

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA
INSTITUTO DE QUÍMICA



BÁRBARA MAIA DE VIVEIROS

PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA A RESOLUÇÃO CINÉTICA DE
AMINAS

Rio de Janeiro

2018

BÁRBARA MAIA DE VIVEIROS

PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA A RESOLUÇÃO CINÉTICA DE
AMINAS

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Bacharelado em
Química da Universidade Federal do Rio
de Janeiro, como requisito parcial à
obtenção do título de bacharel em
Química.

Orientador (a): Rodrigo Octavio Mendonça Alves de Souza

Rio de Janeiro

2018

BÁRBARA MAIA DE VIVEIROS

PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA A RESOLUÇÃO CINÉTICA
DE AMINAS

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Bacharelado em
Química da Universidade Federal do Rio
de Janeiro, como requisito parcial à
obtenção do título de bacharel em
Química.

Rio de Janeiro, 30 de Julho de 2018.

Prof. Dr. Rodrigo Octavio Mendonça Alves de Souza
Orientador

Prof. Dr. José Celestino de Barros Neto

Prof. Dr. Ivaldo Itabaiana Junior

Prof. Dr. Tiago Lima da Silva

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, sem ele nada é possível. Aos meus pais Rosangela e Nivaldo, ao meu irmão Bruno e ao meu amor Danilo que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ser a base essencial da minha vida e que permitiu eu chegar até aqui.

Aos meus pais, Rosangela e Nivaldo por todo apoio e carinho. Sem a ajuda de vocês nada disso seria possível.

Ao meu irmão Bruno por sempre me apoiar e ajudar com toda a parte tecnológica que fez permitir o andamento desse presente trabalho.

Aos meus avós Messias e Penha, a minha prima Ana Penha e toda a família que de certo modo, sempre estiveram ao meu lado.

Ao meu amor Danilo, por todo o apoio, carinho e paciência. Você fez toda a diferença nesses quatro anos.

A minha amiga Camila que sempre esteve ao meu lado desde o primeiro dia de aula e, que com certeza, foi essencial para eu chegar até aqui. A dupla VV (Vinícius e Vitor) por todo o apoio com as disciplinas e conselhos. Ao meu amigo Haroldo, por toda palavra amiga durante esse período e aos meus amigos Robson e Lohrene por estar ao meu lado e por todas as risadas que me fizeram mais feliz.

Agradeço ao meu professor Rodrigo, pela orientação, apoio e confiança.

Aos colegas do Boss Group pelo ótimo ambiente de trabalho e por me ajudarem no laboratório para a realização desse projeto. Em especial a Raquel pela grande ajuda com o presente trabalho, ao Alexandre, Anderson, Marcelo, Mauro, Viviane e Júlio por todo o apoio.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

VIVEIROS, Bárbara Maia. Processo biotecnológico para a resolução cinética de aminas. Trabalho de projeto final de curso - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2018.

RESUMO

As aminas opticamente puras são de grande importância para a indústria farmacêutica, química e agroquímica, sendo usadas principalmente como agentes de resolução para obtenção de álcoois, bem como na preparação de diversos fármacos. Uma ótima alternativa às rotas sintéticas tradicionais para preparar composto de alta pureza óptica é a biocatálise.

Nesse contexto, diante da necessidade de se obter moléculas enantiomericamente puras, foi feito um estudo da resolução cinética do *rac*-feniletilamina e de um intermediário da rotigotina utilizando tecnologia de reatores de fluxo contínuo, através da utilização de um leito fixo preenchido com lipase B de *Candida antarctica* imobilizada.

Inicialmente, foi feito um estudo para otimizar as condições da resolução cinética do *rac*-feniletilamina em batelada. Sendo assim, diferentes doadores de acila e proporções entre os reagentes foram testados. Em uma segunda etapa, foi testado as melhores condições obtidas em batelada para o sistema de fluxo contínuo a fim de comparar ambas metodologias. Por fim, avaliou-se as condições otimizadas obtidas para a resolução cinética de um intermediário da rotigotina.

Os resultados obtidos mostram que podem ser obtidas excelentes conversões e satisfatórios valores de razão enantiomérica para a resolução cinética da *rac*-feniletilamina em pouco tempo de reação em fluxo contínuo. Entretanto, não obteve valores satisfatórios para a resolução cinética de um intermediário da rotigotina. Além disso, observou-se um excelente tempo reacional comparado ao sistema em batelada para a resolução cinética da *rac*-feniletilamina, entretanto a produtividade para ambos os sistemas foram similar em conversões moderadas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Enantiômeros da cetamina e da talidomida.....	12
Figura 2. Exemplos de aminas quirais.....	14
Figura 3. Estrutura química da rac-feniletilamina.	15
Figura 4. Estrutura química da rotigotina.....	15
Figura 5. Diagrama de energia para diferentes enantiômeros (MILNER & MAGUIRE, 2012).	19
Figura 6. Equação para cálculo da razão enantiomérica da reação.....	20
Figura 7. Substratos utilizados na otimização da resolução cinética.....	27
Figura 8. Doadores de acila utilizados.....	27
Figura 9. Sistema de resolução cinética em batelada.	30
Figura 10. A) Sistema de fluxo contínuo; B) Leito fixo preenchido com a lipase.	31
Figura 11. Cromatograma da (R,S)-feniletilamina derivatizada.	36
Figura 12. Cromatograma da (R,S)-feniletilacetamida.	37
Figura 13. Cromatograma obtido por CG-DIC após 24h de reação da resolução cinética da (R,S)-feniletilamina utilizando 10eq de acetato de vinila.....	39
Figura 14. Cromatograma obtido por CG-DIC após 24h de reação da resolução cinética da (R,S)-feniletilamina utilizando 2eq de acetato de vinila.	39
Figura 15. Cromatograma obtido por CG-DIC após 24h de reação da resolução cinética da (R,S)-feniletilamina utilizando 2eq de acetato de isopropenila.....	41
Figura 16. Cromatograma obtido por CG-DIC após 24h de reação da resolução cinética da (R,S)-feniletilamina utilizando 10eq de acetato de isopropenila.....	42
Figura 18. Cromatograma obtido por CG-DIC após 96h de reação da resolução cinética da (R,S)-feniletilamina utilizando 10eq de acetato de etila.....	44
Figura 17. Cromatograma obtido por CG-DIC após 96h de reação da resolução cinética da (R,S)-feniletilamina utilizando 2eq de acetato de etila.....	44
Figura 19. Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética em fluxo contínuo da (R,S)-feniletilamina com tempo de residência de 40 min.	47
Figura 20. Cromatograma da cetona, em coluna capilar cp-chirasil-dex cb.	50
Figura 21. Espectro de infra-vermelho da cetona.....	51
Figura 22. Perfil por CCD do material de partida (cetona), da mistura e do produto ((R,S)-amina 2). Fase estacionária sílica; fase móvel: acetato de etila/hexano (2:8) e revelador: iodo.....	52

Figura 23. Cromatograma da (R,S)-amina 2 derivatizada.	52
Figura 24. Espectro de Infra-vermelho da (R,S)-amina 2	53
Figura 25. Cromatograma da (R,S)-amida 2.	54
Figura 26. Espectro de Infra-vermelho da (R,S)-amida 2	55
Figura 28. Cromatograma de CG-EM da cetona, (R,S)-amina 2 derivatizada e (R,S)-amida 2	55
Figura 27. Espectro de massas da cetona	55
Figura 29. Espectro de massas da (R,S)-amina 2 derivatizada.....	56
Figura 30. Espectro de massas da (R,S)-amida 2.....	56
Figura 31. Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética em fluxo contínuo da (R,S)-feniletilamina com tempo de residência de 120 min.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resolução cinética da (<i>R,S</i>)-feniletilamina e avaliação de diferentes proporções de acetato de vinila.....	38
Tabela 2. Resolução cinética da (<i>R,S</i>)-feniletilamina e avaliação de diferentes proporções de acetato de isopenila	40
Tabela 3: Resultado da resolução cinética da (<i>R,S</i>)-feniletilamina em diferentes tempos de reação com acetato de etila como doador de acila.....	43
Tabela 4. Resultado da resolução cinética da (<i>R,S</i>)-feniletilamina em diferentes tempos com acetato de etila como doador de acila em fluxo contínuo.	46
Tabela 5. Valores de produtividade obtidos para a resolução cinética da (<i>R,S</i>)-feniletilamina em batelada.....	49
Tabela 6. Valores de produtividade obtidos para a resolução cinética da (<i>R,S</i>)-feniletilamina em fluxo contínuo	49
Tabela 7. Resultado da resolução cinética da (<i>R,S</i>)-amina 2 em diferentes tempos com acetato de etila como doador de acila em fluxo contínuo.....	57

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. A análise retrosintética para a síntese de um intermediário da rotigotina.	16
Esquema 2. Rota sintética da rotigotina. (Adaptado de Webster et al., 2010).	16
Esquema 3. Rota sintética da rotigotina. (Adaptado de Cobley et al., 2016).....	17
Esquema 4. Interação entre sítio ativo da enzima com os diferentes enantiômeros (Adaptado de KAZLAUSKAS, 1991)	22
Esquema 5. Mecanismo da lipase. (Adaptado de FABER, 2011).	23
Esquema 6. Esquema de intermediários para a catálise enzimática da lipase (Adaptado de RAZAK et al., 2015).	24
Esquema 7. Esquema geral de um reator de fluxo contínuo (Adaptado de DE SOUZA et al., 2014)	25
Esquema 8. Esquema geral com as reações a partir da (<i>R,S</i>)-feniletilamina.....	29
Esquema 9. Esquema geral com as reações a partir da cetona para obtenção da (<i>R,S</i>)-amina 2.....	29
Esquema 10. Acetilação da (<i>R,S</i>)-feniletilamina.....	37
Esquema 11. Aminação redutiva da cetona para obtenção da (<i>R,S</i>)-amina 2	51
Esquema 12. Acetilação da (<i>R,S</i>)-amina 2.....	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURA

CG - Cromatografia gasosa

Conv. - Conversão

E - Razão enantiomérica

ee_p - Excesso enantiomérico do produto

ee_s - Excesso enantiomérico do substrato

CG-EM - Cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas

CG-DIC - Cromatografia gasosa com detector por ionização de chama

RC - Resolução cinética

N435 - lipase B de *Candida antarctica* imobilizada comercializada pela empresa Novozymes

RMN - Ressonância magnética nuclear

t. a. - Temperatura ambiente

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	Aminas opticamente puras.....	14
2.1.2	<i>Rac</i> -feniletilamina	14
2.1.3	Rotigotina.....	15
2.2	Resolução cinética com o uso de lipases	18
2.3	Enzimas	21
2.4	Lipases.....	21
2.5	Biocatalise em Fluxo contínuo	25
3	OBJETIVOS.....	26
3.1	Objetivo geral.....	26
3.2	Objetivos específicos	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	Materiais utilizados	27
4.1.2	Substratos.....	27
4.1.3	Doadores de grupo acila	27
4.1.4	Enzimas utilizadas	27
4.1.5	Reagentes e solventes utilizados.....	28
4.1.6	Equipamentos	28
4.2	Métodos	29
4.1.1	Esquemas gerais das reações.....	29
4.1.2	Acetilação da (<i>R,S</i>)-feniletilamina	30
4.1.3	Resolução cinética da (<i>R,S</i>)-feniletilamina.....	30
4.1.3.1	Avaliação de diferentes tempos de reação para diferentes proporções de doador de acila em batelada	30
4.1.4	Reação de resolução cinética da (<i>R,S</i>)-feniletilamina em fluxo contínuo ...	31
4.1.4.1	Avaliação de diferentes tempos de residência na reação de resolução cinética da (<i>R,S</i>)-feniletilamina em fluxo contínuo.....	31
4.1.5	Aminação reductiva da cetona para obtenção da (<i>R,S</i>)-amina 2.....	32
4.1.6	Acetilação da (<i>R,S</i>)-amina 2	32
4.1.7	Resolução cinética enzimática da (<i>R,S</i>)-amina 2 nas condições otimizadas	33

4.1.8	Análise cromatográficas em CG-DIC para a (R,S)-feniletilamina.....	33
4.1.9	Análise cromatográficas em CG-DIC para a (R,S)-amina 2.....	33
4.1.10	Cálculo do excesso enantiomérico	34
4.1.11	Cálculo de produtividade.....	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	Estudo com a (R,S)-feniletilamina	36
5.1.1	Análise de CG-DIC da (R,S)-feniletilamina	36
5.1.2	Acetilação da (R,S)-feniletilamina	36
5.1.3	Otimização da resolução cinética da (R,S)-feniletilamina por batelada	37
5.1.3.1	Resolução cinética da (R,S)-feniletilamina e avaliação de diferentes proporções de acetato de vinila	37
5.1.3.2	Resolução cinética da (R,S)-feniletilamina e avaliação de diferentes proporções de acetato de isopropenila	40
5.1.3.3	Resolução cinética da (R,S)-feniletilamina e avaliação de diferentes proporções de acetato de etila	42
5.1.4	Resolução cinética da (R,S)-feniletilamina em fluxo contínuo	45
5.2	Estudo com a (R,S)-amina 2.....	50
5.2.1	Análise da cetona por CG-DIC.....	50
5.2.2	Aminação redutiva da cetona.....	51
5.2.3	Acetilação da (R,S)-amina 2	53
5.2.4	Resolução cinética da (R,S)-amina 2 em fluxo contínuo	56
6	CONCLUSÃO	59
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	60
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	61
9	ANEXOS.....	66

1 INTRODUÇÃO

Muitas moléculas na natureza possuem uma geometria o qual sua imagem espelhada não é sobreponível com ela mesmo. Esta é chamada de imagem especular. Um dos motivos para essa não sobreposição é a presença de um carbono estereogênico, ou seja, um centro assimétrico na molécula. Cada isômero presente (imagem/imagem especular) é denominado enantiômero, sendo que cada um destes enantiômeros possuem atividade óptica distintas, alterando o ângulo do plano de polarização da luz (KUZEFF, 2012).

Existe diversas substâncias utilizadas como fármacos que apresentam propriedades quirais. A modificação da orientação espacial do centro estereogênico pode modificar o efeito biológico. Um exemplo disso é a cetamina que em sua forma (S) apresenta atividade anestésico e em sua forma (R) é um alucinógeno. Outro exemplo é a talidomida, que em sua forma (R) é um sedativo leve e pode ser utilizado no tratamento de náuseas na gravidez enquanto que o enantiômero (S) é teratogênico, levando à má formação congênita, afetando o crescimento dos membros superiores e inferiores do feto. Esse é um efeito nocivo grave causado pelo enantiômero de um fármaco comercial (COELHO, 2001).

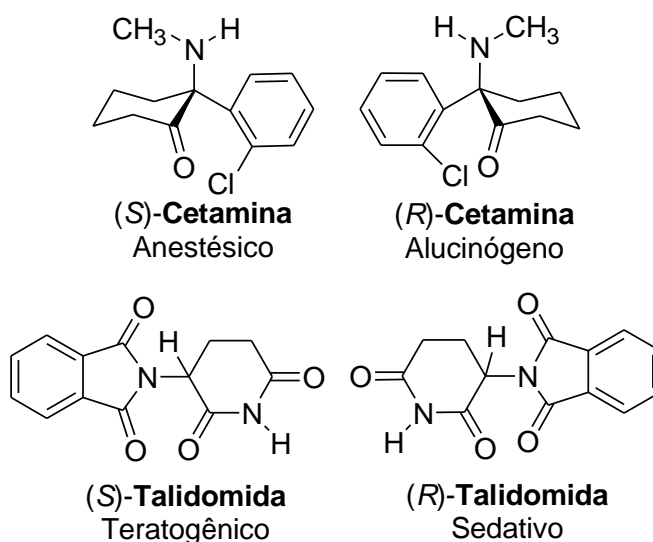


Figura 1. Enantiômeros da cetamina e da talidomida

Esse comportamento distintos dos enantiômeros fez com que nas últimas décadas fosse investido na busca de novas rotas enantiosseletivas que fossem

eficientes, principalmente para a indústria farmacêutica, com o objetivo de obter produtos puros com aplicação direta na indústria (BRAGA et al., 2013).

Dentre os vários intermediários químicos que possuem quiralidade empregados na síntese de cosméticos, fármacos, alimentos e agroprodutos, as aminas merecem ênfase devido a sua versatilidade e a viabilidade de estarem presentes na estrutura dos produtos finais (STRAUSS, 1999).

Desse modo, pelas aminas quirais apresentarem uma grande importância em diversos setores industriais, fica evidente a relevância de realizar rotas sintéticas eficientes e que estejam de acordo com a química verde.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aminas opticamente puras

Com o crescimento da indústria farmacêutica e o avanço da área de química orgânica, farmacologia e síntese enzimática, obteve-se o conhecimento que a atividade biológica das moléculas estão intimamente associado a sua estrutura molecular. Como algumas substâncias possuem atividades biológicas, o estudo para conseguir isolar tais substâncias é cada vez mais crescente até os dias atuais, inclusive na indústria farmacêutica (BARREIRO *et al.*, 1997).

As aminas opticamente puras, aquelas cujo o átomo de nitrogênio está ligado ao centro quiral, são de grande importância para a indústria farmacêutica, química e agroquímica, sendo usadas como agentes de resolução para obtenção de ácidos carboxílicos e como síntons na síntese de muitas drogas e pesticidas (NUGENT *et al.*, 2010). Alguns exemplos de aminas quirais estão demonstrados na figura 2.

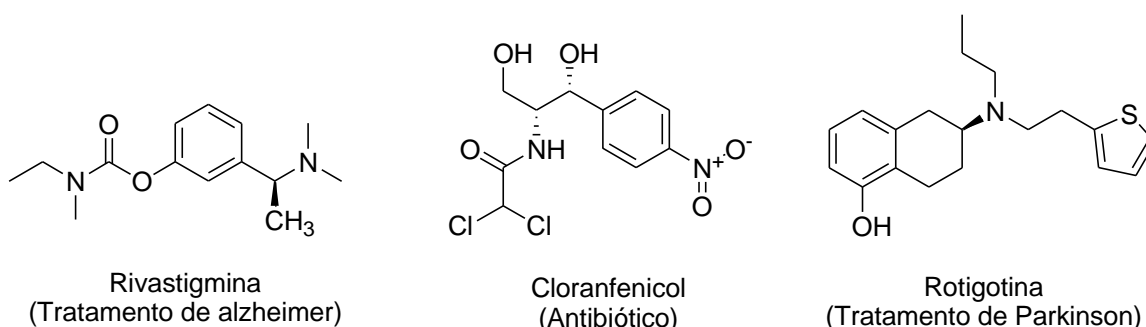


Figura 2. Exemplos de aminas quirais.

2.1.2 *Rac*-feniletilamina

Os fármacos que reproduzem total ou parcialmente os efeitos da estimulação nervosa simpática sobre os órgãos efetores são denominados adrenérgicos ou simpatomiméticos. A estrutura química básica da maioria dos fármacos adrenérgicos é a feniletilamina que é constituída por um anel benzênico ligado através de uma cadeia de dois carbonos e um grupo amina (Figura 3) (DELUCIA, R *et al.*, 2007).

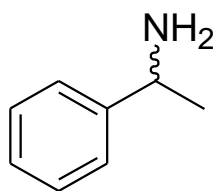


Figura 3. Estrutura química da *rac*-feniletilamina.

2.1.3 Rotigotina

Uma amina quiral relevante na indústria farmacêutica é a rotigotina (Figura 4). Este fármaco é utilizado para o tratamento da doença de Parkinson em estágio avançado e da síndrome das pernas inquietas (BUNTEN *et al.*, 2006).

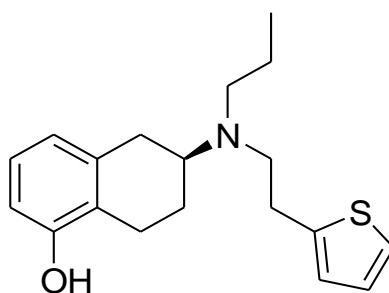
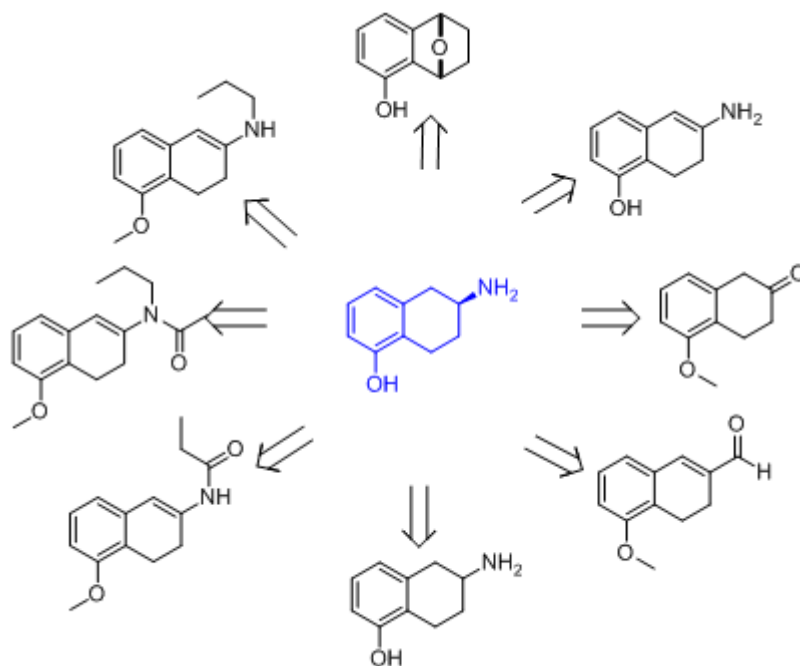


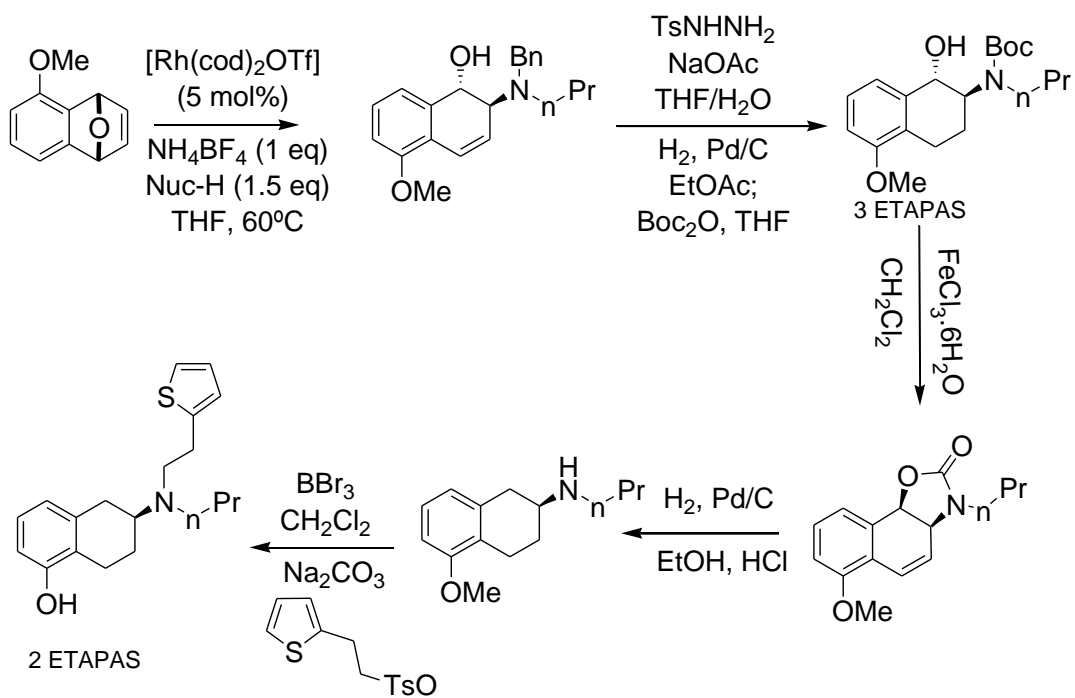
Figura 4. Estrutura química da rotigotina.

Na literatura, a rota sintética da rotigotina geralmente utiliza a amina opticamente pura representada em azul no esquema 1 e, para chegar até ela, fazem uso de diferentes substratos.



Esquema 1. A análise retrosintética para a síntese de um intermediário da rotigotina.

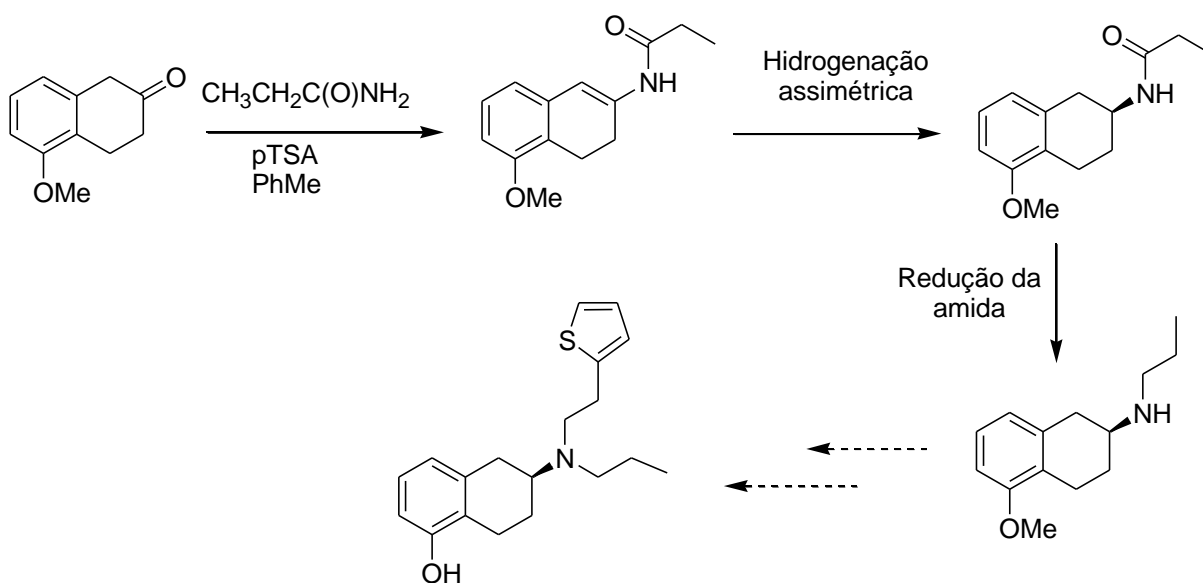
Uma rota sintética para a rotigotina proposta por Webster e colaboradores (2010) pode ser observada no esquema 2.



Esquema 2. Rota sintética da rotigotina. (Adaptado de Webster *et al.*, 2010).

Como pode-se observar, a rota é composta de diversas etapas para a obtenção da rotigotina. Além disso, na primeira etapa foi necessária a utilização de um catalisador potente de Rh-OTf e vários outros reagentes para a transformação dos enantiômeros em produtos diferentes para que assim, prosseguisse com a síntese com apenas um dos enantiômeros.

Outra proposta para a síntese da rotigotina é feita por Cobley e colaboradores (2016) (Esquema 3). Na segunda etapa, para a resolução do racemato, foi feita uma hidrogenação assimétrica com a utilização de um pré-catalisador $[\text{RuCl}((\text{R})\text{-T-BINAP})_2(\text{I-Cl})_3][\text{NH}_2\text{Me}_2]$ e a necessidade de aumento de pressão para que houvesse uma conversão de 98% em 18 horas de reação.



Esquema 3. Rota sintética da rotigotina. (Adaptado de Cobley et al., 2016).

Muitos métodos químicos e enzimáticos para a síntese de amins quirais foram desenvolvidos até agora para a resolução de racematos, incluindo a adição de carbânions à iminas quirais sulfinil, sulfonil ou fosforil (LIN *et al.*, 2008), hidrogenação de acilenaminas com ligantes fosforosos (LIU *et al.*, 2005), metal de transição ou redução de imina assimétrica organocatalisada (MALKOV *et al.*, 2007; VERKADE *et al.*, 2008), hidroaminação assimétrica de olefinas (LUTETE *et al.*, 2004; HIL, 2006; AILLAUD, 2007), cristalização (SAKAMOTO *et al.*, 2011) e resolução dinâmica e

cinética catalisada por enzimas (SHI *et al.*, 2012; PAIVIO *et al.*, 2012; VONGVILAI *et al.*, 2011). Dentre essas, as duas últimas são as mais utilizadas.

Entretanto, todas essas abordagens possuem escopo limitado pois são compostos por várias etapas, gastando uma alta quantidade de materiais de partida e muitas podem não serem disponíveis comercialmente, como também em alguns casos, a necessidade de alta temperatura e pressão o que é desfavorável para a indústria. Além disso, os métodos não seguem os princípios da química verde, pois além de utilizarem muitos reagentes e solventes, estes podem ainda utilizarem reagentes tóxicos.

Como é visto, ainda é recente as buscas de rotas para a resolução de racematos que é constituído por menos etapas, menos gastos de reagentes e que sejam eficientes. Para isso, o uso da resolução cinética utilizando lipases tem sido amplamente empregada na resolução de racematos, devido a capacidade da reação seletiva de um dos enantiômeros e de ser um catalisador biodegradável (MIRANDA *et al.*, 2015).

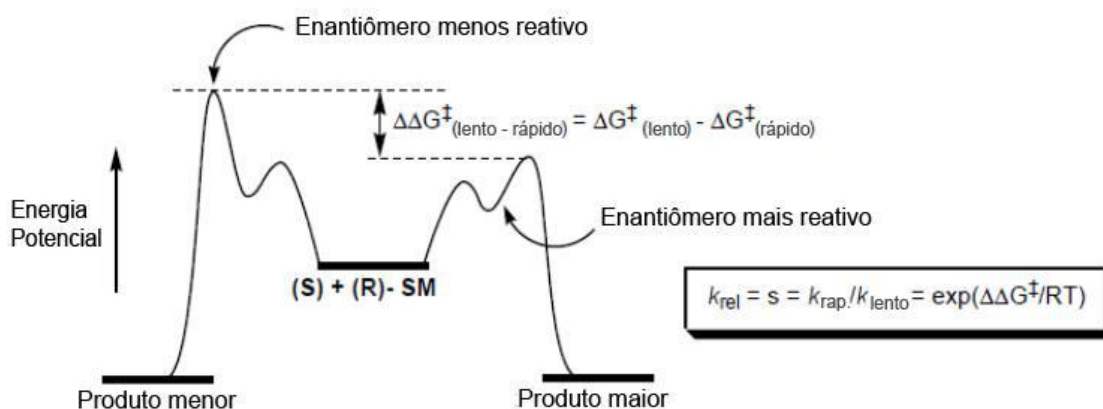
2.2 Resolução cinética com o uso de lipases

Em uma resolução cinética, um dos enantiômeros de um racemato deve ser transformado em um produto em velocidade diferente ao outro. Em uma resolução cinética ideal, apenas um dos enantiômeros da mistura racêmica é transformado no produto desejado, enquanto o outro permanece inalterado. Se o catalisador utilizado é uma enzima, então chama-se o processo de resolução cinética enzimática ou resolução biocatalítica (KAMAL *et al.*, 2008).

A razão cinética para a seletividade é devido a diminuição da energia entre o substrato e o estado de transição. Essa diminuição de energia, geralmente é conferido pela estabilização do estado de transição da reação pela enzima, assumindo que o catalisador se liga mais fortemente ao estado de transição do que ao estado fundamental do substrato.

