



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**



THIAGO SABINO DA SILVA

**EFEITO DA PORÇÃO ALCOÓLICA NA RESOLUÇÃO CINÉTICA
ENZIMÁTICA DE ÉSTERES DERIVADOS DO ÁCIDO 2-BROMO BUTÍRICO:
UM BLOCO DE CONSTRUÇÃO QUIRAL VERSÁTIL**

CURITIBA

2016

THIAGO SABINO DA SILVA

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Química Orgânica, no Curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Piovan

**EFEITO DA PORÇÃO ALCOÓLICA NA RESOLUÇÃO CINÉTICA
ENZIMÁTICA DE ÉSTERES DERIVADOS DO ÁCIDO 2-BROMO BUTÍRICO:
UM BLOCO DE CONSTRUÇÃO QUIRAL VERSÁTIL**

CURTIBA

2016

S586e Silva, Thiago Sabino da
Efeito da porção alcoólica na resolução cinética enzimática de ésteres derivados do ácido 2-bromo butírico: um bloco de construção quiral versátil / Thiago Sabino da Silva. – Curitiba, 2016.
128f. : il. [algumas color.] ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-graduação em Química, 2016.

Orientador: Leandro Piovan

I. Química orgânica. I. Universidade Federal do Paraná. II. Piovan, Leandro. III. Título.

CDD: 540

TERMO DE APROVAÇÃO

**EFEITO DA PORÇÃO ALCOÓLICA NA RESOLUÇÃO CINÉTICA
ENZIMÁTICA DE ÉSTERES DERIVADOS DO ÁCIDO
2-BROMOBUTÍRICO: UM BLOCO DE CONSTRUÇÃO QUIRAL VERSÁTIL**

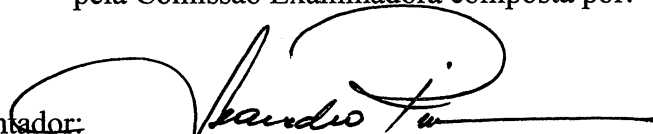
por

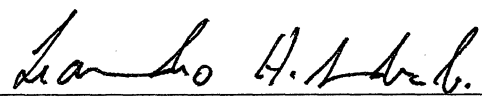
THIAGO SABINO DA SILVA

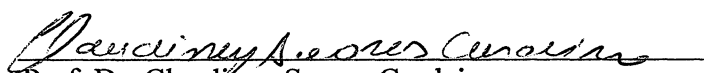
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,

pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador: 
Prof. Dr. Leandro Piovan
Dep. de Química – UFPR


Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade
Instituto de Química – USP


Prof. Dr. Claudiney Soares Cordeiro
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 26 de agosto de 2016.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Leandro Piovan pela oportunidade concedida para a realização desse trabalho, pela orientação e pela ajuda em tornar minhas ideias mais organizadas e claras e ao Prof. Dr. Alfredo Ricardo Marques de Oliveira pelas sempre valiosas discussões.

Aos, mais que colegas de laboratório, amigos do LasQue que tive o prazer de conviver durante esses 2 anos. Ao Murilo, pelas discussões sobre rock'n roll e oxazolinas, à Pamela, por me acolher durante meu estágio supervisionado e pela amizade dentro e fora do laboratório, à Juliana, parceira do noturno (2), do boxe e de discussões futebolísticas, à Mariana pelos cupcakes e marmitas divididas, à Mara pela sempre disposição em ajudar todo mundo (instaladora oficial do TopSpin) e por deixar a porta da "casa do Marão" aberta o que serei eternamente grato, ao Jonas, pelas sempre pertinentes contribuições em apresentações e artigos e pelas sensacionais Bannoffs, ao Rodolfo, pela amizade e parceria dentro e fora do campo, uma pessoa realmente ímpar e cozinheiro de mão cheia, à Suelem, parceira de boxe, corrida, basquete, apesar dos tocos, corridas de CG, filmes e bandas de rock, por me aguentar mesmo nos dias mais ranzinzas. Agradeço também aos ICs do laboratório: Kelvin, Martha, Matheus e Tainara.

Às meninas da Casa do Marão, Andressa, Allen, Mara e Ariana, por me acolherem tão bem e terem me deixado tão à vontade, agradeço de coração.

Aos amigos do futebol, Diogo, Emir, Vitor Hugo, Mascote, Leandro, Denis, Cris, Vinícius, Fernando, Luiz, Mateus e Rodolfo, pelos essenciais jogos de terça e quinta feira.

A todos os amigos do Departamento de Química, em especial ao colega do meu ano, Maurício e aos inseparáveis Sirlon e Valmir, Fabiano (Cabelo) e ao Eduardo da Allen. A Cami, por esses mais de 8 anos de amizade e conversas durante os almoços no Ru.

À minha família por estar sempre ao meu lado, me apoiando incondicionalmente, especialmente minha mãe Lecy, e meu pai Jairo.

Ao Departamento de Química pela infra-estrutura cedida e à UFPR, CAPES, CNPQ e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

*“Be a simple kind of man
be something you love and understand.”*

Simple man – Lynyrd Skynyrd

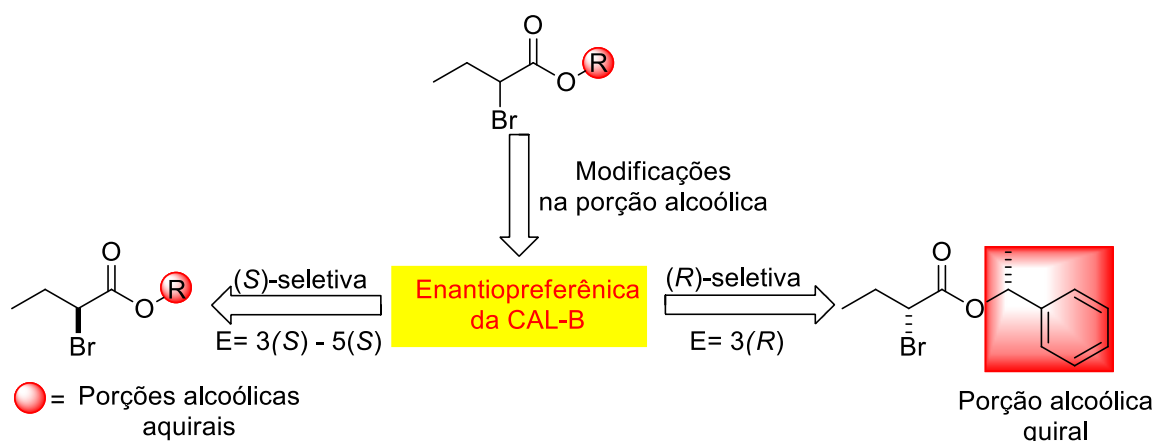
RESUMO

Lipases vem sendo empregadas com sucesso na obtenção de compostos enantiomericamente puros, especialmente álcoois e aminas quirais. No entanto, a enantiosseletividade desses biocatalisadores frente a ácidos carboxílicos e derivados, é usualmente baixa requerendo o estudo de estratégias capazes de melhorar o reconhecimento enzimático.

Este trabalho teve como objetivo estudar a resolução cinética enzimática (RCE) de ésteres derivados do ácido 2-bromo butírico, um importante bloco de construção quiral, empregando lipases comerciais através de reações de transesterificação. Dentre as lipases testadas apenas a lipase de *Candida antarctica* B (CAL-B) e a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLIM) apresentaram seletividade frente a porção acila do éster 2-bromobutanoato de etila apresentando valores de razão enantiomérica (E) considerados baixos, 3(S) para CAL-B e 3(R) para TLIM. A lipase CAL-B foi a escolhida para o estudo das otimizações das RCE através de alterações nas estruturas dos nucleófilos empregados na reação de transesterificação e de mudanças na porção alcóolica do éster (engenharia do substrato): tamanho da cadeia alquílica; presença de ramificações, insaturações, heteroátomos e quiralidade.

As alterações na estrutura do éster resultaram em uma ligeira melhora no valor do E, sendo que o melhor valor observado foi igual a 5 para o éster 2-bromobutanoato de *iso*-butila. A conversão da reação também se mostrou dependente da natureza da porção alcóolica, sendo que o aumento da cadeia hidrocarbônica e a presença de ramificações resultaram em um decréscimo na taxa de conversão e a presença dos heteroátomos, O e Cl, em um aumento significativo da conversão da reação.

Para avaliar a influência da quiralidade, um 2-bromo éster derivado do (*R*)-1-feniletanol foi sintetizado e a RCE dessa mistura epimérica resultou na inversão da enantiopreferência da lipase CAL-B apresentando um valor de $E=3(R)$. Adicionalmente o uso do (*R*)-1-feniletanol como nucleófilo também resultou na inversão da enantiopreferência enzimática frente a porção acila dos 2-bromo butanoatos. Os efeitos de inversão observados são inéditos para a lipase CAL-B, e nos permitiram modificar de forma simples a enantiosseletividade das reações enzimáticas através de alterações na estrutura dos substratos/nucleófilos.



Palavras-chave: CAL-B, engenharia do substrato, inversão da enantiopreferência, 2-bromo butanoatos.

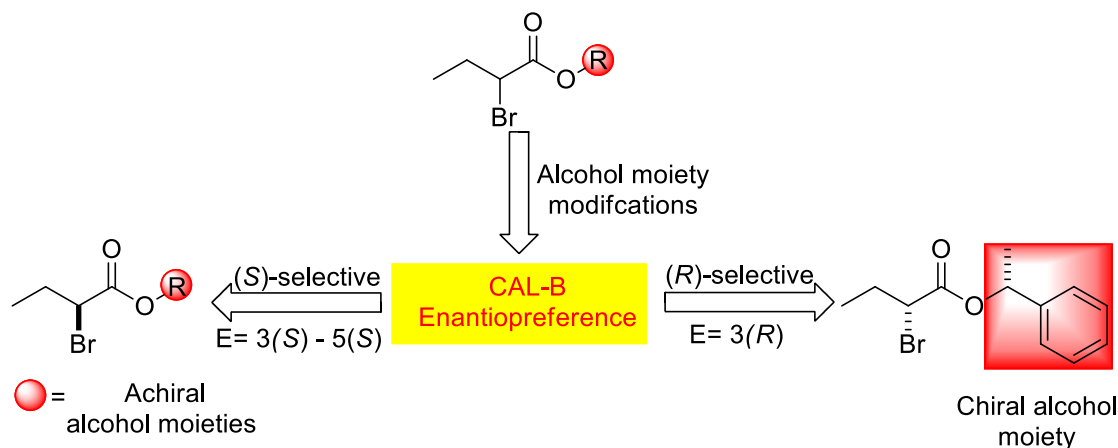
ABSTRACT

Lipases has been successfully employed in the obtainment of enantiomeric pure compounds, especially chiral alcohols and amines, however the enantioselectivity of these biocatalysts in front of chiral carboxylic acids or derivatives was usually low requiring optimization studies.

The present work aimed the enzymatic kinetic resolution (EKR) of 2-bromo butyric esters, using lipase-mediated transesterification. Among the commercial lipases tested, only the lipases from *Candida antarctica* B (CAL-B) and *Thermomyces lanuginosus* (TLIM) catalyzed the reaction with enantioselectivity, however the enantiomeric ratios (E) of these EKR were low: 3(S) for CAL-B and 3(R) for TLIM. CAL-B was chosen to study the optimization of enzymatic resolution through changes on nucleophile structure and at the alcohol moiety of the 2-bromo butanoates, the substrate engineering approach. A series of 2-bromo esters was synthesized varying the hydrocarbon chain length, the presence of branches, insaturations, heteroatoms and chirality.

The proposed modifications on alcohol moiety resulted in a slightly improvement of reaction enantioselectivity, the EKR of *iso*-butyl 2-bromo butanoate gives a $E=5(R)$. We also could note the influence of alcohol moiety over the reaction conversion rate, the increasing of hydrocarbon chain length and the presence of branches resulted in a decrease of conversion rate, on the other hand the presence of electron withdrawing atoms O and Cl increased the rate of conversion.

To study the influence of a chiral alcohol moiety over the CAL-B acyl enantioselectivity, a (*R*)-1-Phenylethyl 2-bromo ester was synthesized and the epimeric mixture submitted to EKR and surprisingly an enantiopreference inversion was observed ($E=3(R)$). To expand this effect, the use of (*R*)-1-Phenylethanol as nucleophile was tested and again the inversion was observed. These inversion effects from CAL-B mediated resolutions were inédits, and allowed the switching of enantiopreference through the simple manipulation of substrate/nucleophile structure.



Keywords: CAL-B, substrate engineering, enantiopreference inversion, double enantioselection, 2-bromoesters.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fármacos derivados de uma unidade 2-bromo alquílica (destacada em vermelho).....	17
Figura 2 – Diagrama de energia de uma resolução cinética enzimática (A e B são enantiômeros). Adaptado de Faber. ²³	21
Figura 3 - Representação do padrão de enovelamento α/β . As fitas β estão representadas como setas azuis as α hélices como bastões amarelos. Em destaque os resíduos constituintes da tríade catalítica. Adaptado de Jaegger. ²⁹	22
Figura 4 – Enantiômero que reagirá mais rápido de acordo com a Regra de Kazlauskas.	23
Figura 5 – Complexos covalentes formados entre a lipase e derivados do mentol. A presença de uma ligação de hidrogênio adicional no complexo (<i>R</i>) explica a maior velocidade de reação deste enantiômero. Adaptado de Cygler. ³⁰	24
Figura 6 – Modelo proposto por Ahmed para explicar a enantiosseletividade da CRL frente à ácidos carboxílicos quirais.	26
Figura 7 – Intermediário tetraédrico I estabilizado pela presença de uma ligação de hidrogênio adicional. Adaptado de Tsai ⁶⁰	31
Figura 8 - Produtos derivados do ácido 2-bromo butírico (12).....	34
Figura 9 – A) Cromatograma do éster (19), (<i>R</i>) enriquecido. B) Cromatograma do éster (19), (<i>S</i>) enriquecido.	39
Figura 10 - Cromatogramas do substrato 19 (<i>R</i>) enantioenriquecido pela reação de transesterificação empregando a lipase CAL-B (em vermelho) e (<i>S</i>) enantioenriquecido empregando a lipase TLIM (em preto).	40
Figura 11 – Excessos enantioméricos do substrato e produto no decorrer da reação de transesterificação enzimática entre o éster 19 e <i>n</i> -propanol.	42
Figura 12 – RCE do éster (19), empregando (A) 10 equivalentes, (B) 20 equivalentes, (C) 30 equivalentes e (D) 40 equivalentes de <i>n</i> -propanol.	43
Figura 13 – Ligação de hidrogênio intramolecular auxiliando na catálise enzimática.	44
Figura 14 - Intermediário tetraédrico formado na aminólise do éster 2-metóxi acetato de etila catalisado por uma serina hidrolase. Adaptado de Cammenberg et al. ⁷⁶	48
Figura 15 - Comparação dos intermediários tetraédricos dos compostos 22 e 25 , evidenciando a ligação de hidrogênio adicional devido a presença do heteroátomo no composto 25	49
Figura 16 - Cromatograma do éster 19 (<i>S</i>) enriquecido pela transesterificação enzimática do éster 26 (em vermelho), e (<i>R</i>)-enriquecido pela transesterificação enzimático do éster 27 (em preto).	50
Figura 17 – Intermediários tetraédricos envolvidos no efeito de inversão.....	54
Figura 18 - Proposta do perfil energético da reação de transesterificação usando o (<i>R</i>)-1-feniletanol (31) como nucleófilo.	55
Figura 19 – Cromatogramas do éster 27 com a porção acila (<i>S</i>)-enriquecida proveniente da síntese química (linha preta) e (<i>R</i>)-enriquecida proveniente da síntese enzimática. ...	57

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Exemplo de reações de substituição nucleofílica na posição 2. Adaptado de Tang ¹³	18
Esquema 2 - Reação de Hell-Volhard-Zelinski.....	18
Esquema 3 – Síntese de ácidos 2-bromo alquílicos usando <i>N</i> -bromosuccinimida.	18
Esquema 4 - Síntese de ácidos 2-bromo alquílicos a partir de aminoácidos.....	19
Esquema 5 - Síntese assimétrica de α -bromo ésteres.	19
Esquema 6 - Desracemização de alfa-bromo ácidos usando um auxiliar quiral.	20
Esquema 7 – Mecanismo geral de uma reação enzimática.....	20
Esquema 8 – Mecanismo geral de transformação de um substrato mediada por lipases. Adaptado de Faber. ²³	23
Esquema 9 - Estratégias de resolução cinética enzimática de ácidos carboxílicos e derivados empregando lipases.	26
Esquema 10 – a) Resolução “ <i>quasi-irreversível</i> ” empregando um éster derivado de um álcool pouco nucleofílico. b) resolução irreversível empregando um éster vinílico.	27
Esquema 11 – Mutantes da CAL-B com enantiopreferência inversa e enantiosseletividade melhor que a lipase selvagem (<i>WT</i>). Adaptado de Wu. ⁵²	28
Esquema 12 – Mecanismo de transformação de um derivado de ácido carboxílico mediado por lipases.	30
Esquema 13 - Aumento da enantiosseletividade da reação enzimática através da alteração da porção alcóolica. Adaptado de Yang ⁴⁶	32
Esquema 14 - Análise retrosintética do fármaco levetiracetam (4).....	33
Esquema 15 - Síntese dos substratos derivados do ácido 2-bromobutírico (1).	36
Esquema 16 – Síntese dos ésteres 27-30	37
Esquema 17 – Obtenção dos álcoois 31-34 através da resolução cinética enzimática (RCE) empregando a lipase CAL-B.	38
Esquema 18 – Obtenção dos racematos 31-34	38
Esquema 19 – Transesterificação enzimática de um éster derivado do 2-cloroetanol.....	47
Esquema 20 - Reação de transesterificação enzimática dos epímeros do éster 2-bromo butanoato de (<i>R</i>)-1-feniletila (27), empregando etanol como nucleófilo.....	50
Esquema 21 - Mecanismo geral de transesterificação enzimática, evidenciando a primeira etapa (etapa de acilação) como a determinante para a enantiopreferência enzimática. ..	51
Esquema 22 - Mecanismo geral de transesterificação enzimática, evidenciando a segunda etapa (etapa de deacilação) como a determinante para a enantiopreferência enzimática.	54
Esquema 23 – Síntese dos ésteres 18-26	63
Esquema 24 – Esquema geral da síntese dos ésteres 27-30	66
Esquema 25 – Síntese dos racematos 31-33	67
Esquema 26 – Síntese do 1-fenilpropanol (32)	68
Esquema 27 – Resolução cinética enzimática dos álcoois 31-33	69
Esquema 28 – Hidrólise dos acetatos (<i>R</i>)- 31a-33^a	70
Esquema 29 – RCE em fluxo do álcool 34 , seguida de hidrólise do acetato (<i>R</i>)- 34a	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Influência do solvente na enantiosseletividade das RCE de álcoois secundários. ⁵⁷	30
Tabela 2 – Influência do nucleófilo na razão enantiomérica da RCE do ibuprofeno.....	32
Tabela 3 - Triagem enzimática da reação de transesterificação do éster 19.	40
Tabela 4 – Efeito da estrutura do nucleófilo sobre a enantiosseletividade da RCE do éster 19.	41
Tabela 5 – Efeito da concentração do nucleófilo sobre a RCE do éster 19.....	42
Tabela 6 – Efeito da estrutura do nucleófilo sobre a enantiosseletividade da RCE do éster 19.	43
Tabela 7 – Efeito da engenharia do substrato na RCE dos 2-bromoésteres 18-27	46
Tabela 8 – Efeito do uso de nucleófilos quirais na RCE de 2-bromoésteres.....	52
Tabela 9 – Substratos e nucleófilos envolvidos em resoluções cinéticas duplas (RCD) empregando CAL-B.....	56
Tabela 10 - Efeito do solvente sobre a enantiosseletividade da RCE.	58
Tabela 11 - Tempo de retenção dos 2-bromoésteres 16-28	72
Tabela 12 - Tempo de retenção dos álcoois 28-31	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-Pent	3-Pentila
ΔG	Energia livre de Gibbs
$[\alpha]_D$	Rotação ótica específica
δ	Deslocamento químico
Asp	Aspartato
Bu	Butila
C	Conversão
CAL-B	Lipase de <i>Candida antarctica</i>
CRL	Lipase de <i>Candida rugosa</i>
D	Dupleto
DCC	di-Ciclohexilcarbodiimida
Dd	Duplo dupleto
DMAP	4-dimetil-Aminopiridina
E	Razão enantiomérica
<i>e.d.</i>	Excesso diastereoisomérico
<i>e.e.</i>	Excesso enantiomérico
Et	Etila
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Glut	Glutamato
H	Hora
His	Histidina
HVZ	Hell-Volhard-Zelinsky
<i>iso</i> -Bu	<i>iso</i> -Butila
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
Leu	Leucina
Ln	Logaritmo natural
Log	Logaritmo
M	Multiplete
Me	Metila
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimida
<i>n</i> -Prop	<i>n</i> -Propila

Ph	Fenila
PPL	Lipase de pâncreas de porco
Q	Quarteto
RCE	Resolução cinética enzimática
RMN	Ressonância magnética nuclear
S	Simpleto
SAC	<i>Substrate-assisted catalysis</i>
Ser	Serina
T	Tripleto
THF	Tetraidrofurano
TLIM	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Quiralidade molecular.....	16
1.2	Ácidos 2-bromo alquílicos: blocos de construção quirais versáteis.....	17
1.3	Enzimas como agentes de resolução de racematos.....	20
1.4	Lipases: mecanismo de ação.....	21
1.4.1	Mecanismo de enantiodiferenciação por lipases.....	23
1.4.2	Lipases na resolução de ácidos carboxílicos quirais.....	26
1.5	Estratégias de otimização de reações catalisadas por lipases visando maior enantiosseletividade.....	27
1.5.1	Biocatalisador: seleção e otimização.....	28
1.5.2	“Engenharia” do meio reacional.....	28
1.5.3	Engenharia do substrato e do nucleófilo.....	30
1.6	Lipases na resolução de ácidos 2-bromo alquílicos.....	33
2	OBJETIVOS.....	35
2.1	Objetivo geral.....	35
2.2	Objetivos específicos.....	35
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
3.1	Síntese dos ésteres 2-bromo butíricos 18-30	36
3.2	Determinação da enantiopreferência enzimática da lipase CAL-B e da ordem de eluição dos picos cromatográficos.....	39
3.3	Triagem enzimática frente à reação de transesterificação.....	40
3.4	Estudo da influência do nucleófilo sobre a reação de transesterificação.....	41
3.5	Estudo da influência da estrutura do substrato sobre a enantiosseletividade.....	45
3.6	Uso de nucleófilos quirais na RCE de 2-bromo ésteres.....	51
3.7	Inversão da enantiopreferência enzimática: um efeito químico ou enzimático?.....	57
3.8	Efeito do solvente na enantiosseletividade da reação enzimática.....	58
4	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	60
5	PARTE EXPERIMENTAL.....	62
5.1	Considerações gerais.....	62

5.2	Procedimento experimental	63
5.2.1	Síntese e caracterização dos ésteres racêmicos	63
5.2.2	Resolução cromatográfica dos 2-bromo ésteres 18-30.....	72
5.2.3	Resolução cromatográfica dos álcoois benzílicos secundários 31-34.....	73
5.2.4	Determinação da enantiopreferência enzimática	74
6	REFERÊNCIAS	75
	APÊNDICE A: ESPECTROS SELECIONADOS	i
	APÊNDICE B: CROMATOGRAMAS.....	xxxix

1 INTRODUÇÃO

1.1 Quiralidade molecular

Segundo o Goldbook da IUPAC¹, quiralidade é “a propriedade geométrica de um objeto rígido (ou a disposição espacial de pontos ou átomos) em não ser sobreponível à sua imagem especular”.

A quiralidade de uma molécula pode estar relacionada à uma série de características estruturais, tais como: presença de um carbono sp^3 substituído com quatro grupos diferentes, alenos com substituintes diferentes nos carbonos sp^2 , restrição de rotação de ligação entre anéis aromáticos, dentre outras.²

Como consequência, moléculas quirais que possuem isomeria espacial e, que não são sobreponíveis às suas imagens especulares, são chamadas de enantiômeros. Em ambientes aquirais, a maioria dos pares de enantiômeros possui as mesmas propriedades físico-químicas, mas, em ambientes quirais (reagentes e catalisadores quirais, receptores biológicos) se comportam de maneira distinta. Outra característica de moléculas quirais é a capacidade de desviar a luz plano-polarizada. Enantiômeros, por exemplo, podem ser diferenciados através do sentido do desvio ótico, uma vez que individualmente desviam a luz em sentidos opostos, mas com a mesma magnitude de desvio.³

A natureza fornece inúmeros exemplos de moléculas quirais, como é o caso de feromônios, substâncias de defesa, hormônios e neurotransmissores, sendo que essas substâncias são biossintetizadas pelos organismos apenas em uma forma enantiomérica. Essa alta especificidade é decorrência da composição das macromoléculas biológicas envolvidas na biossíntese, compostas exclusivamente por monômeros em uma forma enantiomérica: (*L*)-aminoácidos em proteínas, e (*D*)-açúcares em carboidratos e ácidos nucleicos.⁴

A inerente quiralidade presente na natureza resulta na capacidade de diferenciação de enantiômeros pelos receptores biológicos. Essa descoberta data de 1886 quando o químico italiano Arnaldo Piutti observou que o aminoácido (*L*)-asparagina não tinha sabor enquanto o aminoácido (*D*)-asparagina era adocicado.⁵ O reconhecimento biológico não se restringe somente as propriedades organolépticas de moléculas quirais, e se dá também na interação entre fármaco-receptor podendo influenciar no mecanismo de ação e na metabolização de substâncias exógenas.⁶

A partir de 1992, uma portaria do órgão americano FDA (*Food and Drug Administration*) passou a exigir um estudo minucioso dos efeitos de cada enantiômero de fármacos quirais uma vez que eles podem apresentar a mesma atividade (e.g. ambos enantiômeros apresentam atividade anti-inflamatória), atividades biológicas distintas (e.g.

L-propranolol é um bloqueador β , enquanto o *D*-propranolol não apresenta atividade), efeitos colaterais (e.g. (*R*)-Dopa está associado à alterações sanguíneas, enquanto o (*L*)-Dopa é usado no tratamento de Parkinson).⁷ Os enantiômeros de um fármaco também podem apresentar perfis farmacocinéticos diferentes, o que justifica a administração em apenas uma das formas, como é o caso do albuterol, um bronco dilatador administrado em sua forma (*R*).⁸

Como consequência houve um aumento no interesse das indústrias farmacêuticas em sintetizar moléculas enantiopuras.⁹⁻¹¹ Dentre os compostos quirais, ácidos carboxílicos contendo um átomo de bromo na posição 2 se destacam como precursores de compostos que apresentam atividade biológica (Figura 1). O ácido 2-bromo butírico (**1**), por exemplo, é precursor do levetiracetam (**2**) usado no tratamento de epilepsia e do composto (*R*)-(**3**) usado no tratamento da diabetes *melittus* tipo 2.¹²

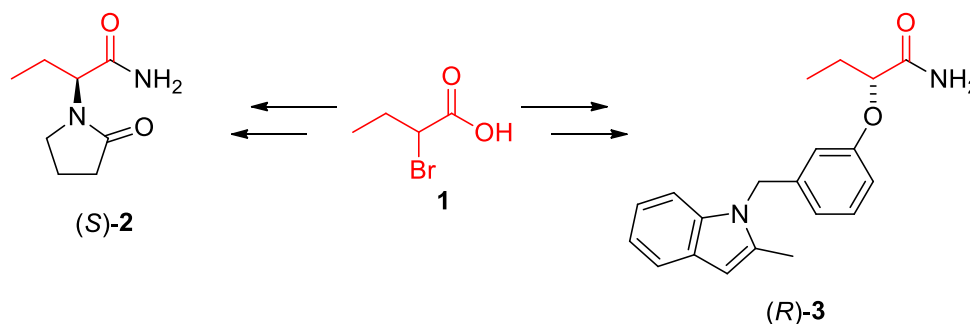
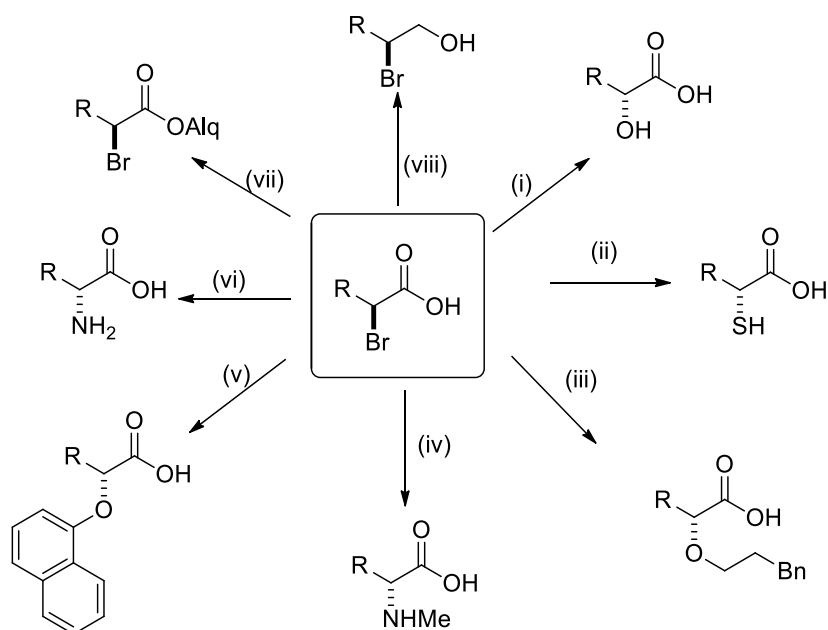


Figura 1 – Fármacos derivados de uma unidade 2-bromo alquílica (destacada em vermelho).

1.2 Ácidos 2-bromo alquílicos: blocos de construção quirais versáteis

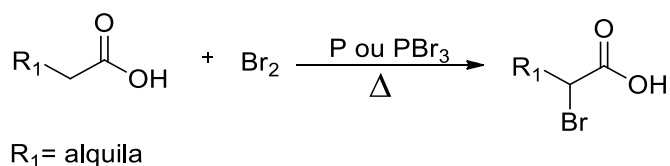
Ácidos 2-bromoalquílicos são blocos de construção versáteis devido à suscetibilidade do carbono ligado ao bromo (carbono α ou posição 2) sofrer ataque nucleofílico (Esquema 1). Com exceção do ácido bromo acético, todos os outros ácidos monobromados dessa classe possuem um centro de quiralidade na posição 2. A derivatização da posição 2 ocorre através de reações de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) do átomo de bromo, o que implica na inversão da estereoquímica do carbono 2, o que torna a obtenção desses blocos de construção enantiomericamente puros vantajosa. Além da posição 2, o grupo carboxila também pode ser transformado sem perda do excesso enantiomérico em éster ou álcool, aumentando a versatilidade desse bloco sintético.



Esquema 1 – Exemplo de reações de substituição nucleofílica na posição 2. Adaptado de Tang¹³

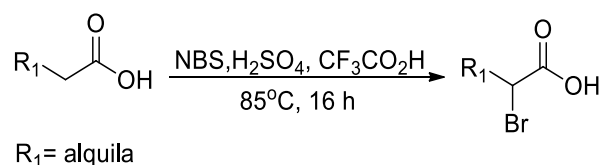
Condições e reagentes: (i) KOH diluído (aq.), (ii) Tiobenzoato de céσιο em DMF seguido de hidrólise do benzoato; (iii) NaH, THF, BnOCH₂CH₂OH ou NaH, DMF, BnOCH₂CH₂OH, (iv) PbOH, MeNH₂, H₂O, (v) 1- naftol, NaOH, H₂O, EtOH; (vi) NH₃ em H₂O; (vii) H₂SO₄, álcool, refluxo; (viii) LiAlH₄ em éter etílico.

No que diz respeito às abordagens sintéticas para obtenção de ácidos 2-bromo alquílicos, Hell, Volhard e Zelinsky desenvolveram, durante a década de 1880, uma metodologia que envolve a reação entre ácidos carboxílicos e bromo molecular na presença de quantidades catalíticas de fósforo ou tribrometo de fósforo (Esquema 2). Essa reação é conhecida como a reação de Hell-Volhard-Zelinski (HVZ).¹⁴



Esquema 2 - Reação de Hell-Volhard-Zelinski.

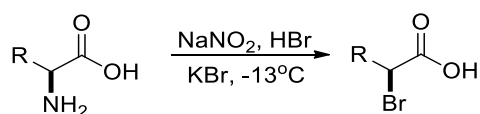
Em 1998, Zhang e colaboradores,¹⁵ desenvolveram uma nova metodologia para a síntese de ácidos 2-bromo alquílicos a partir da reação entre um ácido carboxílico e *N*-bromosuccinimida (NBS), obtendo rendimentos que variaram de 82% a 89% (Esquema 3).



Esquema 3 – Síntese de ácidos 2-bromo alquílicos usando *N*-bromosuccinimida.

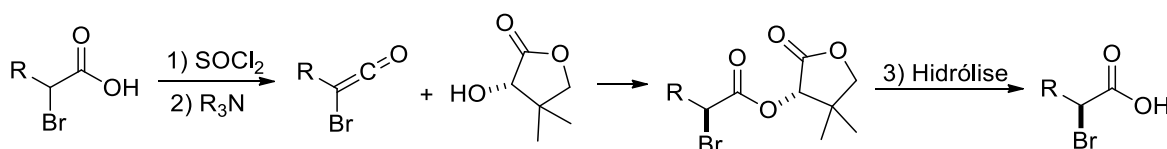
Ambas as metodologias levam a ácidos 2-bromados em sua forma racêmica o que limita o uso em aplicações em que existe o interesse na forma enantiopura destes compostos.

Como alternativa para a obtenção desses blocos enantiomericamente puros, se pode usar um “*chiral pool*”, através da síntese a partir de aminoácidos naturais em sua forma levógira (Esquema 4).¹⁶ A desvantagem dessa estratégia é o número restrito de aminoácidos, ou seja a diversidade estrutural é limitada e se pode obter apenas um dos enantiômeros diretamente, uma vez que os aminoácidos são encontrados naturalmente em apenas uma forma enantiomérica.



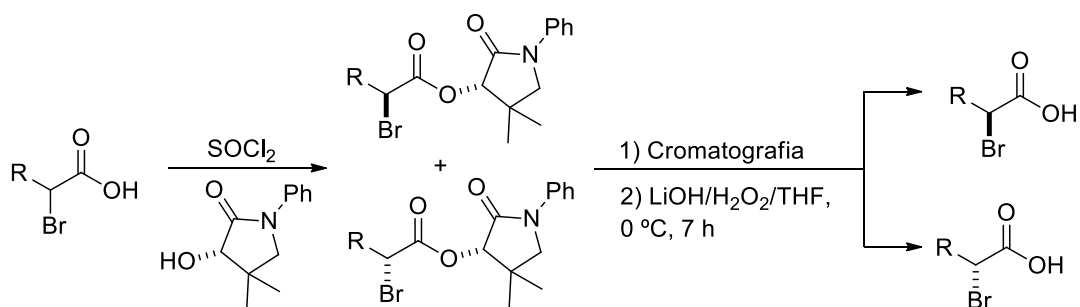
Esquema 4 - Síntese de ácidos 2-bromo alquílicos a partir de aminoácidos.

A síntese assimétrica de 2-bromo ésteres parte de haletos de acila de alfa-bromo ácidos que, na presença de aminas terciárias, geram cetenas alfa-bromadas pró-quirais que reagem com um álcool enantiomericamente puro gerando α -bromo ésteres com excessos diastereoisoméricos variando entre 75% e 91%. A posterior hidrólise desses ésteres fornece 2-bromoácidos enantioenriquecidos (Esquema 5).¹⁷



Esquema 5 - Síntese assimétrica de α -bromo ésteres.

Outra estratégia para obtenção de 2-bromoácidos opticamente ativos através de rotas químicas é a resolução desses compostos usando auxiliares quirais, através da formação de diastereoisômeros que podem ser separados por métodos físicos como a cromatografia, por exemplo, devido as diferentes propriedades físicas entre os dois ésteres formados. Um exemplo de resolução desses compostos é o trabalho de Boschi e colaboradores,¹⁸ que propuseram a desracemização do ácido 2-bromo butírico usando a (S)-*N*-fenilpantolactama como auxiliar quiral, obtendo os respectivos ácidos carboxílicos com excessos enantioméricos superiores a 99% (Esquema 6).



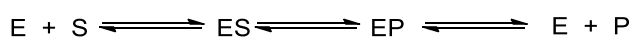
Esquema 6 - Desracemização de alfa-bromo ácidos usando um auxiliar quiral.

Além das rotas químicas, a biocatálise surge como uma opção para a obtenção de produtos químicos finos através de processos mediados por enzimas apresentando diversas vantagens, tais como condições brandas de reação e alta estereosseletividade.^{19,20}

1.3 Enzimas como agentes de resolução de racematos

Enzimas são macromoléculas compostas por *L*-aminoácidos ligados através de ligações peptídicas em sequência definida e possuem a função de catalisar as reações que ocorrem a nível biológico.²¹ O arranjo molecular espacial destas macromoléculas é definido através de interações covalentes (ponte de dissulfeto), não-covalentes (interações hidrofóbicas, van der Waals e ligação de hidrogênio) e eletrostáticas entre os resíduos de aminoácidos.

O mecanismo de catálise enzimática envolve a formação de um complexo enzima-substrato em uma região conhecida como sítio ativo, onde resíduos de aminoácidos induzem o ajuste do substrato, favorecendo a formação do complexo e diminuindo a energia de ativação da reação catalisada. Uma vez formado o complexo enzima-substrato (**ES**), a reação procede através da formação de um segundo complexo, o enzima-produto (**EP**), que após ser clivado, libera a enzima (**E**) e o produto (**P**) da transformação (Esquema 7).²²



Esquema 7 – Mecanismo geral de uma reação enzimática.

Devido à identidade quiral da enzima, decorrente da composição exclusiva por aminoácidos em suas formas levóginas, os enantiômeros de um racemato formam complexos enzima-substrato (**ES**) diastereoisoméricos, e portanto, com energias de ativação diferentes, o que pode levar à uma diferença na velocidade de formação dos

produtos. (Figura 2). Esse fenômeno é conhecido como resolução cinética enzimática (RCE).²³

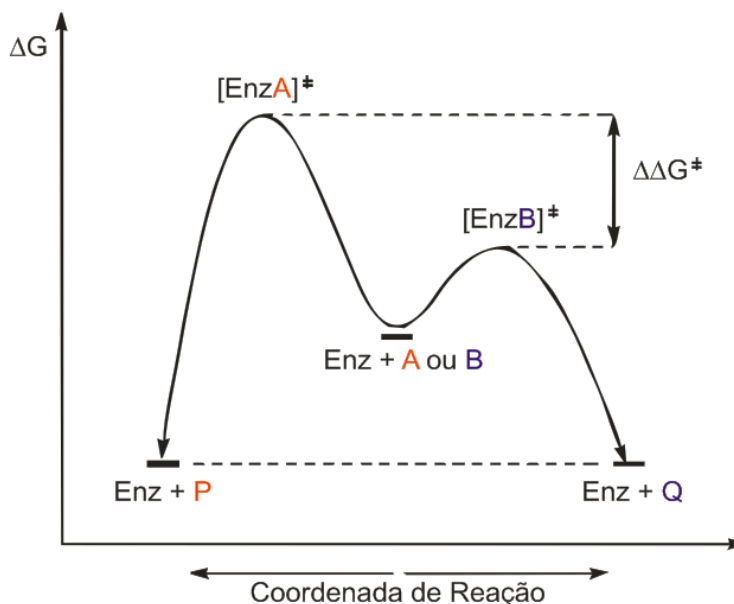


Figura 2 – Diagrama de energia de uma resolução cinética enzimática (A e B são enantiômeros). Adaptado de Faber.²³

A descoberta de que enzimas podem manter sua atividade em solventes orgânicos²⁴ e que catalisam reações com substratos não-naturais, aliadas a capacidade de reconhecer/discriminar a quiralidade desses substratos, tornou o emprego da catálise enzimática uma ferramenta importante na resolução de racematos. Dentre as enzimas mais estudadas se encontram as lipases.

1.4 Lipases: mecanismo de ação

As lipases pertencem à grande classe das hidrolases e são encontradas em animais, plantas, fungos e bactérias.²³ Estas enzimas possuem a função natural de hidrolisar acilglicerídeos de cadeia longa e também podem catalisar a reação de esterificação de ácidos graxos livres de acordo com a quantidade de água presente no meio.²⁵ Por atuarem especificamente na porção carboxílica dos substratos, também são conhecidas como carboxil-esterases.

A grande utilização de lipases em síntese orgânica se deve a fatores como a alta quimio, enantio e regiosseletividade, a possibilidade de trabalhar em diferentes faixas de pH, estabilidade em solventes orgânicos, aceitação de uma grande variedade de substratos e ausência de coenzimas e cofatores.²⁶

Estruturalmente as lipases são caracterizadas pela presença de uma estrutura secundária em seu interior com um padrão de enovelamento α/β (o “ α/β hydrolase fold”).²⁷

Essa estrutura é composta por 8 fitas β conectadas por α -hélices onde os resíduos responsáveis pela catálise enzimática encontram-se dispostos linearmente na sequência serina-aspartato/glutamato-histidina (Figura 3).²⁸

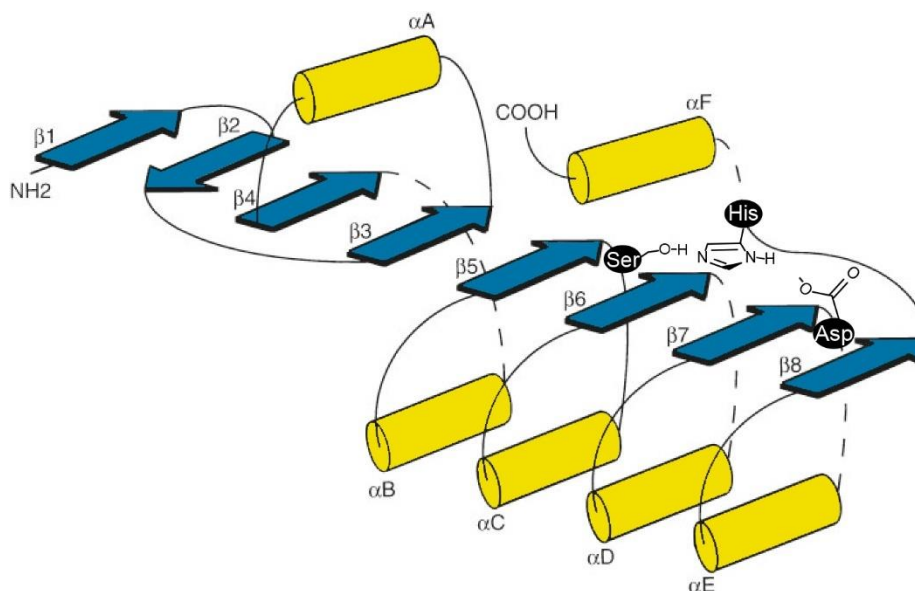
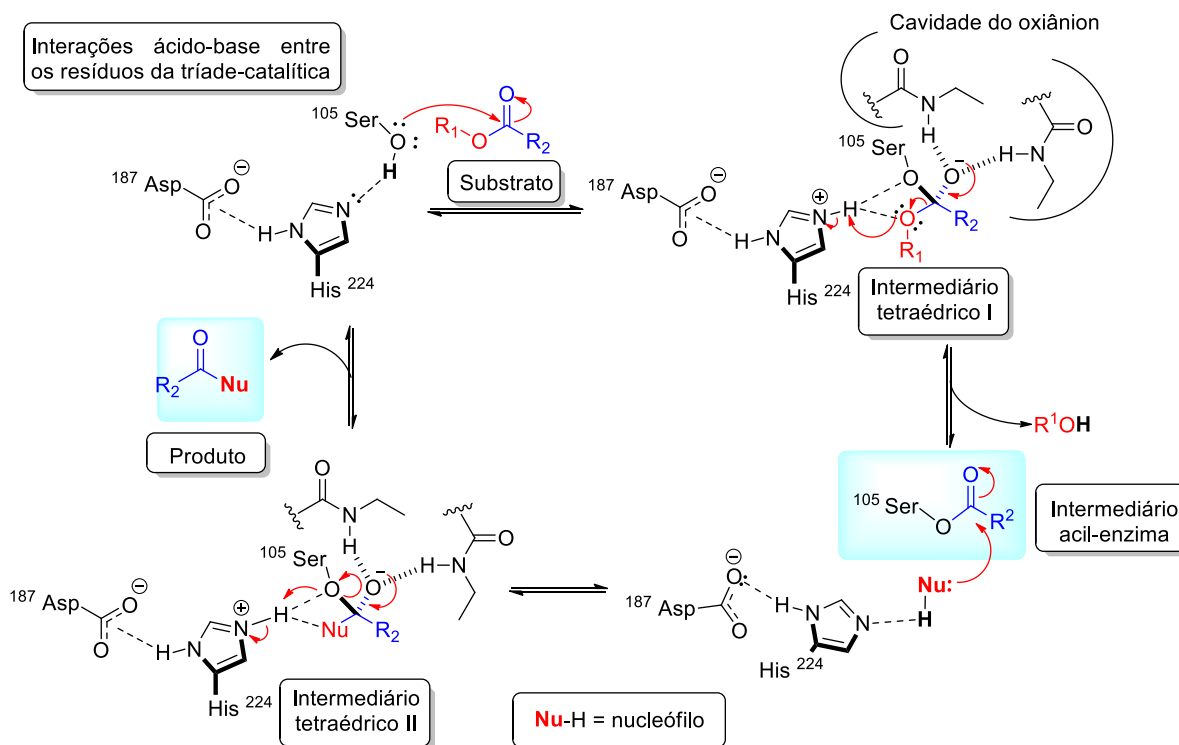


Figura 3 - Representação do padrão de enovelamento α/β . As fitas β estão representadas como setas azuis as α hélices como bastões amarelos. Em destaque os resíduos constituintes da tríade catalítica. Adaptado de Jaegger.²⁹

A disposição dos resíduos que compõem a tríade catalítica no sítio ativo permite interações ácido-base que resultam na ativação do resíduo nucleofílico de serina. A interação ácido-base entre o resíduo ácido (Aspartato/Glutamato) e o hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio do anel imidazólico resulta no aumento da basicidade do nitrogênio que por sua vez abstrai o hidrogênio ligado ao oxigênio do resíduo de serina, aumentando sua nucleofilicidade. O resíduo de serina “ativado” ataca a carbonila do substrato dando origem a um intermediário tetraédrico que tem a carga negativa estabilizada por ligações de hidrogênio com resíduos NH em uma região da enzima conhecida como “cavidade do oxiânion”. A quebra desse intermediário dá origem ao complexo covalente acil-enzima que pode ser atacado por um nucleófilo presente no meio. Esse ataque nucleofílico, também auxiliado pelo resíduo catalítico de histidina, gera um segundo intermediário tetraédrico que após sua quebra regenera o resíduo de serina e libera o produto da transformação enzimática (Esquema 8).^{23,29}



Esquema 8 – Mecanismo geral de transformação de um substrato mediada por lipases. Adaptado de Faber.²³

1.4.1 Mecanismo de enantiodiferenciação por lipases

Como discutido no tópico 1.3 a origem da discriminação enantiomérica enzimática reside na formação de complexos diastereoisoméricos enzima-substrato devido à identidade quiral do biocatalisador, mais especificamente das características estruturais do sítio ativo.³⁰

Com o crescimento do uso de lipases em síntese orgânica, foi possível a proposição de modelos que pudessem prever a enantiosseletividade das reações biocatalisadas. O modelo mais famoso ficou conhecido como a “Regra de Kazlauskas”³¹, que embora sendo empírico conseguiu racionalizar a enantiopreferência enzimática para álcoois secundários e mais tarde sendo ampliado para aminas secundárias.³² A Regra de Kazlauskas permite prever qual dos enantiômeros reagirá mais rápido de acordo com o tamanho dos grupos que compõe o centro de quiralidade, segundo ela quão mais distintos forem os volumes desses grupos maior será a enantiosseletividade da reação (Figura 4).

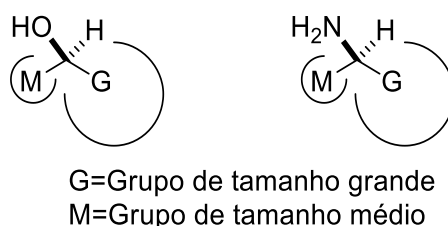


Figura 4 – Enantiômero que reagirá mais rápido de acordo com a Regra de Kazlauskas.

