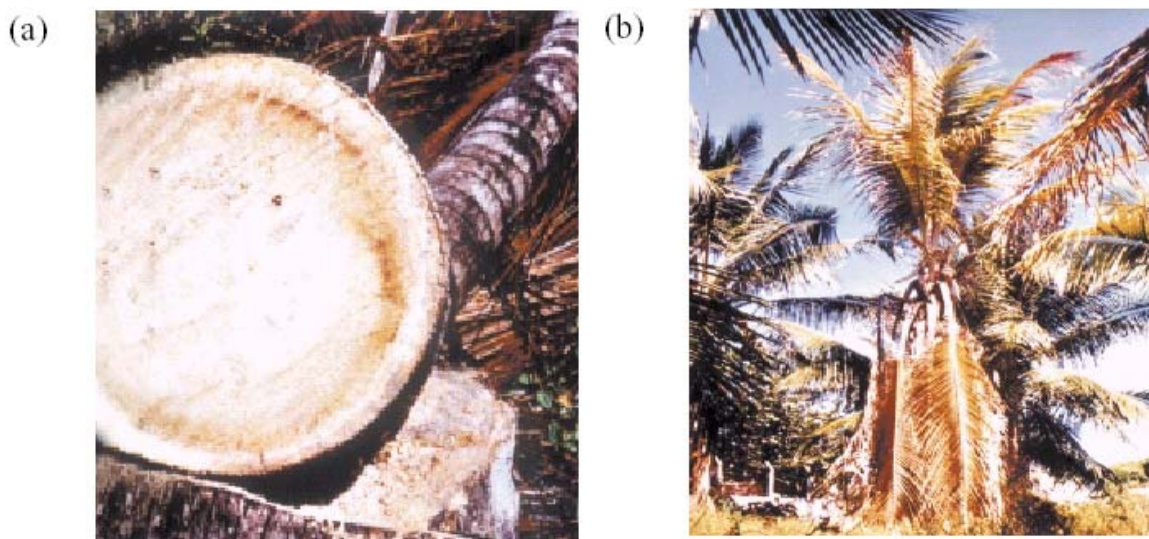
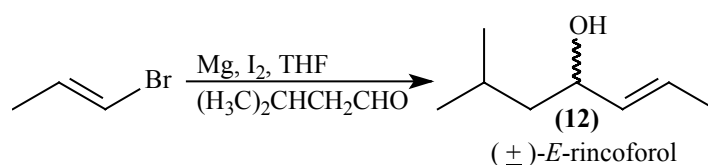


Figura 11: Sintomas interno (a) e externo (b) da doença do anel-vermelho (Baseado em Navarro *et al.*, 2002).

O (\pm)-rincoforol em testes de campo tem demonstrado uma maior eficiência na captura dos insetos, quando associado com pedaços de cana-de-açúcar, estipe do coqueiro ou frutos de abacaxi. Como exemplo deste efeito sinérgico, Rochat e colaboradores (1991) obtiveram uma captura média de 3 insetos por armadilha quando utilizaram somente pedaços de cana-de-açúcar, ao passo que quando combinaram a cana-de-açúcar com o (\pm)-Rincoforol (2,5 mg), foram coletados de 20 a 30 insetos por armadilhas. A utilização do feromônio isoladamente em campo, no entanto, tem demonstrado pouca atratividade na captura dos insetos (Rochat, *et al.*, 1991).

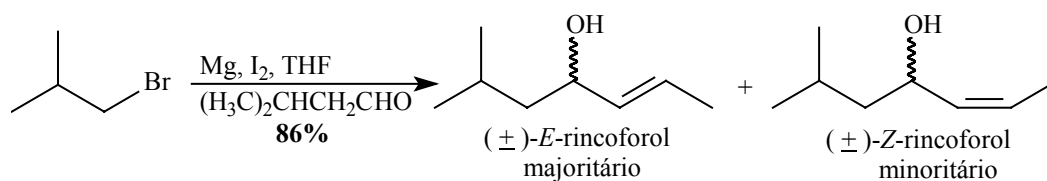
1.7.4 – Sínteses do rincoforol

Várias sínteses racêmicas do rincoforol encontram-se publicadas em literatura (Oehlschlager, *et al.*, 1992 e Navarro, *et al.*, 2002). Em uma delas o feromônio em questão é preparado através da reação do brometo de (*E*)-1-propenil magnésio com o isovaleraldeído (Oehlschlager, *et al.*, 1992).



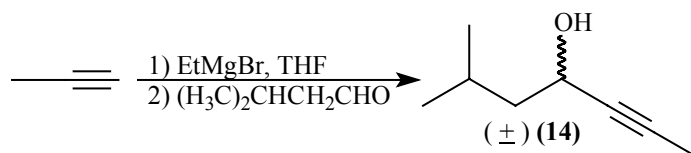
Esquema 07: Síntese do rincoforol seguida por Oehlschlager e colaboradores.

Uma outra síntese racêmica envolve a reação de condensação entre o brometo de isobutilmagnésio com o crotonaldeído (Navarro, *et al.*, 2002), gerando o rincoforol em 86% de rendimento. Nesta metodologia não se controla a estereoquímica da ligação dupla, uma vez que o crotonaldeído é comercializado como uma mistura dos estereoisômeros *E* e *Z*, prevalecendo o isômero geométrico *E*.



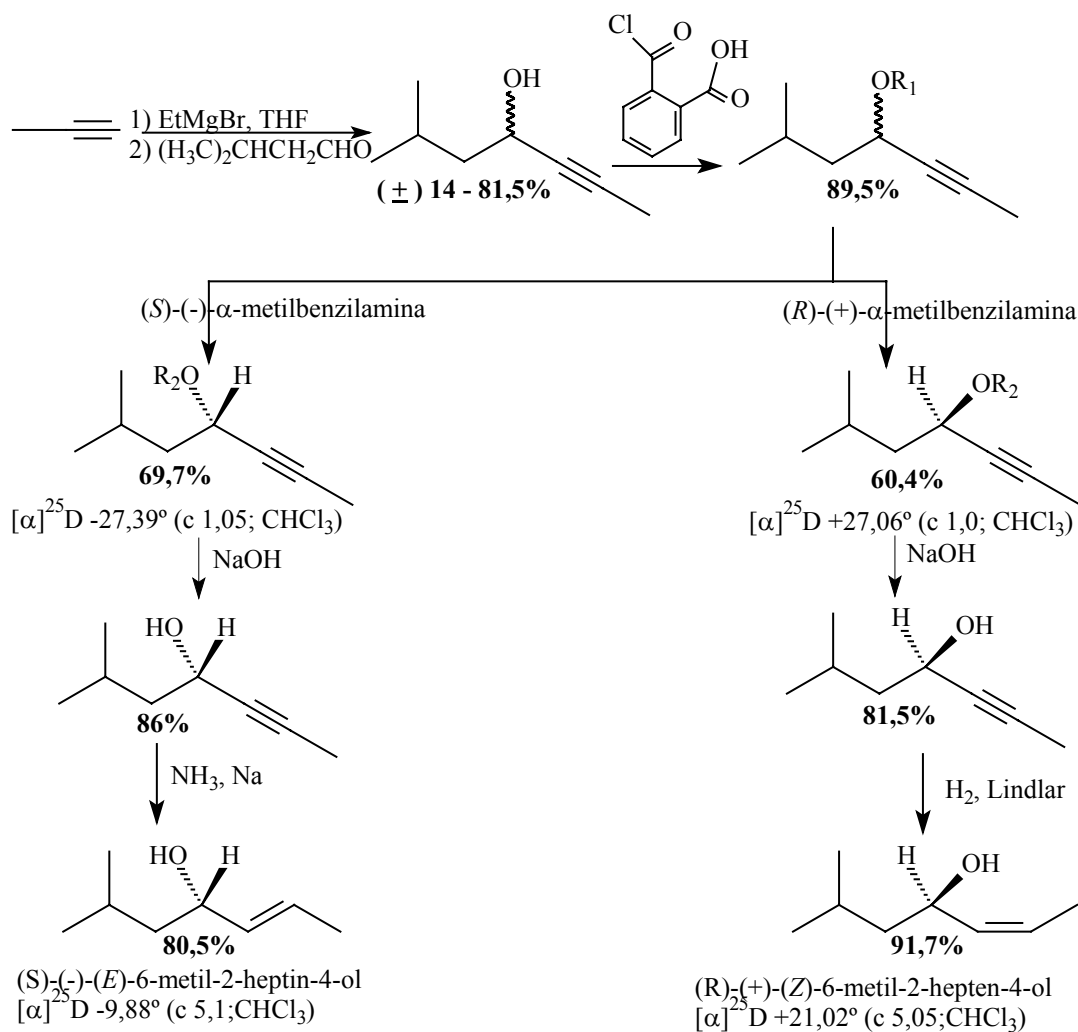
Esquema 08: Síntese do rincoforol seguida por Navarro e colaboradores.

Chan e colaboradores, 1976 prepararam o rincoforol através da reação do propino, gás não comercial. A síntese é iniciada através do borbulhamento do gás propino em uma solução de brometo de etil magnésio fazendo o produto desta reagir com o isovaleraldeído, fornecendo o álcool acetilênico em 81%.



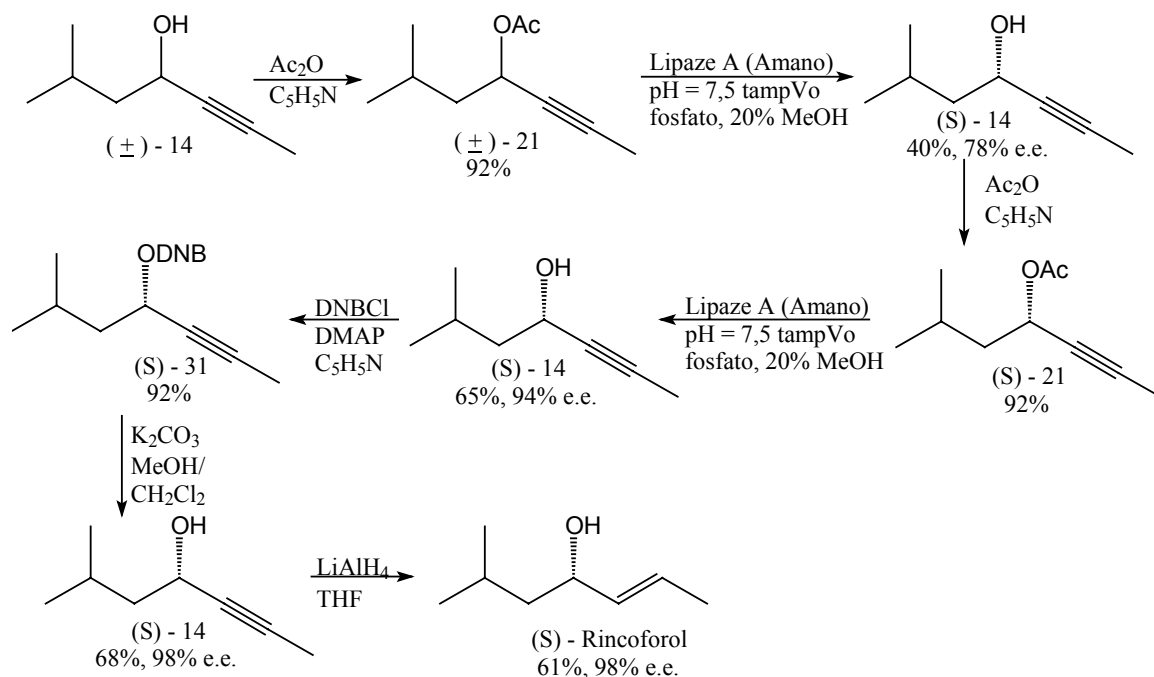
Esquema 09: Síntese do Intermediário (14) utilizada por Chan e colaboradores

A resolução dos compostos racêmicos é feita conforme ilustrada no esquema 10 abaixo.



Esquema 10: Resolução química usada por Chan e colaboradores para obter o (S)-(-)-rincoforol.

Mori preparou o álcool acetilênico (**14**) como mostrado no esquema 09 acima e fez a resolução enzimática dos estereoisômeros, obtendo o isômero desejado em sete etapas e com rendimento de 6,6 %,ma partir do álcool (**14**).



Esquema 11: Resolução enzimática para obtenção do (4*S*,2*E*)-(-)-6-metil-2-hepten-4-ol; (*S*)-rincoforol.

I.7.5 – *Metamasius hemipterus sericeus* (Coleoptera: Curculionidae).

I.7.5.1 - *Metamasius hemipterus*

O gênero *Metamasius* Horn, 1873, está associado a várias plantas hospedeiras como cana-de-açúcar, bromeliáceas, palmáceas, musáceas, entre outras. É de ampla distribuição no continente Americano, desde os Estados Unidos, até o Brasil.

A praga da cana-de-açúcar, *Metamasius hemipterus sericeus*, é distribuída pelo leste da Índia, América do Sul e Central tendo sido primeiramente encontrada no estado da Flórida em 1984 (Wooddruff e Baranowske, 1985). Dez anos após foi dimensionado os danos causados pela praga na cultura da cana-de-açúcar bem como relatada a dispersão por toda a Flórida (Sosa et al., 1997)



Figura 12: Macho de *Metamasius hemipterus sericeus*

Estudos envolvendo a ecologia química deste inseto levaram à identificação de alguns compostos liberados pelos machos entre eles o 4-metil-5-nonanol, 2-metil-4-heptanol, 2-metil-4-octanol, 5-nonanol e 3-hidróxi-4-metil-5-nonanona, tendo sido proposto que o 2-metil-4-octanol atuaria como feromônio de agregação desta espécie (Ramires-Lucas et al., 1996). Testes de campo efetuados na Índia, demonstraram que o estereoisômero *R* é mais potente que o *S* (Cho e Kim, 2003).

O 2-metil-4-octanol também é descrito como sendo feromônio de agregação de outros insetos da mesma família como *Sphenophorus levis* (Zarbin et al., 2004) e *Rhabdocelus obscurus* (Gibblin-Davis et al., 2000).

O *Sphenophorus levis* é conhecido também como gorgulhão-rajado ou besouro-da-cana. Semelhante ao bicudo do algodão, tem o dobro do tamanho do *Rhabdocelus obscurus*, medindo cerca de 15 mm. Assemelha-se também ao *Metamasius hemipterus*, sendo desprovido de manchas nos élitros. O *S. levis* tem hábitos noturnos, apresenta pouca agilidade e simula-se de morto quando atacado, denominado cientificamente de estenose.

Segundo Zarbin e colaboradores (2004) o composto (*S*)-2-metil-4-octanol é produzido especificamente pelos machos e sua atividade biológica está aparentemente associada ao comportamento de agregação da espécie.

Rhabdoscelus obscurus é considerada praga das plantações de cana-de-açúcar na Nova Guiné e utiliza o 2-metil-4-octanol como feromônio de agregação

(Gibblin-Davis et al., 2000) sendo que a estereoquímica do composto natural não foi determinada neste caso.

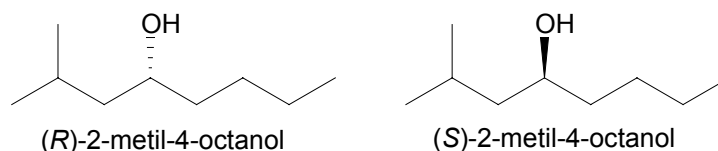
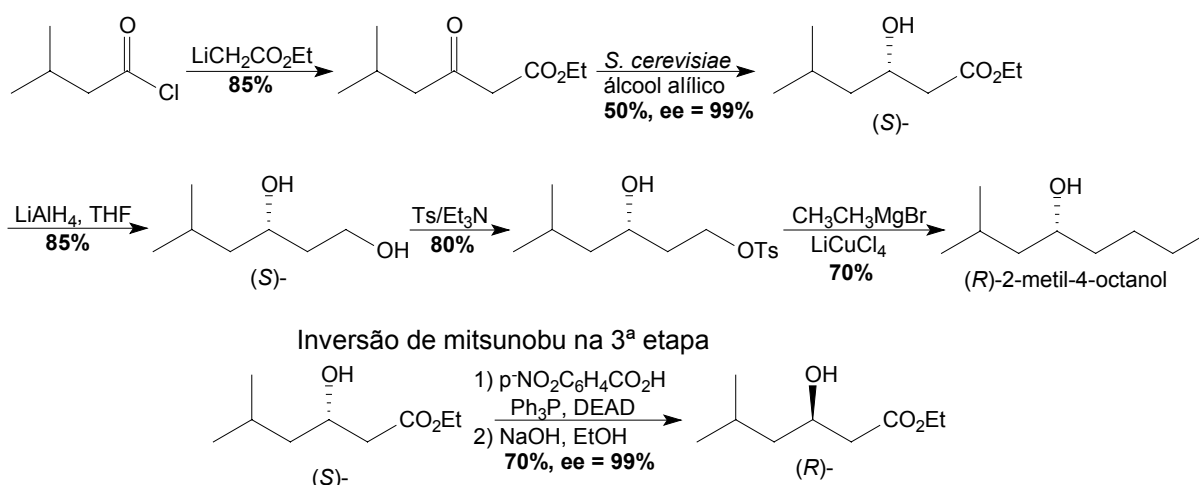


Figura 13: Enantiômeros do (R)- e (S)-2-metil-4-octanol

I.7.5.2 - Sínteses do 2-metil-4-octanol

A primeira síntese estereosseletiva do feromônio em questão teve como material de partida a (R) e (S)-leucina envolvendo cinco etapas com 11% de rendimento.

Baraldi e colaboradores (2002) sintetizaram o isômero (R) e (S)-2-metil-4-octanol conforme o esquema 12 com cinco etapas e com rendimento global de 20% para o enantiômero S. Para a síntese do enantiômero R, foi empregada a reação de inversão de Mitsunobu e o rendimento global foi de 14% .



Esquema 12: Síntese enantiosseletiva seguida por Baraldi e colaboradores para obtenção do (R) e (S)-2-metil-4-octanol.

OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi efetuar a síntese estereosseletiva dos feromônios de agregação do *Rhynchophorus palmarum* (L.) e *Sphenophorus Levis*, empregando como etapa chave nas respectivas rotas de síntese, a resolução enzimática de álcoois acetilênicos.

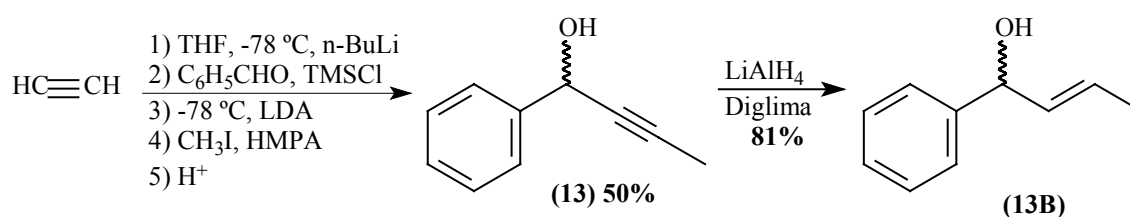
RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.1 - Testes iniciais

III.1.1 - Síntese racêmica do rincoforol

Inicialmente trabalhou-se na determinação das condições experimentais para se efetuar a síntese racêmica do rincoforol, que permitisse o controle da estereoquímica da dupla ligação. Para a síntese química do composto, utilizou-se inicialmente o gás acetileno como reagente de partida e o benzaldeído, disponível em nosso laboratório. As condições utilizadas para a preparação deste intermediário consistiram em borbulhar o acetileno em THF refrigerado a -78°C e adicionar n-BuLi para gerar o ânion acetileto para posterior adição do aldeído. Após ocorrer o ataque nucleofílico a carbonila do aldeído adicionou-se cloreto de trimetilsilano para capturar o alcóxido formado e desta forma, permitir a alquilação do acetileto terminal gerando seu ânion com diisopropilamideto de lítio e posterior alquilação com iodometano. Para favorecer a alquilação, hexametilfosforoamida (HMPA) foi usado.

É conhecido de literatura que a redução de ligações triplas adjacentes a grupos hidroxilas, efetuadas com hidreto de lítio e alumínio, ocorrem de maneira estereosseletiva, favorecendo a obtenção do composto de estereoquímica *E* (COREY e CHENG, 1989). Esta condição reacional foi então empregada para se preparar o composto **(13B)**.



Esquema 13: Rota teste para preparação do rincoforol racêmico.

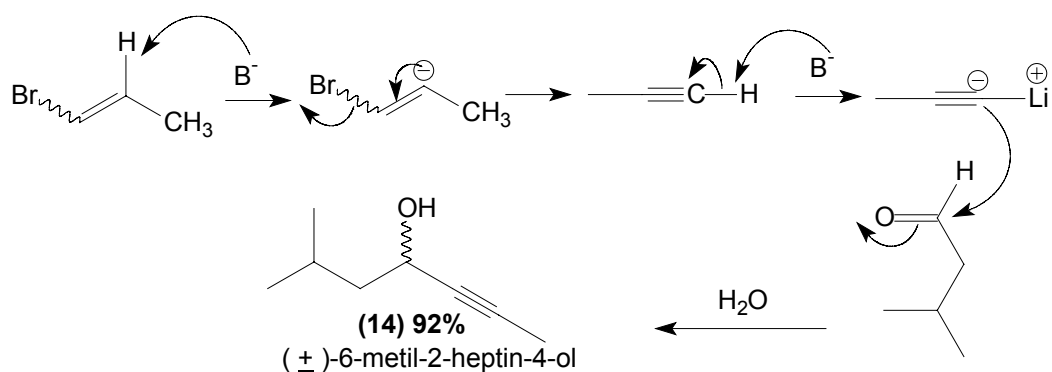
Ressalta-se que a redução da tripla ligação com LiAlH_4 , quando testada em refluxo de THF, não ocorreu em rendimentos apreciáveis. Desta forma, quando a mesma reação foi efetuada em refluxo de 2-metóxi-etil éter (diglima), o alquenol

desejado, com estereoquímica *E* para a dupla ligação gerada, foi obtido em rendimento de 81%.