Em uma reação enantiosseletiva, os substratos enantioméricos competem pelo sítio ativo da enzima. Devido ao ambiente quiral do sítio ativo da enzima, complexos enzima-substrato são formados, que possuem diferentes valores de energia livre para seus respectivos estados de transição. O resultado é uma diferença de energia de

ativação para ambos os substratos enantioméricos (Figura 5). Como consequência, um enantiômero será transformado mais rapidamente que o outro. A reação enzimática cessará automaticamente com 50% de conversão, quando não restar mais do enantiômero do mais reativo. (FABER, 1997).



Resolução Cinética

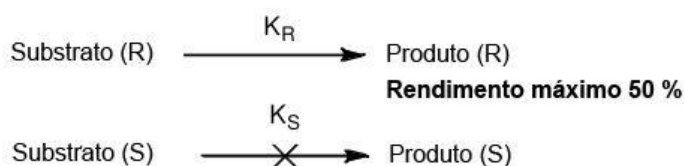


Figura 5. Diagrama de energia para diferentes enantiômeros (MILNER & MAGUIRE, 2012).

A biotransformação têm-se mostrado como uma alternativa às rotas sintéticas tradicionais para moléculas quirais, devido às químio-, regio- e enantiosseletividades frequentemente constatadas nas reações enzimáticas. As reações biocatalíticas utilizadas em escala industrial são demonstradas na gráfico 1. As lipases são as mais utilizadas pelo fato de não requererem o uso de cofatores (GONÇALVES *et al*, 2012).

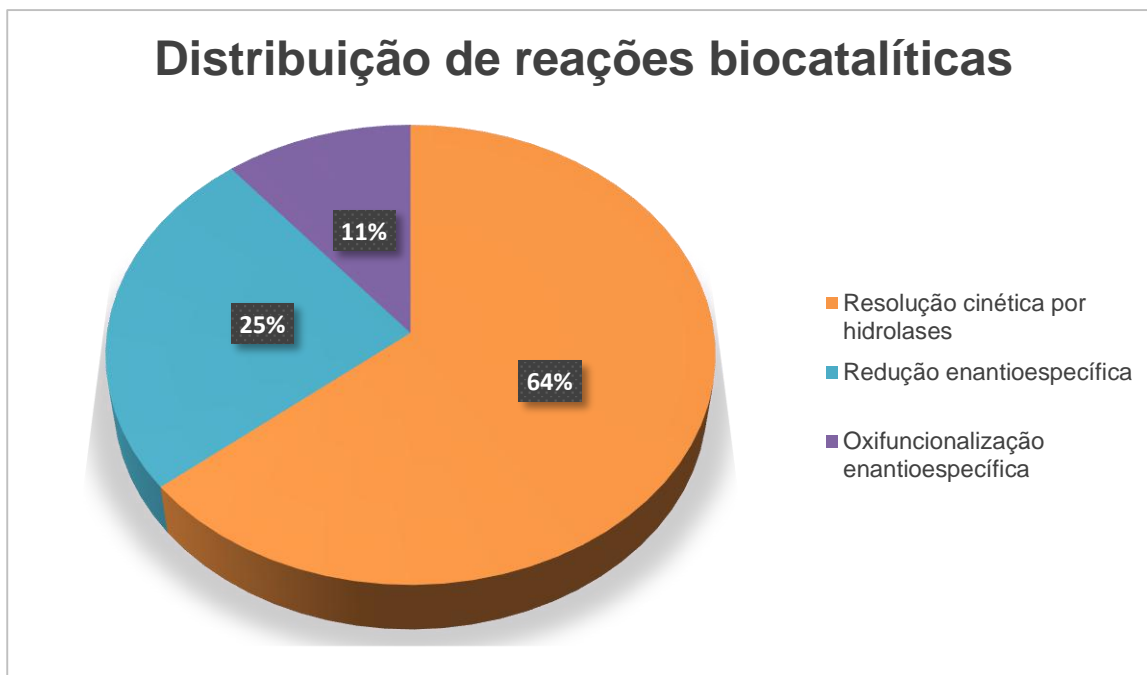


Gráfico 1. Distribuição de reações biocatalíticas utilizadas em escala industrial para a obtenção de produtos opticamente puros. (Adaptado de GONÇALVES *et al*, 2012)

Durante uma resolução cinética, os excessos enantioméricos do substrato (ee_s) e do produto (ee_p) variam à medida em que a reação prossegue. Com esses valores e a conversão, pode-se calcular a enantiosseletividade da reação (E) (Figura 6). Como regra geral, razões enantioméricas inferiores a 15 são inaceitáveis para fins práticos, moderadas a boas quando seus valores encontram-se entre 15 e 30, e acima deste valor são consideradas excelentes. (FABER e WOLFGANG, 2012).

$$E = \frac{\ln[(1-C)(1-ees)]}{\ln[(1-C)(1+ees)]} = \frac{\ln[1-C(1+eep)]}{\ln[1-C(1-eep)]}$$

Figura 6. Equação para cálculo da razão enantiomérica da reação.

2.3 Enzimas

As enzimas atuam como catalisadores biológicos e podem aumentar a velocidade de uma reação por um fator de 10^{14} vezes mais do que uma reação não catalisada sem serem consumidas no processo (VOET *et al.*, 2000).

Por outro lado, as enzimas não catalisam apenas em meio biológico, mas algumas delas também podem ser manipuladas para atuarem como um catalisador químico, sendo benéfico em reações orgânicas. Durante as últimas décadas, os estudos de biocatálise mostraram que a tolerância do substrato de muitas enzimas é muito mais do que se acreditava e que um número grande de biocatalizadores são capazes de aceitar substratos não naturais de um tipo estrutural não relacionado.

Quando certos cuidados são tomados, as enzimas podem ser consideravelmente estáveis. Algumas podem tolerar temperaturas superiores à 100°C e pressões altas. Além disso, as enzimas podem ser reutilizadas se estão imobilizadas (FABER, 1997).

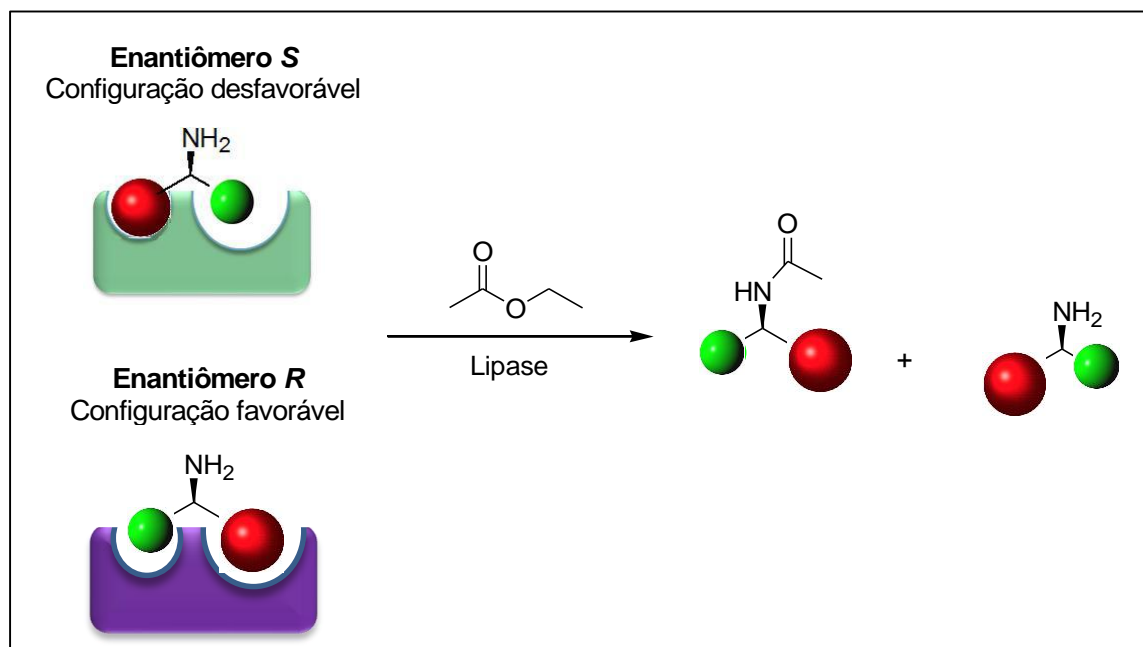
Em uma perspectiva mais geral, o uso de biocatalisadores possui muitas características atraentes no contexto da Química Verde; Além do mais, devido à seletividade das enzimas, passos extras para proteção e desproteção de grupos funcionais não são necessários, como seriam na síntese química tradicional (KRAGL *et al.*, 1997).

2.4 Lipases

As lipases são enzimas hidrolíticas presentes em diversos organismos, como animais, plantas, fungos e bactérias. Em seu ambiente de origem, estas enzimas tem o papel de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis aos ácidos graxos correspondentes e glicerol. Entretanto, elas não possuem apenas funcionalidade em meio biológico, mas também são capaz de catalisar uma vasta quantidade de substratos de ésteres não naturais, enquanto mantém uma alta enantiosseletividade e regioseletividade. Desse modo, as lipases convertem-se em um catalisador que cumprem um papel relevante em biotecnologia, principalmente na indústria do óleo e dos alimentos, e em síntese orgânica. Alguns profissionais, como os químicos, usam lipases no preparo de

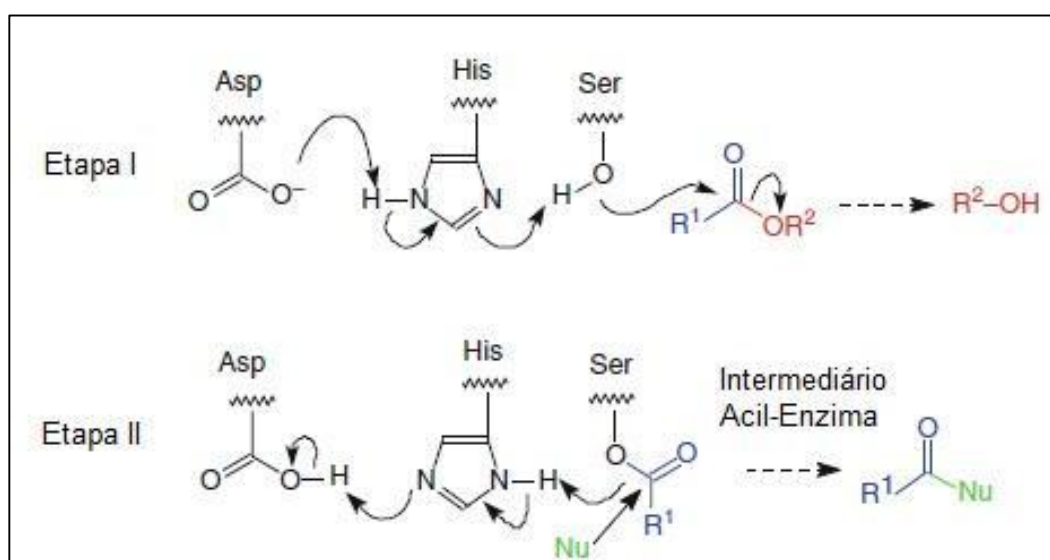
produtos farmacêuticos enantiomericamente puros e intermediários sintéticos. (COSTA e AMORIM, 1999; KAZLAUSKAS; 1998).

Os substratos e os estados de transição originado durante o processo catalítico estão ligados por ligações covalentes com a superfície da enzima. A força de ligação depende de alguns fatores como distância e ângulos de interação da enzima com o substrato, o que resulta na seletividade da enzima frente à alguns substratos. Qualquer impedimento estérico devido a geometria ou conformação da estrutura enzimática facilitará a enzima diferenciar enantiômeros durante o processo de interação com o substrato (COSTA e AMORIM, 1999). Kazlauskas e colaboradores (1991) em seu trabalho, assumiu que a enzima possui duas cavidades hidrofóbicas com tamanho uma maior que a outra, sendo esta variação de tamanho o fator que possibilita a melhor interação com uma molécula em detrimento da outra, as quais neste caso são o par de enantiômeros. A configuração do enantiômero (*R*), como mostra o esquema abaixo, possui uma configuração mais estável do que a configuração (*S*) quando interagir com as diferentes cavidades da enzima, logo o enantiômero com configuração (*R*) será acetilado preferencialmente (KAZLAUSKAS, 1991).



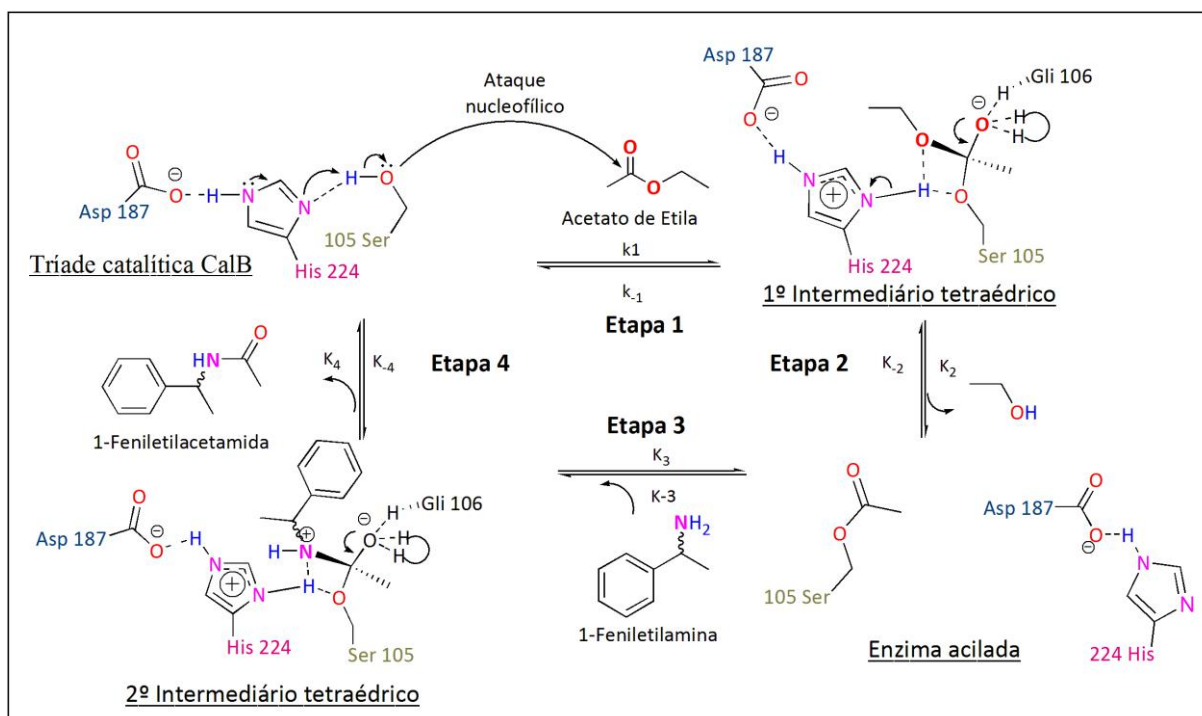
Esquema 4. Interação entre sítio ativo da enzima com os diferentes enantiômeros (Adaptado de KAZLAUSKAS, 1991)

O mecanismo da formação de amidas pelas lipases é muito semelhante ao observado na hidrólise química por uma base (Esquema 5). O grupo hidroxila de uma serina atua como um nucleofílico, atacando o grupo carbonila de um éster. Dois grupos adicionais (Asp e His) localizados próximos ao resíduo de serina formam a chamada tríade catalítica. O arranjo especial de estes três grupos provoca uma diminuição do pKa do hidrogênio da hidroxila pertencente a serina, permitindo-lhe realizar um ataque nucleofílico ao grupo carbonila do substrato $R^1 - CO - OR^2$ (Etapa I). Assim, a porção acila do substrato torna-se covalentemente ligado à enzima, formando o "intermediário acil-enzima", liberando o grupo (R^2-OH). Então um nucleófilo (Nu), que pode ser H_2O , R^4-OH , R^3-NH_2 , H_2O_2 , que por sua vez ataca o intermediário acil-enzima, regenera a enzima e libera um composto do tipo $R^1-CO-Nu$ (Etapa II). O intermediário que possui uma carga negativa sobre o oxigênio após o ataque do nucleofílico, é estabilizado através de ligações de hidrogênio dos grupamentos amidas dos resíduos pertencentes à chamada "cavidade do oxianion" (FABER, 2011).



Esquema 5. Mecanismo da lipase. (Adaptado de FABER, 2011).

Um esquema de intermediários da catálise enzimática na acetilação da *rac*-feniletilamina utilizando o acetato de etila como doador de acila pode ser visto no esquema 6.



Esquema 6. Esquema de intermediários para a catálise enzimática da lipase (Adaptado de RAZAK *et al.*, 2015).

1ª etapa: A serina que está presente no que é chamada “tríade catalítica” atua como nucleófilo e faz um ataque nucleofílico ao átomo de carbono do acetato de etila, formando o primeiro intermediário tetraédrico. Este intermediário é estabilizado por ligações de hidrogênio pelo chamado “cavidade do oxiânion”.

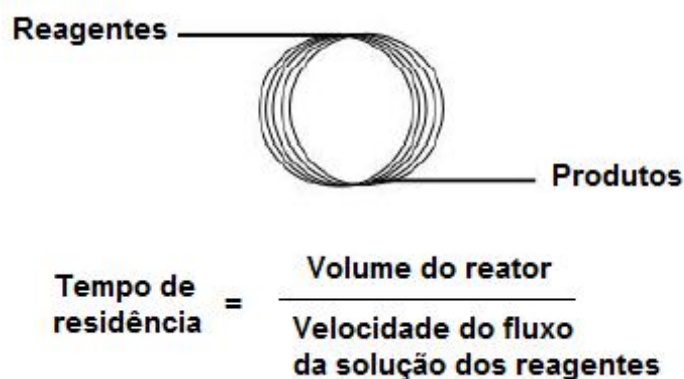
2ª etapa: A ligação da carbonila é refeita e desfaz-se o intermediário tetraédrico, liberando etanol e formando o intermediário denominado enzima acilada;

3ª etapa: A *rac*-feniletilamina que tem caráter nucleofílico, ataca o carbono suscetível do intermediário acil enzima, abrindo a ligação C=O, gerando um segundo intermediário tetraédrico.

4ª etapa: O retorno da ligação C=O desfaz o segundo intermediário tetraédrico com a liberação da *rac*-feniletilacetamida e da enzima livre, regenerando o ciclo catalítico.

2.5 Biocatálise em Fluxo contínuo

A tecnologia de reações em fluxo contínuo pode ser caracterizada por diversos reatores tubulares diferentes, com volumes de trabalho que podem variar de 15 nL a 1 L (DE SOUZA *et al.*, 2014). Reatores com leito fixo são os mais utilizados para lipases imobilizadas (LUTZ *et al.*, 2009). O meio é bombeado com uma vazão controlada por um módulo, que atravessa o reator preenchido pela enzima imobilizada, promovendo o contato entre o biocatalisador e o substrato. Assim sendo, o tempo de reação é determinado pelo fluxo e o volume do reator, o qual é chamado de tempo de residência (Esquema 7).



Esquema 7. Esquema geral de um reator de fluxo contínuo (Adaptado de DE SOUZA *et al.*, 2014)

A tecnologia de fluxo contínuo despertou a atenção da comunidade de química orgânica na última década como uma ferramenta interessante para melhorar a síntese orgânica. Algumas das vantagens da tecnologia de fluxo são: mistura em microescala e transferência de temperatura e massa de forma eficiente; maior eficiência no controle de parâmetros de reação e na mistura dos reagentes; menor custo na otimização das condições de reação; menor número de operações no isolamento do produto. Portanto, tornou-se claro que a reação em fluxo contínuo é uma tecnologia que pode facilitar o uso de lipases imobilizadas para produção industrial de amins opticamente puras (BAXENDALE *et al.*, 2013; DE SOUZA *et al.*, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolvimento de um processo biotecnológico utilizando lipases imobilizadas com a utilização de fluxo contínuo para a resolução cinética de aminas.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Otimização da condições reacionais para a resolução cinética da *rac*-1-Feniletilamina por batelada;
- ✓ Aplicação da melhores condições em fluxo contínuo para a resolução cinética da *rac*-1-Feniletilamina;
- ✓ Aplicação da melhores condições em fluxo contínuo para a resolução cinética de um intermediário da rotigotina;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais utilizados

4.1.2 Substratos

Foi utilizado a *rac*-feniletilamina para a otimização da resolução cinética por batelada e sua aplicação em fluxo contínuo. E foi utilizada a 5-metil-3,4-dihidro-1*H*-naftalen-2-ona para a síntese de um intermediário da rotigotina para, posteriormente, sua aplicação em fluxo contínuo nas condições otimizadas já estabelecidas. (Figura 7).

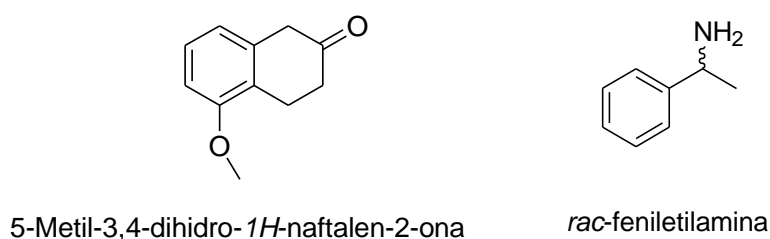


Figura 7. Substratos utilizados na otimização da resolução cinética

4.1.3 Doadores de grupo acila

Foram usados os seguintes doadores de acila: acetato de vinila, acetato de isopropenila e acetato de etila como doadores de grupo acila.

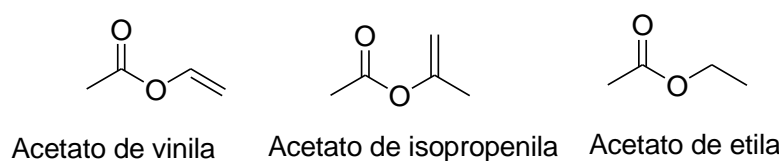


Figura 8. Doadores de acila utilizados.

4.1.4 Enzimas utilizadas

N435 (enzima lipase B de *Candida antarctica*), imobilizada em resina de troca iônica do tipo acrílica macro porosa.

4.1.5 Reagentes e solventes utilizados

- Tolueno
- Acetato de etila
- Hexano
- Isopropóxido de titânio IV
- Solução de amônia em metanol 7N
- Borohidreto de sódio
- Anidrido acético
- Acetato de sódio
- Anidrido trifluoroacético
- Trietilamina
- Sulfato de sódio anidro

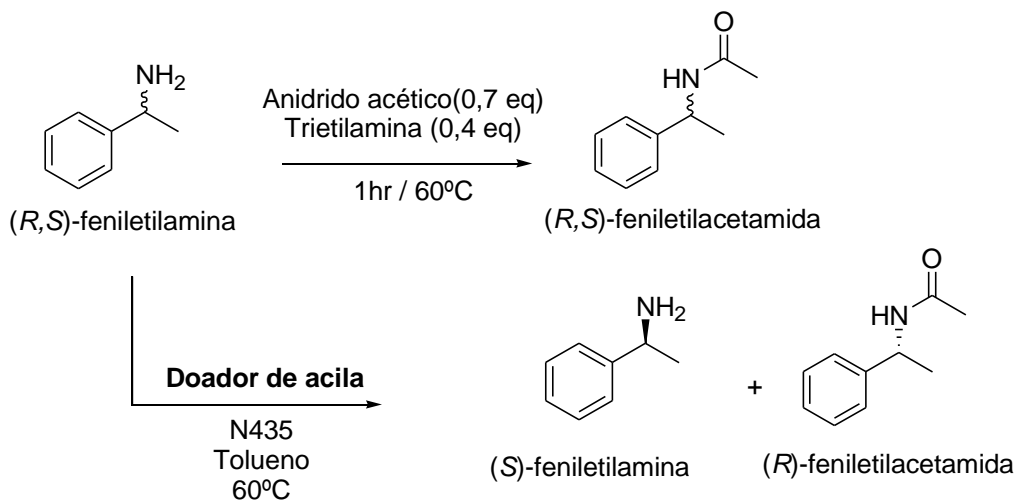
4.1.6 Equipamentos

- Balança analítica Mettler Toledo
- Agitador Magnético com Aquecimento
- Sistema Ásia 110 de Fluxo Contínuo – Syrris;
- CG-DIC Hewlett–Packard (HP) Modelo GC-6890C;
- CG-EM Shimadzu 2010
- Coluna CP-CHIRASIL-DEX
- Shaker BioVera

4.2 Métodos

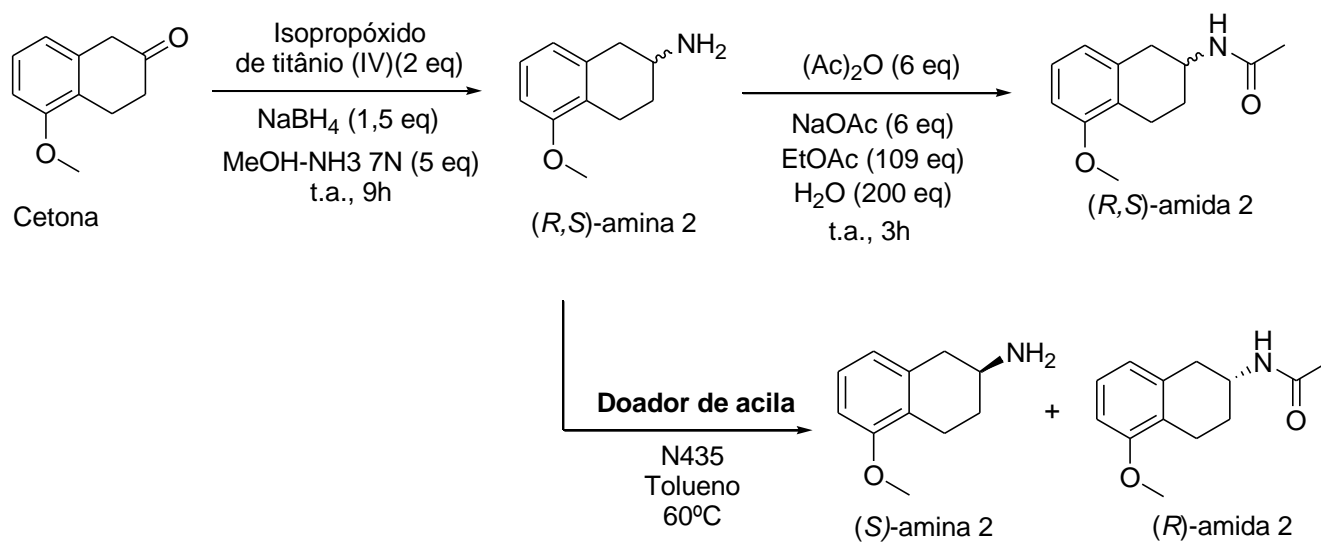
4.1.1 Esquemas gerais das reações

- Estudo com a (*R,S*)-feniletilamina.



Esquema 8. Esquema geral com as reações a partir da (*R,S*)-feniletilamina

- Estudo com um intermediário da rotigotina denominado como (*R,S*)-amina 2.



Esquema 9. Esquema geral com as reações a partir da cetona para obtenção da (*R,S*)-amina 2

4.1.2 Acetilação da (*R,S*)-feniletilamina

Para a acetilação da (*R,S*)-feniletilamina foi feita uma reação de derivatização em um vial de 2mL com 10uL da (*R,S*)-feniletilamina, 5uL de anidrido acético e 5uL de trietilamina. A reação foi agitada no shaker por 1 hora em uma temperatura de 60°C.

4.1.3 Resolução cinética da (*R,S*)-feniletilamina

4.1.3.1 Avaliação de diferentes tempos de reação para diferentes proporções de doador de acila em batelada

Em um balão de capacidade de 5mL adicionou-se 100mg da (*R,S*)-feniletilamina, doador de acila (2eq ou 10eq) e 20mg de CAL B N435 em tolueno (5mL) à 60°C por 24h utilizando acetato de vinila e isopropenila e, por 96h utilizando acetato de etila (Figura 9). Foram recolhidas alíquotas de 50uL da reação nos seguintes tempos: 0h, 3h e 24h para a reação com acetato de vinila e isopropenila. Já utilizando acetato de etila foram recolhidas alíquotas de 50uL da reação nos seguintes tempos: 0h, 2h, 4h, 6h, 9h, 24h, 72h e 96h. Todas as amostras foram derivatizadas com 5uL de anidrido trifluoroacético e 5uL de trietilamina e posteriormente foram analisadas no CG-DIC.

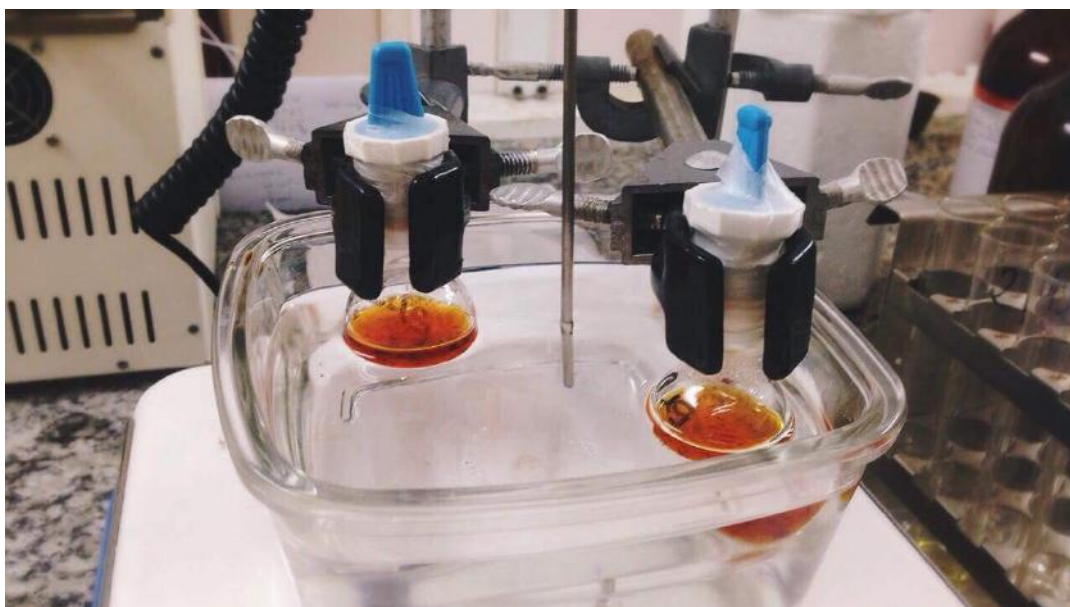


Figura 9. Sistema de resolução cinética em batelada.

4.1.4 Reação de resolução cinética da (*R,S*)-feniletilamina em fluxo contínuo

O sistema de reação em fluxo é composta por:

- 1) Recipiente contendo a solução reacional inicial;
- 2) Módulo com controle de vazão e outras funções;
- 3) Bomba de seringa com capacidade de 1,5mL;
- 4) Leito fixo preenchido com a lipase;
- 5) Frasco de coleta da solução após a reação;



Figura 10. A) Sistema de fluxo contínuo; B) Leito fixo preenchido com a lipase.