Embora extremamente útil para o planejamento de substratos que podem ser resolvidos com enantiosseletividade aceitável, o modelo proposto por Kazlauskas não explica a origem da enantiodiferenciação enzimática. Com o avanço da cristalografia, a estrutura terciária das lipases passou a ser conhecida, permitindo assim a análise racional da enantioespecificidade enzimática.^{30,33,34}

Cyglar *et al*³⁰ foram os primeiros a relacionar os aspectos estruturais do sítio ativo à preferência enzimática através da síntese de inibidores enzimáticos derivados do mentol (**4**). A cristalização da lipase de *Candida rugosa* (CRL) ligada covalente aos compostos (*R*)-**4** e (*S*)-**4** permitiu a observação tridimensional das interações entre os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo e o substrato. Os autores identificaram uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio do substrato e o átomo de hidrogênio ligado ao nitrogênio do resíduo de histidina, que estava presente apenas no enantiômero (*R*)-**4**, o que justificava a conversão mais lenta do enantiômero (*S*)-**4**. Os autores também descreveram uma torção no anel imidazólico do resíduo de histidina-449 atribuída a porção isopropila do enantiômero (*S*)-**4** que apontava para o anel imidazólico, em contraste, a porção isopropila do enantiômero **4**-(*R*) apontava na direção contrária do resíduo histidínico (Figura 5).

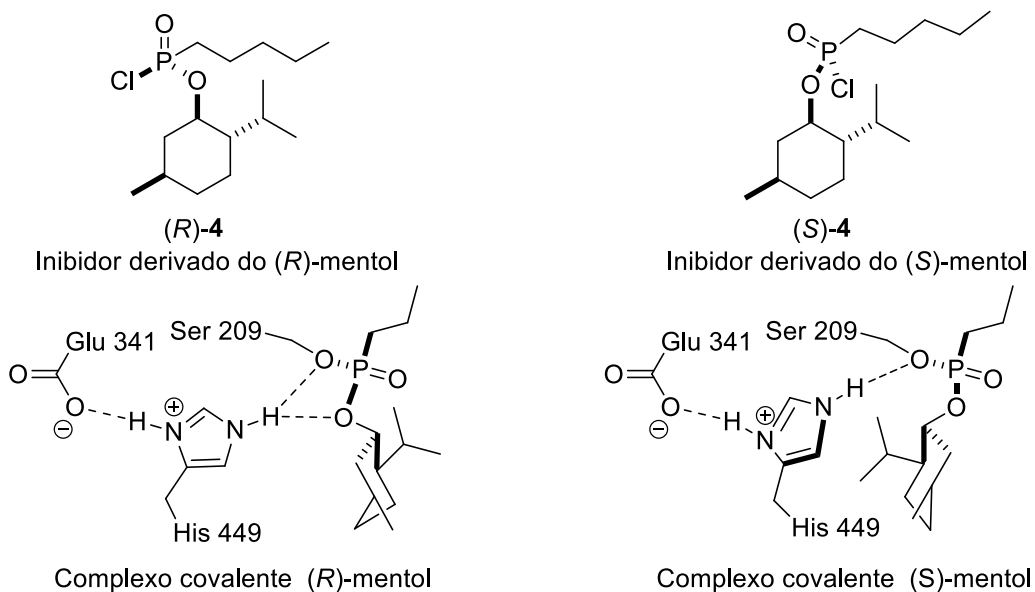


Figura 5 – Complexos covalentes formados entre a lipase e derivados do mentol. A presença de uma ligação de hidrogênio adicional no complexo (*R*) explica a maior velocidade de reação deste enantiômero. Adaptado de Cyglar.³⁰

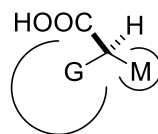
O conhecimento da estrutura terciária das lipases somada à modelagem molecular permite também entender os aspectos estruturais da enantiosseletividade enzimática sem a necessidade do desenvolvimento de inibidores quirais análogos ao substrato.^{35,36}

Uppenberg³⁴ de posse da estrutura cristalográfica da lipase de *Candida antarctica* B (CAL-B), conseguiu explicar a alta enantioespecificidade frente ao éster octanoato de 1-feniletila. Uppenberg mostrou que a presença de bolsões ou sítios hidrofóbicos responsáveis pela acomodação dos substituintes do centro assimétrico de acordo com o tamanho. Quando o substituinte metila do (S)-1-feniletanol se acomodava no sítio referente ao substituinte pequeno, o átomo de oxigênio do álcool se deslocava para fora da cavidade do oxianion e a ligação de hidrogênio com o resíduo catalítico de histidina era perdida, portanto o ajuste estérico levava à um “ajuste não produtivo”. No caso do enantiômero (R) a acomodação dos grupos ligados ao centro assimétrico nos respectivos bolsões resultava em um “ajuste produtivo”, uma vez que a ligação de hidrogênio entre o resíduo de histidina e o oxigênio do álcool era conservada. Uppenberg³⁴ também demonstrou que o enantiômero mais lento de um racemato, também pode possuir a ligação de hidrogênio com o resíduo catalítico de histidina, evidenciando que outros fatores estavam associados ao enantioconhecimento como o tamanho dos bolsões responsáveis pela acomodação dos substituintes.

No mesmo estudo, Uppenberg³⁴ demonstrou que o sítio ativo das lipases é dividido em um bolsão responsável pela acomodação da parte álcool do substrato, distinguido pela presença do resíduo de histidina catalítico (responsável pela doação do próton para o oxigênio do álcool abandonador), e em outro canal responsável pela acomodação da porção acila do substrato.

A origem da discriminação de enantiômeros contendo o centro assimétrico na porção acila, por sua vez não possui uma regra empírica aplicável ou um modelo que consiga explicar de forma geral as características estruturais do sítio ativo responsável pela discriminação.³⁷ A usual baixa enantiosseletividade das reações de resolução cinética enzimática de ácidos carboxílicos e derivados³⁸ pode ser uma das causas da falta de um número maior de estudos que tentem racionalizar de forma mais abrangente esse tópico.

Ahmed *et al.*³⁹ propuseram um modelo empírico baseado na regra de Kazlauskas e nos estudos de Cygler³⁰ relacionando o tamanho dos substituintes ligados ao estereocentro alfa carbonílico (posição 2) à enantiopreferência da lipase de *Candida rugosa* em reações de hidrólise. O modelo proposto não se ajustou a todos os substratos estudados, mas os autores também relataram a presença de regiões específicas para acomodação dos grupos de acordo com o volume dos mesmos (Figura 6).

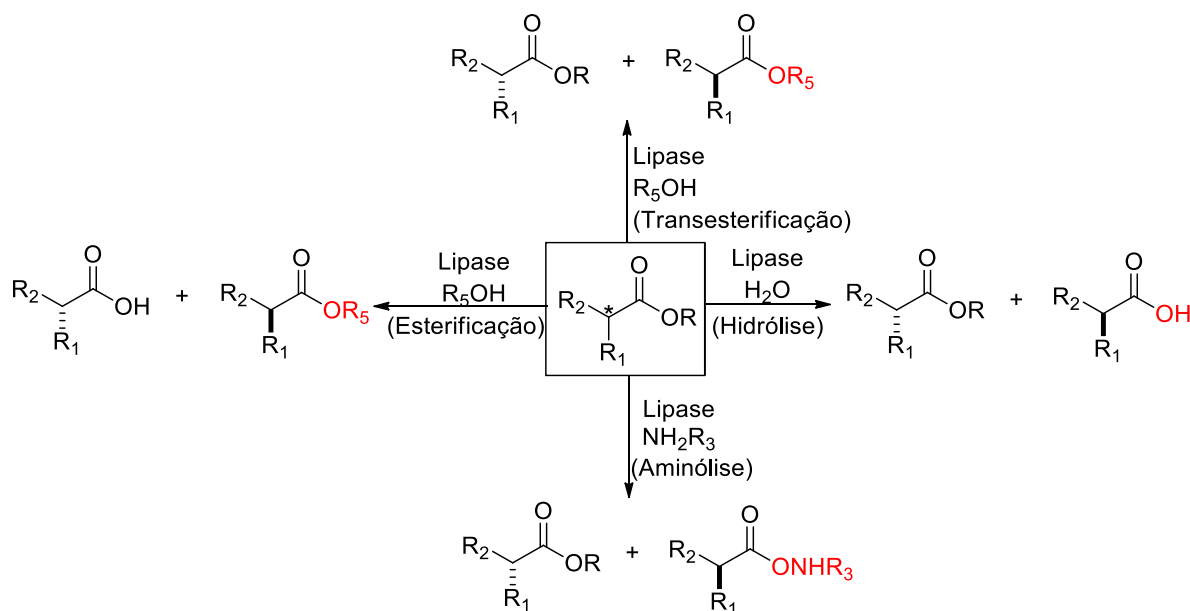


G=Grupo de tamanho grande
M=Grupo de tamanho médio

Figura 6 – Modelo proposto por Ahmed para explicar a enantiosseletividade da CRL frente à ácidos carboxílicos quirais.

1.4.2 Lipases na resolução de ácidos carboxílicos quirais

Lipases podem resolver racematos de ácidos carboxílicos e derivados através de diferentes estratégias, tais como: esterificação, transesterificação, hidrólise e aminólise (Esquema 9).⁴⁰



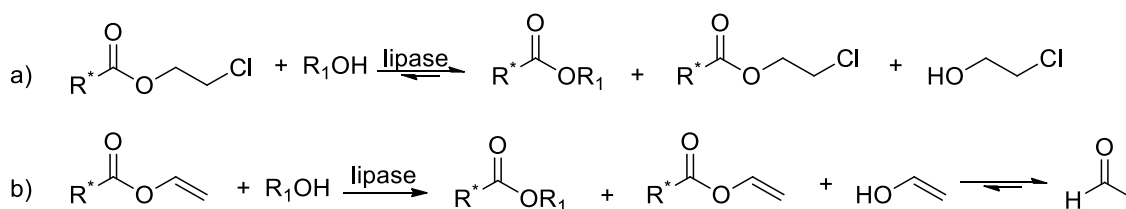
Esquema 9 - Estratégias de resolução cinética enzimática de ácidos carboxílicos e derivados empregando lipases.

A hidrólise de ésteres é o processo enzimático mais comum na resolução de ácidos carboxílicos quirais e tem como grande vantagem ser um processo irreversível já que a água é usada como nucleófilo e solvente em condições básicas.⁴¹

A esterificação catalisada por lipases em solvente orgânico é vantajosa pois economiza uma etapa sintética uma vez que as outras estratégias necessitam da conversão do ácido quiral ao éster correspondente.²⁴ Entretanto, a reversibilidade da reação é um ponto negativo. O uso de nucleófilo em excesso, ou de agentes secantes como peneiras moleculares e sais podem colaborar para a retirada da água formada durante a reação.²³

A reação de aminólise permite a obtenção de ésteres e amidas enantiomericamente enriquecidos, e, devido à estabilidade do grupamento amida formado, é um processo que pode ser considerado irreversível. Além disso, do ponto de vista químico, é uma alternativa branda para a síntese de amidas quirais.^{42,43}

A reação de transesterificação não é usualmente empregada na resolução de racematos de ésteres devido a reversibilidade do processo.⁴⁴ As estratégias encontradas para contornar esse problema são: a) o uso do nucleófilo em excesso; b) o uso de ésteres “ativados” (ésteres que liberam nucleófilos fracos, como ésteres de 2-halo-etila),²⁴ o que torna a reação “*quasi-irreversível*”; c) o uso de ésteres vinílicos que liberam álcoois vinílicos que tautomerizam rapidamente para a forma carbonilada tornando o processo irreversível (Esquema 10).⁴⁴⁻⁴⁶



Esquema 10 – a) Resolução “*quasi-irreversível*” empregando um éster derivado de um álcool pouco nucleofílico. b) resolução irreversível empregando um éster vinílico.

Se comparado à resolução de álcoois e aminas, existem menos exemplos de resolução de ácidos carboxílicos encontrados na literatura.^{23,38} Como discutido no tópico 1.4.1, isso se deve a usual baixa enantiosseletividade das reações de resolução envolvendo esses substratos. Faber²³ sugere que o reconhecimento da porção alcoólica é privilegiado uma vez que o substrato natural das lipases são acilgliceróis, onde a parte alcoólica, o glicerol, substrato próquiral, enquanto a parte acila é aquiral. Essa baixa enantiosseletividade da RCE de ácidos carboxílicos e derivados leva a necessidade de otimização das condições reacionais.

1.5 Estratégias de otimização de reações catalisadas por lipases visando maior enantiosseletividade

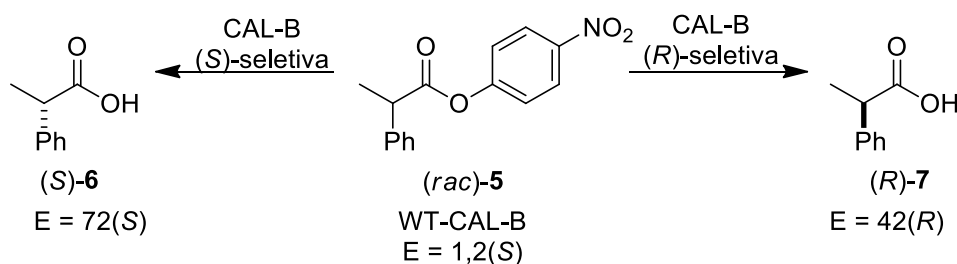
A enantiosseletividade do processo catalítico está atrelada a três componentes principais: o biocatalisador, o meio reacional e o substrato. Alterações nesses parâmetros podem resultar na melhora da enantiosseletividade da reação.^{47,48}

1.5.1 Biocatalisador: seleção e otimização.

Os avanços nas técnicas de cristalografia e raios-X⁴⁹ permitiram a determinação da estrutura terciária e do arranjo tridimensional do sítio catalítico de muitas enzimas, incluindo algumas lipases. O conhecimento dessas características permitiu o desenvolvimento de modelos que podem prever quais características estruturais o substrato deve possuir para que exista um bom reconhecimento por parte do biocatalisador.^{30,34,37,39}

O biocatalisador pode ser geneticamente modificado através de alterações na sequência primária de aminoácidos, o que reflete em mudanças na estrutura terciária da enzima. As mutações podem resultar em lipases termicamente mais tolerantes, além de permitir alterações racionais no sítio ativo enzimático que podem resultar em uma melhora da enantiosseletividade frente a um determinado substrato.^{50,51}

Wu *et al.*⁵² modificaram geneticamente a enzima CAL-B visando a hidrólise do 2-fenilpropanoato de *p*-nitrofenila (**5**), conseguindo um aumento na razão enantiomérica de $E = 1,2(S)$ para a lipase selvagem, para $72(S)$ ou revertendo a preferência enantiomérica apresentando um $E = 42(R)$ (Esquema 11).



Esquema 11 – Mutantes da CAL-B com enantiopreferência inversa e enantiosseletividade melhor que a lipase selvagem (*WT*). Adaptado de Wu.⁵²

1.5.2 “Engenharia” do meio reacional

1.5.2.1 Temperatura

Alterações na temperatura em que a reação enzimática ocorre podem afetar tanto a velocidade da reação como a enantiosseletividade do processo. O aumento na velocidade da reação através do aumento da temperatura pode ser explicado cineticamente através da equação de Arrhenius (Equação 1):

$$k = Ae^{-E_a/RT}$$

Equação 1 – Equação de Arrhenius

Segundo a equação de Arrhenius a constante de velocidade (k) de uma reação é diretamente proporcional à temperatura e os processos envolvendo enzimas também apresentam esse comportamento. No entanto, enzimas são catalisadores sensíveis à temperatura e a energia fornecida pode ser suficiente para a quebra de interações não-covalentes entre resíduos de aminoácidos, alterando a estrutura tridimensional da enzima e podendo causar a desnaturação enzimática.⁵³

A alteração na estrutura tridimensional da enzima não altera somente a velocidade da reação, tendo efeitos também sob o sítio catalítico o que pode alterar a enantiosseletividade do processo.⁵⁴ Sakai *et al.*⁵⁵ conseguiram aumentar a enantiosseletividade da reação de transesterificação enzimática do álcool 3-fenil-2H-azirina-2-metanol de $E = 17$ a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ para $E = 99$ a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

1.5.2.2 Influência do solvente

Outro parâmetro reacional que pode afetar a enantiosseletividade do processo é o solvente escolhido. O solvente deve solubilizar o composto empregado como substrato, mas pode interferir diretamente sobre a enzima, isso porque o uso de solventes orgânicos em reações enzimáticas é uma condição não-natural uma vez que enzimas, na natureza, catalisam processos em meios aquosos ou interfaces.⁵³

Laane *et al.*⁵⁶ relacionaram a polaridade do solvente orgânico, por meio do $\log P$ e a atividade enzimática. Nesse estudo os solventes orgânicos foram separados em três categorias: solventes polares ($\log P < 2$), moderadamente polares ($2 < \log P < 4$) e apolares ($\log P > 4$). Os pesquisadores chegaram à conclusão que quanto mais polar for o solvente orgânico, maior será a capacidade desse solvente em retirar a água de hidratação que permeia e estabiliza a estrutura enzimática, o que se reflete em uma menor atividade enzimática.

Além da alteração na atividade enzimática (velocidade da reação), o solvente também altera a rigidez conformacional da enzima, uma vez que interações eletrostáticas não-covalentes entre os resíduos de aminoácidos são fortemente dependentes da polaridade do meio reacional. Essa alteração se reflete em diferentes valores de enantiosseletividade de uma mesma reação enzimática em solventes diferentes.^{57,58} Fitzpatrick e Klibanov⁵⁷ investigaram a reação de transesterificação de uma série de álcoois secundários quirais homólogos em diferentes solventes orgânicos empregando a lipase de *Subtilisin Carlsberg*, e observaram que a reação em dioxano foi mais enantiosseletiva que em tetraidrofurano e acetonitrila (Tabela 1).

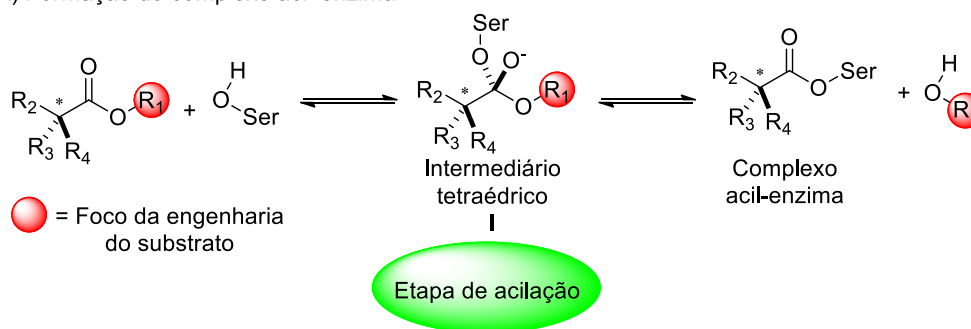
Tabela 1 – Influência do solvente na enantiosseletividade das RCE de álcoois secundários.⁵⁷

Álcool	Razão enantiomérica		
	Dioxano	Acetonitrila	Tetraidrofurano
1-Feniletanol	50	3,6	34
1-(2-Naftil)-etanol	58	20	56
2-octanol	100	14	80
2-butanol	3,9	1,2	3,2
2-Cloro-1-Feniletanol	6,8	2,1	5,6

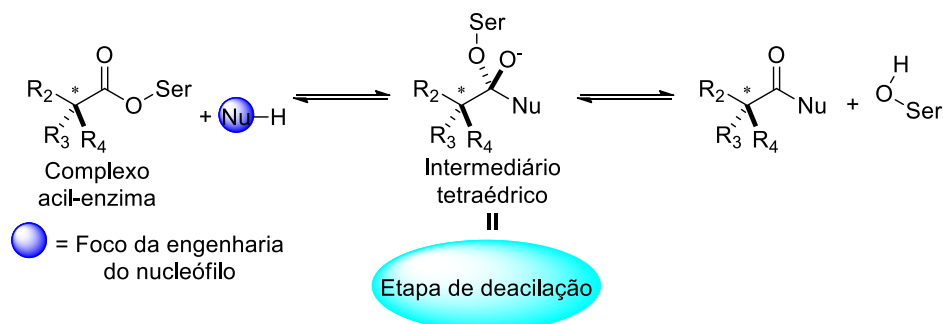
1.5.3 Engenharia do substrato e do nucleófilo

A transformação de ácidos carboxílicos ou derivados, mediada por lipases, ocorre através de um mecanismo de duas etapas (Esquema 12): a primeira etapa é conhecida como etapa de acilação, e é nela que o resíduo ativado de serina presente no sítio ativo ataca a carbonila do substrato gerando um primeiro intermediário tetraédrico. Após a deslocalização dos pares de elétrons há a formação do complexo acil-enzima. O complexo acil-enzima pode ser então atacado por um nucleófilo presente no meio reacional, gerando um segundo intermediário tetraédrico que após sua quebra fornece o produto, essa etapa é conhecida como etapa de deacilação.

A) Formação do complexo acil-enzima



B) Quebra do complexo acil-enzima



Esquema 12 – Mecanismo de transformação de um derivado de ácido carboxílico mediado por lipases.

A engenharia do substrato foca em alterações na porção alcoólica dos estéres quirais, interferindo na primeira etapa da reação (acilação) (Esquema 12, A). Alterações nesta porção podem resultar em diferenças no impedimento estérico durante o ataque à carbonila, e no aumento da reatividade (eletrofilicidade) do composto carboxilado através da inclusão de grupos retiradores de elétrons (ésteres ativados).²⁴

Além disso, levando em consideração que a primeira etapa envolve a ativação do resíduo de serina através de reações ácido-base envolvendo os resíduos de aspartato e histidina, a inclusão de átomos capazes de estabilizar a carga positiva sobre o anel imidazólico através de ligação de hidrogênio com o próton proveniente do resíduo de serina, resulta na estabilização do intermediário tetraédrico o que pode se refletir no aumento da atividade enzimática e em alterações na enantiosseletividade (Figura 7).^{59,60} Essa estratégia é conhecida como *SAC*, *substrate-assisted catalysis*.

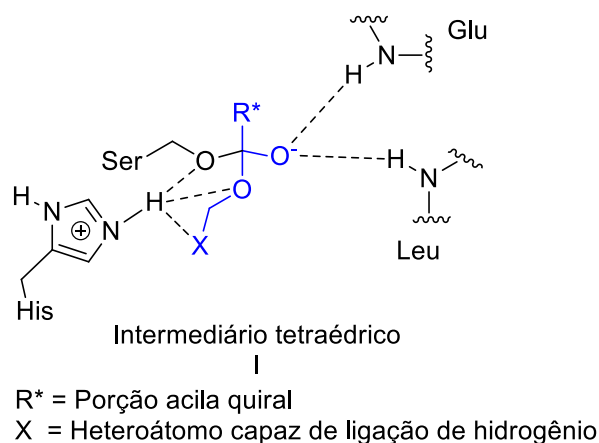
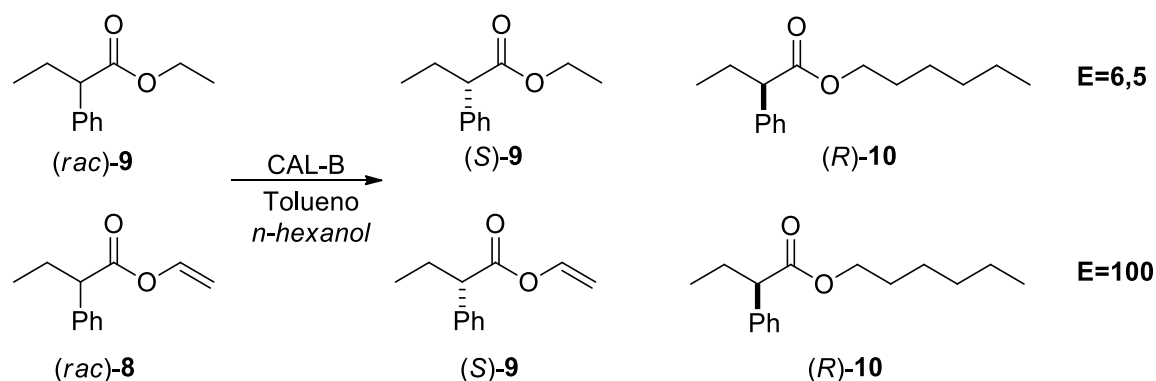


Figura 7 – Intermediário tetraédrico I estabilizado pela presença de uma ligação de hidrogênio adicional. Adaptado de Tsai⁶⁰

Outro exemplo de como o enantio-reconhecimento enzimático pode ser alterado através de mudanças na porção alcoólica de um éster quiral foi dado por Yang *et al.* (Esquema 13).⁴⁶ Os pesquisadores observaram que a enantiosseletividade das reações de transesterificação e hidrólise de ésteres vinílicos de ácidos arilalcanóicos era significativamente maior que as reações com ésteres etílicos. A reação de transesterificação empregando o éster vinílico **8** apresentou um valor de $E > 100$ enquanto o éster etílico **9** um valor de $E = 6,5$. Segundo os autores, os elétrons π presentes na ligação dupla da porção vinílica poderiam interagir com os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo levando a uma melhora no reconhecimento enzimático.



Esquema 13 - Aumento da enantiosseletividade da reação enzimática através da alteração da porção alcóolica. Adaptado de Yang⁴⁶

Para um mesmo substrato, nas mesmas condições reacionais (solvente e temperatura) a enantiosseletividade pode ser alterada através de alterações sobre a estrutura do nucleófilo. Essas mudanças interferem na segunda etapa do mecanismo de transformação enzimática, etapa de deacilação (Esquema 12, B).

Pan *et al.*⁶¹ estudaram o efeito do tamanho da cadeia de álcool, sob a enantiosseletividade da reação de esterificação do ácido 2-(4-clorofenoxi) propanóico catalisada pela lipase OF 360, e observaram que a enantiosseletividade aumentava com o aumento da cadeia do álcool.

Tsai e Wei⁶² verificaram que a esterificação do naproxeno pela lipase de *Candida cylindracea* usando como nucleófilos trimetil-silil-metanol ou trimetil-silil-etanol possuía maior enantiosseletividade do que quando realizada com álcoois não funcionalizados.

A mudança da função química do nucleófilo também pode alterar a enantiosseletividade da reação, como relatado por De Zoete *et al.*⁶³ através da comparação da enantiosseletividade das reações de amonólise, hidrólise e alcoólise (transesterificação) catalisadas pela lipase CAL-B frente ao éster de 2-cloro-etila do ibuprofeno (11) (Tabela 2).

Tabela 2 – Influência do nucleófilo na razão enantiomérica da RCE do ibuprofeno

NuH	Conv. (%)	e.e (%) substrato	E
H ₂ O	63	5,8	4
BuOH	56	86	16
NH ₃	56	96	28

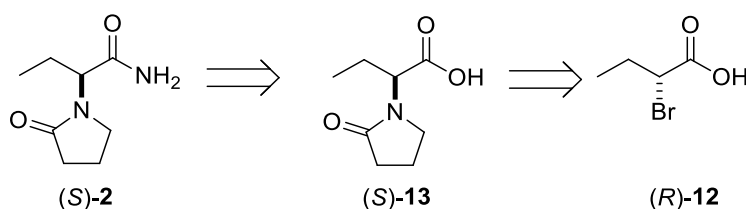
1.6 Lipases na resolução de ácidos 2-bromo alquílicos

Embora a resolução de ácidos carboxílicos seja desafiadora a resolução de racematos de uma série de ácidos 2-bromo alquílicos foi realizada com sucesso em 1985 por Klivanov por meio da reação de esterificação enzimática destes ácidos usando *n*-butanol como nucleófilo, a lipase *Candida cylindracea* (atualmente denominada *Candida rugosa*) e hexano como solvente.²⁴

A resolução desses ácidos usando lipases comerciais, entretanto, é um desafio, como se pode observar na tese apresentada por Tang¹³ onde a esterificação enzimática do ácido 2-bromo propanóico foi estudada usando um kit contendo 15 lipases comerciais e *n*-butanol como nucleófilo em hexano, sendo o melhor valor de E obtido de 2,5 (S) para a CAL-B, o que justificou a ideia de se “melhorar” geneticamente essa lipase.

Alternativas para a obtenção desses ácidos enantiomericamente puros encontradas na literatura são a hidrólise⁶⁴ ou aminólise⁶⁵ enzimática de 2-bromo ésteres racêmicos.

Dentre os ácidos 2-bromo alquílicos de interesse farmacêutico, em que a resolução do racemato é necessária, destaca-se o ácido (*R*)-2-bromo butírico (**12**) por ser precursor do fármaco antiepilético levetiracetam (**2**) (Esquema 14), que comercializado através do nome Keppra[®] movimentou cerca de 655 milhões de euros em 2014.⁶⁶ Em 2015 a Anvisa registrou o Keppra[®] como um dos medicamentos indicados para o tratamento da epilepsia.⁶⁷



Esquema 14 - Análise retrosintética do fármaco levetiracetam (**4**)

Além da aplicação na síntese do fármaco levetiracetam, o ácido 2-bromo butírico (**12**) é um bloco de construção importante na síntese de outras substâncias biologicamente ativas tais como: *i*) precursor para fármacos que regulam a produção de insulina e auxiliam no tratamento da psoríase e do mal de Alzheimer **14**;⁶⁸ *ii*) 2-bromo nitrilas **15**, intermediárias na síntese de produtos naturais;¹⁶ *iii*) ácidos carboxílicos onde o substituinte alfa são hidrazinas **16a** ou *N,N*-dimetil-hidrazinas **16b**, compostos que apresentam função antiviral e antitumoral;⁶⁹ *iv*) na síntese de 2-selênio ésteres **17** que podem atuar na inibição das glutatona peroxidases (Figura 8).⁷⁰

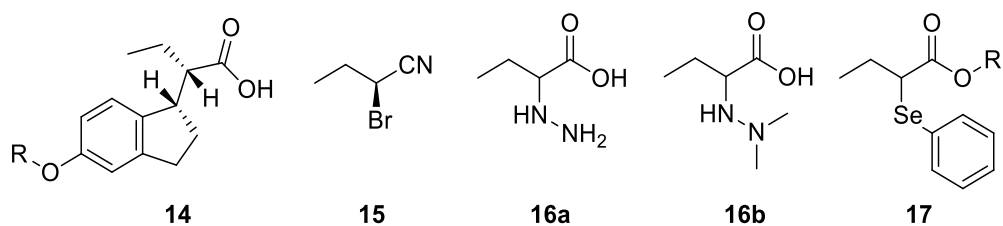


Figura 8 - Produtos derivados do ácido 2-bromo butírico (12)

Dado a grande versatilidade do ácido 2-bromobutírico (12) e seus derivados e de ser um bloco de construção quiral vantajoso do ponto de vista econômico, o presente trabalho visa otimizar as reações enzimáticas através de alterações na estrutura dos substratos e nas condições reacionais na tentativa de contornar a usual baixa enantiosseletividade das RCE desse tipo de substrato.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudo das reações de resolução cinética enzimática de ésteres derivados do ácido 2-bromo butírico mediadas por lipases.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliação de lipases comerciais em reações de esterificação e transesterificação do ácido 2-bromo butírico e derivados.
- Avaliação das condições reacionais das reações de resoluções cinética enzimática visando o aumento dos parâmetros de estereosseletividade.
- Realização de alterações racionais na estrutura dos ésteres derivados do ácido 2-bromobutírico visando a melhora da enantiosseletividade das reações.
- Definição de uma estratégia biocatalítica baseada nos estudos realizados para a obtenção, em escala preparativa, do ácido 2-bromo butírico e derivados.

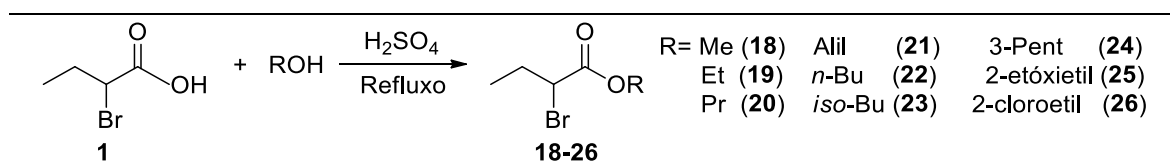
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A reação de transesterificação enzimática de ésteres derivados do ácido 2-bromo butírico (**1**) foi escolhida como modelo, pois permitiu o acesso a todos os dados experimentais (excesso enantiomérico do substrato e produto), obtidos por cromatografia em fase gasosa em fase estacionária quiral, sem a necessidade de derivatização. Os parâmetros reacionais das reações enzimáticas, conversão (*c*) e razão enantiomérica (*E*), foram calculados através das equações determinadas por Chen⁷¹:

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

3.1 Síntese dos ésteres 2-bromo butíricos 18-30

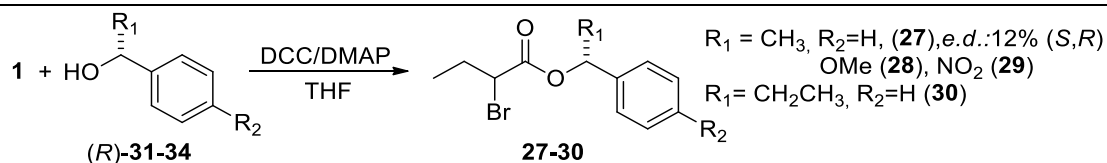
Os ésteres **18-26** foram sintetizados através da reação entre o ácido 2-bromo butírico (**1**) e os respectivos álcoois na presença de ácido sulfúrico e sob refluxo (Esquema 15).



Esquema 15 - Síntese dos substratos derivados do ácido 2-bromobutírico (**1**).

Éster (Rendimento)		
18 (85%)	21 (66%)	24 (80%)
19 (80%)	22 (75%)	25 (77%)
20 (69%)	23 (49%)	26 (89%)

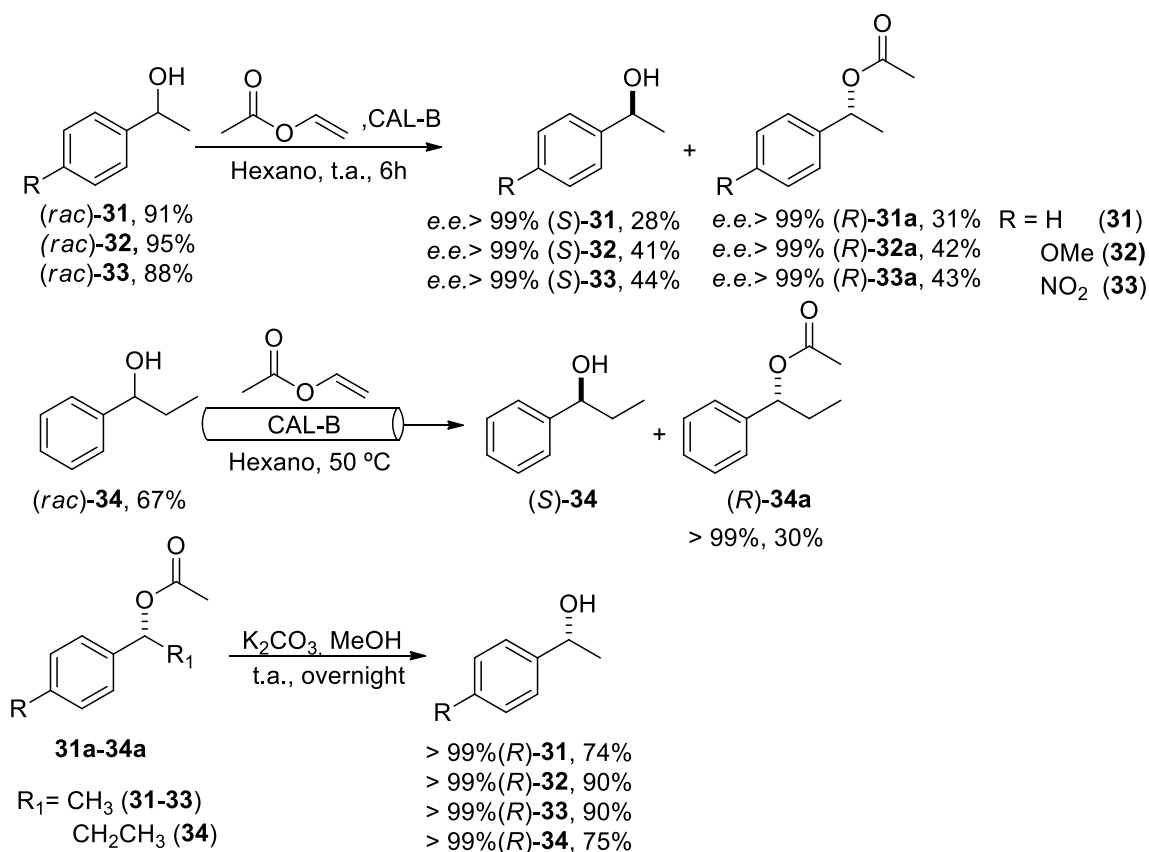
Os ésteres **27-29** foram sintetizados empregando dicicloexilcarbodiimida (DCC)/4-dimetilaminopiridina (DMAP) e os respectivos álcoois benzílicos secundários enantiopuros **31-34** (Esquema 16).



Esquema 16 – Síntese dos ésteres 27-30

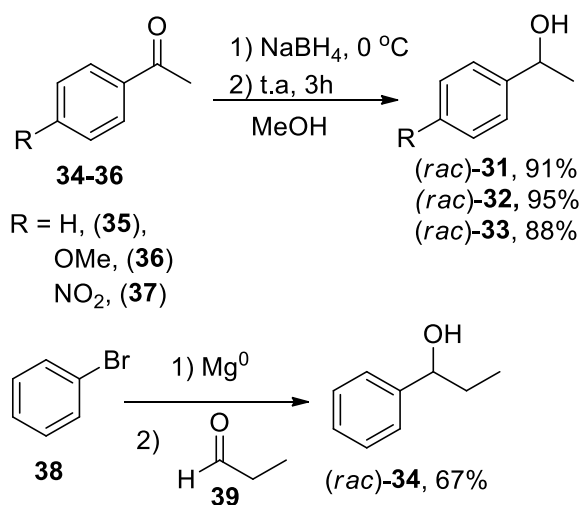
Álcool (<i>R</i>)	Éster (Rendimento)
 (<i>R</i>)-31	 27 (52 %) e.d.: 12% (S,R)
 (<i>R</i>)-32	 28 (padrão analítico)
 (<i>R</i>)-33	 29 (padrão analítico)
 (<i>R</i>)-34	 30 (padrão analítico)

Os álcoois **31-33** foram obtidos em sua forma enantiopura através da resolução cinética enzimática em batelada empregando CAL-B e acetato de vinila em hexano. O racemato do álcool **34** foi resolvido também empregando a lipase CAL-B mas em um sistema de fluxo contínuo *home-made* desenvolvido em nosso grupo de pesquisa por Thomas devido ao maior tempo de reação necessário para sua resolução.⁷² Os acetatos (*R*)-**31a-34a** foram separados dos respectivos álcoois por cromatografia *flash*, e hidrolisados na presença de carbonato de potássio (K₂CO₃) e metanol (MeOH), fornecendo os álcoois (*R*)-**31-34** com excessos enantioméricos superiores a 99% (Esquema 17). Os excessos enantioméricos dos álcoois e acetatos foram determinados via cromatografia gasosa em fase estacionária quiral (ver tópico 5.2.3 de Materias e Métodos).



Esquema 17 – Obtenção dos álcoois **31-34** através da resolução cinética enzimática (RCE) empregando a lipase CAL-B.

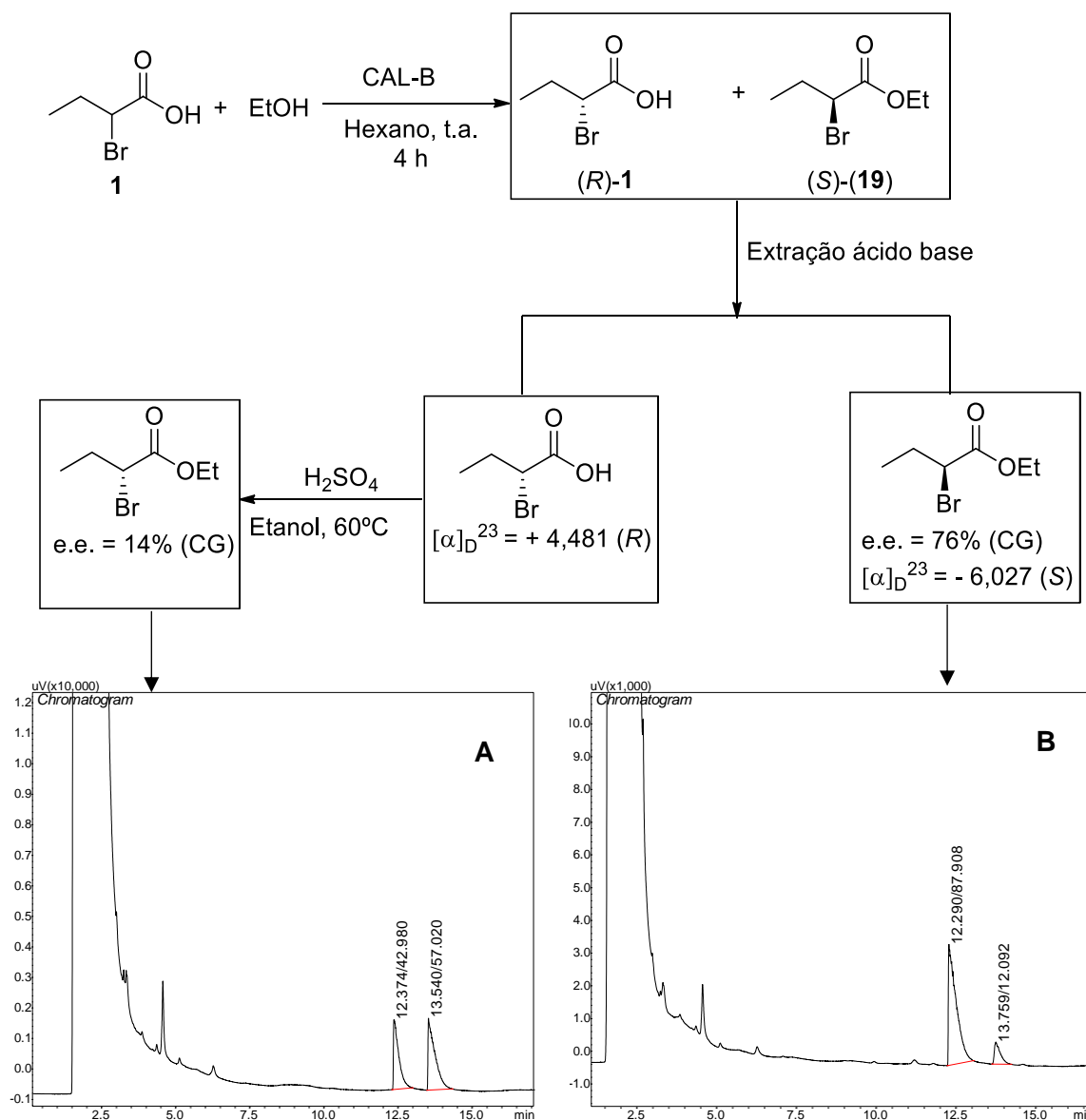
A obtenção dos racematos **31-33** se deu através da redução das respectivas cetonas **35-37** usando boroidreto de sódio ($NaBH_4$). O álcool 1-fenilpropanol (**34**) foi obtido através da reação de Grignard entre o bromobenzeno (**38**) e o propanal (**39**) (Esquema 18).



Esquema 18 – Obtenção dos racematos **31-34**.

3.2 Determinação da enantiopreferência enzimática da lipase CAL-B e da ordem de eluição dos picos cromatográficos

A determinação da enantiopreferência enzimática da CAL-B se deu através do isolamento do produto e do substrato da reação de esterificação enzimática do ácido 2-bromo butírico (**1**) mediada pela lipase CAL-B empregando etanol como nucleófilo, através de extração ácido-base, seguido de análises polarimétricas e cromatográficas (Figura 9).



A comparação dos desvios óticos observados e os dados encontrados na literatura¹⁸ permitiram determinar que a CAL-B é (S)-seletiva frente ao ácido 2-bromo butírico (**1**). Em conjunto com a análise polarimétrica a análise cromatográfica permitiu definir que o pico com menor tempo de retenção (t_r) é referente ao enantiômero (S) como

se pode observar através da comparação de áreas entre os picos (Figura 9, B). Todos os ésteres estudados nesse projeto apresentaram a mesma ordem de eluição.

3.3 Triagem enzimática frente à reação de transesterificação

O éster 2-bromobutanoato de etila (**19**) foi submetido à reação de transesterificação enzimática empregando 6 lipases comerciais usando *n*-butanol como nucleófilo em hexano a 35 °C (Tabela 3).

Tabela 3 - Triagem enzimática da reação de transesterificação do éster **19**.

Entrada	Lipase	c (%)	e.e. _s (%)	e.e. _p (%)	E
1	CAL-B	63	44 (<i>R</i>)	37 (<i>S</i>)	3
2	<i>Candida rugosa</i>	54	0	0	0
3	<i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLIM)	52	28 (<i>S</i>)	32 (<i>R</i>)	3
4	Pâncreas de porco (PPL)	0	0	-	-
5	Amano OS	10	0	0	0
6	<i>Rhizopus oryzae</i>	78	0	0	0

Condições reacionais: Éster **19** (0,1 mmol), lipase (20 mg), *n*-butanol (0,3 mmol), hexano (2 mL), 35 °C, 6 h.

Dentre as lipases avaliadas apenas a lipase de pâncreas de porco (PPL) não catalisou a reação de transesterificação (Tabela 3, Entrada 4). As lipases de *Candida rugosa* e de *Rhizopus oryzae* catalisaram a reação, mas não discriminaram os enantiômeros (Tabela 3, Entradas 2 e 6). Nota-se também que a lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) e a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLIM), catalisaram a reação com enantiopreferência inversa (Tabela 3, entradas 1 e 3), como se pode observar na Figura 10.

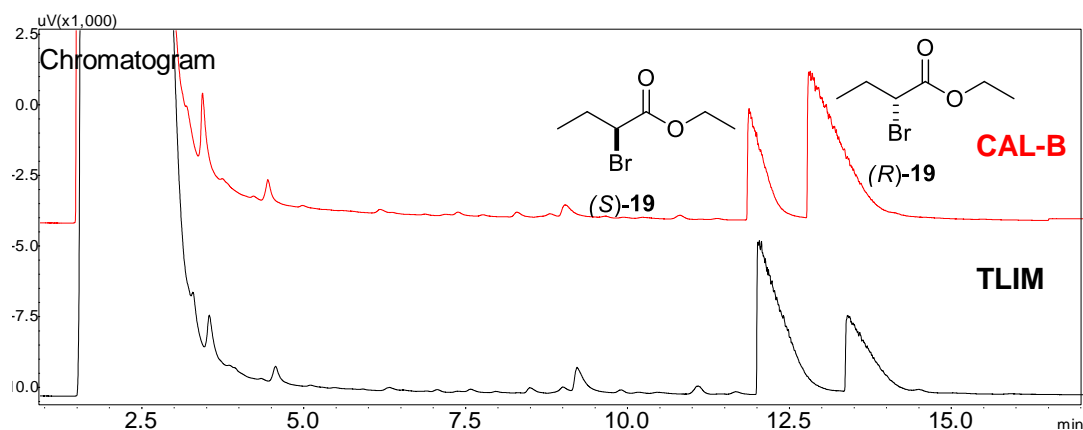


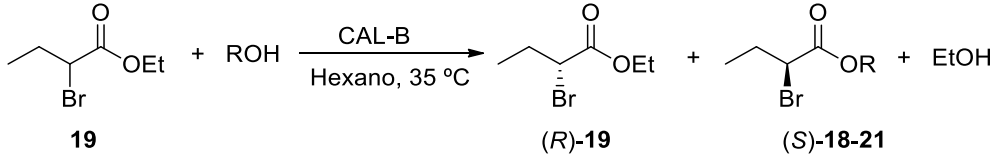
Figura 10 - Cromatogramas do substrato **19** (*R*) enantioenriquecido pela reação de transesterificação empregando a lipase CAL-B (em vermelho) e (*S*) enantioenriquecido empregando a lipase TLIM (em preto).

Os valores de razão enantiomérica (E) observados nas entradas 1 e 3 da Tabela 2 foram baixos ($E = 3$), o que tornaria a aplicação da resolução cinética enzimática desvantajosa. Na tentativa de melhorar este parâmetro, a lipase B de *Candida antarctica* foi selecionada e alterações nas condições reacionais, substrato e nucleófilo foram realizadas.

3.4 Estudo da influência do nucleófilo sobre a reação de transesterificação

Uma vez selecionada a lipase passou-se a estudar o efeito do nucleófilo sobre a enantiosseletividade da reação. Para tanto, metanol, *n*-propanol e o álcool alílico foram avaliados como nucleófilos na transesterificação do éster **19** (Tabela 4).

Tabela 4 – Efeito da estrutura do nucleófilo sobre a enantiosseletividade da RCE do éster **19**.



Entrada	Álcool	Tempo (h)	c (%)	e.e. _s (%)	e.e. _p (%)	E
1	MeOH	0,5	28	22	56	4
2		2	41	25	36	3
3	<i>n</i> -PrOH	0,5	17	13	64	5
4		2	37	31	53	4
5	Álcool	0,5	11	8	62	5
6	alílico	2	26	20	57	4

Condições reacionais: Éster **19** (0,1 mmol), CAL-B (20 mg), álcool (0,3 mmol), hexano (2 mL), 35 °C

A variação do nucleófilo não alterou significativamente a enantiosseletividade da reação, o valor de E variou entre 3 e 5, valores considerados baixos para RCE. Nesses casos para se obter o substrato enriquecido costuma-se deixar a conversão da reação passar de 50%, sacrificando o rendimento químico,²³ entretanto, as reações estudadas mostraram um decréscimo no excesso enantiomérico justamente nessa faixa, como se pode observar no gráfico de conversão por excesso enantiomérico da reação envolvendo o éster **19** e propanol como nucleófilo. (Figura 11).