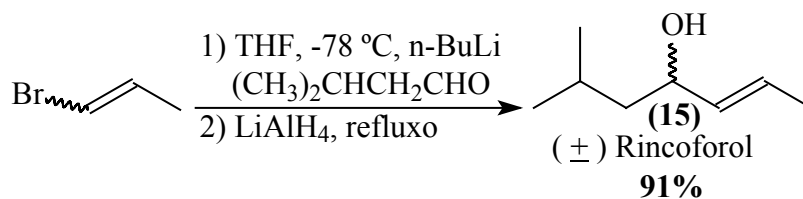
Esses resultados nos mostraram a viabilidade de se sintetizar o feromônio em questão com total controle da estereoquímica da insaturação através da metodologia proposta.

Um método mais direto para a obtenção do feromônio em questão foi empregado a partir do trabalho desenvolvido em 1995 por Suffert e colaboradores. Neste trabalho é descrita uma maneira eficiente de se preparar o propileto de lítio a partir da mistura dos estereoisômeros do (*E/Z*) 1-bromopropeno.

Para a preparação do intermediário chave para a síntese do rincoforol, a metodologia descrita por Suffert e colaboradores, consiste em gerar o propileto de lítio em THF a partir do (*E/Z*) 1-bromopropeno, bastando para tal adicionar dois equivalentes de *n*-BuLi, sendo que, o primeiro equivalente gera o propino em “*situ*” e com a adição do segundo equivalente gera-se o propileto de lítio, como demonstrado no esquema 14. Com o propileto de lítio gerado, o isovaleraldeído, agora disponível em nosso laboratório, foi acrescentado lentamente ao meio reacional e desta reação obteve-se a mistura racêmica do (\pm)-6-metil-2-heptin-4-ol com 92% de rendimento, intermediário chave para a síntese do rincoforol, conforme esquema 14.



Esquema 14: Proposta para gerar propileto de lítio em “*situ*” na reação e adição nucleofílica a carbonila do isovaleraldeído.



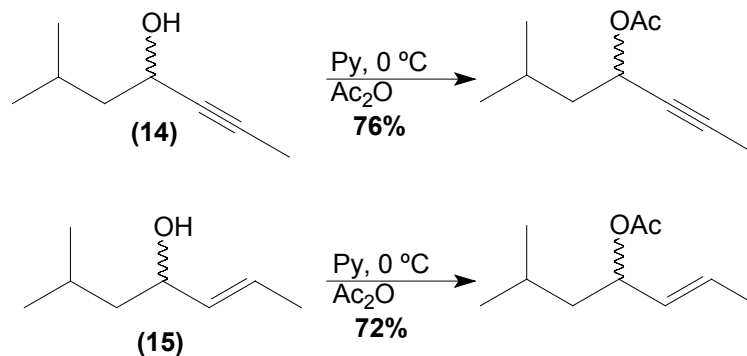
Esquema 15: Método de síntese “one pot” do (±) rincoforol.

III.1.2 - Resolução enzimática na síntese estereosseletiva do rincoforol (15).

É conhecido de literatura que álcoois secundários podem ser eficiente resolvidos por algumas enzimas. Bons resultados foram recentemente descritos quando álcoois acetilênicos foram reagidos com acetato de vinila, na presença de uma enzima suportada, conhecida como NOVOZYME 435 (Raminelli et al., 2004).

A grande vantagem da utilização da NOVOZYME 435 consiste no fato de as reações serem efetuadas em hexano anidro, solvente facilmente eliminado ao final do processo e que por se tratar de uma enzima suportada em resina ela pode ser removida do processo por simples filtração.

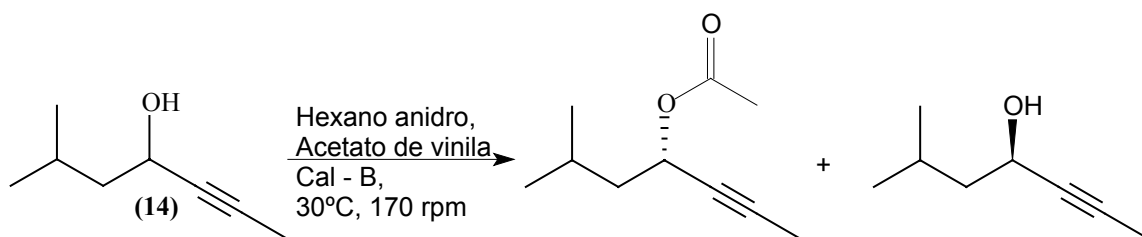
Inicialmente vislumbrou-se a possibilidade de se testar a resolução enzimática dos enantiômeros do composto (14) e da mistura racêmica do rincoforol (15). A primeira etapa envolveu a acetilação dos racematos através da reação com anidrido acético em piridina, a 0 °C (Mori & Akao, 1980), para se obter os padrões necessários para o acompanhamento dos respectivos processos de resolução por CG.



Esquema 16: Preparação química dos acetatos para padrões cromatográficos nas reações de resolução enzimática

Os acetatos preparados e seus álcoois precursores foram analisados por cromatografia gasosa em coluna apolar aquiral (VA- 5) para se determinar o tempo de retenção dos mesmos nas seguintes condições cromatográficas: temp. inicial 60°C, gradiente de 10°C/minuto até 230°C, sendo que para o álcool **(14)** o tempo de retenção foi de 3,81 minutos e seu derivado acetilado, 5,55 minutos e para o álcool **(15)**, o tempo de retenção foi de 3,08 minutos e seu derivado acetilado foi 4,62 minutos respectivamente. A reação de acetilação enzimática foi monitorada por CG aquiral seguido de análise em CG quiral, no caso de se detectar a formação do composto acetilado.

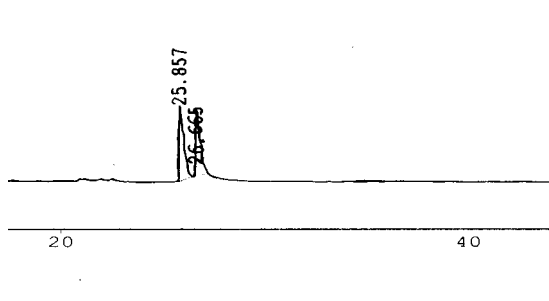
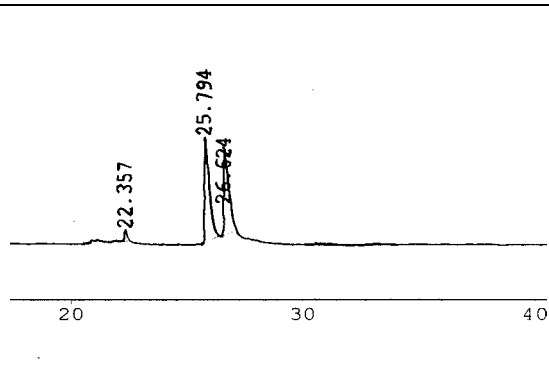
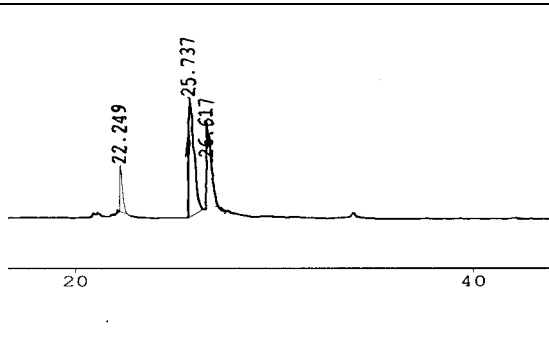
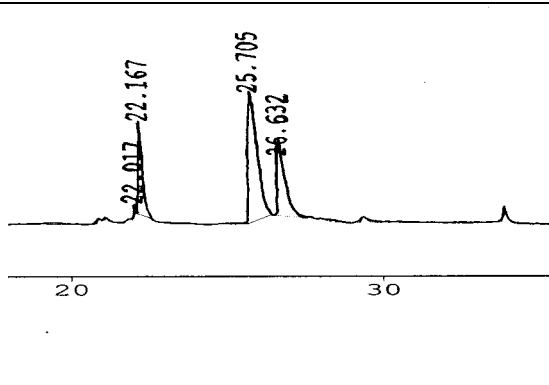
III.2 - Tentativa de resolução do (\pm)-6-metil-2-heptin-4-ol (**14**)



Esquema 17: Representação de resolução enzimática do (\pm)-6-metil-2-heptin-4-ol (**14**).

A evolução da resolução enzimática dos enantiômeros em questão é ilustrada na tabela **06** abaixo.

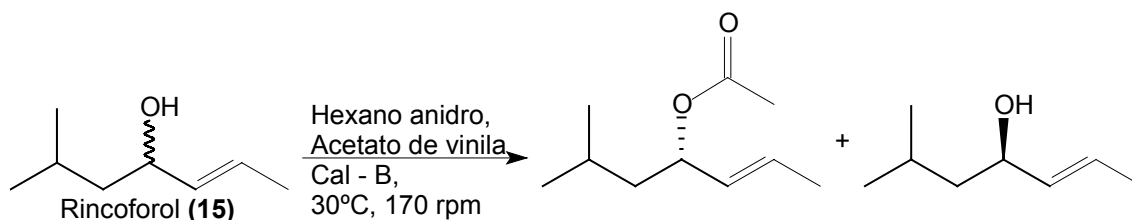
Tabela 06: Resultados da resolução enzimática do (\pm) 6-metil-2-heptin-4-ol (**14**), com tempo de resolução.

Tempo	Cromatograma	Descrição
2 horas		Não foi observada a formação do produto acetilado até este tempo
6 horas		Neste tempo observou-se a formação de um dos produtos acetilados em 3% e redução da área referente ao pico do álcool com maior tempo de retenção.
24 horas		Após este tempo, 11% do produto acetilado aparece no cromatograma com redução proporcional do álcool com maior tempo de retenção.
48 horas		Com 48 horas, começa a ser observado a formação do acetato de menor tempo de retenção, na proporção de 0,8% na mistura total, perfazendo um excesso enantiomérico de 92% para o acetato majoritário.

A formação do derivado acetilado, catalisada pela enzima, mostrou ser bastante lenta sendo também observado o aparecimento do outro enantiômero acetilado mesmo antes de se ter uma boa conversão química daquele enantiômero

que mostrou ser mais reativo. Esses resultados mostraram que o alquinol (**14**) não poderia ser empregado na síntese estereosseletiva do rincoforol, com a enzima selecionada.

III.3 - Tentativa de resolução do (\pm)-6-metil-(2*E*)-hepten-4-ol (rincoforol) (**15**).

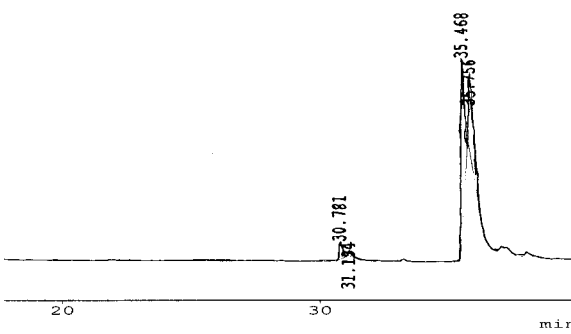


Esquema 18: Representação de resolução enzimática do (\pm)-6-metil-2*E*-hepten-4-ol (**15**).

A possibilidade de se efetuar a resolução enzimática diretamente dos enantiômeros do rincoforol também foi avaliada. A evolução da reação está ilustrada na tabela **07**.

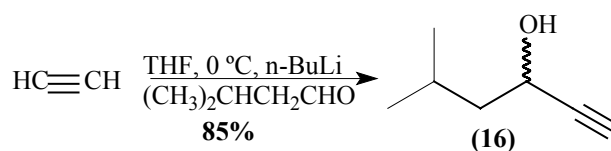
Tabela 07: Resultados da resolução enzimática do rincoforol.

Tempo	Cromatograma	Descrição
2 horas		Não foi observada a formação do produto acetilado até este tempo

48 horas		<p>A resolução enzimática se mostrou lenta e não eficiente pois após 48 horas observou-se a formação dos dois produtos acetilados em excesso enantiomérico de apenas 30% e com baixa conversão química</p>
----------	---	--

Não tendo sido obtido êxito na resolução dos compostos **(14)** e **(15)** optou-se por tentar a resolução com um outro composto que pudesse ser empregado na síntese do rincoforol.

Analisando-se os resultados de literatura (Raminelli *et al.*, 2004), as reações enzimáticas que geravam melhores resultados trabalhando-se com a enzima que estávamos utilizando, empregavam compostos que apresentavam álcoois acetilênicos com a ligação tripla terminal. Desta forma optou-se por preparar o composto derivado da reação do ânion acetileto com o aldeído isovalérico, conforme ilustrado no esquema abaixo.



Esquema 19: Preparação do (\pm)-5-metil-1-hexin-3-ol **(16)**.

A caracterização deste composto foi feita por RMN de hidrogênio e carbono, os quais mostraram algumas características peculiares.

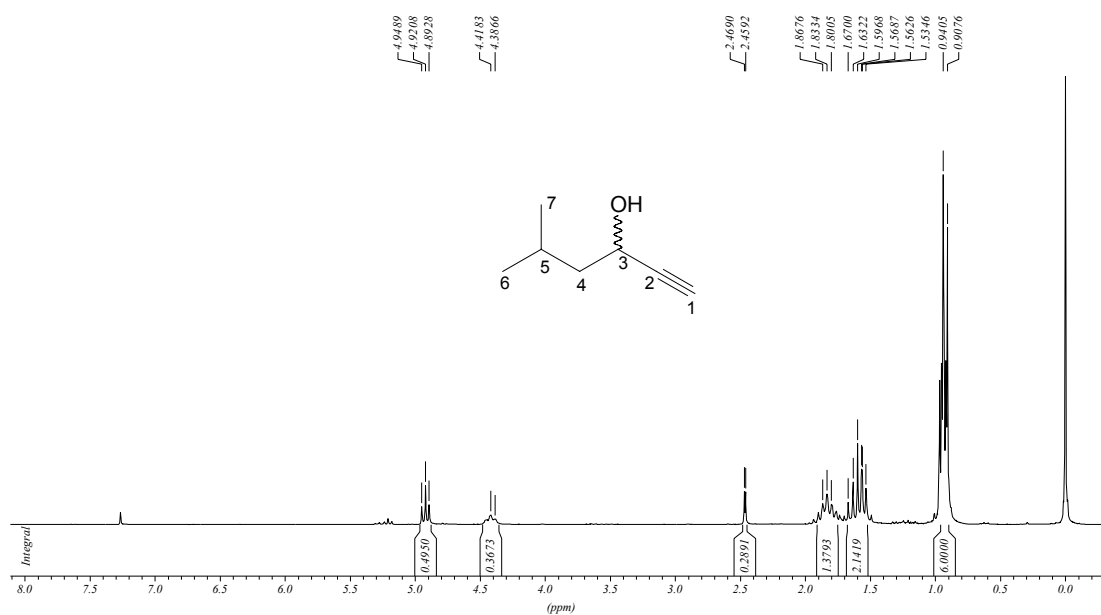


Figura 15: Espectro de hidrogênio do álcool (16).

Neste espectro observamos que na região de 0,90-0,94 ppm temos os hidrogênios correspondente as metila (6 e 7), as quais também tem deslocamentos semelhantes para os álcoois **14** e **15**, na região de 1,6 ppm temos os hidrogênios do CH₂ do carbono (4), em 1,84 ppm temos o Hidrogênio CH do carbono (5), em 2,46 ppm temos o hidrogênio acetilênico (1), em 4,4 ppm temos o hidrogênio da hidroxila e em 4,92 ppm temos o hidrogênio carbinólico do carbono (3).

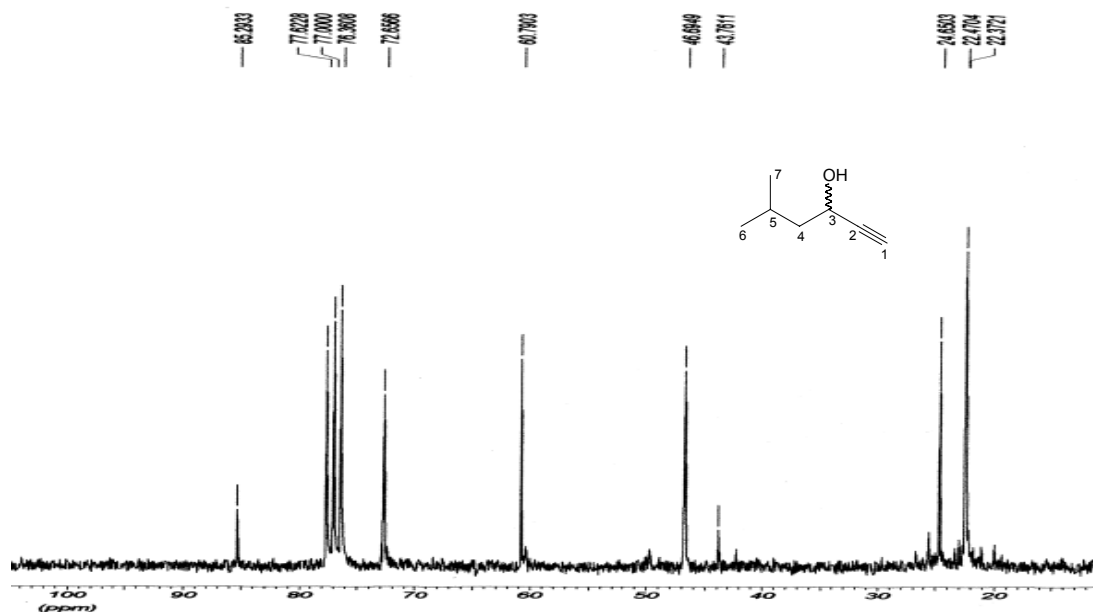
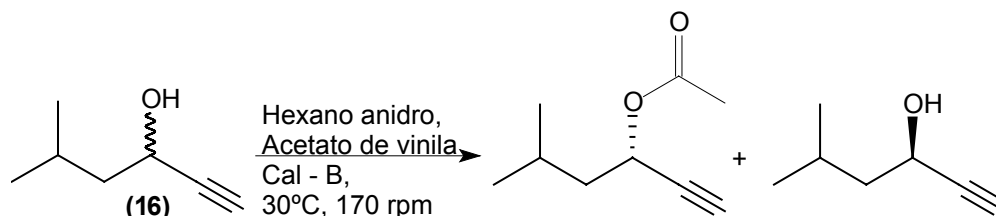


Figura 16: Espectro de carbono do álcool **(16)**.

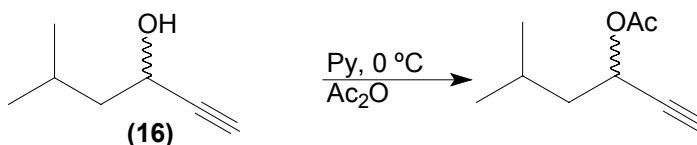
Para o espectro de carbono temos os carbonos em 22,3 e 22,4 ppm correspondente as metilas (6 e 7), em 24,6 ppm ao carbono (5) referente ao grupo isopropil presentes também nos compostos acima descritos **14** e **15**, em 45,6 ppm o carbono (4), em 60,8 ppm o carbono carbinólico (3) e em 72,6 ppm o carbono acetilênico terminal (1) e em 85,3 ppm o carbono quaternário acetilênico (2), os quais são característicos para este tipo de moléculas, sendo que a calibração foi feita usando o clorofórmio deuterado como padrão interno em 77,0 ppm. Neste espectro aparece uma impureza em 43,7 ppm a qual não foi caracterizada.

III.4 - Tentativa de resolução do (±)-5-metil-1-hexin-3-ol **(16)**.



Esquema 20: Proposta de resolução enzimática do (±)-5-metil-1-hexin-3-ol **(16)**.

Para a resolução enzimática do álcool **(16)** empregando-se NOVOZYME 435 (Cal-B), inicialmente preparou-se o derivado acetilado deste composto, conforme ilustrado para os compostos **(14)** e **(15)**.



Esquema 21: Preparação do derivado acetilado do álcool **(16)**.

A mistura racêmica do álcool e acetato foram analisadas para se determinar seus tempos de retenção em coluna aquiral apolar, como também em coluna quiral. Os tempos de retenção do álcool **(16)** em coluna apolar aquiral tendo como temperatura inicial de injeção 40 °C, gradiente 2 °C/minuto até 170 °C, foi de 6,45 minutos para o álcool e 12,86 minutos para seu derivado acetilado. Para a coluna quiral nas mesmas condições de análise acima, os tempos de retenção dos enantiômeros dos álcoois foi 23,03 e 23,68 minutos e seus derivados acetilados foi 18,10 e 20,08 minutos respectivamente.

As evoluções da resolução enzimáticas dos enantiômeros em questão são ilustradas abaixo seguindo uma seqüência de análises feitas a partir de alíquotas retiradas durante as reações. Estes resultados estão expressos nos cromatogramas que seguem na seqüência.

No cromatograma referente à alíquota coletada no tempo zero, observa-se a presença de aproximadamente 50% de cada um dos álcoois na mistura enantiomérica, conforme esperado.