4.1.4.1 Avaliação de diferentes tempos de residência na reação de resolução cinética da (*R,S*)-feniletilamina em fluxo contínuo

Os experimentos de resolução cinética em fluxo contínuo foram realizados utilizando-se um módulo da Asia Flow System (Syrris). O sistema inclui uma bomba injetora, aquecedor e um leito fixo com capacidade de 1,2mL empacotada com enzima N435. O leito foi aquecido até 60°C e bombeado com tolueno com vazão de 1.0 mL.min⁻¹. Em seguida, uma solução de tolueno (10mL) contendo 200mg da (*R,S*)-feniletilamina e acetato de etila (2eq) foi bombeada através do leito na vazão à 120

uL.min⁻¹, 60 uL.min⁻¹, 40 uL.min⁻¹, 30 uL.min⁻¹, 24 uL.min⁻¹, 20 uL.min⁻¹, correspondendo aos tempos de residência de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos respectivamente. O cálculo da vazão foi feito da seguinte maneira: Capacidade do leito fixo (1,2mL) dividido pelo tempo de residência requisitado.

Após cada tempo de residência, foi coletado 50uL da solução e, em seguida derivatizada com 5uL de anidrido trifluoroacético e 5uL de trietilamina e deixado em agitação em uma temperatura de 60°C, posteriormente analisadas em CG-DIC.

4.1.5 Aaminação redutiva da cetona para obtenção da (R,S)-amina 2

A metodologia empregada na reação da aaminação envolve a adição em um balão de capacidade 50mL de cetona (2mmol, 1eq), solução de amônia 7N (5eq), isopropóxido de titânio (2eq) em atmosfera de argônio. A reação foi agitada, em placa de agitação, em temperatura ambiente por 6 horas. Em seguida, adicionou-se lentamente NaBH₄ (1,5eq) em banho de gelo e deixou em agitação por mais 3h. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada, usando como eluente acetato de etila em hexano 20:80. Para o isolamento do produto de interesse foi adicionado à mistura reacional 10mL de NH₄OH 2M. O precipitado resultante foi filtrado e lavado com acetato de etila (2 x 10mL). Em seguida, o produto de interesse na fase orgânica foi extraída com HCl 1M (3 x 10mL). Para o produto retornar para a fase orgânica, a solução aquosa foi tratada com solução de NaOH 2M até a faixa de pH entre 10-12. Após ser feito lavagem com acetato de etila (3 x 15mL), as fases orgânicas foram combinadas e lavada com salmoura (20mL), seca com sulfato de sódio anidro e a solução foi concentrada sob pressão reduzida no rotaevaporador. Posteriormente, o produto final foi derivatizado com 5uL de anidrido trifluoroacético e 5uL de trietilamina e analisado em CG-DIC.

4.1.6 Acetilação da (R,S)-amina 2

Em um balão de capacidade 5mL foi adicionado a (R,S)-amina 2 (8,25x10⁻¹ mmol, 1eq), anidrido acético (6,35eq), acetato de sódio (5,5eq), acetato de etila (109eq) e água (198eq). A reação ficou em agitação por 3 horas. O isolamento do produto de interesse foi feito adicionando água a mistura reacional e a fase aquosa foi

extraída com acetato de etila (2 x 5mL). As fases orgânicas foram combinadas e lavada com bicarbonato de sódio (3 x 5mL) e cloreto de sódio (1 x 3mL). Em seguida, a mistura foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida no rotaevaporador. Posteriormente, o produto final foi analisado em CG-DIC.

4.1.7 Resolução cinética enzimática da (R,S)-amina 2 nas condições otimizadas

O experimento de resolução cinética em fluxo contínuo foram realizados utilizando um módulo da Asia Flow System (Syrris). O sistema inclui uma bomba injetora, aquecedor e um leito fixo com capacidade de 1,2mL empacotada com enzima N435. O leito foi aquecido até 60°C e percorrido com tolueno com vazão de 1.0 mL.min⁻¹. Em seguida, uma solução de tolueno (5mL) contendo a (R,S)-amina 2 (10mg, 1eq) e acetato de etila (2eq) foi bombeada através do leito na vazão à 30 uL.min⁻¹, 20 uL.min⁻¹ e 10 uL.min⁻¹, correspondendo aos tempos de residência de 40, 60 e 120 minutos respectivamente.

4.1.8 Análise cromatográficas em CG-DIC para a (R,S)-feniletilamina

Amostras de 50µL foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a um detector por ionização de chamas (CG-DIC Shimadzu CG2010): coluna capilar quiral cp-chirasil-dex cb. O forno foi aquecido até 90°C, então mantido por 15 min, e reaquescido a 40°C/min até 190°C e então mantido por 5min, com fluxo da coluna de 2,5 mL.min⁻¹ e injeção no modo Split. As porcentagens de conversão e de excessos enantioméricos foram analisadas pela área dos cromatogramas.

4.1.9 Análise cromatográficas em CG-DIC para a (R,S)-amina 2

Amostras de 50µL foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a um detector por ionização de chamas (CG-DIC Shimadzu CG2010): coluna capilar quiral cp-chirasil-dex cb. O forno foi aquecido até 105°C, então mantido por 7 min, e reaquescido a 10°C/min até 180°C e então mantido por 16min, com fluxo da coluna de 2 mL.min⁻¹ e injeção no modo Split. As porcentagens de conversão e de seletividade foram analisadas pela área dos cromatogramas.

4.1.10 Cálculo do excesso enantiomérico

Foi determinada os valores de conversão ($Conv$), excesso enantiomérico do substrato (ee_s), excesso enantiomérico do produto (ee_p) calculado como $ee = (\text{área do enantiômero } R - \text{área do enantiômero } S)$, conversão por comparação das áreas observadas no cromatograma e a razão enantiomérica (E) segundo cálculos proposto por Faber (2011) como $E = \ln[1 - C(1 - ee_p)] / \ln[1 - C(1 + ee_p)]$. Para os cálculos de razão enantiomérica foi utilizado o programa disponível na internet em <http://biocatalysis.uni-graz.at/enantio/cgi-bin/enantio.pl>.

4.1.11 Cálculo de produtividade

Foi determinada os valores de produtividade para a resolução cinética da (R,S)-feniletilamina em batelada (Equação 1) e em fluxo contínuo (Equação 2).

$$\text{EQUAÇÃO 1: } P = \frac{V \cdot \text{Conc}_{\text{reag}} \cdot F_p \cdot (PM_{\text{prod}} / PM_{\text{reag}}) \cdot \text{Conv}}{100 \cdot g_{\text{enz}} \cdot t}$$

Onde:

P = Produtividade ($\text{mg}_{\text{produto}} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)

V : Volume reacional (mL)

$\text{Conc}_{\text{reag}}$: concentração inicial da amina (mg/mL)

PM_{prod} : Peso molecular da amida (mg/mol)

PM_{reag} : Peso molecular da amina (mg/mol)

$Conv$: Conversão(%)

g_{enz} : Grama de enzima utilizada (g)

T : Tempo reacional (minutos)

F_p : Porcentagem de pureza da amina/100

$$\text{EQUAÇÃO 2: } P = \frac{F \cdot \text{Conc}_{\text{reag}} \cdot F_p \cdot (PM_{\text{prod}} / PM_{\text{reag}}) \cdot \text{Conv}}{100 \cdot g_{\text{enz}}}$$

Onde:

P = Produtividade ($\text{mg}_{\text{produto}} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)

F: Fluxo (mL/min)

Conc_{reag}: concentração inicial da amina (mg/mL)

PM_{prod}: Peso molecular da amida (mg/mol)

PM_{reag}: Peso molecular da amina (mg/mol)

Conv: Conversão(%)

g_{enz}: Grama de enzima utilizada (g)

Fp: Porcentagem de pureza da amina/100

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo com a (*R,S*)-feniletilamina

5.1.1 Análise de CG-DIC da (*R,S*)-feniletilamina

Para estabelecer um perfil cromatográfico no CG-DIC, para posteriormente, ter uma comparação dos enântiômeros na resolução cinética, foi feita a análise de CG-DIC da (*R,S*)-feniletilamina. Como foi obtido picos sobrepostos e arrastados no cromatograma da amina, foi feito a derivatização com anidrido trifluoroacético e trietilamina para que houvesse a modificação do grupo funcional da molécula, e conseqüentemente, mudanças nas suas propriedades físico-químicas. Este procedimento resulta na melhora da resposta do detector, e aumento da eficiência na separação dos picos cromatográficos. Portanto, após uma nova análise, obteve-se o cromatograma com tempo de retenção de 11.392min e 11.705min para a (*R,S*)-feniletilamina (Figura 11).

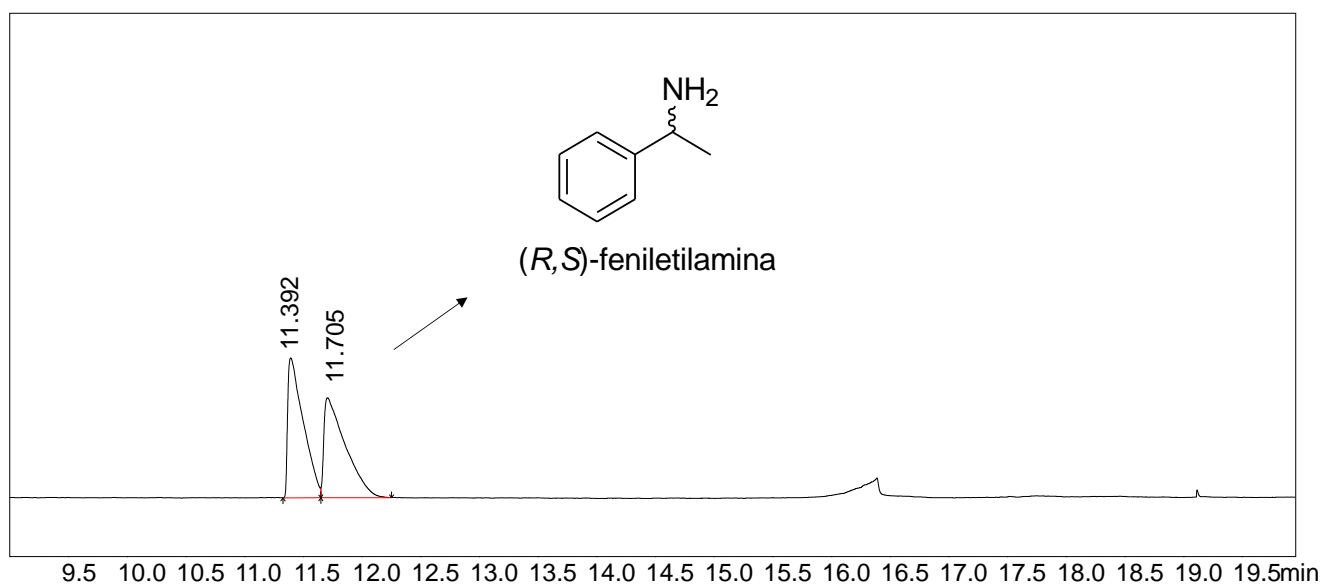
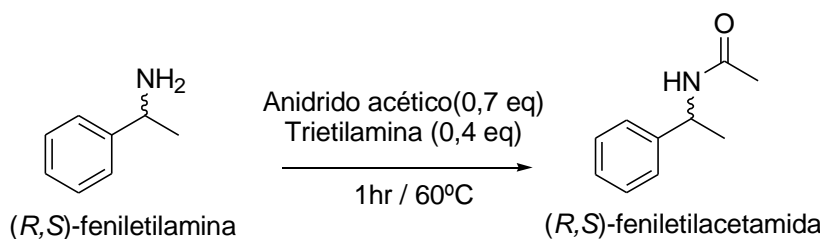


Figura 11. Cromatograma da (*R,S*)-feniletilamina derivatizada.

5.1.2 Acetilação da (*R,S*)-feniletilamina

Para estabelecer um método analítico em CG-DIC para identificação dos enantiômeros para cálculo do excesso enantiomérico da (*R,S*)-feniletilacetamida, posteriormente na resolução cinética, foi necessário que a (*R,S*)-feniletilamina fosse acetilada (Esquema 10). As proporções utilizadas estão descritas na metodologia no tópico 4.1.2.



Esquema 10. Acetilação da (*R,S*)-feniletilamina

O produto foi analisado por CG-DIC e teve tempo de retenção de 17.466min e 17.529min para a (*R,S*)-feniletilacetamida (Figura 12).

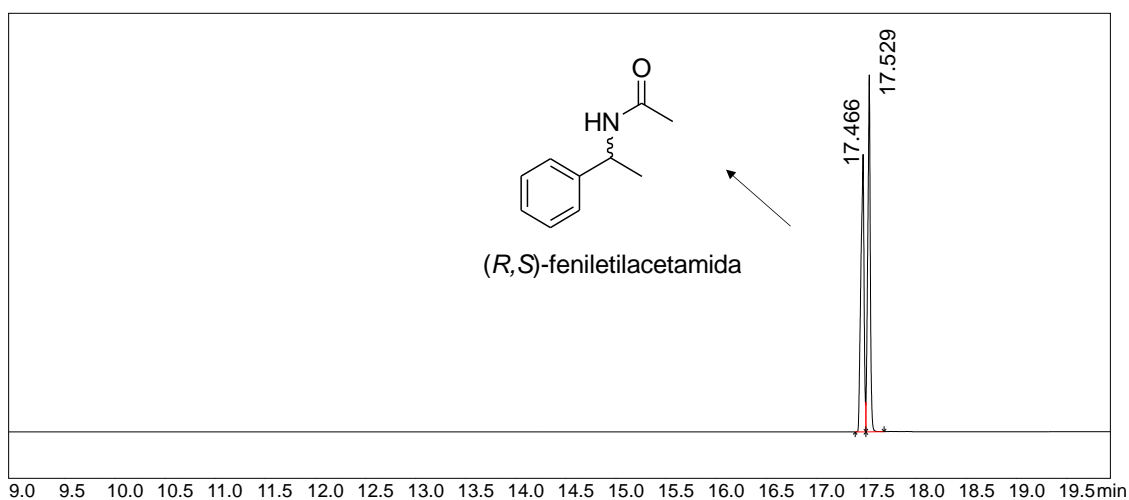


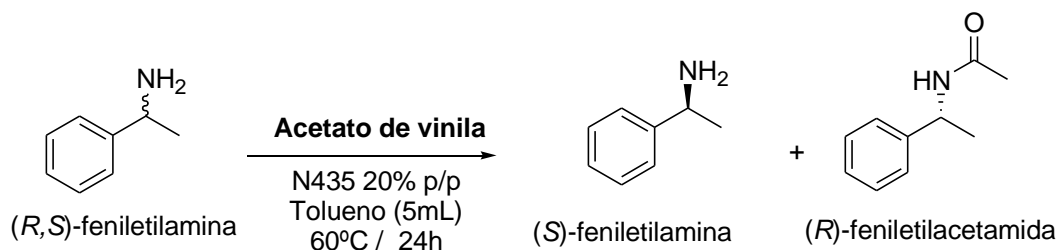
Figura 12. Cromatograma da (*R,S*)-feniletilacetamida.

5.1.3 Otimização da resolução cinética da (*R,S*)-feniletilamina por batelada

5.1.3.1 Resolução cinética da (*R,S*)-feniletilamina e avaliação de diferentes proporções de acetato de vinila

A primeira condição a ser testada para a resolução cinética foi utilizando acetato de vinila como doador de acila nas proporções de 2eq e 10eq e tolueno como solvente para que, posteriormente, os parâmetros fossem otimizados. Após a análise de CG-DIC (Figura 13 e 14), foram obtidos os valores encontrados na tabela 1.

Tabela 1. Resolução cinética da (*R,S*)-feniletilamina e avaliação de diferentes proporções de acetato de vinila.



Eq.	Tempo de reação (h)	Conv. ^a (%)	e.e. ^b prod. (%)	E ^c
2 eq	0	3	5	0
2 eq	3	24	2	0
2 eq	24	27	3	0
10 eq	0	17	0,23	0
10 eq	3	94	0,81	0
10 eq	24	>99	0,74	0

Condições reacionais: (*R,S*)-feniletilamina (1eq, 100mg), acetato de vinila (2eq e 10eq) como doador de acila e 60mg de CAL B N435 em tolueno (5mL) por 24h à 60°C, avaliado por CG-DIC.

^aconversão: determinada por comparação das áreas observadas no cromatograma; ^bexcesso enantiomérico: (*R* - *S*); ^crazão enantiomérica: $E = \ln \{ [eep(1 - ees)] / (eep + ees) \} / \ln \{ [eep(1 + ees)] / (eep + ees) \}$.

Como pode ser observado na tabela 1, obteve-se que após 24 h de reação não houve nenhuma enantiosseletividade para ambas as proporções de doador de acila. Além disso, obteve uma conversão de 27% para 2eq do acetato de vinila e uma conversão >99% para 10eq do acetato de vinila.

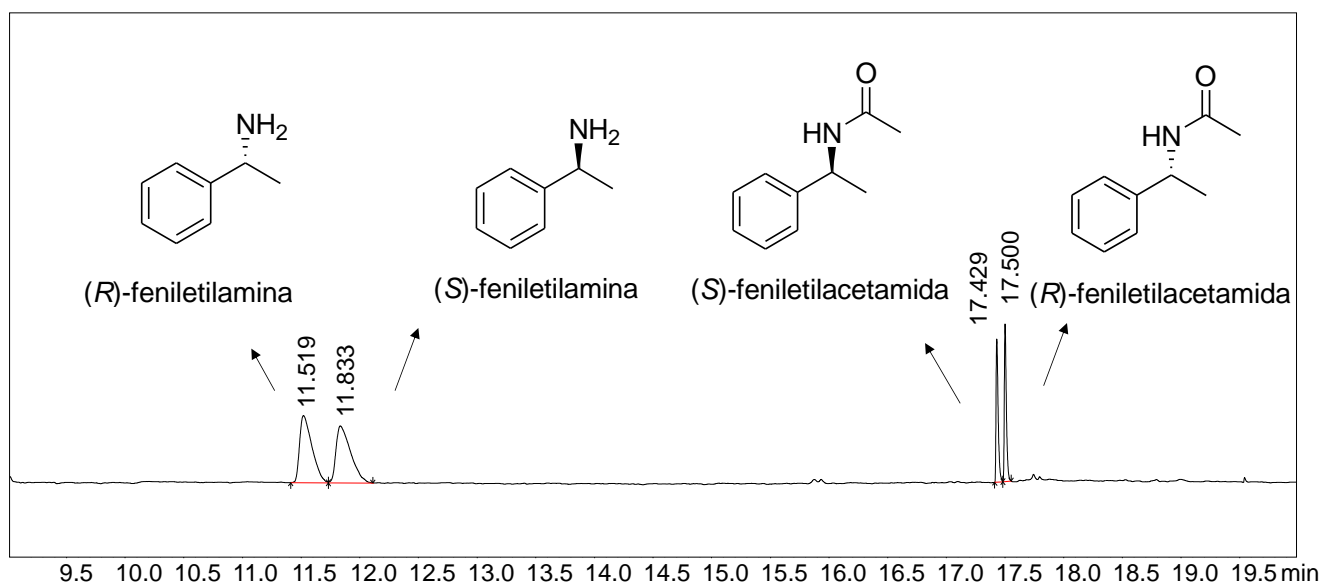


Figura 14. Cromatograma obtido por CG-DIC após 24h de reação da resolução cinética da (R,S)-feniletilamina utilizando 2eq de acetato de vinila.

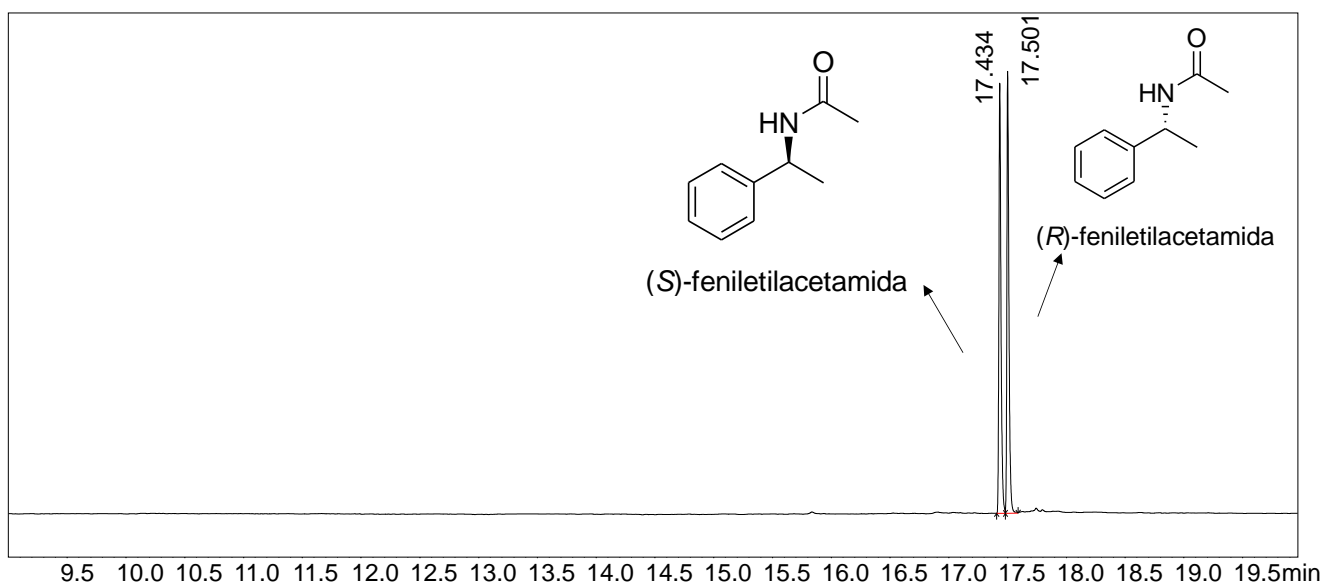


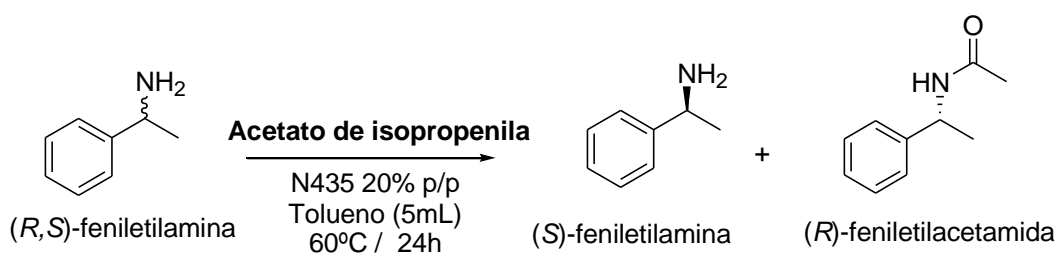
Figura 13. Cromatograma obtido por CG-DIC após 24h de reação da resolução cinética da (R,S)-feniletilamina utilizando 10eq de acetato de vinila.

Faber e colaboradores (2011) em seu trabalho relatou que a nucleoficidade da amina é significativamente maior do que a de um álcool por exemplo e, ela acaba reagindo com ésteres não enzimaticamente, prejudicando a enantiosseletividade da reação. Outra hipótese para essa não enantiosseletividade, pode ser a formação de subprodutos como o acetaldeído gerado pelo acetato de vinila e este, pode desativar alguns tipos de lipases como a CAL-B. (WEBER, 1997)

5.1.3.2 Resolução cinética da (*R,S*)-feniletilamina e avaliação de diferentes proporções de acetato de isopropenila

A próxima etapa foi fazer um estudo do comportamento da reação de resolução cinética da (*R,S*)-feniletilamina utilizando proporções de 2eq e 10eq de acetato de isopropenila como doador de acila em diferentes tempos reacionais. Os resultados obtidos após análise em CG-DIC (Figura 15 e 16) são encontrados na tabela 2.

Tabela 2. Resolução cinética da (*R,S*)-feniletilamina e avaliação de diferentes proporções de acetato de isopropenila



Eq.	Tempo (h)	Conv^a. (%)	e.e^b. prod. (%)	E^c
2 eq	0	5	65	5
2 eq	3	73	52	4
2 eq	24	96	36	2
10 eq	0	9	13	1
10 eq	3	90	11	1
10 eq	24	>99	8	0

Condições reacionais: (*R,S*)-feniletilamina (1eq, 100mg), acetato de isopropenila (2eq e 10eq) como doador de acila e 60mg de CAL B N435 em tolueno (5mL) por 24h à 60°C, avaliado por CG-DIC.

^aconversão: determinada por comparação das áreas observadas no cromatograma; ^bexcesso enantiomérico: (*R* - *S*); ^crazão enantiomérica: $E = \ln \{ [eep (1 - ees)] / (eep + ees) \} / \ln \{ [eep (1 + ees)] / (eep + ees) \}$.

Os resultados demonstraram um aumento da enantiosseletividade e do excesso enantiomérico do produto comparado aos resultados utilizando acetato de vinila como

doador de acila. Entretanto, ainda foi obtido valores moderados de conversão e baixos valores de enantiosseletividade. Como pode observar na tabela 2, a alíquota recolhida no tempo zero (após adicionar todos os reagentes), já apresentava uma conversão do substrato. Com esses resultados, pressupõe que o acetato de isopropenila frente à essa reação, é ainda muito reativo. Desse modo, a reação não enzimática acaba prevalecendo, resultando em baixos valores de enantiosseletividade.

Outro problema encontrado ao utilizar o acetato de isopropenila na resolução cinética da (*R,S*)-feniletilamina foi a presença de um subproduto, que pressupõe ser uma imina resultante da condensação da 1-feniletilamina com acetona que é gerada no meio reacional.

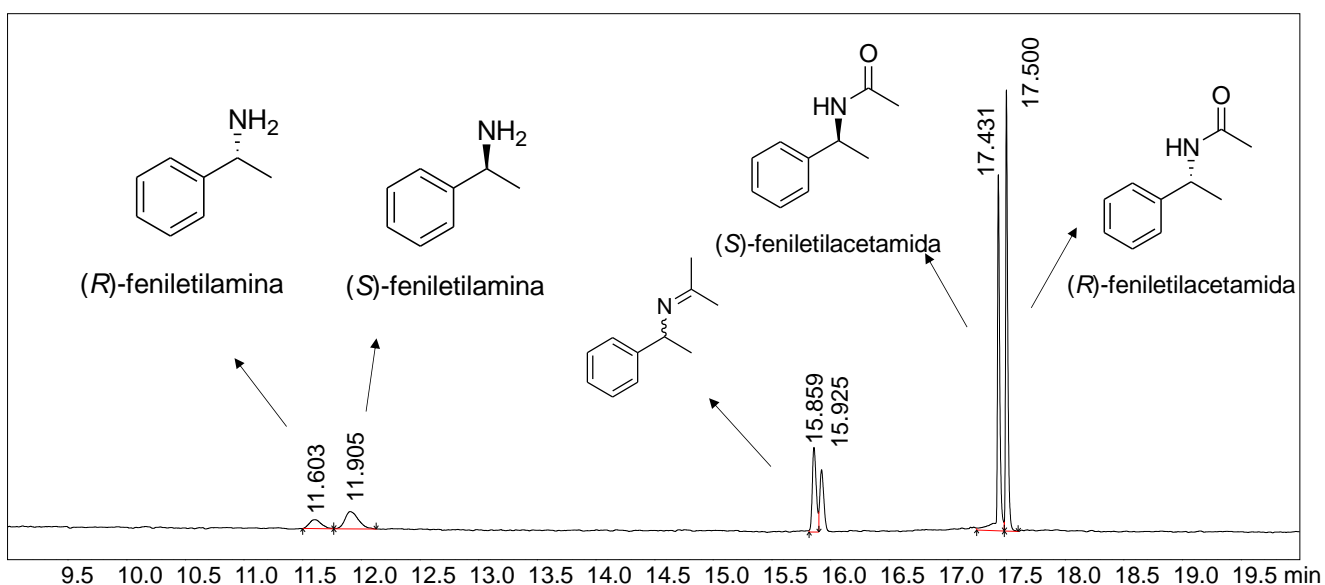


Figura 15. Cromatograma obtido por CG-DIC após 24h de reação da resolução cinética da (*R,S*)-feniletilamina utilizando 2eq de acetato de isopropenila.

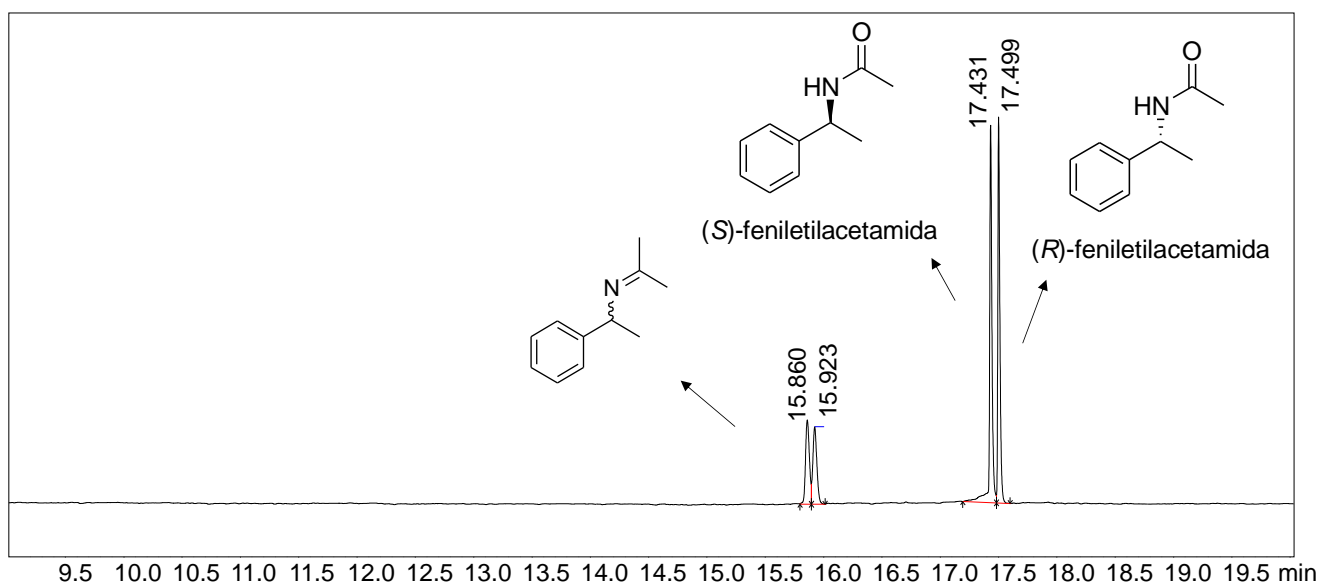
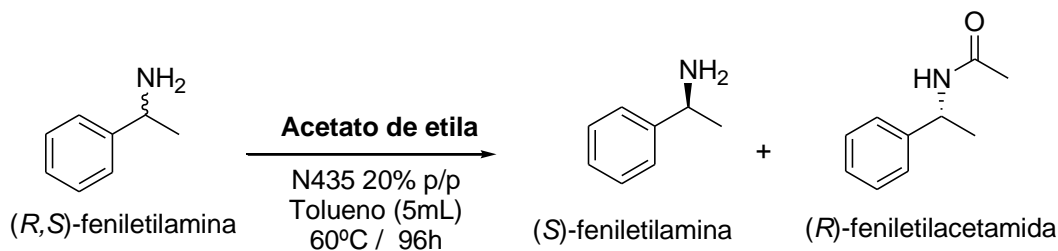


Figura 16. Cromatograma obtido por CG-DIC após 24h de reação da resolução cinética da (*R,S*)-feniletilamina utilizando 10eq de acetato de isopropenila

5.1.3.3 Resolução cinética da (*R,S*)-feniletilamina e avaliação de diferentes proporções de acetato de etila

Como os resultados foram insatisfatórios para os sistemas reacionais utilizando acetato de vinila e acetato de isopropenila como doador de acila, foi necessário escolher um doador de acila que na literatura apresentava uma menor reatividade frente à resolução cinética usando lipase, já que os doadores mais comumente utilizados para a resolução cinética de álcool, por exemplo, como o acetato de vinila e acetato de isopropenila apresentavam uma maior reatividade nesse sistema. Desse modo, optou-se pela utilização do acetato de etila. Os resultados obtidos após análise em CG-DIC (Figura 17 e 18) para a resolução cinética da (*R,S*)-feniletilamina em diferentes tempos de reação com acetato de etila como doador de acila são encontrado na tabela 3.