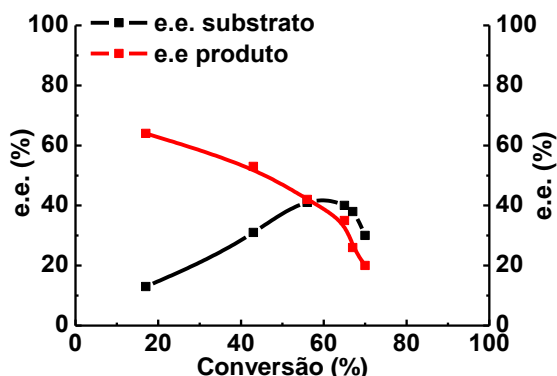


Figura 11 – Excessos enantioméricos do substrato e produto no decorrer da reação de transesterificação enzimática entre o éster **19** e *n*-propanol.

Esse comportamento está associado à reversibilidade da reação, uma vez que o álcool liberado pelo substrato também é um nucleófilo para a reação de transesterificação do produto. A enantiopreferência da reação reversa é a mesma da reação principal, então o produto enantiomericamente enriquecido com o enantiômero (*S*) tem justamente esse enantiômero sendo consumido preferencialmente, o que diminui o excesso enantiomérico do substrato (*R*)-enriquecido a partir de taxas de conversão mais altas.

Na tentativa de diminuir o efeito da reversibilidade da reação, foram realizados estudos sobre a influência da relação molar do nucleófilo frente ao substrato. O éster **19** foi submetido à reação de transesterificação enzimática usando *n*-propanol em diferentes razões (3, 10, 20, 30 e 40 equivalentes) em relação ao substrato (Tabela 5). Os maiores excessos enantioméricos do substrato (Tabela 5, Entradas 4 e 5) se deram em concentrações maiores do nucleófilo, devido ao equilíbrio da reação estar mais deslocado para a formação dos produtos. (Tópico 1.4.2.).

Tabela 5 – Efeito da concentração do nucleófilo sobre a RCE do éster **19**.

Entrada	Equivalentes	Tempo (h)	c (%)	e.e. _s (%)	e.e. _p (%)	E
1	3	12	70	30	10	2
2	10	12	74	71	25	3
3	20	12	69	73	33	4
4	30	12	72	82	32	4
5	40	12	74	84	30	4

Condições reacionais: Éster **19** (0,1 mmol), CAL-B (20 mg), álcool (0,3, 1, 2, 3 e 4 mmol), hexano (2 mL), temperatura 35 °C, 12 horas de reação

Essa conclusão fica mais evidente quando o perfil reacional é analisado como um todo, como se pode ver ao comparar o perfil reacional da entrada 1 (Figura 11), com o perfil das outras entradas (Figura 12).

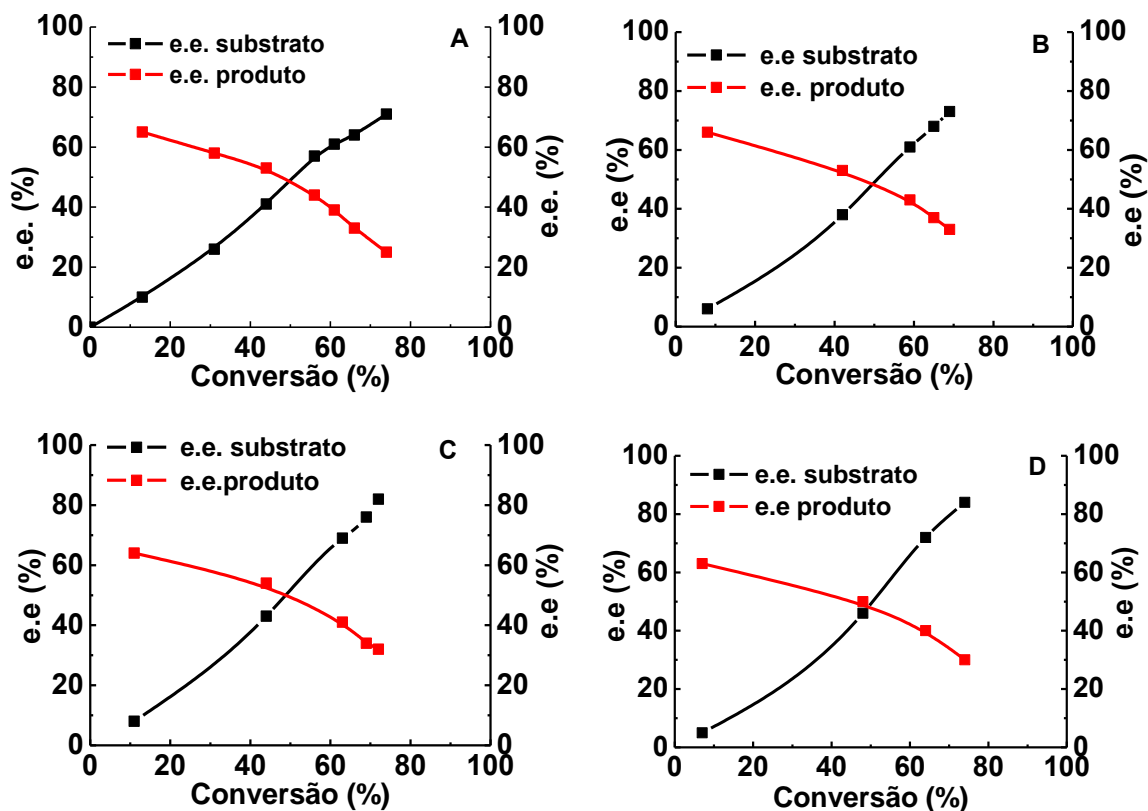


Figura 12 – RCE do éster (19), empregando (A) 10 equivalentes, (B) 20 equivalentes, (C) 30 equivalentes e (D) 40 equivalentes de *n*-propanol.

A partir desse estudo a influência da estrutura do álcool usado como nucleófilo foi reavaliada usando 40 equivalentes como condição padrão. (Tabela 6).

Tabela 6 – Efeito da estrutura do nucleófilo sobre a enantiosseletividade da RCE do éster 19.

Entrada	Álcool	Tempo (h)	c (%)	e.e.s (%)	e.e.p (%)	E
1	MeOH	12	78	90	25	4
2	<i>n</i> -PrOH	12	78	84	30	4
3	<i>n</i> -ButOH	24	74	86	30	5
4	Álcool alílico	24	79	72	19	3
5	2-Etoxietanol	8	83	60	12	2
6	2-Cloroetanol	24	0	0	n.r	n.r

Condições reacionais: Éster 19 (0,1 mmol), lipase (20 mg), álcool (4 mmol), hexano (2 mL), 35 °C; n.r: não reagiu.

O aumento na cadeia carbônica em álcoois alquílicos alifáticos (Tabela 6, Entradas 1-3) não influenciou de forma significativa a enantiosseletividade da reação. No entanto, visando aplicação em escala maior dessa reação o uso do *n*-butanol seria mais vantajoso do que os outros álcoois, já que a diferença nas propriedades físicas, particularmente o ponto de ebulição, entre o substrato **19**, um éster etílico, e o produto da transesterificação **22**, um éster butírico, é maior, o que facilitaria o processo de separação por destilação.

A diferença no excesso enantiomérico do substrato usando álcool alílico (Tabela 6, Entrada 4) para o *n*-propanol (Tabela 6, Entrada 2) foi de cerca de 12 pontos percentuais, enquanto a conversão foi praticamente a mesma. Esse dado é interessante porque os nucleófilos em questão possuem o mesmo número de carbonos e não possuem ramificação, mas a presença da ligação dupla pode ter influenciado de forma negativa a discriminação enzimática.

A enantiosseletividade das reações envolvendo os álcoois alílico e etoxietanol (Tabela 6, Entradas 4 e 5) foi ligeiramente menor que as observadas usando álcoois alifáticos saturados, o que reforça o efeito da estrutura do nucleófilo sobre a enantiosseletividade da reação. Também é possível notar que a velocidade de conversão é sensivelmente maior no caso do 2-etoxietanol quando se compara com os demais álcoois, 83% de conversão em 8 horas frente aos 78% dos álcoois alquílicos menores metanol e propanol (Tabela 6, Entradas 1 e 2).

A princípio, essa aceleração não seria esperada uma vez que o aumento da cadeia carbônica no álcool resulta também no aumento do impedimento estérico desse nucleófilo no complexo acil-enzima. Entretanto a presença do heteroátomo de oxigênio pode estar auxiliando o resíduo catalítico de histidina na abstração do próton do 2-etoxietanol através de uma ligação de hidrogênio intramolecular (Figura 13), um efeito análogo ao “*Substrate-assisted catalysis*” mas agora quem auxilia na catálise é o nucleófilo.

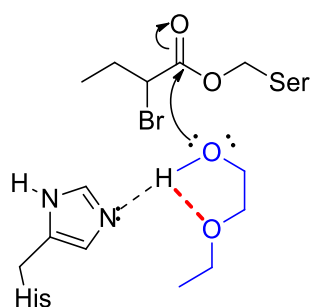


Figura 13 – Ligação de hidrogênio intramolecular auxiliando na catálise enzimática.

A reação envolvendo o álcool 2-cloroetanol (Tabela 6, Entrada 6) resultou na solubilização do suporte em que a enzima CAL-B estava imobilizada, além de causar a

desnaturação da enzima. A desnaturação foi comprovada através da adição de *n*-propanol à mistura reacional e não observação da formação do éster propílico **20**, indicando que o álcool 2-cloroetanol, nessa concentração, causou a desnaturação da enzima.

3.5 Estudo da influência da estrutura do substrato sobre a enantiosseletividade

Considerando que a primeira etapa do mecanismo de ação das lipases envolve a formação de um complexo acil-enzima através do ataque de um resíduo de serina à carboxila do éster (Tópico 1.5.3), espera-se que alterações na porção alcoólica do éster quiral possam interferir no reconhecimento enzimático.⁷³ O planejamento estrutural dos substratos foi baseado em estudos como o de Tsai e Wei⁶² e de Pan *et al.*⁶¹ onde o aumento da cadeia alquílica de álcoois resultou no aumento da enantiosseletividade da reação de esterificação enzimática de ácidos carboxílicos racêmicos, e no estudo de Bojarski *et al.*⁷³ onde a hidrólise de ésteres derivados do álcool 2-cloroetanol apresentou maior enantiosseletividade que a de ésteres derivados do *p*-nitrofenol.

Para estudar esse efeito, uma série de ésteres derivados do ácido 2-bromo butírico (**12**) foi sintetizada, variando a porção alcoólica: tamanho da cadeia hidrocarbônica (**18-24**), presença de insaturações (**21**), ramificações (**23-24**), heteroátomos (**25-26**) e a introdução de quiralidade nessa porção (**27**). Os resultados da RCE desses substratos estão dispostos na Tabela 7.

Tabela 7 – Efeito da engenharia do substrato na RCE dos 2-bromoésteres **18-27**

Reaction scheme: $\text{R-CH(Br)-CH}_2\text{-CO}_2\text{R} + \text{EtOH} \xrightarrow[\text{n-hexano, 35 }^\circ\text{C}]{\text{CAL-B}}$ $\text{R-CH(Br)-CH}_2\text{-CO}_2\text{OR} + \text{R-CH(Br)-CH}_2\text{-CO}_2\text{Et}$ (R)-18-26 + (S)-19

Reaction scheme: $\text{R-CH(Br)-CH}_2\text{-CO}_2\text{R} + \text{EtOH} \xrightarrow[\text{n-hexano, 35 }^\circ\text{C}]{\text{CAL-B}}$ $\text{R-CH(Br)-CH}_2\text{-CO}_2\text{O-CH(Ph)-CH}_2\text{R} + \text{R-CH(Br)-CH}_2\text{-CO}_2\text{Et}$ (S,R)-27 + (R)-19

Entrada	R/Ester	t (h)	c (%)	e.e. _s (%) ^a	e.e. _p (%) ^a	E
1	(18)	12	84	86	24	4 (S)
2	(20)	12	70	77	33	4 (S)
3	(21)	12	85	90	16	3 (S)
4	(22)	12	58	55	40	4 (S)
5	(23)	12	31	28	61	5 (S)
6	(24)	12	0	-	-	-
7	(24)	36	0	-	-	-
8	(25)	4	82	90	20	4 (S)
9	(26)	0.5	75	88	29	5 (S)
10 ^b	(26)	0.5	71	75	31	4 (S)
11	(27)	36	13	19 (S,R) ^c	47 (R)	3 ^d (R)

Condições de reação: Ester (0.1 mmol), lipase (20 mg), álcool (4 mmol), hexano (2 mL), 35 °C. ^a Determinado por análise cromatográfica usando a coluna quiral Beta-Dex 325. ^b Álcool (0,3 mmol, 3 equivalentes) ^c Excesso diastereoisomérico determinado por cromatografia gasosa. O excesso diastereoisomérico inicial, 12% (S,R) foi levado em conta nos cálculos. ^d Embora o substrato seja uma mistura de epímeros, o excesso diastereoisomérico é decorrente da parte acila, portanto se pode encarar esse valor pode ser usado nas equações dadas por Chen⁷¹, além disso nesse caso o E observado tem a mesma significância dos valores observados para substratos que são pares enantioméricos.⁷⁴

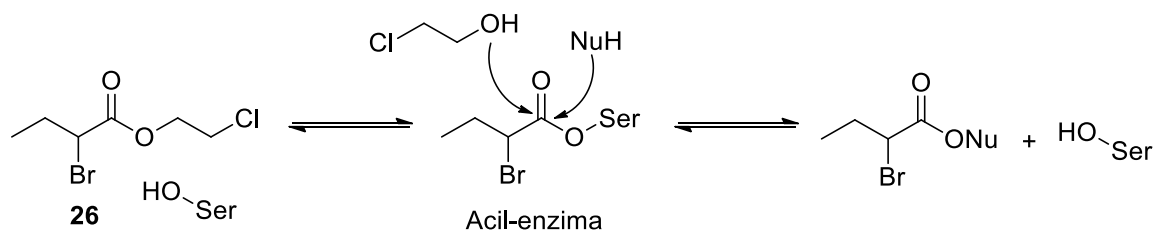
De forma geral não houve mudanças significativas na razão enantiomérica da reação, os valores de E variaram de 3 a 5, mas foi possível notar uma relação direta entre a estrutura do substrato e a taxa de conversão da reação.

O aumento da cadeia alquílica (Tabela 7, Entradas 1-8) resultou em um decréscimo do valor de conversão em um mesmo intervalo de tempo, e a presença de ramificações se mostrou mais prejudicial a velocidade da reação (Tabela 7, Entradas 5-6), o éster **24**, inclusive não apresentou conversão mesmo após 36 horas, evidenciando que o aumento do impedimento estérico ao ataque nucleofílico do resíduo de serina resulta na diminuição da taxa de conversão.

O substrato **21** foi planejado baseado em um estudo de Yang ⁴⁶, onde o uso de ésteres vinílicos aumentou significativamente a enantiosseletividade da RCE de ácidos arilalifáticos quando comparado a resolução de ésteres etílicos. Uma das justificativas dos autores foi que a presença de elétrons π na ligação dupla, poderiam interagir com resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima, o que resultaria no aumento da enantiosseletividade. Infelizmente, a presença da ligação dupla, no nosso caso, não resultou na melhora da enantiosseletividade, embora se trate de um sistema alílico e não vinílico como o estudado por Yang⁴⁶. Independente disso a presença da insaturação resultou em um aumento da taxa de conversão, 85% em 12 h (Tabela 7, Entrada 3), quando comparado com seu análogo propílico, 70% em 12 h (Tabela 7, Entrada 4).

A introdução de heteroátomos na porção alcoólica, ésteres **25** e **26** (Tabela 7, Entradas 8 a 10), por sua vez, resultou em um aumento das taxas de conversão, 82% em 4 h para o éster **25** e mais significativamente para o éster derivado do 2-cloroetanol (**26**), 75% de conversão em apenas 30 min.

Esse resultado já era esperado no caso do éster derivado do 2-cloroetanol (**26**) (Tabela 7, Entradas 9 e 10) pois, uma vez formado o complexo acil-enzima, ocorre a liberação do 2-cloroetanol que devido a presença do átomo de cloro diminui o caráter nucleofílico do oxigênio, e, portanto, diminui a competitividade com o álcool usado como nucleófilo (Esquema 19). Além disso o efeito retirador de elétrons do átomo de cloro torna a carbonila mais eletrofílica, o que torna esse substrato mais reativo que os demais.



Esquema 19 – Transesterificação enzimática de um éster derivado do 2-cloroetanol.

O efeito *quasi*-irreversível fica claro quando se compara o excesso enantiomérico do substrato **26** (75%) usando 3 equivalentes de nucleófilo (Tabela 7, Entrada 9) com o excesso enantiomérico do éster etílico **19** (30%), usando os mesmos 3 equivalentes (Tabela 4, Entradas 1 e 2). Como discutido no tópico 3.4, o uso de 3 equivalentes resultava na queda do excesso enantiomérico do substrato quando a reação atingia a taxa de 50% de conversão, devido ao efeito competitivo do álcool abandonador. A diferença significativa entre os excessos enantioméricos desses substratos é um claro indício que a competição pelo complexo acil-enzima entre o 2-cloroetanol e o nucleófilo é menor que no caso do éster etílico, onde há liberação de etanol.

No caso do 2-bromo butanoato de 2-etoxietila (**25**) a explicação não reside na nucleofilicidade do álcool abandonador, 2-etoxietanol, que, embora tendo a presença de

um átomo de oxigênio na posição β não há, de forma tão clara, o efeito retirador de elétrons quando comparamos com o 2-cloroetanol por exemplo. Além disso, o efeito estérico de diminuição da velocidade de reação com o aumento da cadeia carbônica, observado na série de álcoois alquílicos (Tabela 7, Entradas 1-7), não se aplica nesse caso, já que em termos de tamanho da porção alcoólica o 2-etoxietanol deveria se comportar similarmente ao 2-bromo butanoato de *n*-butila (**22**) (Tabela 7, Entrada 4).

Um efeito similar do aumento da velocidade de reação foi observado por Wagegg *et al.* nas reações de aminólise catalisada por lipases usando o 2-metoxiacetato de etila como doador acila.⁷⁵ Esse efeito também foi observado na hidrólise de amidas derivadas do ácido 2-metoxiacético. A explicação segundo Cammenberg *et al.*⁷⁶ é que o oxigênio β da parte acila estabiliza o intermediário tetraédrico acil-enzima através de ligação de hidrogênio com o hidrogênio da amina (Figura 14). Entretanto, o aumento da velocidade não foi observado na reação de alcoólise desses mesmos ésteres usando o 1-feniletanol como nucleófilo, uma vez que o intermediário tetraédrico acil-enzima não possui átomo de hidrogênio que possibilite a estabilização por ligação de hidrogênio.

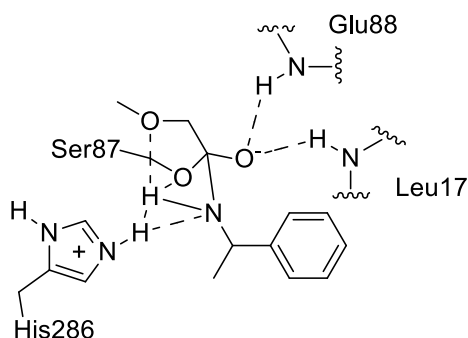


Figura 14 - Intermediário tetraédrico formado na aminólise do éster 2-metóxi acetato de etila catalisado por uma serina hidrolase. Adaptado de Cammenberg *et al.*⁷⁶

Embora a proposta de Cammenberg trate da presença do heteroátomo na porção acila do éster, a ideia que heteroátomos também possam interagir, através de ligações de hidrogênio, com resíduos de aminoácidos presentes no sítio catalítico enzimático quando presente na porção alcoólica e alterar a estabilidade do intermediário tetraédrico, já foi levantada na literatura, e esse tipo de engenharia do substrato, como dito, é conhecida como “SAC”, *Substrate-assisted catalysis*.^{59,60}

Como discutido no tópico 1.5.3, essa estratégia se baseia na estabilização do intermediário tetraédrico gerado pelo ataque do resíduo de serina à carbonila, através da presença de uma ligação de hidrogênio adicional entre o heteroátomo presente na porção alcoólica e o próton do resíduo de histidina envolvido na ativação do resíduo de serina,⁶⁰ o que diminui a energia do intermediário tetraédrico resultando em alterações na atividade enzimática

Na Figura 15 estão comparadas as estruturas dos intermediários tetraédricos dos ésteres butírico **22** e 2-etoxietílico **25**, que possuem um tamanho similar mas diferem significativamente na velocidade da reação. A proposta mais plausível para o aumento da taxa de conversão observado é justamente a possibilidade da formação de uma ligação de hidrogênio adicional devido a presença do átomo de oxigênio.

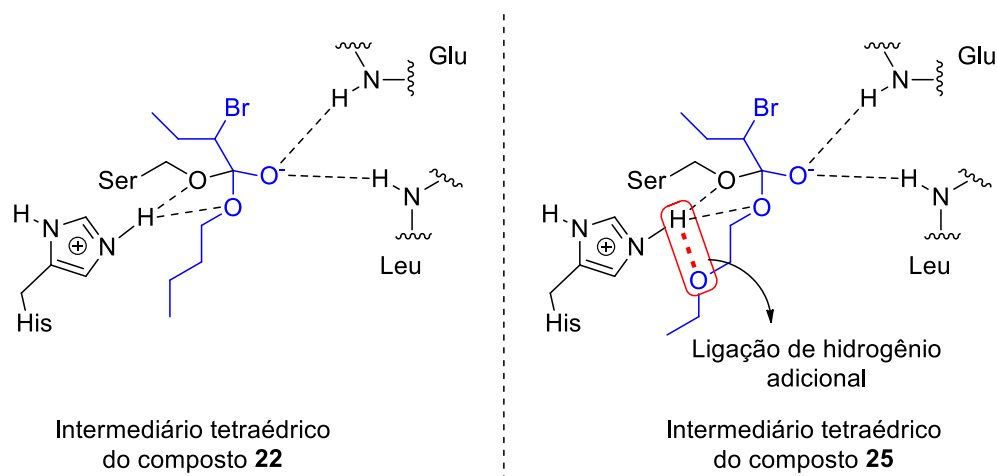
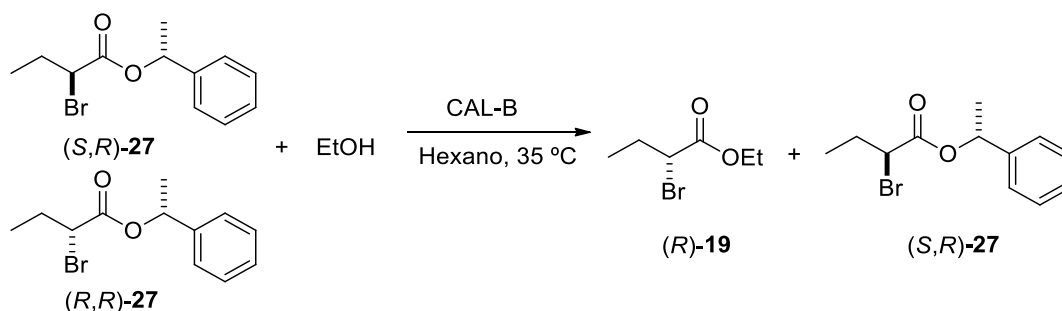


Figura 15 - Comparação dos intermediários tetraédricos dos compostos **22** e **25**, evidenciando a ligação de hidrogênio adicional devido a presença do heteroátomo no composto **25**.

Curiosamente, a aplicação de ésteres de 2-etoxietila em reações de aminólise como agente acilante capaz de aumentar a velocidade da reação enzimática ainda não foi relatado na literatura. Varma *et al.*⁷⁷ demonstraram que o uso do acetato de 2-etoxietila aumentou a enantiosseletividade da resolução da 1-feniletilamina, quando comparado com acetato de etila, entretanto nenhuma menção foi dada ao aumento da velocidade reacional. O uso de ésteres derivados do 2-etoxietanol seria uma alternativa economicamente mais viável que o uso do metoxi-acetato de etila como doador acila em reações de aminólise enzimática.

Por fim, o uso do éster 2-bromo butanoato de (*R*)-1-feniletila (**27**) (Tabela 7, Entrada 11) foi uma tentativa de melhorar a enantiosseletividade da reação enzimática através da resolução de um par de epímeros (Esquema 20). A premissa que levou à proposição desse substrato, foi que a discriminação enzimática dos epímeros (*R,R*) e (*S,R*) pudesse ser maior que a discriminação enantiomérica (*R*), (*S*), visto que diastereoisômeros possuem propriedades diferentes mesmo em ambientes aquirais.



Esquema 20 - Reação de transesterificação enzimática dos epímeros do éster 2-bromo butanoato de (*R*)-1-feniletila **27**, empregando etanol como nucleófilo.

A resolução cinética da mistura epimérica **27** não resultou na melhora da razão enantiomérica da reação ($E=3$), e a taxa de conversão da reação, se comparada com os demais substratos, sofreu uma redução considerável, apenas 13% em 36 h (Tabela 7, Entrada 11). Entretanto, um novo fenômeno foi observado: a inversão da enantiopreferência enzimática na porção acila, como se pode observar comparando o perfil dos cromatogramas do produto **19** da transesterificação enzimática (Figura 16).

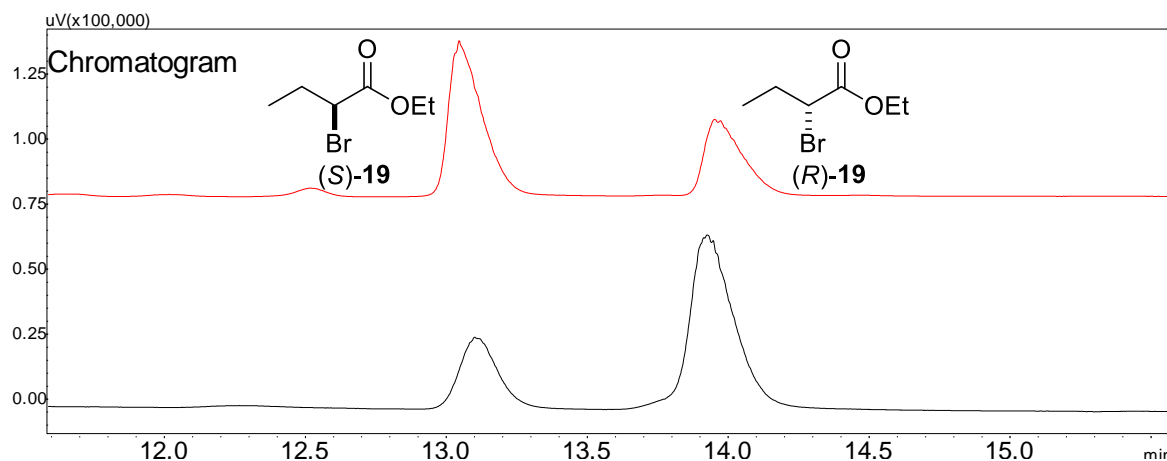
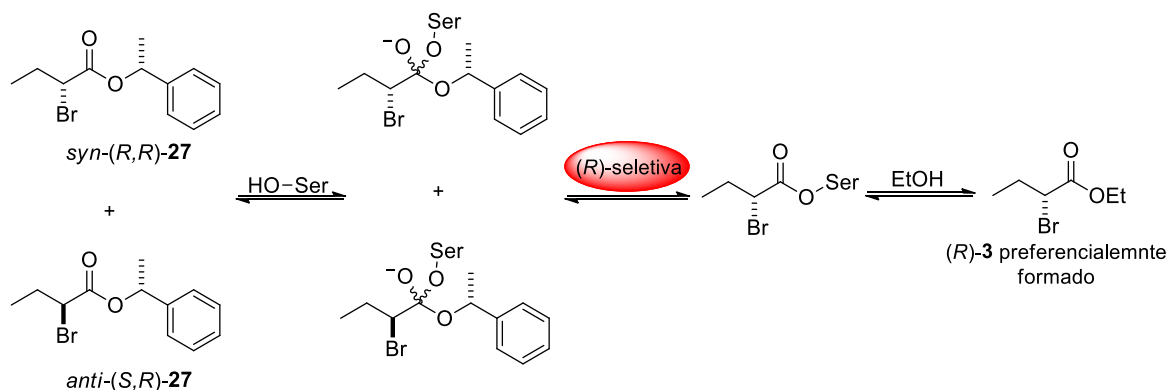


Figura 16 - Cromatograma do éster **19** (*S*) enriquecido pela transesterificação enzimática do éster **26** (em vermelho), e (*R*)-enriquecido pela transesterificação enzimática do éster **27** (em preto).

Como discutido na introdução (Tópico 1.5.3), o mecanismo de transformação de ácidos carboxílicos e derivados envolve duas etapas, uma de acilação e outra de deacilação do complexo acil-enzima formado por um nucleófilo presente no meio. A enantiopreferência da CAL-B observada nos casos dos substratos em que a porção alcóolica é aquiral, sugere que a formação do intermediário acil-enzima (*S*) se dê de forma mais rápida e, portanto, o produto com essa configuração seja preferencialmente formado. Como a única etapa em que a porção alcóolica quiral está envolvida é justamente a primeira etapa (etapa de acilação), a inversão sugere que o intermediário acil-enzima formado mais rapidamente seja o com configuração (*R*) (Esquema 21).



Esquema 21 - Mecanismo geral de transesterificação enzimática, evidenciando a primeira etapa (etapa de acilação) como a determinante para a enantiopreferência enzimática.

Algumas hipóteses foram levantadas para entender esse efeito:

- Impedimento estérico ao ataque do resíduo de serina, decorrente do grupamento (*R*)-1-feniletila, desfavorecendo o ataque ao diastereoisômero que possui a parte carboxílica com configuração (*S*), que nos demais casos era a porção preferencialmente reconhecida;
- A presença de um segundo centro quiral interfere na estabilidade do intermediário tetraédrico o que tornando a quebra do intermediário que contém a parte acila com configuração (*R*) se dê de forma mais rápida;
- A enzima também precisar reconhecer a parte alcoólica do éster para que haja a reação, o ajuste produtivo dessa porção pode resultar em alterações em como a parte acila é reconhecida levando a alterações na enantiodiscriminação.

Embora o efeito de inversão seja interessante e até o momento esse seja o primeiro relato de inversão da enantiopreferência da CAL-B apenas pela manipulação do substrato, a taxa de conversão da reação é baixa quando comparada com os demais substratos, então sê propôs o estudo da reação envolvendo agora o uso do 1-feniletanol e derivados (**31-34**) como nucleófilos da reação, no intuito de melhorar a velocidade da reação além de verificar se o efeito de inversão continuaria sendo observado.

3.6 Uso de nucleófilos quirais na RCE de 2-bromo ésteres

Na tentativa de melhorar a taxa de conversão da reação, o éster derivado do 2-cloroetanol **26** foi a primeira escolha devido à maior taxa de conversão na reação com etanol e da menor nucleofilicidade do álcool abandonador (Tabela 7, entradas 9 e 10), o que permitiu o uso de nucleófilos quirais em menores concentrações. O uso do (*R*)-1-

feniletanol como nucleófilo também resultou na inversão da enantiosseletividade da CAL-B e o valor do E observado igual a 4 (Tabela 8, Entrada 1). A taxa de conversão aumentou comparada com a transesterificação dos epímeros **27** (Tabela 7, Entrada 11), o que tornou a investigação do efeito de inversão mais interessante de ser estudado através do uso do nucleófilo quiral.

Tabela 8 – Efeito do uso de nucleófilos quirais na RCE de 2-bromoésteres.

$$\text{18,25,26} + \text{HO-CH(R}_1\text{)-C}_6\text{H}_4\text{(R}_2\text{)} \xrightarrow[\text{n-hexano, 35 }^\circ\text{C}]{\text{CAL-B}} \text{(S)-2,9,10} + \text{(R,R)-27-30}$$

$\text{R}_1=\text{CH}_3, \text{R}_2=\text{H}$ (**31**), OMe (**32**), NO_2 (**33**)
 $\text{R}_1=\text{CH}_2\text{CH}_3, \text{R}_2=\text{H}$ (**34**)

Entrada	R/Éster	Nucleófilo	t (h)	c (%)	e.e. _s (%) ^c	e.d. _p (%) ^c	E ^d
1		(<i>R</i>)- 31	12	49	44	45	4 (<i>R</i>)
2		(<i>S</i>)- 31	12	-	-	-	-
3 ^a		(<i>rac</i>)- 31	12	43	38	51	4 (<i>R</i>)
4	(26)	(<i>R</i>)- 32	12	54	39	33	3 (<i>R</i>)
5		(<i>R</i>)- 33	12	18	3	14	1 (<i>R</i>)
6 ^b		(<i>R</i>)- 33	24	52	23	20	2 (<i>R</i>)
7		(<i>R</i>)- 34	96	29	8	20	2 (<i>R</i>)
8	(18)	(<i>R</i>)- 31	12	33	17	35	2 (<i>R</i>)
9	(25)	(<i>R</i>)- 31	12	55	42	34	3 (<i>R</i>)

Condições de reação: Éster (0,1 mmol), lipase (20 mg), álcool (0,3 mmol), hexano (2 mL), 35 °C ^a Concentração do álcool (0,6 mmol). ^b Tolueno foi usado com solvente ao invés de *n*-hexano. ^c Excessos determinados por CG. ^d O valor do excesso diastereoisomérico do produto (d.e._p), foi considerado como o excesso enantiomérico do produto e.e._p nas equações propostas por Chen.^{71,74}

Como esperado a enzima não reconheceu o (*S*)-1-feniletanol (**31**) como nucleófilo demonstrando que o reconhecimento da porção álcool não foi alterado pela presença de um doador acila quiral (Tabela 8, Entrada 2). Essa constatação permitiu o estudo da reação empregando o racemato de 1-feniletanol como nucleófilo (Tabela 8, Entrada 3) e o comportamento da reação similar ao do uso do nucleófilo em sua forma enantiomericamente pura.

Ainda usando o éster **26** como substrato, foi testado o efeito da presença de grupos doadores e retiradores de densidade eletrônica no anel aromático de álcoois benzílicos secundários sobre a enantiosseletividade da reação bem como o aumento da cadeia alquílica (Tabela 8, Entradas 4-6).

A presença da metoxila, substituinte doador de densidade eletrônica, na posição *para* no nucleófilo quiral **32** (Tabela 8, Entrada 4) não interferiu no efeito de inversão, e os valores de conversão e razão enantiomérica não variaram consideravelmente se comparados com o uso do 1-feniletanol (**31**).

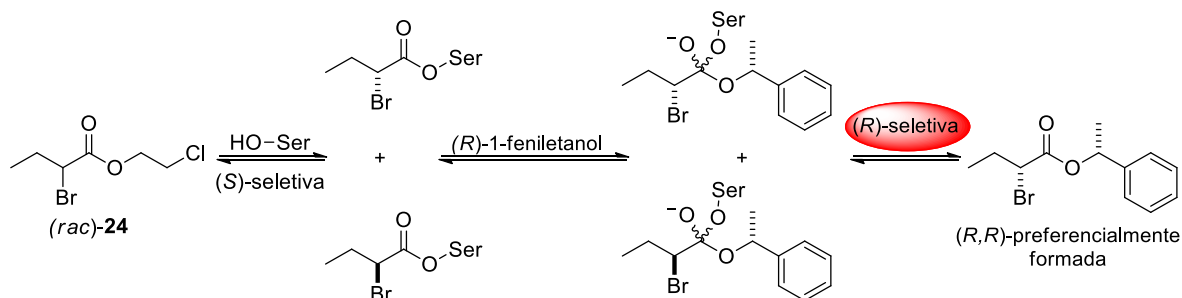
O uso do *p*-nitro-(*R*)-1-feniletanol (**33**) como nucleófilo por sua vez resultou em um decréscimo da taxa de conversão da reação e da enantiosseletividade do processo (Tabela 8, Entrada 5). Esses efeitos podem estar ligados à baixa solubilidade desse nucleófilo em hexano, o que diminui a velocidade de reação e prejudica a enantiosseletividade. Para contornar a falta de solubilidade, tolueno foi testado como solvente e uma melhora na taxa de conversão e na razão enantiomérica foram observadas (Tabela 8, Entrada 6) se comparadas ao uso de hexano como solvente

A inversão observada nos levou a propor o uso do (*R*)-1-fenilpropanol (**34**) como nucleófilo esperando que o aumento da cadeia alquílica pudesse acentuar o efeito de inversão, uma vez que esse fenômeno está atrelado também ao efeito estérico criado pela estrutura do nucleófilo (Tabela 7, Entrada 7). O que se observou, no entanto, foi uma diminuição considerável da velocidade da reação (29% em 96 h) e a queda da enantiosseletividade ($E=2$), embora novamente o efeito de inversão tenha sido observado. A diminuição da velocidade da reação, especificamente da segunda etapa, devido ao nucleófilo ser mais impedido estericamente parece ser a causa dessa queda de enantiosseletividade.

O uso dos ésteres **18** e **25** como substratos também resultou na inversão da enantiopreferência da CAL-B quando 1-feniletanol como foi usado como nucleófilo (Tabela 7, Entradas 8 e 9), demonstrando que o efeito está associado ao uso do nucleófilo quiral. É importante destacar que a taxa de conversão entre os substratos quando se usou 1-feniletanol (**31**) como nucleófilo (Tabela 7, Entradas 1-3;8,9) não variou de forma tão significativa demonstrando que a segunda etapa também participa de forma significativa para a velocidade global da reação.

Do ponto de vista do mecanismo da reação, a inversão da enantiopreferência usando nucleófilos quirais, implica que a etapa determinante para a enantiodiscriminação é agora a desacilação do intermediário acil-enzima, uma vez que o nucleófilo só participa dessa etapa (Esquema 22). Se compararmos com o mecanismo para explicar a inversão da enantiopreferência no caso da transesterificação dos epímero (Esquema 21) vemos que a etapa determinante da reação muda. Essa observação demonstra claramente que ambas etapas contribuem para a enantiodiscriminação enzimática.

A inversão se torna interessante, na medida em que a primeira etapa da reação envolve o ataque do resíduo de serina à carbonila ao éster do 2-cloroetanol **26** e se levarmos em conta os resultados observados quando substratos racêmicos são transformados (Tabela 7, Entradas 1-10), essa etapa pode ser considerada (*S*) seletiva, o que implica que o fenômeno de inversão ocorre mesmo precedido por uma etapa (*S*) seletiva (Esquema 22).



Analisando os dois fenômenos de inversão, pode-se concluir que o efeito está ligado à formação e quebra dos intermediários tetraédricos que contêm o álcool quiral em sua estrutura (Figura 17), uma vez que estão presentes na primeira etapa da reação envolvendo a transesterificação dos epímeros **27** (Esquema 21) e na segunda etapa quando se trata do uso do nucleófilo quiral. A estabilidade desse intermediário também está atrelada ao reconhecimento da porção alcoólica pela enzima, o que deve alterar a forma como a porção acila é enantio-reconhecida, tornando o intermediário com configuração (*R*) na porção acila mais estável que o intermediário (*S*).

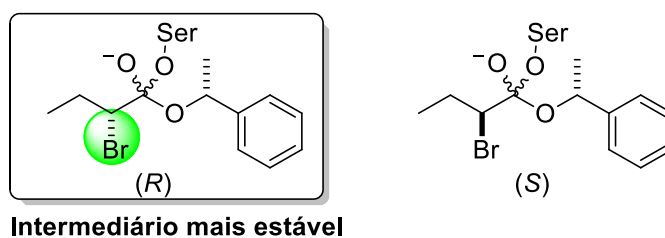


Figura 17 – Intermediários tetraédricos envolvidos no efeito de inversão.

Um hipotético perfil energético da reação envolvendo o nucleófilo quiral foi proposto. No gráfico de energia livre de Gibbs (ΔG) versus coordenada de reação (Figura 18), novamente se tem que a formação do complexo ativado enzima-substrato referente ao enantiômero (*R*), $[ES_{(R)}]^\ddagger$, continua sendo mais energética que a formação do complexo ativado enzima-substrato (*S*), $[ES_{(S)}]^\ddagger$, entretanto uma vez formado o intermediário enzima-substrato $[ES]$ o ataque do nucleófilo (*R*)-1-feniletanol (**31**) se dá de maneira mais rápida no intermediário $ES_{(R)}$, devido a menor energia de ativação para a formação do complexo ativado $[ES_{(R)}Nu]^\ddagger$, quando comparado com a do seu par enantiomérico (*S*), $[ES_{(S)}Nu]^\ddagger$. Essa diferença energética $\Delta\Delta G[ESNu]^\ddagger$ deve ser tão significativa que torna a etapa do ataque nucleofílico ao intermediário acil-enzima, determinante na enantiosseletividade da reação enzimática, o que resulta na inversão da enantiosseletividade.

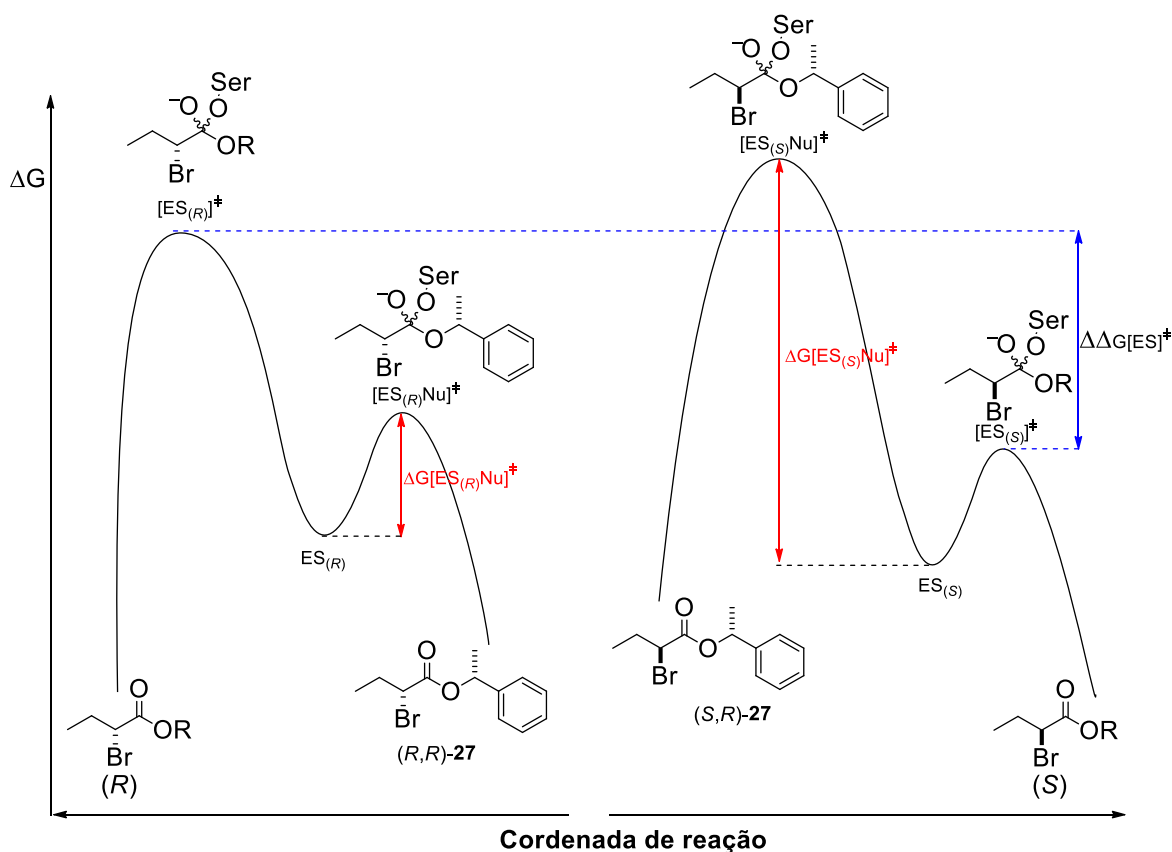
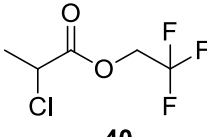
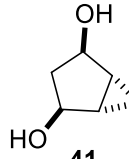
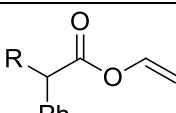
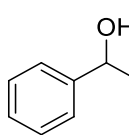
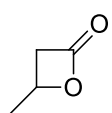
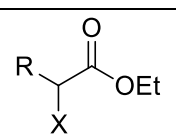
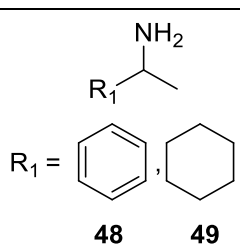




Figura 18 - Proposta do perfil energético da reação de transesterificação usando o (R)-1-feniletanol (**31**) como nucleófilo.

Embora inédito para a lipase de *Candida antarctica*, esse fenômeno de inversão já foi observado por Holmberg em 1992⁷⁸ durante a esterificação do ácido 2-cloropropiônico empregando álcoois quirais (inclusive o 1-feniletanol) mediada pela lipase de *Candida rugosa*. Naquele trabalho a reação previamente (R) seletiva se tornava (S) seletiva, o que se observou, entretanto no presente estudo foi justamente o comportamento inverso, uma enzima (S) seletiva se tornando (R) seletiva através do emprego de nucleófilos quirais, demonstrando que as características estruturais dos sítios ativos enzimáticos participam do efeito de inversão.

Frente a inversão observada, fez-se um levantamento de reações de resolução cinética dupla (RCD) envolvendo nucleófilos quirais e mediadas pela CAL-B e em nenhum dos casos os autores relataram o efeito de inversão (Tabela 9)

Tabela 9 – Substratos e nucleófilos envolvidos em resoluções cinéticas duplas (RCD) empregando CAL-B

Entrada	Substrato	Nucleófilo	Referência
1	 <p>40</p>	 <p>41</p>	79
2	 <p>R Ph</p> <p>R=Me (42) Et (43)</p>	 <p>31</p>	45 80
3	 <p>44</p>		
4	 <p>R X</p> <p>X= Br, R = CH₃ (45) X= Cl, R = CH₃ (46) X= Br, R =CH₃(CH₂)₄ (47)</p>	 <p>NH₂ R₁</p> <p>R₁ = , </p> <p>48 49</p>	65

O levantamento permite uma série de observações a respeito do efeito de inversão:

- A não inversão do éster 2-cloropropiônico (**40**), um substrato bastante similar ao objeto de estudo do presente trabalho (Tabela 9, Entrada 1) pode estar relacionada à estrutura do nucleófilo, como discutido por Holmberg⁷⁸, ou seja a presença da quiralidade no nucleófilo não implica necessariamente na inversão;
- O uso do 1-feniletanol (**31**) como nucleófilo nem sempre resulta na inversão da enantiosseletividade (Tabela 9, Entradas 2 e 3) demonstrando que a estrutura do substrato também está relacionada com o fenômeno;
- Chama a atenção a RCD dos ésteres 2-fenilalquílicos **42** e **43** (Tabela 9, Entrada 2), substratos que apresentam quiralidade devido a substituição alfa carbonílica (caso dos 2-bromoésteres estudados nessa dissertação), e que não tem a enantiopreferência alterada, sugerindo que o efeito eletrônico do átomo de bromo também pode estar envolvido no efeito da inversão;
- Por fim, a não inversão da enantiopreferência quando os 2-haloésteres **45-47** foram submetidos a RCD empregando aminas quirais estruturalmente análogas ao 1-feniletanol (**48,49**) (Tabela 9, Entrada 4), demonstra que a

inversão não está ligada somente ao efeito estérico do nucleófilo e que a natureza do nucleófilo influencia na observação ou não do fenômeno.

3.7 Inversão da enantiopreferência enzimática: um efeito químico ou enzimático?

Reações mediadas por catalisadores químicos entre um racemato de ácido carboxílico/éster e um racemato de álcool, ou a hidrólise/transesterificação de um par de diastereoisômeros, levam a formação de intermediários de reação diastereoisoméricos o que pode tornar essas reações diastereo- ou enantiosseletiva.

Essa característica inerente dessas reações não pode ser ignorada quando se discute o fenômeno observado nesse trabalho, inclusive porque a enantiosseletividade observada é baixa, $E=3-5$, o que pode gerar perguntas como se o efeito seria observado se a enantiosseletividade da reação fosse maior ou que se o efeito observado se deve puramente à presença de uma segunda entidade quiral?

A síntese química do éster 2-bromo butanoato de (*R*)-1-feniletila (**27**) levou a formação de um produto com excesso diastereoisomérico de 12% (*S,R*), indicando que a carbonila do ácido que possui configuração (*S*) sofre menos impedimento estérico ao ataque do (*R*)-1-feniletanol (Figura 19, linha preta). Em contraste, quando a lipase catalisou a reação de transesterificação empregando (*R*)-1-feniletanol como nucleófilo (Tabela 8) o éster apresentou excesso diastereoisomérico (*R,S*) (Figura 19, linha vermelha), o que corrobora para o entendimento do fenômeno como atrelado à presença da enzima.