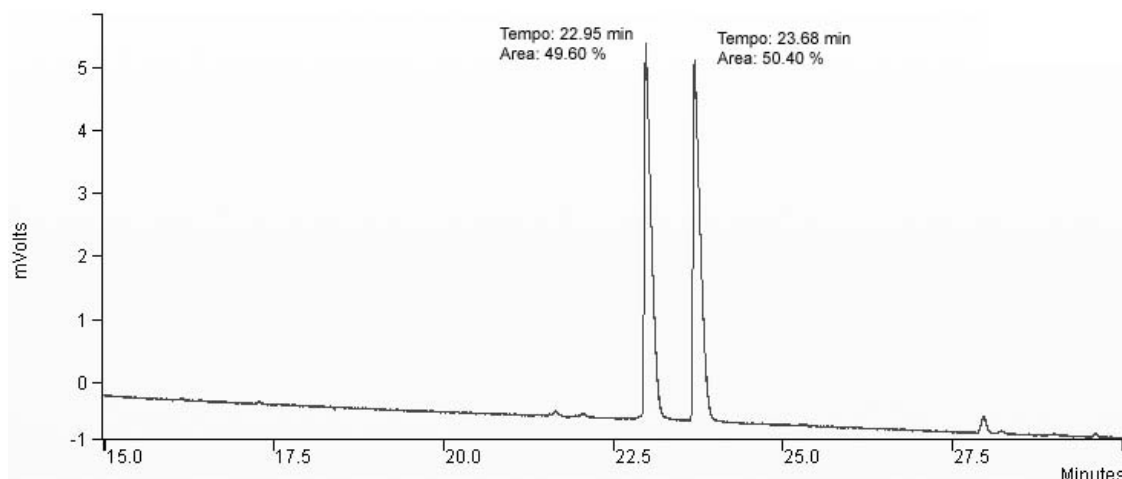


Figura 17: Cromatograma do álcool (\pm)-5-metil-1-hexin-3-ol com zero hora de resolução enzimática.

No cromatograma após uma hora de resolução enzimática, observa-se que o enantiômero de menor tempo de retenção diminui 17% em relação ao outro com conseqüente formação proporcional do seu éster derivado, em elevado excesso enantiomérico.

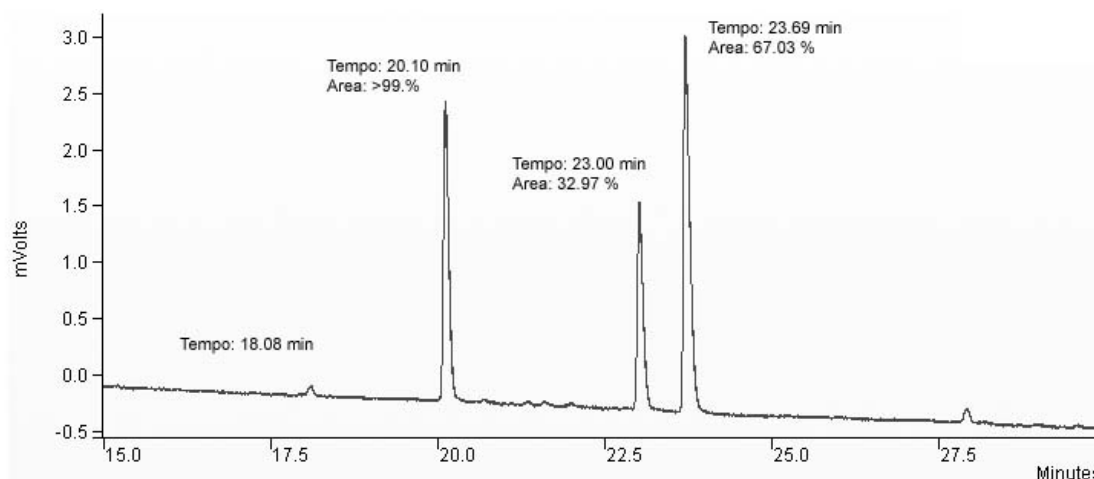


Figura 18: Cromatograma do álcool (\pm)-5-metil-1-hexin-3-ol com uma hora de resolução enzimática.

Após duas horas de resolução enzimática, observa-se que 21,74% do álcool com menor tempo de retenção permanece na mistura reacional sem ser acetilado,

enquanto que o excesso enantiomérico do derivado acetilado de maior tempo de retenção diminui.

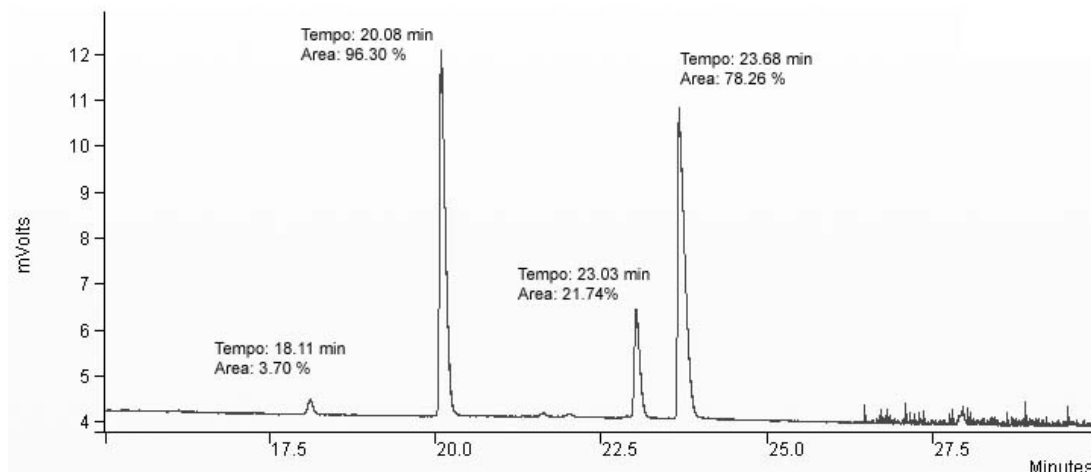


Figura 19: Cromatograma do álcool (±)-5-metil-1-hexin-3-ol com duas horas de resolução enzimática.

Após três horas de reação a tendência discutida até então é mantida, com aumento da conversão química do álcool com menor tempo de retenção e diminuição do excesso enantiomérico do acetato de maior tempo de retenção.

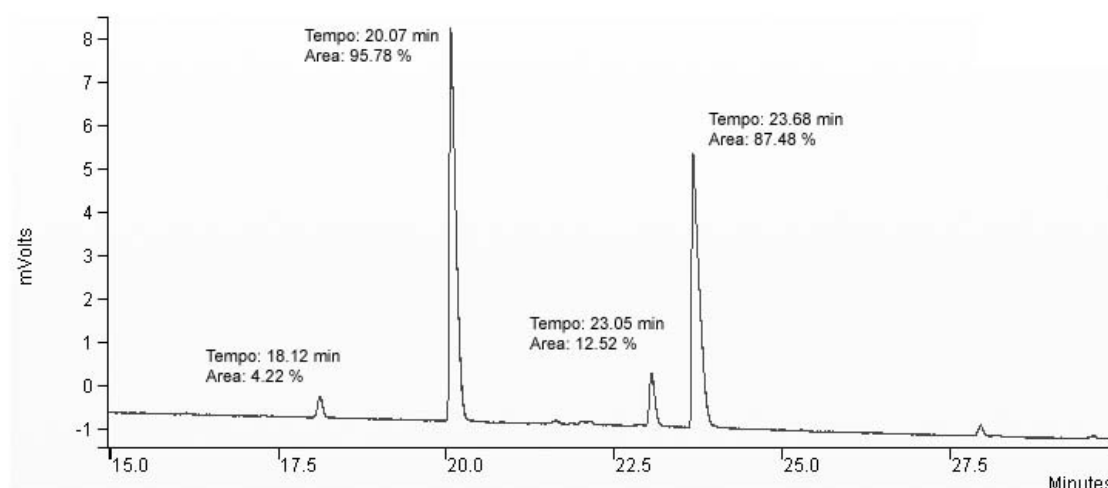


Figura 20: Cromatograma do álcool (±)-5-metil-1-hexin-3-ol com três horas de resolução enzimática.

Com quatro horas de resolução enzimática, observa-se uma diminuição na cinética de conversão, provavelmente devido à menor concentração do enantiômero mais reativo no meio reacional.

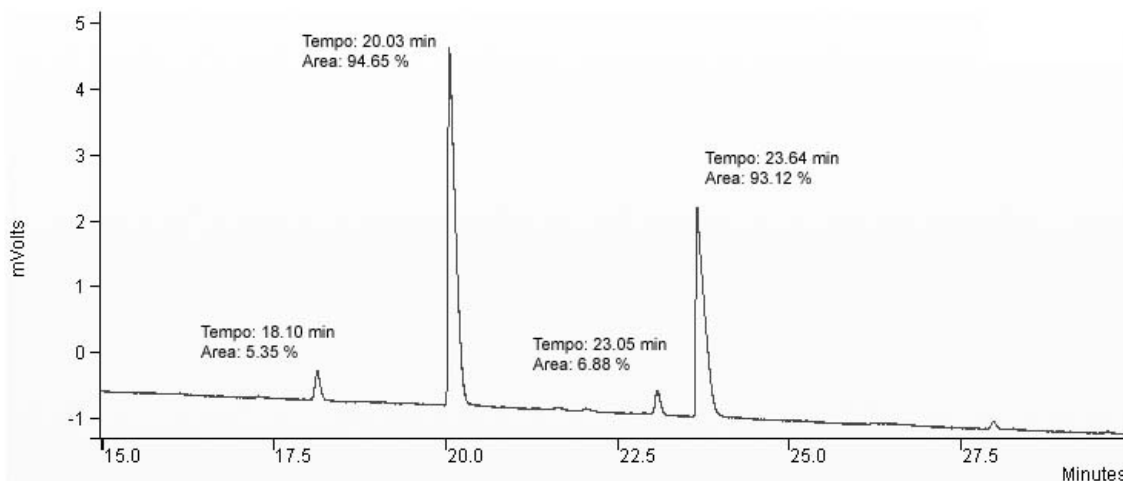


Figura 21: Cromatograma do álcool (±)-5-metil-1-hexin-3-ol com quatro horas de resolução enzimática

Com cinco horas de resolução observa-se que somente 3,54% do enantiômero do álcool mais reativo restava no meio reacional.

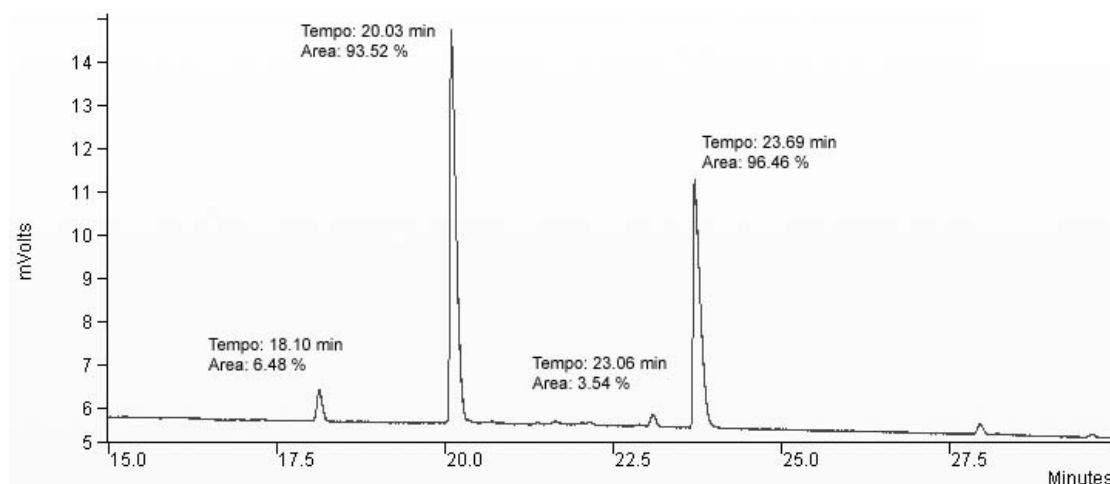


Figura 22: Cromatograma do álcool (±)-5-metil-1-hexin-3-ol com cinco horas de resolução enzimática.

Com seis horas de resolução enzimática praticamente todo álcool de menor tempo de retenção havia sido acetilado, tendo como consequência um excesso enantiomérico acima de 99% para o álcool de maior tempo de retenção. Por outro lado, o excesso enantiomérico do acetato majoritário estava abaixo de 85%

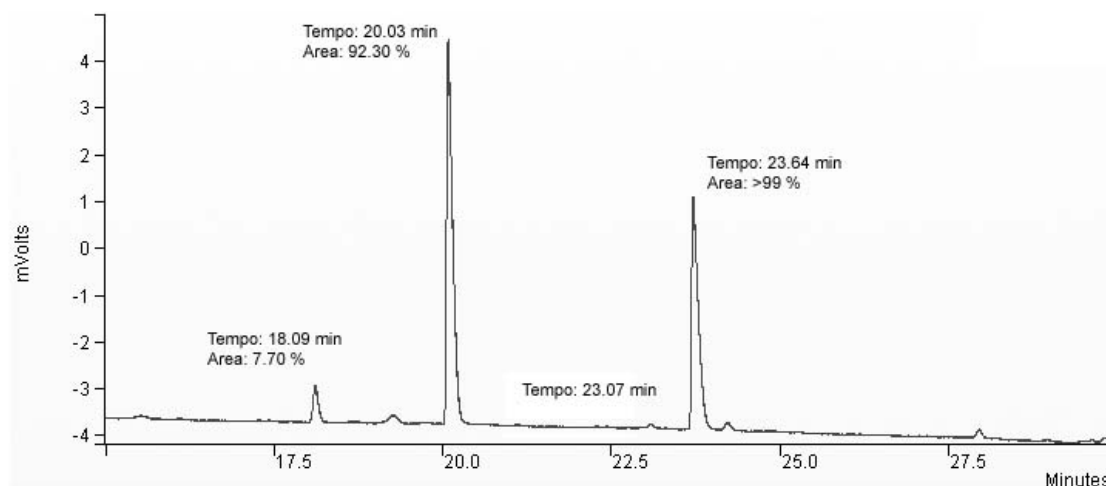


Figura 23: Cromatograma do álcool (\pm)-5-metil-1-hexin-3-ol com seis horas de resolução enzimática.

O álcool majoritário remanescente no meio reacional foi recuperado, após purificação por coluna cromatográfica utilizando diclorometano como eluente, em rendimento que variou de 42 a 44% e com excesso enantiomérico acima de 99%. A utilização do diclorometano como eluente deveu-se ao fato de além dele permitir a separação entre o álcool e os derivados acetilados, apresentar baixo ponto de ebulição, facilitando sua remoção ao final do processo, tendo em vista que os compostos com os quais se estava trabalhando apresentavam alta volatilidade. A eliminação do solvente em evaporador rotativo era sempre feita com muito cuidado, evitando-se aquecimento. Ao se aquecer a 30°C o balão para eliminação do hexano que era utilizado para se efetuar a resolução determinou-se, por análise de cromatografia gasosa, que tanto a mistura dos álcoois quanto à dos derivados acetilados, eram observadas no solvente coletado no evaporador rotatório.

Na tabela 09, estão resumidos os resultados dos cromatogramas referente às análises das alíquotas coletadas durante a resolução enzimática. Ressalta-se aqui

que a determinação da estereoquímica absoluta dos álcoois e acetatos apresentada na tabela 09, foi efetuada baseando-se em dados de literatura (Ramanelli *et al.*, 2004) onde se mostra que para uma série de álcoois secundários com tripla terminal empregados naquele estudo, sempre o álcool de estereoquímica *R* apresentava menor cinética de reação. No entanto, as estereoquímicas absolutas dos álcoois e dos acetatos em questão serão determinadas ao final da síntese dos feromônios por comparação com dados de literatura.

Tabela 07: Resultados obtidos na resolução enzimática do álcool (\pm)-5-metil-1-hexin-3-ol (**16**):

Tempo	% álcool (S)	% álcool (R)	% (S) acetilado	% (R) acetilado	e.e. álcool (R)	e.e. éster (S)
0 hora	50	50	0	0	0	0
1 hora	32,97	67,03	> 99	< 1	34	> 99
2 horas	21,74	78,26	96,30	3,70	56,52	92,60
3 horas	12,52	87,48	95,78	4,22	74,96	91,56
4 horas	6,88	93,12	94,65	5,35	86,24	89,30
5 horas	3,54	96,46	93,52	6,48	92,92	87,04
6 horas	< 1	> 99	92,30	7,70	> 99	84,60

A amostra do álcool com excesso enantiomérico acima de 99%, e a mistura dos acetatos tendo o majoritário um excesso enantiomérico de 84,5%, foram analisadas no polarímetro para se determinar suas rotações específicas. A leitura da amostra efetuada no polarímetro necessita de correção em função da temperatura trabalhada. A fórmula que se utiliza para efetuar a correção é:

$$\alpha_D^{20} = \alpha^T [1 + 0,0001(T - 20)] \text{ onde:}$$

α^{20} = rotação óptica determinada a 20°C,

α^T = rotação observada na temperatura ambiente,

T = temperatura da amostra no ambiente.

A atividade óptica é expressa como rotação específica e obedece a seguinte equação:

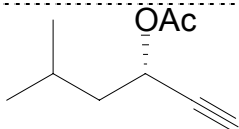
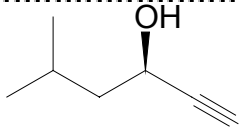
$$\alpha_D^{20} = \frac{\text{rotação observada em graus} \times 100}{[\text{comprimento da cubeta (dm)} \times \text{concentração g/100mL}]}$$
 onde: o comprimento

da cubeta é de 1 dm.

Na tabela 10, estão expressas as leituras e as rotações específicas das amostras. Ressalta-se que para a amostra da mistura dos acetatos, após cálculo do valor corrigido, foi feito novo cálculo para determinar sua rotação específica a 100% de pureza óptica, conforme demonstrado a seguir.

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{84,60\%}{100\%} \times \frac{-13,525^\circ}{X} \quad X = -15,99^\circ$$

Tabela 08: Rotação específica do álcool resolvido e do acetato com valor corrigido para 100% pureza óptica.

Amostra	Valor de leitura	Valor corrigido	$[\alpha]_D^{20}$ 100%
	- 0,138°	- 13,525°	- 15,99°
	+ 0,073°	+ 7,298°	+ 7,298°

Os resultados obtidos até então mostraram a possibilidade de se sintetizar um dos álcoois com elevado excesso enantiomérico. O composto apresentando a outra estereoquímica, em elevado excesso enantiomérico, poderia ser obtido através de hidrólise química da mistura dos acetatos com posterior resolução enzimática dos álcoois derivados.

A hidrólise foi efetuada refluxando-se a mistura dos acetatos com uma solução de hidróxido de sódio/metanol (10 % massa/volume) e água durante 2 h, com rendimento de 89%. A mistura dos álcoois desta forma obtida foi analisada por CG em coluna quiral e o cromatograma é apresentado abaixo.

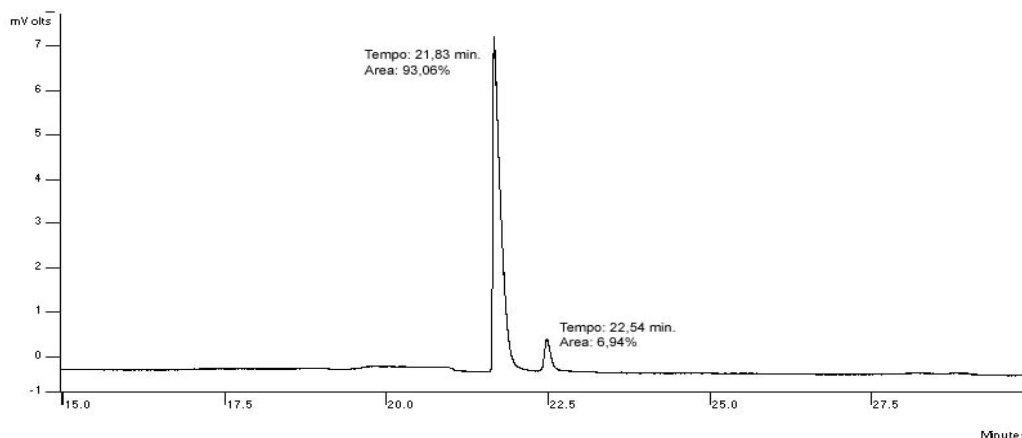


Figura 24: Cromatograma da mistura enantiomérica dos álcoois (**16**) obtida após hidrólise química da mistura enantiomérica dos acetatos derivados

A mistura dos álcoois assim preparada foi submetida à resolução enzimática, empregando-se as mesmas condições experimentais descritas anteriormente. A reação foi monitorada com o tempo e determinou-se que após três horas de resolução, praticamente todo o álcool majoritário no meio reacional havia sido convertido ao seu derivado acetilado, o qual apresentou excesso enantiomérico acima de 99%, conforme ilustrado na figura abaixo.