Tabela 3: Resultado da resolução cinética da (R,S)-feniletilamina em diferentes tempos de reação com acetato de etila como doador de acila



Eq.	Tempo de reação (h)	Conv ^a . (%)	e.e ^b . prod. (%)	E ^c
2 eq	0	0	0	0
2 eq	2	9	85	17
2 eq	4	10	81	18
2 eq	6	15	82	18
2 eq	9	20	89	22
2 eq	24	28	92	34
2 eq	72	49	93	80
2 eq	96	50	92	105
10 eq	0	0	0	0
10 eq	2	9	80	10
10 eq	4	12	79	10
10 eq	6	19	79	11
10 eq	9	27	80	11
10 eq	24	40	75	12
10 eq	72	52	71	12
10 eq	96	65	63	15

Condições reacionais: (R,S)-feniletilamina (1eq, 100mg), acetato de etila (2eq e 10eq) como doador de acila e 60mg de CAL B N435 em tolueno (5mL) por 4 dias à 60°C, avaliado por CG-DIC.

^aconversão: determinada por comparação das áreas observadas no cromatograma; ^bexcesso enantiomérico: (R - S); ^crazão enantiomérica: $E = \ln \{ [eep (1 - ees)] / (eep + ees) \} / \ln \{ [eep (1 + ees)] / (eep + ees) \}$.

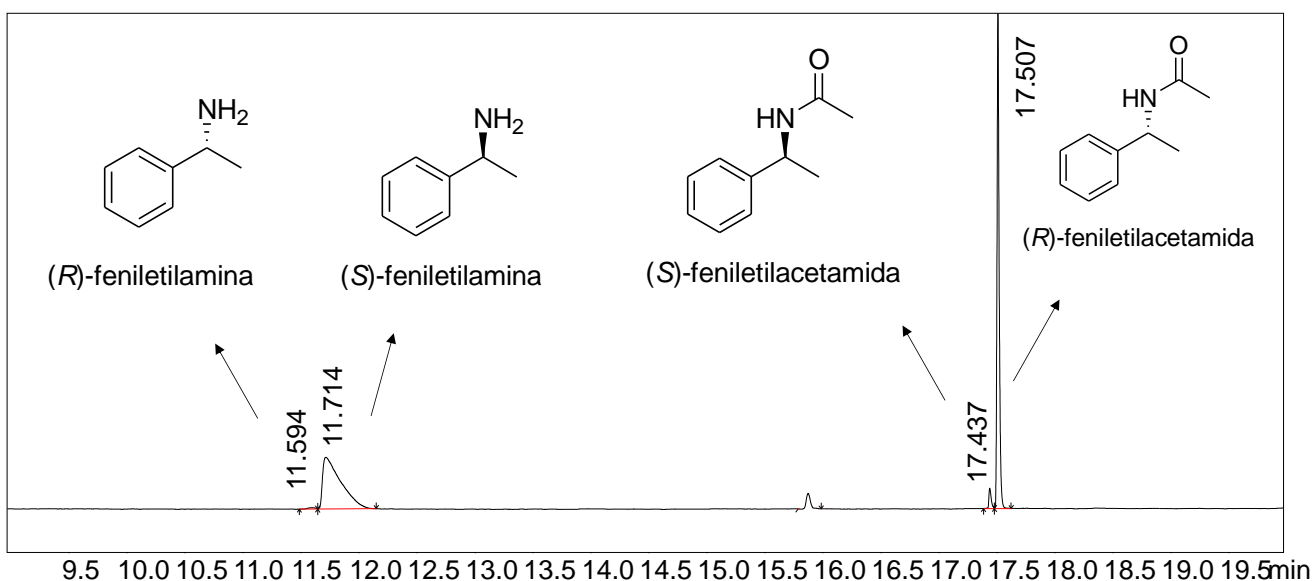


Figura 17. Cromatograma obtido por CG-DIC após 96h de reação da resolução cinética da (R,S)-feniletilamina utilizando 10eq de acetato de etila.

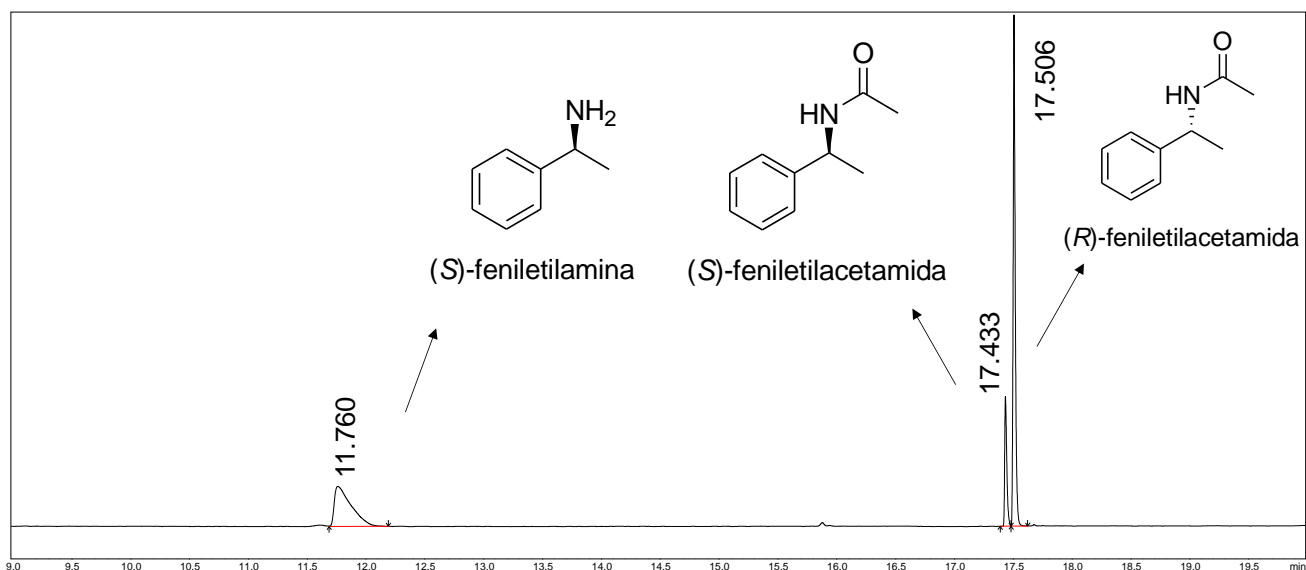


Figura 18. Cromatograma obtido por CG-DIC após 96h de reação da resolução cinética da (R,S)-feniletilamina utilizando 2eq de acetato de etila.

Como pode ser observado pela tabela 3 e pelo gráfico 2, obteve valores satisfatórios de enantiosseletividade e conversão usando 2eq de doador de acila na RC. Enquanto foi obtido altos valores de conversão, porém baixos valores para enantiosseletividade com o uso de 10eq de doador de acila. Pressupõe que o alto valor de enantiosseletividade para o uso de 2eq de acetato de etila, é devido à baixa reatividade do acetato de etila diretamente com a amina para esse sistema,

priorizando assim, a reação enzimática. Já a baixa enantiosseletividade para a reação utilizando 10eq de doador de acila, pode ser decorrente pela interação direta do acetato de etila com a amina não enzimaticamente, pela alta proporção desta na reação. Consequentemente a reação perde a enantiosseletividade, já que a enzima atua parcialmente sobre o substrato.

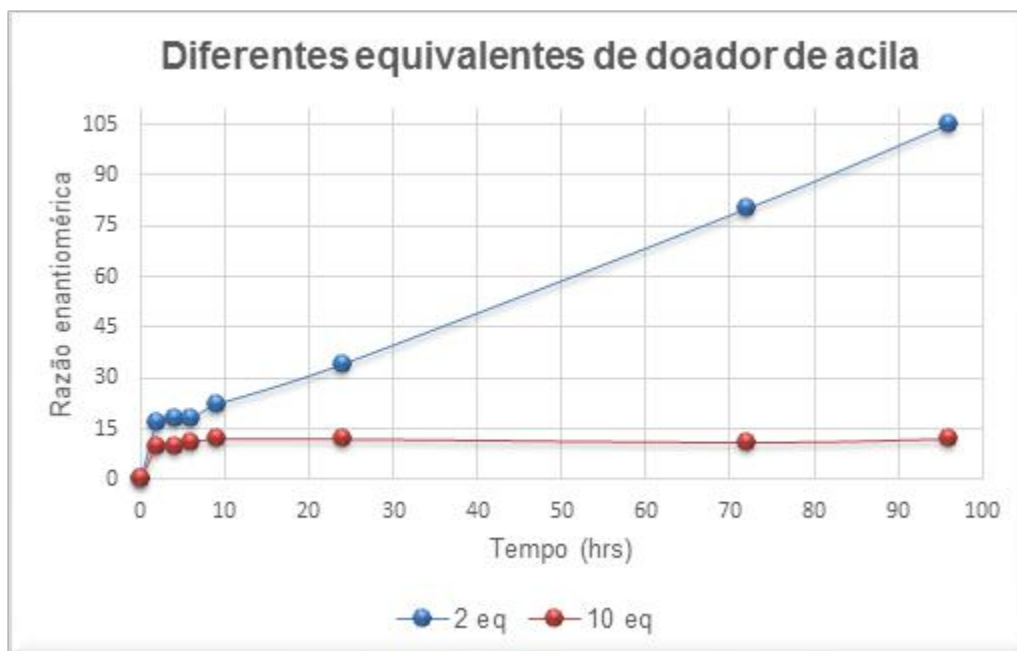


Gráfico 2. Comparação entre as diferentes proporções de acetato de etila na resolução cinética.

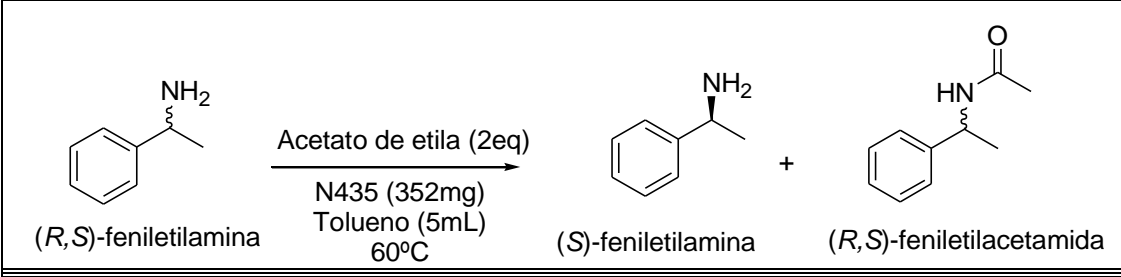
Com esses resultados, definiu que o uso de 2 equivalentes de acetato de etila como doador de acila com a utilização de tolueno como solvente, são as melhores condições para a aplicação em fluxo contínuo.

5.1.4 Resolução cinética da (*R,S*)-feniletilamina em fluxo contínuo

Com as condições melhoradas por batelada e os métodos analíticos estabelecidos, foi feita a aplicação da reação de resolução cinética da (*R,S*)-feniletilamina em fluxo contínuo.

A reação de $1,65 \times 10^{-1}$ da (*R,S*)-feniletilamina foi feita em diferentes tempos de reação (10, 20, 30, 40, 50 e 60 min) com 2eq de acetato de etila como doador de acila em fluxo contínuo. Os valores para conversão, excesso enantiomérico do produto e a razão enantiomérica desta reação é encontrada na tabela 4.

Tabela 4. Resultado da resolução cinética da (*R,S*)-feniletilamina em diferentes tempos com acetato de etila como doador de acila em fluxo contínuo.

			
Tempo de residência (min)	Conv ^a . (%)	e.e ^b . prod. (%)	E ^c
0	0	0	0
10	13	93	35
20	28	93	37
30	30	96	95
40	33	94	77
50	37	96	101
60	43	96	103

Condições reacionais: Tolueno (10 mL) contendo a (*R,S*)-feniletilamina (200 mg, 1eq) e acetato de etila (2eq) bombeada através do leito na vazão $120 \text{ uL} \cdot \text{min}^{-1}$, $60 \text{ uL} \cdot \text{min}^{-1}$, $40 \text{ uL} \cdot \text{min}^{-1}$, $30 \text{ uL} \cdot \text{min}^{-1}$, $24 \text{ uL} \cdot \text{min}^{-1}$, $20 \text{ uL} \cdot \text{min}^{-1}$, correspondendo aos tempos de residência de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos respectivamente., utilizando o leito fixo preenchido com N435. Avaliado por CG-DIC. ^aconversão: determinada por comparação das áreas observadas no cromatograma; ^bexcesso enantiomérico: (*R* - *S*); ^crazão enantiomérica: $E = \ln \{ [eep (1 - ees)] / (eep + ees) \} / \ln \{ [eep (1 + ees)] / (eep + ees) \}$.

O cromatograma obtido por CG-DIC da reação de resolução cinética em fluxo contínuo da (*R,S*)-feniletilamina com tempo de residência de 40 min pode ser visto na figura 19. É observado a redução do pico referente ao enantiômero (*R*) do substrato e o aparecimento do pico referente ao enantiômero (*R*) do produto.

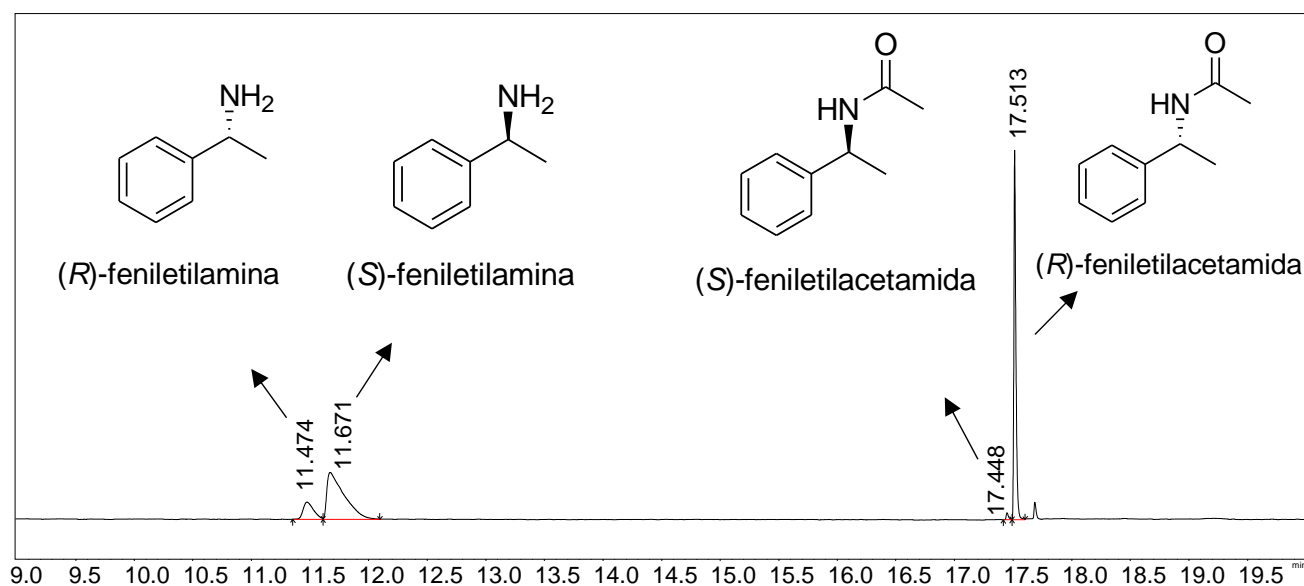


Figura 19. Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética em fluxo contínuo da (*R,S*)-feniletilamina com tempo de residência de 40 min.

Como pode ser observado pelas tabelas 3 e 4 e fazendo a comparação de ambos pelo gráfico 3, pode ser observado que a resolução cinética em fluxo contínuo foi demasiadamente mais rápida do que a RC por batelada, mantendo bons valores de conversão e enantiosseletividade. Para obter uma conversão boa e uma razão enantiomérica acima de 100, foi necessário apenas 1h de reação, enquanto para obter aproximadamente a mesma razão enantiomérica por batelada, foi necessária mais do que 90h de reação. Este resultado demonstra a eficiência da tecnologia de fluxo contínuo para esse sistema reacional, contribuindo para a redução do tempo e, proporcionando uma maior eficácia na transferência de massa sem sofrer inibição do sistema biocatalítico pelo produto, uma vez que o fluxo laminar remove o produto do contato da enzima.

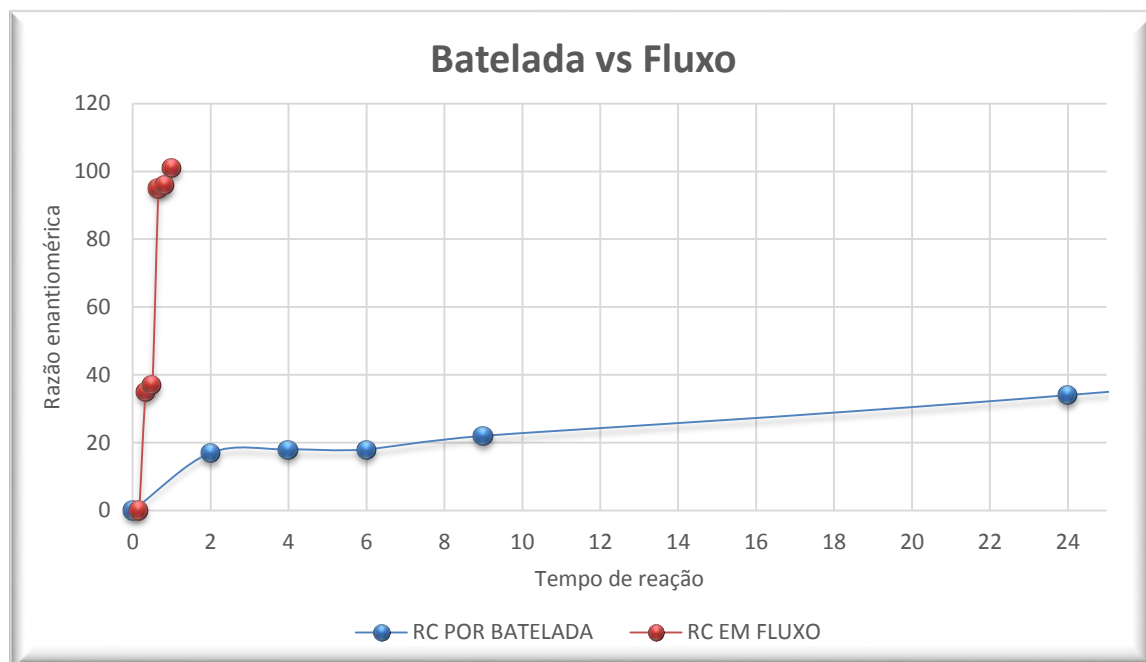


Gráfico 3. Comparação da RC por batelada e em fluxo contínuo.

5.1.5 Diferença de produtividade entre batelada e fluxo contínuo

Como alguns parâmetros como a quantidade de enzima utilizada e o tempo reacional foram diferentes em ambos os sistemas, foi necessário o cálculo de produtividade para uma melhor comparação. Os valores obtidos para a resolução cinética da (*R,S*)-feniletilamina em batelada e em fluxo contínuo são encontrados na tabela 5 e na tabela 6, respectivamente.

Tabela 5. Valores de produtividade obtidos para a resolução cinética da (R,S)-feniletilamina em batelada.

Batelada		
Tempo (min)	Conv (%)	Produtividade ($\text{mg}_{\text{produto}} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{enzima}}^{-1}$)
120	9	5,03
240	10	2,79
360	15	2,79
540	20	2,48
1440	28	1,30
4320	49	0,76
5760	50	0,58

Tabela 6. Valores de produtividade obtidos para a resolução cinética da (R,S)-feniletilamina em fluxo contínuo

Fluxo contínuo		
Fluxo ($\text{uL} \cdot \text{min}^{-1}$)	Conv (%)	Produtividade ($\text{mg}_{\text{produto}} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{enzima}}^{-1}$)
120	13	1,18
60	28	1,27
40	30	0,91
30	33	0,75
24	37	0,67
20	43	0,65

Como pode observar pelas tabelas 5 e 6, para valores baixos de conversão, foi obtido uma maior produtividade para o sistema em batelada e, para altos valores de conversão, obteve-se maiores valores de produtividade para o sistema em fluxo contínuo. Esse resultado é devido à grande diferença do tempo reacional e também pela quantidade de enzima utilizada nos dois sistemas. Entretanto alguns fatores

devem ser analisados, mesmo que em um sistema em batelada a utilização da lipase seja bem menor, ela está em constante agitação e acaba se deteriorando ao contrário da lipase utilizada no leito fixo, a qual fica intacta. Desse modo, as lipases em fluxo contínuo se conservam muito mais e podem ser reutilizadas. Logo, o fluxo tem uma grande vantagem tanto no tempo reacional como na reutilização da enzima.

5.2 Estudo com a (R,S)-amina 2

5.2.1 Análise da cetona por CG-DIC

Para acompanhar os perfis cromatográficos no CG-DIC após a reação de aminação foi feita a análise cromatográfica no CG-DIC (Figura 20) e CG-EM (Figura 28 e 27) da cetona e sua devida caracterização por espectroscopia de infra-vermelho (Figura 21).

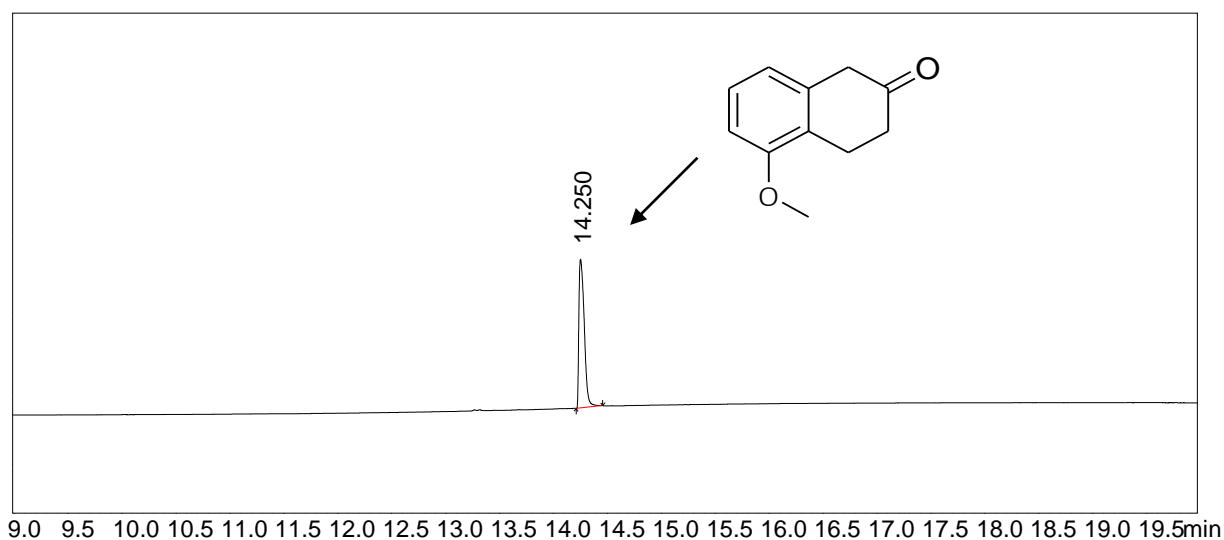


Figura 20. Cromatograma da cetona, em coluna capilar cp-chirasil-dex cb.

Na análise do espectro de infra-vermelho observa-se a banda referente ao estiramento da carbonila (C=O) em 1716 cm^{-1} que não será observado após a aminação. Além desta, é observado bandas referentes ao estiramento da ligação dupla C=C em 1641 cm^{-1} e dos carbonos sp² e sp³ em torno de 3000 cm^{-1} .

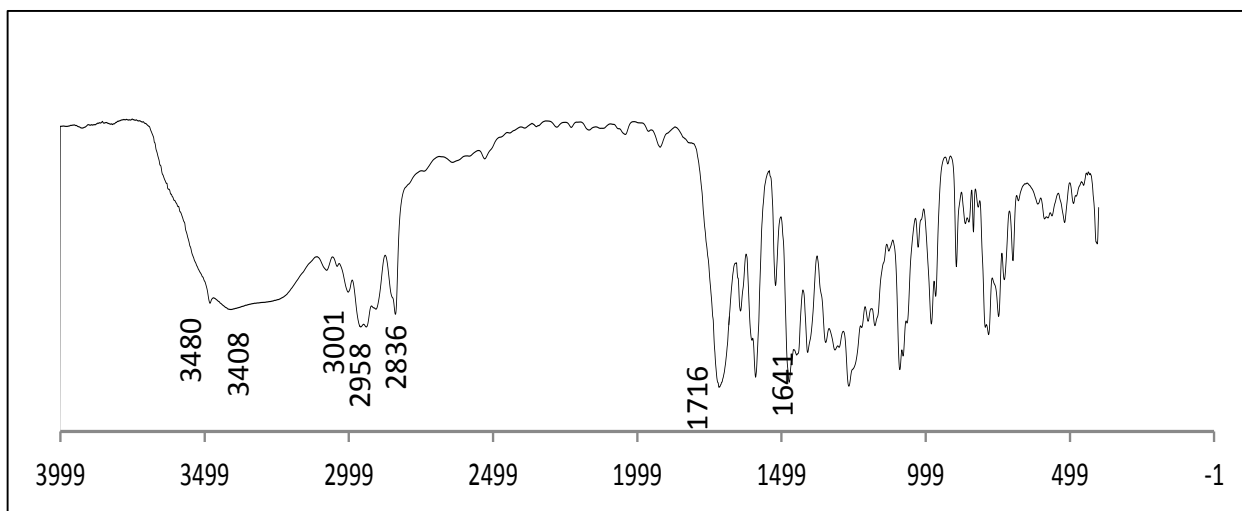
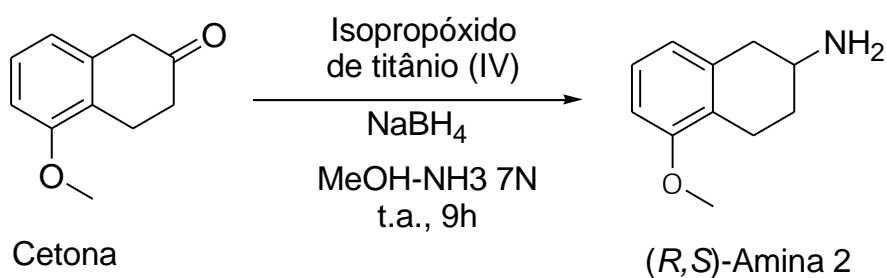


Figura 21. Espectro de infra-vermelho da cetona

5.2.2 Aminoação redutiva da cetona

Para o aumento da quantidade do que chamamos de (*R,S*)-amina 2 disponível para as reações posteriores, foi feita a reação de aminoação redutiva da cetona (MIRIYALA, 2004), como mostra o esquema 11. As proporções dos reagentes utilizadas estão descritas na metodologia no tópico 4.1.5.



Esquema 11. Aminoação redutiva da cetona para obtenção da (*R,S*)-amina 2

A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada com acetato em hexano 20:80. O perfil cromatográfico após o fim da reação é mostrada na figura 22.

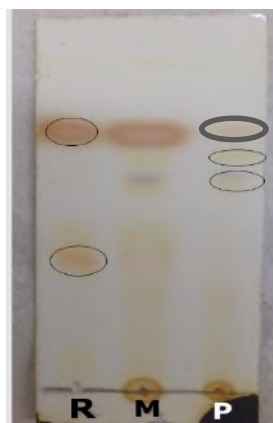


Figura 22. Perfil por CCD do material de partida (cetona), da mistura e do produto ((*R,S*)-amina 2). Fase estacionária sílica; fase móvel: acetato de etila/hexano (2:8) e revelador: iodo

O produto foi obtido na forma de um óleo marrom escuro com um rendimento de 37%. Uma das consequências do baixo rendimento foi devido à dificuldade do isolamento, o qual se caracteriza por várias etapas e aumenta a porcentagem de perda do produto. Em seguida, o produto foi derivatizado com anidrido trifluoroacético e trietilamina, pelo mesmo motivo feito para a (*R,S*)-feniletilamina e após foi analisado por CG-DIC (Figura 23).

Com a análise cromatográfica, foi calculado a conversão e obteve-se >99% da (*R,S*)-amina 2.

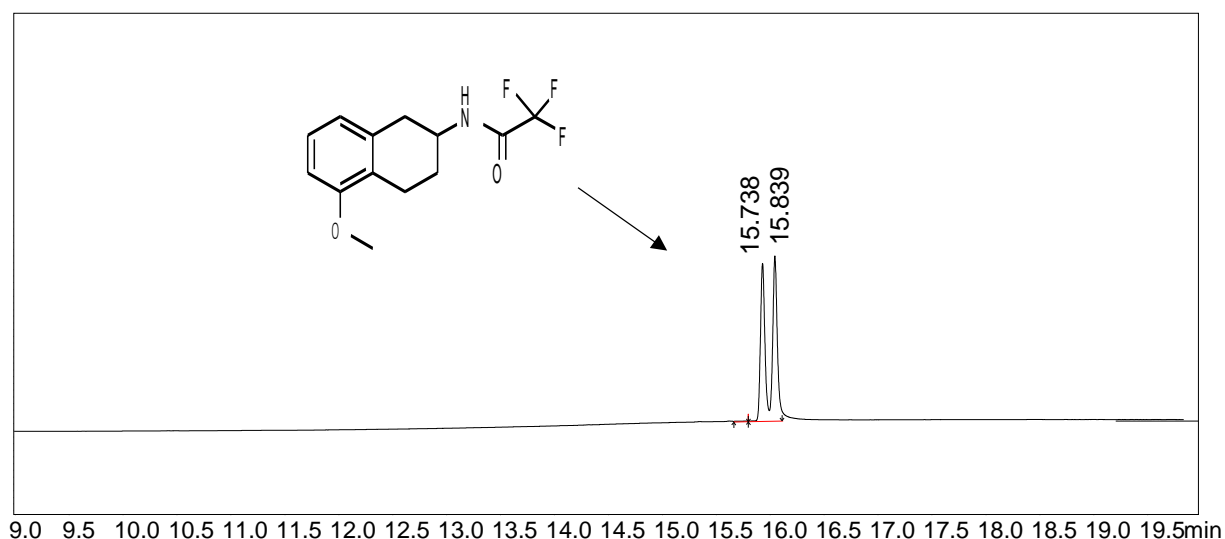


Figura 23. Cromatograma da (*R,S*)-amina 2 derivatizada.

O produto também foi devidamente analisado por CG-EM (Figura 28 e 29) Ressonância magnética nuclear de ^{13}C e ^1H (Figura A1 e A2) e espectroscopia de infra-vermelho (Figura 24).