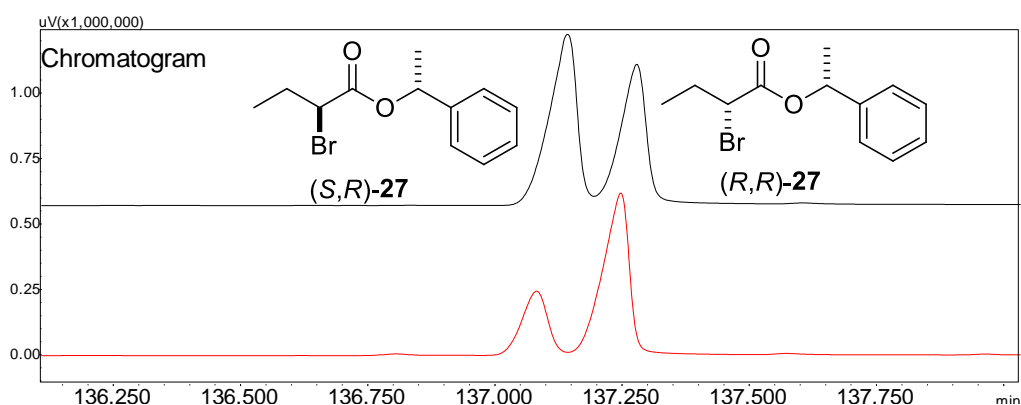


Figura 19 – Cromatogramas do éster **27** com a porção acila (*S*)-enriquecida proveniente da síntese química (linha preta) e (*R*)-enriquecida proveniente da síntese enzimática.

3.8 Efeito do solvente na enantiosseletividade da reação enzimática

O 2-bromo butanoato de 2-cloroetila (**26**) também foi escolhido para uma triagem de solventes visando melhorar a enantiosseletividade da reação (Tabela 10). Além do *n*-hexano os solventes escolhidos foram acetato de etila (serve tanto como solvente da reação e fonte de etanol), ciclohexano (solvente cíclico que em algumas reações aumenta a enantiosseletividade enzimática devido à essa característica estrutural), éter *tert*-butilmetílico (solvente com log P baixo usualmente usado em reações envolvendo substratos mais polares), *tert*-butanol e clorofórmio (solventes que apresentaram seletividade inversa no trabalho de Graça *et al.*⁸¹). O uso do líquido iônico [Bmim]/[BF₄] como cosolvente nas reações enzimáticas também foi estudado, também baseado no trabalho de Graça *et al.*⁸¹ onde foi observado um aumento significativo no E da reação de aminólise do mandelato de metila quando se empregava líquidos iônicos como solvente.

Tabela 10 - Efeito do solvente sobre a enantiosseletividade da RCE.

Reaction scheme: CCCC(=O)OCCCl.Br + EtOH $\xrightarrow[\text{Solvente, 35 } ^\circ\text{C}]{\text{CAL-B}}$ CCCC(=O)OCCCl.Br (*R*)-**26** + CCCC(=O)OCC.OEt.Br (*S*)-**19**

Entrada	Solvente	log P	Tempo (h)	c (%)	e.e. _s (%)	e.e. _p (%)	E
1	Hexano	3,5	0,5	75	88	29	5
2	Hexano/[Bmim][BF ₄] ^a	-	0,5	19	13	57	4
3	Ciclohexano	3,2	0,5	73	89	33	5
4	<i>t</i> -Butanol	0,58	0,5	84	80	15	3
5	<i>t</i> -Butanol/[Bmim][BF ₄] ^a	-	0,5	14	10	60	4
6	MTBE	0,94	1	78	86	24	4
7	Clorofórmio	2,0	4	68	80	38	5
8	Clorofórmio/[Bmim][BF ₄] ^a	-	4	42	39	54	5
9	Acetato de etila ^b	0,68	4	83	96	20	5

Condições reacionais: Éster (0,1 mmol), CAL-B (20 mg), etanol (4 mmol), solvente (2 mL), 35 °C. ^a Mistura solvente orgânico/líquido iônico (10:1 v/v). ^b Ácetato de etila foi usado como solvente e fonte de etanol.

A triagem de solventes não resultou na alteração significativa do valor da razão enantiomérica da reação, os valores continuaram na faixa de 3-5. Por outro lado, a taxa de conversão da reação se mostrou dependente da natureza do solvente. A adição do líquido iônico como co-solvente (Tabela 10, Entradas 2, 5 e 8) resultou na considerável diminuição da taxa de conversão da reação, resultado também observado no trabalho de Graça *et al.*⁸¹ mas em termos de enantiosseletividade da reação não houve alteração.

Analisando o log P dos solventes era de se imaginar que o *tert*-butanol (Tabela 10, Entrada 4) seria o solvente em que a reação teria a menor taxa de conversão (menor log P, mais hidrofílico, maior capacidade de retirar/alterar a água da camada de hidratação

da enzima), isso não foi observado e pode ser explicado pela maior solubilidade do nucleófilo no meio reacional. A observação que os solventes MTBE, Clorofórmio e Acetato de etila (Tabela 10, Entradas 6, 7 e 9), apresentaram taxas de conversão menores que o dos hidrocarbonetos (Tabela 10, Entradas 1 e 2), pode ser explicada novamente pelo log P, uma vez que solventes polares usualmente causam a diminuição da atividade enzimática pela maior interação com a camada de hidratação da enzima (Tópico 1.5.2.2)

4 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O estudo da transesterificação enzimática dos ésteres derivados do ácido 2-bromo butírico (1) permitiu observar a influência da reversibilidade da reação sobre a enantiosseletividade enzimática e, através da mudança na concentração do nucleófilo, foi possível observar excessos enantioméricos acima de 80%.

A similaridade dos valores observados para a razão enantiomérica das reações de resolução cinética enzimática, indica que alterações mais significativas devem ser feitas tanto na estrutura do substrato como no nucleófilo.

A presença do heteroátomo de oxigênio no álcool 2-etóxi-etanol resultou no aumento da taxa de conversão da reação, demonstrando que características estruturais do nucleófilo, nesse caso ligação de hidrogênio intramolecular, podem auxiliar a catálise enzimática.

Embora várias alterações na porção alcoólica dos substratos tenham sido realizadas (tamanho da cadeia alquílica, presença de insaturações, heteroátomos), não foi possível observar a melhora da enantiosseletividade. Por outro lado, a taxa de conversão da reação se mostrou sensível a estrutura da porção alcóolica, e novamente se pode observar o efeito do heteroátomo de oxigênio como auxiliar da catálise enzimática através da estabilização do intermediário tetraédrico através de uma ligação de hidrogênio com o resíduo catalítico de histidina.

Além disso foi possível observar a inversão da enantiopreferência enzimática quando se empregou o éster derivado do (*R*)-1-feniletila (27), uma prova de que a engenharia da porção alcoólica pode alterar significativamente o reconhecimento enzimático. Estudos de modelagem molecular são necessários para entender de forma mais clara a inversão da enantiosseletividade enzimática observada. Até o momento essa é a primeira vez que esse efeito é relatado na literatura empregando a lipase CAL-B.

O efeito de inversão também foi observado quando se usou álcoois secundários benzílicos quirais, 1-feniletanol e derivados, e mostra de forma clara que as duas etapas da transformação enzimática (acilação e desacilação), contribuem para a determinação da enantiosseletividade da reação. Novamente, o efeito observado é inédito para a CAL-B embora esse efeito tenha sido relatado em uma reação mediada pela lipase *Candida rugosa*.

De forma geral, as alterações nas condições reacionais e engenharia de substrato e solvente não foram suficientes para tornar a reação suficientemente enantiosseletiva para que houvesse a possibilidade de resolução satisfatória do substrato. Entretanto foi possível manipular a enantiosseletividade enzimática apenas pela engenharia do substrato/nucleófilo, o que contorna uma das maiores deficiências da catálise enzimática: a ausência de um sítio ativo enantiocomplementar.

Como perspectivas do trabalho se têm a continuação do estudo do fenômeno de inversão através do:

- Aumento do número de substratos, variando a posição do bromo, o tamanho da cadeia alquílica, o efeito de outros haletos e substituintes na posição;
- Uso de outros nucleófilos quirais, mais estericamente impedidos como o 1-(2-Naftil)-etanol, ou que tenham heteroátomos capazes de auxiliar na catálise enzimática como o 1-(2-Furil)etanol;
- Estudos cinéticos e uso de modelagem molecular.

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Considerações gerais

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em um espectrômetro Bruker DPX200 operando em 200 MHz para o núcleo de hidrogênio e 50 MHz para o núcleo de carbono. Os deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^1H foram expressos em relação ao tetrametilsilano ($\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ppm) e de RMN de ^{13}C foram expressos em relação ao solvente ($\delta_{\text{CDCl}_3} = 77,0$ ppm). As multiplicidades dos sinais de RMN de ^1H foram relatadas como se segue: deslocamento químico em ppm (δ), multiplicidade (s = simpleto, d = duplete, dd = duplo duplete, t = tripleto, q = quarteto, m = multiplete) constante de acoplamento em hertz (Hz) e intensidade relativa (integral). Os dados de RMN de ^{13}C foram relatados como se segue: deslocamento químico em ppm (δ).

Os espectros de massas foram obtidos em um CG-EM Shimadzu QP- 5050A com coluna capilar DB-5 com detecção via espectrometria de massas, ionização por impacto de elétrons (70 eV), injetor do modo split a 250 °C.

Para o acompanhamento das reações via cromatografia gasosa foi utilizado um cromatógrafo a gás Shimadzu GC-17A com coluna capilar quiral Chirasil-Dex CB, com dimensões 25 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro. Foi utilizada a programação de temperatura adequada para a separação de cada composto.

Os reagentes foram usados sem purificação prévia. Os solventes utilizados nas sínteses, hexano e acetato de etila foram destilados previamente.

Para a determinação da rotação óptica específica foi utilizado um equipamento modelo Jasco P2000 com cela contendo 1 cm de caminho óptico, utilizando hexano como solvente.

O excesso enantiomérico foi calculado através da diferença de áreas entre os picos dos enantiômeros determinados por cromatografia gasosa (Equação 2):

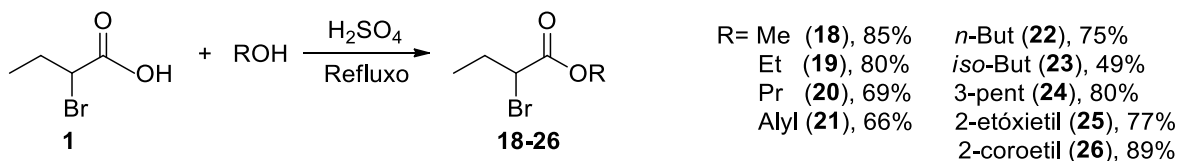
$$\text{excesso enantiomérico (\%)} = \frac{(R) - (S)}{(R) + (S)} \times 100$$

Equação 2 – Cálculo do excesso enantiomérico

5.2 Procedimento experimental

5.2.1 Síntese e caracterização dos ésteres racêmicos

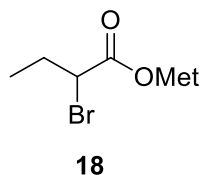
Os ésteres **18-26** foram sintetizados através da reação entre o ácido 2-bromo butírico (**2**) e os respectivos álcoois na presença de ácido sulfúrico e refluxo. Os produtos foram obtidos como óleos incolores ou levemente amarelados, e foram usados nas reações enzimáticas sem purificação.



Esquema 23 – Síntese dos ésteres **18-26**

SÍNTESE DOS ÉSTERES **18-22**⁸²

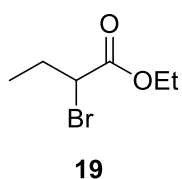
Em um balão de 25 mL conectado a um condensador de refluxo, foi adicionado ácido 2-bromo butírico (**1**) (1,670g, 10 mmol) e o álcool respectivo (metanol (10 mL); etanol (10 mL); propanol (1,800 g, 30 mmol); álcool alílico (1,742 g, 30 mmol); *n*-butanol (10 mL); *iso*-butanol (2,223 g, 30 mmol)). A essa solução foi adicionado 0,1 mL de H₂SO₄ e o sistema a foi mantido em refluxo pelo período apropriado (*overnight* nos casos dos ésteres **18**, **19e 20**; 6 h nos casos dos ésteres **20,21** e **22**). Após esse período a mistura reacional foi transferida para um funil de separação e adicionou-se 15 mL de acetato de etila. Essa solução foi lavada com solução saturada de NaHCO₃ (3 x 15 mL), a fase orgânica foi seca usando MgSO₄ anidro e concentrado a pressão reduzida.



RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS), δ (ppm): 1,03 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H); 1,9-2,2 (m, 2H); 3,79 (s, 3H); 4,14-4,22 (dd, *J* = 7,7 Hz, 7,6 Hz, 1H).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 11,9; 28,4; 47,4; 52,9; 170,2.

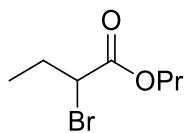
CG-EM (70 eV), *m/z* (intensidade relativa): 154 (64%); 152 (68%); 123 (19%); 121 (20%); 101 (65%); 69 (35 %); 59 (100%); 55 (22%); 42 (16%). Rendimento: 85%. Óleo incolor.



RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS), δ (ppm): 1,03 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H); 1,30 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H); 1,89-2,23 (m, 2H); 4,16 (dd, *J* = 7,7Hz, 7,6 Hz, 1H); 4,24 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H).

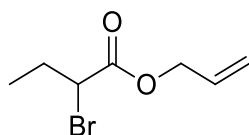
RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 11,9; 14,0; 28,4; 47,8; 61,9; 169,8. **CG-EM** (70 eV), *m/z* (intensidade relativa): 168 (66%); 166 (68%); 123 (53%); 121 (55%);

115 (65%); 87 (30%); 69 (28%); 55 (47%); 45 (24%); 43 (100%).
Rendimento: 80%. Óleo incolor.



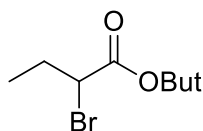
20

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS), δ (ppm): 0,97 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H); 1,03 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H); 1,61-1,79 (m, 2H); 1,89-2,24 (m, 2H); 4,11-4,21 (m, 3H). **RMN de ^{13}C** (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 10,3; 11,9; 21,9; 28,4; 47,9; 67,4; 169,9. **CG-EM** (70 eV), m/z (intensidade relativa): 169 (18%); 167 (20%); 123 (8%); 121 (8%); 55 (12 %); 43 (100 %); 42 (24 %). Rendimento: 69%. Óleo levemente amarelado



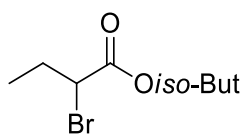
21

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS), δ (ppm): 1,04 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H); 1,91-2,25 (m, 2H); 4,20 (t, 7,7 Hz, 1H); 4,67 (m, 2H); 5,26-5,42 (m, 2H); 5,84-6,04 (m, 1H). **RMN de ^{13}C** (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 11,9; 28,4; 47,6; 66,3; 118,9; 131,4; 169,4. **CG-EM** (70 eV), m/z (intensidade relativa): 151 (70%); 149 (74%); (127 (98%); 123 (87%); 120 (99%); 85 (31%); 81 (58%); 71 (35%); 70 (34%); 69 (42%); 57 (76%); 55 (100%); 43 (33%); 42 (42%). Rendimento: 66%. Óleo levemente amarelado.



22

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS), δ (ppm): 0,95 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H); 1,03 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H); 1,32-1,50 (m, 2H); 1,59-1,73 (m, 2H); 1,89-2,23 (m, 2H); 4,13-4,21 (m, 3H). **RMN de ^{13}C** (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 11,9; 13,6; 19,0; 28,4; 30,5; 47,9; 65,7; 169,9. **CG-EM** (70 eV), m/z (intensidade relativa): 169 (9%); 167 (10%); 121 ((%); 87 (10%); 69 (8%); 57 (84%); 56 (100%); 55 (25%); 43 (11%); 42 (9%). Rendimento: 75%. Óleo levemente amarelado.

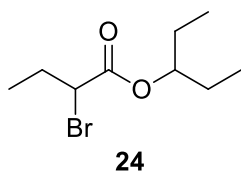


23

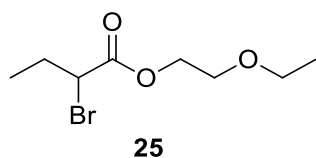
RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS), δ (ppm): 0,94 (d, $J = 6,7$ Hz, 6H); 1,03 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H); 2,05 (m, 3H); 3,96 (m, 2H); 4,18 (m, 1H); **RMN de ^{13}C** (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 11,9; 19,0; 27,7; 28,4; 47,9 71,8; 169,9. **CG-EM** (70 eV), m/z (intensidade relativa): 151 (10%); 149 (11%); 123 (12%); 121 (12%); 70 (9%); 57 (76%); 56 (100%); 43 (11%); 42 (8%). Rendimento: 49%. Óleo levemente amarelado.

SÍNTESE DOS ÉSTERES 24-26⁸²

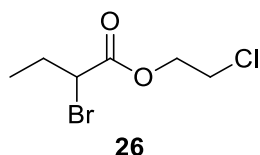
Em um balão de 50 mL conectado a um condensador de refluxo e um separador Dean-Stark foi adicionado ácido 2-bromo butírico (**2**) (1,670 g, 10 mmol) e o respectivo álcool (3-pentanol (2.644 g, 30 mmol); 2-cloro etanol (2,416 g, 30 mmol); 2-etóxi etanol (2,416 g, 30 mmol)) e 20 mL de isooctano. A essa solução foi adicionado 0,1 mL de H₂SO₄ e o sistema foi mantido em refluxo por 8 h. Após esse período, a mistura reacional foi transferida para um funil de separação e adicionou-se 10 mL de acetato de etila. Essa solução foi lavada com solução saturada de NaHCO₃ (3 x 15 mL), a fase orgânica foi seca usando MgSO₄ anidro e concentrado a pressão reduzida.



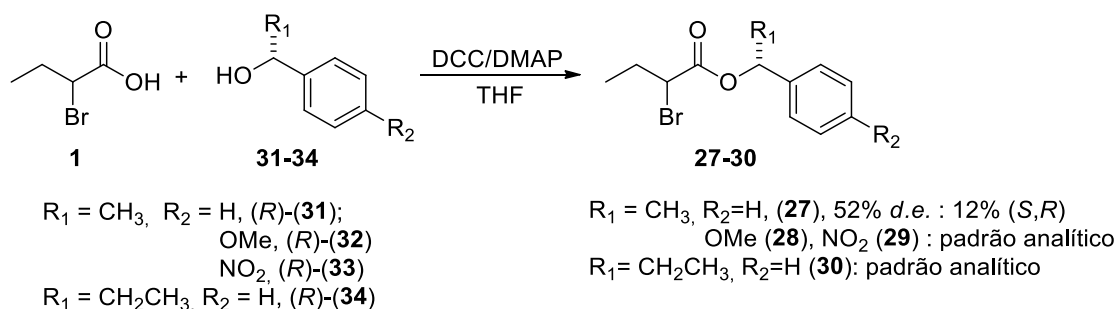
RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS), δ (ppm): 0,85 – 0,97 (m, 6H); 1,03 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H); 1,52 – 1,71 (m, 4H); 1,88 – 2,24 (m, 2H); 4,16 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H); 4,74 – 4,89 (m, 1H). **RMN de ¹³C NMR** (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 9,5; 11,9; 26,4; 28,4; 48,3; 78,5; 169,7. Rendimento: 80%. Óleo amarelado.



RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS), δ (ppm): 1,04 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H); 1,21 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H); 1,9 – 2,24 (m, 2H); 3,54 (q, *J* = 7,0 Hz, 2H); 3,64-3,69 (m, 2H); 4,21 (t, 7,6 Hz, 1H); 4,3-4,35 (m, 2H). **RMN de ¹³C** (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 11,8; 15,1; 28,4; 47,6; 64,5; 66,7; 68,0; 169,8. **CG-EM (70 eV)**, *m/z* (intensidade relativa): 123 (8,8%); 121 (9%); 114 (10%); 99 (9%); 72 (100%); 59 (77%); 55 (18%); 45 (37%); 44 (31%); 43 (32%). Rendimento: 77%. Óleo amarelado.

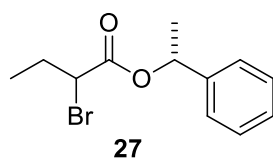


RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS), δ (ppm): 1,05 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H); 1,92-2,26 (m, 2H); 3,69-3,75 (m, 2H); 4,21 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H); 4,40-4,46 (m, 2H). **RMN de ¹³C** (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 11,9; 28,3; 41,1; 47,1; 66,1; 169,5. **CG-EM (70 eV)**, *m/z* (intensidade relativa): 202 (35%); 200 (27%); 151 (32%); 149 (49%); 123 (35%); 121 (39%); 107 (11%); 87 (22%); 69 (31%); 65 (32%); 64(20%); 63 (100%); 62 (56%); 55 (33%); 43 (13%); 42 (23%). Rendimento: 89%. Óleo amarelado.

SÍNTESE DOS ÉSTERES 27-30⁸³

Esquema 24 – Esquema geral da síntese dos ésteres 27-30.

Em um balão de 25 mL contendo ácido 2-bromo butírico (**1**) (0,336 g, 2 mmol), (*R*) 1-feniletanol (**31**) (0,257 g, 2,1 mmol), *N,N*-dimetil-aminopiridina, DMAP, (24 mg 0,2 mmol) e 15 mL de THF, foi adicionado diciclohexilcarbodiimida, DCC, (0,480 g, 2,3 mmol) à 0 °C e mantida essa temperatura por 15 minutos. A solução foi deixada sob agitação à temperatura ambiente overnight, e hexano (15 mL) foi adicionado. A solução foi filtrada sob celite e o filtrado seco com MgSO₄ e concentrado à pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia flash em sílica gel usando hexano:acetato de etila (20:1) como fase móvel, fornecendo o 2-bromobutanoato de (*R*)-1-feniletila (**27**) como um óleo incolor (0,284 g, 1,05 mmol, 52% de rendimento).

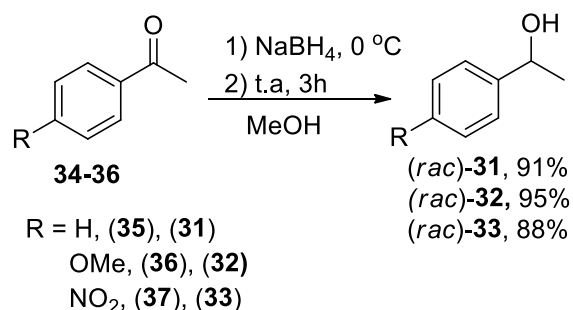


RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS), δ (ppm): 0,94-1,04 (m, 3H); 1,58 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H); 1,88-2,23 (m, 2H); 4,14-4,22 (m, 1H); 5,87-5,98 (*m*, 1H); 7,29-7,40 (*m*, 5H). **RMN de ¹³C** (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 11,9; 21,8; 22,0; 28,4; 48,1; 73,4; 126,0; 126,1; 128,1; 128,6; 140,8; 140,9; 168,8; 160,9. Rendimento: 52%. Óleo incolor.

Os ésteres **28-30** foram sintetizados em microescala apenas para comparação cromatográfica de acordo com o seguinte procedimento: em um vial de 4 mL com agitação magnética, DCC (21 mg, 0,1 mmol) foi adicionado à uma solução contendo o álcool (*R*) (*p*-metóxi-1-feniletanol (**32**) (15 mg, 0,1 mmol); *p*-nitro-1-feniletanol (**33**) (17 mg, 0,1 mmol); 1-fenilpropanol (**34**)), o ácido 2-bromobutírico (**1**) (17 mg, 0,1 mmol), DMAP (2mg, 0,02 mmol) e 2 mL de THF. A solução foi mantida sob agitação overnight à temperatura ambiente, filtrada e lavada com uma solução saturada de NaHCO₃ (3 x 2 mL). Uma alíquota de 20 µL da fase orgânica foi retirada e diluída em 100 µL de acetato de etila e analisada por CG.

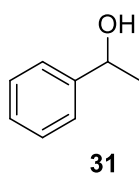
SÍNTESE DOS ÁLCOOIS RACÊMICOS 31-33

Os álcoois **31-33** foram sintetizados através da redução das respectivas cetonas usando borohidreto de sódio (Esquema 25)

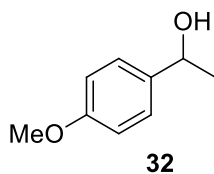


Esquema 25 – Síntese dos racematos **31-33**

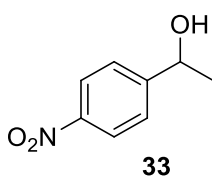
Em um balão de 25 mL imerso em banho de gelo contendo uma solução da respectiva cetona (acetofenona (**35**) (2,403 g, 20 mmol); *p*-metóxi-acetofenona (**36**) (3,000 g, 20 mmol); *p*-nitro-acetofenona(**37**) (3,303 g, 20 mmol)) em 20 mL de metanol, borohidreto de sódio, NaBH₄, (0,82 g, 22 mmol) foi adicionado em porções. Após a adição do NaBH₄ o banho de gelo foi retirado e a reação deixada sob agitação a temperatura ambiente por 3 h. O metanol foi retirado via evaporação rotatória e ao sólido pastoso resultante adicionou-se uma solução saturada de NH₄Cl (10 mL), o pH dessa solução foi ajustado até 7 com auxílio de uma solução de HCl 2 mol L⁻¹. A fase aquosa foi lavada com diclorometano (3 x 10 mL), a fase orgânica reunida e seca com MgSO₄ e concentrada no rotaevaporador, fornecendo os respectivos álcoois **31-33**.



RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS), δ (ppm): 1,48 (d, J = 6,5 Hz, 3H); 4,88 (q, 1H); 7,20- 7,40 (m, 5H). **RMN de ¹³C** (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 25,2; 70,4; 125,4; 127,5; 128,5; 145,9. Rendimento: 91%. Óleo incolor.



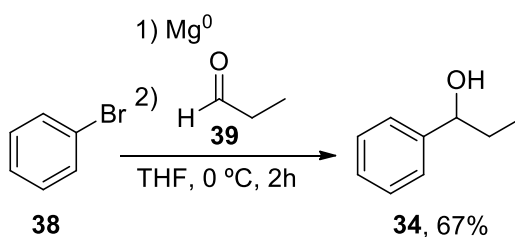
RMN de ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, TMS), δ (ppm): 1,45 (d, J = 6,5 Hz, 3H), 3,79 (s, 3H), 4,82 (q, J = 6,5 Hz, 1H), 6,86 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,28 (d, J = 8,7 Hz, 2H). **RMN de ¹³C NMR** (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 25,0, 55,3, 69,9, 113,8, 126,7, 138,0, 158,9. Rendimento: 95%. Óleo incolor.



RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS), δ (ppm): 1,50 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H), 5,00 (q, $J = 6,5$ Hz, 1H), 7,52 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 8,15 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H). **RMN de ^{13}C NMR** (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 25,3, 22,2, 71,2, 123,8, 126,7, 147,4, 148,9, 170,0. Rendimento: 88%. Óleo amarelo.

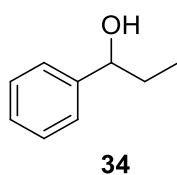
SÍNTESE DO ÁLCOOL **34**

O álcool **34** foi sintetizado através da reação de Grignard, usando bromobenzeno (**34**) e propanaldeído (**35**) (Esquema 26).

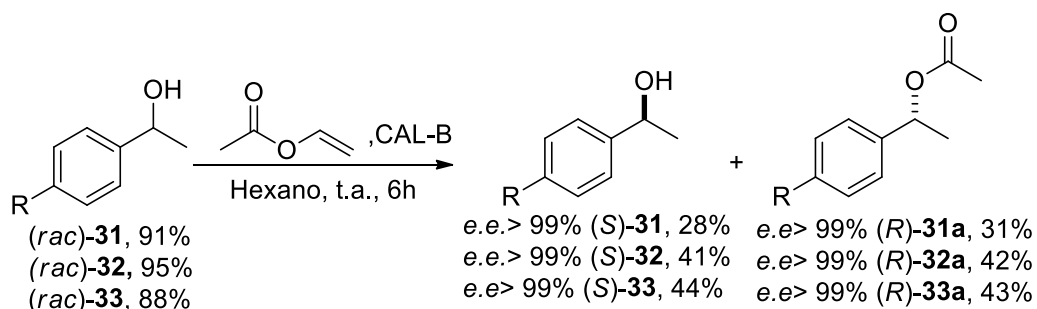


Esquema 26 – Síntese do 1-fenilpropanol (**32**)

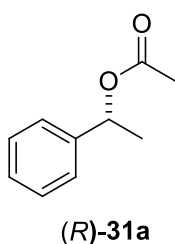
Em um balão de duas bocas sob atmosfera de nitrogênio, magnésio (0,292 g, 12 mmol) e uma quantidade catalítica de iodo foram adicionados. O balão foi flambado até a sublimação do iodo (procedimento repetido duas vezes). Após essa etapa, 5 mL de THF anidro foi adicionado ao sistema seguido da adição gota à gota do haleto **38** (1,5701g, 1,05 mmol). Após a total adição do haleto mais 5 mL de THF anidro foi adicionado ao sistema e a solução foi mantida sobre agitação até o consumo do magnésio. O sistema foi então resfriado à 0 °C, 15 ml de THF anidro foi adicionado e propanalaldeído (**39**) (0,8712g, 15 mmol, 1,075 mL) foi adicionado gota à gota. A reação foi mantida à 0 °C por 2 h e interrompida através da adição de uma solução saturada de NH_4Cl (30 mL). A fase orgânica foi separada e a fase aquosa lavada com éter etílico (3 x 20mL). As frações orgânicas foram agrupadas, secas com MgSO_4 e o excesso de solvente retirado em um evaporador rotatório. O óleo obtido foi purificado por cromatografia *flash* empregando uma mistura hexano/acetato (9:1) fornecendo o álcool **34** como um óleo incolor.



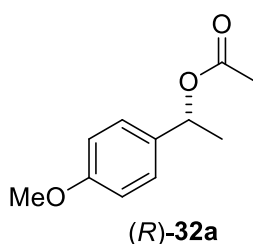
RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS), δ (ppm): 0,88 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H), 1,66-1,86 (m, 2H), 4,53 (t, $J = 6,6$ Hz, 1H), 7,26-7,36 (m, 5H). **RMN de ^{13}C** (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 10,1; 31,9; 76,0, 126,0, 127,4, 128,4, 144,6. Rendimento: 67%. Óleo incolor.

RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA DOS ÁLCOOIS **31-33**Esquema 27 – Resolução cinética enzimática dos álcoois **31-33**.

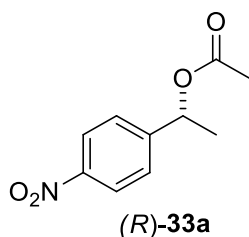
Em um balão de 50 mL contendo o álcool racêmico (1-feniletanol (**31**) (1,222 g, 10 mmol); *p*-metóxi-1-feniletanol (**32**) (1,520 g, 10 mmol); *p*-nitro-1-feniletanol (**33**) (1,671g, 10 mmol)) acetato de vinila (2,583 g, 30 mmol) e 20 mL de hexano, foi adicionado 500 mg de CAL-B. Essa solução foi mantida sob agitação e a conversão da reação foi monitorada por cromatografia gasosa até que se observasse 50% de conversão. A enzima foi retirada do meio reacional por filtração e o filtrado concentrado sob pressão reduzida. O resíduo foi submetido a cromatografia flash em sílica gel usando hexano: acetato de etila 9:1 como fase móvel, fornecendo acetato os (*R*)-acetatos **31a-33a** e os álcoois (*S*)-**31-33** com excessos enantioméricos superiores à 99%. Os espectros obtidos dos álcoois foram idênticos aos do racemato por isso serão omitidos.



RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS), δ (ppm): 1,53 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H); 2,07 (s, 3H); 5,88 (q, $J = 6,6$ Hz 5H); 7,23-7,38 (m, 5Hz). **RMN de ^{13}C** (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 21,4; 22,2; 72,3; 126,1; 127,9; 128,5; 141,7; 170,3. Rendimento: 31%. Óleo incolor.

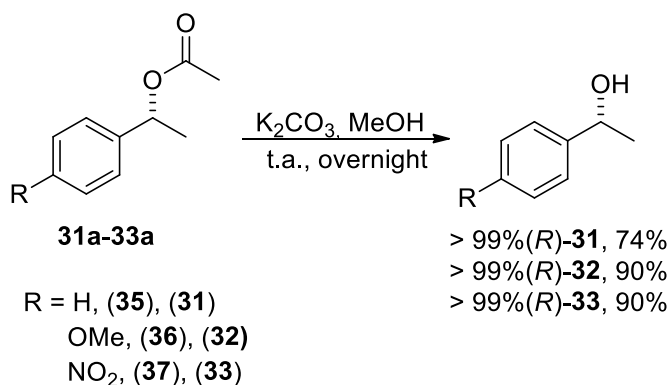


RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS), δ (ppm): 1,51 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H), 2,03 (s, 3H), 3,77 (s, 3H), 5,84 (q, $J = 6,5$ Hz, 1H), 6,87 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 7,29 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H). **RMN de ^{13}C** (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 21,3; 21,9; 55,2; 72,0; 113,8; 127,6; 133,7; 159,3; 170,3. Rendimento: 42%. Óleo incolor.



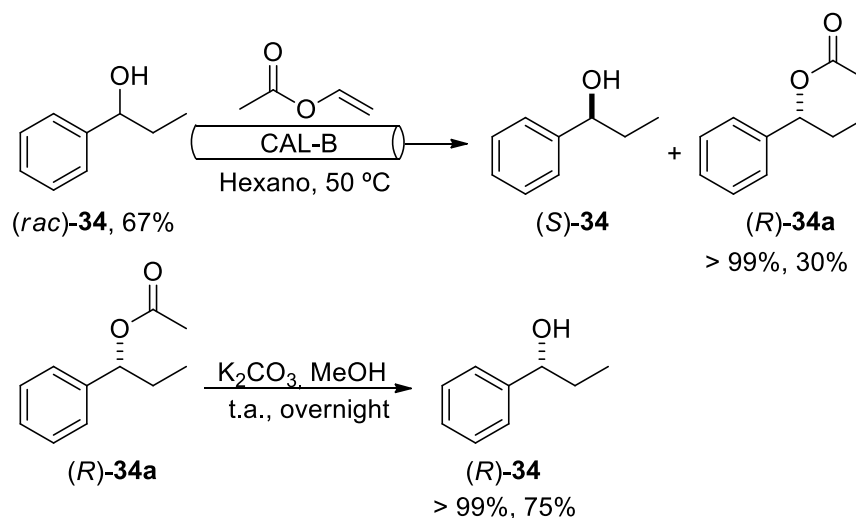
RMN de ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , TMS), δ (ppm): 1,56 (d, J = 6,7 Hz, 3H), 2,12 (s, 3H), 5,93 (q, J = 6,7 Hz, 1H), 7,51 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 8,22 (d, J = 8,8 Hz, 2H). **RMN de ^{13}C NMR** (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 21,1; 22,2; 71,2; 123,8; 126,7; 147,4; 149,0; 170,0. Rendimento: 43%. Óleo amarelo.

ETAPA III: HIDRÓLISE DOS ACETATOS **31a-33a**



Esquema 28 – Hidrólise dos acetatos (*R*)-**31a-33a**.

Em um balão de 25 ml foi adicionado K_2CO_3 (0,900 g, 6,5 mmol) à uma solução dos respectivos (*R*)-acetatos (3 mmol) em 15 mL de metanol. A solução foi mantida sob agitação à temperatura ambiente pelo período da noite, e o excesso de metanol retirado sob pressão reduzida. Éter foi adicionado ao balão (15 mL) e fase orgânica lavada com 10 mL de água destilada. A fase aquosa foi lavada com éter (2 x 15 mL), as fases orgânicas reunidas, secas com MgSO_4 , e concentrada sobre pressão reduzida, fornecendo os álcoois (*R*)-**31-33** com excesso enantiomérico maior que 99%.

OBTENÇÃO DO (*R*)-1-FENILPROPANOL (**34**)

Esquema 29 – RCE em fluxo do álcool **34**, seguida de hidrólise do acetato (*R*)-**34a**.

A obtenção do álcool **34** se deu através do uso de um sistema em fluxo “*home-made*” desenvolvido no nosso laboratório⁷², isso porque como verificado por Thomas⁷² a reação em batelada para esse substrato é muito lenta.

Procedimento experimental: Uma solução contendo álcool **34** (0,740 g, 5,43 mmol) e acetato de vinila (1,89 g, 22 mmol) em 60 mL de hexano foi eluída à 0,1 mL/min. Após a eluição do volume total o solvente e o doador acila foram retirados sob pressão reduzida, e o óleo resultante submetido a cromatografia *flash*, fornecendo o acetato (*R*)-**34a** (e.e. >99%, rendimento de 30%).

O acetato (*R*)-**34a** (0,284 g, 1,59 mmol) foi diluído em 10 mL de metanol, K₂CO₃ (0,439 g, 3,18 mmol) foi adicionado e a solução deixada sobre agitação overnight à temperatura ambiente. O excesso de metanol foi retirado usando um evaporador rotatório, éter foi adicionado ao balão (15 mL) e a solução orgânica lavada com água destilada (15 ml). A fase aquosa foi extraída com éter etílico (2 x 15 mL), as frações orgânicas reunidas, secas com MgSO₄, concentrada sob pressão reduzida, fornecendo o álcool (*R*)-1-fenilpropanol (**34**) com 75% de rendimento e pureza enantiomérica maior que 99% (espectros de RMN de ¹³C e ¹H idênticos à mistura racêmica.)

5.2.2 Resolução cromatográfica dos 2-bromo ésteres 18-30

A resolução cromatográfica dos ésteres **18-30** se deu via cromatografia gasosa foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu GC-17A com coluna capilar quiral Chirasil-Dex CB, com dimensões 25 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro, e temperatura do injetor e detector: injetor de 275 °C. Foi utilizada a programação de temperatura adequada para a separação de cada composto (Tabela 11).

Tabela 11 - Tempo de retenção dos 2-bromoésteres **16-28**

Ester	Método	Tempo de retenção	
		(S)	(R)
18	A	9,9	10,7
19		13,2	14,1
20		22,9	24,0
21		23,1	24,7
22		32,9	33,1
23		30,0	30,3
24		37,5	37,8
25		36,1	36,6
26	B	101,9	102,6
27	C	137,1	137,3
28	D	152,2	152,6
29	E	124,8	125,2
30	F	59,0	59,2

Método A: 90 °C mantida por 28 minutos, taxa de aquecimento de 10 °C/min até 150 °C, tempo de espera de 15 minutos.

Método B: temperatura inicial de 70 °C mantida por 80 minutos seguido de aquecimento à uma taxa de 1 °C/min até 150 °C (mantido por 6 minutos). A temperatura foi elevada até 210 °C. à uma taxa de 15 °C/min e mantida por 15 minutos.

Método C: temperatura inicial de 90 °C mantida por 120 minutos e programada para 150 °C (mantido por 6 minutos) à uma taxa de aquecimento de 10 °C/min. A temperatura foi elevada até 210 °C (15 °C/min) e mantida por 15 minutos.

Método D: temperatura inicial de 90 °C mantida por 70 minutos, programada até 150 °C (1 °C/min) e mantida a essa temperatura por 6 minutos. A temperatura foi então elevada até 210 °C à uma taxa de 5 °C/min e mantida por 15 minutos.

Método E: temperatura inicial de 90 °C mantida por 70 °C, programada até 150 °C à uma taxa de 10 °C/min e mantida por 6 minutos. A temperatura foi elevada à 210 °C à uma taxa de 2 °C/min e mantida adicionalmente por 15 minutos.

Método F: temperatura inicial de 80 °C mantida por 38 minutos seguido de aquecimento à uma taxa de 10 °C/min até 150 °C e mantido por 6 minutos. Aquecimento até 210 °C à 15°C/min e mantida adicionalmente por 15 minutos.

5.2.3 Resolução cromatográfica dos álcoois benzílicos secundários 31-34

A resolução cromatográfica dos álcoois **31-34** se deu via cromatografia gasosa foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu GC-17A com coluna capilar quiral Chirasil-Dex CB, com dimensões 25 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro, e temperatura do injetor e detector : injetor de 275 °C. Foi utilizada a programação de temperatura adequada para a separação de cada composto (Tabela 11).

Tabela 12 - Tempo de retenção dos álcoois **28-31**

Ester	Método	Tempo de retenção	
		(R)	(S)
31	G	16,4	17,2
32	H	32,5	33,4
33	I	56,5	57,9
34	J	53,9	54,3

Método G: isoterma de 110 °C por 20 minutos;

Método H: isoterma de 125 °C por 40 minutos;

Método I: temperatura de inicial de 120 °C aquecida à uma taxa de 1 °C/min até 160 °C e mantida por 30 minutos;

Método J: temperatura inicial de 80 °C mantida por 30 minutos seguido de aquecimento até 210 °C à uma taxa de 2 °C/min.

5.2.4 Determinação da enantiopreferência enzimática

A determinação da enantiopreferência enzimática nas reações de RCE, se deu através do isolamento do produto e do substrato da reação de esterificação enzimática do ácido 2-bromo butírico (**1**) mediada pela lipase CAL-B, seguido de análise polarimétrica.

Em um balão de 25 mL foram adicionados ácido 2-bromo butírico (**11**) (0,334 g, 2 mmol), etanol (0,276 g, 6mmol), 10 mL de hexano e 50 mg da lipase CAL-B. A solução foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 4h, e após esse período, a enzima foi retirada do meio reacional por filtração. O filtrado foi lavado com solução saturada de NaHCO₃ (2 x 10 mL), e a fase orgânica seca com MgSO₄ e concentrada sob pressão reduzida fornecendo 95 mg do éster **19** enantioenriquecido que foi analisado via cromatografia gasosa e por polarimetria. A fase aquosa foi acidificada com solução aquosa de HCl 6 mol L⁻¹ até pH = 1, e lavada com éter etílico (3 x 10 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄ e o solvente retirado sob pressão reduzida, fornecendo 0,225 g do ácido **1** enantioenriquecido, que foi analisado via polarimetria.

Em um vial de 4 mL, o ácido **1** (10 mg), 1 mL de etanol e 1 gota de H₂SO₄, foram submetidos a aquecimento de 60 °C por 1 h. Adicionou-se então 5 mL de uma solução saturada de NaHCO₃ e posteriormente 5 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi analisada por cromatografia gasosa em fase estacionária quiral para determinar o excesso enantiomérico (e.e. = 14%).

A análise polarimétrica forneceu para o éster **19** enantioenriquecido $[\alpha]_D^{23} = -6,027$ (c 1,5g/100 mL, MeOH), que por comparação com a literatura indica uma mistura (*S*) enriquecida.⁸⁴ A análise via cromatografia forneceu um valor de 76% de excesso enantiomérico.

A análise polarimétrica do ácido **19** enantiomericamente enriquecido forneceu um valor de $[\alpha]_D^{23} = + 4,481$ (c 1,5g/100 mL, MeOH), que por comparação com a literatura¹⁸ indica uma mistura (*R*) enriquecida.

6 REFERÊNCIAS

- 1 IUPAC, Compendium of Chemical Terminology. Goldbook, Disponível em <http://goldbook.iupac.org/C01058> 24/07/2016
- 2 SCHURIG, V. **Differentiation of Enantiomers I**. Springer International Publishing, 2013.
- 3 CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced Organic Chemistry: Structure and mechanisms**. 4 ed. Kluwer Academic/Plenum Pub., 2000.
- 4 SOJO, V. On the Biogenic Origins of Homochirality. **Origins of Life and Evolution of Biospheres**, v. 45, p. 219-224, 2015.
- 5 GAL, J. The Discovery of Stereoselectivity at Biological Receptors: Arnaldo Piutti and the Taste of the Asparagine Enantiomers—History and Analysis on the 125th Anniversary. **Chirality**, v. 24, p. 959-976, 2012.
- 6 CROSSLEY, R. The relevance of chirality to the study of biological activity. **Tetrahedron**, v. 48, p. 8155-8178, 1992.
- 7 FDA'S policy statement for the development of new stereoisomeric drugs. **Chirality**, v. 4, p. 338-340, 1992.
- 8 AGRANAT, I.; CANER, H.; CALDWELL, J. Putting chirality to work: the strategy of chiral switches. **Nat Rev Drug Discov**, v. 1, p. 753-768, 2002.
- 9 MARGOLIN, A. L. Enzymes in the synthesis of chiral drugs. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 266-280, 1993.
- 10 ANDERSSON, T. Single-Isomer Drugs. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 43, p. 279-285, 2004.
- 11 CANER, H.; GRONER, E.; LEVY, L.; AGRANAT, I. Trends in the development of chiral drugs. **Drug Discovery Today**, v. 9, p. 105-110, 2004.
- 12 BRENNA, E.; GATTI, F. G.; MANFREDI, A.; MONTI, D.; PARMEGGIANI, F. Enoate Reductase-Mediated Preparation of Methyl (S)-2-Bromobutanoate, a Useful Key Intermediate for the Synthesis of Chiral Active Pharmaceutical Ingredients. **Organic Process Research & Development**, v. 16, p. 262-268, 2011.
- 13 TANG, S.-L. **Engineering of *Candida antarctica* lipase B for the kinetic resolution of α -halo esters**
Dissertação. (Doutorado em Química) - Faculty of Engineering and Physical Sciences, University of Manchester
Manchester, 2010.
- 14 WANG, Z. Hell-Volhard-Zelinsky Reaction. In: (Ed.). **Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents**. John Wiley & Sons, Inc., 2010. p.
- 15 ZHANG, L. H.; DUAN, J.; XU, Y.; DOLBIER JR, W. R. A simple and efficient method of preparing α -bromo carboxylic acids. **Tetrahedron Letters**, v. 39, p. 9621-9622, 1998.

- 16 TKA, N.; KRAĬEM, J.; HASSINE, B. B. Synthesis of Enantiomerically Enriched α -Bromonitriles from Amino Acids. **Synthetic Communications**, v. 43, p. 735-743, 2012.
- 17 DURST, T.; KOH, K. Asymmetric synthesis of alpha-halo esters. **Tetrahedron Letters**, v. 33, p. 6799-6802, 1992.
- 18 BOSCHI, F.; CAMPS, P.; COMES-FRANCHINI, M.; MUÑOZ-TORRERO, D.; RICCI, A.; SÁNCHEZ, L. A synthesis of levetiracetam based on (S)-N-phenylpantolactam as a chiral auxiliary. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 16, p. 3739-3745, 2005.
- 19 WENDA, S.; ILLNER, S.; MELL, A.; KRAGL, U. Industrial biotechnology-the future of green chemistry? **Green Chemistry**, v. 13, p. 3007-3047, 2011.
- 20 POLAINA, J.; MACCABE, A. P. **Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications**. Springer Netherlands, 2007.
- 21 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 6 ed. W.H. Freeman, 2013.
- 22 SILVERMAN, R. B. **Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions, Revised Edition**. 2 ed. Elsevier Science, 2002.
- 23 FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook**. 5 ed. Berlin: Springer, 2012.
- 24 KIRCHNER, G.; SCOLLAR, M. P.; KLIBANOV, A. M. Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, p. 7072-7076, 1985.
- 25 JAEGER, K.-E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 396-403, 1998.
- 26 SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 37, p. 1608-1633, 1998.
- 27 OLLIS, D. L.; CHEAH, E.; CYGLER, M.; DIJKSTRA, B.; FROLOW, F.; FRANKEN, S. M.; HAREL, M.; REMINGTON, S. J.; SILMAN, I.; SCHRAG, J.; SUSSMAN, J. L.; VERSCHUEREN, K. H. G.; GOLDMAN, A. The α/β hydrolase fold. **Protein Engineering**, v. 5, p. 197-211, 1992.
- 28 SCHRAG, J. D.; CYGLER, M. [4] Lipases and $\alpha\beta$ hydrolase fold. In: (Ed.). **Methods in Enzymology**. Academic Press, 1997. p. 85-107.
- 29 JAEGER, K.-E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.
- 30 CYGLER, M.; GROCHULSKI, P.; KAZLAUSKAS, R. J.; SCHRAG, J. D.; BOUTHILLIER, F.; RUBIN, B.; SERREQUI, A. N.; GUPTA, A. K. A Structural Basis for the Chiral Preferences of Lipases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, p. 3180-3186, 1994.
- 31 KAZLAUSKAS, R. J.; WEISSFLOCH, A. N. E.; RAPPAPORT, A. T.; CUCCIA, L. A. A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions

- catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 56, p. 2656-2665, 1991.
- 32 SMIDT, H.; FISCHER, A.; FISCHER, P.; SCHMID, R. D. Preparation of optically pure chiral amines by lipase-catalyzed enantioselective hydrolysis of N-acyl-amines. **Biotechnology Techniques**, v. 10, p. 335-338, 1996.
- 33 KAZLAUSKAS, R. J.; WEBER, H. K. Improving hydrolases for organic synthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 2, p. 121-126, 1998.
- 34 UPPENBERG, J.; OEHRNER, N.; NORIN, M.; HULT, K.; KLEYWEGT, G. J.; PATKAR, S.; WAAGEN, V.; ANTHONSEN, T.; JONES, T. A. Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. **Biochemistry**, v. 34, p. 16838-16851, 1995.
- 35 NORIN, M.; HULT, K.; MATTSON, A.; NORIN, T. Molecular Modelling of Chymotrypsin-Substrate Interactions: Calculation of Enantioselectivity. **Biocatalysis**, v. 7, p. 131-147, 1993.
- 36 NORIN, M.; HAEFFNER, F.; ACHOUR, A.; NORIN, T.; HULT, K. Computer modeling of substrate binding to lipases from *Rhizomucor miehei*, *Humicola lanuginosa*, and *Candida rugosa*. **Protein Science**, v. 3, p. 1493-1503, 1994.
- 37 TSAI, S.-W. Enantiopreference of *Candida antarctica* lipase B toward carboxylic acids: Substrate models and enantioselectivity thereof. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 127, p. 98-116, 2016.
- 38 UWE T. BORNSCHEUER, R. J. K. **Hydrolases in Organic Synthesis**. 2 ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006.
- 39 AHMED, S. N.; KAZLAUSKAS, R. J.; MORINVILLE, A. H.; GROCHULSKI, P.; SCHRAG, J. D.; CYGLER, M. Enantioselectivity of *Candida Rugosa* Lipase Toward Carboxylic Acids: A Predictive Rule from Substrate Mapping and X-Ray Crystallography. **Biocatalysis**, v. 9, p. 209-225, 1994.
- 40 KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 555-569, 2012.
- 41 MUÑOZ SOLANO, D.; HOYOS, P.; HERNÁIZ, M. J.; ALCÁNTARA, A. R.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M. Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 196-207, 2012.
- 42 GOTOR, V.; BRIEVA, R.; REBOLLEDO, F. A simple procedure for the preparation of chiral amides. **Tetrahedron Letters**, v. 29, p. 6973-6974, 1988.
- 43 GOTOR, V.; BRIEVA, R.; GONZÁLEZ, C.; REBOLLEDO, F. Enzymatic aminolysis and transamidation reactions. **Tetrahedron**, v. 47, p. 9207-9214, 1991.
- 44 MIYAZAWA, T.; KURITA, S.; SHIMAOKA, M.; UEJI, S.; YAMADA, T. Resolution of racemic carboxylic acids via the lipase-catalyzed irreversible transesterification of vinyl esters. **Chirality**, v. 11, p. 554-560, 1999.