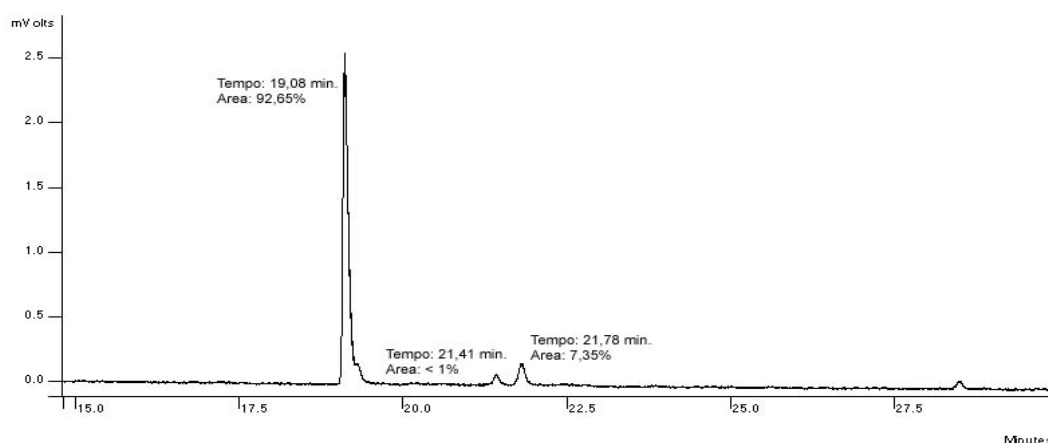


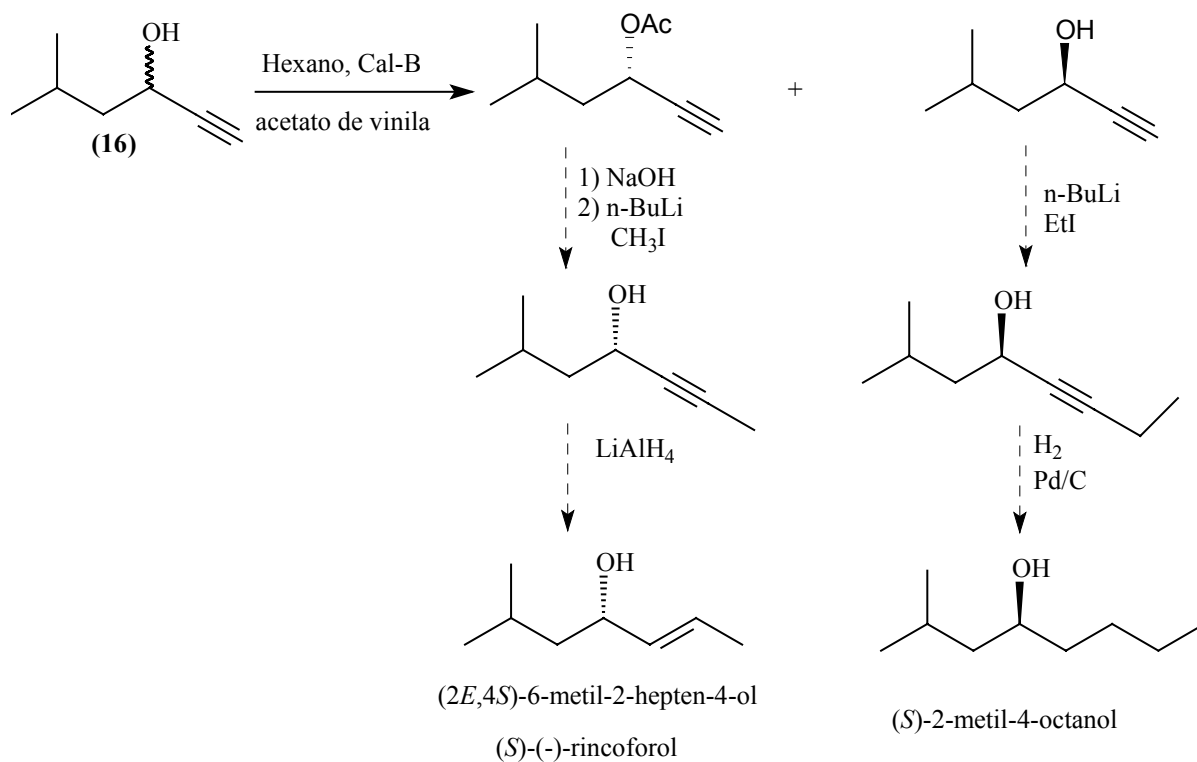
Figura 25: Cromatograma da resolução enzimática dos enantiômeros dos álcoois (**16**) após três horas de reação.

Após purificação por cromatografia em coluna empregando-se diclorometano como eluente o acetato em questão foi obtido em rendimento total de 34% após os dois processo de resolução e hidrólise química.

As alterações nos tempos de retenção observados nesta segunda resolução enzimática, é consequência da coluna quiral estar trabalhando no limite de sua temperatura e desta forma sofrer degradação durante as análises efetuadas.

Estes resultados mostraram que a acetilação enzimática da mistura racêmica do álcool alílico (**15**) e acetilênico não terminal (**14**) não apresentou boa seletividade. Por outro lado a acetilação do álcool acetilênico terminal (**16**) ocorreu com boa estereosseletividade. Uma hipótese para racionalizar estes resultados pode ser o fato de a enzima ser sensível à diferença química existente entre os substituintes conectados ao carbono carbinólico do grupo hidroxila que está sendo resolvido. A presença de uma metila substituindo a ligação tripla no composto (**14**), não presente no composto (**16**), compromete a seletividade do processo de acetilação enzimática, provavelmente diminuindo a diferença de energia entre os complexos diastereoisoméricos que se estabelecem a partir da interação enzima-substratos, diminuindo desta forma a seletividade do processo.

A metodologia desenvolvida neste trabalho permitiu a obtenção de ambos os enantiômeros do álcool acetilênico (**16**) em bons rendimentos químicos e excesso enantiomérico acima de 99%. Ambos os enantiômeros em questão estão sendo empregados na síntese estereosseletiva tanto do (S)-rincoforol, como do (S)-2-metil-4-octanol, também feromônio de agregação identificado para outros insetos-praga de ocorrência nacional, *Sphenophorus Levis* (Baraldi, *et al.*, 2002), *Metamasius hemipterus* (Baraldi, *et al.*, 2002) e *Rhabdoscelus obscurus* (Baraldi, *et al.*, 2002). As sínteses estereosseletivas em questão estão em fase de conclusão, de acordo com a metodologia ilustrada abaixo.



Esquema 22: Proposta de síntese estereosseletiva para obtenção do (S)-rincoforol e do (S)-2-metil-4-octanol em fase do conclusão.

CONCLUSÕES

Foi desenvolvida neste trabalho uma metodologia que permite a síntese estereosseletiva dos feromônios de agregação de dois insetos que se constituem importantes pragas das palmeiras produtoras de óleo e coco, *Rhynchophorus palmarum* (L) e *Metamasius hemipterus*, empregando como etapa chave a resolução enzimática de um álcool acetilênico secundário apresentando ligação tripla terminal. Através da resolução enzimática os intermediários quirais foram obtidos em bons rendimentos químicos e excelentes excessos enantioméricos. No caso da síntese do rincoforol, um excelente controle da estereoquímica da ligação dupla foi obtido através da redução da ligação tripla de um álcool acetilênico com hidreto de lítio e alumínio.

A enzima utilizada na resolução dos álcoois acetilênicos terminais racêmicos, além de apresentar a vantagem de poder ser empregada em hexano, possibilita a resolução do racemato em um curto intervalo de tempo e em uma única etapa para a obtenção de um dos estereoisômeros, sendo que o outro estereoisômero é obtido após hidrólise química e nova acetilação enzimática, ambos com excesso enantiomérico acima de 99%.

A separação da enzima do meio reacional necessita de simples filtração e a purificação do álcool e de seu derivado acetilado é efetuada por cromatografia de coluna de maneira simples e rápida.

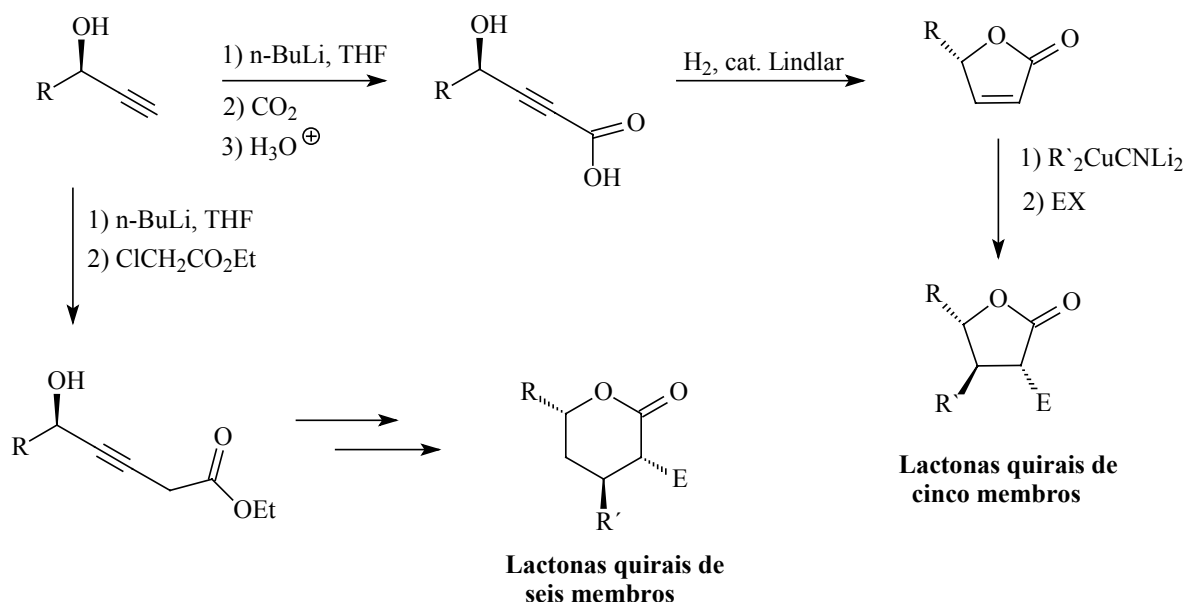
A síntese estereosseletiva do feromônio de agregação do *Metamasius hemipterus* também propiciará a determinação da estereoquímica absoluta do produto natural, através da técnica de cromatografia gasosa em coluna quiral.

PERSPECTIVAS

Avaliação do efeito da estereoquímica da ligação dupla na atividade do rincoforol.

Determinação da estereoquímica absoluta do feromônio de agregação do inseto *Metamasius hemipterus*.

Os elevados excessos enantioméricos dos álcoois acetilênicos preparados abrem perspectivas para que tais compostos sejam empregados na síntese de outros produtos naturais quirais, como na síntese de lactonas de cinco e seis membros, estruturas frequentemente encontradas na natureza.



Esquema 37. Potencial para utilização dos álcoois quirais na síntese de produtos naturais

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

VI.1 - ASPECTOS GERAIS

Os reagentes e solventes empregados nos procedimentos, quando necessário, foram previamente tratados de acordo com procedimentos descritos na literatura (Perrin e Armego, 1988).

Todas as reações foram monitoradas via cromatografia em coluna capilar, e/ou cromatografia em camada delgada.

Os solventes foram removidos em um evaporador rotatório Büchi, operando à pressão reduzida (30 mm Hg).

As análises de cromatografia gasosa foram efetuadas em um cromatógrafo HP 5890 usando coluna VA – 5, gás de arraste N₂ ou em um equipamento VARIAN 3800 equipado com duas colunas: VF-5MS (5%-Phenyl-Methylpolysiloxane) (0,25 mm X 30 m.) e com coluna CHIRASIL – DEX CB - β-ciclodextrin (0,25 mm X 25 m.) usando He como gás de arraste. As análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas foram efetuadas em um cromatógrafo VARIAN CG MS/MS Saturn 2000 equipado com coluna VA – 5 (5%-Phenyl-Methylpolysiloxane) (0,25 mm X 30 m.) usando He como gás de arraste. As análises de cromatografia gasosa envolvendo as separações dos enantiômeros em um cromatógrafo SHIMADZU, modelo 17A com coluna CHIRASIL – DEX CB - β-ciclodextrin (0,25 mm X 25 m.) usando H₂ como gás de arraste.

As análises de RMN-¹H e ¹³C foram feitas em um espectrômetro BRUKER ARX-200, utilizando-se clorofórmio deuterado como solvente. Todos os espectros foram registrados utilizando-se tetrametilsilano como padrão de referência interno.

Os espectros de absorção na região do Infravermelho foram registrados em um equipamento BIORAD Modelo: FTS-3500 GX, as amostras foram preparadas na forma de um filme líquido sobre pastilhas de brometo de potássio (KBr) e as absorções são expressas em número de onda (cm⁻¹).

Os deslocamentos químicos (δ) estão expressos em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Para indicar a multiplicidade dos sinais, foram adotadas as seguintes abreviações: s (simpleto), sl (simpleto largo), d (duplete), dd (duplo dublete), dt (duplo tripleto), dq (duplo quarteto), t (tripleto), td (triplo duplete), q (quarteto), m (multiplete).

Nas colunas cromatográficas flash foi utilizada sílica gel 60, 230-400 mesh ASTM Merck. Nas colunas cromatográficas por gravidade utilizou-se sílica gel 60, 70-230 mesh ASTM Merck.

As análises cromatográficas em camada delgada foram efetuadas empregando-se as placas comerciais da MERCK (E. MERCK, tipo 5554, 0,2 mm) as quais foram reveladas sob luz ultravioleta ($\lambda = 254$ nm) ou com auxílio de uma solução de vanilina em uma mistura de ácido sulfúrico-etanol (6% vanilina m/v, 4% ácido sulfúrico e 10%, v/v, em etanol) (CHRISMAN, 2004).

As medidas de α_D foram feitas em um Polarímetro Rudolph modelo Autopol III com λ 589 nm e padrão interno de calibração com leitura $33,9732^{\circ} \pm 0,0001^{\circ}$ com cubeta de comprimento de 1 dm e faixa de concentração 0,1-1,0%.

Os procedimentos experimentais relatados referem-se aos melhores resultados obtidos.

VI.2 - PROCEDIMENTOS

VI.2.1 – Preparação do 1-fenil-2-butin-1-ol (13) a partir do acetileno.

Em um balão de duas bocas com capacidade de 50 mL, equipado com agitação magnética, sob atmosfera de argônio adicionou-se tetraidrofurano (THF) (15mL), refrigerou-se a -78°C , borbulhou-se o acetileno (5,0 mmol, 123 mL), adicionou-se n-BuLi (5,0 mmol, 3,85 mL) e deixou-se em agitação durante 30 minutos. Em seguida, adicionou-se benzaldeído (5,0 mmol, 0,53gramas, 0,51 mL) e deixou-se elevar à temperatura ambiente durante uma hora. A mistura reacional foi refrigerada a -5°C , adicionou-se clorotrimetilsilano (TMSCl) (5,0 mmol, 0,54 gramas, 0,63 mL) e deixou-se em agitação durante 40 minutos. Após refrigeração da mistura reacional a -78°C , adicionou-se lentamente diisopropilamideto de lítio (LDA) (5,0 mmol diisopropilamina 0,51gramas, 0,70 mL e n-BuLi, 5,0 mmol 3,85 mL), deixou-se em agitação durante 30 minutos, seguido de adição de iodometano (5,0 mmol, 0,73 gramas, 0,32 mL) e posteriormente adicionou-se hexametilfosforoamida (HMPA) (10,0 mmol, 1,80 gramas, 1,75 mL), mantendo-se em agitação durante 72 horas. Em seguida adicionou-se ácido clorídrico HCl 1,0 mol/L (10,0 mmol, 10 mL), deixou-se em agitação durante três horas, neutralizou-se o meio reacional e extraiu-se a fase aquosa com éter etílico (4x10 mL), secou-se com sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente. O produto foi purificado por coluna cromatográfica usando como eluente a mistura de éter de petróleo:acetato de etila 4:1, obtendo-se (2,5 mmol, 0,365 gramas) do produto puro com rendimento de 50%.

Análise do composto:

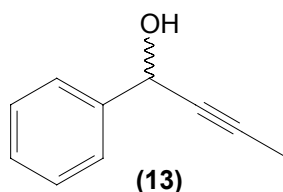
FTIR filme líquido e pastilha de KBr (cm^{-1}): 3350, 2961, 2870, 2230, 1450, 1040

RMN ^1H (200MHz – CDCl_3) δ : 1,91 (s, 3H); 2,6 (sl, 1H); 5,4 (s, 1H); 7,3 – 7,6 (m, 5H).

RMN ^{13}C (50MHz – CDCl_3) δ 3,63; 64,69; 79,16; 82,96; 126,51; 128,14; 128,47; 141,21.

Na análise de cromatografia gasosa em coluna apolar (VA-05) com temperatura inicial de 60°C, gradiente 10°C/minuto até 230°C o tempo de retenção foi de 8,44 minutos.

VI.2.2 – Preparação do 1-fenil-2-butin-1-ol (13) a partir do (*E/Z*) 1-bromopropeno.



Em um balão sob atmosfera de argônio equipado com agitação magnética, adicionou-se a mistura de (*E/Z*) 1-bromopropeno (15,5 mmol, 1,87gramas, 13,5 mL), e tetraidrofurano (THF) (20 mL). Refrigerou-se a -78°C e lentamente adicionou-se n-BuLi (22 mmol, 10,2 mL) e deixou-se em agitação durante 60 minutos. Em seguida acrescentou-se benzaldeído (10 mmol, 1,06 gramas, 1,02 mL) diluído em THF (10 mL), deixou-se em agitação até a temperatura ambiente e por mais 30 minutos. À mistura reacional foi adicionada solução saturada de cloreto de amônio (10 mL), separou-se as fases e extraiu-se a fase aquosa com éter etílico (3x20 mL). As fases orgânicas foram combinadas, lavada com solução saturada de cloreto de sódio (2x10 mL), secada com sulfato de magnésio anidro, filtrada e o solvente evaporado em evaporador rotatório. Purificou-se em coluna cromatográfica usando hexano:éter etílico 80:20 como eluente, obtendo-se (9,4 mmol, 1,37 gramas) rendimento de 94%.

Análise do composto:

FTIR filme líquido e pastilha de KBr (cm^{-1}): 3350, 2961, 2870, 2230, 1450, 1040

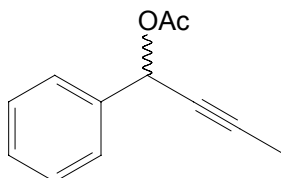
RMN ^1H (200MHz – CDCl_3) δ : 1,91 (s, 3H); 2,6 (sl, 1H); 5,4 (s, 1H); 7,3 – 7,6 (m, 5H).

RMN ^{13}C (50MHz – CDCl_3) δ 3,63; 64,69; 79,16; 82,96; 126,51; 128,14 (2C); 128,47 (2C); 141,21.

Cromatografia gasosa em coluna apolar VA- 5: Temp. in. 60 °C rampa de 10 °C/min até 230 °C, tr = 8,44 minutos.

Cromatografia coluna quiral β -ciclodextrina: temp. inicial 50 °C/5min gradiente 2,0 °C/min até 170 °C/10min. tr = 43,58 e 44,50 para os enantiômeros.

VI.2.3 - Preparação do acetato de 1-fenil-2-butin-1-ol.



Em um balão equipado com agitação magnética sob atmosfera de argônio, pesou-se 1-fenil-2-butin-1-ol (1mmol, 0,146 gramas). Acrescentou-se piridina (5 mL), resfriou-se a 0°C e adicionou-se lentamente anidrido acético (3 mmol, 0,30 gramas, 0,28mL) deixando-se em agitação até temperatura ambiente.

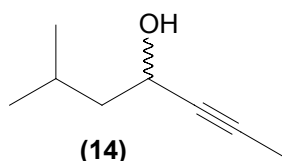
A reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada CCD usando como eluente hexano:acetato de etila 9:1. Para o material de partida obteve-se um $R_f = 0,18$ e para o composto acetilado obteve-se um $R_f = 0,43$ até todo o material de partida ser consumido (30 minutos).

Para extrair a reação acrescentou-se acetato de etila (30 mL), transferiu-se para um funil de separação, lavou-se com sulfato de cobre saturado (3 x 30 mL), em seguida lavou-se com cloreto de sódio saturado (2 x 10 mL) e secou-se com sulfato de magnésio. Evaporou-se o solvente em evaporador rotatório e purificou-se em coluna cromatográfica obtendo-se (0,81 mmol, 0,149 gramas) rendimento de 80,5% do produto puro acetilado.

Análise do composto:

Cromatografia coluna apolar VA- 5: Temp. in. 60 °C rampa de 10 °C/min até 230 °C tr = 9,87 minutos.

Cromatografia coluna quiral β -ciclodextrina: temp. inicial 50 °C/5min gradiente 2,0 °C/min até 170 °C/10min. tr = 27,92 e 28,29 minutos para os enantiômeros.

VI.2.4 - Preparação do (±)-6-metil-2-heptin-4-ol (14).

Em um balão equipado com agitação magnética e sob atmosfera de argônio, acrescentou-se tetrahidrofurano (20 mL), seguido da adição de (*E/Z*)-1-bromopropeno (15,5 mmol, 1,87g, 13,5 mL). A mistura reacional foi refrigerada à -78°C e lentamente acrescentou-se n-BuLi (22 mmol, 8,06 mL). Deixou-se em agitação durante 60 minutos. Em seguida transferiu-se de outro balão refrigerado, isovaleraldeído (10 mmol, 0,86 gramas, 1,07 mL), diluído em THF (10 mL) e deixou-se em agitação até temperatura ambiente por mais 30 minutos. Acrescentou-se solução aquosa saturada de cloreto de amônio (10 mL), separou-se as fases e extraiu-se a fase aquosa com éter etílico (3 X 20 mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio (2 X 10 mL), secou-se com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente em evaporador rotatório. Purificou-se em coluna cromatográfica usando éter etílico:hexano 8:92 como solvente, obtendo-se (9,2 mmol, 1,16 gramas) com rendimento de 92% do produto puro.