Após a aminação, observa-se pelo espectro de infra-vermelho, o sumiço da banda referente ao estiramento da carbonila ($\text{C}=\text{O}$) em 1716cm^{-1} , e o aparecimento das duas bandas correspondente ao estiramento da amina primária $\text{N}-\text{H}$ em 3291cm^{-1} e 3352cm^{-1} . Além desta, é observado bandas referentes ao estiramento da ligação dupla $\text{C}=\text{C}$ em 1641cm^{-1} e dos carbonos sp^2 e sp^3 em torno de 3000cm^{-1} .

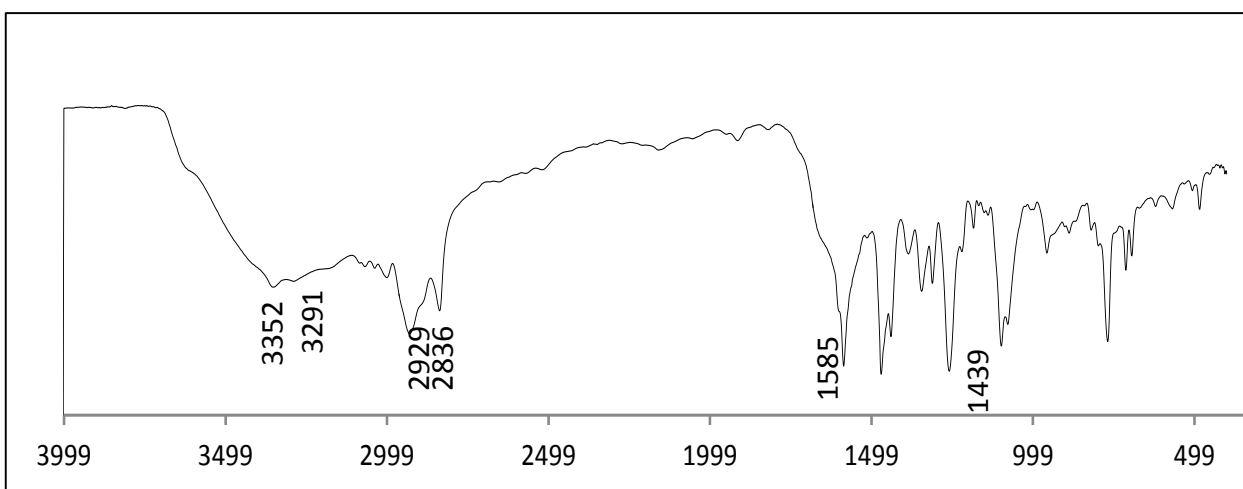
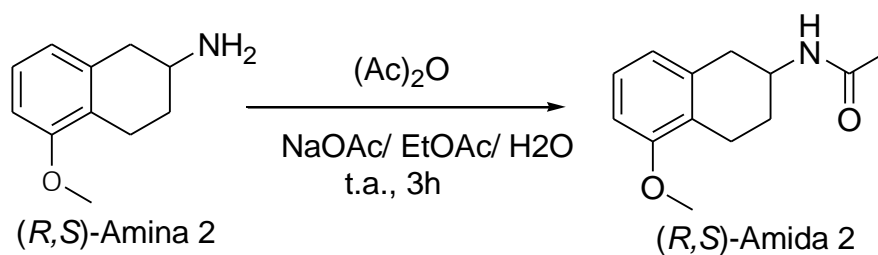


Figura 24. Espectro de Infra-vermelho da (*R,S*)-amina 2

5.2.3 Acetilação da (*R,S*)-amina 2

Para estabelecer um perfil cromatográfico no CG-DIC, para posteriormente, ter uma comparação dos enântiômeros na resolução cinética, foi feito a acetilação da (*R,S*)-amina 2 (Esquema 12). As proporções dos reagentes utilizadas estão descritas na metodologia no tópico 4.1.6 (COPINGA *et al.*, 1993).



Esquema 12. Acetilação da (R,S)-amina 2

Foi obtido um produto sólido marrom escuro, o qual foi caracterizado e confirmado por CG-DIC (figura 25), Ressonância magnética nuclear de ^{13}C e ^1H (figura A3 e A4) e espectroscopia de infra-vermelho (figura 26).

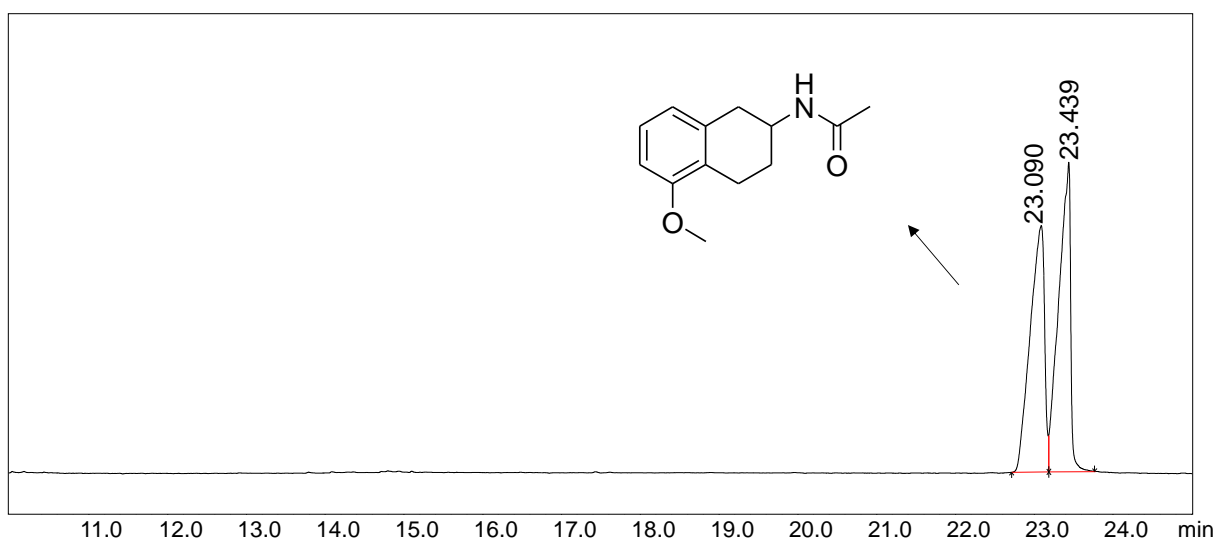


Figura 25. Cromatograma da (R,S)-amida 2.

No espectro de infra-vermelho, pode-se observar em 3292cm^{-1} a banda correspondente ao singlete do estiramento da amida secundária e em 1713cm^{-1} a banda correspondente ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$ da amida.

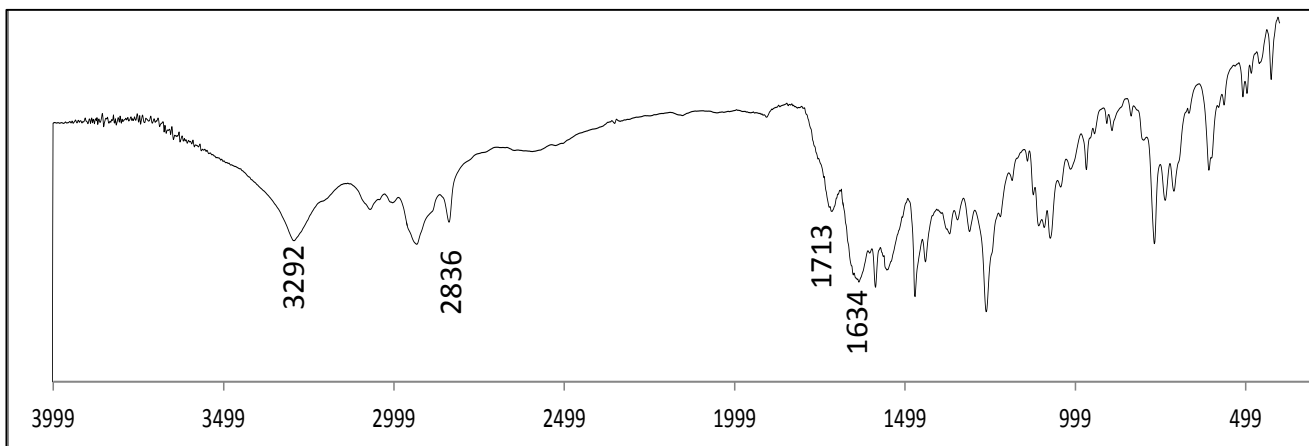


Figura 26. Espectro de Infra-vermelho da (R,S)-amida 2

Em seguida foi feita a análise por CG-EM da cetona, (R,S)-amina 2 derivatizada e (R,S)-amida 2 (Figura 27).

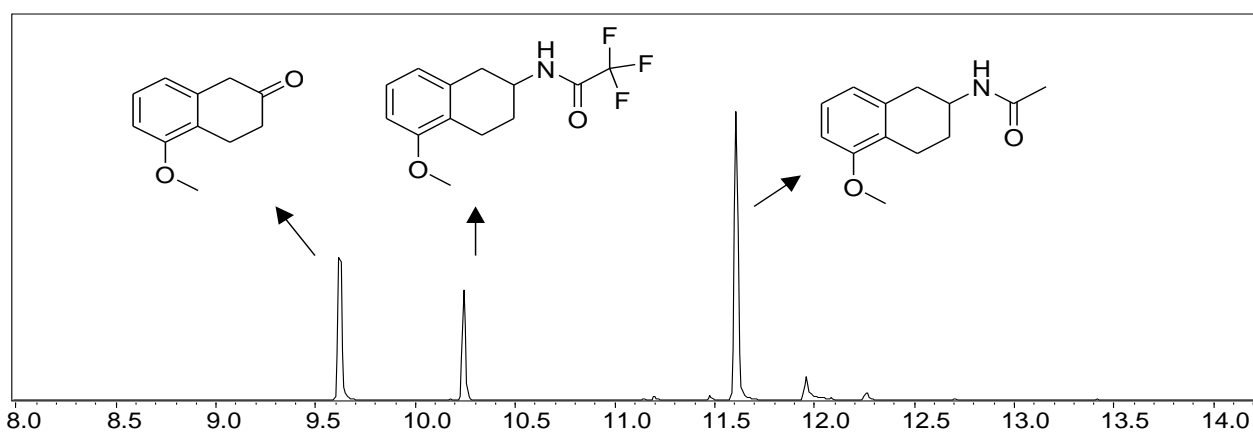


Figura 27. Cromatograma de CG-EM da cetona, (R,S)-amina 2 derivatizada e (R,S)-amida 2

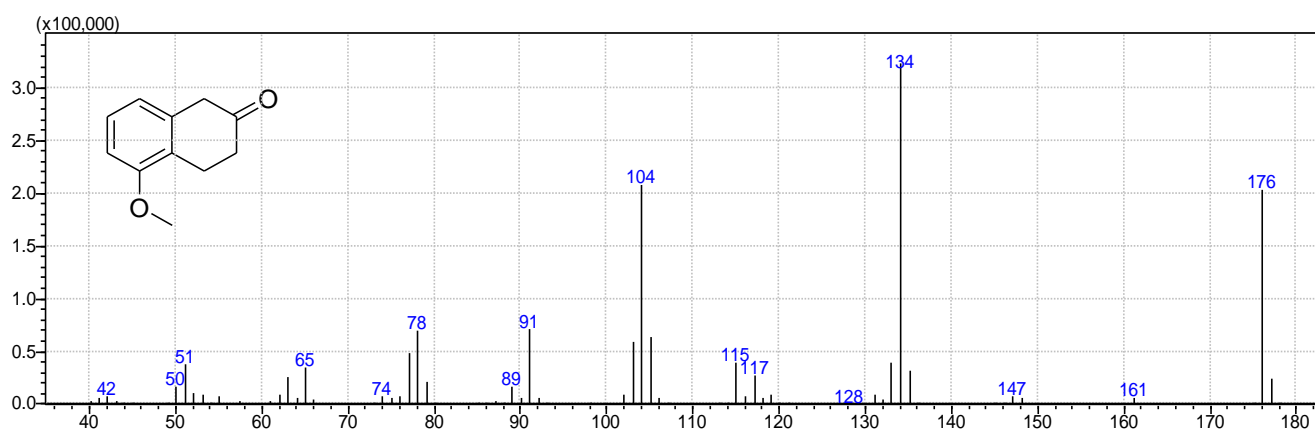


Figura 28. Espectro de massas da cetona

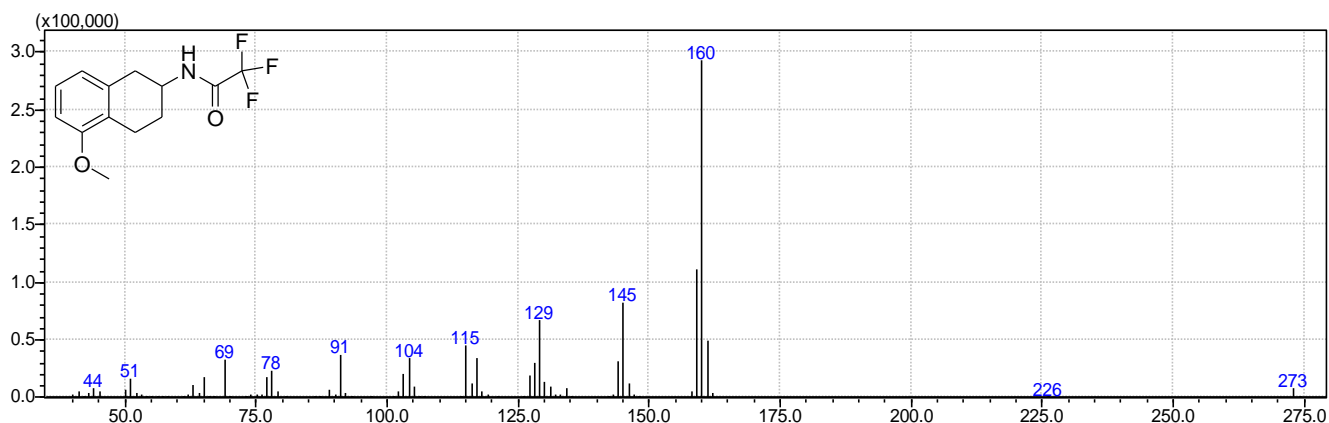


Figura 29. Espectro de massas da (*R,S*)-amina 2 derivatizada

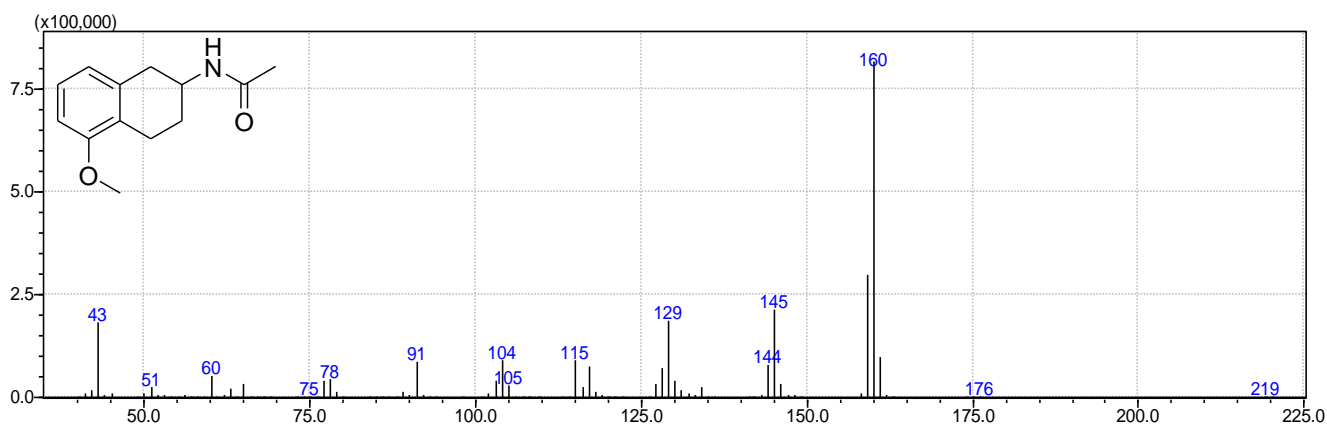


Figura 30. Espectro de massas da (*R,S*)-amida 2

No espectro de massas da cetona (Figura 27), os íons de m/z 176, 134 foram atribuídos aos íons $[M]^+$ e $[C_9H_{10}O]^+$; no espectro da (*R,S*)-amina 2 derivatizada (Figura 29), os íon de m/z 273 e 160 foram atribuídos aos íons $[M]^+$ e $[C_{11}H_{12}O]^+$; no espectro da (*R,S*)-amida 2 (Figura 30), os íon de m/z 219 e 160 foram atribuídos aos íons $[M]^+$ e $[C_{11}H_{12}O]^+$.

5.2.4 Resolução cinética da (*R,S*)-amina 2 em fluxo contínuo

Tendo as condições otimizadas para a (*R,S*)-feniletilamina e os métodos analíticos estabelecidos, foi testado as mesmas condições para a resolução cinética da (*R,S*)-amina 2. Entretanto, como tinha uma falta da disponibilidade do substrato da (*R,S*)-amina 2 e tinha a necessidade de um volume mínimo de solvente para o fluxo, foi feito o teste com $1,12 \times 10^{-2}$ M da (*R,S*)-amina 2, uma concentração 15 vezes mais

diluída comparado a concentração utilizada para a resolução cinética da (*R,S*)-feniletilamina

Após a análise de CG-DIC (Figura 31), foram encontrados valores medianos para conversão, entretanto quase nenhuma enantiosseletividade. Com isso, também foi testado tempo de residência de 60 min e 120min, o qual perpetuou o mesmo resultado. Os resultados encontram-se na tabela 7.

Tabela 7. Resultado da resolução cinética da (*R,S*)-amina 2 em diferentes tempos com acetato de etila como doador de acila em fluxo contínuo.

COc1ccc2c(c1)CCCC2N (R,S)-Amina 2 + Acetato de Etila (2 eq) $\xrightarrow[\text{Tolueno, 60}^\circ\text{C}]{\text{N435}}$ COc1ccc2c(c1)CCCC2N (*S*)-Amina 2 + CC(=O)N[C@@H]1CCc2ccc(OC)cc2C1 (*R*)-Amida 2

Tempo de residência (min)	Conv ^a . (%)	e.e ^b . prod. (%)	E ^c
40	2	5	1
60	3	4	1
120	18	7	1

Condições reacionais: Tolueno (5 mL) contendo a (*R,S*)-amina 2 (10mg, 1eq) e acetato de etila (2eq) bombeada através do leito na vazão 30 uL.min⁻¹, 20 uL.min⁻¹, 10 uL.min⁻¹, correspondendo aos tempos de residência de 40, 60 e 120 minutos respectivamente, utilizado a coluna preenchida com N435. Avaliado por CG-DIC. ^aconversão: determinada por comparação das áreas observadas no cromatograma; ^bexcesso enantiomérico: (*R* - *S*); ^crazão enantiomérica: $E = \ln \{ [eep (1 - ees)] / (eep + ees) \} / \ln \{ [eep (1 + ees)] / (eep + ees) \}$.

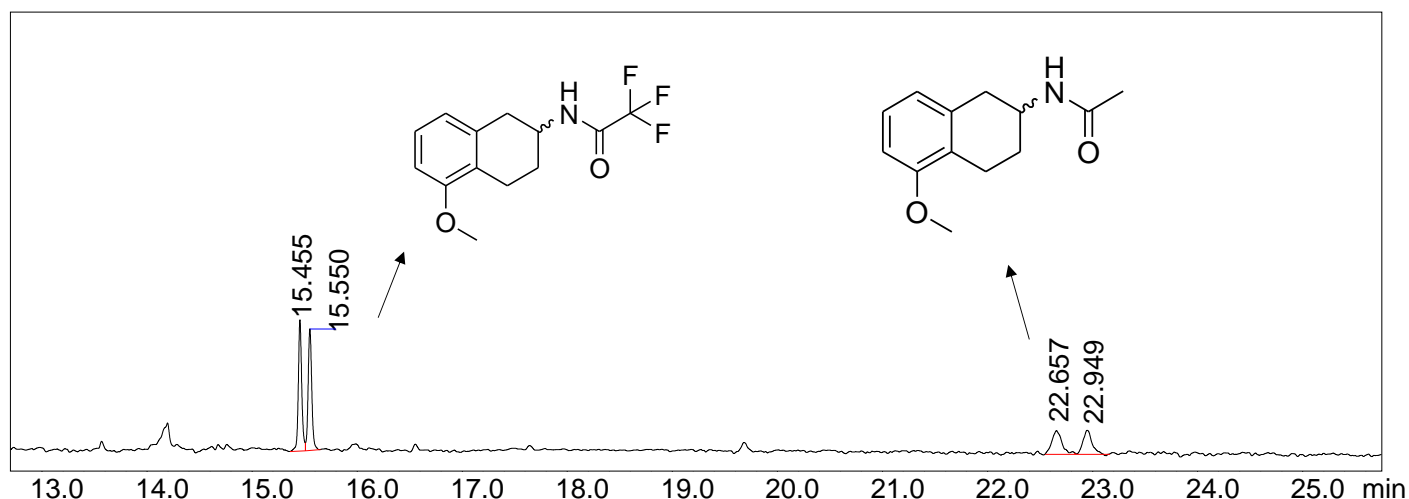


Figura 31. Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética em fluxo contínuo da (*R,S*)-feniletilamina com tempo de residência de 120 min.

O cromatograma obtido por CG-DIC da reação de resolução cinética em fluxo contínuo da (*R,S*)-amina 2 com tempo de residência de 120 min pode ser visto na figura 30. É observado o surgimento dos dois enantiômeros do produto (*R,S*)-amida 2

Costa e Amorim (1999) em seu trabalho, relatou que as lipases não hidrolisam substratos que estejam abaixo de uma concentração mínima. Nessa conjectura, é provável que a baixa enantiosseletividade da enzima nesse sistema, foi devido à baixa concentrações da enzima (*R,S*)-amina 2.

A utilização da baixa concentração da (*R,S*)-amina 2, foi devido à baixa disponibilidade do substrato (cetona) no laboratório, o que impediu o aumento da quantidade de (*R,S*)-amina 2 disponível para as reações de resolução cinética. Além disso, para uma reação em fluxo contínuo, é necessário a utilização de uma quantidade mínima de solvente para que possa preencher todo o sistema, incluindo a coluna empacotada com a enzima e, para isso, foi indispensável a diluição do substrato. Desse modo, é imprescindível fazer um estudo mais aprofundado das interações enzima-substrato. Para isso, ainda é necessário variar a concentração da (*R,S*)-amina 2 nesse sistema para se obter um conhecimento mais eficaz dessas interações.

6 CONCLUSÃO

Foi possível desenvolver condições otimizadas utilizando lipase imobilizada para a resolução cinética da (*R,S*)-feniletilamina em fluxo contínuo, cujo valores de enantiosseletividade e conversão foram satisfatórios. Entretanto, a aplicação das condições otimizadas para baixas concentrações de (*R,S*)-amina 2, resultou em valores moderados de conversão e baixa enantiosseletividade.

Além disso, em comparação a reação em batelada, a reação em fluxo contínuo apresentou um tempo reacional muito menor para chegar nos valores de enantiosseletividade e de conversão obtido em batelada. Com isso, fica claro a vantagem do uso do fluxo contínuo frente a reação em batelada para esse sistema.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Realizar um estudo mais elaborado da resolução cinética em fluxo contínuo em maiores concentrações da (*R,S*)-amina 2;
- Realizar um estudo para separar os enantiômeros do substrato e produto da (*R,S*)-fenetilacetamida após a resolução cinética em fluxo contínuo;

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

AILLAUD, I.; COLLIN, J.; HANNEDOUCHE, J.; SCHULZ, E. **Dalton Transactions** 2007, 5105.

BARREIRO, J, E; FERREIRA, F, V; COTA, R, R, P. **Substâncias entantiomericamente puras (SEP): A questão dos fármacos quirais**. *Química Nova*, 20(6) (1997)

BAXENDALE, IAN R.; HORNUNG, CHISTIAN; LEY, STEVEN V. *Aust. J. Chem.* 2013, 66, 131.

BRAGA, A. L.; LUDTKE, D. S.; SCHNEIDER, P. H.; ANDRADE, L. H.; PAIXÃO, M. W. **Catálise assimétrica no Brasil: desenvolvimento e potencialidades para o avanço da indústria química brasileira**. *Química nova*. V. 36, nº10, p. 1591-1599, 2013.

BRUHASPATY, M. **Chemoselective reductive alkylation of ammonia with carbonyl compounds: synthesis of primary and symmetrical secondary amines**. Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy. *Tetrahedron* 60 (2004) 1463–1471.

BUNTEN S, HAPPE S. **Rotigotine transdermal system: a short review**. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2006;2:421–426.

COBLEY, J, C. EVANS, G; FANJUL, T; SIMMONS, S; WOODS, A; **New catalytic route for the synthesis of an optically active tetralone-derived amine for rotigotina**. *Tetrahedron Letters*, 2016

COELHO, A, S, F. **Fármacos e quiralidade**. *Química Nova*. 2001

COPINGA, S; TEPPER, G, P; GROL, J, C; HORN, S, A; DUBOCOVICH, L, M; **2-Amido-8-methoxytetralins: A Series of Nonindolic Melatonin-like Agents**; *J. Med. Chem.* 1993, 36, 2891-2898

COSTA, U, E, V.; AMORIM, N, L, H.; **O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: Aspectos gerais sobre a influência do solvente.** Química, 22(6) (1999)

DELUCIA, R.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; PLANETA, C. S.; GALLACCI, M.; AVELLAR, M.C.W., (Eds). **Farmacologia integrada.** 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2007. 701p.

DE SOUZA, R. O. M. A.; MIRANDA, L. S. M. **Reações Sob Fluxo Contínuo: da Química Verde a um Processo Verde.** Rev. Virtual Quim., 2014, 6 (1), 34-43

FABER, K.; RIVA, S. **Enzyme catalyzed irreversible acyl transfer.** Synthesis. P. 895-910. 1992.

FABER, K.; **Biotransformations in Organic Chemistry,** Springer-Verlag: Berlin, 1997.

FABER, K. **Biotransformations in organic synthesis;** 6a ed.; Springer-Verlag: Berlin, 2011.

FU, S.; XU, G.; CHEN, Y.; WU, J.; YANG, L. Chinese Journal of Organic Chemistry 2012, 32, 526.

GONÇALVES, C, A, R; OLIVEIRA, B, J, A; GONÇALVES, E J; **Biocatálise e Biotransformação: Fundamentos e Aplicações.** Editora Schoba, São Paulo, v. 2, p. 9–19, 2012.

HIL, K. K. **Pure and Applied Chemistry** 2006, 78, 341.

HÖHNE, M., BORNSCHEUER, U. T. ChemCatChem 2009, 1, 42-51.

KAMAL, A.; AZHAR, M. A.; KRISHNAJI, T.; MALIK, M. S.; AZEEZA, S. **Approaches based on enzyme mediated kinetic to dynamic kinetic resolutions: A versatile route for chiral intermediates**. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 252, n. 5-7, p. 569–592, 2008.

KAZLAUSKAS, R. J.; BORNSCHEUER, U. T. **Biotransformations with Lipases**. In: **Biotechnology and Ezyme Catalysis**. Wiley-VCH Verlag GmbH, 1998. p. 36–191.

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 rugose***. *Journal of Organic Chemistry*. V.56, p. 2656-2665. 1991.

KRAGL, U.; KRUSE, W.; HUMMEL, W.; WANDREY, C. **Biotechnology and Bioengineering** 1996, 52, 309.

KUZEFF, R. M. a Review of use of enantiomers in homeopathy. **ISRN Toxicology**. 2012.

LIN, G.-Q.; XU, M.-H.; ZHONG, Y.-W.; SUN, X.-W. **Accounts of Chemical Research** 2008, 41, 831.

LIU, D. A.; ZHANG, X. M. **European Journal of Organic Chemistry** 2005, 646.

LUTETE, L. M.; KADOTA, I.; YAMAMOTO, Y. **Journal of the American Chemical Society** 2004, 126, 1622.

RAO, N. N.; LUTZ, S. WURGES, K. MONOIR, D. “**Continuous Biocatalytic Processes**”. *Organic. Process Research and Development*, v 13 (3), p. 607-616, 2009.

RAZAK, N, N, A; ANNUAR, M, S, M; **Enzymatic synthesis of flavonoid ester: Elucidation of its kinetic mechanism and equilibrium thermodynamic behavior**. **American Chemical Society**. *Ind. Eng. Chem. Res*, 2015

MALKOV, A. V.; FIGLUS, M.; STONCIUS, S.; KOCOVSKY, P. **Journal of Organic Chemistry** 2007, 72, 1315.

MILNER, S. E. e MAGUIRE, A. R. **Recent trends in whole cell and isolated enzymes in enantioselective synthesis**. *Arkivoc*, v. 2012(i), p. 321–382, 2012.

MIRANDA, A. S.; MIRANDA, L. S. M.; SOUZA, R. O. M. A. Lipase: Valuable catalysts for dynamics kinect resolution. **Biotechnology Advances**. V.33, nº 5, p. 372-393, 2015.

MIRIYALA, B; BHATTACHARYYA, S; WILLIAMSON, S, J. **Chemoselective reductive alkylation of ammonia with carbonyl compounds: synthesis of primary and symmetrical secondary amines**. *Tetrahedron* 60 (2004) 1463–1471

NUGENT, T. C.; EL-SHAZLY, M. **Advanced Synthesis & Catalysis** 2010, 352, 753.

PAIVIO, M.; PERKIO, P.; KANERVA, L. T. **Tetrahedron-Asymmetry** 2012, 23, 230.

SAKAMOTO, M.; FUJITA, K.; YAGISHITA, F.; UNOSAWA, A.; MINO, T.; FUJITA, T. **Chemical Communications** 2011, 47, 4267.

SHI, J.; LI, X.; WANG, Q.; ZHANG, Y.; TANG, Y. **Journal of Catalysis** 2012, 291, 87.

STRAUSS, U.; FELFER, U.; FABER, K. **Biocatalytic transformation of racemates into chiral building blocks in 100% chemical yield and 100% enantiomeric excess**. *Tetrahedron: Asymmetry*. v. 10, n. 1, p. 107–117, 1999.

VERKADE, J. M. M.; VAN HEMERT, L. J. C.; QUAEDFLIEG, P. J. L. M.; Rutjes, F. P. J. T. *Chemical Society Reviews* 2008, 37, 29.