- 45 YANG, H.; HENKE, E.; BORNSCHEUER, U. T. Highly efficient double enantioselection by lipase-catalyzed transesterification of (R,S)-carboxylic acid vinyl esters with (RS)-1-phenylethanol. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 10, p. 957-960, 1999.
- 46 YANG, H.; HENKE, E.; BORNSCHEUER, U. T. The Use of Vinyl Esters Significantly Enhanced Enantioselectivities and Reaction Rates in Lipase-Catalyzed Resolutions of Arylaliphatic Carboxylic Acids. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 64, p. 1709-1712, 1999.
- 47 BERGLUND, P. Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis. **Biomolecular Engineering**, v. 18, p. 13-22, 2001.
- 48 TURNER, N. J. Controlling chirality. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 401-406, 2003.
- 49 JANSONIUS, J. N. Enzyme Mechanism: What X-Ray Crystallography can(not) Tell Us. In: Dino Moras *et al.* (Ed.). **Crystallography in Molecular Biology**. Boston, MA: Springer US, 1987. p. 229-240.
- 50 ENGSTRÖM, K.; NYHLÉN, J.; SANDSTRÖM, A. G.; BÄCKVALL, J.-E. Directed Evolution of an Enantioselective Lipase with Broad Substrate Scope for Hydrolysis of α -Substituted Esters. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, p. 7038-7042, 2010.
- 51 SVENDSEN, A. Lipase protein engineering. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1543, p. 223-238, 2000.
- 52 WU, Q.; SONI, P.; REETZ, M. T. Laboratory Evolution of Enantiocomplementary *Candida antarctica* Lipase B Mutants with Broad Substrate Scope. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, p. 1872-1881, 2013.
- 53 STRAATHOF, A. J. J.; ADLERCREUTZ, P. **Applied Biocatalysis**. Taylor & Francis, 2003.
- 54 OVERBEEKE, P. L. A.; OTTOSSON, J.; HULT, K.; JONGEJAN, J. A.; DUINE, J. A. The Temperature Dependence of Enzymatic Kinetic Resolutions Reveals the Relative Contribution of Enthalpy and Entropy to Enzymatic Enantioselectivity. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 17, p. 61-79, 1999.
- 55 SAKAI, T.; KAWABATA, I.; KISHIMOTO, T.; EMA, T.; UTAKA, M. Enhancement of the Enantioselectivity in Lipase-Catalyzed Kinetic Resolutions of 3-Phenyl-2H-azirine-2-methanol by Lowering the Temperature to -40 °C. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 62, p. 4906-4907, 1997.
- 56 LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 81-87, 1987.
- 57 FITZPATRICK, P. A.; KLIBANOV, A. M. How can the solvent affect enzyme enantioselectivity? **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, p. 3166-3171, 1991.
- 58 KLIBANOV, A. M. Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 14, p. 141-144, 1989.

- 59 DALL'ACQUA, W.; CARTER, P. Substrate-assisted catalysis: Molecular basis and biological significance. **Protein Science**, v. 9, p. 1-9, 2000.
- 60 TSAI, S.-W.; CHEN, C.-C.; YANG, H.-S.; NG, I. S.; CHEN, T.-L. Implication of substrate-assisted catalysis on improving lipase activity or enantioselectivity in organic solvents. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1764, p. 1424-1428, 2006.
- 61 PAN, S.-H.; KAWAMOTO, T.; FUKUI, T.; SONOMOTO, K.; TANAKA, A. Stereoselective esterification of halogen-containing carboxylic acids by lipase in organic solvent: effects of alcohol chain length. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 47-51, 1990.
- 62 TSAI, S.-W.; WEI, H.-J. Enantioselective esterification of racemic naproxen by lipases in organic solvent. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 328-333, 1994.
- 63 DE ZOETE, M. C.; KOCK-VAN DALEN, A. C.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A. A New Enzymatic Reaction: Enzyme Catalyzed Ammonolysis of Carboxylic Esters. **Biocatalysis**, v. 10, p. 307-316, 1994.
- 64 PUGNIÉRE, M.; SAN JUAN, C.; PREVIERO, A. Specific esterase activity of subtilisin toward esters of α -haloacids. **Tetrahedron Letters**, v. 31, p. 4883-4886, 1990.
- 65 AZIM, A.; SHARMA, S. K.; OLSEN, C. E.; PARMAR, V. S. Lipase catalysed synthesis of optically enriched α -haloamides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 1345-1348, 2001.
- 66 keppra, Disponível em <http://www.ucb.com/investors/UCB-today/Keppra>, 01/08/2016
- 67 Anvisa, <http://portal.anvisa.gov.br>,
- 68 ZHANG, M.; ZHU, L.; MA, X. An efficient enantioselective synthesis of an indane acetic acid derivative: methyl (2S)-2-[(1S)-5-hydroxy-2,3-dihydro-1H-inden-1-yl]butanoate. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, p. 3447-3453, 2003.
- 69 MALIN, S. A.; LASKIN, B. M.; MALIN, A. S. Reaction of α -bromocarboxylic acids with hydrazine and dimethylhydrazine. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v. 80, p. 2165-2168, 2007.
- 70 LEBARILLIER, L.; OUTURQUIN, F.; PAULMIER, C. Preparation and Oxidation of α -Phenylselanyl Esters. **Tetrahedron**, v. 56, p. 7483-7493, 2000.
- 71 CHEN, C. S.; FUJIMOTO, Y.; GIRDAUKAS, G.; SIH, C. J. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, p. 7294-7299, 1982.
- 72 THOMAS, J. C. **APLICAÇÃO DO SISTEMA DE FLUXO CONTÍNUO EM REAÇÕES DE RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA: OBTENÇÃO DE ÁLCÓOIS SECUNDÁRIOS OPTICAMENTE ATIVOS EMPREGANDO A LIPASE B DE *Candida antarctica***. Dissertação. (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

- 73 BOJARSKI, J.; OXELBARK, J.; ANDERSSON, C.; ALLENMARK, S. Enantioselective lipase-catalyzed ester hydrolysis: Effects on rates and enantioselectivity from a variation of the ester structure. **Chirality**, v. 5, p. 154-158, 1993.
- 74 STRAATHOF, A. J. J.; RAKELS, J. L. L.; HEIJNEN, J. J. Mass balancing in kinetic resolution: Calculating yield and enantiomeric excess using chiral balance. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 45, p. 536-538, 1995.
- 75 WAGEGG, T.; ENZELBERGER, M. M.; BORNSCHEUER, U. T.; SCHMID, R. D. The use of methoxy acetoxy esters significantly enhances reaction rates in the lipase-catalyzed preparation of enantiopure 1-(4-chloro phenyl) ethyl amines. **Journal of Biotechnology**, v. 61, p. 75-78, 1998.
- 76 CAMMENBERG, M.; HULT, K.; PARK, S. Molecular Basis for the Enhanced Lipase-Catalyzed N-Acylation of 1-Phenylethanamine with Methoxyacetate. **ChemBioChem**, v. 7, p. 1745-1749, 2006.
- 77 VARMA, R., M. SANGITA KASTURE, G. BHASKAR GAIKWAD, N. SANJAY AND R. UTTAM KALKOTE. Lipase catalysed enantioselective amidation of α -phenylethylamine. **Asian J. Biochem**, v. 2, p. 279-283, 2007.
- 78 HOLMBERG, E.; HULT, K. Alcohol Induced Reversal of Enantioselectivity in a Lipase Catalyzed Resolution of 2-Chloropropionic Acid. **Biocatalysis**, v. 5, p. 289-296, 1992.
- 79 THEIL, F.; BJÖRKLING, F. Specificity of *Candida antarctica* lipase B (SP 435) in the presence of lipase A in a double enantioselective transesterification. **Biotechnology Letters**, v. 15, p. 605-608, 1993.
- 80 XIA, B.; LI, Y.; CHENG, G.; LIN, X.; WU, Q. Lipase-Catalyzed Doubly Enantioselective Ring-Opening Resolution between Alcohols and Lactones: Synthesis of Chiral Hydroxyl Esters with Two Stereogenic Centers. **ChemCatChem**, v. 6, p. 3448-3454, 2014.
- 81 PILISSÃO, C.; NASCIMENTO, M. D. G. Effects of organic solvents and ionic liquids on the aminolysis of (RS)-methyl mandelate catalyzed by lipases. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 17, p. 428-433, 2006.
- 82 EP1852433; L. T. D. Zeria Pharmaceutical Co; 2007
- 83 MAO, J.; LIU, F.; WANG, M.; WU, L.; ZHENG, B.; LIU, S.; ZHONG, J.; BIAN, Q.; WALSH, P. J. Cobalt-Bisoxazoline-Catalyzed Asymmetric Kumada Cross-Coupling of Racemic α -Bromo Esters with Aryl Grignard Reagents. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, p. 17662-17668, 2014.
- 84 FERORELLI, S.; LOIODICE, F.; TORTORELLA, V.; CONTE-CAMERINO, D.; DE LUCA, A. M. Carboxylic acids and skeletal muscle chloride channel conductance: effects on the biological activity induced by the introduction of methyl groups on the aromatic ring of chiral α -(4-chloro-phenoxy)alkanoic acids. **II Farmaco**, v. 56, p. 239-246, 2001.

APÊNDICE A: ESPECTROS SELECIONADOS

SUMÁRIO

Figura A1 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de metila (18).....	iii
Figura A2 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de metila (18).....	iv
Figura A3 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de etila (19).....	v
Figura A4 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de etila (19).....	vi
Figura A5 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de <i>n</i> -propila (20).....	vii
Figura A6 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de <i>n</i> -propila (20).....	viii
Figura A7 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de alila (21).....	xiv
Figura A8 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de alila (21).....	x
Figura A9 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de butila (22).....	xi
Figura A10 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de butila (22).....	xii
Figura A11 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de <i>iso</i> -butila (23).....	xiii
Figura A12 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de <i>iso</i> -butila (23).....	xiv
Figura A13 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de 3-pentila (24).....	xv
Figura A14 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de 3-pentila (24).....	xvi
Figura A15 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de 2-etoxietila (25).....	xvii
Figura A16 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de 2-etoxietila (25).....	xviii
Figura A17 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de 2-cloroetila (26).....	xviii
Figura A18 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de 2-cloroetila (26).....	xx
Figura A19 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de (R)-1-feniletila (27).....	xxi
Figura A20 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de (R)-1-feniletila (27).....	xxii
Figura A21 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do (<i>rac</i>)-1-Feniletanol (31).....	xxiii

Figura A22 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do (rac)-1-Feniletanol (31)	xxiv
Figura A23 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do acetato de (<i>R</i>)-1-Feniletila (31)	xxv
Figura A24 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do acetato de (<i>R</i>)-1-Feniletila (31)	xxvi
Figura A25 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do <i>p</i> -metoxi-(rac)-1-feniletanol (32)	xxvii
Figura A26 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do <i>p</i> -metoxi-(rac)-1-feniletanol (32)	xxviii
Figura A27 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do acetato de <i>p</i> -metoxi-(<i>R</i>)-1-feniletila (32a)	xxviii
Figura A28 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do acetato de <i>p</i> -metoxi-(<i>R</i>)-1-feniletila (32a)	xxx
Figura A29 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do <i>p</i> -nitro-(rac)-1-feniletanol (33)	xxxi
Figura A30 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do <i>p</i> -nitro-(rac)-1-feniletanol (33)	xxxii
Figura A31 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do acetato de <i>p</i> -nitro-(<i>R</i>)-1-feniletanol (33a)	xxxiii
Figura A32 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do acetato de <i>p</i> -nitro-(<i>R</i>)-1-feniletanol (33a)	xxxiv
Figura A33 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do (rac)-1-Fenilpropanol (34)	xxxv
Figura A34 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do (rac)-1-Fenilpropanol (34).	xxxvi
Figura A35 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do acetato de (<i>R</i>)-1-Fenilpropila (34a)	xxxvii
Figura A36 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do acetato de (<i>R</i>)-1-Fenilpropila (34a)	xxxviii

Figura A1 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de metila (**18**)

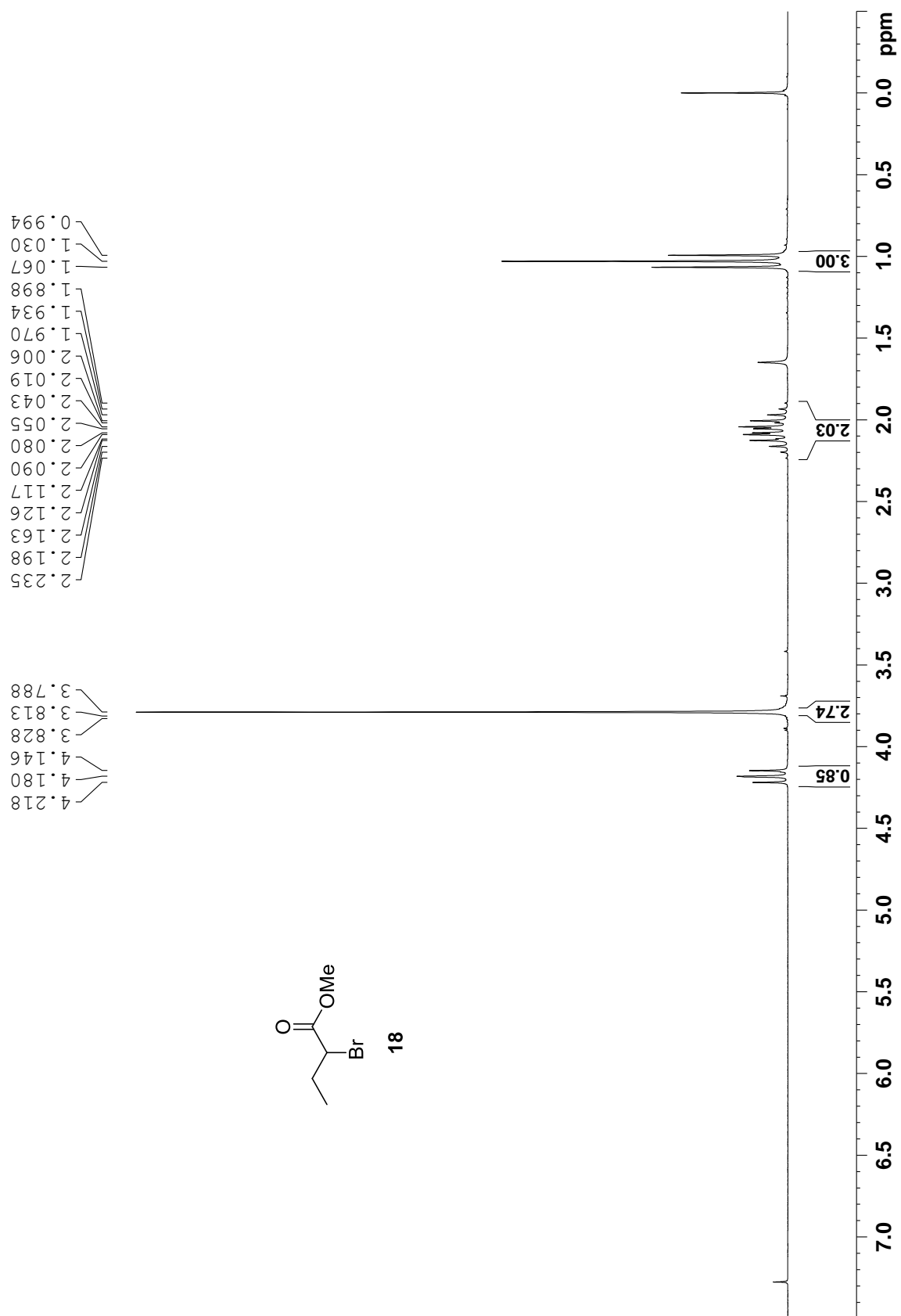


Figura A2 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de metila (**18**)

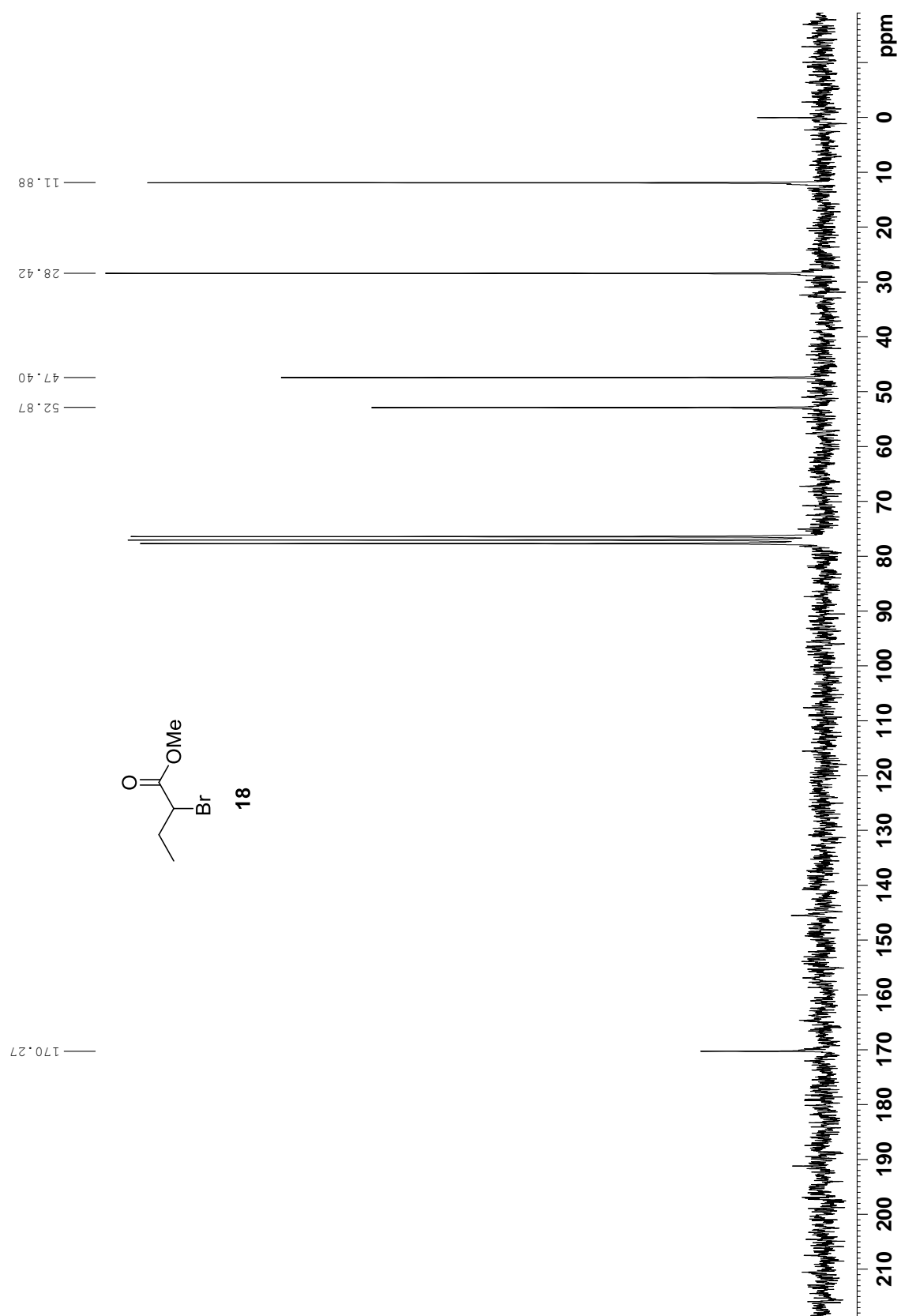


Figura A3 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de etila (19)

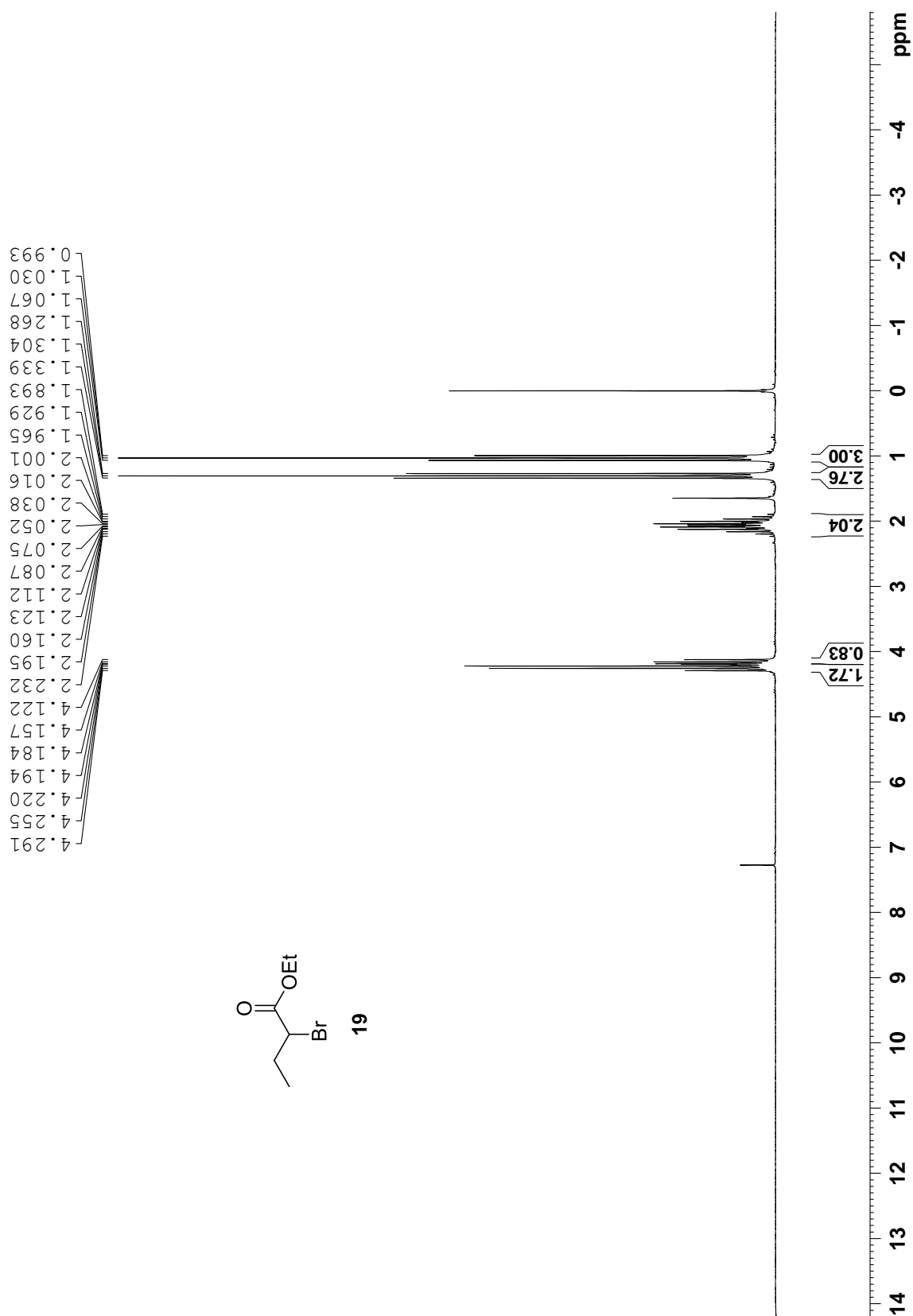


Figura A4 - - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de etila (**19**)

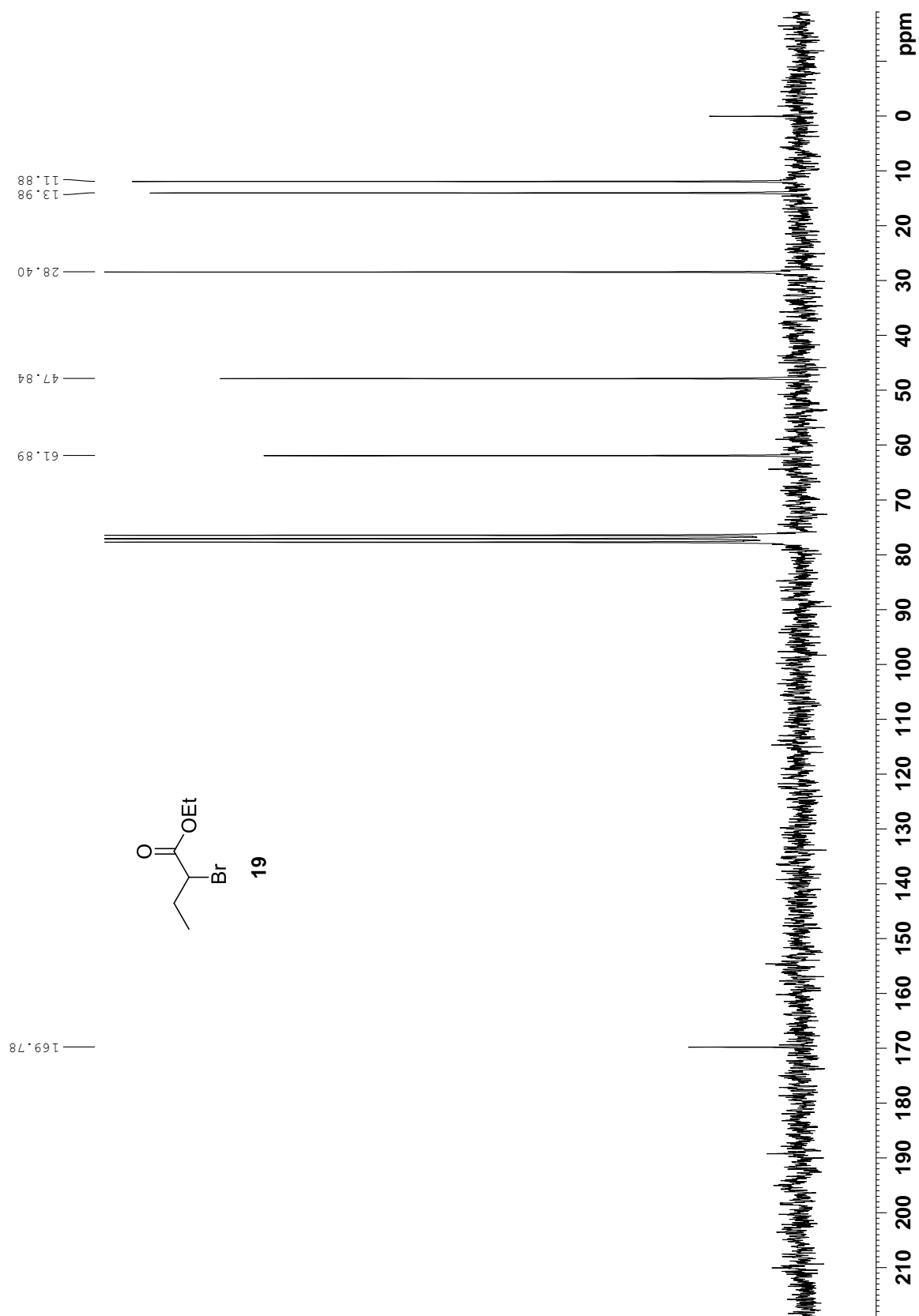


Figura A5 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de *n*-propila (**20**)

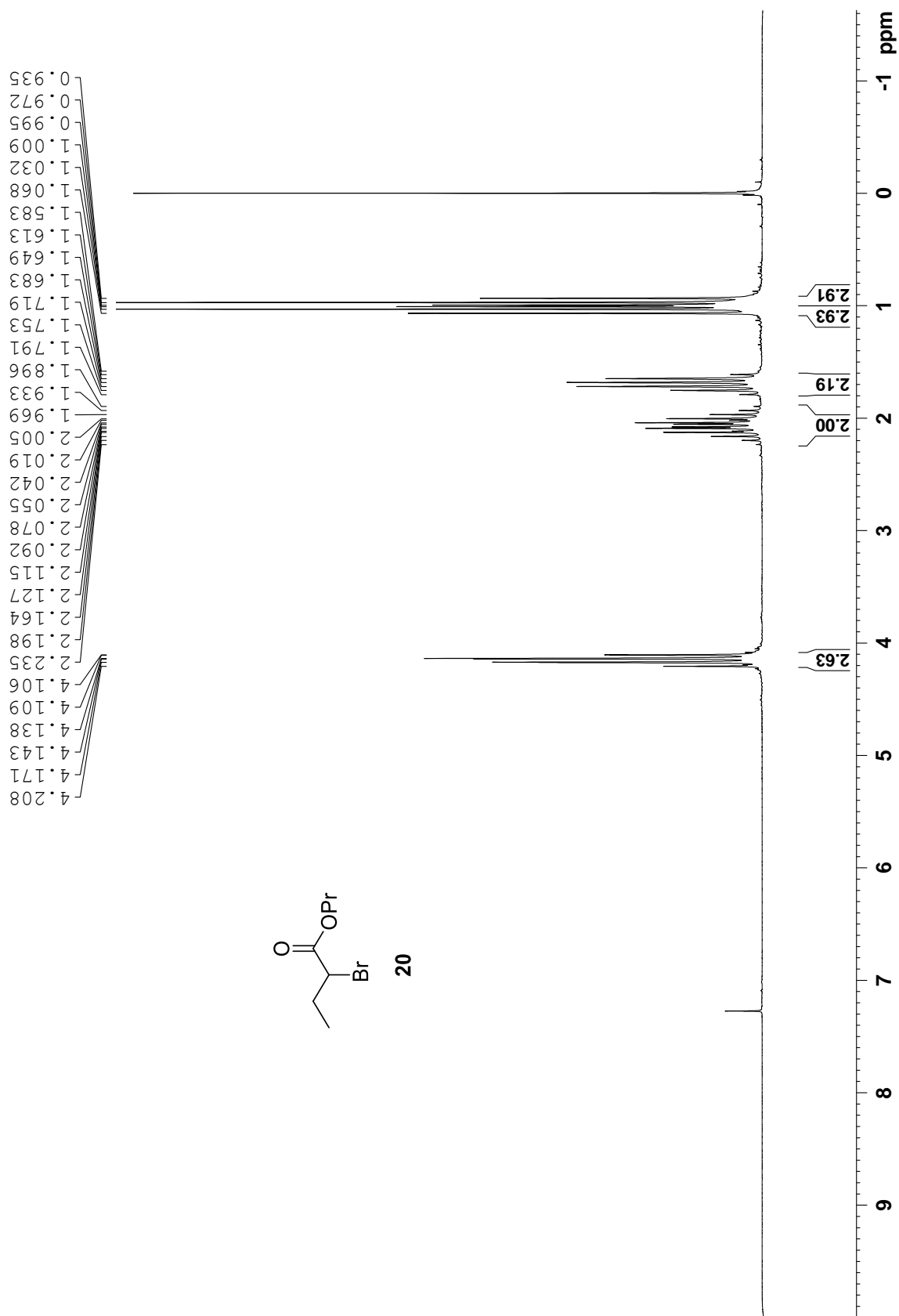


Figura A6 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de *n*-propila (**20**)

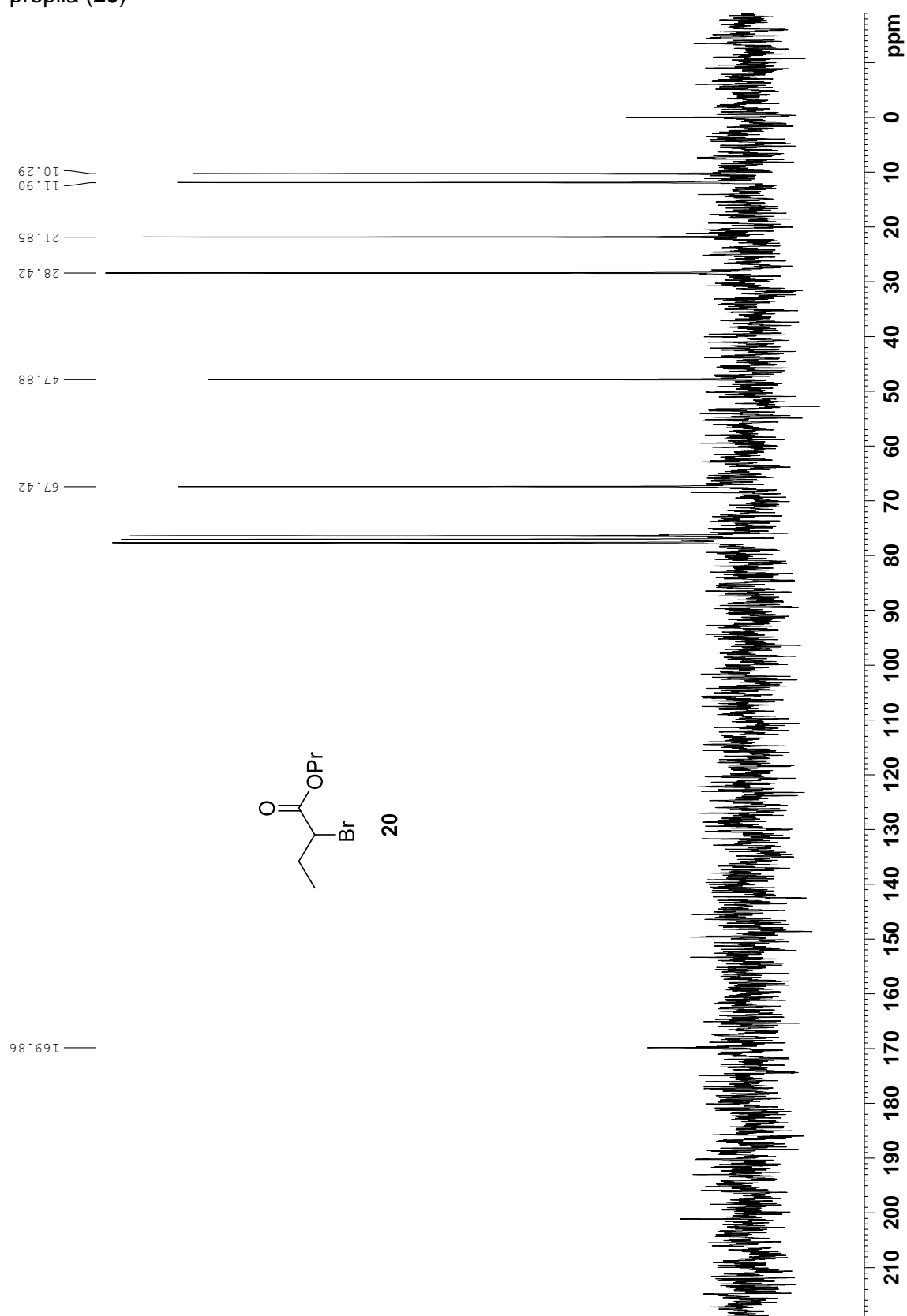


Figura A7 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de alila (**21**)

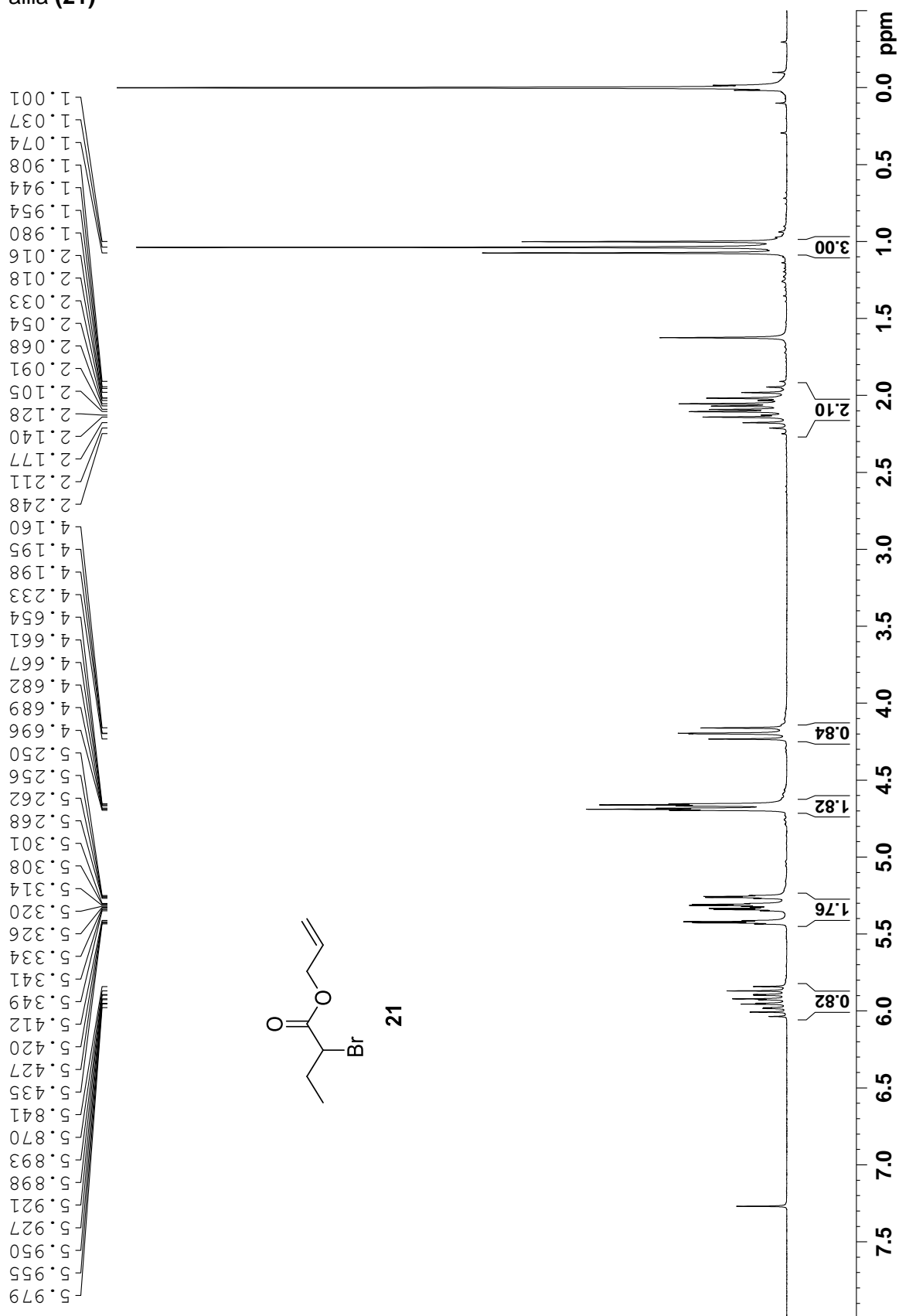


Figura A8 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de alila (21)

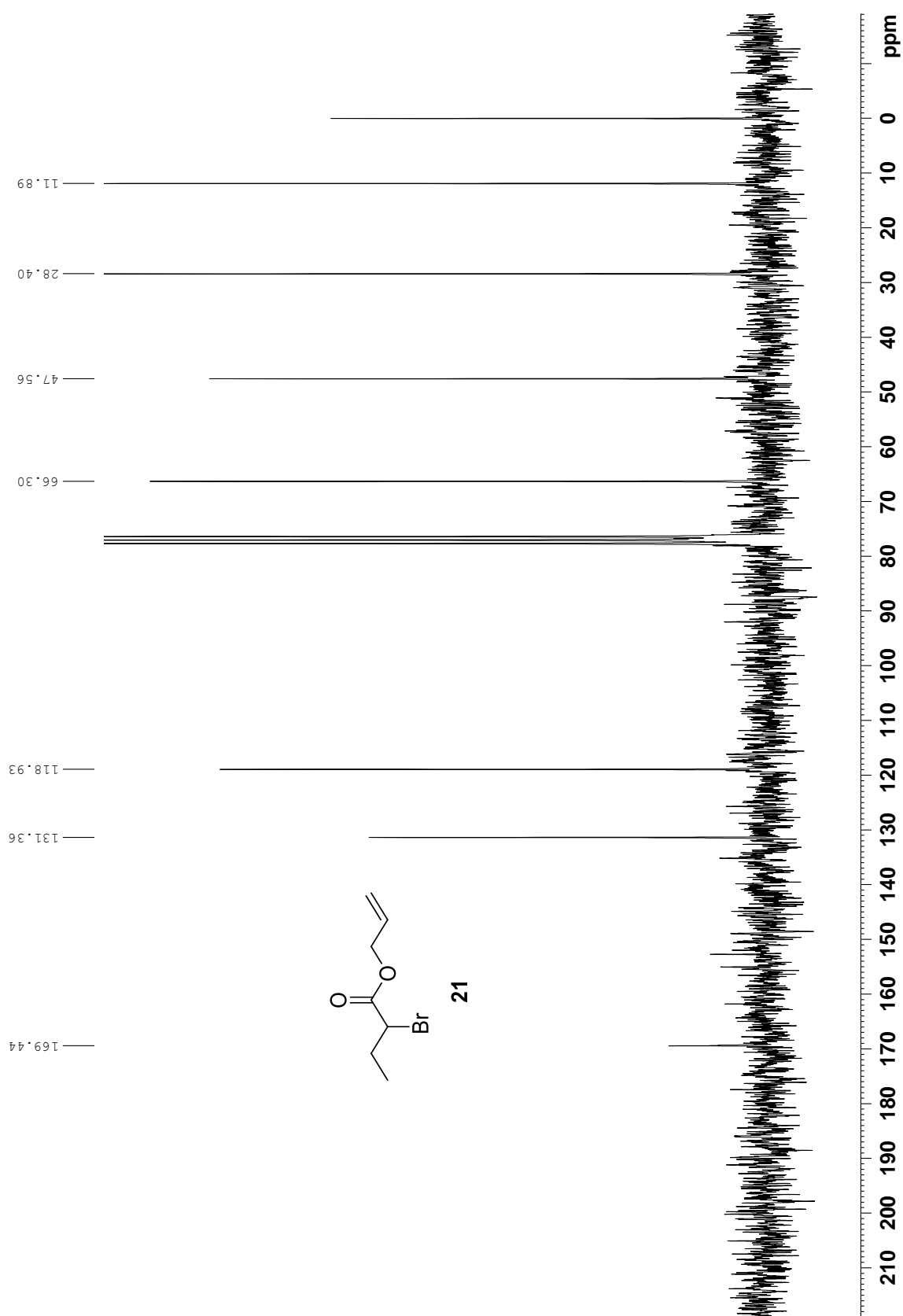


Figura A9 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de butila (**22**)

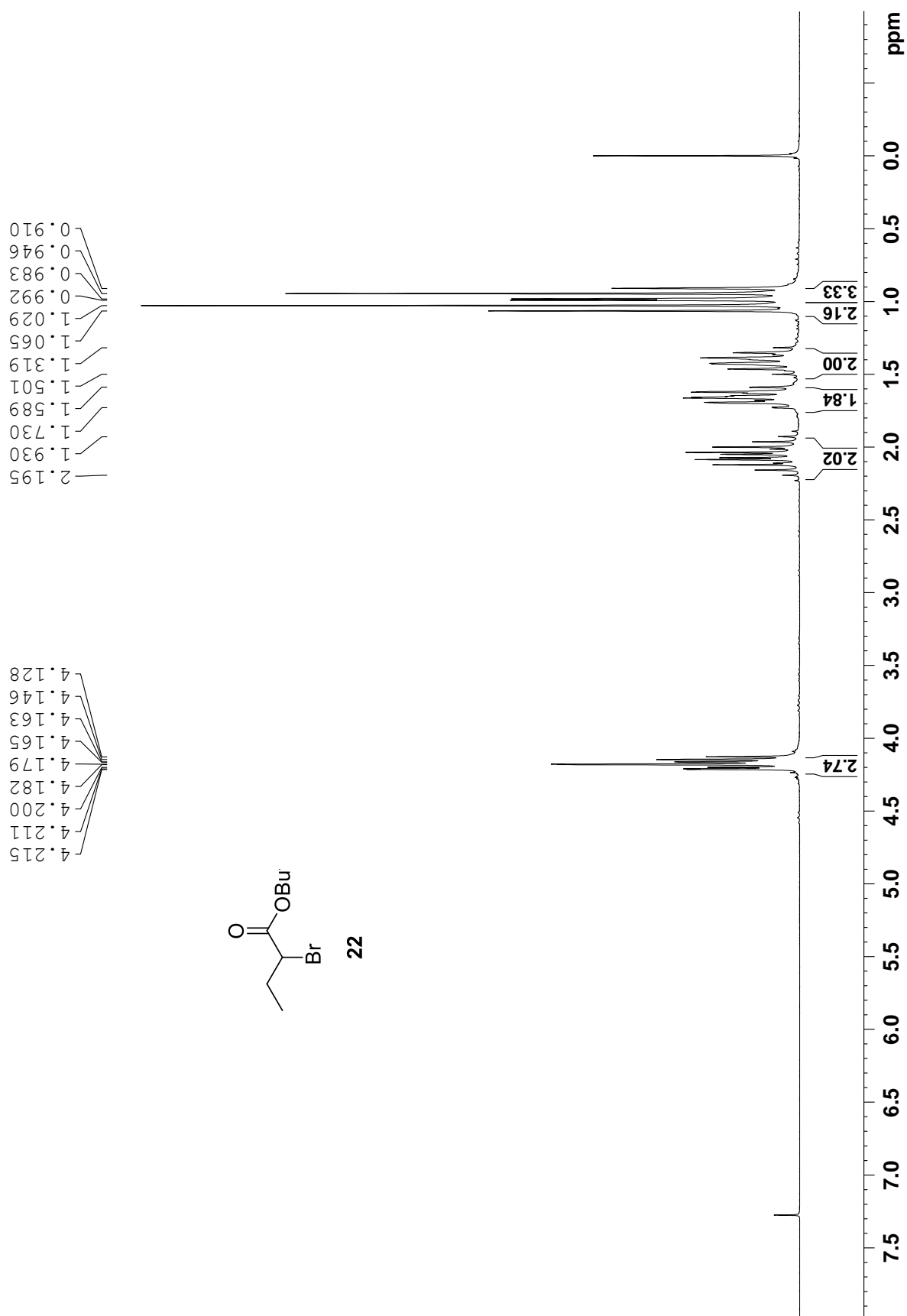


Figura A10 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de butila (**22**).