Análise do composto:

FTIR: filme em pastilha de KBr: cm^{-1} . 3383; 2956; 2250; 1740; 1466; 1367; 1185; 968.

RMN ^1H (200MHz – CDCl_3) δ 0,89 (d, $J = 3,9$ Hz, 3H); 0,93 (d, $J = 3,9$ Hz, 3H); 1,65 (dd, $J = 7,08$ e $6,35$ Hz, 2H); 1,75-1,95 (m, 5H); 4,35 (td, $J = 7,08$ e $1,95$ Hz, 1H).

RMN ^{13}C (50MHz – CDCl_3) δ 3,47; 22,44; 22,47; 24,70; 47,17; 61,17; 80,69; 80,74.

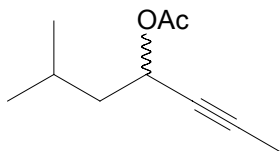
E.M. m/z (abundância relativa %) 126 (M^+ , 0,3); 87(35); 69(100); 57(20).

Cromatografia gasosa coluna apolar (VA- 5): temp. inicial 60°C rampa de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 230°C , $t_r = 3,77$ minutos.

Cromatografia coluna quiral β -ciclodextrina: temp. inicial $50^{\circ}\text{C}/5\text{min}$ gradiente $1,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até $170^{\circ}\text{C}/10\text{min}$. $t_r = 25,75$ e $26,65$ para os enantiômeros.

Os espectros de Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono, bem como o espectro de massa estão em anexo.

VI.2.5 - Preparação do acetato de (\pm)-6-metil-2-heptin-4-ol (14).



Em um balão equipado com agitação magnética sob atmosfera de argônio, pesou-se 6-metil-2-heptin-4-ol (1mmol, 0,126 gramas). Acrescentou-se piridina (5 mL), resfriou-se a 0°C e adicionou-se lentamente anidrido acético (3 mmol, 0,30 gramas, 0,28 mL) deixando-se em agitação até temperatura ambiente.

A reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada CCD usando como eluente hexano:acetato de etila 9:1. Para o material de partida obteve-se um $R_f = 0,21$ e para o composto acetilado obteve-se um $R_f = 0,49$ até todo material de partida ser consumido (30 minutos).

Para extrair a reação acrescentou-se acetato de etila (30 mL), transferiu-se para um funil de separação, lavou-se com sulfato de cobre saturado (3 x 30 mL), em seguida lavou-se com solução saturada de cloreto de sódio (2 x 10 mL) e secou-se com sulfato de magnésio. Após filtração evaporou-se o solvente em evaporador rotatório e purificou-se em coluna cromatográfica obtendo-se (0,76 mmol, 0,127 gramas) com rendimento de 76% do produto puro acetilado.

Análise do composto:

Cromatografia gasosa em coluna apolar VA- 5: temp. inicial 60 °C, rampa de 10 °C/min até 230 °C, $t_r = 5,55$ minutos.

Cromatografia coluna quiral β -ciclodextrina: temp. inicial 50 °C/5min, gradiente 1,5 °C/min até 170 °C/10min, $t_r = 22,01$ e 22,17 para os enantiômeros.

VI.2.6 - Resolução Enzimática do (±)-6-metil-2-heptin-4-ol (14)

Em um erlenmeyer de 125 mL de capacidade, pesou-se a mistura racêmica do álcool (±)-6-metil-2-heptin-4-ol (0,5 mmol, 0,063 gramas), acrescentou-se hexano (10 mL), seguido da adição de acetato de vinila (2,0 mL) e por último adicionou-se a Enzima Cal-B novozyme 435 (0,300 gramas). Deixou-se em agitação em um SHAKER à 30 °C com uma rotação de 170 rpm. Retirou-se alíquotas com o auxílio de seringa descartável após , 2, 6, 24 e 48 horas para posterior análise por cromatografia gasosa usando coluna apolar aquiral e coluna quiral para monitoramento.

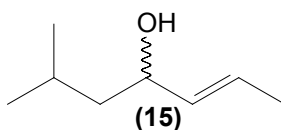
Análise dos compostos:

Na cromatografia apolar o tempo de retenção do álcool é de 3,77 minutos, ao passo que de seu derivado acetilado é de 5,55 minutos, tendo como condições de análise: temp. inicial 60 °C, rampa de 10 °C/min até 230 °C.

Cromatografia coluna quiral β-ciclodextrina: temp. inicial 50 °C/5min, gradiente 2,0 °C/min até 170 °C/10min, tr = 22,01 e 22,17 para os enantiômeros.

Os cromatogramas estão mostrados nos resultados e discussão.

VI.2.7 - Preparação do (±)-6-metil-(2E)-hepten-4-ol – Rincoforol (15).



Em um balão equipado com agitação magnética e sob atmosfera de argônio, acrescentou-se THF (20 mL), (*E/Z*) 1-bromopropeno (15,5 mmol, 1,87 gramas, 13,5 mL), resfriou-se a -78 °C e lentamente acrescentou-se n-BuLi (22 mmol, 8,06 mL) deixando a mistura reacional em agitação durante 60 minutos. Em seguida transferiu-se de outro balão previamente resfriado o isovaleraldeído (10 mmol, 0,86 gramas, 1,07 mL), diluído em THF (10 mL) e deixou-se em agitação até temperatura ambiente e por mais 30 minutos. Em seguida acrescentou-se hidreto de lítio e alumínio (30 mmol, 1,14 g), aqueceu-se até refluxo por mais 6 horas. Água foi adicionada lentamente e após separação das fases, extraiu-se a fase aquosa com

éter etílico. As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com solução saturada de cloreto de sódio e secada sob sulfato de sódio anidro. Após filtração evaporou-se o solvente em rotaevaporador. O produto foi purificado conforme composto **14** anteriormente descrito obtendo-se (0,91 mmol, 1,16 gramas) com rendimento de 91% do produto puro.

Análise do composto:

FTIR: filme em pastilha de KBr: cm^{-1} 3383; 2956; 1670; 1466; 1367; 1159; 1062; 968.

RMN ^1H (200MHz – CDCl_3): δ 0,91 (d, $J = 2,69$ Hz, 3 H, H-7); 0,92 (d, $J = 2,69$ Hz, 3 H, H-7'); 1,27-1,5 (m, 2 H, H-5); 1,70 (d, $J = 3,0$ Hz, 3 H, H-1); 4,12 (dd, 13,43 e 6,84 Hz, 1 H, H-4); 5,47 (dd, $J = 6,84$; 15,39 Hz, 1 H, H-3); 5,66 (dq, $J = 6,35$, 15,39 Hz, 1 H, H-2).

RMN ^{13}C (50MHz – CDCl_3): 17,64; 22,50; 22,91; 24,55; 46,43; 71,35; 126,56; 134,68.

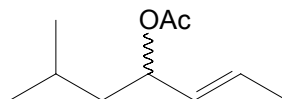
Cromatografia gasosa em coluna apolar VA 5: temp. inicial 60 °C, rampa 10 °C/min até 230 °C, $t_r = 3,11$ minutos.

Cromatografia coluna quiral β -ciclodextrina: temp. inicial 50 °C/5min, rampa 1,5 °C/min 170 °C/10min, $t_r = 35,47$ e 35,76 para os enantiômeros.

E.M. m/z (abund. Relativa %): 128 (M^+ , 0,3); 111(32), 95(30), 86(18), 71(100), 57(15).

Os espectros de infravermelho, RMN ^1H , ^{13}C e E.M. estão em anexo.

VI.2.8 - Preparação do acetato de (\pm)-6-metil-2*E*-hepten-4-ol.



Em um balão equipado com agitação magnética sob atmosfera de argônio, pesou-se 6-metil-2*E*-hepten-4-ol (1mmol, 0,128 gramas), em seguida acrescentou-se piridina (5 mL), resfriou-se a 0°C e adicionou-se lentamente anidrido acético (3 mmol, 0,30 gramas, 0,28mL) deixando-se em agitação até temperatura ambiente.

A reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD) usando como eluente hexano:acetato de etila 9:1, R_f material de partida igual a 0,26, R_f produto igual a 0,75 até todo material de partida ser consumido (30 minutos).

Para extrair a reação acrescentou-se acetato de etila (30 mL), transferiu-se para um funil de separação, lavou-se com sulfato de cobre saturado (3x30 mL), em seguida lavou-se com solução saturada de cloreto de sódio (2x10 mL) e secou-se a fase orgânica com sulfato de magnésio anidro. Após filtração, evaporou-se o solvente em evaporador rotatório e purificou-se em coluna cromatográfica obtendo-se (0,72 mmol, 0,122 gramas) com rendimento de (72%) do produto puro acetilado.

Análise do composto:

Cromatografia gasosa coluna apolar (VA 5): temp. inicial 60 °C, rampa 10 °C/min até 230 °C, tr = 4,62 minutos.

Cromatografia gasosa em coluna quiral β-ciclodextrina: temp. inicial 50 °C/5min, gradiente de 1,5 °C/min até 170 °C/10min, tr = 30,27 e 30,66 para os enantiômeros acetilados.

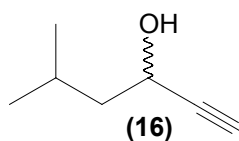
Este derivado acetilado foi preparado para acompanhar a resolução enzimática via cromatografia gasosa .

Os cromatogramas e análise estão em resultados e discussão.

VI.2.9 - Resolução Enzimática do (±)-6-metil-(2E)-hepten-4-ol (15) - (rincoforol).

Em um Erlenmeyer de 125 mL de capacidade, pesou-se a mistura racêmica do álcool (±)-6-metil-(2E)-hepten-4-ol (0,5 mmol, 0,064 gramas), acrescentou-se hexano anidro (10 mL), em seguida, adicionou-se acetato de vinila (2,0 mL) e posteriormente acrescentou-se a Enzima Cal-B novozyme 435 (0,300 gramas). Deixou-se em agitação em um SHAKER a 30 °C com uma rotação de 170 rpm. Retirou-se alíquotas com o auxílio de seringa descartável após 2, 6, 24 e 48 horas para posterior análise por cromatografia gasosa usando coluna aquiral e quiral monitorar se houve formação do produto acetilado.

As análises de cromatografia em coluna apolar e quiral, estão apresentadas nos resultados e discussão.

VI.2.10 - Preparação do (±)-5-metil-1-hexin-3-ol (16).

Em um balão equipado com agitação magnética e sob atmosfera de argônio, acrescentou-se tetraidrofurano (THF) (100 mL), resfriou-se a 0 °C, borbulhou-se acetileno até saturar o solvente e lentamente acrescentou-se n-BuLi (20 mmol, 14,8 mL). Continuou-se a borbulhar acetileno até novamente saturar. Deixou-se em agitação durante 30 minutos para a formação do ânion acetileto de lítio e em seguida acrescentou-se, de outro balão, o isovaleraldeído (20 mmol, 1,72 gramas, 2,15 mL), diluído em THF (10 mL). Retirou-se a refrigeração e deixou-se em agitação até atingir a temperatura ambiente e por mais 30 minutos. Em seguida acrescentou-se solução saturada de cloreto de amônio (30 mL), separou-se as fases e extraiu-se a fase aquosa com éter etílico (3 x 30 mL). Combinou-se as fases orgânicas, lavou-se com solução saturada de cloreto de sódio (2 x 10 mL), secou-se com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente em evaporador rotatório, com rendimento bruto acima de 85%. Parte do produto foi purificado em sílica flash 230-400 mesh antes de usar em resolução e caracterização. A caracterização do composto foi efetuada por RMN (300 MHz) de hidrogênio e carbono, que estão representados abaixo.

Análise do composto:

FTIR: Filme em pastilha de KBr: cm^{-1} 3383; 3304; 2974; 1645; 1376; 1046; 882.

RMN ^1H : (CDCl_3 , TMS; 300 MHz): δ 0,92 (d, J = 5,28 Hz, 3 H, H-6); 0,96 (d, J = 5,28 Hz, 3 H, H-6'); 1,52-1,72 (m, 2H H-4); 1,72-1,97 (m, 1 H, H-5); 2,19 (sl, 1 H, -OH); 2,46 (d, 3,3 Hz, 1 H, H-1); 4,4 (td, J = 7,23 e 3,3 Hz, 1 H, H-3).

RMN ^{13}C : (CDCl_3 , TMS, 75 MHz), δ 22,37; 22,47; 24,65; 46,69; 60,79; 72,65; 85,29.

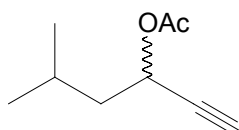
E.M. m/z (abund. relativa %): 113 (M^+ , 6); 96(3); 84(11); 83(100); 69(3); 57(10); 55(74); 43(2).

Cromatografia gasosa em coluna apolar (VA 5): temp. inicial 40 °C, gradiente 2 °C/min até 230 °C, t_r = 3,94 minutos.

Cromatografia gasosa coluna quiral β -ciclodextrina: 40 °C/1min, 2 °C/min até 170 °C/5min, t_r = 23,08 e 23,68 minutos respectivamente para cada um dos enantiômeros.

Os valores de α_D para o álcool de maior tempo de retenção foi de + 7,298° e para o acetilado enzimaticamente com excesso de 84,60% foi de -13,525° que após correção matemática para 100% passou a ser de -15,99°.

VI.2.11 - Preparação do acetato de (\pm)-5-metil-1-hexin-3-ol.



Em um balão equipado com agitação magnética sob atmosfera de argônio, pesou-se (\pm)-5-metil-1-hexin-3-ol (**16**) (1mmol, 0,112 gramas), em seguida acrescentou-se piridina (5 mL), resfriou-se a 0°C e adicionou-se lentamente anidrido acético (3 mmol, 0,30 gramas, 0,28mL) deixando-se em agitação até temperatura ambiente.

A reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada CCD usando como eluente Hexano:Acetato de etila 9:1. Para o material de partida obteve-se um R_f = 0,23 e para o composto acetilado obteve-se um R_f = 0,69.

A purificação não foi efetuada, pois o mesmo serviu somente como padrão para determinar as condições cromatográficas em coluna quiral.

Análise do Composto:

Cromatografia gasosa em coluna polar (VA 5): temp. inicial 40 °C, 2 °C/min até 230 °C, t_r = 9,67 minutos.

Cromatografia coluna quiral β -ciclodextrina: 40 °C/1min, 2 °C/min até 170 °C/5min, t_r = 18,09 e 20,03 minutos respectivamente para cada um dos enantiômeros acetilados.

VI.2.12.1 - Resolução Enzimática do (\pm)-5-metil-1-hexin-3-ol (16).

Em um Erlenmeyer de 125 mL de capacidade, pesou-se a mistura racêmica do álcool (\pm)-5-metil-2-hexin-3-ol (0,5 mmol, 0,056 gramas), acrescentou-se hexano (10 mL), em seguida adicionou-se acetato de vinila (2,0 mL) e posteriormente a Enzima Cal-B novozyme 435 (0,300 gramas). Deixou-se em agitação num SHAKER à 30 °C com uma rotação de 170 rpm. Retirou-se alíquotas com o auxílio de seringa descartável após , 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas para posterior análise por cromatografia gasosa usando coluna quiral para monitorar se houve formação do produto acetilado.

Análise dos compostos:

A análise da acetilação, foi monitorada por CG quiral e os tempos de retenção dos álcoois e seus derivados acetilados foram os seguintes: para o composto acetilado de menor tempo de retenção foi de 18,09 minutos; para o composto acetilado de maior tempo de retenção foi de 20,03 minutos; para o álcool de menor tempo de retenção foi de 23,08 minutos e para o álcool de maior tempo de retenção foi de 23,68 minutos.

VI.2.12.2 – Separação dos compostos da resolução enzimática de (16)

Após o término da reação de resolução enzimática filtrou-se o meio reacional e lavou-se a enzima com hexano (2 x 5 mL), combinou-se as fases orgânicas e evaporou-se o hexano em evaporador rotatório. Após concentrar, separou-se o álcool do acetilado enzimaticamente por cromatografia de coluna, usando sílica flash 230-400 mesh e diclorometano como solvente tendo o álcool com r_f = 0,40 e o

acetilado um $r_f = 0,60$. Em seguida evaporou-se o solvente dos compostos separados obtendo-se do álcool (0,23 mmol, 0,028 gramas) com rendimento de 46% e do composto acetilado obteve-se (0,22 mmol, 0,034 gramas) com rendimento de 44% do produto puro.

VI.2.12.3 – Hidrólise do enantiômero de (16) acetilado.

Em um balão de 50 mL, equipado com condensador de refluxo, acrescentou-se o éster (1,0 mmol, 0,154 gramas), solução hidróxido de sódio:metanol 10% massa/volume (2 mL) e água (0,3 mL). Em seguida, refluxou-se durante 60 minutos até total hidrólise do éster, deixou-se esfriar até temperatura ambiente e extraiu-se com éter etílico (3 x 20 mL). As fases orgânicas foram combinadas, lavada com solução saturada de cloreto de sódio (2 x 10 mL), secada com sulfato de magnésio anidro e filtrada. O solvente foi evaporado em evaporador rotatório, obtendo-se (0,89 mmol, 0,100 gramas) com rendimento de 89%.

Análise do composto:

Cromatografia coluna quiral β -ciclodextrina: temp. inicial 40 °C/1min, 2 °C/min até 170 °C/5min, $t_r = 21,83$ e 22,54 minutos respectivamente para cada um dos álcoois obtidos da hidrólise.

VI.2.13 – Preparação das amostra para Polarimetria.

Em um balão volumétrico de 10 mL de capacidade, pesou-se 0,1020 gramas de amostra e acrescentou-se éter etílico até o volume do balão. Homogenizou-se e em seguida preencheu-se a cubeta com amostra para leitura no polarímetro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ-MACARIE, E.; AUGIER-MAGRO, G. J.; BARATTI, J. Molecular characterization of gene encoding an esterase from *Bacillus licheniformis* sharing significant similarities with lipases. *Biotechnol. Lett.*, **21**, 313-319, 1999.
- ANDERSCH, P.; BERGER, M.; HERMANN, J.; LAUMEN, K.; LOBELL, M.; SEEMAYER, R.; WALDINGER, C.; SCHNEIDER, M. P. Ester synthesis via acyl transfer (transesterification). *Methods Enzymol.*, **286**, 406-443, 1997.
- Association of Manufacturers of Fermentation Enzyme Products, **Product Specification novozymes**. Novozymes A/S Denmark, 6, 2002.
- Baraldi, P.T.; Zarbin, P.H.G.; Vieira, P.C.; Corrêa, A.G. Enantioselective synthesis of (*R*)- and (*S*)-2-methyl-4-octanol, the male-produced aggregation pheromone of Curculionidae species. *Tetrahedron Asymmetry*, **13**, 621-624, 2002.
- BIANCHI, D.; CESTI, P.; BATTISTEL, E. Anhydrides as acylating agents in lipase-catalyzed stereoselective esterification of racemic alcohols. *J. Org. Chem.*, **53**, 5531-5534, 1988.
- BIER, M.; COLOWICK, S.P.; KAPLAN, N.O. **Lipases, in Methods in Enzymol.** Academic Press, New York, **1**, 627-642, 1955.
- BOURNE, Y.; MATINEZ, C.; KERFELEC, B.; LOMBARDO, D.; CHAPUS, C.; CABBILLAU, C. Horse pancreatic lipase. The crystal structure refined at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **238**, 709-732, 1994.
- BRADY, L.; BROZOWSKI, A. M.; DEREWENDA, Z. S.; DODSON, E.; DODSON, G.; TOLLEY, S.; TURKENBURG, J. P.; CHRISTIANSEN, L.; HUGE-JENSEN, B.; NORSKOV, L.; MENGE, U. A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase. *Nature*, **343**, 767-770, 1990.
- BROCKMAN, H. L.; Borgstrom, B. **General features of lipolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches.** In: **Lipases**. (Eds.) Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1984.
- CHAN, K.-K.; COHEN, N.; DE NOBLE, J.P.; SPECIAN JR., A.C.; SAUCY, G. Synthetic Studies on (2*R*,4'*R*,8'*R*)- α -Tocopherol. Facile Syntheses of Optically Active, Saturated, Acyclic Isoprenoids via Stereospecific (3,3) Sigmatropic Rearrangements. *J. Org. Chem.*, **41**, 3497-3505, 1976.

- CHEN, C-S.; GIRDAUKAS, G.; WU, S-H.; SIH, C. J. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 7294-7299, 1987.
- CHO, B.T., and KIM, D.J. Efficient synthesis of (R)- and (S)-3-octanol, (R)-2-dodecanol, (R)-2-methyl-4-heptanol and (R)-2-methyl-4-octanol: the pheromones of *Myrmica scabrinodis*, *Crematogaster castanea*, *C. liengmei*, *C. auberti* and *Metamasius hemipterus*. *Tetrahedron*. **59**, 2457-2462, 2003.
- CHRISMAN, W. - **Stannyldienynes for Stereoselective Retinoid Synthesis**. (Tese de Doutorado) - Santa Barbara – California 2004.
- COREY, E.J.; CHENG, X-M **The logic of Chemical Synthesis**. - John Wiley & Sons, 1989.
- CYGLER, M.; GROCHULSKI, P.; KAZLAUSKAS, R. J.; SCHRAG, J. D.; BOUTILLIER, F.; RUBIN, B.; SERREGI, A. N.; GUPTA, A. K. A Structural Basis for the Chiral Preferences of Lipases. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 3180-3186, 1994.
- CYGLER, M.; SCHRAG, J. D. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. *Methods Enzymol*, **284**, part A, 3-27, 1997.
- DAVIS, B. G.; BOYLER, V. Biocatalysis and enzymes in organic synthesis. *Nat. Prod. Rep.* **18**, 618-640, 2001.
- DEREWENDA, U.; SWENSON, L.; GREEN, R.; WEI, Y.; DODSON, G. G.; YAMAGUCHI, S.; HAAS, M. J.; DEREWENDA, Z. S. An unusual buried polar cluster in a family of fungal lipases. *Nat. Struc. Biol.*, **1**, 36-47, 1994..
- DESNUELLE, P.; Boyer, P. D. - **The Enzymes**. *Academic Press, New York* **7**, 575-616, 1972.
- Dicke, M.; Sabelis, M.W. **Cost and Benefits of Chemical Information Conveyance: Proximate and Ultimate Factors**. in: Roitberg & M.B. *Insect Chemical Ecology: an Evolutionary Approach* Champ & Hall, Isman, New York, 1992.
- Dicke, M.; Sabelis, M.W. Infochemical terminology : should it be based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds. - *Funct. Ecol.* **2**, 131-143, 1988.
- FERRATO, F.; CARRIERE, F.; SARDA, L.; VERGER, R. A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. *Methods Enzimol.*, **284**, part B, 327-347, 1997.