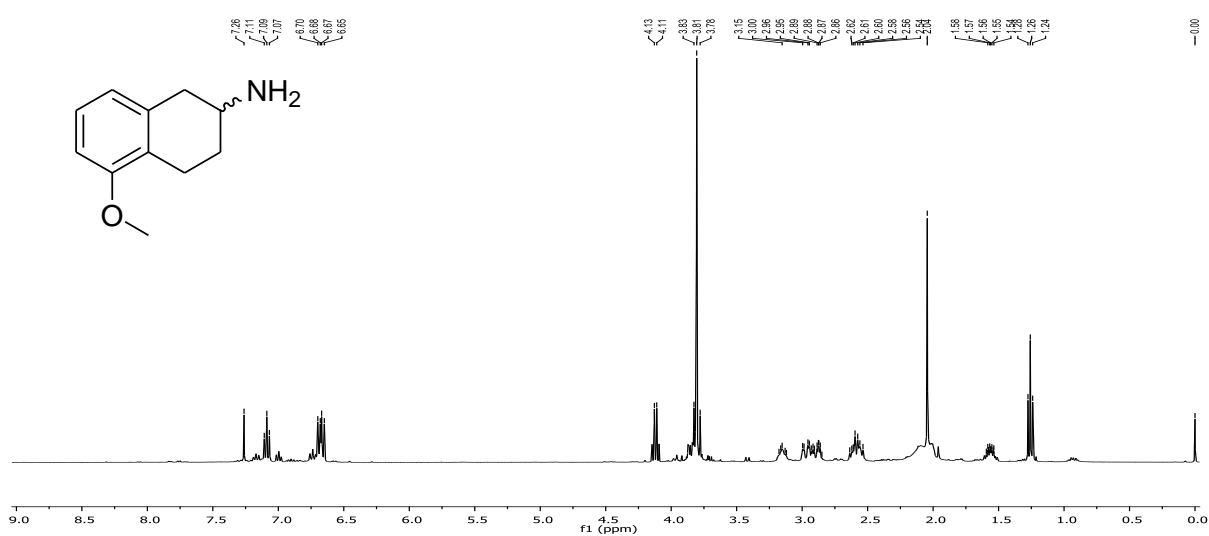
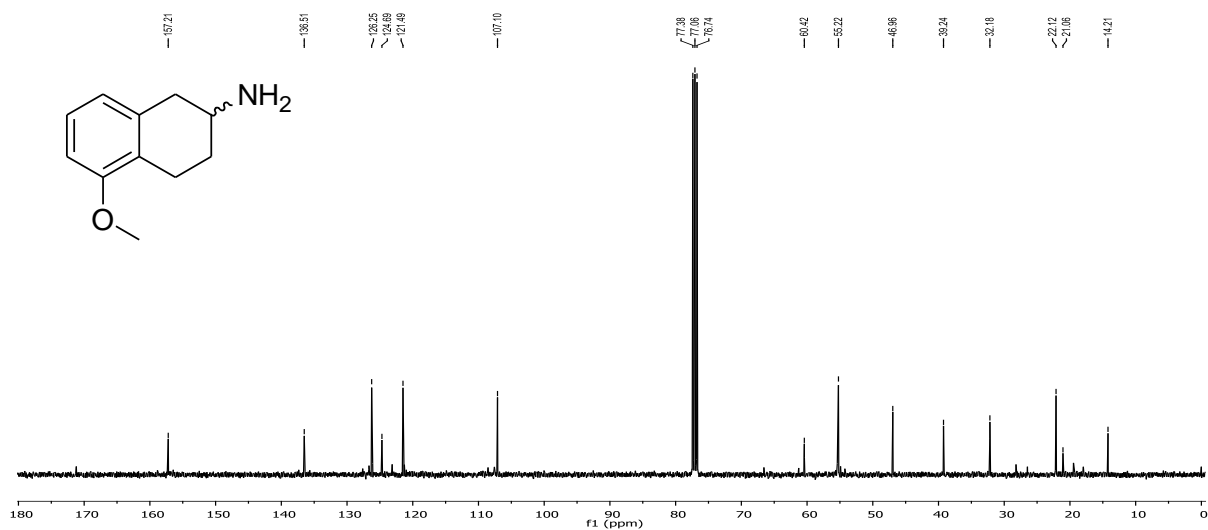
VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W.; **Fundamentos de Bioquímica**, Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000, cap. 4

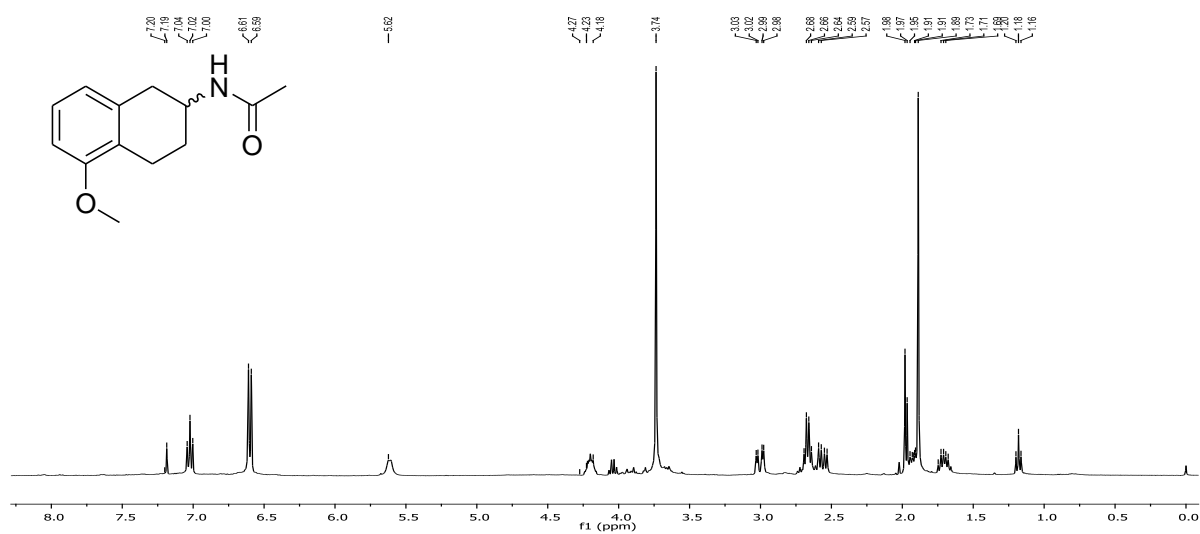
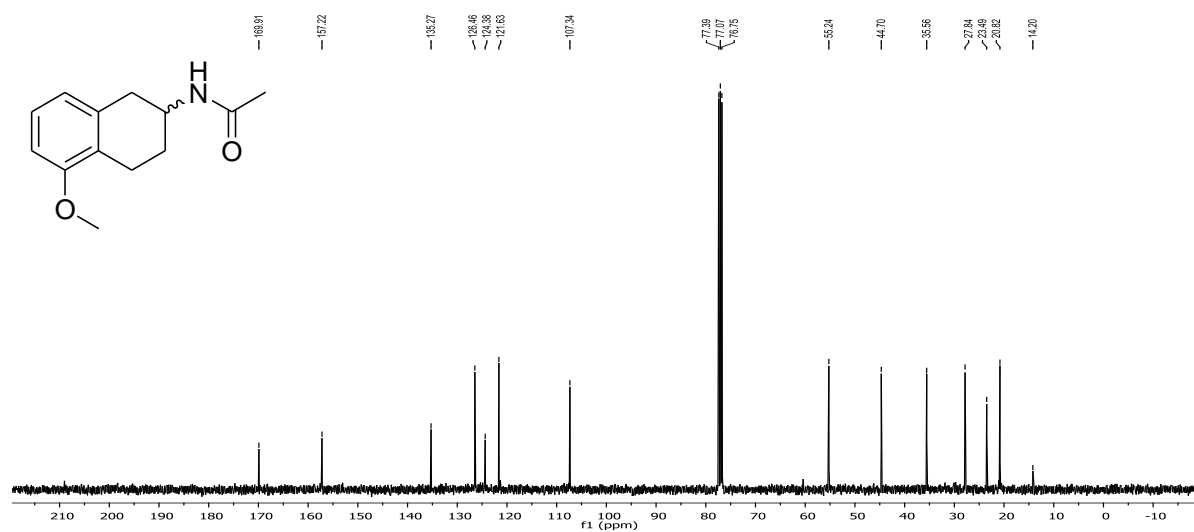
VONGVILAI, P.; LINDER, M.; SAKULSOMBAT, M.; HUMBLE, M. S.; BERGLUND, P.; BRINCK, T.; RAMSTROM, O. **Angewandte Chemie-International Edition** 2011, 50, 6592.

WEBER, K, H; ZUEGG, J; FABER, K; PLEISS, J. **Molecular reasons for lipase-sensitivity against acetaldehyde. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 3 (1997) 13 I- 138

WEBSTER, R; BOYER, A; FLEMING, M, B; LAUTENS, M. **Practical Asymmetric Synthesis of Bioactive Aminotetralis from a Racemic Precursor Using Regiodivergent Resolution.** Organic Letters, 2010, Vol.12, No. 23, P. 5418-5421

9 ANEXOS

7.1 ESPECTROS DE RMN ^1H E ^{13}C a) Espectro de RMN ^1H E ^{13}C da (*R,S*)-amina 2Figura A1: Espectro de RMN ^1H da (*R,S*)-amina 2Figura A2: Espectro de RMN ^{13}C da (*R,S*)-amina 2

b) Espectro de RMN ^1H E ^{13}C da (*R,S*)-amida 2Figura A3: Espectro de RMN ^1H da (*R,S*)-amida 2Figura A4: Espectro de RMN ^{13}C da (*R,S*)-amida 2

7.2 CROMATOGRAMAS

a) Cromatograma da (R,S)-feniletilamina derivatizada

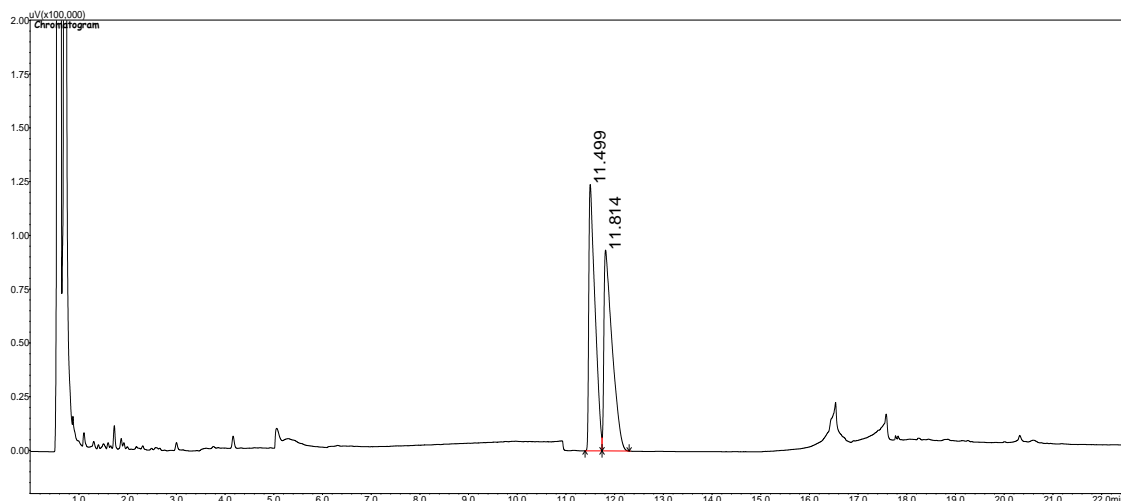


Figura A5: Cromatograma obtido por CG-DIC da (R,S)-feniletilamina (derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna cp-chirasil-dex cb).

b) Cromatograma da (R,S)-feniletilacetamida

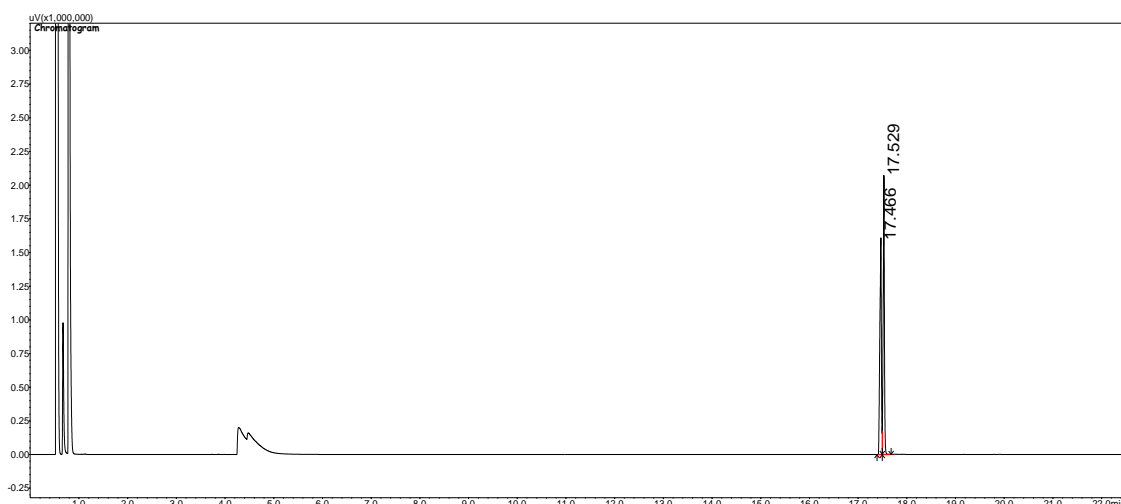


Figura A6: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de derivatização da (R,S)-feniletilamina (1eq) com 5uL de anidrido acético e 5uL da trietilamina. (60°C, 1h) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

c) Cromatograma da (R)-feniletilamina

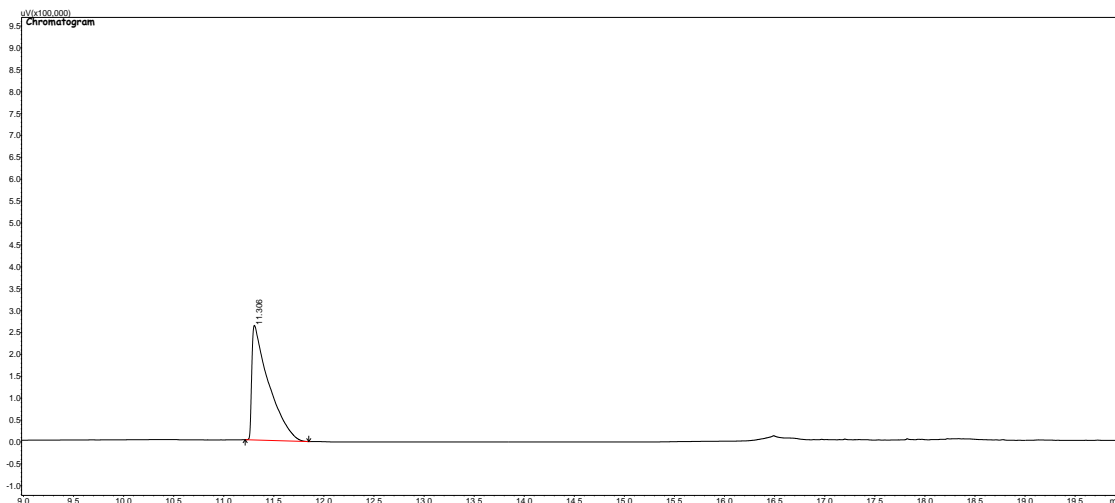


Figura A7: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de derivatização da (R)-feniletilamina (1eq) com 5 μL de anidrido acético e 5 μL da trietilamina. (60°C, 1h) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

d) Cromatograma da (S)-feniletilamina

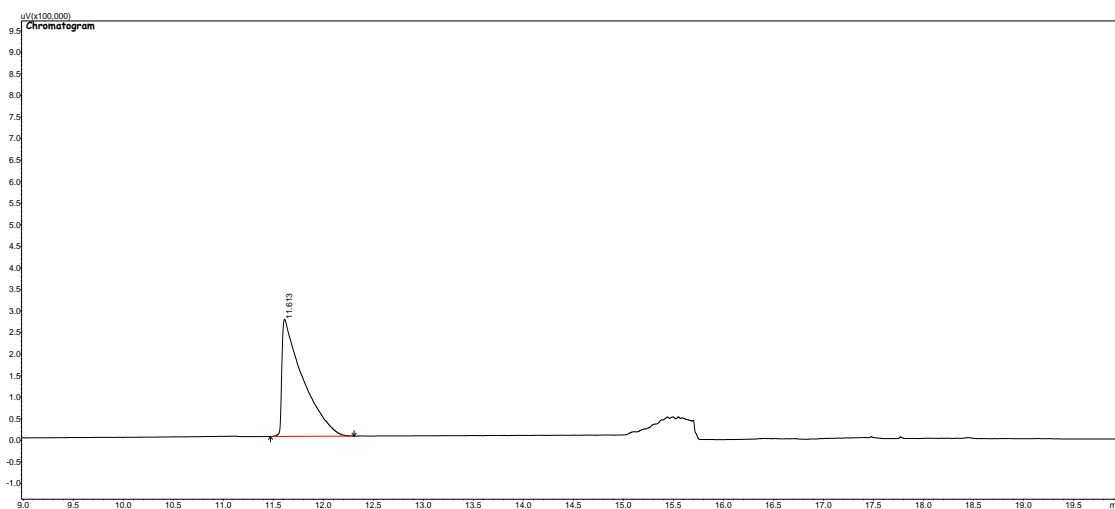


Figura A8: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de derivatização da (S)-feniletilamina (1eq) com 5 μL de anidrido acético e 5 μL da trietilamina. (60°C, 1h) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

e) Cromatogramas da Resolução cinética da (R,S)-feniletilamina usando acetato de vinila como doador de acila (2eq e 10eq)

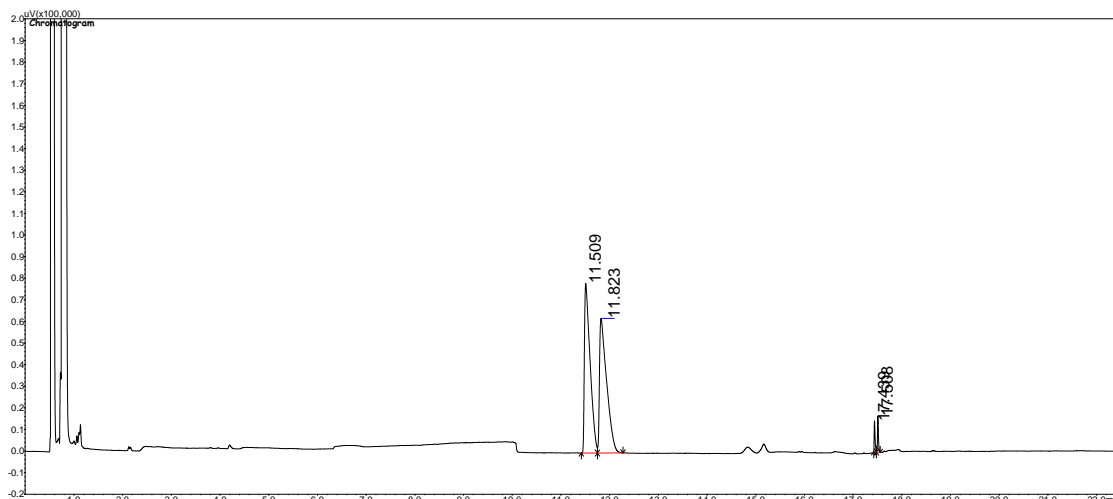


Figura A9: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de vinila (2eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 0h, derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

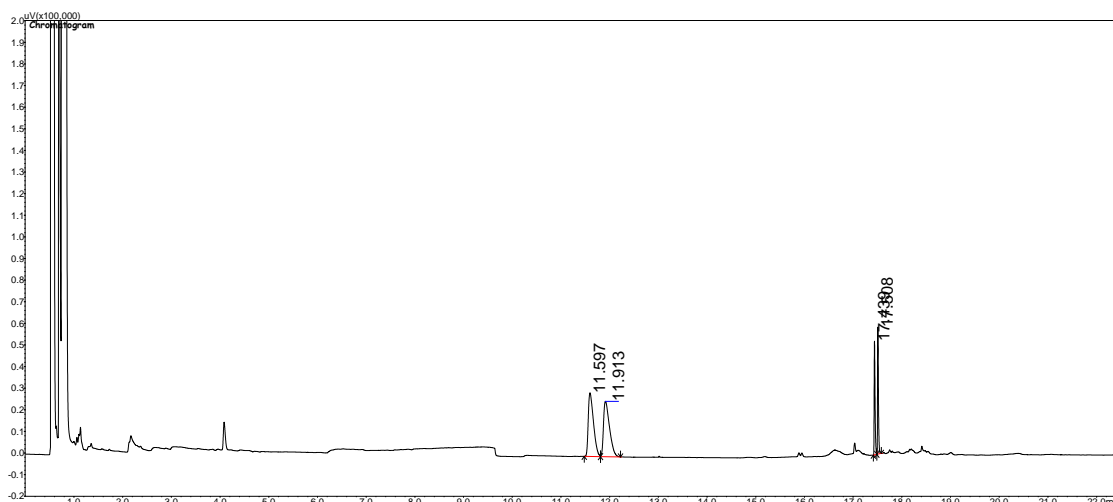


Figura A10: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de vinila (2eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 3h, derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

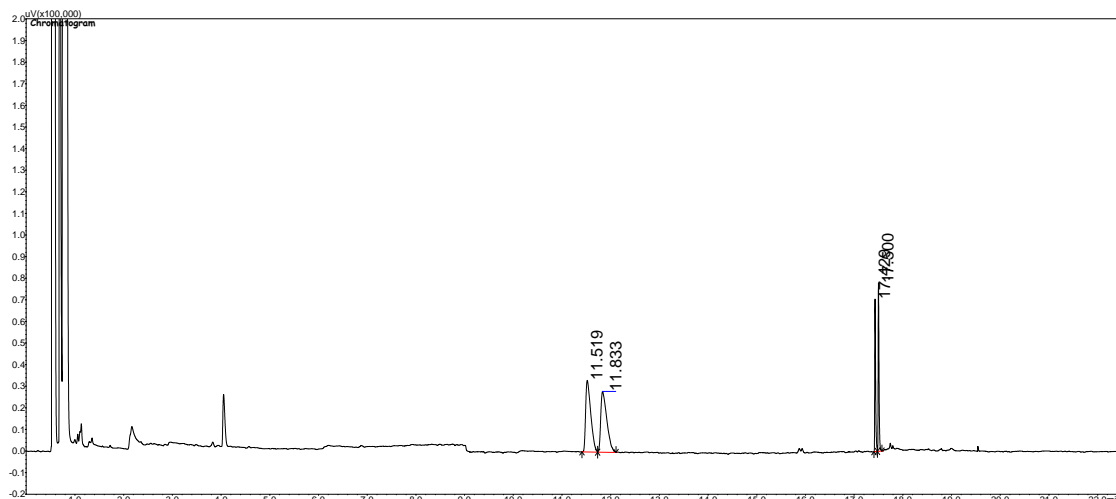


Figura A11: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de vinila (2eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 22h, derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

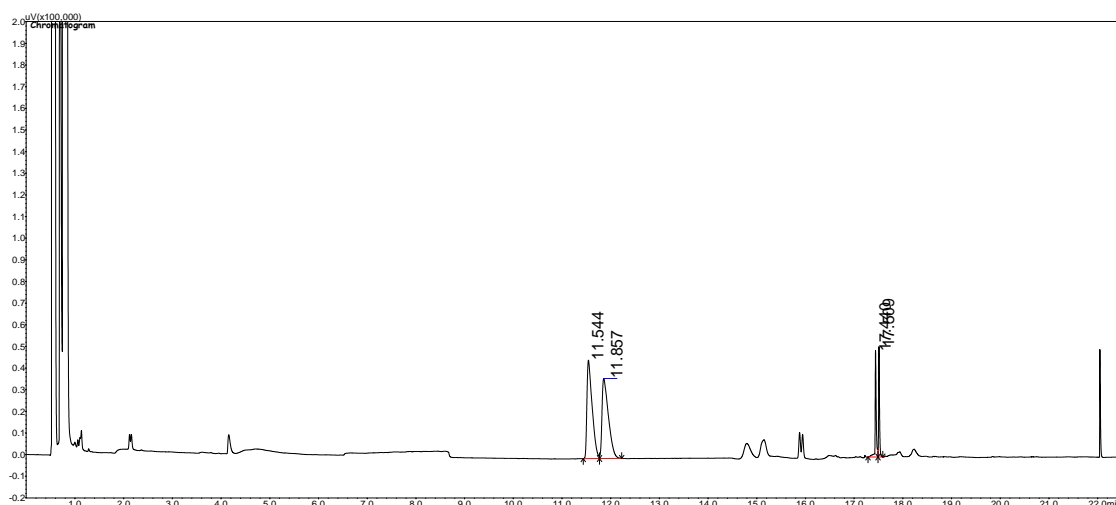


Figura A12: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de vinila (10eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 0h, derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

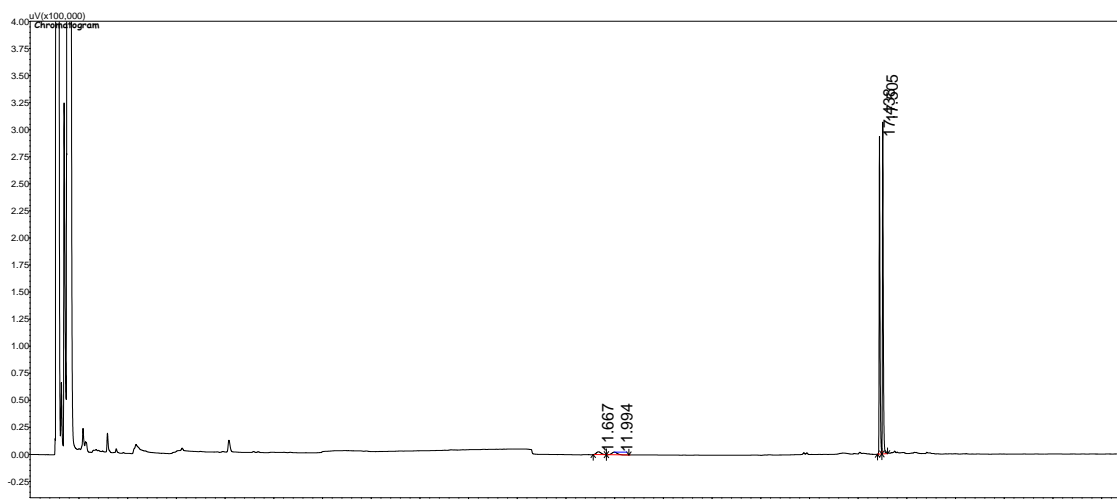


Figura A13: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de vinila (10eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 3h, derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

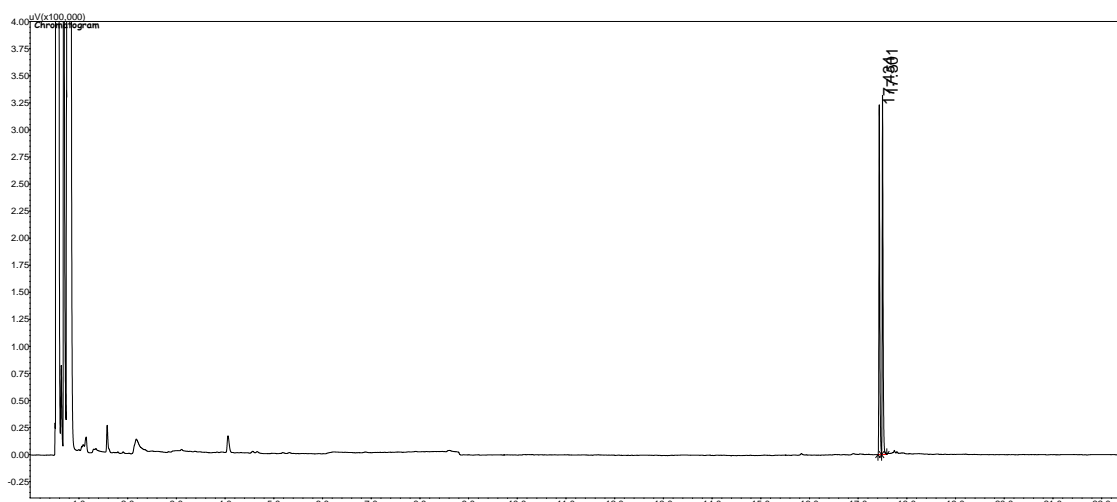


Figura A14: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de vinila (10eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 22h, derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

- f) Cromatogramas da Resolução cinética da (R,S)-feniletilamina usando acetato de isopropenila como doador de acila (2 eq e 10 eq)

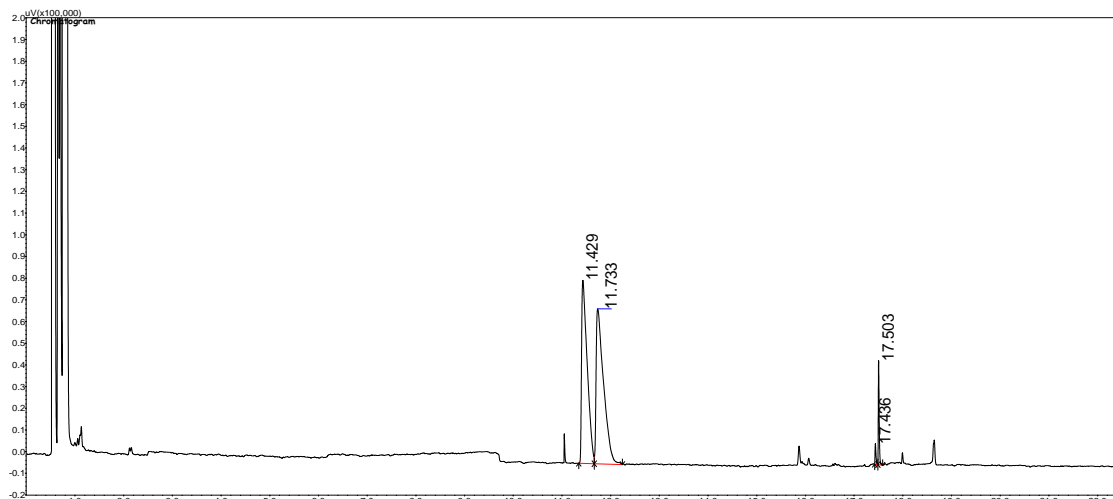


Figura A15: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de isopropenila (2eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 0h, derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

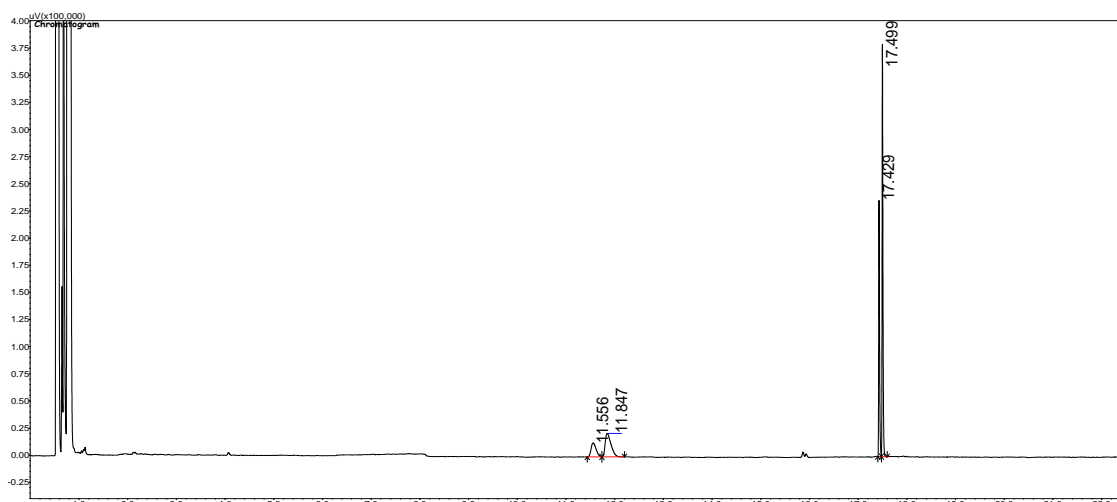


Figura A16: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de isopropenila (2eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 3h, derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