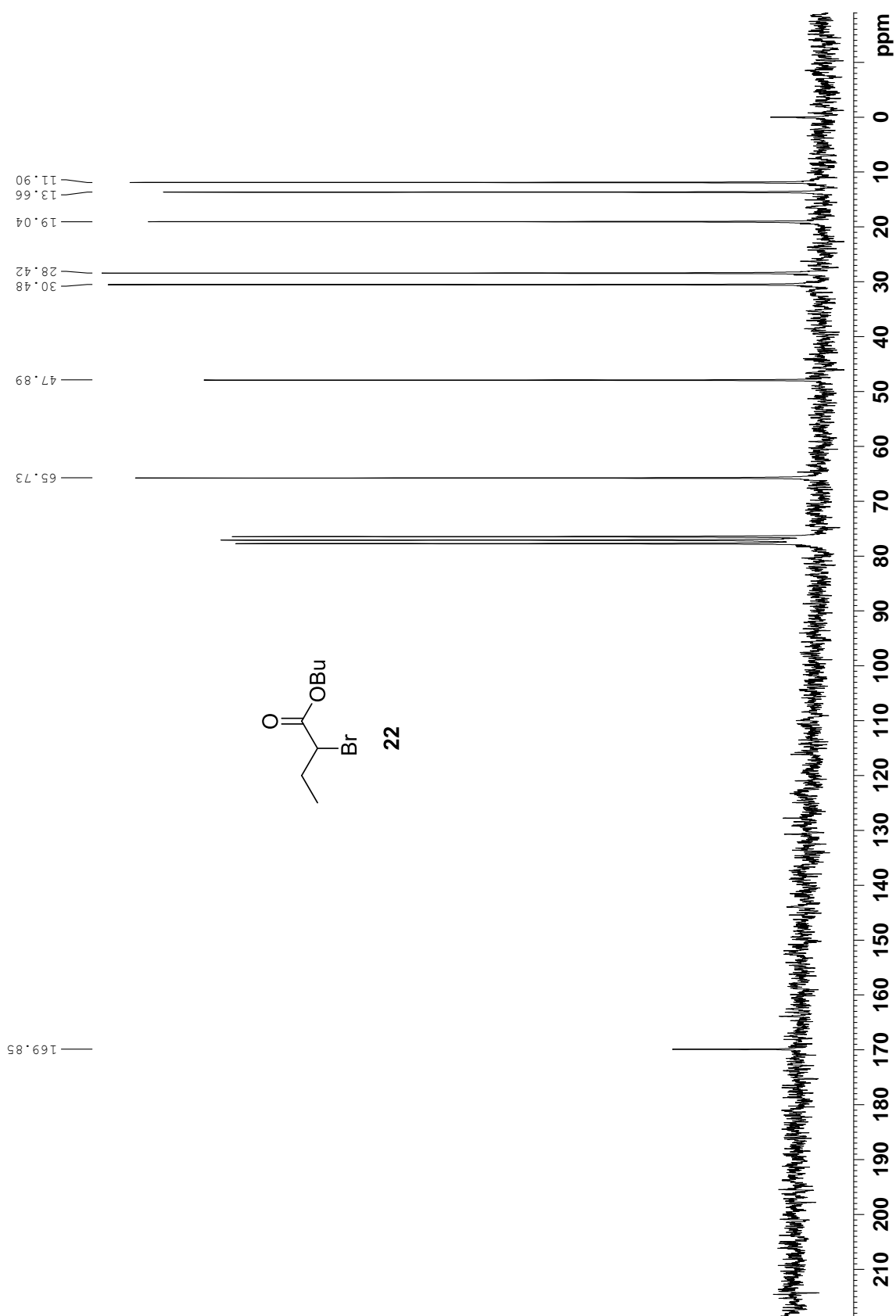


Figura A11 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de *iso*-butila (**23**)

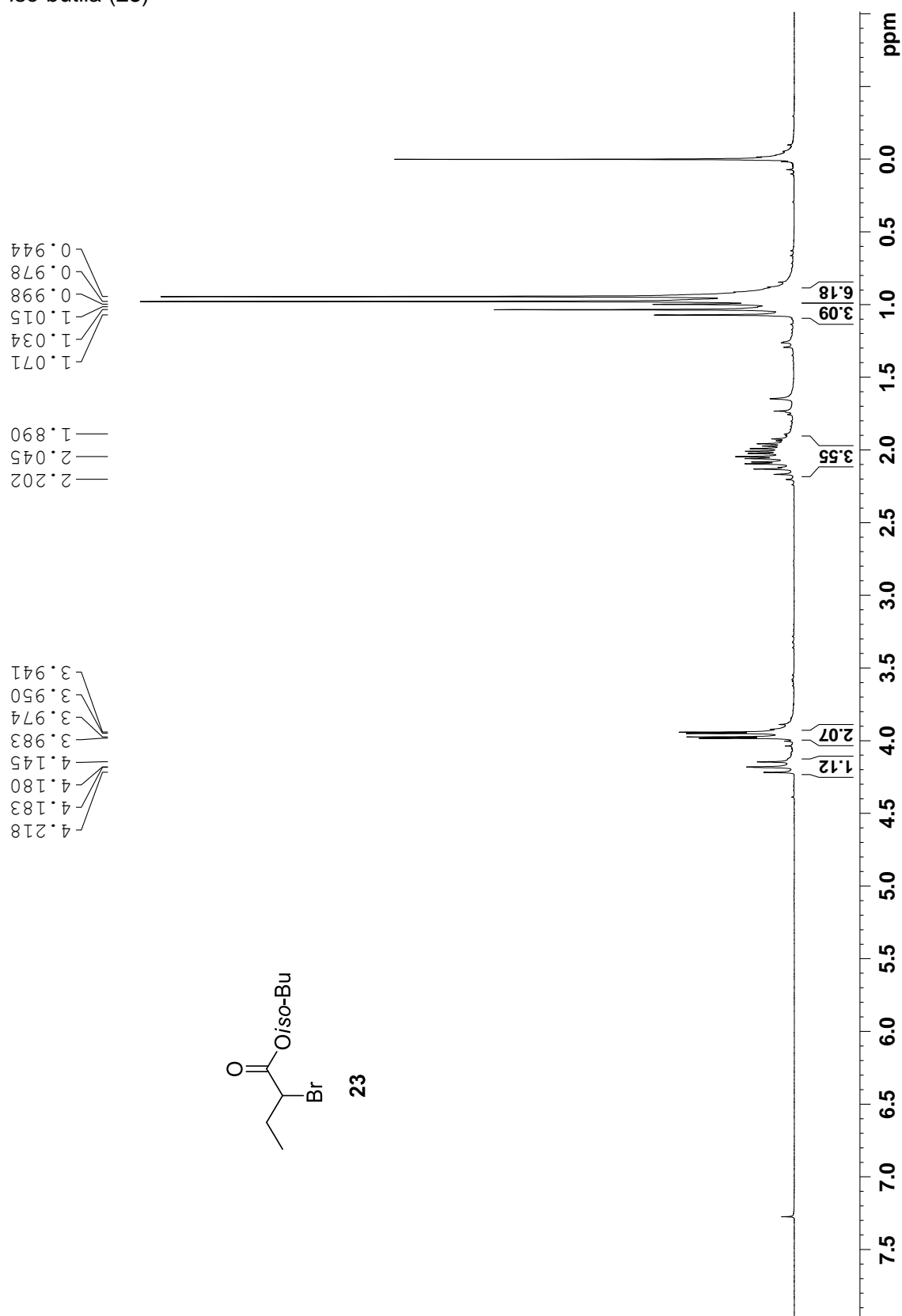


Figura A12 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de *iso*-butila (**23**)

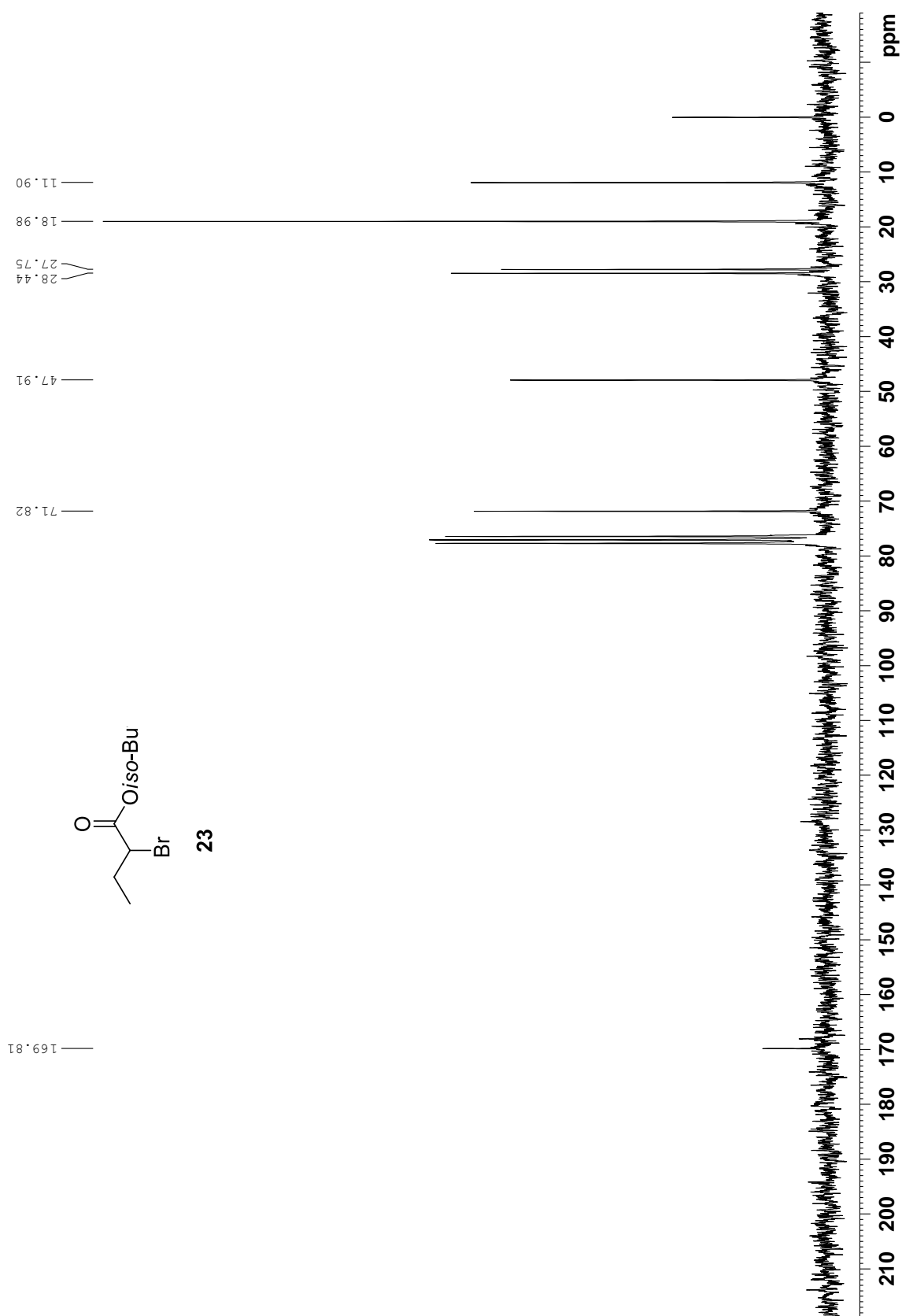


Figura A13 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de 3-pentila (**24**)

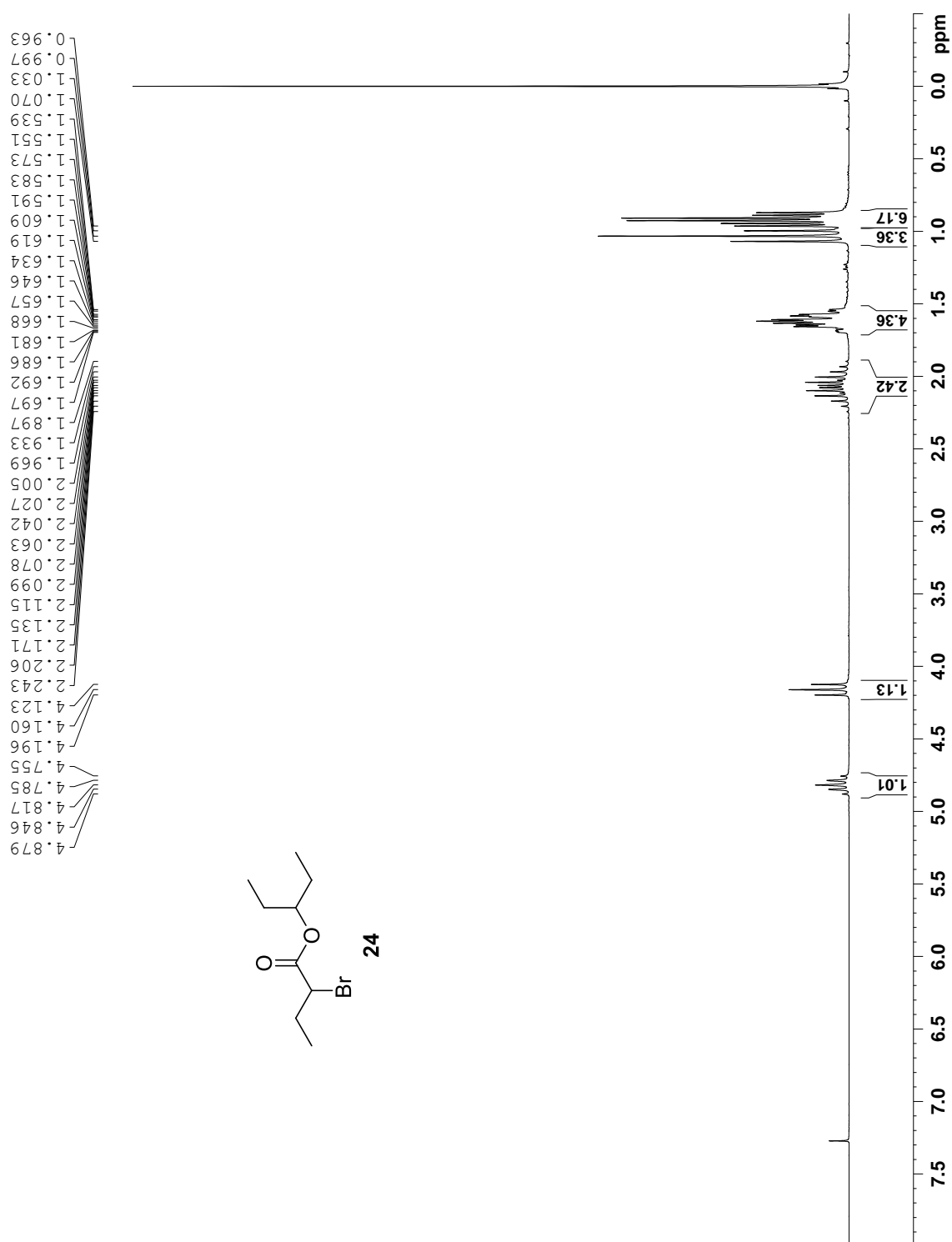


Figura A14 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de 3-pentila (**24**)

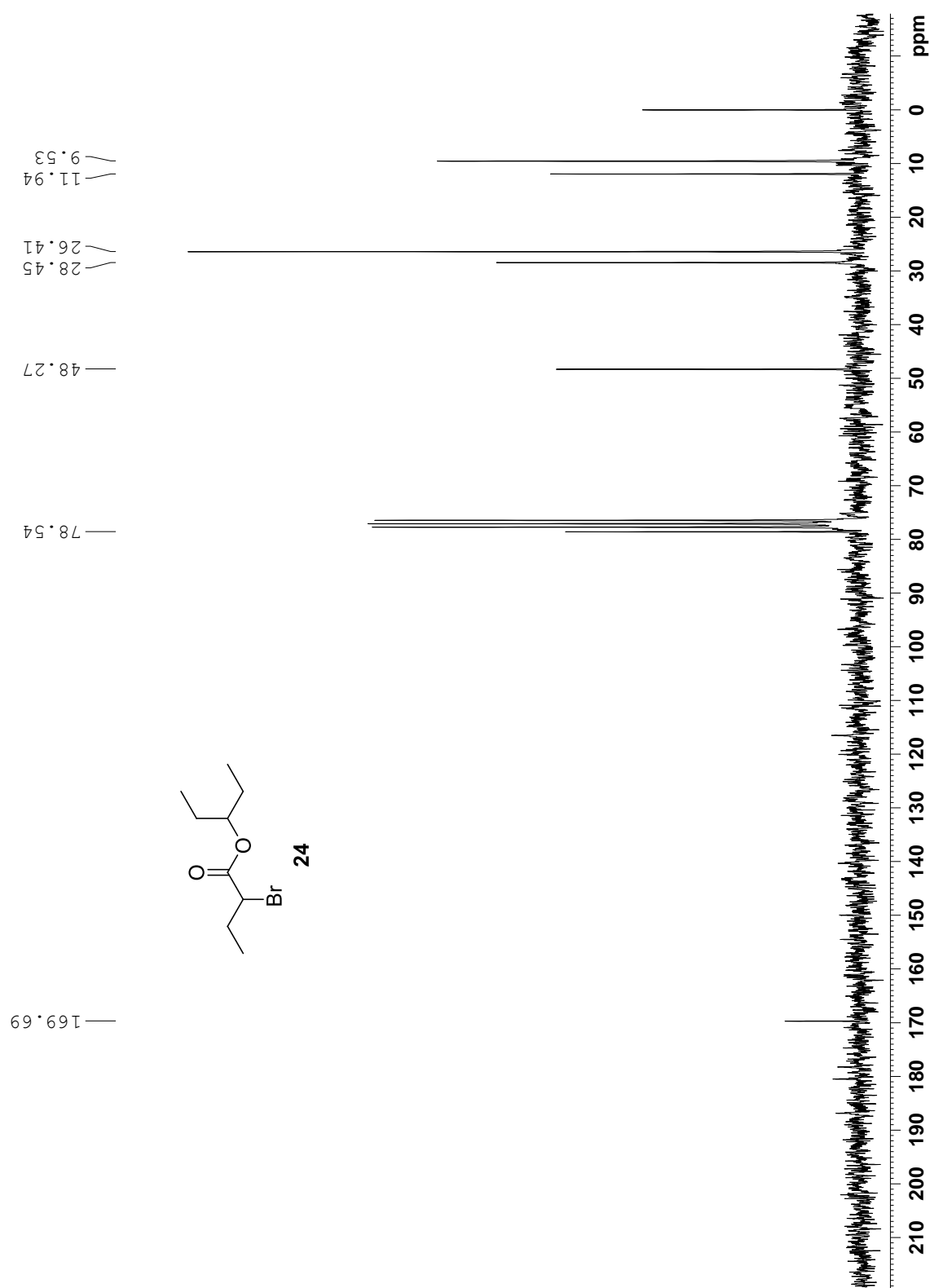


Figura A15 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de 2-etoxietila (**25**)

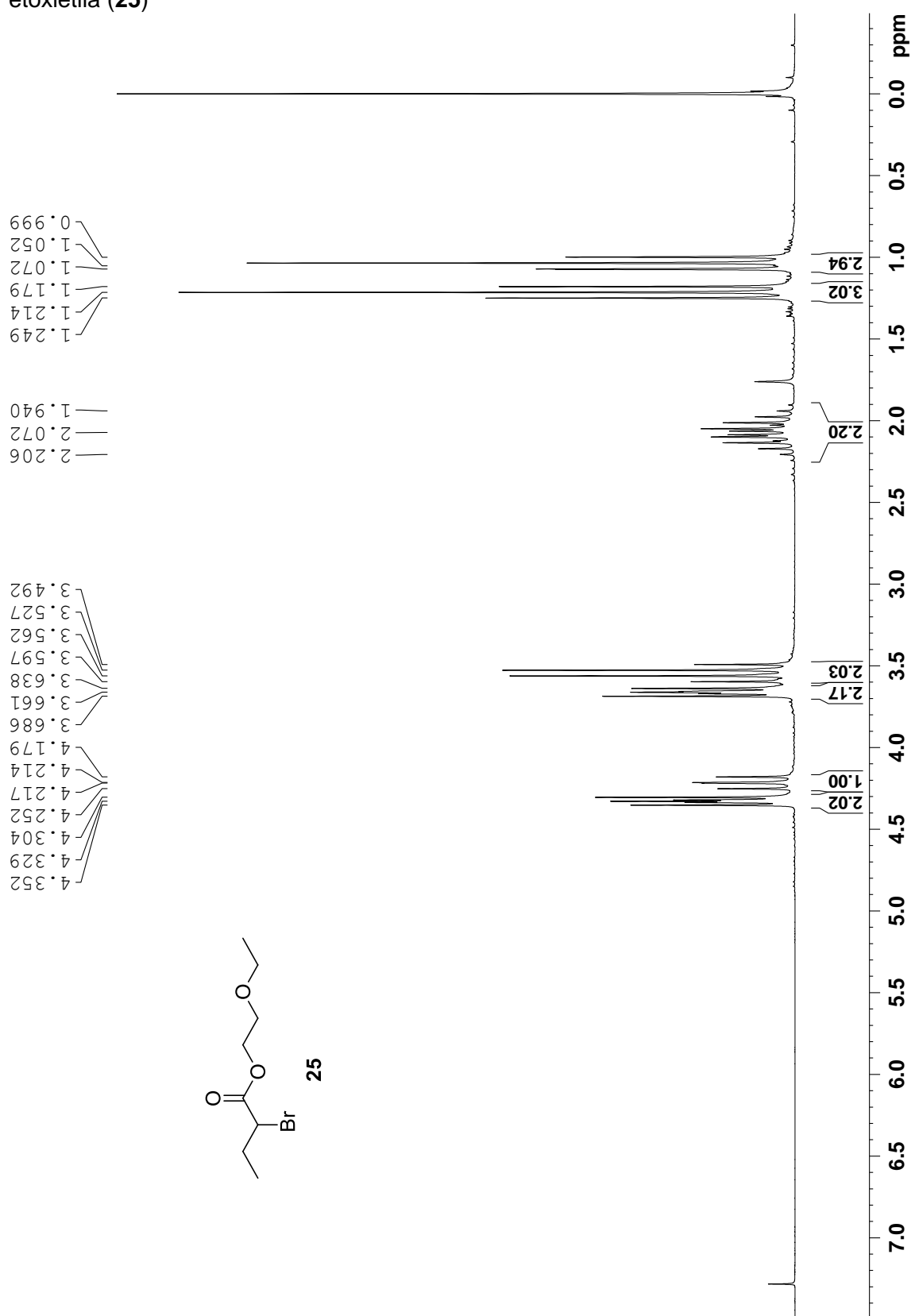
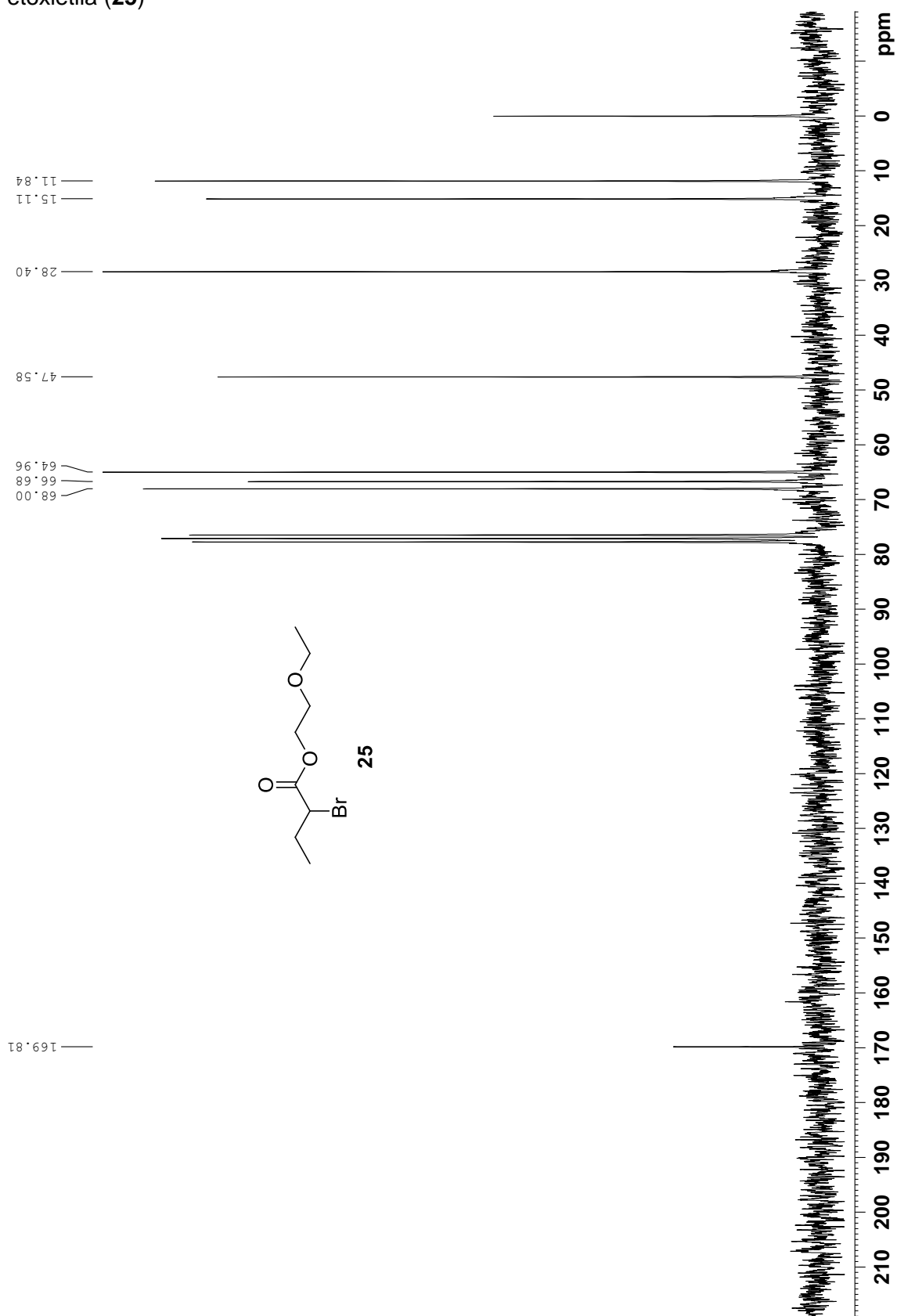


Figura A16 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de 2-etoxietila (**25**)



169.81

68.00
66.68
64.96

47.58

28.40

15.11
11.84

Figura A17 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de 2-cloroetila (**26**)

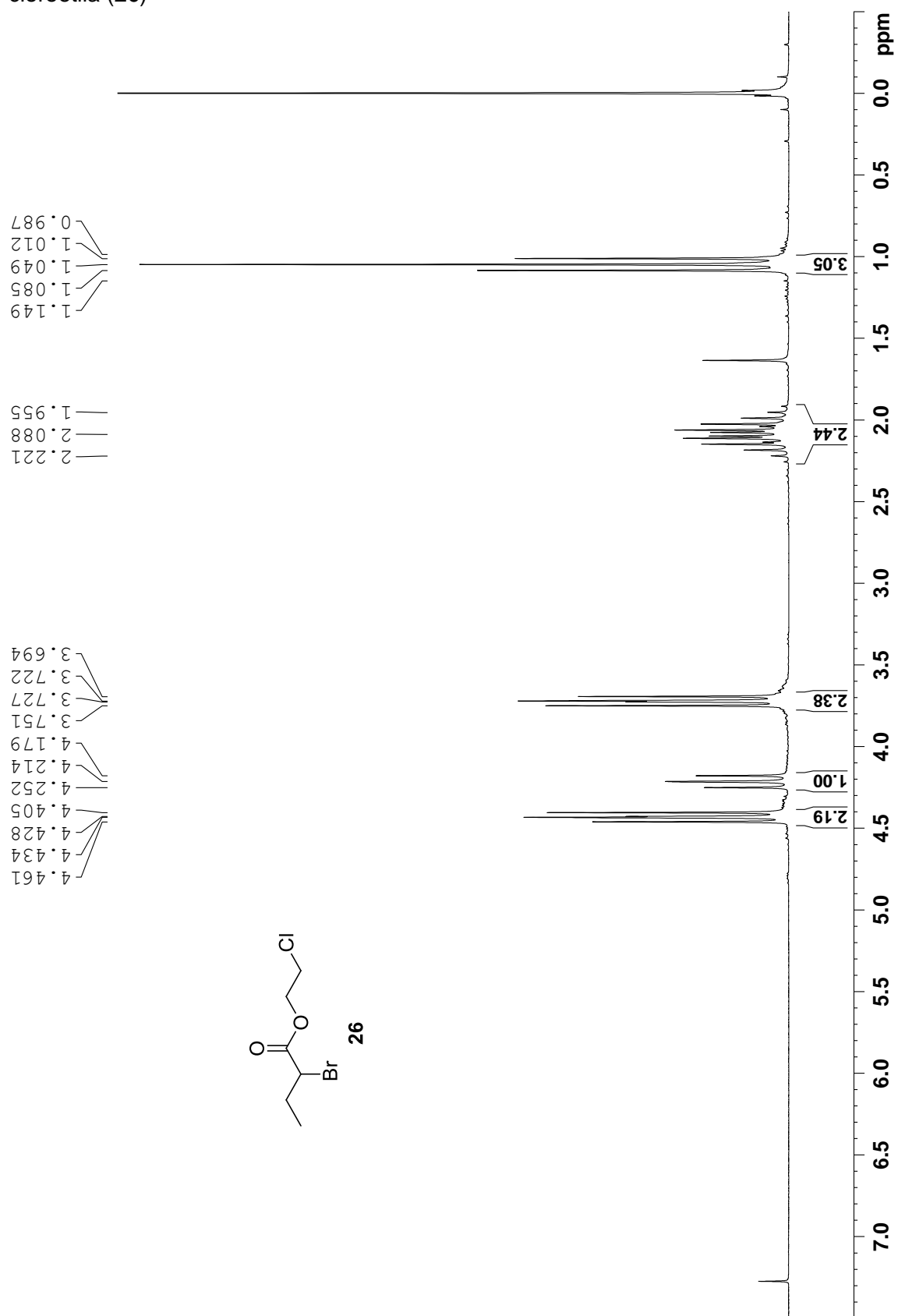


Figura A18 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de 2-cloroetila (**26**)

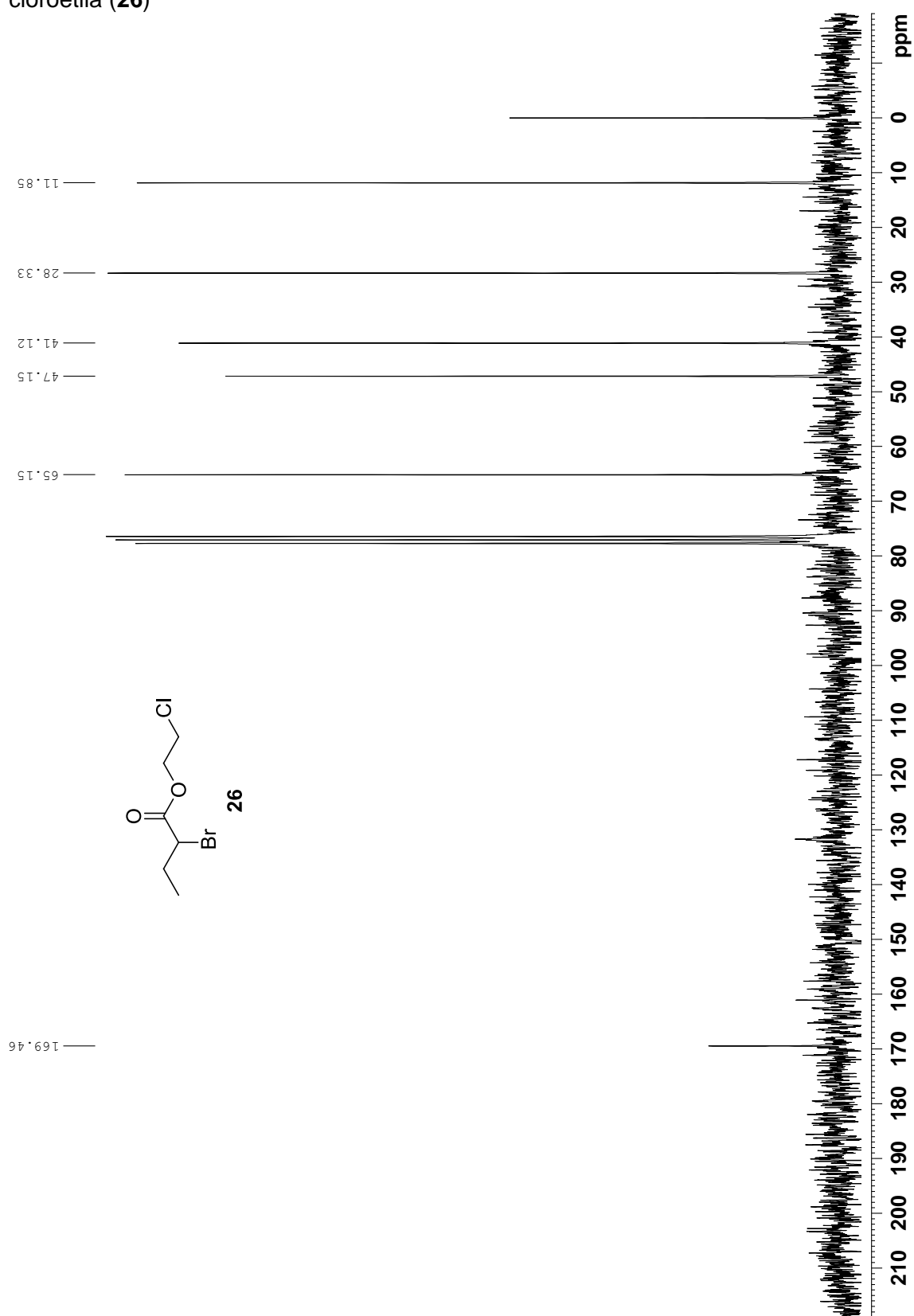


Figura A19 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de (R)-1-feniletila (**27**)

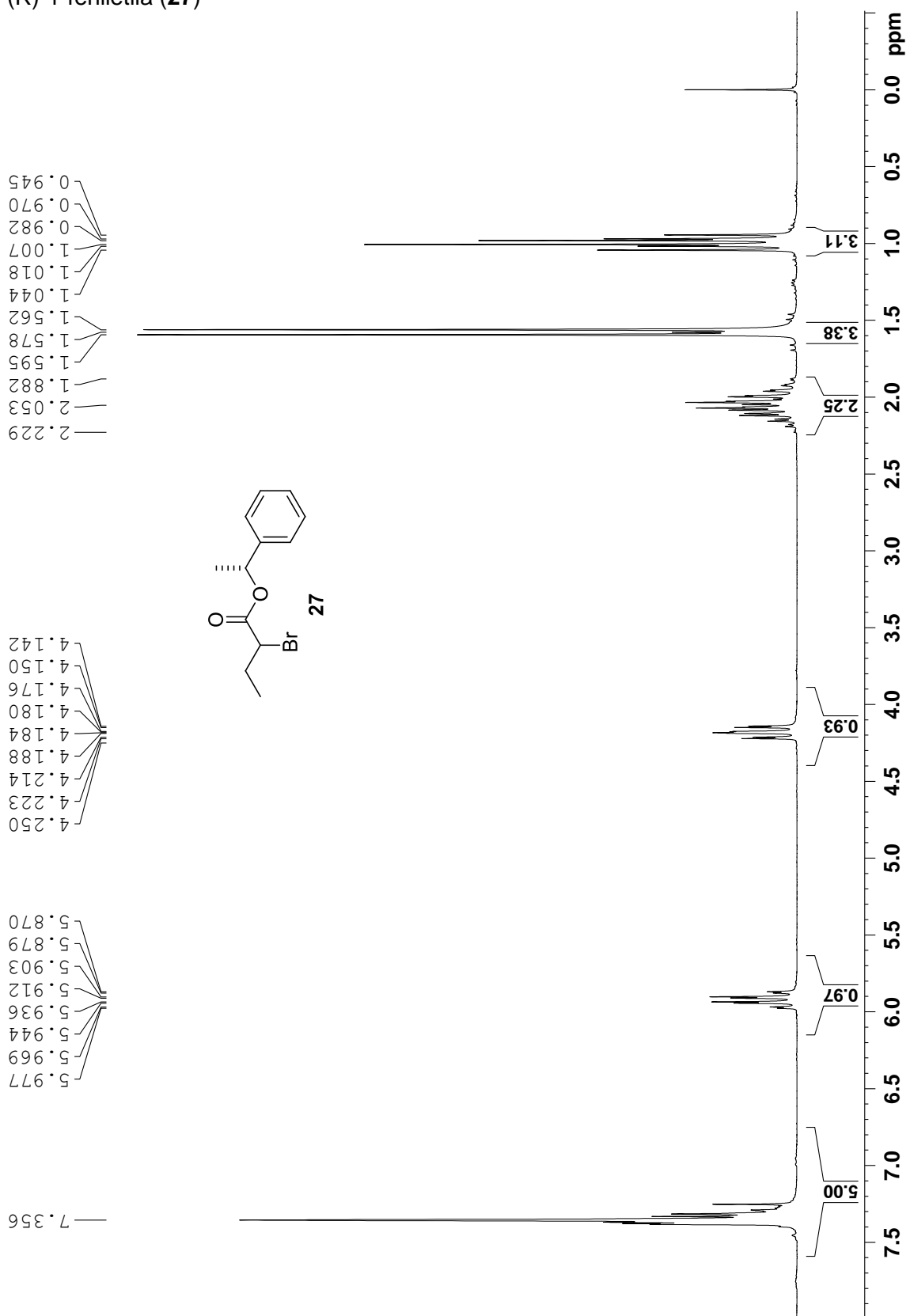


Figura A20 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do 2-bromo butanoato de (R)-1-feniletila (**27**)

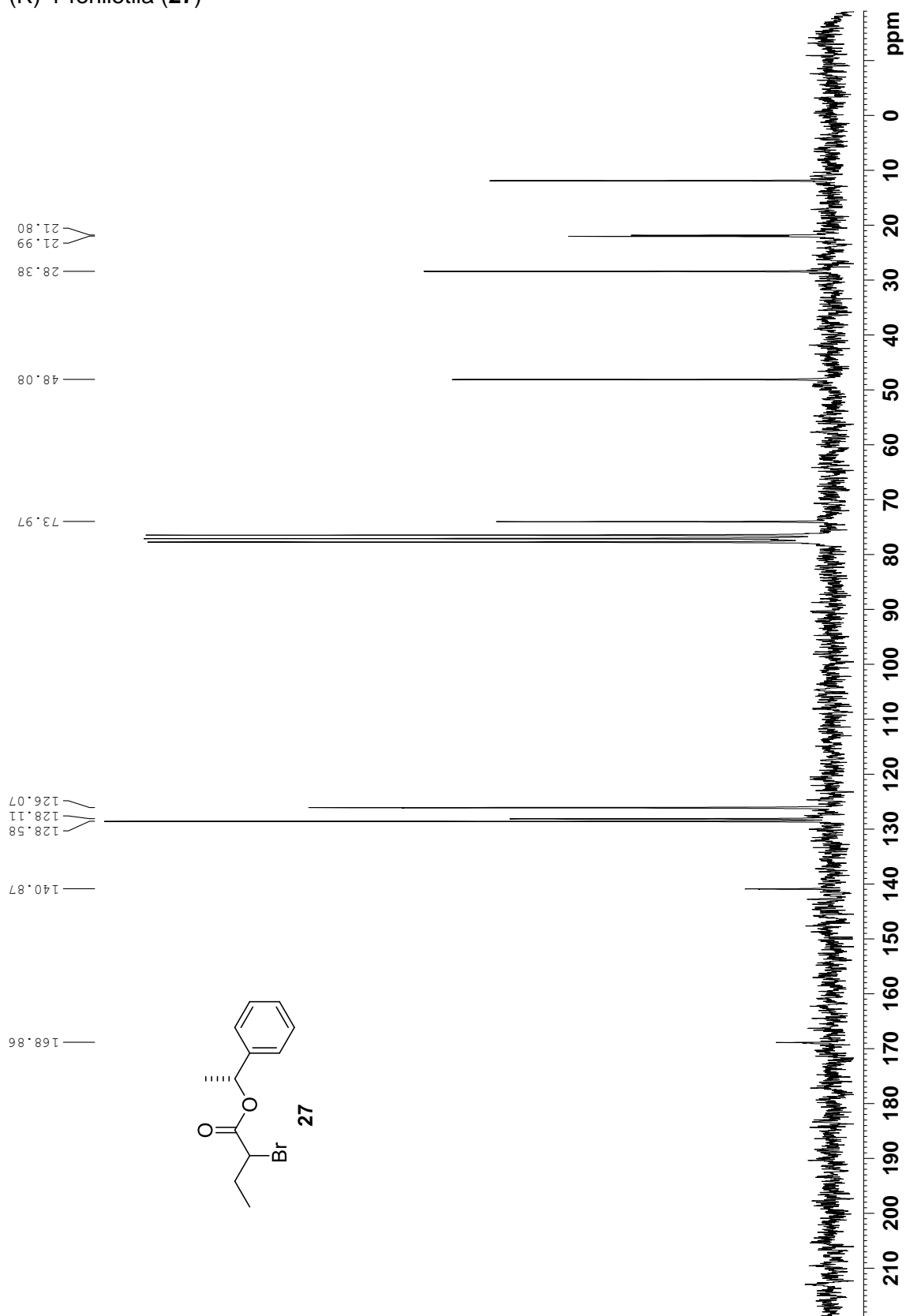


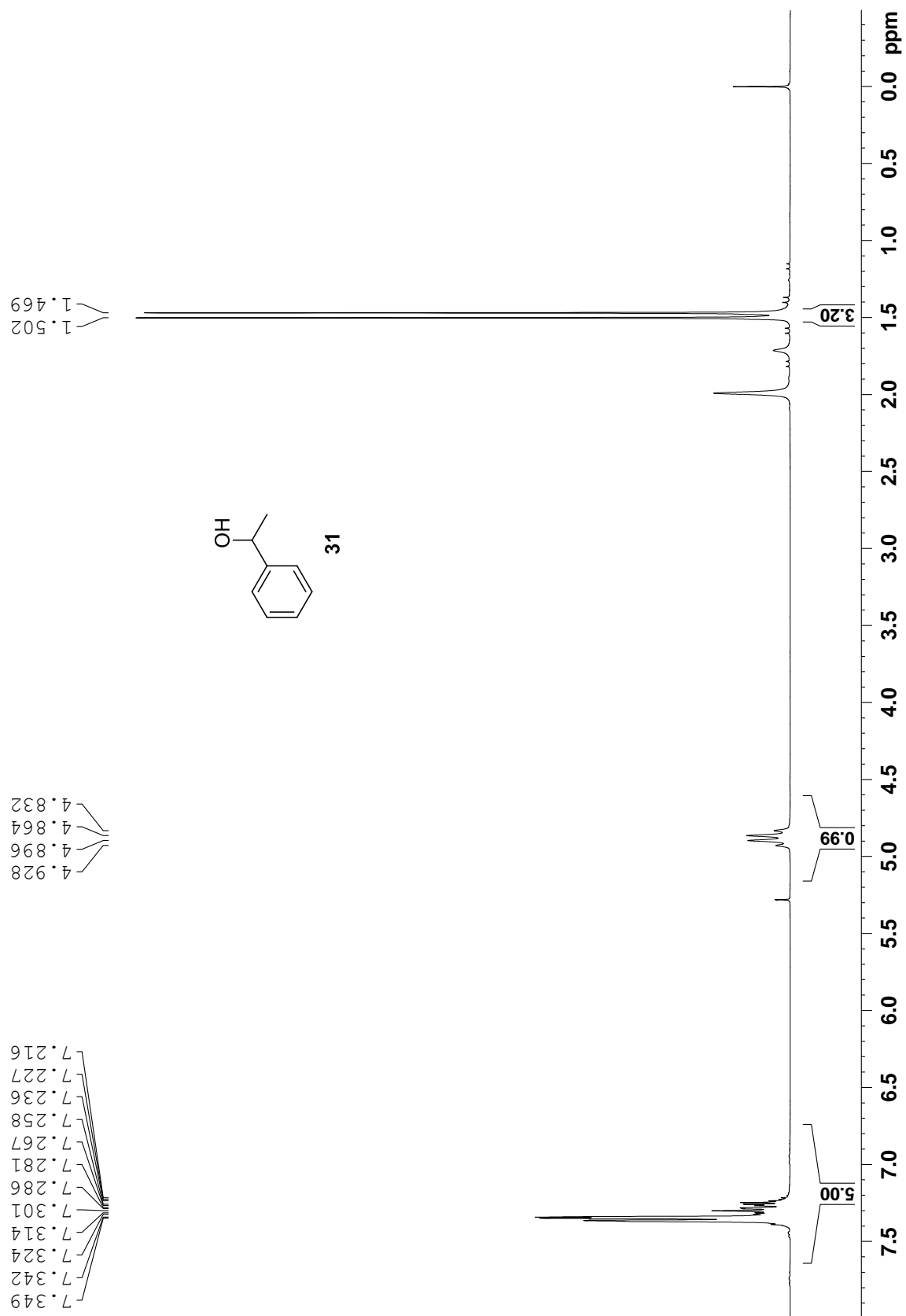
Figura A21 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do (*rac*)-1-Feniletanol (**31**)

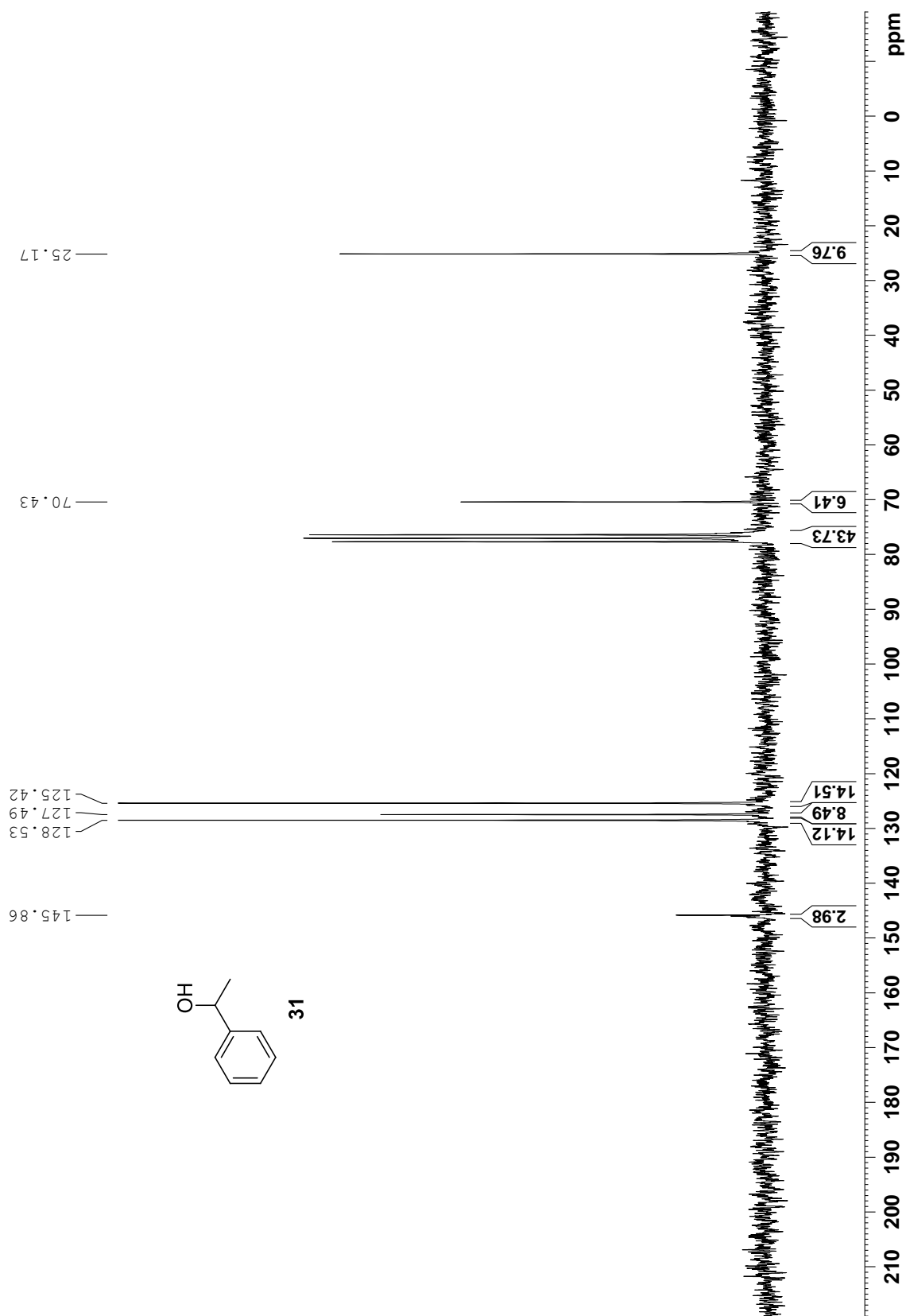
Figura A22 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do (rac)-1-Feniletanol (**31**)

Figura A23 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do acetato de (*R*)-1-Feniletila (**31**)