- FITZPATRICK, P. A.; KLIBANOV, A. M. Computer-assisted modeling of subtilisin enantioselectivity in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 735-742, 1992.
- GOTOR, V. Non-conventional hydrolase chemistry: amide and carbamate bond formation catalyzed by lipases. *Bioorg. Med. Chem.*, **7**, 2189-2197, 1999.
- GREENWAY, A. R. **In Some Chemical and Entomological Problems in the Investigation and Use of Behaviour-Controlling Chemicals, Proceedings of the International Conference on Biological Activity.** - Academic Press, New York, 1975.
- GRIFFITH, R. The relationship between the red ring nematode and the palm weevil. *J. Agric. Soc. Of Trinidad and Tobago*, **68**, 342-352, 1968.
- GROCHULSKI, P.; LI, Y.; SCHRAG, J. D.; BOUTHILLIER, F.; SMITH, P.; HARRISON, D.; RUBIN, B.; CYGLER, M. Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J. Biol. Chem.* **268**: 12843-12847, 1993.
- HERMONO, J.; PIGNOL, D.; KERFELEC, B.; CRENON, I.; CHAPUS, C.; FONTECILLA-CAMPS, J. C. Lipase Activation by Nonionic Detergents The crystal structure of the porcine lipase-coplipase-tetraethylene glycolmonoethyl ether complex. *Biol. Chem.*, **271**, 18007-18016, 1996.
- HERNÁNDEZ, J.V.; CERDA, H.; SAFFÉ, K.; SANCHEZ, K.; Localización del hospedero, Actividad Diaria y Optimización de las Capturas del picudo del Cocotero *Rhynchophorus Palmarum* L. (Coleoptera Curculionidae) Mediante Trampas Inocuas. *Agronomía Tropical*, **42**, 211-216, 1992.
- HERSCHLAG, D. The role of induced fit and conformational-changes of enzymes in specificity and catalysis. *Bioorg. Chem.* **10**, 62-96, 1987.
- HOLMQUIST, M.; CLAUSEN, I.G.; PETKAR, S.; SVENDSEN, A.; HULT, K. Probing a functional role of Glu87 and Trp89 in the lid of *Humicola lanuginosa* lipase through transesterification reactions in organic solvent. *J. Protein. Chem.* **14**, 217-224, 1995.
- ITOH, T.; TAKAGI, Y.; TSUKUBE, H. Synthesis of Chiral Building Block for Organic Synthesis *via* Lipase-Catalyzed Reaction: New Method of Enhancing Enzymatic Reaction Enantioselectivity. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **3**, 259-270, 1997.

- JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.*, **16**, 396-403, 1998.
- JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; HERTZ, M. T. Bacterial biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.*, **53**, 315-351, 1999.
- JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**, 390-397, 2002.
- JAEGER, K. E.; RANSAK, S.; KOCH, H. B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B. W. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.*, **15**, 29-63, 1994.
- KAMINSKA, J.; GÓRNICKA, I.; SIKORA, M.; GÓRA, J. Preparation of Homochiral (S)- and (R)-1-(2-Furyl)ethanols by Lipase-Catalyzed Transesterification. *Tetrahedron Asym.*, **7**, 907-911, 1996.
- KIM, K. K.; SONG, H. K.; SHIN, D. H.; HWANG, K. Y.; SUH, S. W. The Crystal Structure of a Triacylglycerol Lipase from *Pseudomonas cepacia* Reveals a Highly Open Conformation in the Absence of a bound Inhibitor. *Structure*, **5**, 173-185, 1997.
- KITAGUCHI, H.; FITZPATRICK, P.A.; HUBER, J.E.; KLIBANOV, A.M. Enzymatic resolution of racemic amines: crucial role of the solvent. *J Am Chem Soc* **111**, 3094–3095, 1989.
- KITAGUCHI, H.; ITOH, I.; ONO, M. Effects of water and water-mimicking solvents on the lipase-catalyzed esterification in an apolar solvent. *Chem Lett.*, 1203-1306, 1990.
- KLIBANOV, A. M. Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends Biochem Sci.*, **14**, 141-144, 1989.
- KLOPFER, P.H.; HATCH, J.J. **Experimental considerations** In: **Sebeok, T.A.** - (ed.), *Animal Communication*. University of Indiana Press, Bloomington, 1968.
- LANG, D.; HOFMANN, B.; HAALCK, L.; HECHT, H.J.; SPENER, F.; SCHMID, R.D.; SCHOMBURG, D. Crystal Structure of a Bacterial Lipase from *Chromobacterium viscosum* ATCC 6918 Refined at 1.6 Å Resolution. *J. Biol. Chem.*, **259**, 704-709, 1996.

- LAWSON, D. M.; BRZOZWSKI, A. M.; RETY, S.; VERMA, C.; DODSON, G. G. Probing the nature of substrate binding in *Humicola lanuginosa* lipase through X-ray crystallography and intuitive modelling. *Protein Eng.* **7**, 543– 550, 1994.
- LAZLÓ, P.; NOVÁK, L. **Selective Biocatalysis: A Synthetic Approach.** VHC, Weinheim, 1992.
- LEWIS, B.; GOWER, M. **Biology of Communication.** Blackie, London, 1980.
- MILLAR, J. G.; SIMS, J. J.; Haynes, K. F. **Preparation, cleanup, and preliminary fractionation of extracts. In: Methods in Chemical Ecology.** Chapman & Hall, 1998.
- MORI, K.; AKAO, H. Synthesis of Optically Active Alkynyl Alcohol and α -Hydroxy Esters by Microbial Asymmetric Hydrolysis of the Corresponding Acetates. *Tetrahedron*, **36**, 91-96, 1980.
- MOURA, J. I. L.; RESENDE, M. L. V.; SGRILLO, R. B.; NASCIMENTO, L. A.; ROMANO, R. - *Agrotrópica*, **2**, 165-168, 1990.
- NAKAMURA, K.; KINOSHITA, M.; OHNO, A. Structure of solvent affects enantioselectivity of lipase-catalyzed transesterification. *Tetrahedron*, **51**, 8799-8808, 1995.
- NAKAMURA, K.; TAKEBE, Y.; KITAYAMA, T.; OHNO, A. Effect of solvent structure on enantioselectivity of lipase-catalyzed transesterification. *Tetrahedron Lett.*, **32**, 4941-4944, 1991.
- NAVARRO, D.M.A.F.; MURTA, M.M.; DUARTE, A.G.; LIMA, I.S.; NASCIMENTO, R.R.; SANT'ANA, A.E.G. Aspectos Práticos Relacionados ao Uso do Rincoforol, o Feromônio de Agregação da Broca-Do-Olho-do-Coqueiro *Rhynchophorus Palmarum* L. (Coleóptera: Curculionidae) No Controle de Pragas do Coqueiro. Análise de Sua Eficiência em Campo. *Química Nova*, **25**, 32-36, 2002.
- NOBLE, M. E. M.; CLEASBY, A.; JOHNSON, L. N.; EGMOND, M. R.; FRENKEN, L. G. J. The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Lett.* **331**, 123–128 1993.
- NORDLUND, D.A. AND LEWIS, W.J. Terminology of Chemical-releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. *J. Chem. Ecol.* **2**, 211-220, 1980.

- OEHLSCHLAGER, A.C.; PIERCE, JR., H.D.; MORGAN, B; WIMALARATNE, P.D.C.; SLESSOR, K.N.; KING, G.G.S. Chirality and Field Activity of Rhynchophorol, the Aggregation Pheromone of the American Palm Weevil. *Naturwissenschaften*, **79**, 134-135, 1992.
- PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **29**, 119-131, part 2, 1999.
- PERRIN, D.D. and ARMAREGO, W.L.F. **Purification of laboratory chemicals.** Pergamon Press, New York, 1988.
- PIETERSON, W. A.; VIDAL, J. C.; VOLWERK, J. J.; HAAS, G. H. Zymogen-catalyzed hydrolysis of monomeric substrates and the presence of a recognition site for lipid-water interfaces in phospholipase A2. *Biochemistry*, **13**, 1455, 1974.
- PRICE, P.W.; BUOTON, C.E.; CROSS, P. Interactions Among three Trofics Levels; Influence of Plants on Interactions Between Insect Herbivores an Natural Enemies. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **11**, 41-51, 1998.
- RAMINELLI, C.; COMASSETO, J.V.; ANDRADE, L.H.; PORTO, A.L.M. Kinetic resolution of propargylic and allylic alcohols by *Candida Antarctica* lipase (Novozyme 435). *Tetrahedron Asymmetry*, **15**, 3117-3122, 2004.
- ROBERTS, S. M. Preparative biotransformations. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, 1-29, 1999
- ROBERTS, S. M. Preparative biotransformations. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, 611-625, 2000.
- ROBERTS, S. M. Preparative biotransformations: the employment of enzymes and whole-cells in synthetic organic chemistry. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, 157-168, 1998.
- ROCHAT, D.; MALOSSE, C.; LETTERE, M.; DUCROT, P-H; ZAGATTI, P.; RENO, M.; DESCOINS, C. Male-produced aggregation pheromone of the American palm weevil, *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera, curculionidae): collection, identificaion, electrophysiological activity and laboratory bioassay. *J. Chem. Ecol.* **17**, 2127-2141, 1991.

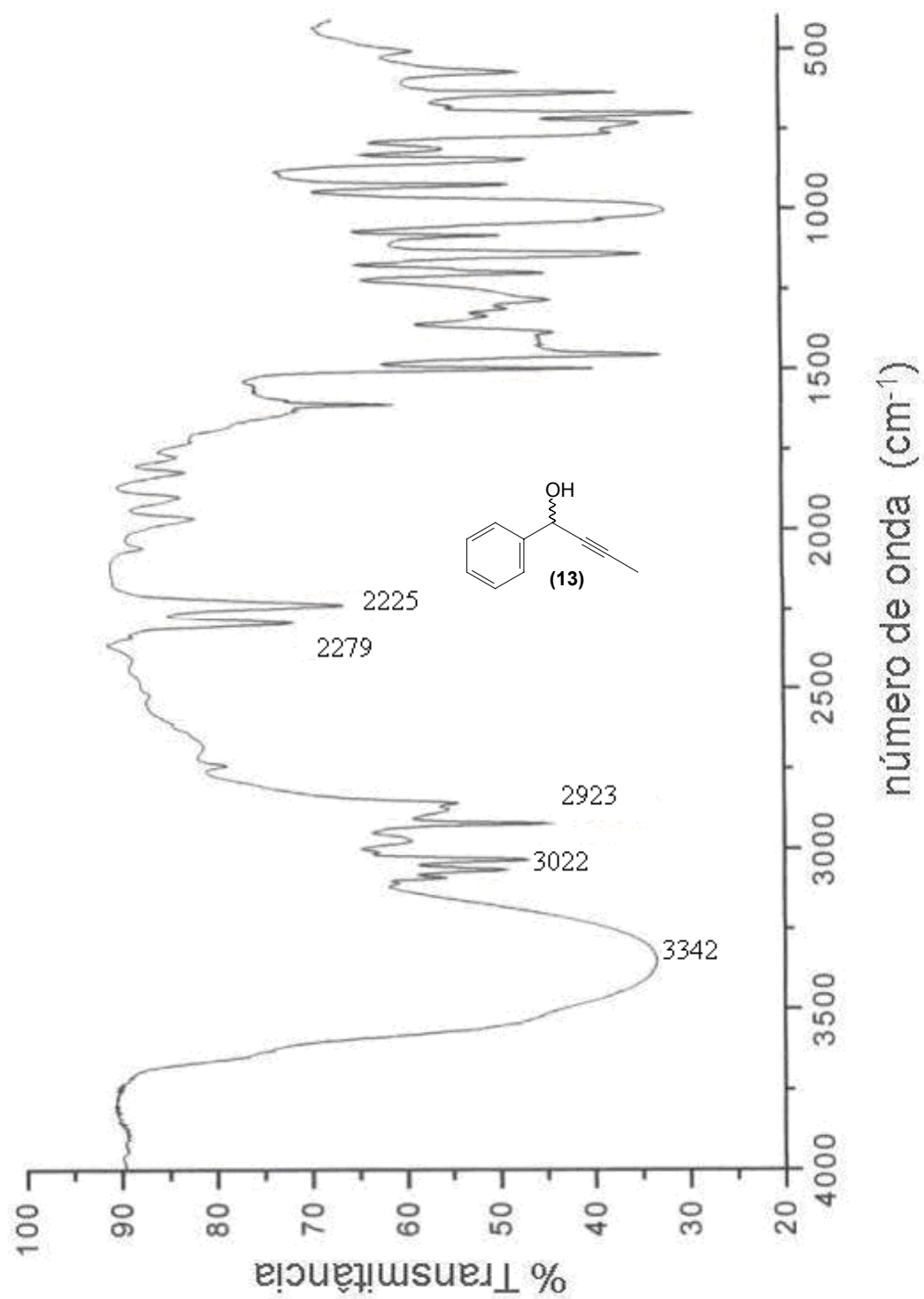
- SAKURAI, T.; MARGOLIN, A. L.; RUSSEL, A. J.; KLIBANOV, A.M. Control of enzyme enantioselectivity by the reaction medium. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 7236-7237, 1988..
- SANTANIELLO, E.; FERRABOSACHI, P.; GRISENTI, P.; MANZOCCHI, A. The biocatalytic approach to the preparation of enantiomerically pure chiral building blocks. *Chem. Rev.*, **92**, 1071-1140, 1992.
- SARDA, L.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancreatique sur les esters en emulsion. *Biochim. Biophys. Acta*, **30**, 513-521, 1958.
- SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **37**, 1609-1633, 1998.
- SCHRAG, J. D.; CYGLER, M. A refined structure of the lipase from *Geotrichum candidum*. *J. Mol. Biol.*, **230**, 575-591, 1993.
- SCHRAG, J. D.; LI, Y.; WU, S.; CYGLER, M. Ser-His-Glu triad form the catalytic site of the lipase from the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature*, **351**, 761-764, 1991.
- SECUNDO, F.; RIVA, S.; CARREA, G. Effect of medium and reaction conditions on the enantioselectivity of lipases in organic solvents and possible rationales. *Tetrahedron: Asymmetry* **3**: 267-280, 1992.
- SIH, C.J.; CHEN, C.S. Aspects and optimization of enantioselective biocatalysis in organic solvents: the use of lipases. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **28**, 695-707, 1989.
- SIH, C.J.; GIRDAUKAS, G.; FUJIMOTO, Y.; CHEN, C.S. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 7294, 1982.
- SIH, C.J.; WU, S.H. Resolution of enantiomers via biocatalysis. *Topics Stereochem.*, **19**, 63-125, 1989.
- STECHER, H.; FABER, K. Biocatalytic Deracemization Techniques: Dynamic Resolutions and Stereo-inversions. *Synthesis*, 1-16, 1997.
- SUFFERT, J.; TOUSSANT, D. An Easy Useful Preparation of Propynyllithium from (E/Z)-1-bromopropene. *J. Org. Chem.* **60**, 3550-3553, 1995.
- TAWAKI, S.; KLIBANOV, A. M. Inversion of enzyme enantioselectivity mediated by the solvent. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 1882-1884, 1992.

- THEIL, F. Lipase-Supported Synthesis of Biologically Active Compounds. *Chem. Rev.* **95**, 2203-2227, 1995.
- UPPENBERG, J.; HANSEN, M.T.; PATKAR, S.; JONES, T.A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida Antarctica*. *Structure* **2**, 293-308, 1994.
- VERGER, R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. *Trens Biotechnol.*, **15**, 32-38, 1997.
- VERGER, R.; MIERAS, M.C.; HAAS, G.H. Action of phospholipase A₂ at interfaces. *J Biol. Chem.* **248**, 4023-4034, 1973.
- VILELA, E.F.; DELLA-LUCIA, T.M.C.; OLIVEIRA, J.S. Controle de insetos-pragas por comportamento : feromônio. *Informativo Agropecuário*, **12**, 39-45, 1986.
- WESCOTT, C.R.; NORITOMI, H.; KLIBANOV, A. M. Rational Control of Enzymatic Enantioselectivity through Solvation Thermodynamics. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 10365-10370, 1996.
- WILSON, E.O. **The Insects Societies**. Harvard University Press, Cambridge, 548, 1971.
- WINKLER, F.K.; D'ARCY, A.; HUNZIKER, W. Structure of human pancreatic lipase. *Nature*, **343**, 771-774, 1990.
- YAMAMOTO, K.; NISHIOKA, J.; ODA, Y.; YAMAMOTO, Y. Asymmetric ring opening of cyclic acid anhydrides with lipase in organic solvents. *Tetrahedron Lett.*, **29**, 1717-1720, 1988.
- ZAKS, A.; KLIBANOV, A.M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *J. Biol. Chem.* **263**, 3194-3201, 1988.