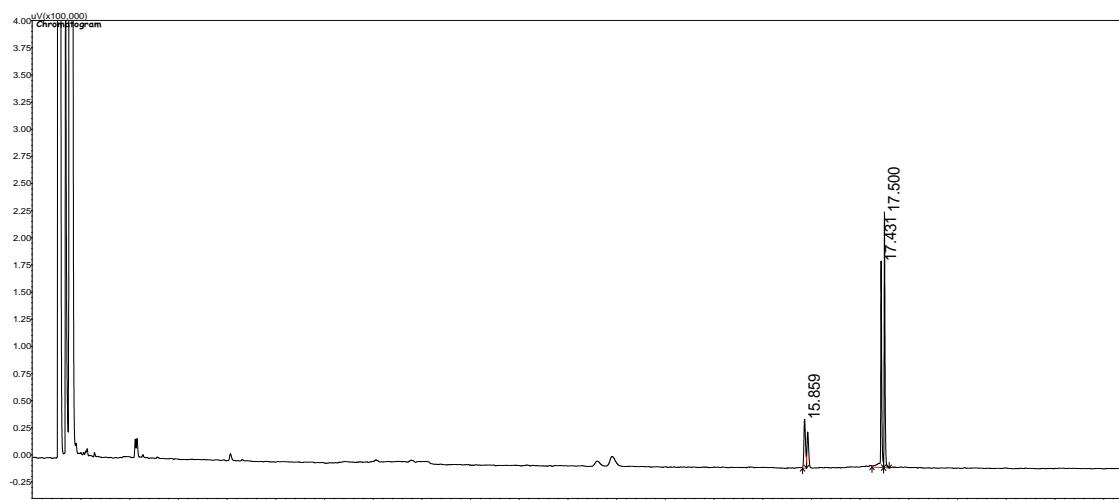


Figura A17: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de isopropenila (2eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 23h, derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

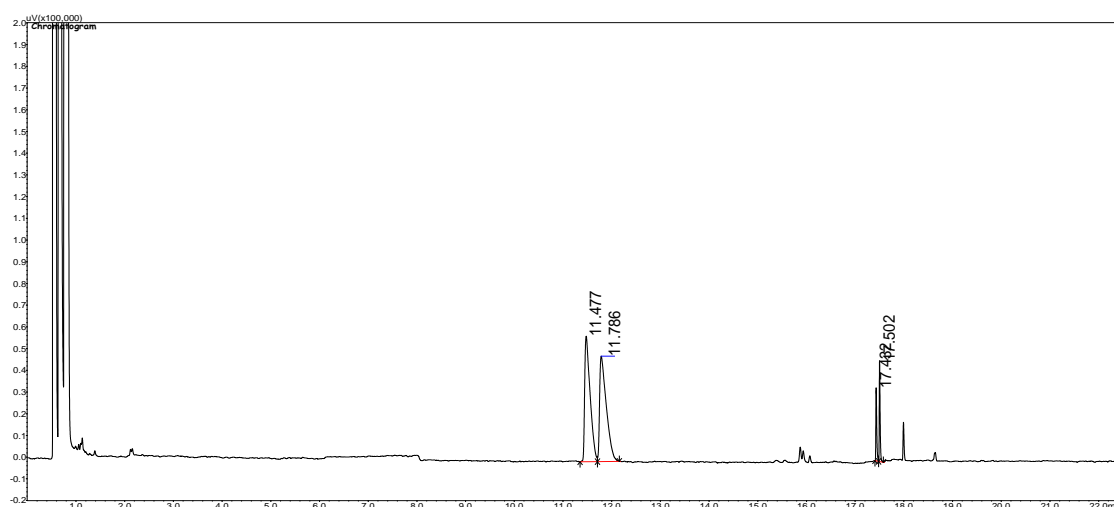


Figura A18: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de isopropenila (10eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 0h, derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

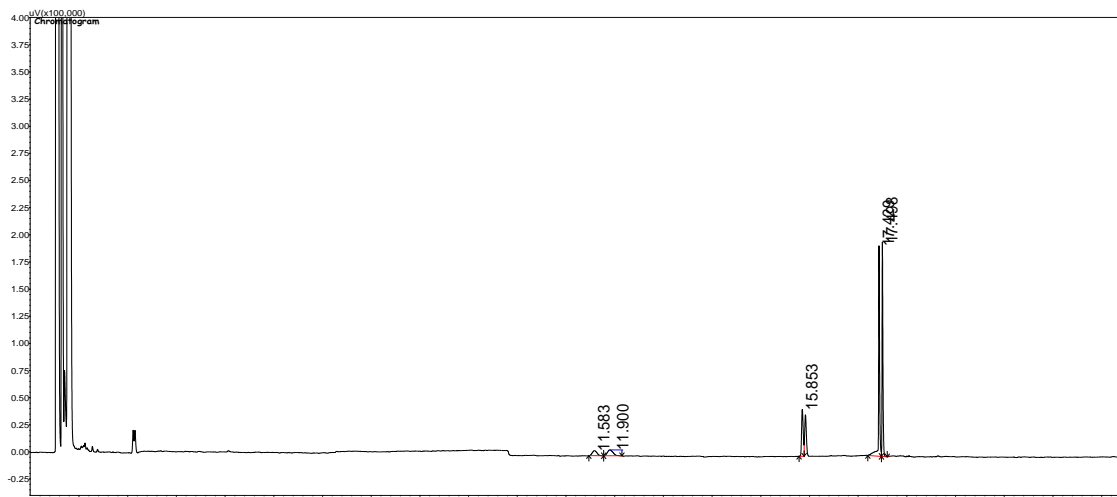


Figura A19: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de isopropenila (10eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 3h, derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

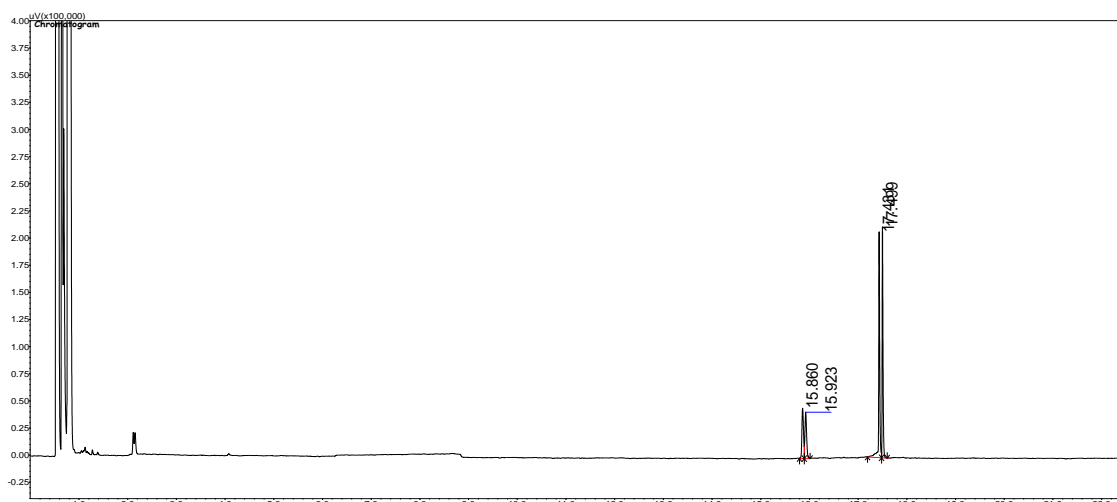


Figura A20: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de isopropenila (10eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 23h, derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

- g) Cromatogramas da Resolução cinética da (R,S)-feniletilamina usando acetato de etila como doador de acila (2eq e 10eq)

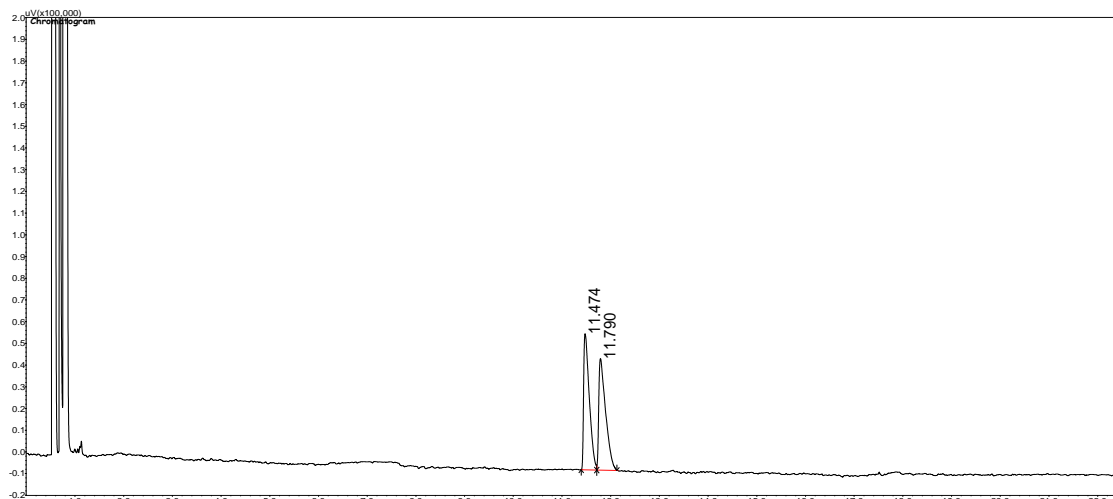


Figura A21: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de etila (2eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 0h, derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

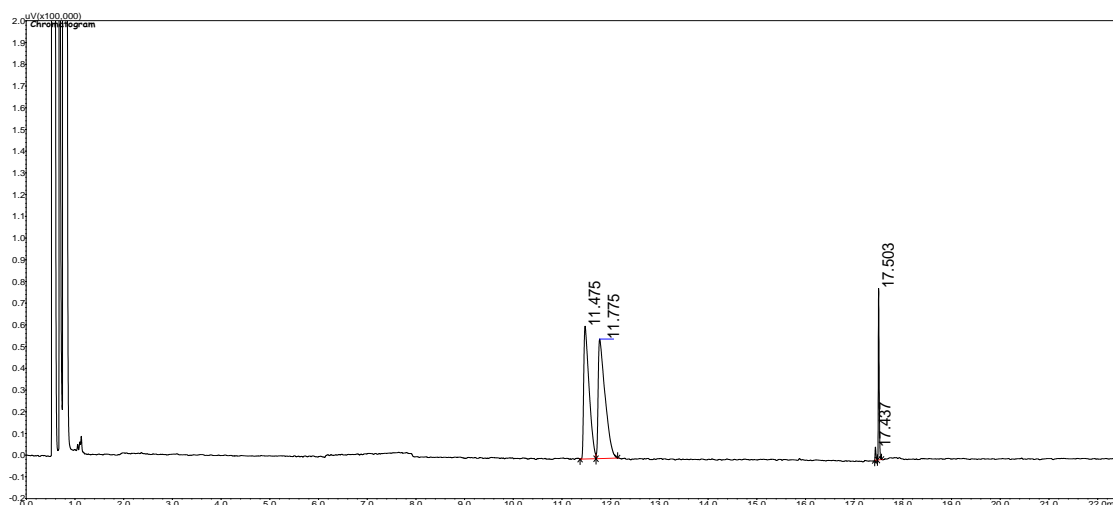


Figura A22: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de etila (2eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 2h, derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

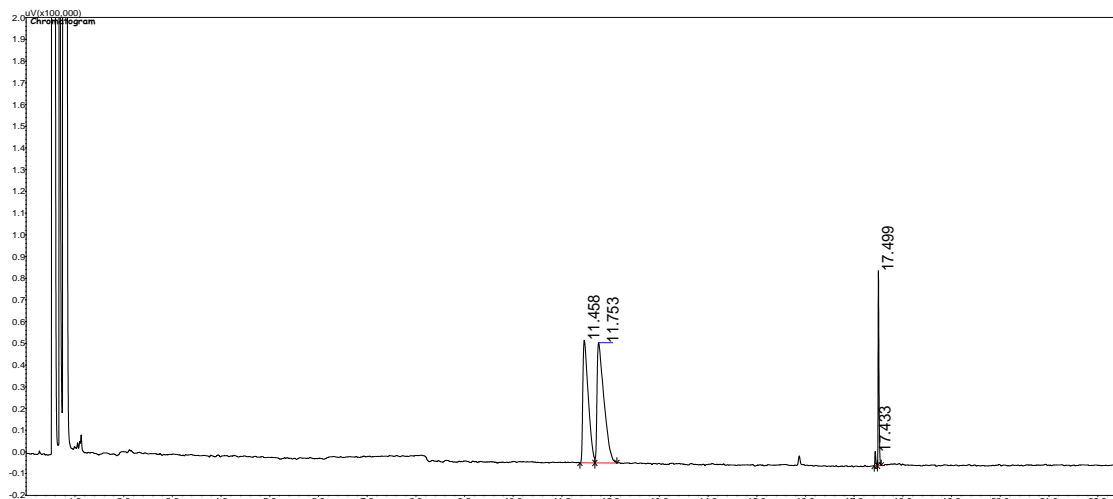


Figura A23: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de etila (2eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 4h, derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

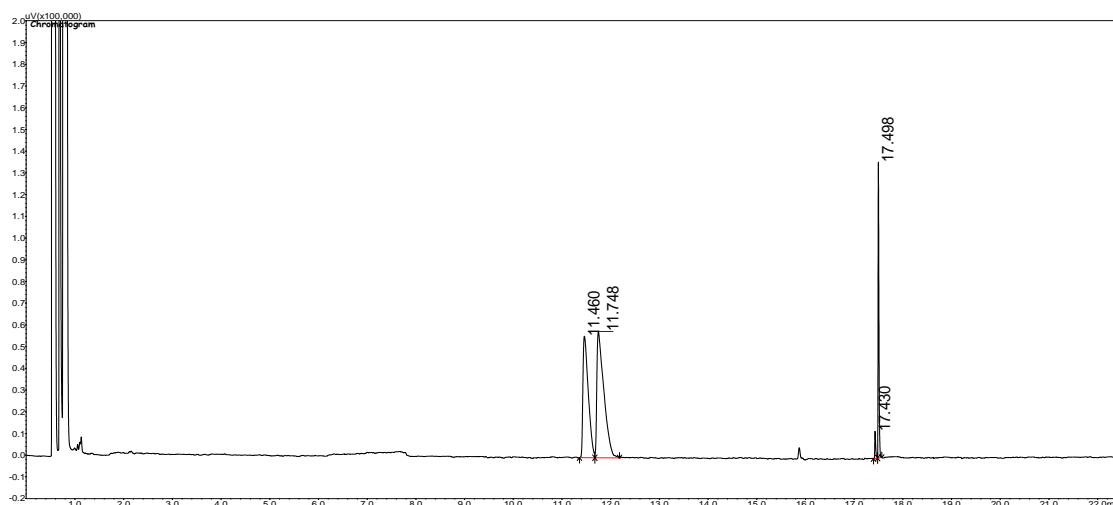


Figura A24: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de etila (2eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 6h, derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

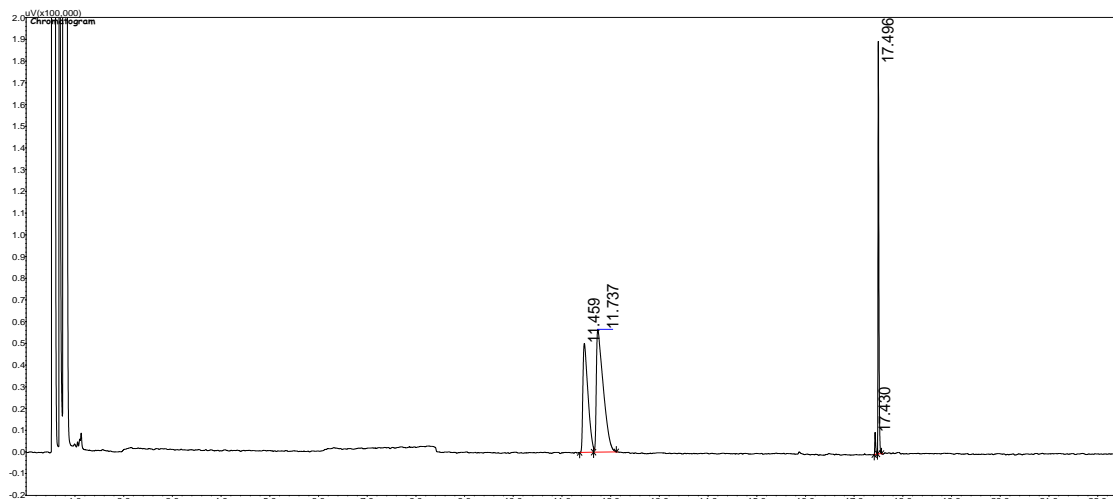


Figura A25: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de etila (2eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 9h, derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

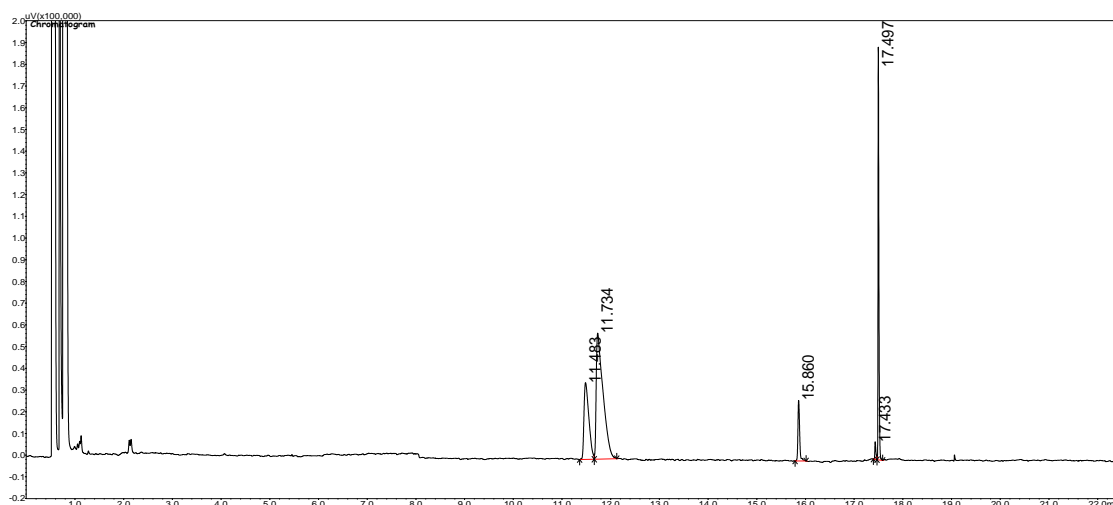


Figura A26: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de etila (2eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 24h, derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

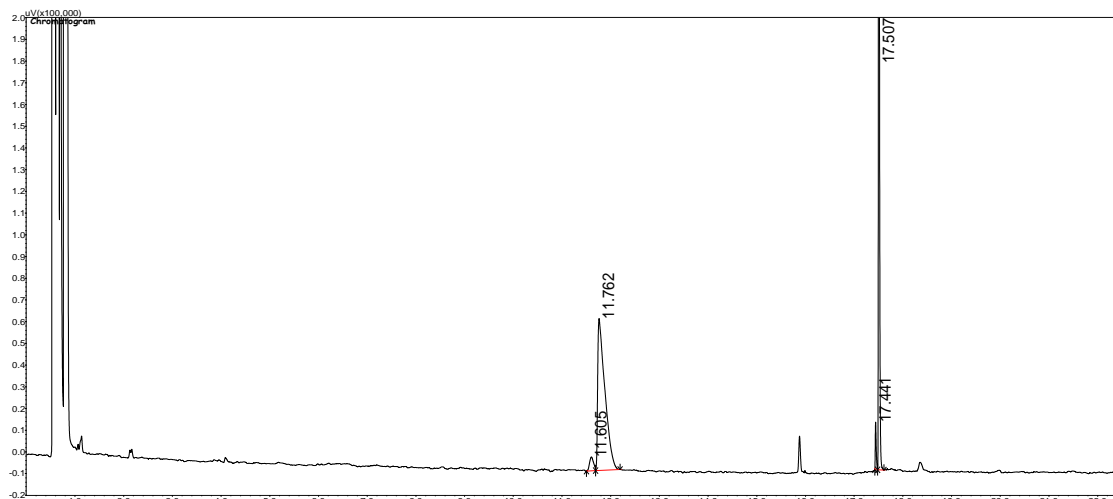


Figura A27: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de etila (2eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 3 dias, derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

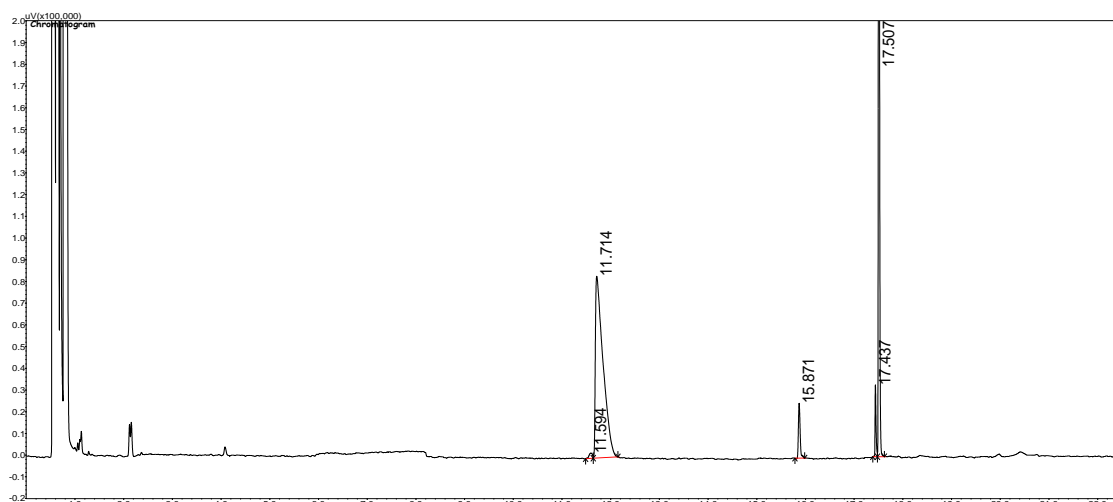


Figura A28: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de etila (2eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 4 dias, derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

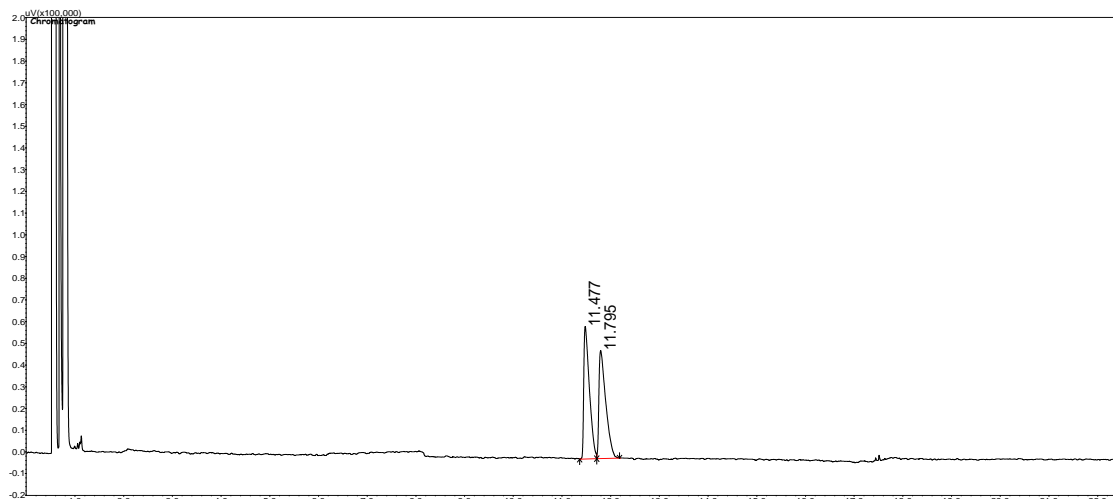


Figura A29: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de etila (10eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 0h, derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

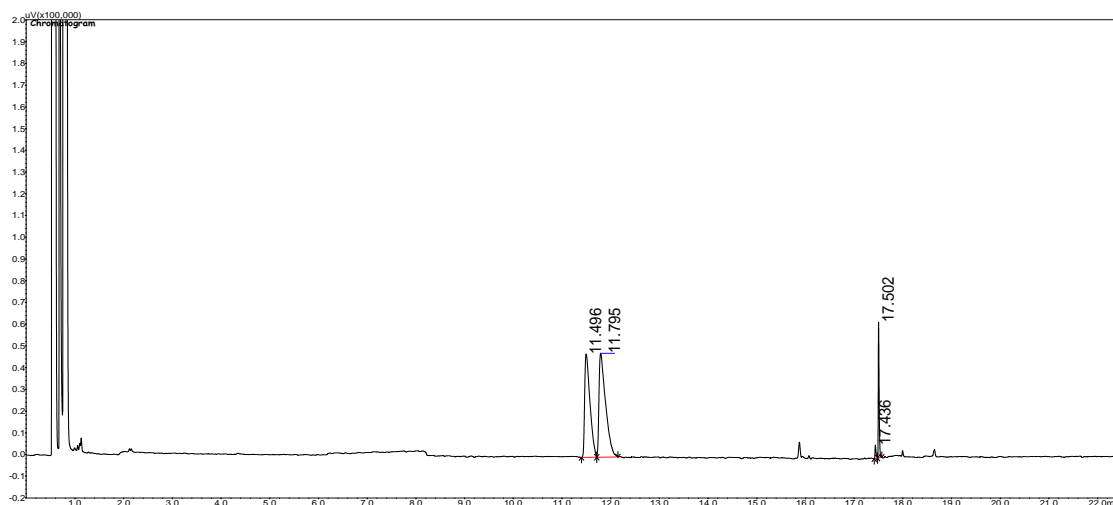


Figura A30: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de etila (10eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 2h, derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

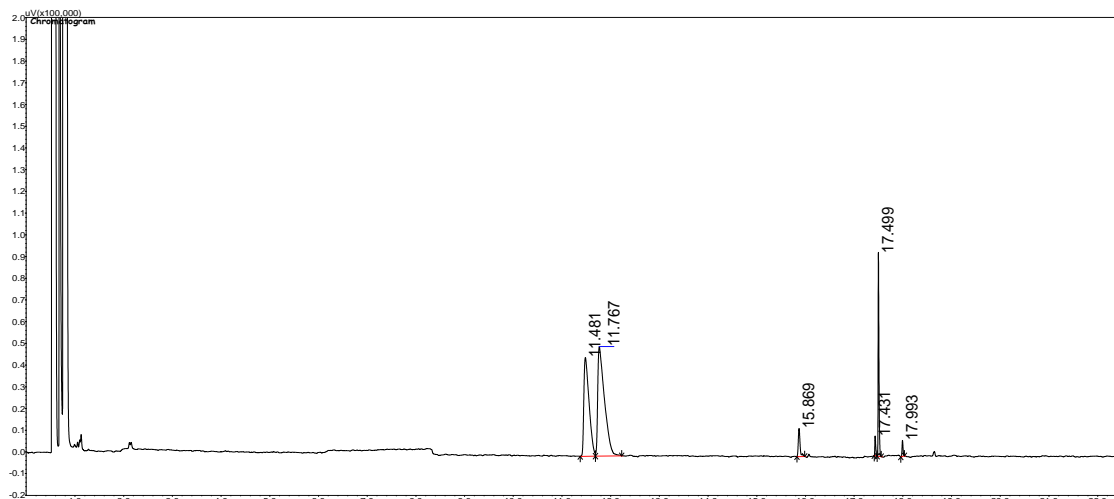


Figura A31: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de etila (10eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 4h, derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

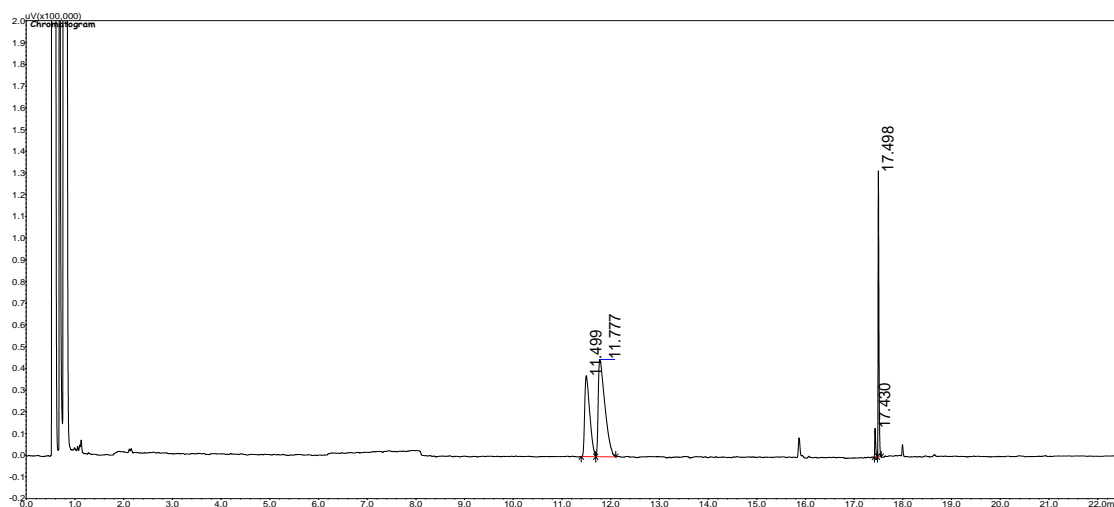


Figura A32: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de etila (10eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 6h, derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

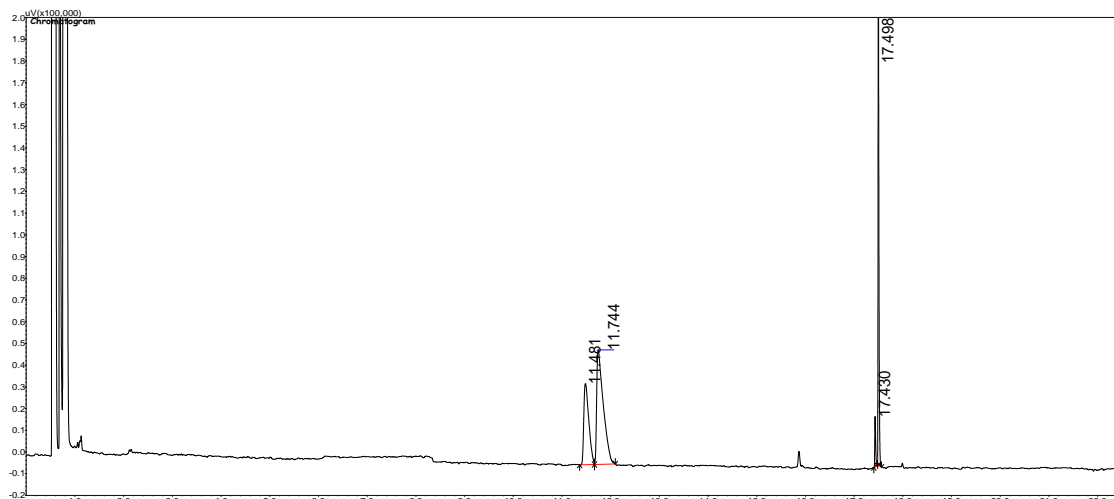


Figura A33: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de etila (10eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 9h, derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