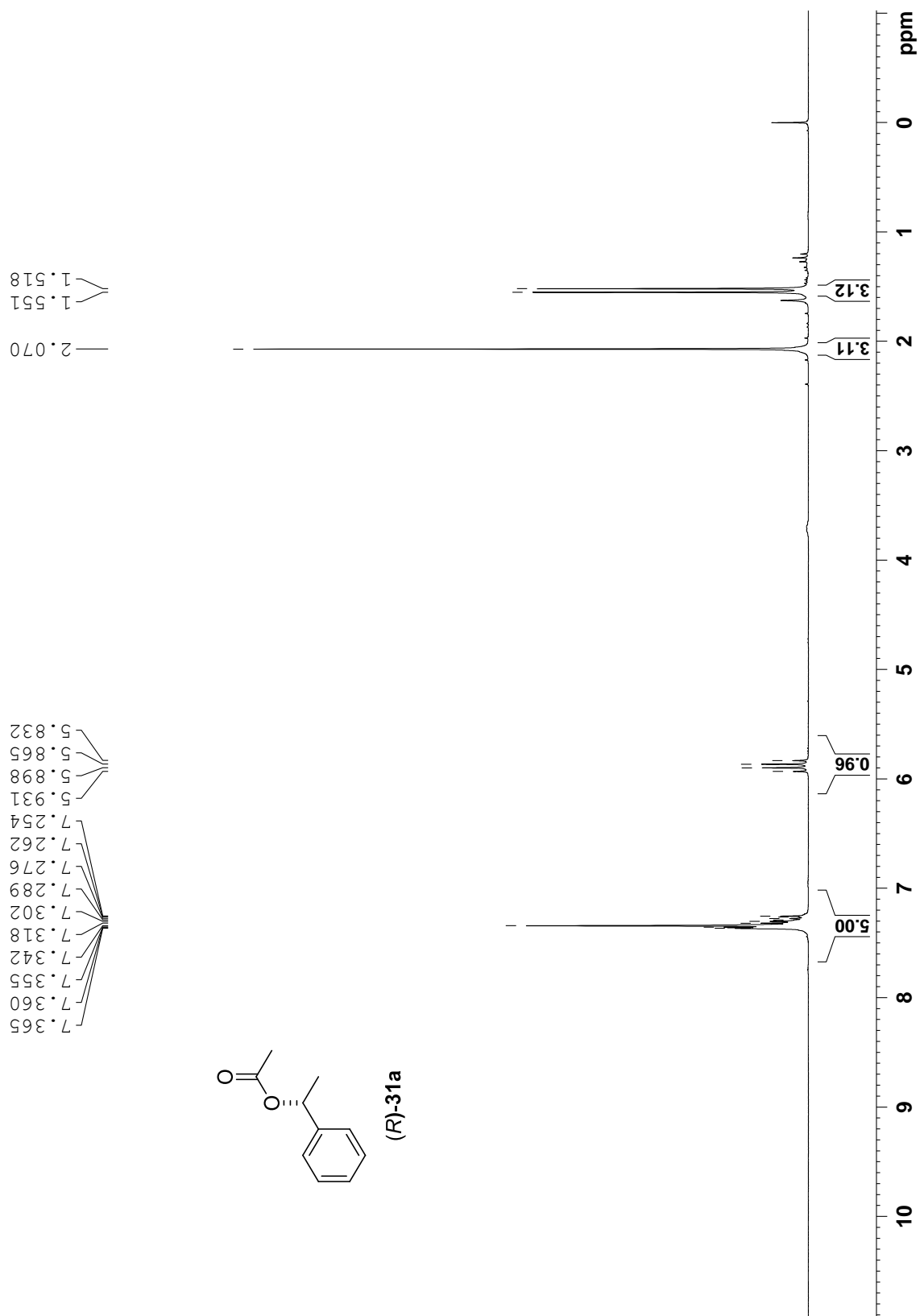


Figura A24 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do acetato de (*R*)-1-Feniletila (31)

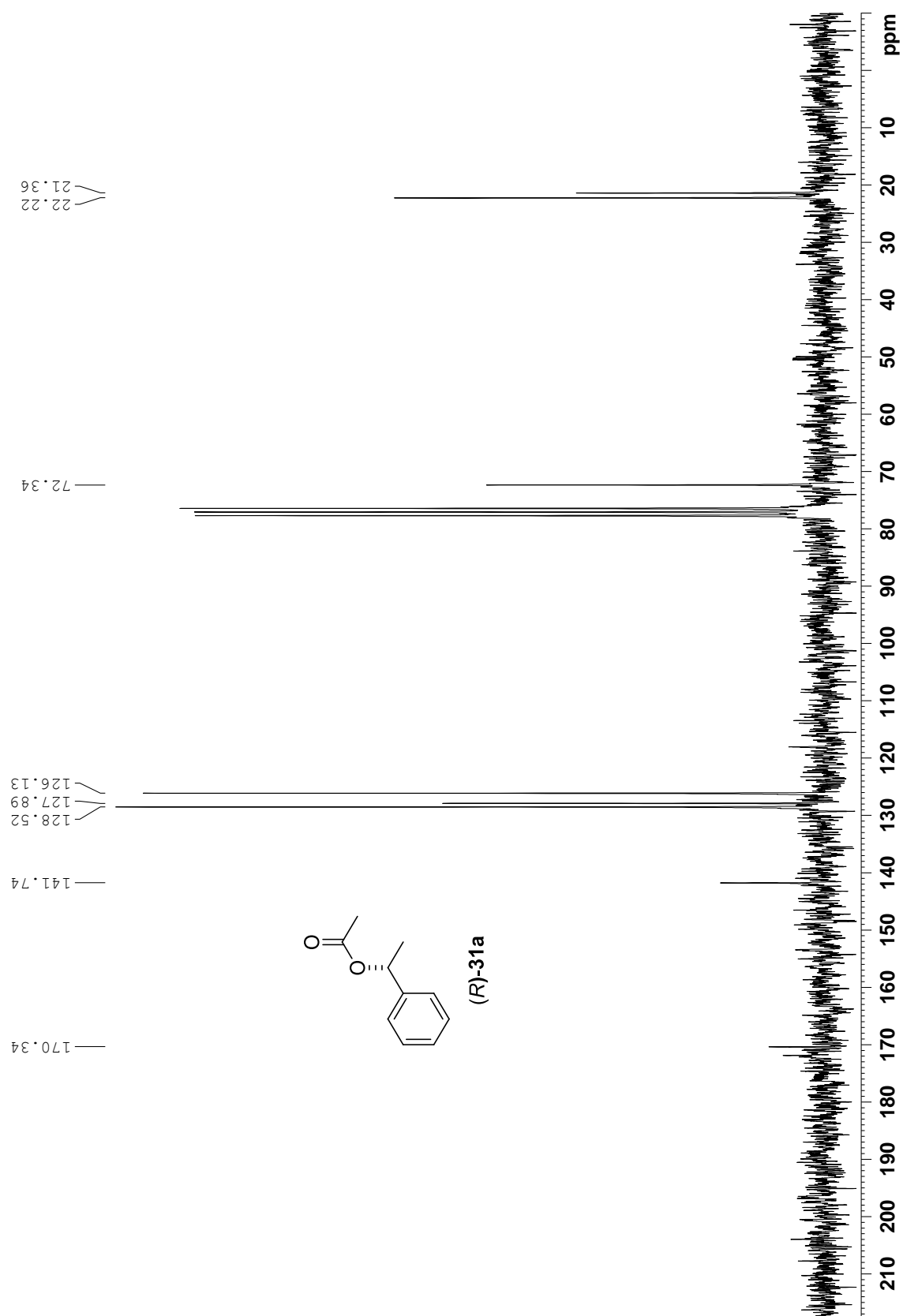


Figura A25 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do *p*-metoxi-(*rac*)-1-feniletanol **(32)**

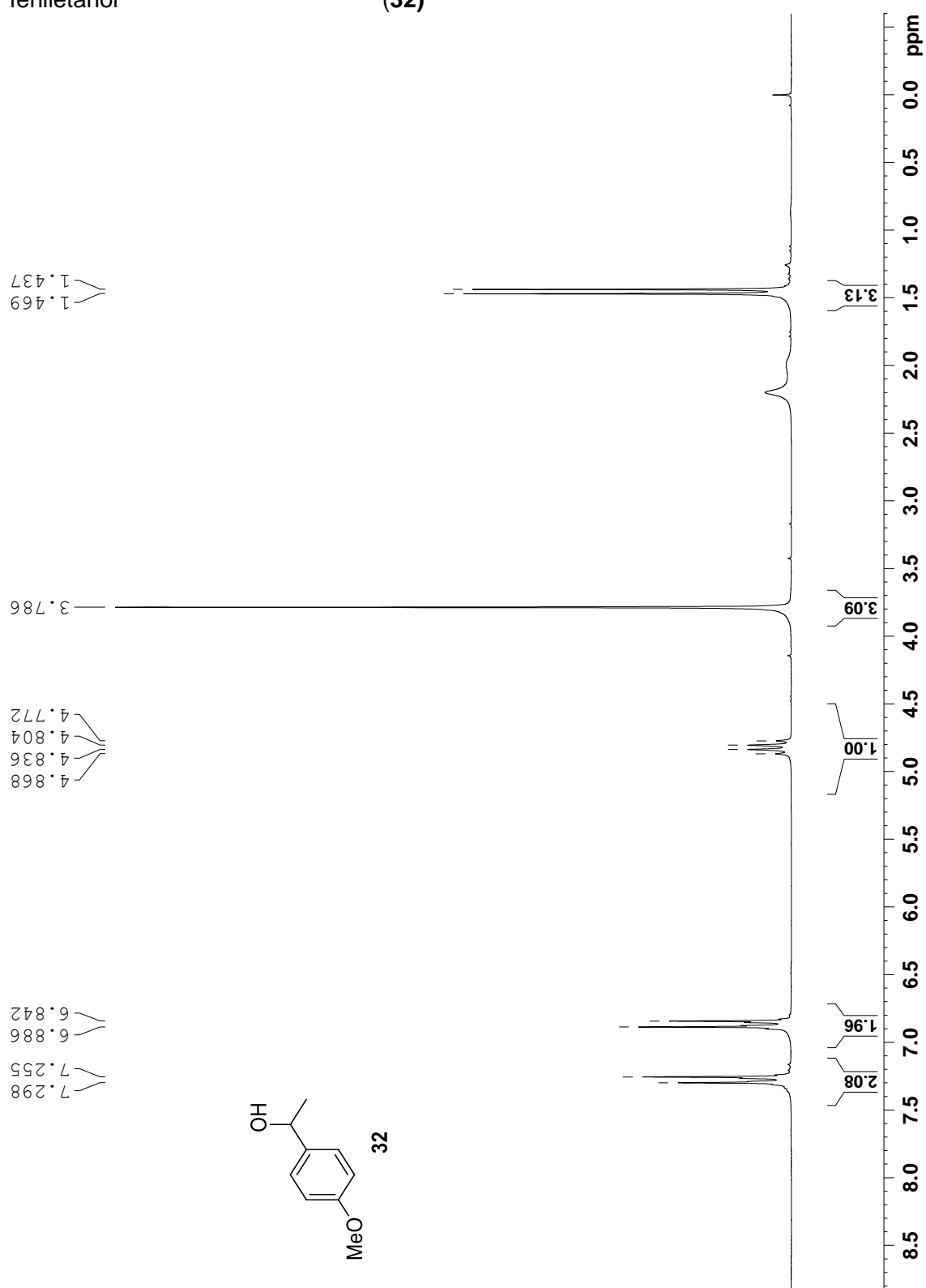


Figura A26 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do *p*-metoxi-(*rac*)-1-feniletanol (**32**)

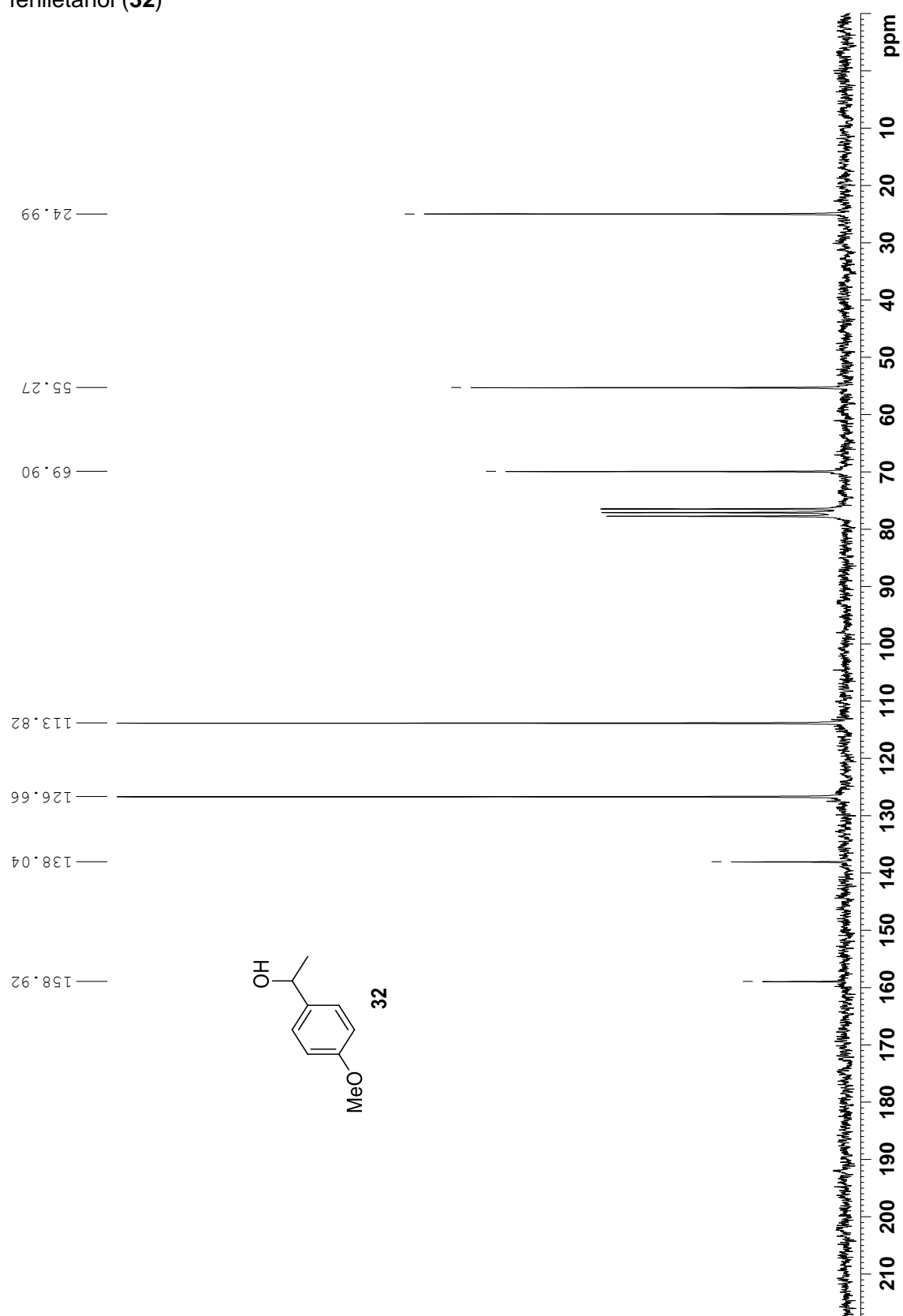


Figura A27 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do acetato de *p*-metoxi-(*R*)-1-feniletila (**32a**)

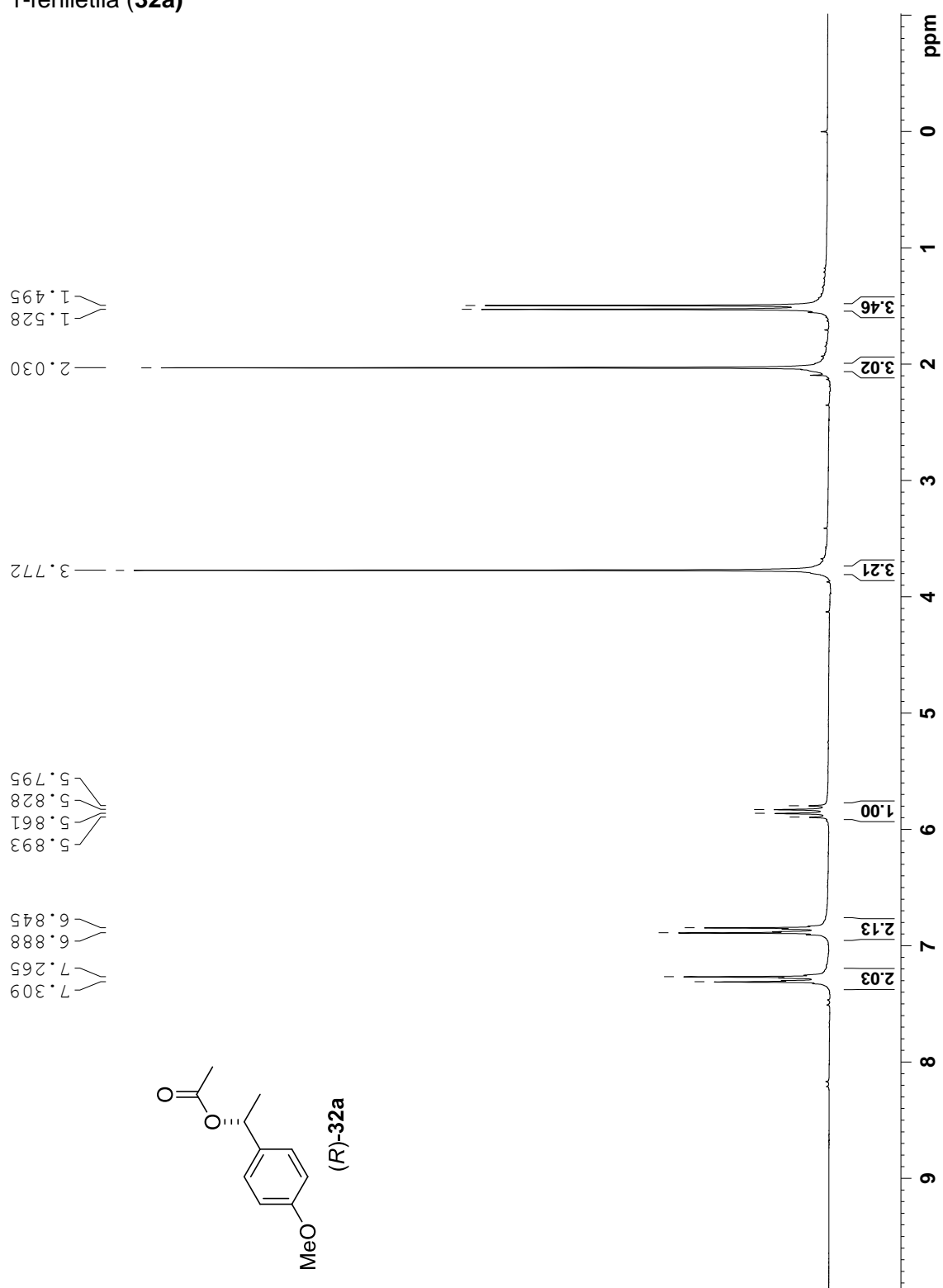


Figura A28 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do acetato de *p*-metoxi-(*R*)-1-feniletila (**32a**)

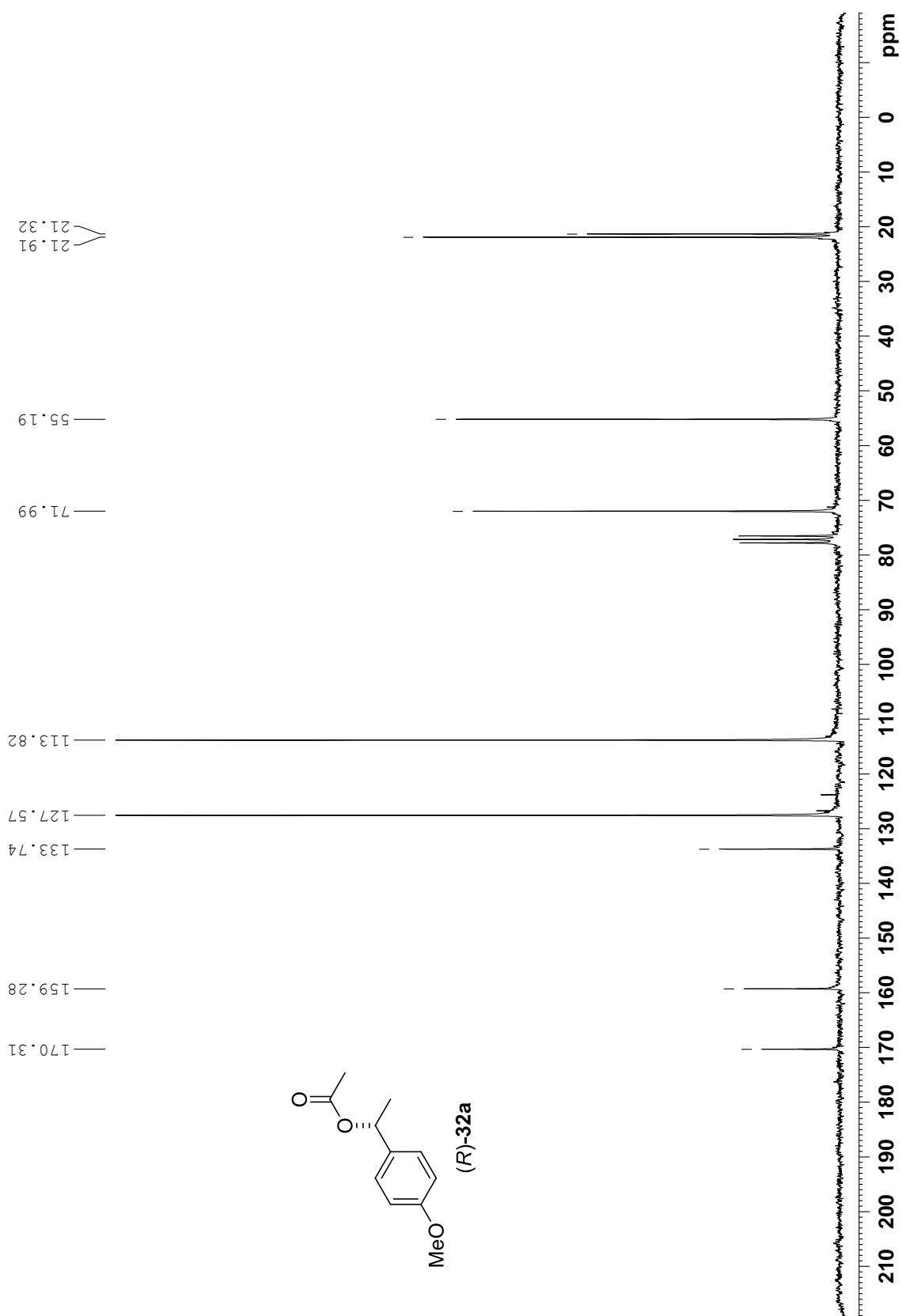


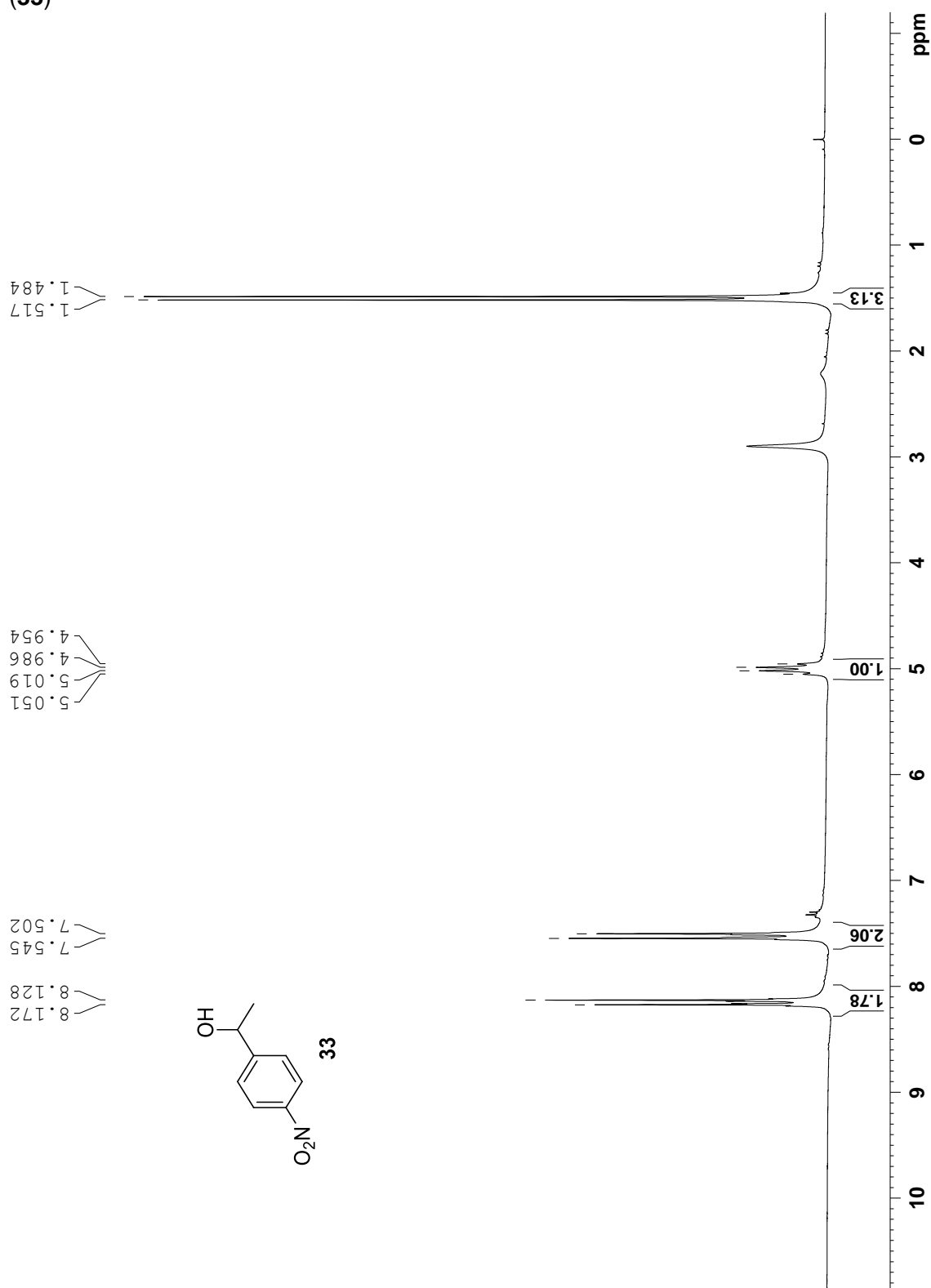
Figura A29 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do *p*-nitro-(*rac*)-1-feniletanol (**33**)

Figura A30 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do *p*-nitro-(*rac*)-1-feniletanol (**33**)

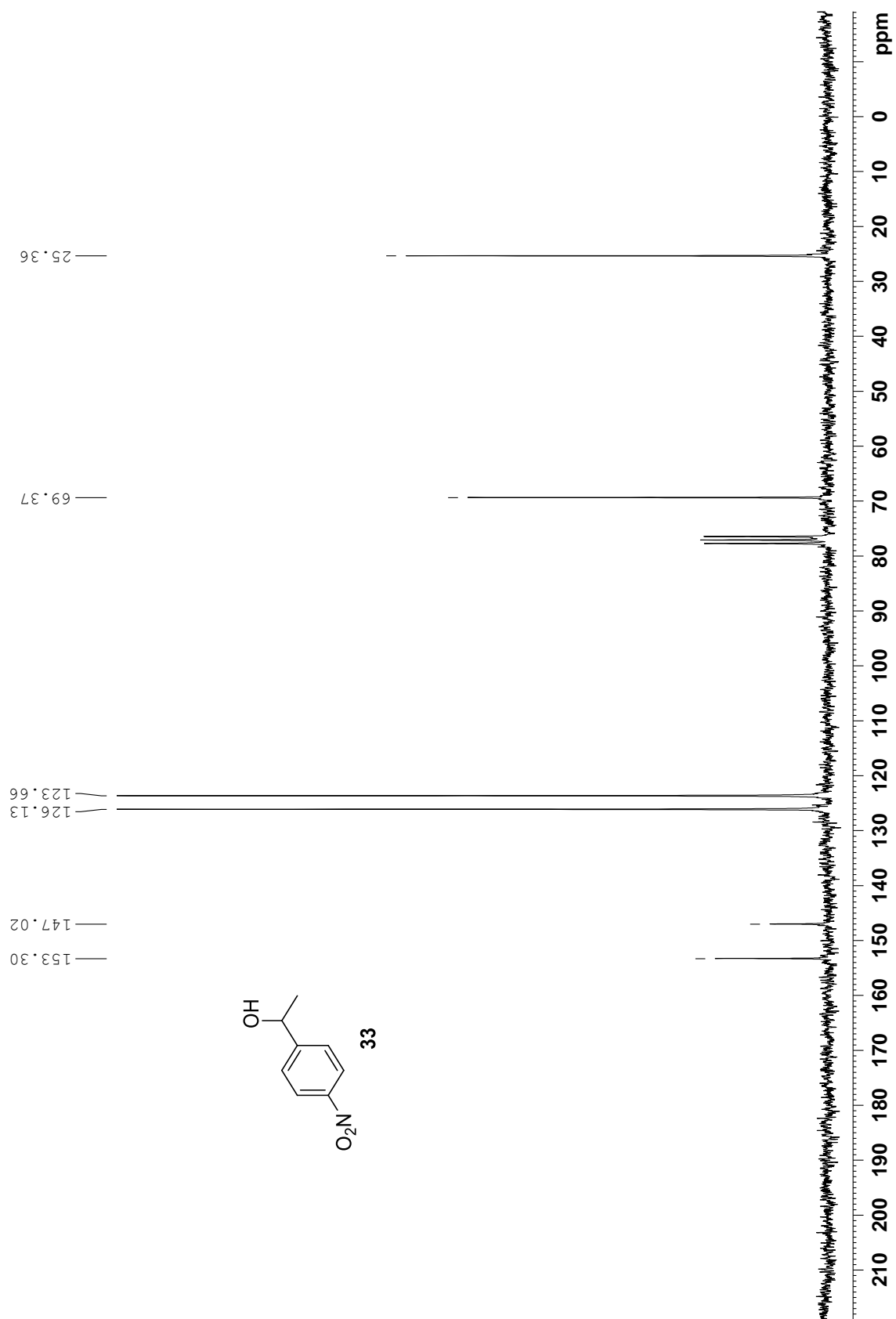


Figura A31 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do acetato de *p*-nitro-(*R*)-1-feniletanol (**33a**)

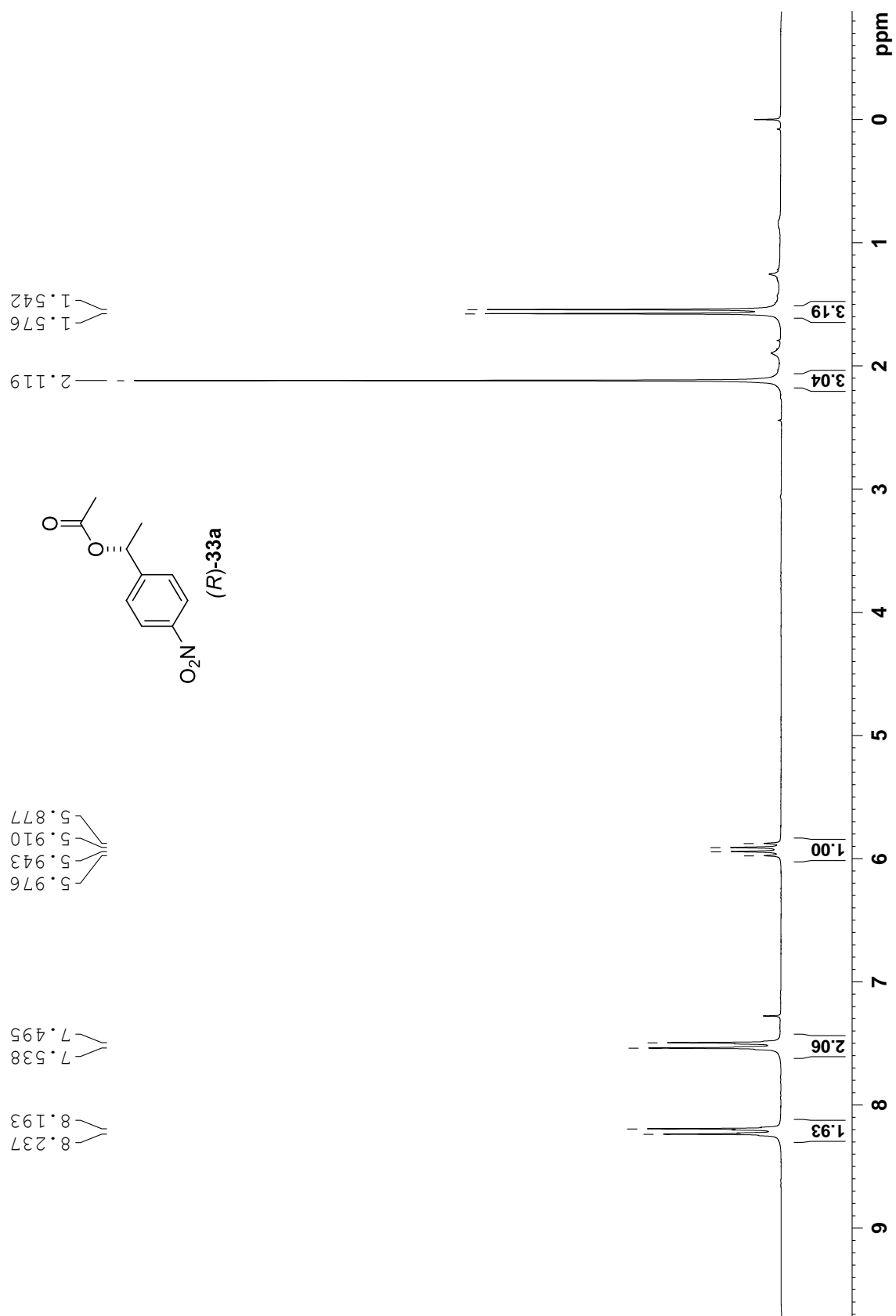


Figura A32 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do acetato de *p*-nitro-(*R*)-1-feniletanol (**33a**)

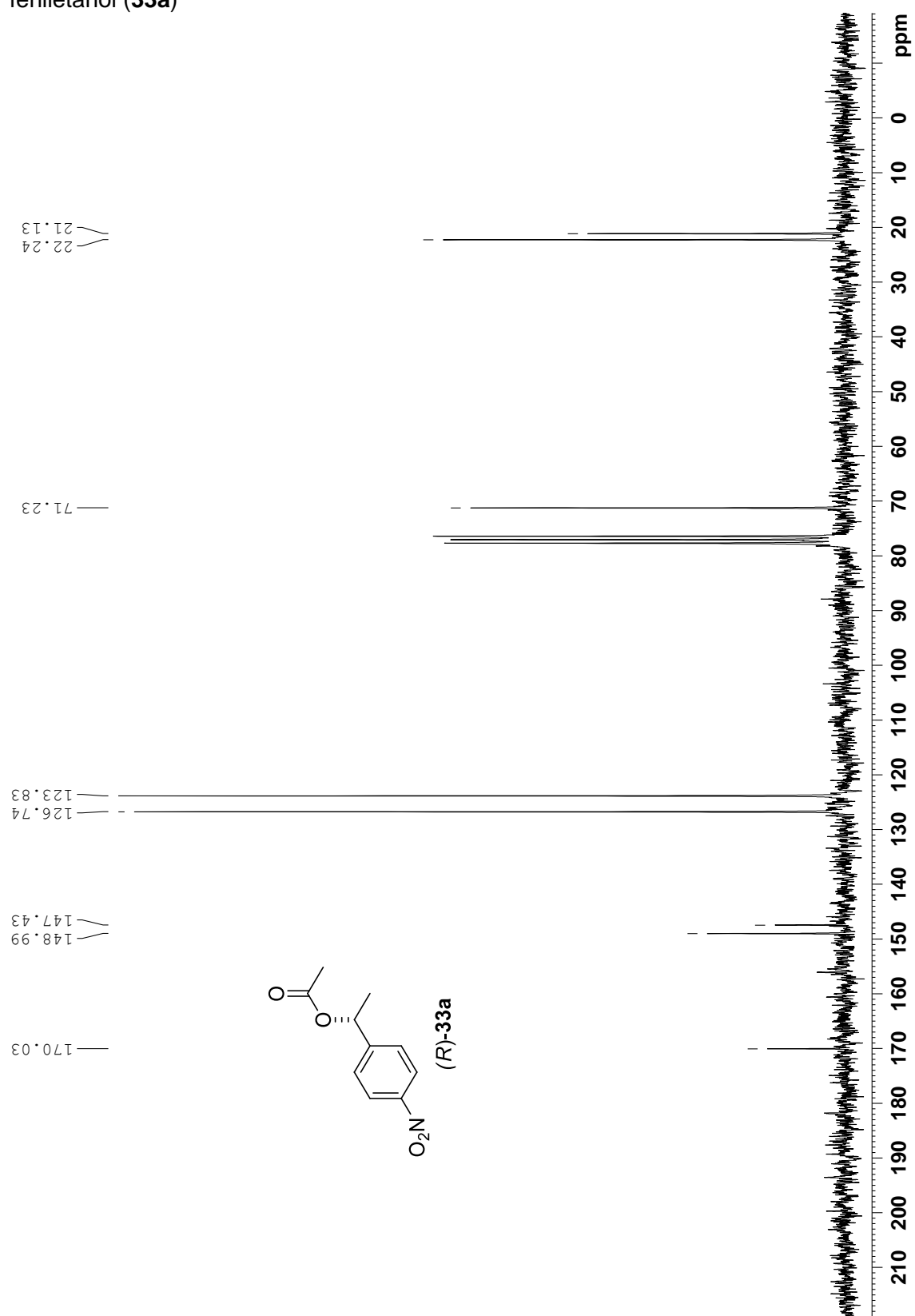


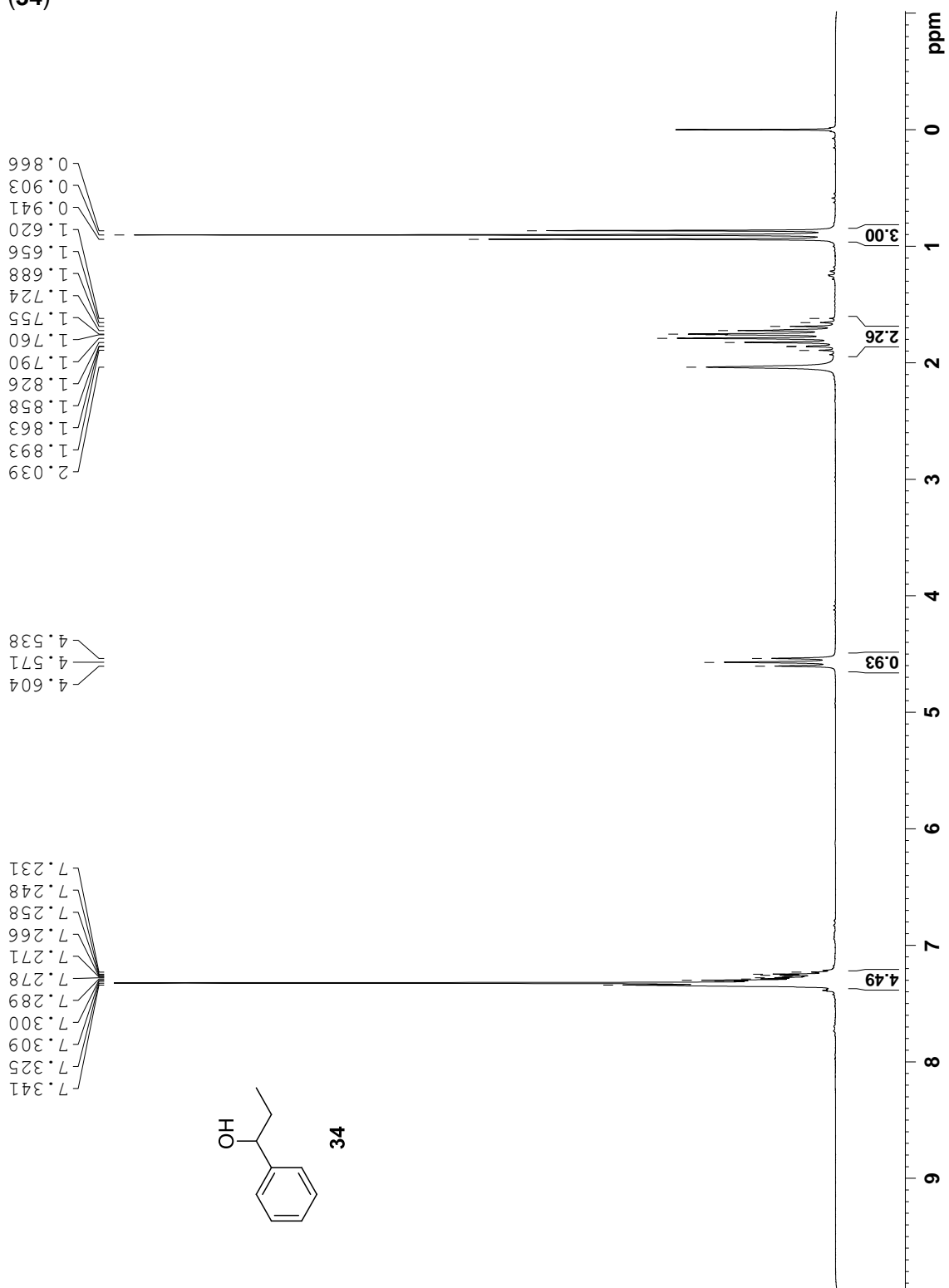
Figura A33 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do (*rac*)-1-Fenilpropanol (**34**)

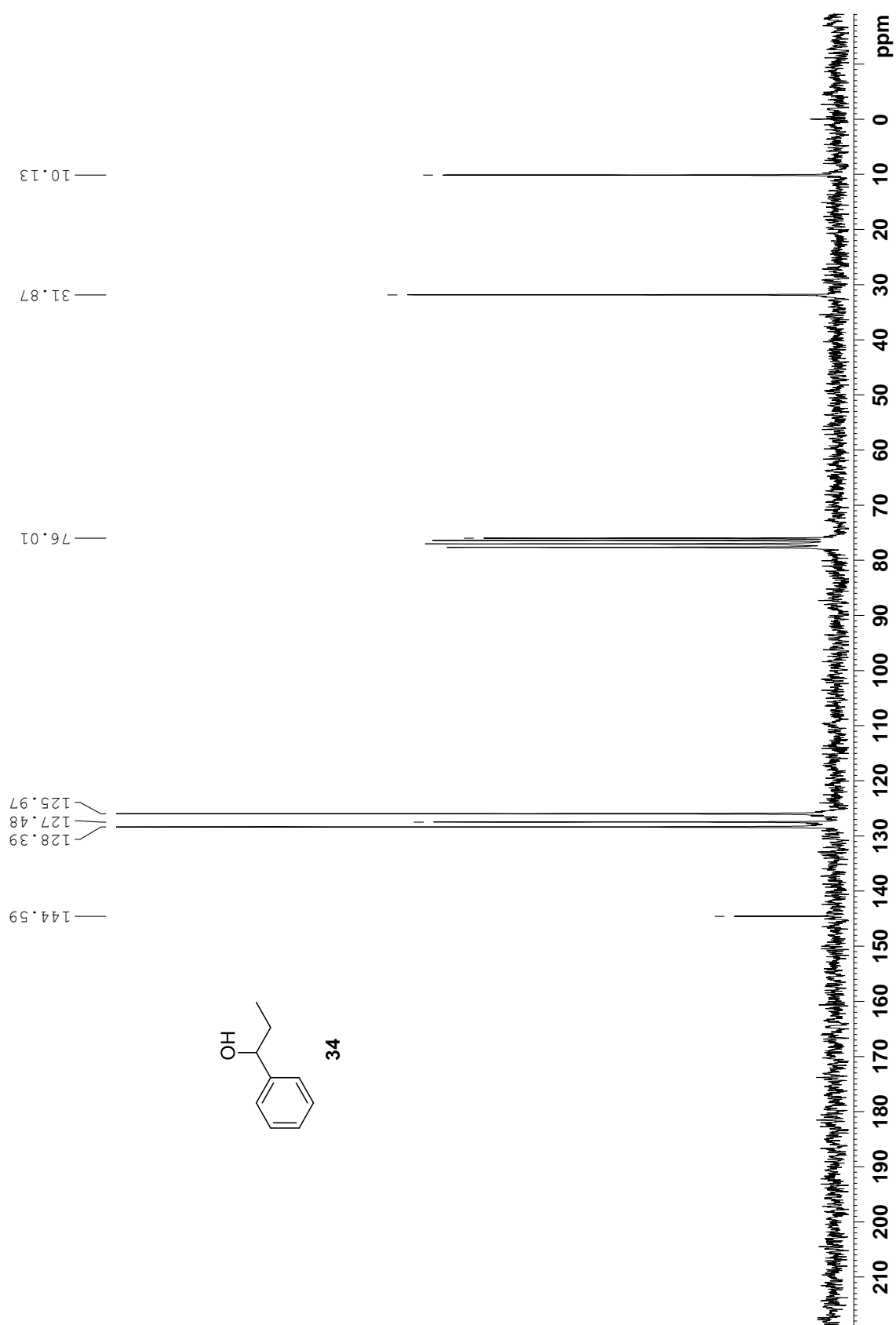
Figura A34 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do (*rac*)-1-Fenilpropanol (**34**).