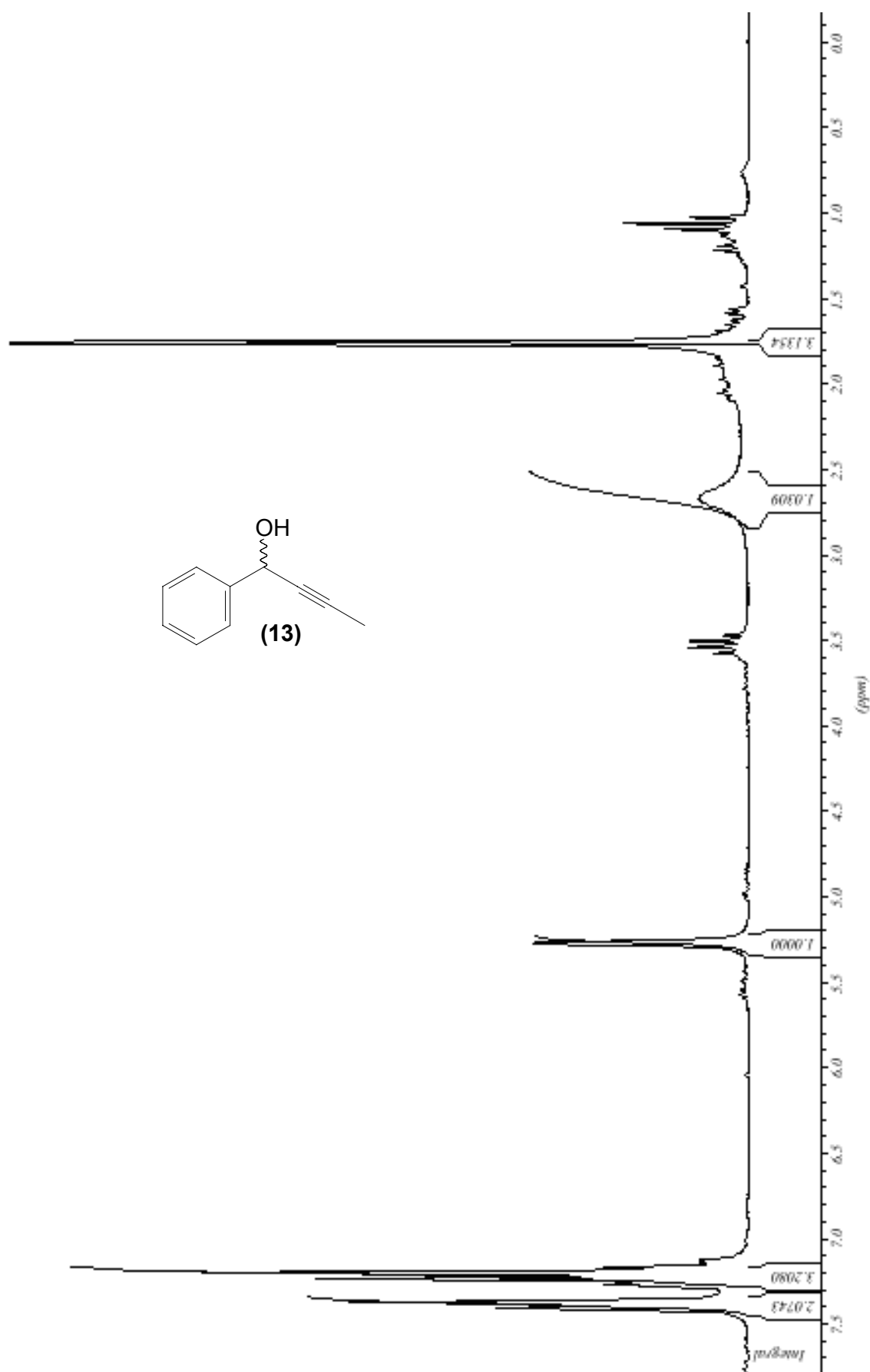
ANEXO

ESPECTROS SELECCIONADOS

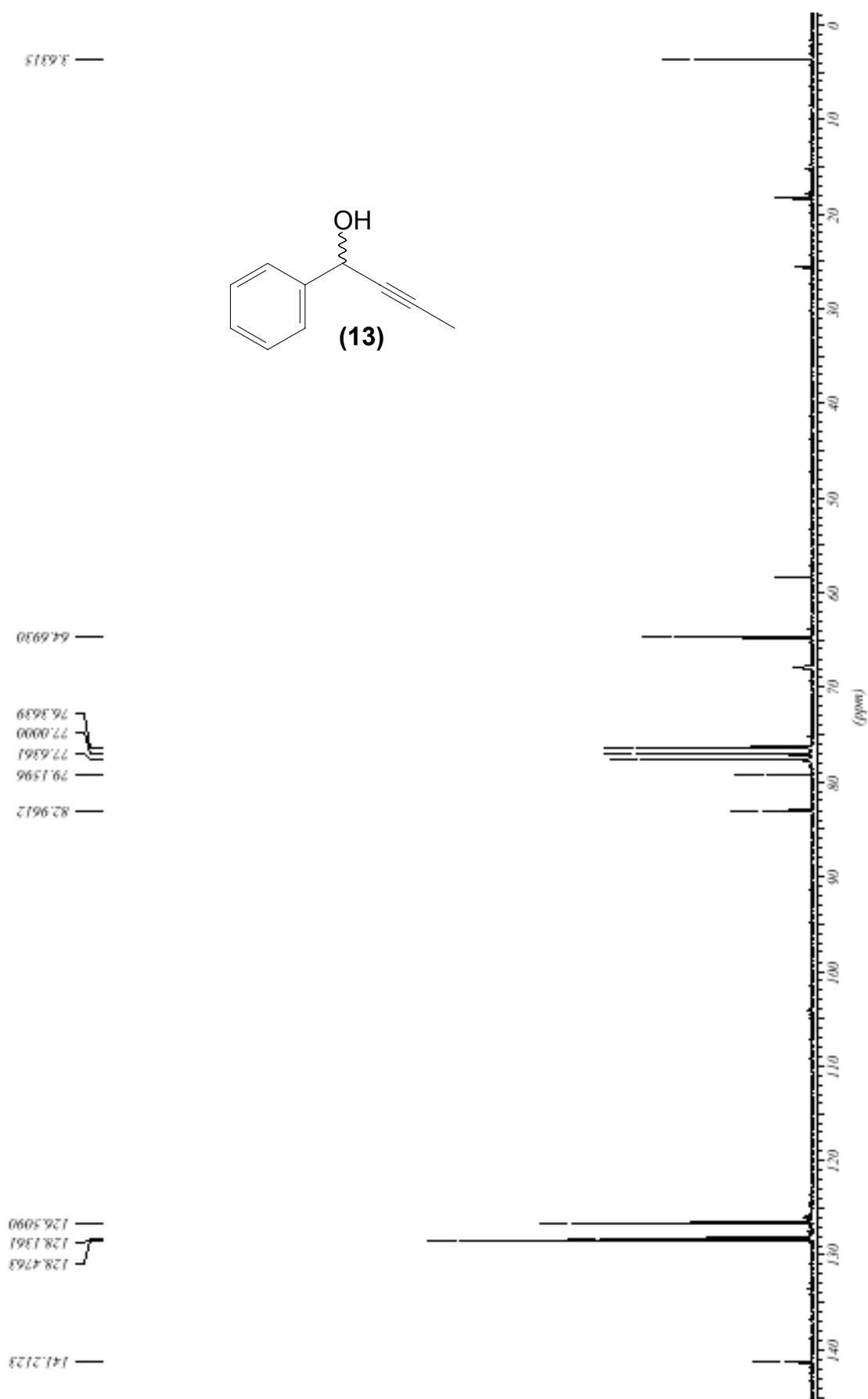
Espectro de infravermelho do (\pm)-1-fenil-2-butin-1-ol (**13**).



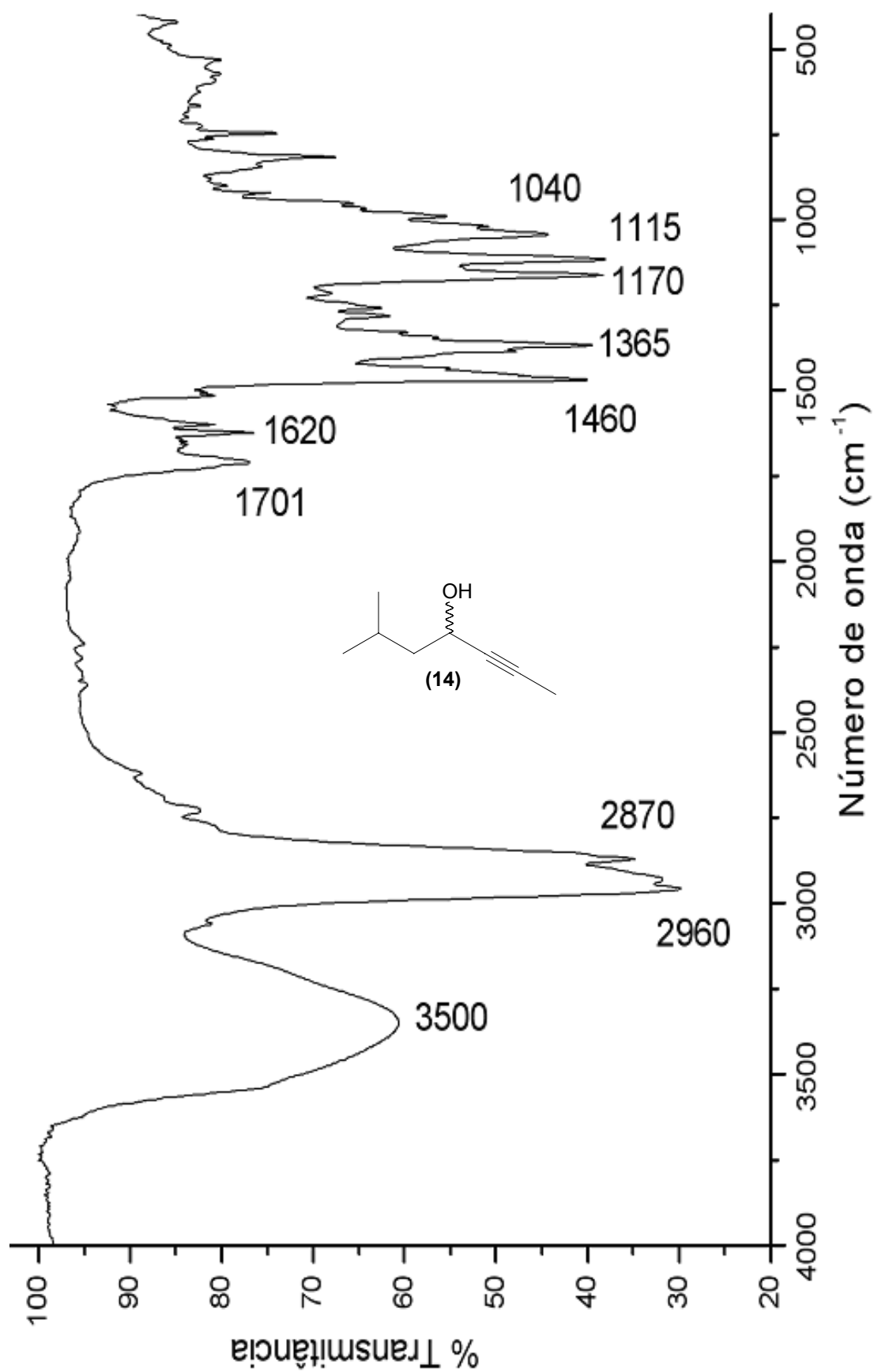
Espectro RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) do 1-fenil-2-butin-1-ol (**13**).



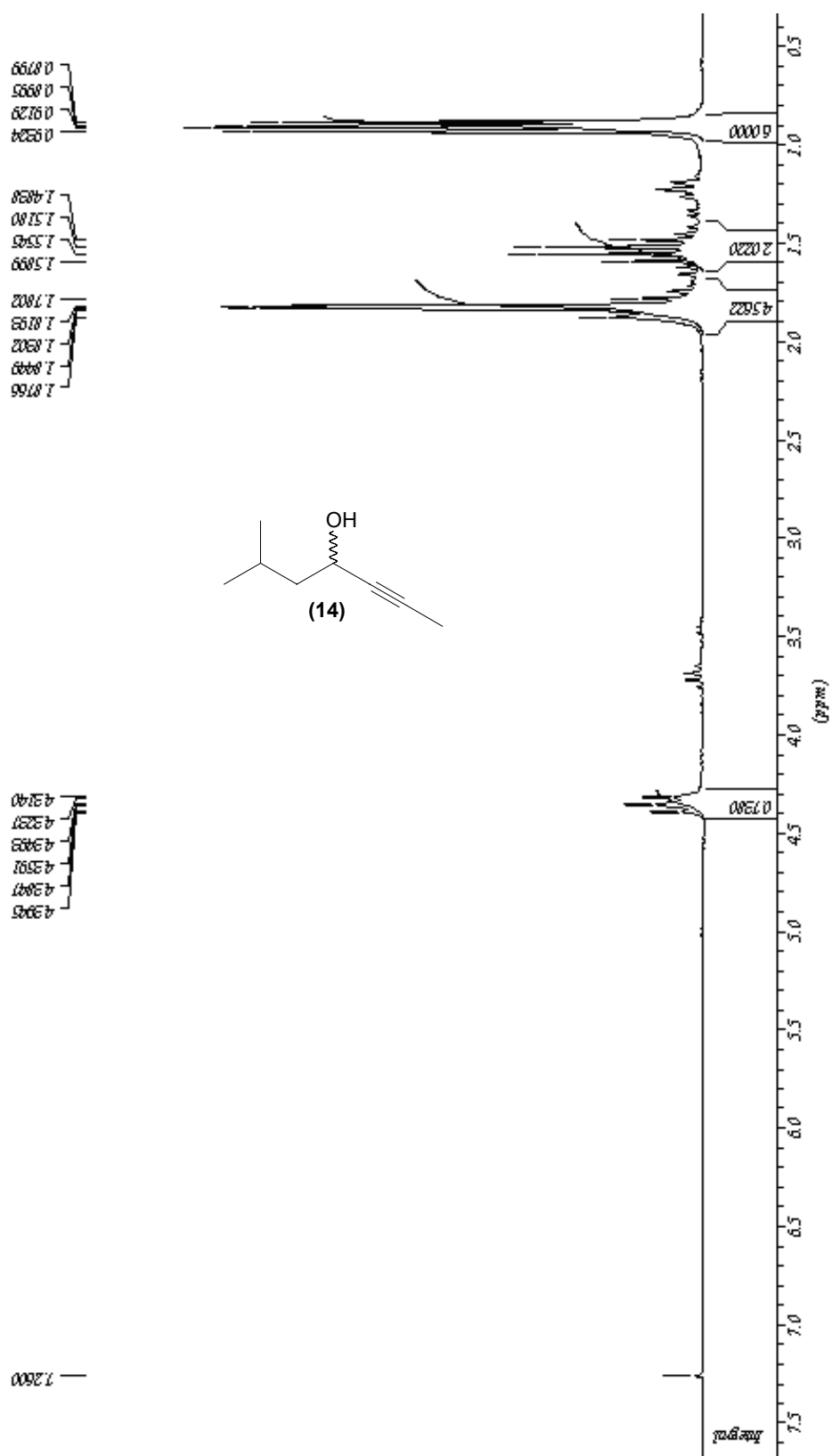
Espectro RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do 1-fenil-2-butin-1-ol (**13**).



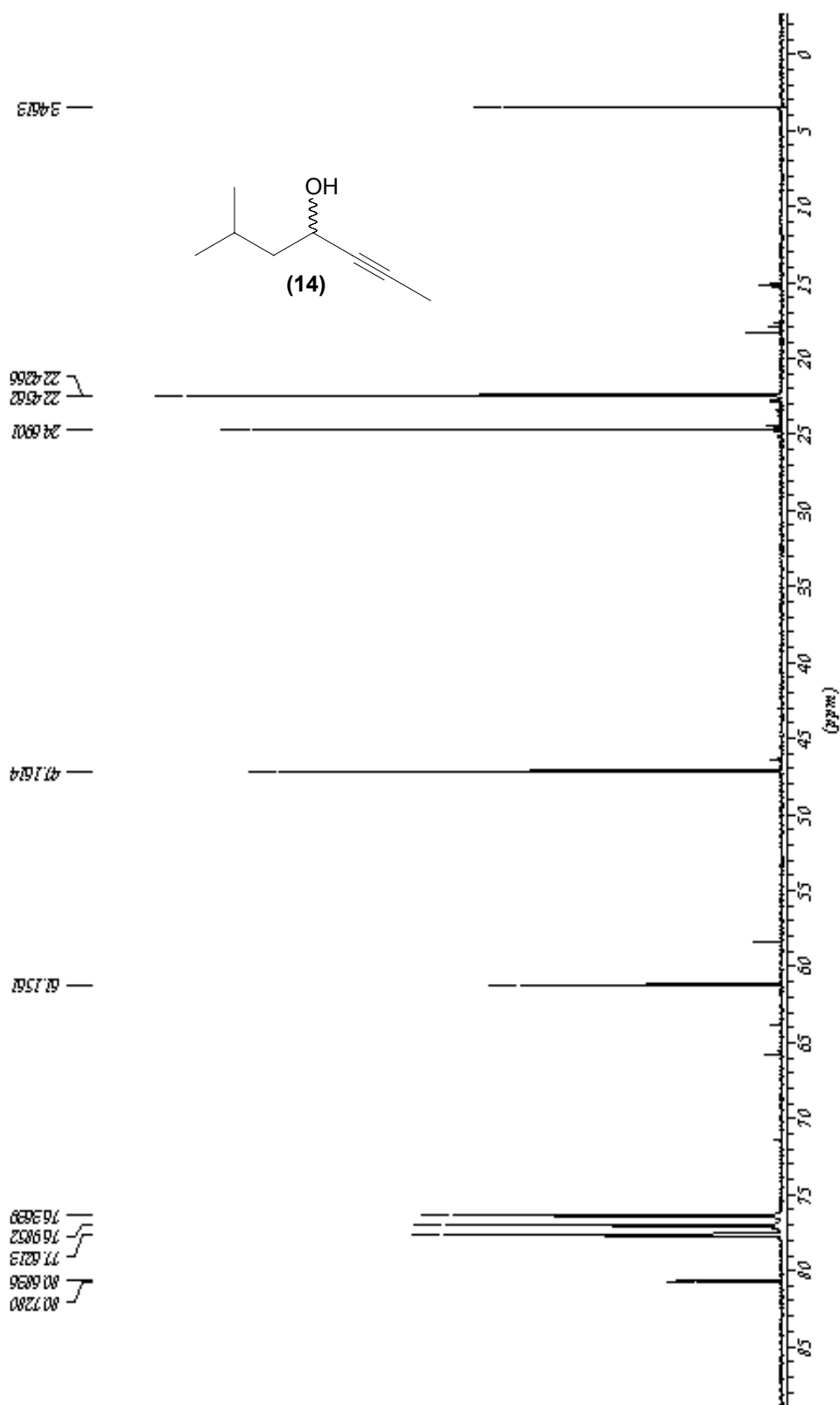
Espectro de infravermelho do (\pm)-6-metil-2-heptin-4-ol (**14**).



Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) do (\pm)-6-metil-2-heptin-4-ol (**14**).



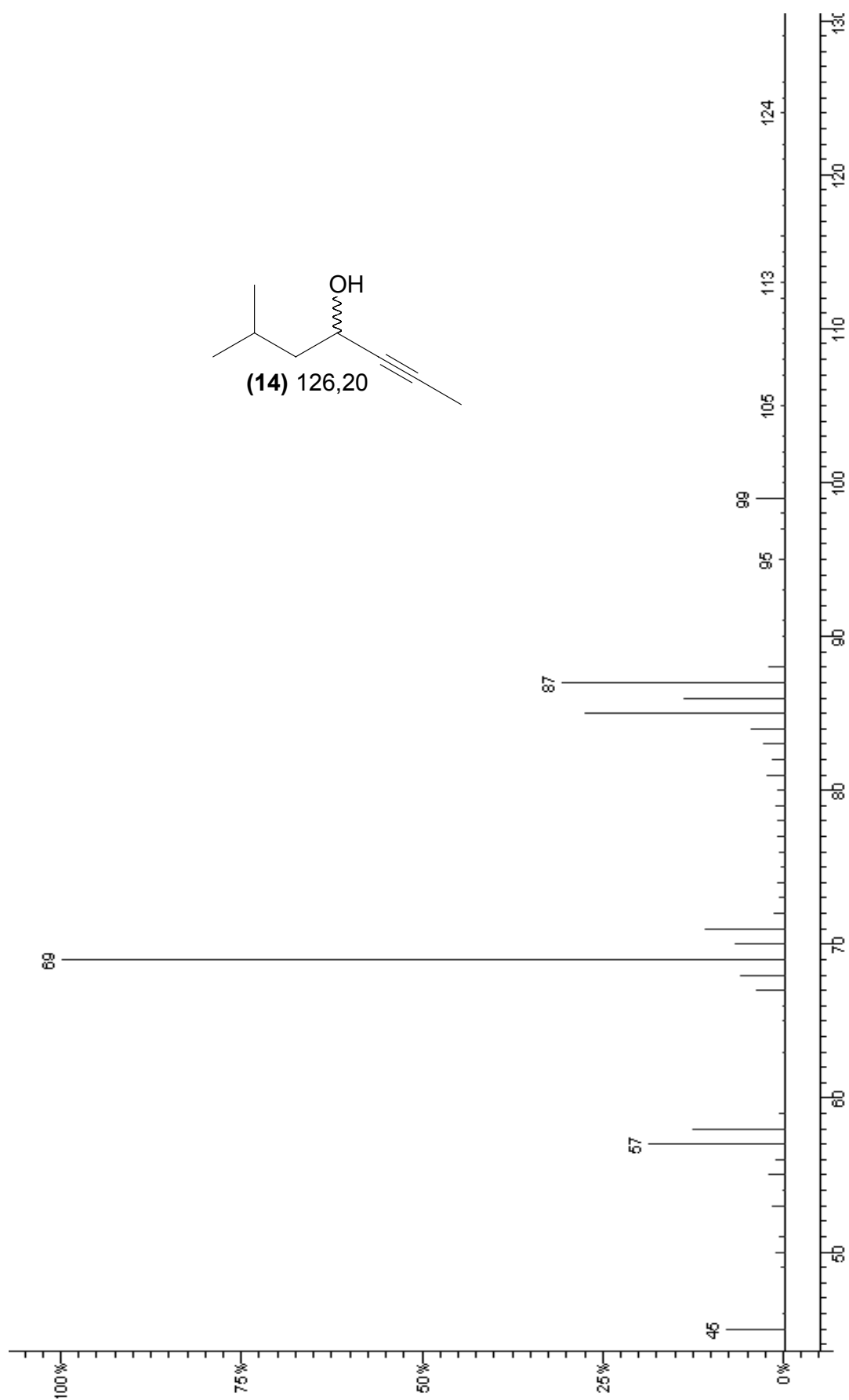
Espectro de RMN ^{13}C (50MHz, CDCl_3) do (\pm)-6-metil-2-heptin-4-ol (**14**).



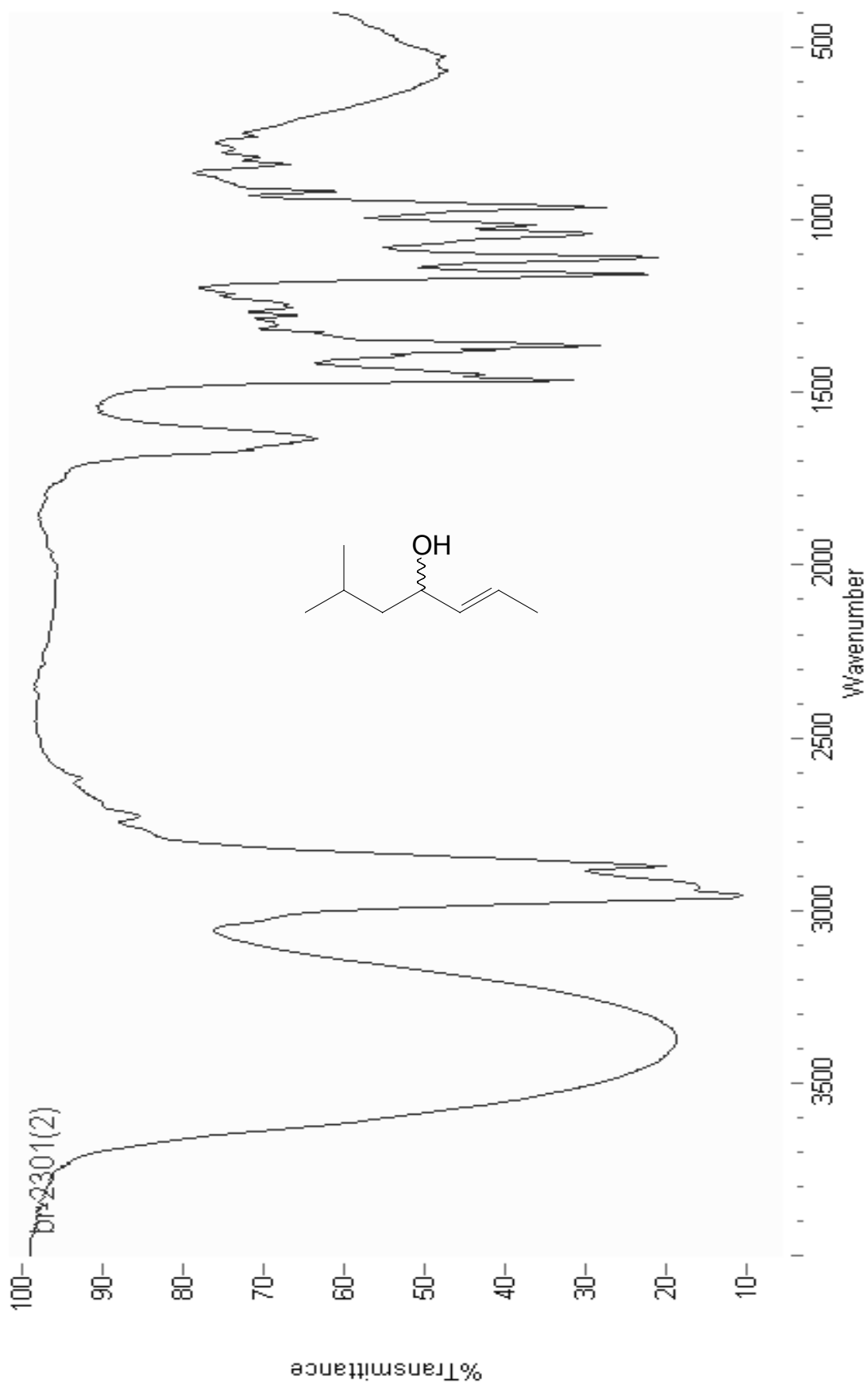
Espectro de RMN DEPT135 (50MHz, CDCl₃) do (±)-6-metil-2-heptin-4-ol (**14**).