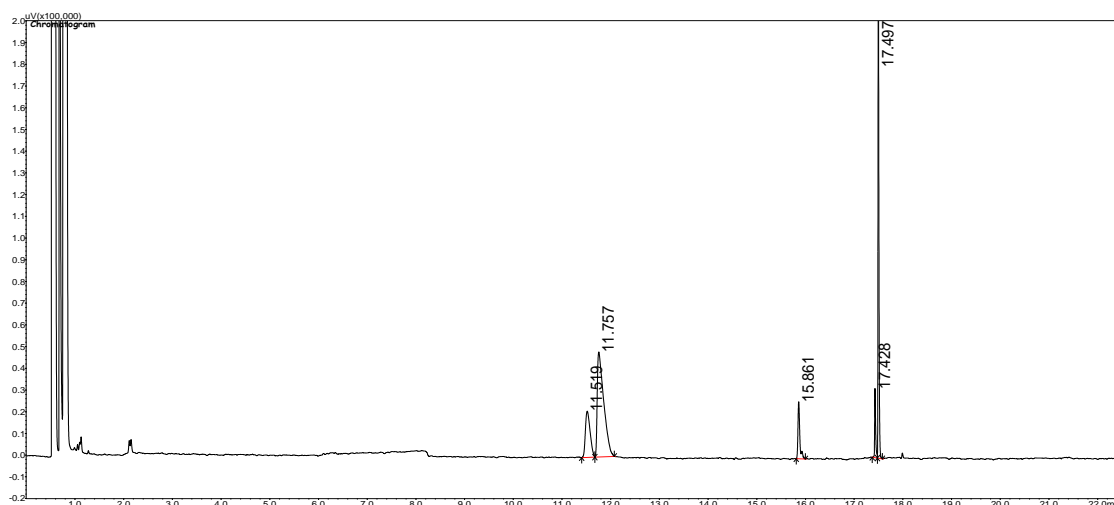


Figura A34: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de etila (10eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 24h, derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

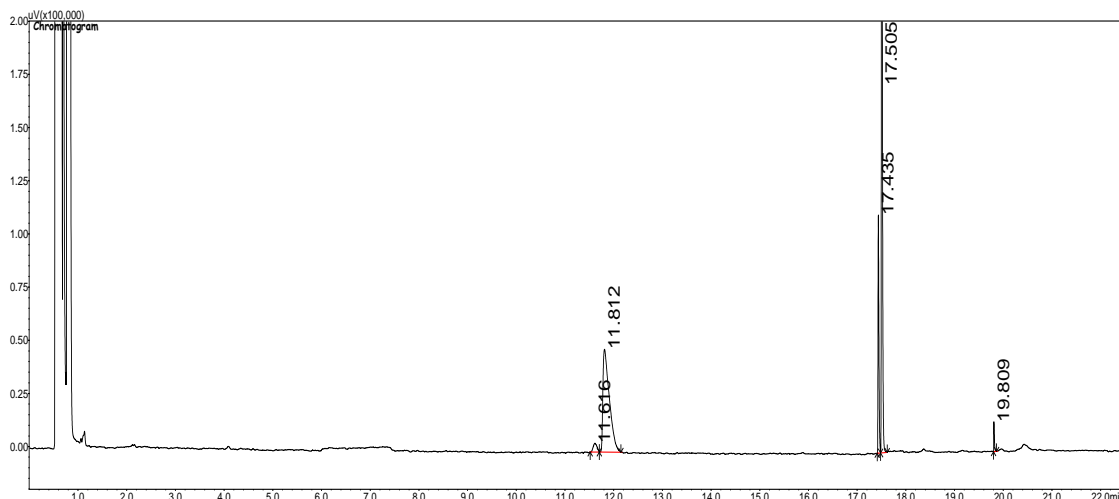


Figura A35: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de etila (10eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 3 dias, derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

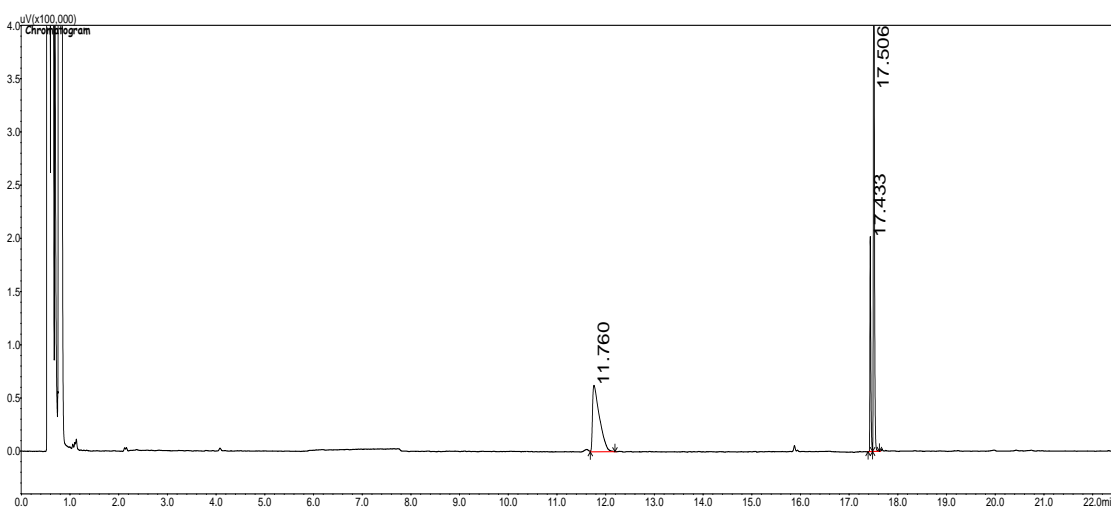


Figura A36: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de etila (10eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 4 dias, derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

h) Cromatogramas da Resolução cinética da (R,S)-feniletilamina usando 2eq de acetato de etila como doador de acila em fluxo contínuo

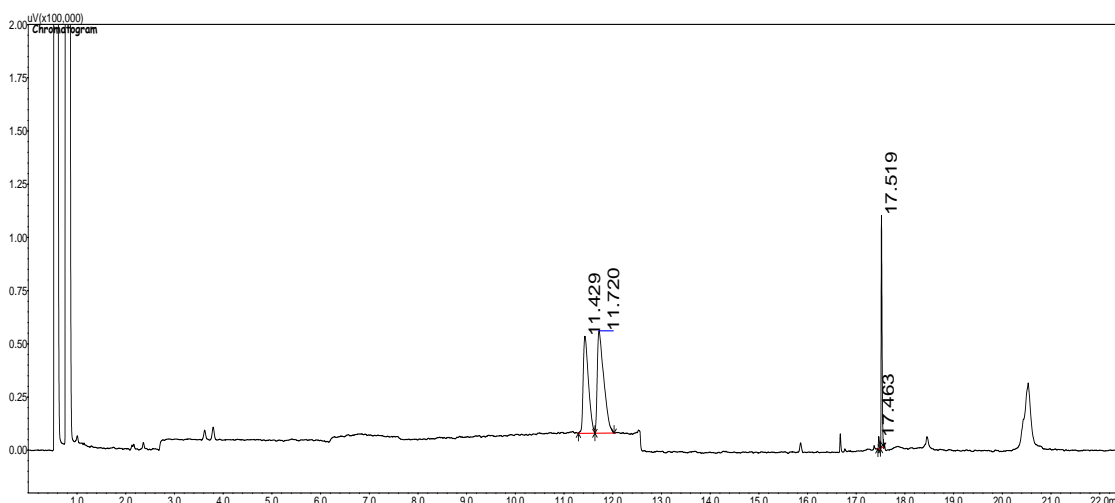


Figura A37: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética em fluxo contínuo da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de etila (2eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, tempo zero) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

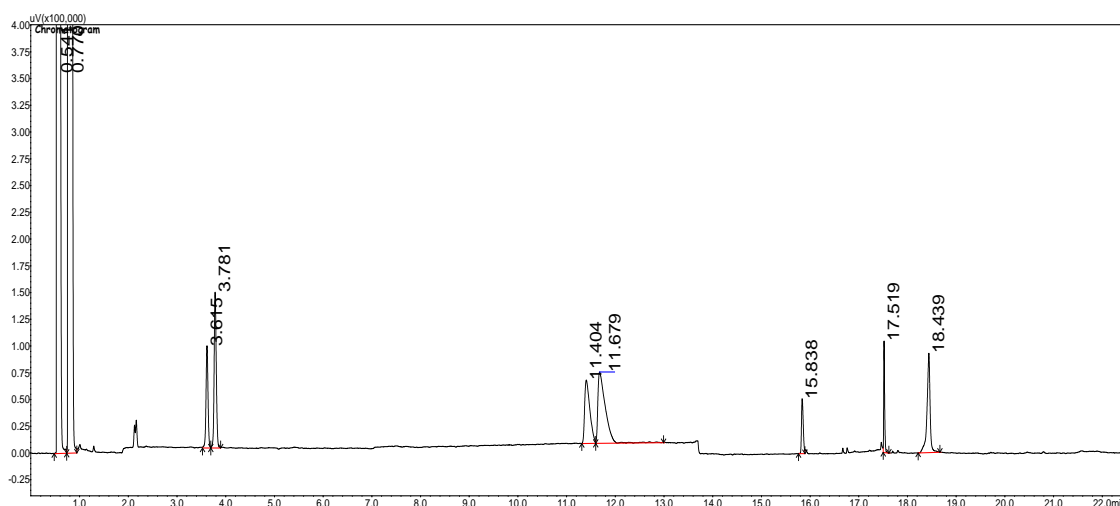


Figura A38: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética em fluxo contínuo da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de etila (2eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 120 uL.min⁻¹, tempo de residência de 10 min) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

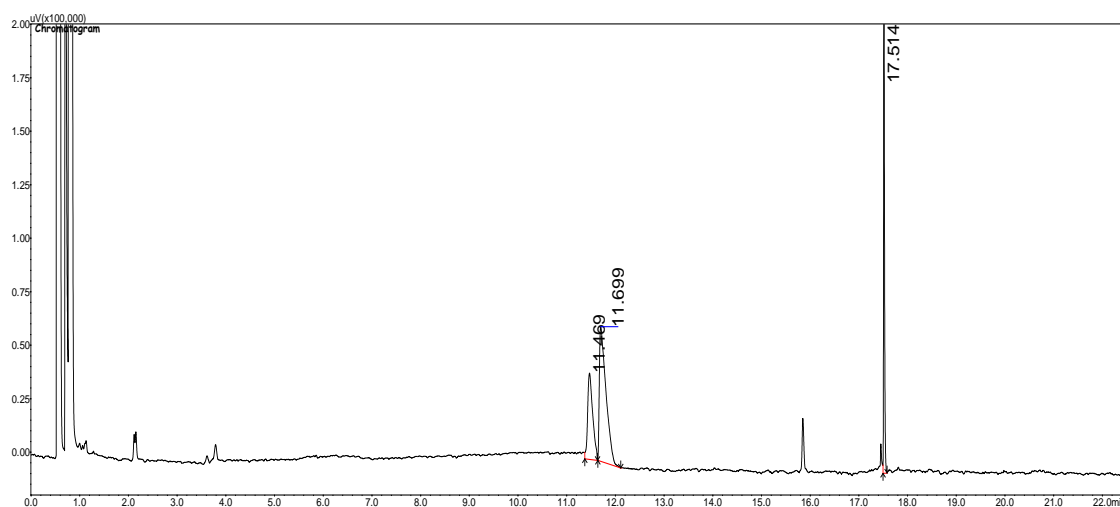


Figura A39: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética em fluxo contínuo da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de etila (2eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 60 uL.min⁻¹, tempo de residência de 20 min) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

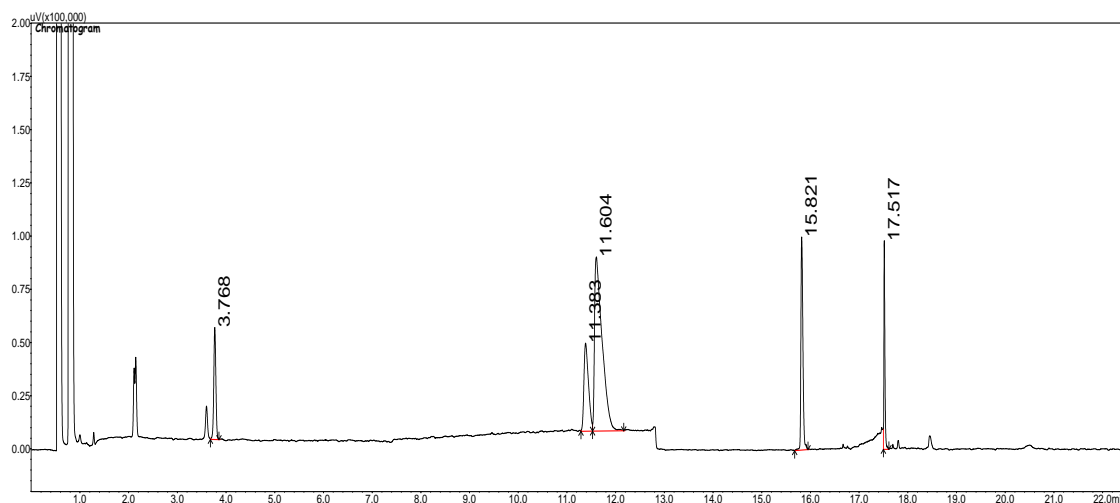


Figura A40: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética em fluxo contínuo da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de etila (2eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 40 uL.min⁻¹, tempo de residência de 30 min) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

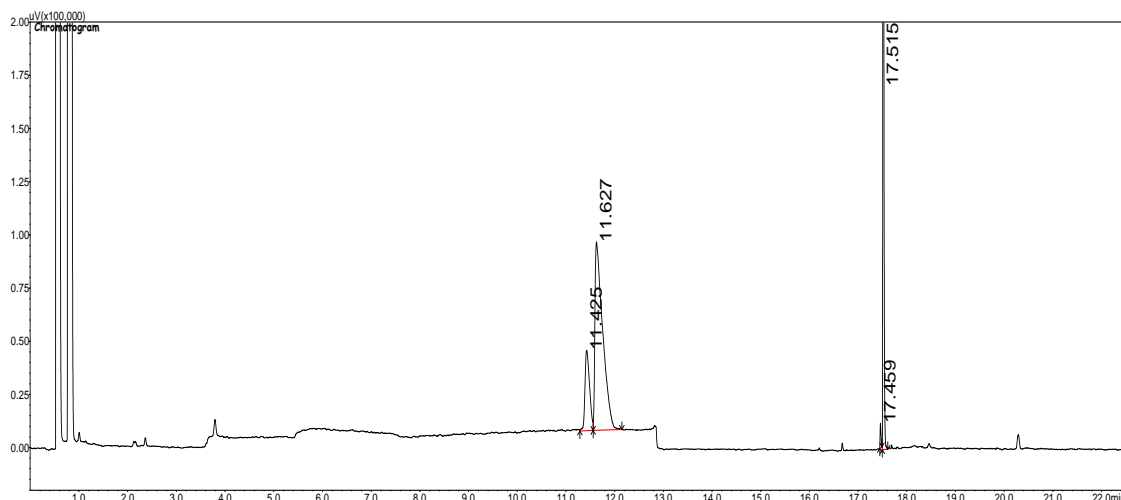


Figura A41: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética em fluxo contínuo da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de etila (2eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 30 uL.min⁻¹, tempo de residência de 40 min) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

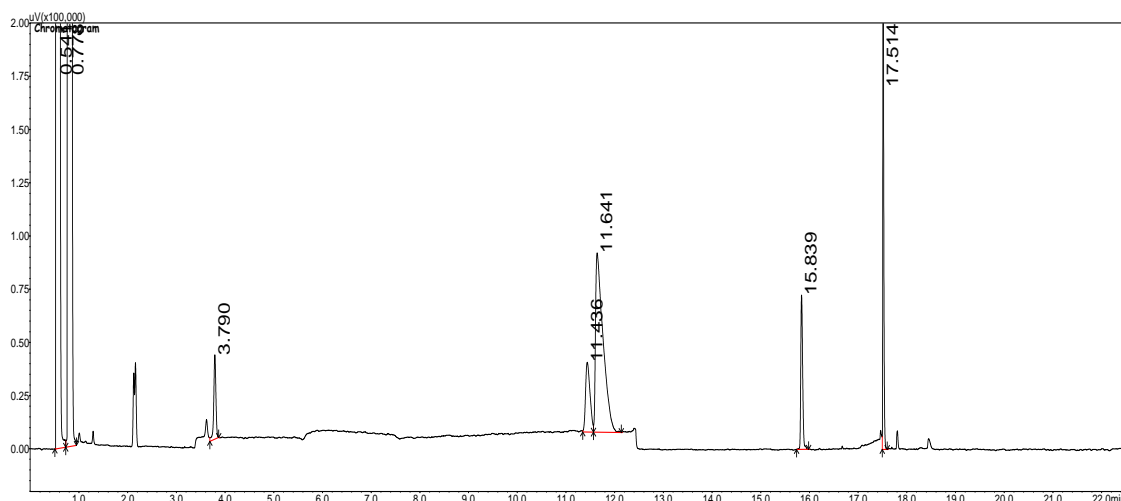


Figura A42: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética em fluxo contínuo da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de etila (2eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 24 uL.min⁻¹, tempo de residência de 50 min) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

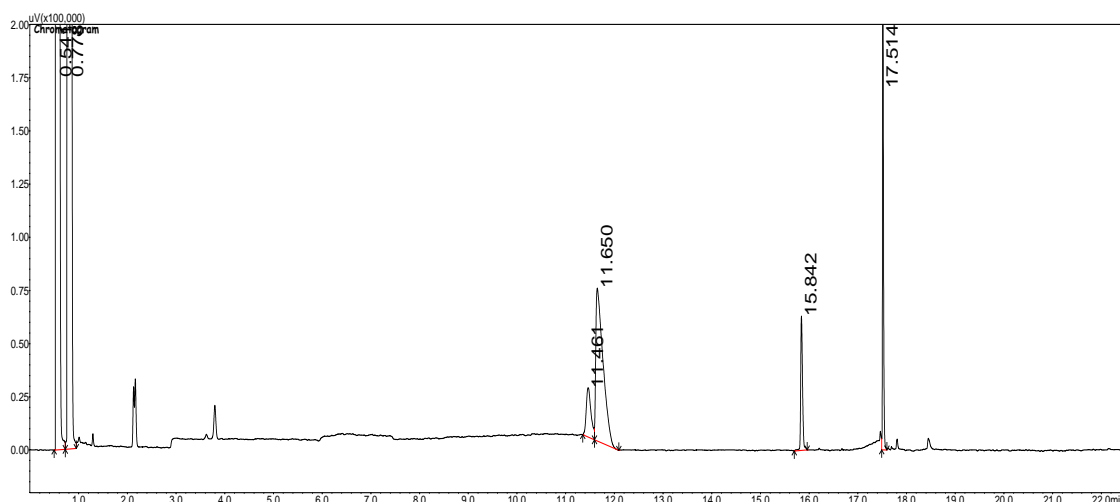


Figura A43: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética em fluxo contínuo da (R,S)-feniletilamina (1eq) com acetato de etila (2eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 20 uL.min⁻¹, tempo de residência de 60 min) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

i) Cromatograma da cetona

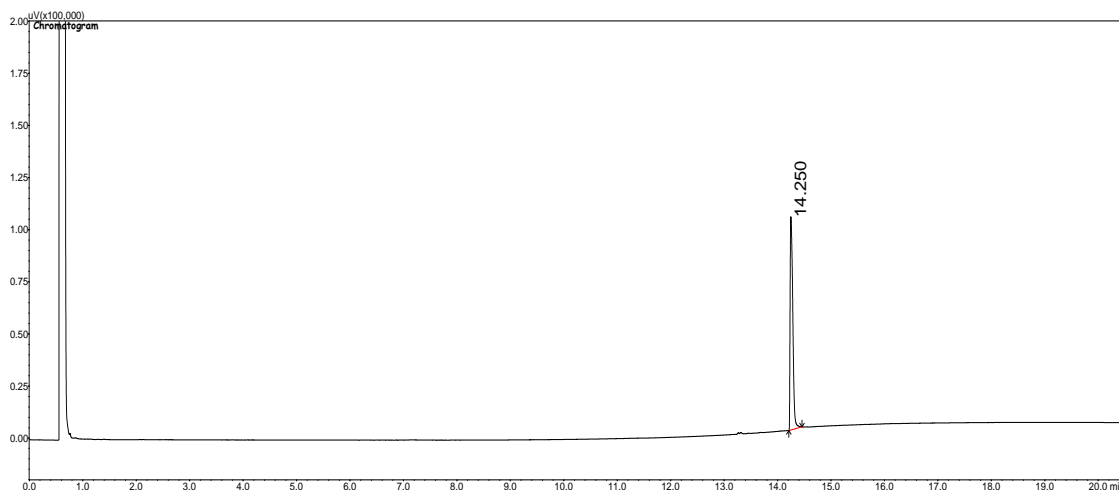


Figura A44: Cromatograma GC-DIC da 5-Metil-3,4-dihidro-1H-naftalen-2-ona (Cetona).

j) Cromatograma da (R,S)-amina 2

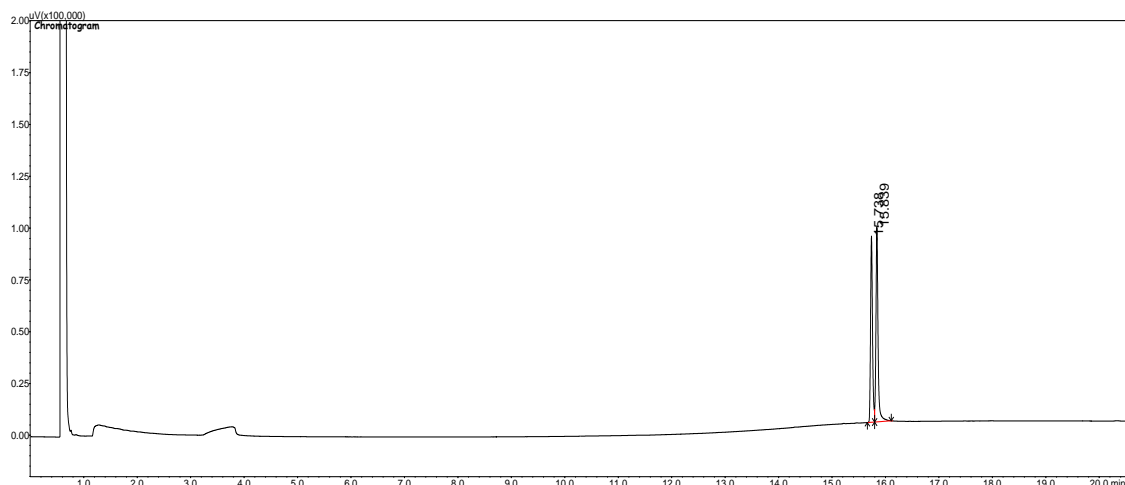


Figura 45: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de aminação redutiva da cetona (1eq) com isopropóxido de titânio (2eq), solução de amônia em metanol 7N (5eq) em atmosfera de argônio. (t.a, 9h, derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

k) Cromatograma da (R,S)-amida 2

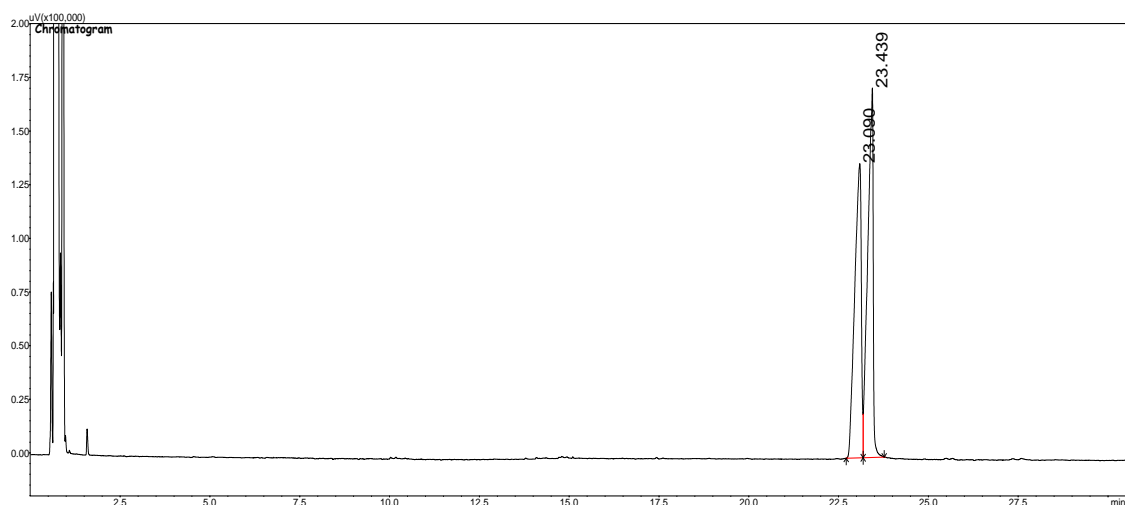


Figura 46: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de acetilação da (R,S)-amina 2 (1eq) com anidrido acético (6,35eq), acetato de sódio (5,5eq), acetato de etila (109eq) e água (198eq). (t.a, 3h, derivatização com anidrido trifluoracético) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

- I) Cromatograma da Resolução cinética da (R,S)-amina 2 usando 2eq de acetato de etila como doador de acila em fluxo contínuo

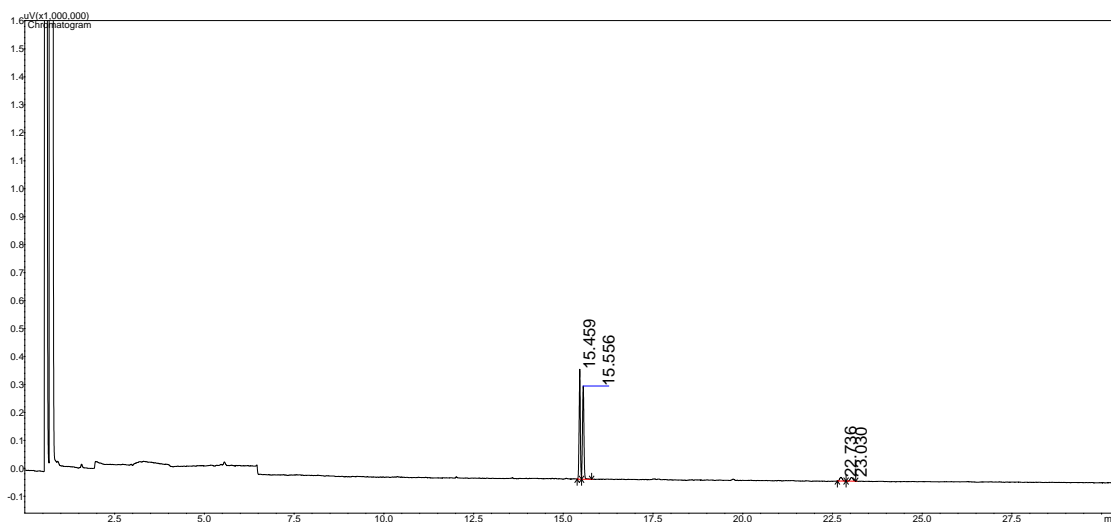


Figura A47: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética em fluxo contínuo da (R,S)-amina 2 (1eq) com acetato de etila (2eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 30 uL.min⁻¹, tempo de residência de 40 min) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

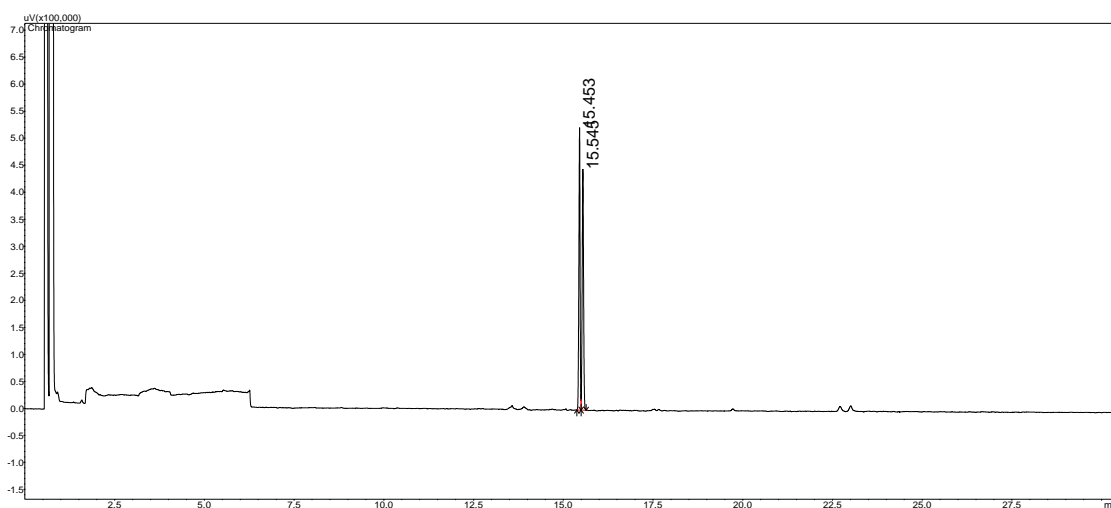


Figura A48: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética em fluxo contínuo da (R,S)-amina 2 (1eq) com acetato de etila (2eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 20 uL.min⁻¹, tempo de residência de 60 min) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).

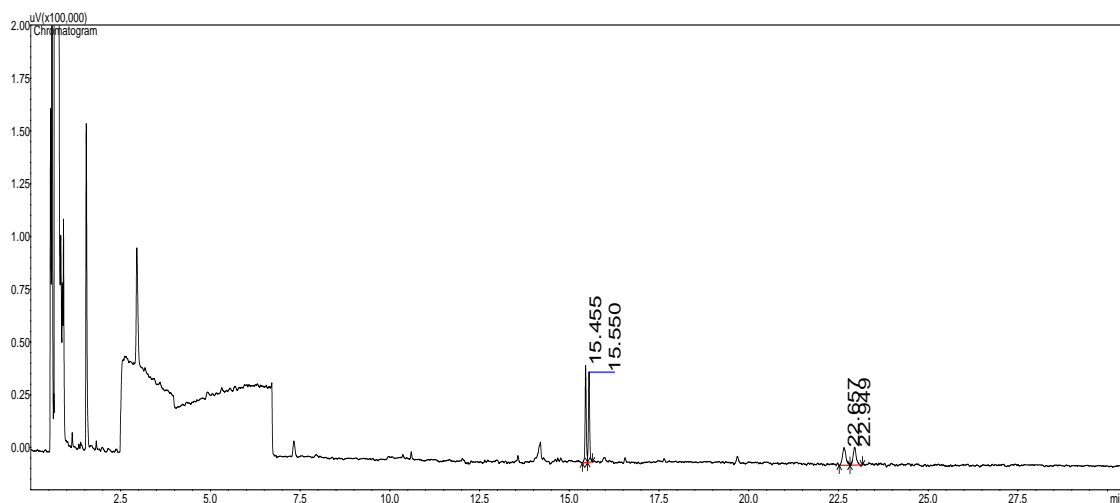


Figura A49: Cromatograma obtido por CG-DIC, da reação de resolução cinética em fluxo contínuo da (R,S)-amina 2 (1eq) com acetato de etila (2eq), CAL-B imobilizada (60mg) em tolueno. (60°C, 10 uL.min⁻¹, tempo de residência de 120 min) (coluna CP-Chirasil_Dex CB).