Figura A35 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) do acetato de (*R*)-1-Fenilpropila (**34a**)

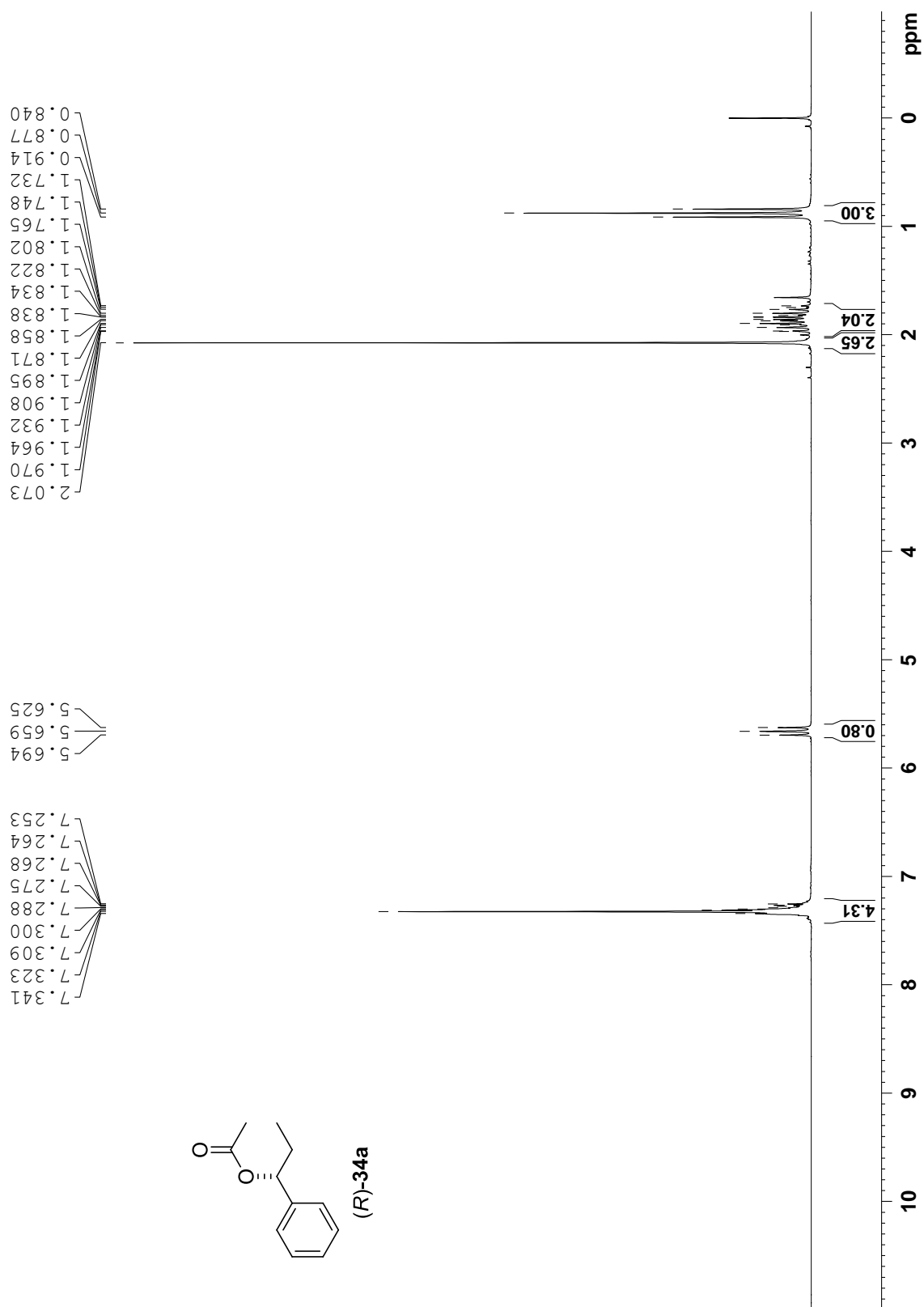
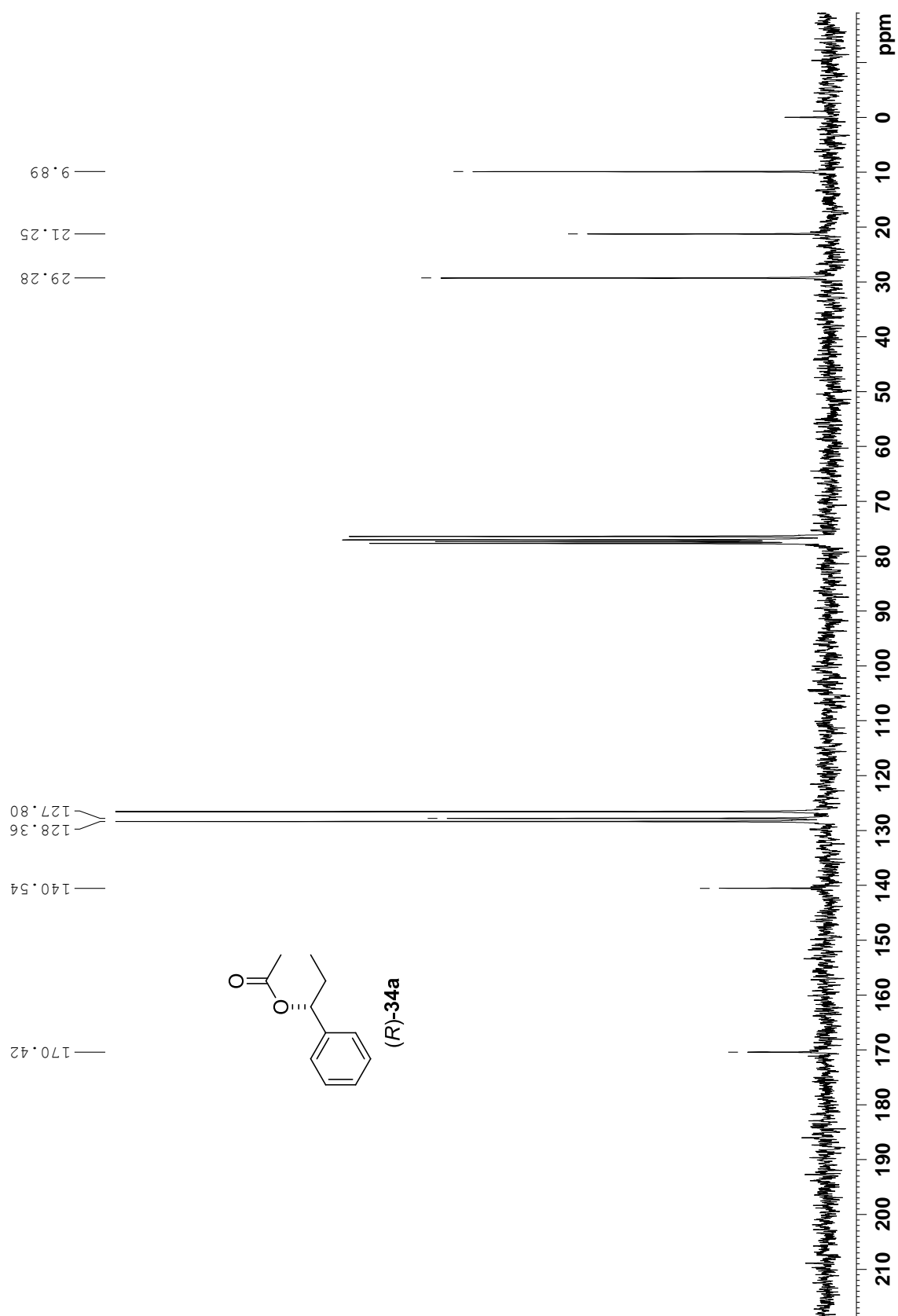


Figura A36 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS) do acetato de (*R*)-1-Fenilpropila (**34a**)



APÊNDICE B: CROMATOGRAMAS

SUMÁRIO

Figura B1 – Cromatograma do racemato do éster 2-bromobutanoato de metila (18).....	xl
Figura B2 – Cromatograma do racemato do éster 2-bromobutanoato de etila (19).....	xl
Figura B3 – Cromatograma do racemato do éster 2-bromobutanoato de n-propila (20)..	xli
Figura B4 – Cromatograma do racemato do éster 2-bromobutanoato de alila (21).	xli
Figura B5 – Cromatograma do racemato do éster 2-bromobutanoato de butila (22).....	xlii
Figura B6 - Cromatograma do racemato do éster 2-bromobutanoato de <i>isso</i> -butila (23).	xlii
Figura B7 - Cromatograma do racemato do éster 2-bromobutanoato de 3-pentila (24)..	xliii
Figura B8 - Cromatograma do racemato do éster 2-bromobutanoato de 2-etoxietila (25).	xliiii
Figura B9 - Cromatograma do racemato do éster 2-bromobutanoato de 2-cloroetila (26).	xliv
Figura B10 – Cromatograma do racemato do éster 2-bromobutanoato de (<i>R</i>)-1-feniletila (27).	xliv
Figura B11 - Cromatograma do racemato do éster 2-bromobutanoato de <i>p</i> -metoxi-(<i>R</i>)-1- feniletila (28).	xlv
Figura B12 - Cromatograma do racemato do éster 2-bromobutanoato de <i>p</i> -nitro-(<i>R</i>)-1- feniletila (29).	xlv
Figura B13 – Cromatograma do racemato do éster 2-bromobutanoato de (<i>R</i>)-1-fenilpropila (30).	xlvi
Figura B14 – Cromatograma do racemato do 1-feniletanol (<i>n</i>).....	xlvi
Figura B15 – Cromatograma do (<i>R</i>)-1-Feniletanol (31) enantiopuro	xlvii
Figura B16 - Cromatograma do racemato do <i>p</i> -metoxi-1-Feniletanol (32).....	xlvii
Figura B17 – Cromatograma do <i>p</i> -metoxi-(<i>R</i>)-1-feniletanol (32) enantiopuro.....	xlviii
Figura B18 - Cromatograma do racemato do <i>p</i> -nitro-1-Feniletanol (32).	xlviii
Figura B19 – Cromatograma do <i>p</i> -nitro-(<i>R</i>)-1-feniletanol (33) enantiopuro	xlix
Figura B20 - Cromatograma do racemato 1-Fenilpropanol (34).	xlix
Figura B21 - Cromatograma do (<i>R</i>)-1-Fenilpropanol (34) enantiopuro.	l

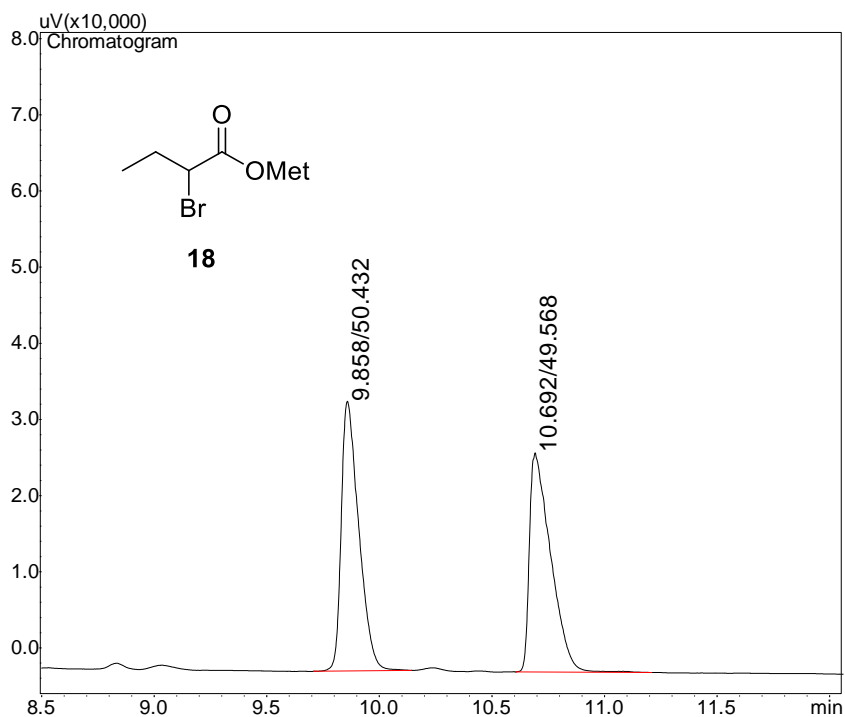


Figura B1 – Cromatograma do racemato do éster 2-bromobutanoato de metila (**18**).

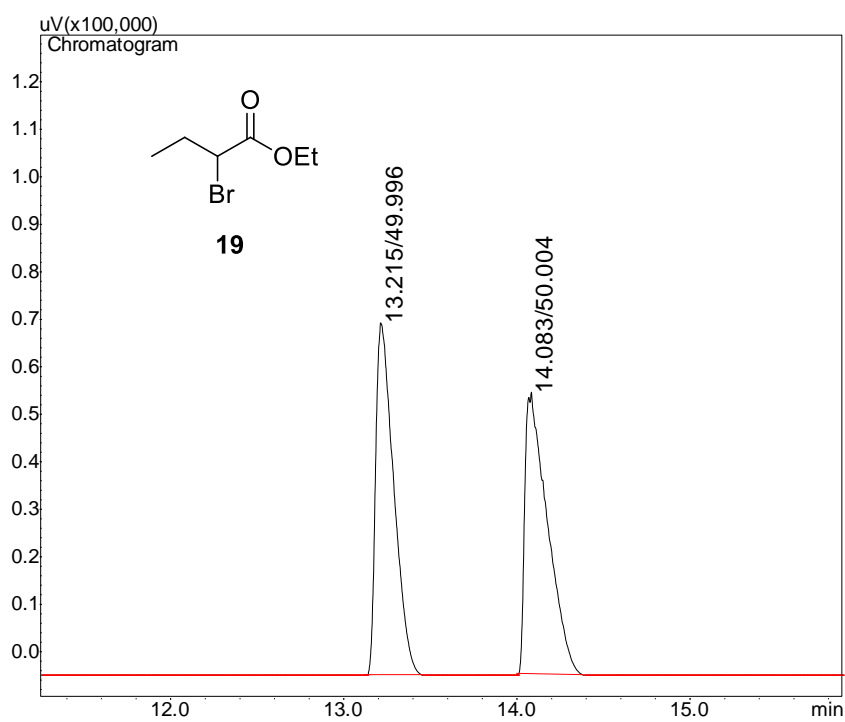


Figura B2 – Cromatograma do racemato do éster 2-bromobutanoato de etila (**19**).

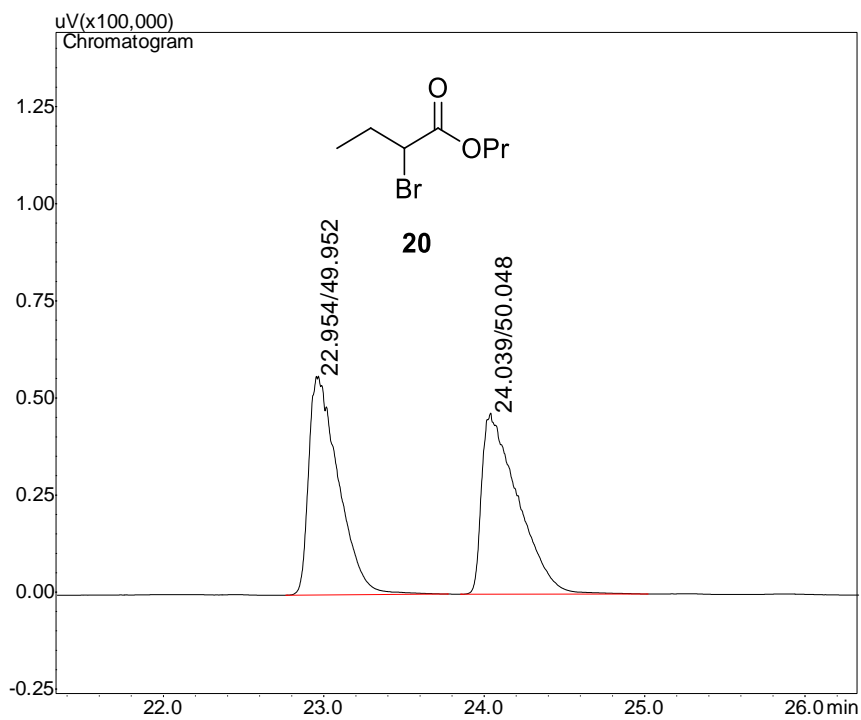


Figura B3 – Cromatograma do racemato do éster 2-bromobutanoato de n-propila (**20**).

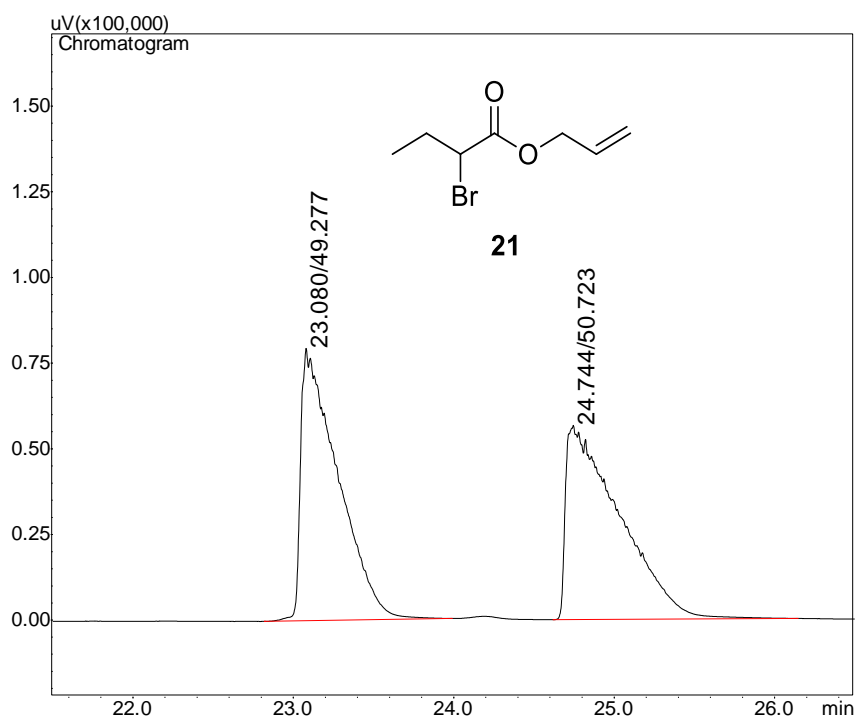


Figura B4 – Cromatograma do racemato do éster 2-bromobutanoato de alila (**21**).

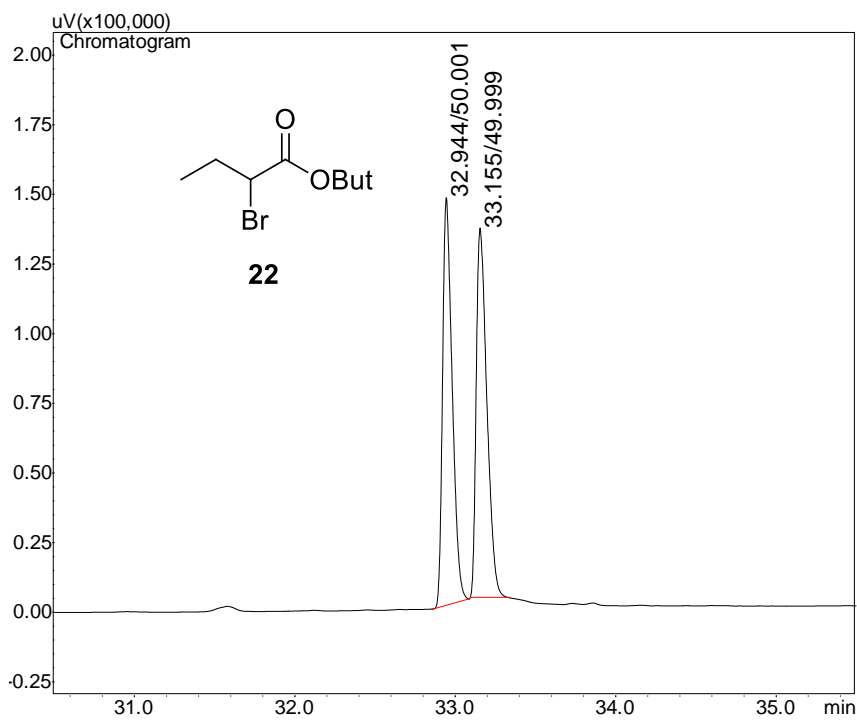


Figura B5 – Cromatograma do racemato do éster 2-bromobutanoato de butila (**22**).

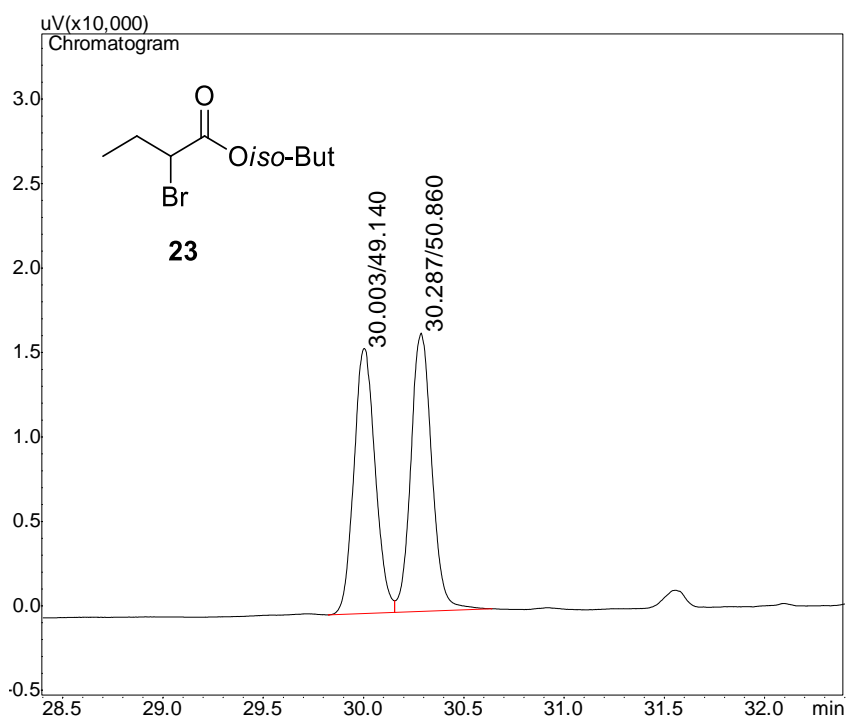


Figura B6 - Cromatograma do racemato do éster 2-bromobutanoato de *isso*-butila (**23**).

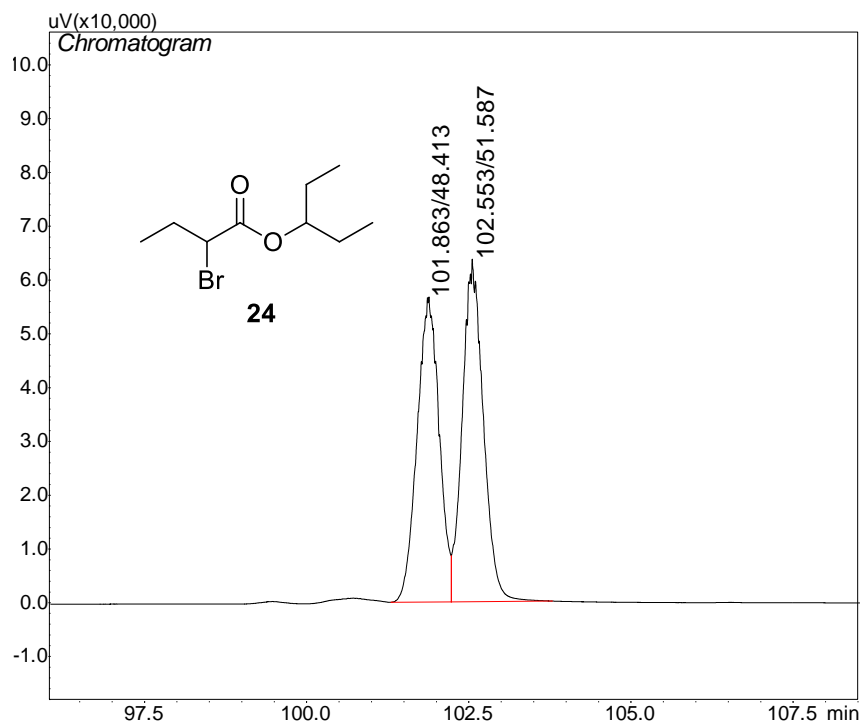


Figura B7 - Cromatograma do racemato do éster 2-bromobutanoato de 3-pentila (**24**).

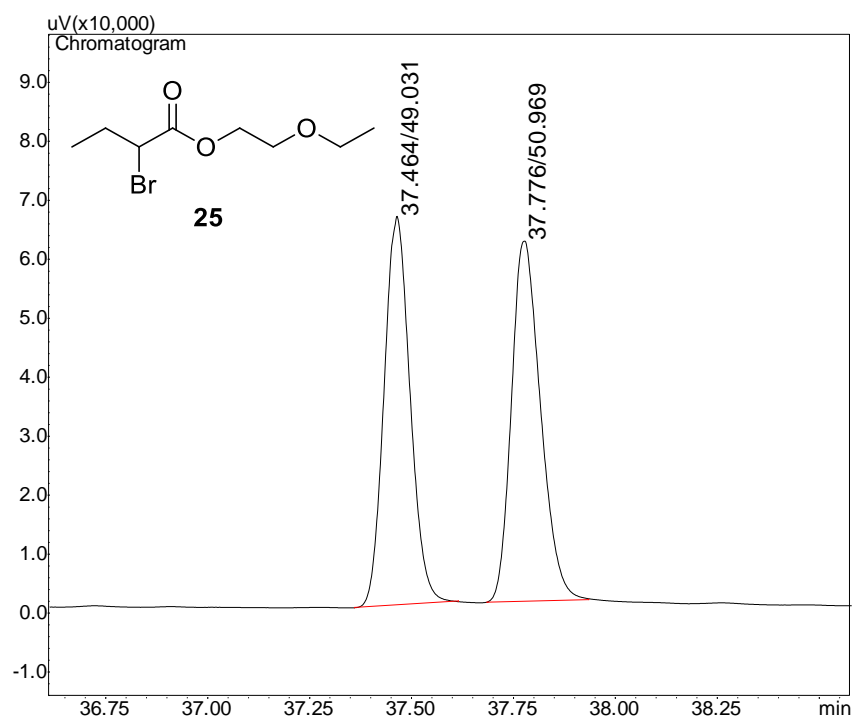


Figura B8 - Cromatograma do racemato do éster 2-bromobutanoato de 2-etoxietila (**25**).

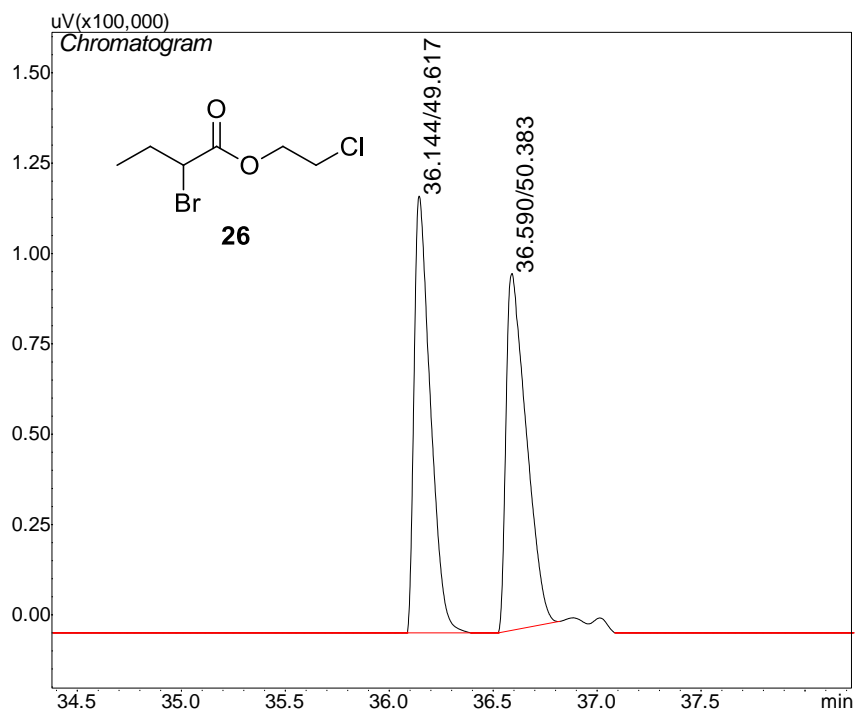


Figura B9 - Cromatograma do racemato do éster 2-bromobutanoato de 2-cloroetila (**26**).

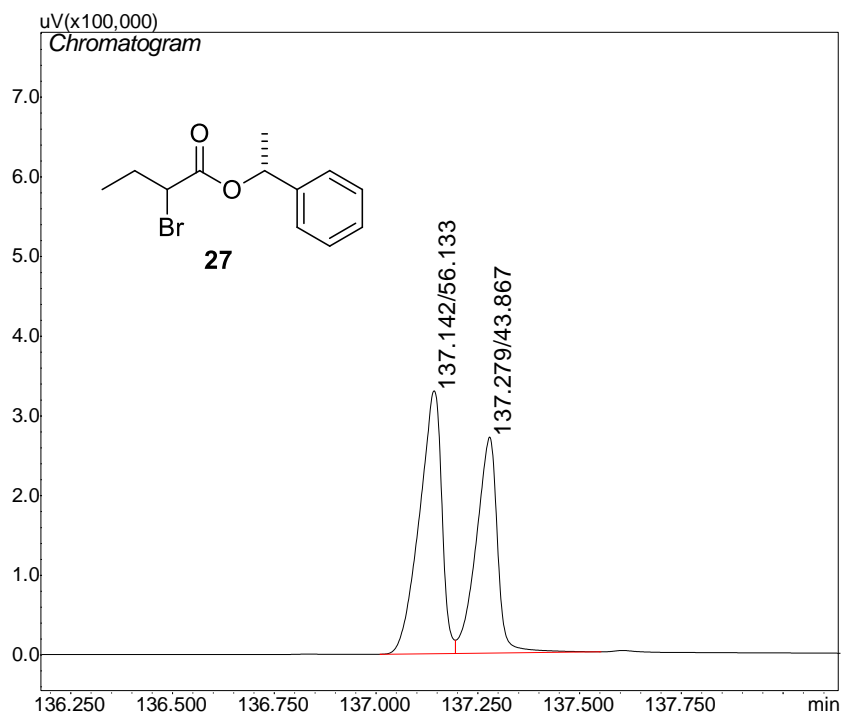


Figura B10 – Cromatograma do racemato do éster 2-bromobutanoato de (*R*)-1-feniletila (**27**).

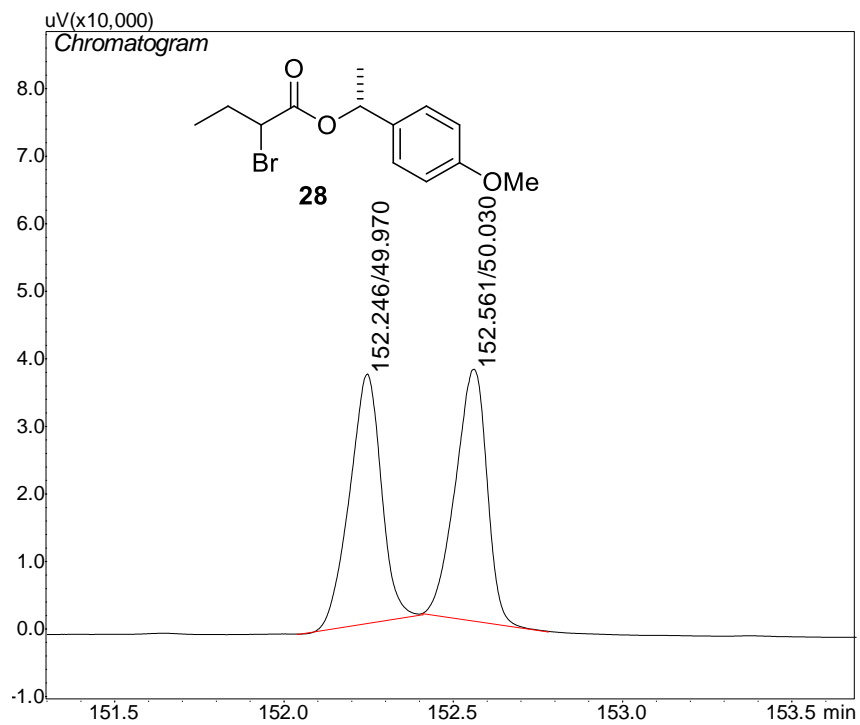


Figura B11 - Cromatograma do racemato do éster 2-bromobutanoato de *p*-metoxi-(*R*)-1-feniletila (**28**).

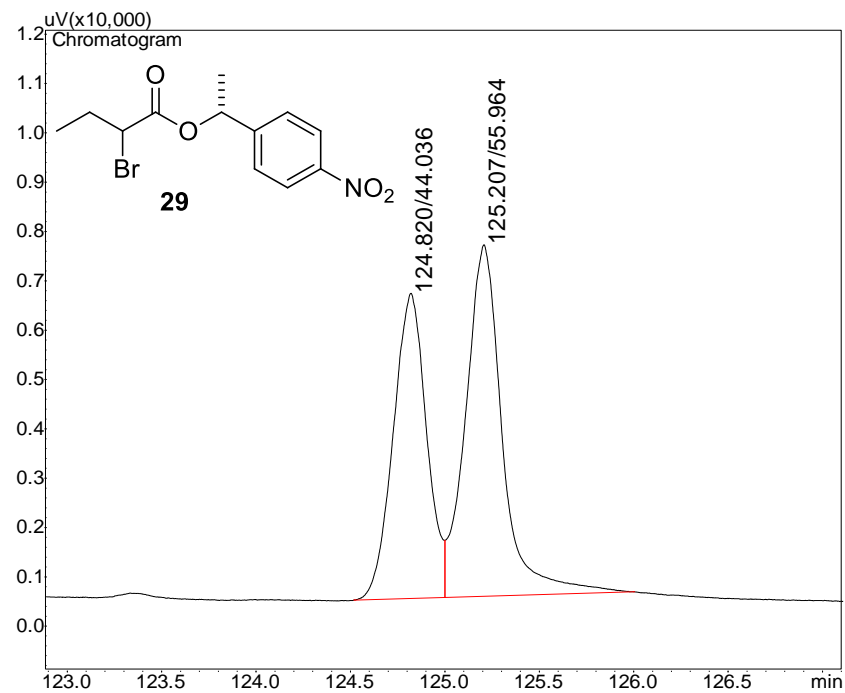


Figura B12 - Cromatograma do racemato do éster 2-bromobutanoato de *p*-nitro-(*R*)-1-feniletila (**29**).

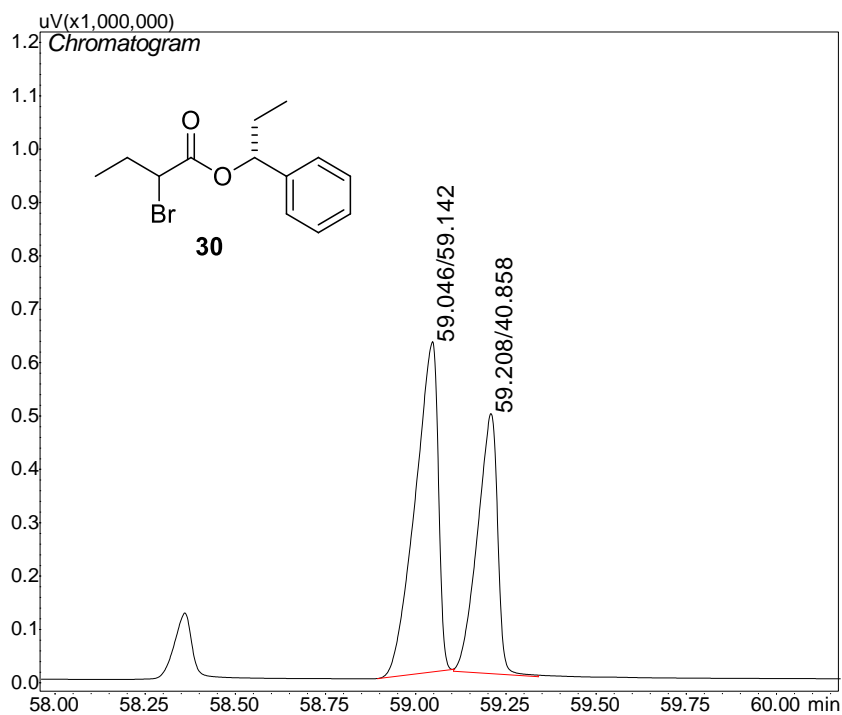


Figura B13 – Cromatograma do racemato do éster 2-bromobutanoato de (*R*)-1-fenilpropila (**30**).

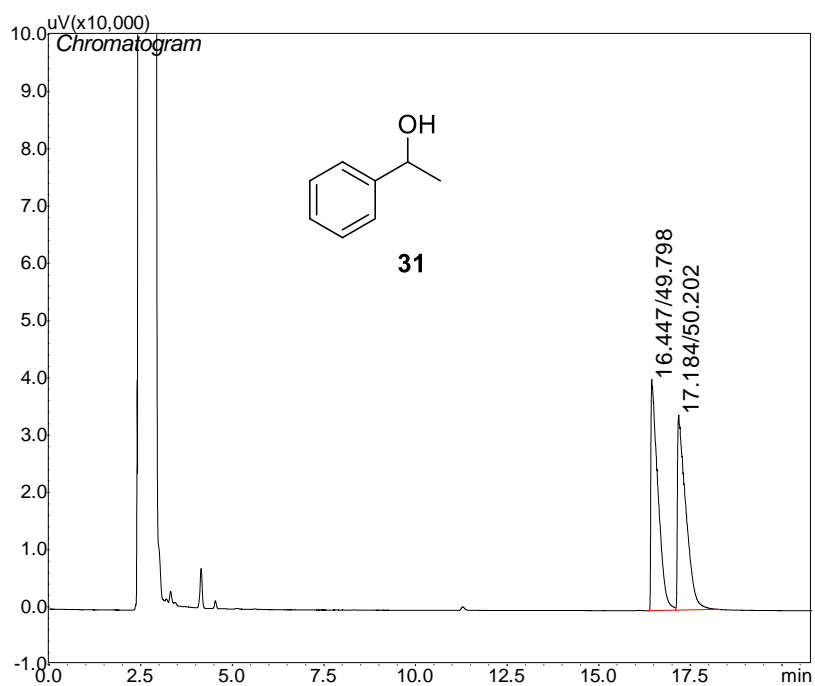


Figura B14 – Cromatograma do racemato do 1-feniletanol (**31**).

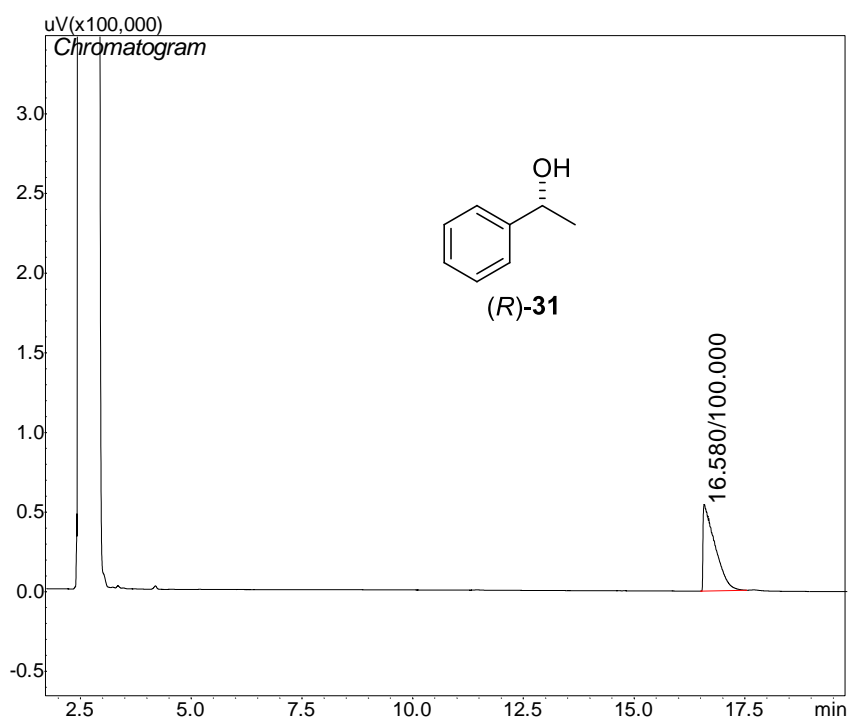


Figura B15 – Cromatograma do (*R*)-1-Feniletanol (**31**) enantiopuro

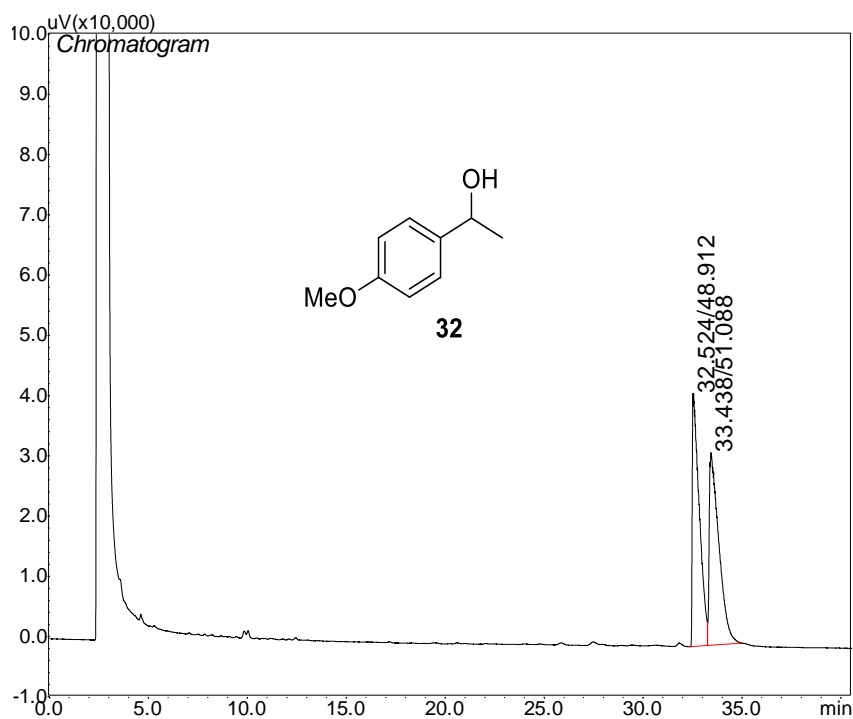


Figura B16 - Cromatograma do racemato do *p*-metoxi-1-Feniletanol (**32**).

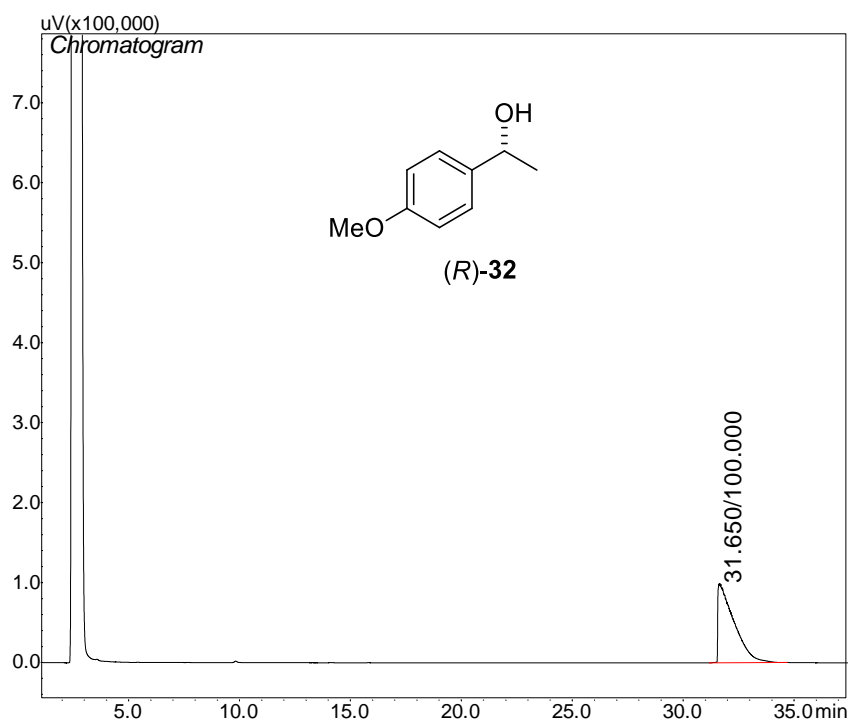


Figura B17 – Cromatograma do *p*-metoxi-(R)-1-feniletanol (**32**) enantiopuro.

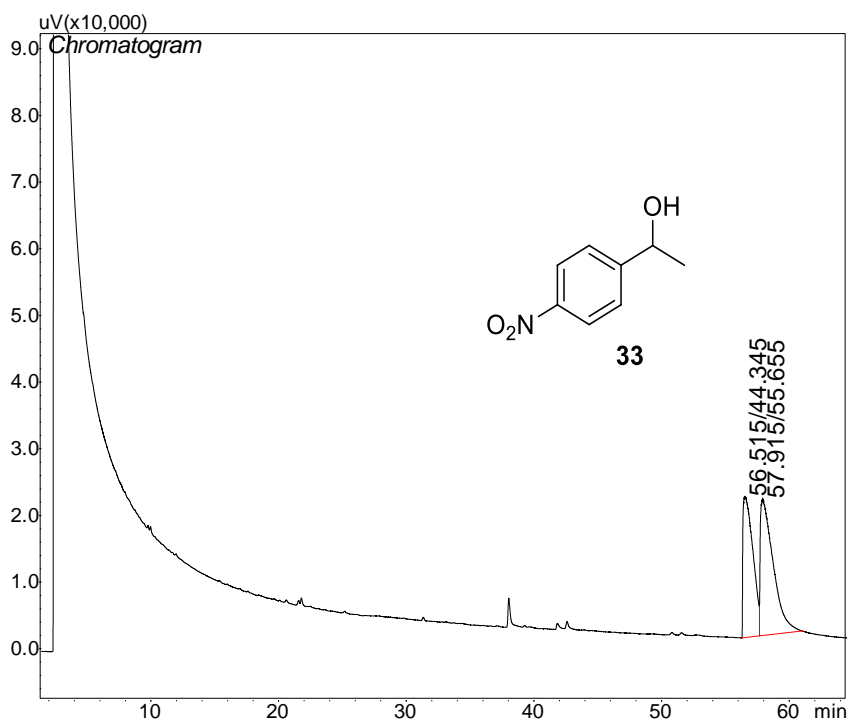


Figura B18 - Cromatograma do racemato do *p*-nitro-1-Feniletanol (**32**).

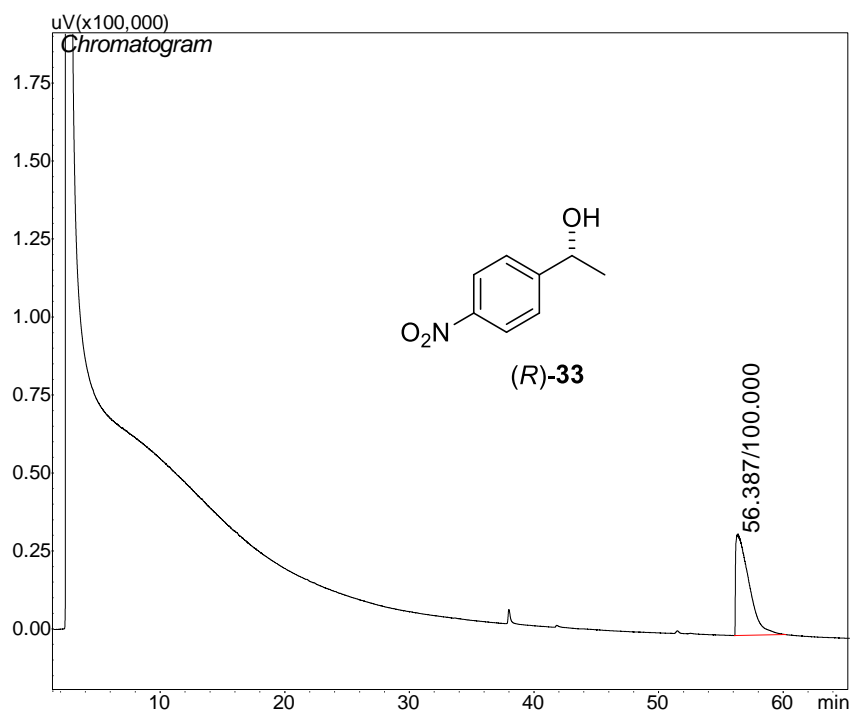


Figura B19 – Cromatograma do *p*-nitro-(*R*)-1-feniletanol (**33**) enantiopuro

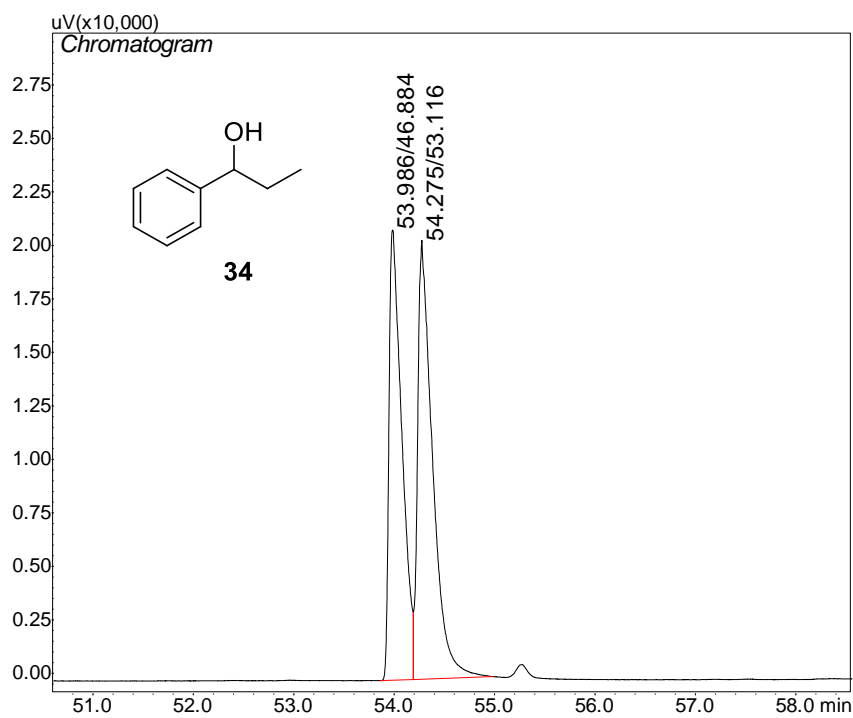


Figura B20 - Cromatograma do racemato 1-Fenilpropanol (**34**).

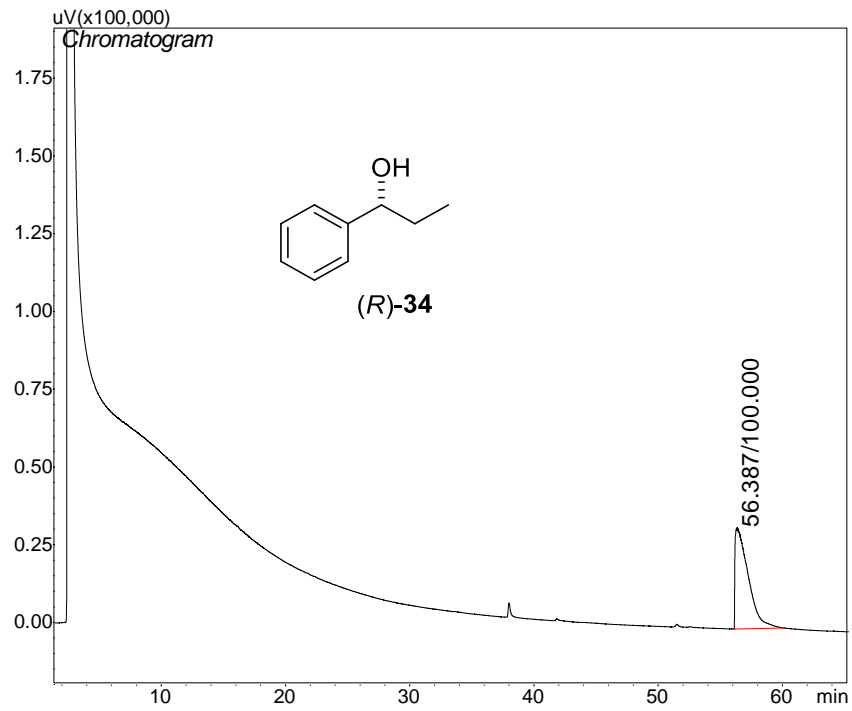


Figura B21 - Cromatograma do (R)-1-Fenilpropanol (**34**) enantiopuro.