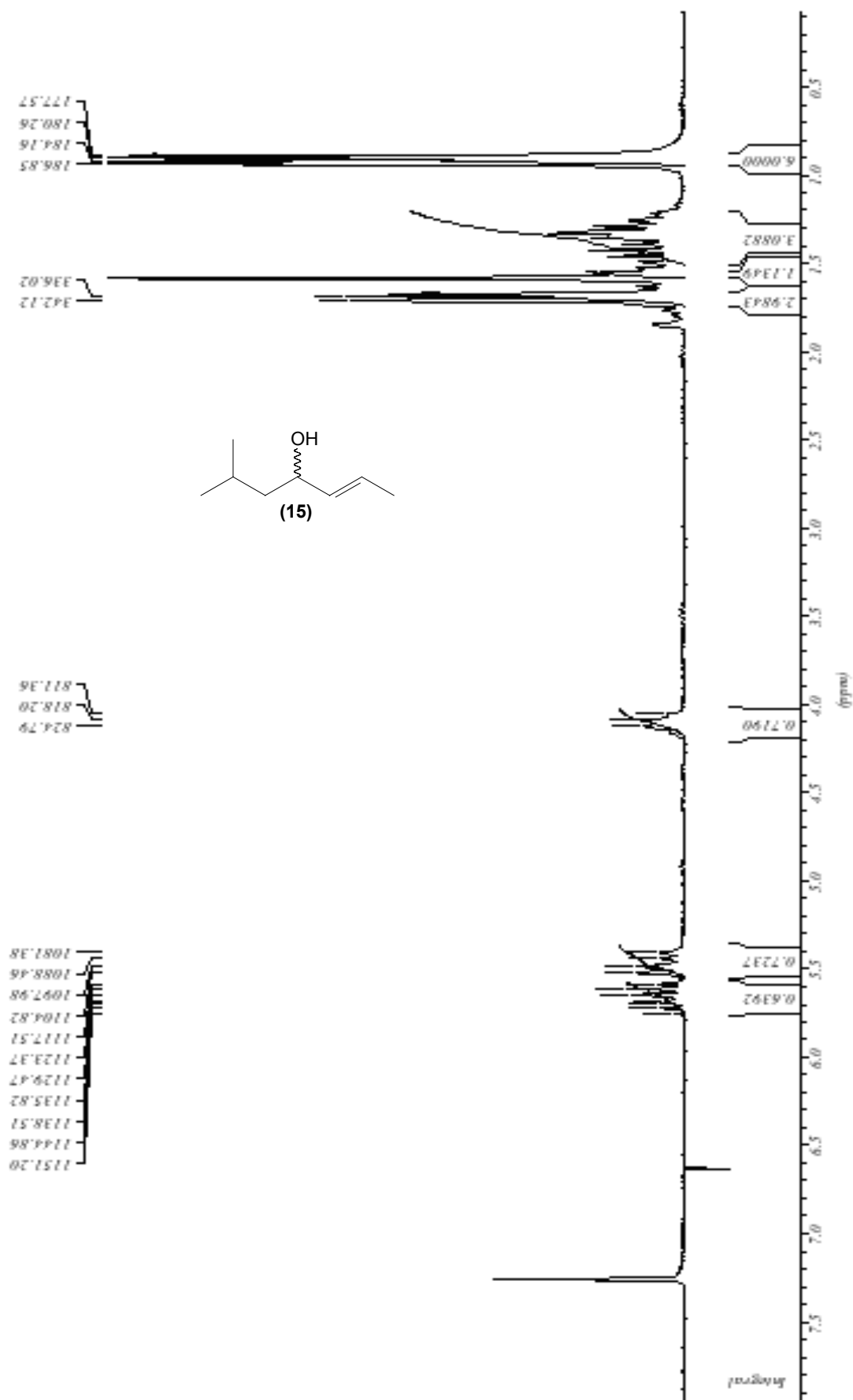
Espectro de massa do (\pm)-6-metil-2-heptin-4-ol (**14**).



Espectro de FTIR do 6-metil-2E-hepten-4-ol (**15**).



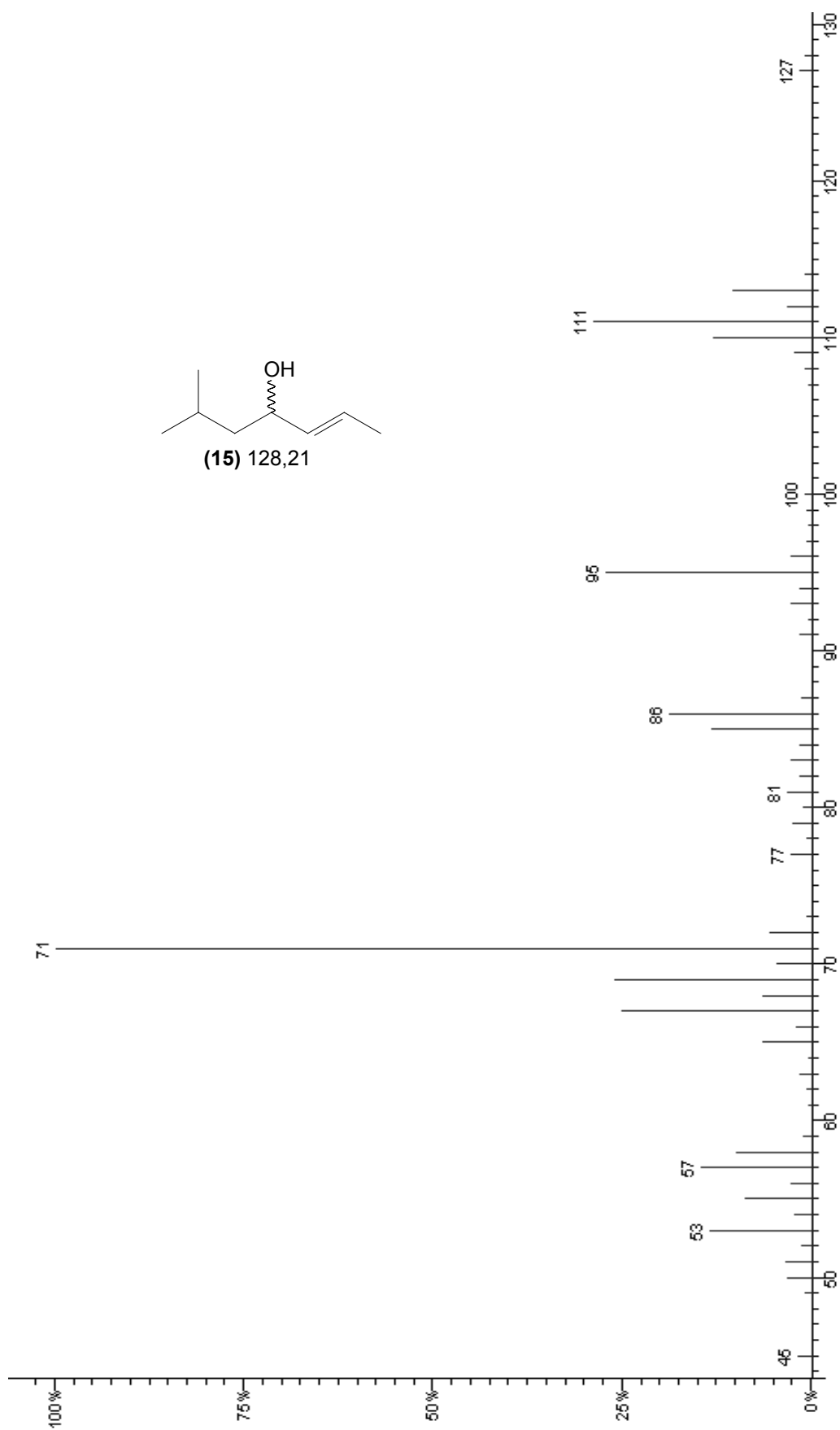
Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) do 6-metil-2-hepten-4-ol – rincoforol(15).



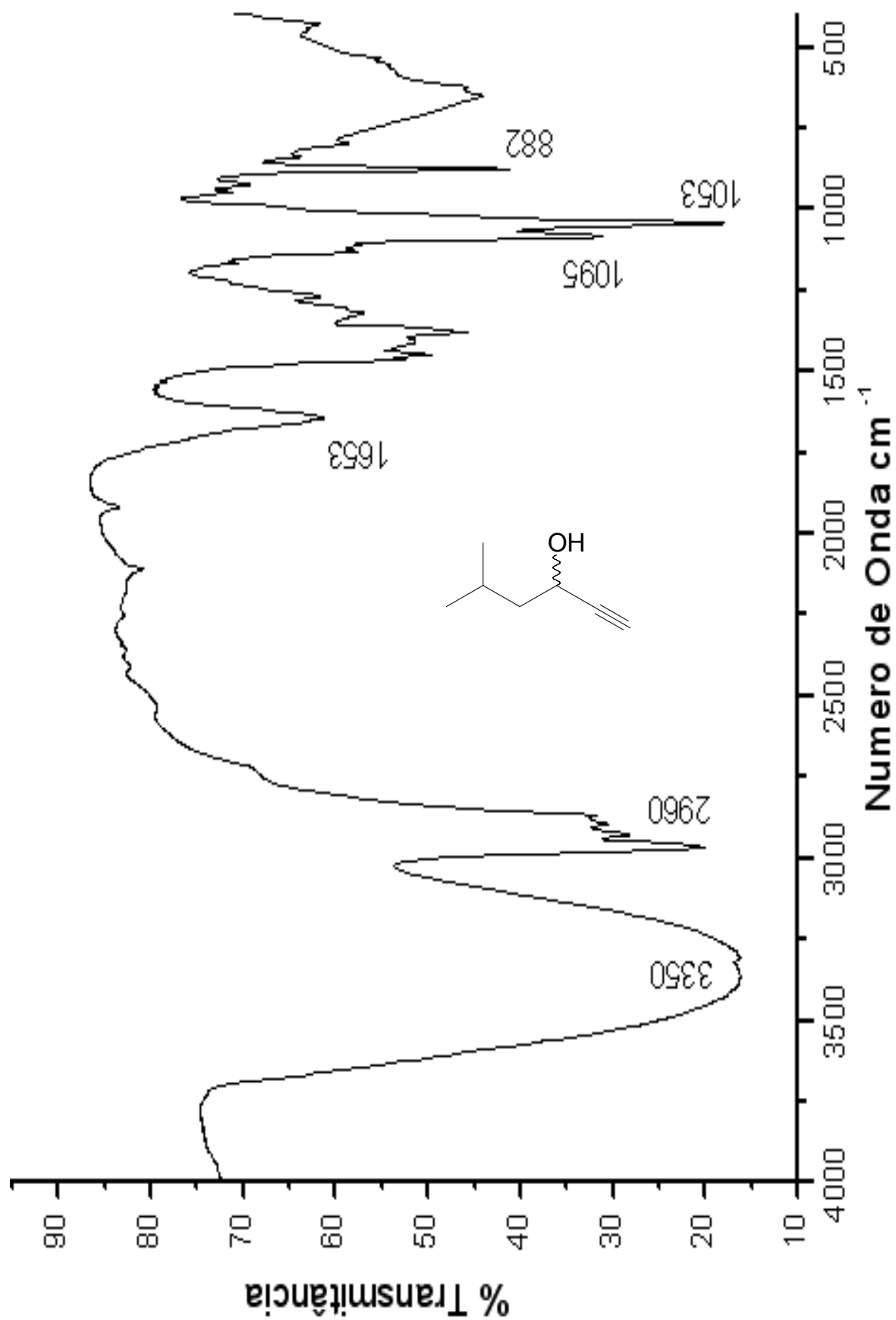
Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do 6-metil-2-hepten-4-ol – rincoforol (**15**).



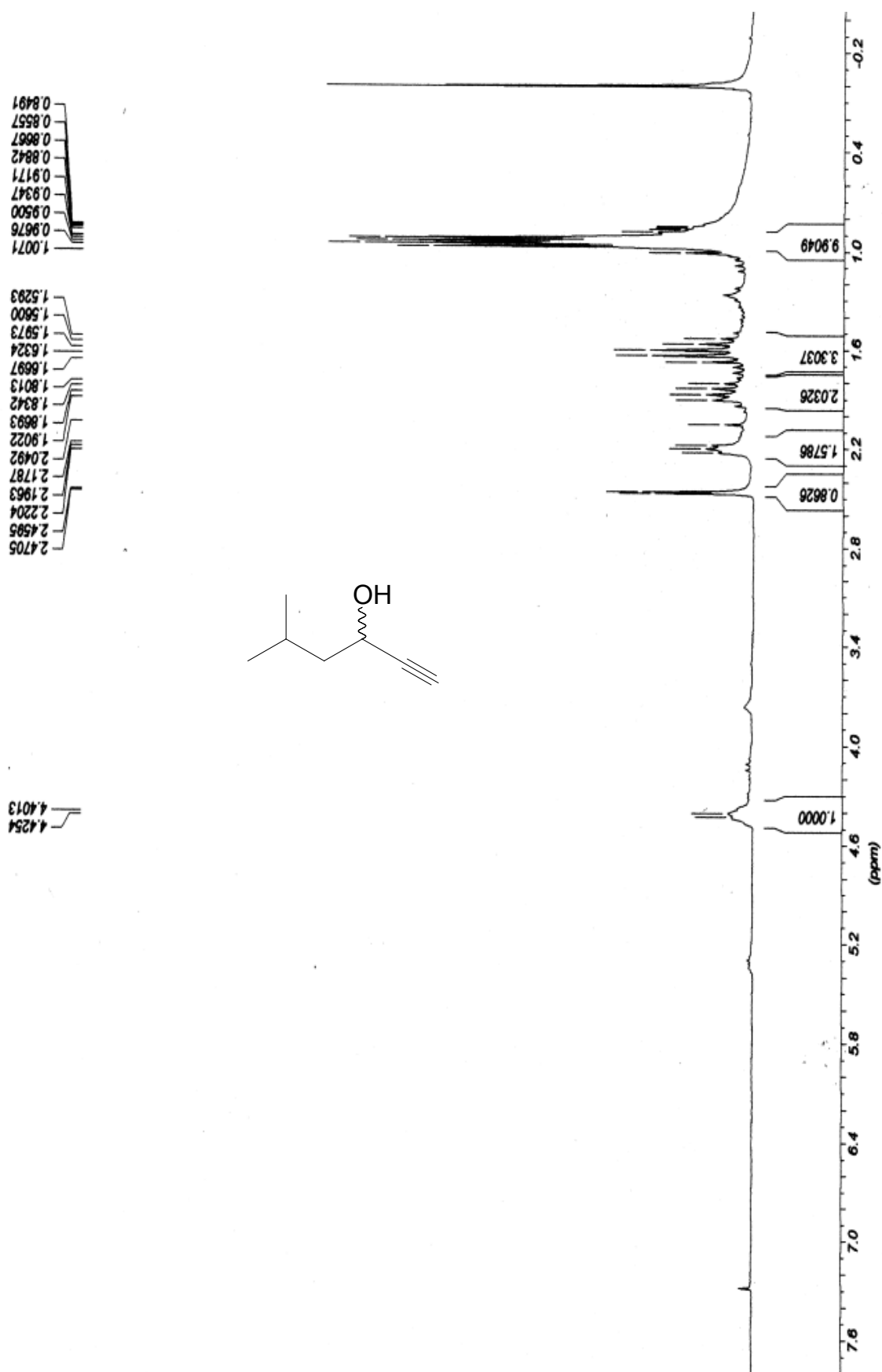
Espectro de massa do (\pm)-6-metil-2*E*-hepten-4-ol – rincoforol (**15**).



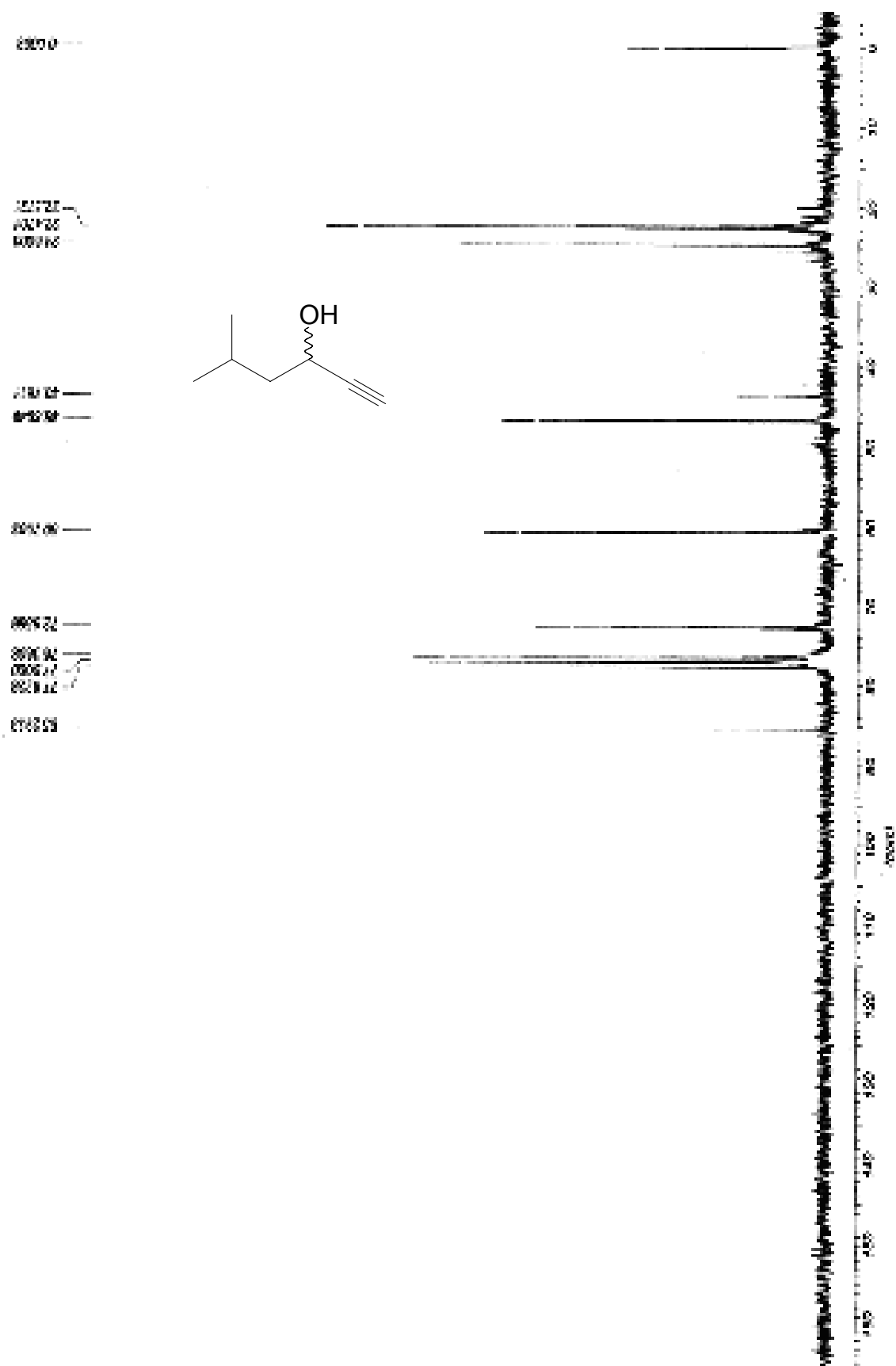
Espectro de infravermelho do (\pm)-5-metil-1-hexin-3-ol (**16**).



Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) (\pm)-5-metil-1-hexin-3-ol (**16**).



Espectro de RMN ^{13}C (300MHz, CDCl_3) (\pm)-5-metil-1-hexin-3-ol (**16**).



Espectro de Massa do (±)-5-metil-1-hexin-3-ol (**16**).