



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**BIO-RESOLUÇÃO DE ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN
MEDIADA PELA ENZIMA LIPASE CALB: BIOATIVIDADE DE SEUS
ENANTIÔMEROS PUROS**

FRANCISCO JOSÉ SEIXAS XAVIER



***João Pessoa – PB - Brasil
Agosto /2013***



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**BIO-RESOLUÇÃO DE ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN
MEDIADA PELA ENZIMA LIPASE CALB: BIOATIVIDADE DE SEUS
ENANTIÔMEROS PUROS**

Francisco José Seixas Xavier*

**Dissertação apresentada ao
Centro de Ciências Exatas e da
Natureza da Universidade
Federal da Paraíba como
requisito para obtenção do
título de Mestre em Química,
área de concentração em
Química Orgânica.**

**Orientador: Juliana Alves Vale
Segundo Orientador: Mário L. A. A. Vasconcellos**

***Bolsista (REUNI E CAPES)**

**João Pessoa – PB - Brasil
Agosto /2013**

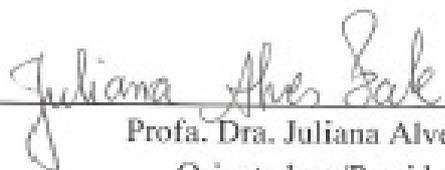
X3b Xavier, Francisco José Seixas.
Bio-resolução de adutos de Morita-Baylis-Hillman mediada pela enzima Lipase CALB: bioatividade de seus enantiômeros puros / Francisco José Seixas Xavier.- João Pessoa, 2013. 126f.
Orientadores: Juliana Alves Vale, Mário L. A. A. Vasconcellos
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCEN
1. Química orgânica. 2. Aduto Morita-Baylis-Hillman (AMBH). 3. Bio-resolução cinética. 4. Lipase CALB. 5. Atividade biológica.

UFPB/BC

CDU: 547(043)

“Bio-resolução de adutos de morita-baylis hillman mediada pela enzima lipase calb: bioatividade de seus enantiômeros puros”.

Dissertação de Mestrado de Francisco José Seixas Xavier aprovada pela banca examinadora em 21 de agosto de 2013:



Profa. Dra. Juliana Alves Vale
Orientadora/Presidente



Prof. Dr. Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos
2º. Orientador



Profa. Dra. Ivani Malvestiti
Examinadora



Prof. Dr. Rodrigo Cristiano
Examinador

Dedico este trabalho aos meus pais Xavier e Rosália pelo esforço, dedicação, amor e compreensão dados em todos os momentos; as minhas irmãs Roseane, Rogéria e Marcionila e ao meu irmão Aldo pelo incentivo; a minha esposa Vanessa por todo seu carinho e compreensão; e a todos àqueles que acreditam no início e no fim de tudo que se propõe a fazer.

AGRADECIMENTOS

A todos os que me ajudaram a concluir este trabalho, fica aqui os meus sinceros agradecimentos:

Do fundo do meu coração aos meus pais Xavier e Rosália pela confiança, força, dedicação, compreensão e amor incondicional que me foi dado durante toda a minha caminhada. Agradeço por eles terem me mostrado os verdadeiros valores da vida e o caminho certo a ser seguido, sem esse apoio tudo teria sido mais difícil.

A todos os meus irmãos pelos incentivos e apoio dado durante as minhas férias e momentos de lazer.

A minha esposa Vanessa, por todo seu incentivo nos momentos difíceis, apoio, amor e carinho acima de tudo.

A minha Orientadora Professora Juliana Vale e segundo Orientador Mário Vasconcellos, pela amizade, confiança e credibilidade depositados em minha pessoa. Agradeço a eles por todos os seus ensinamentos e disposições diante de todas as minhas limitações.

Aos meus parceiros de laboratório pelas conversas e pela amizade, que de muitas formas me incentivaram e ajudaram para que fosse possível a concretização deste trabalho: Sabino, Fábio, Sara, Suervy, Saulo, Wagner, Everton, Guttenberg, Tássia, Yasmim, Thiago, Marília Gabriela (Gaby) e Clarissa.

A professora Márcia Rosa junto com toda sua equipe pela valiosa parceria e colaboração nos estudos relacionados à atividade leishmanicida.

A professora Claudia Braga pelo apoio e direção apontada, desde a graduação que levarei sempre comigo.

A UFPB e a CAPES pela bolsa concedida.

E a todos aqueles que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

"É a aventura mais perseverante e grandiosa da história humana - essa busca por compreender o universo, como opera e de onde veio. É difícil imaginar que um punhado de habitantes de um pequeno planeta que gira em torno de uma estrela insignificante numa pequena galáxia possa ter por objetivo uma completa compreensão do universo em sua totalidade, um grãozinho de criação acreditando realmente ser capaz de compreender o todo."

Físico; (Murray Gell-Mann)

RESUMO

Título: Bio-resolução de adutos de Morita-Baylis-Hillman mediada pela enzima Lipase CALB: bioatividade de seus enantiômeros puros.

Nesse trabalho visou-se a bio-resolução cinética dos Adutos de Morita Baylis Hillman (AMBH) utilizando a Lipase CALB derivada do fungo *Candida Antarctica*. Inicialmente foram sintetizados três AMBH usando acrilonitrila e os respectivos *o*, *m* e *p* nitrobenzaldeídos. Subsequentemente os seus respectivos acetatos foram preparados em altos rendimentos, usando cloreto de acetila e TEA. Foram desenvolvidas com êxito, metodologias para a bio-resolução dos AMBH oriundos dos nitroaldeídos *m* e *p*, obtendo os enantiômeros R com excessos enantioméricos de 99,9%, determinados pela técnica de cromatografia gasosa, usando à coluna quiral beta ciclodextrina e fase móvel (N₂). Porém usando as metodologias acima não foi possível a bio-resolução do AMBH derivado do *o*-benzaldeído. Para obter os enantiômeros S, foram feitas as reações de hidrólise dos respectivos ésteres devidamente separados por cromatografia líquida das reações de biocatálise. As reações de hidrólise foram feitas usando K₂CO₃ e metanol, obtendo-se os enantiômeros S com rendimentos químicos de 100% e 10% e excessos enantioméricos de 86,8% e 97,48% respectivamente. Usando o método de Mosher através da dupla derivatização os valores de deslocamentos químicos obtidos dos espectros de RMN¹H geraram um $\Delta\delta^{RS} > 0$ e $\Delta\delta^{RS} < 0$, o que demonstra que a configuração absoluta do carbono assimétrico dos AMBH os quais a enzima hidrolisou é R. Os valores de $[\alpha]_D$ oriundos dos AMBH nitroaldeídos *m* e *p* (configuração R) são +37 e +30. Os valores de $[\alpha]_D$ dos correspondentes acetatos S são -7 e -9 respectivamente. O AMBH oriundo do *m*-nitroaldeído nas formas R/S, R e S foram bioavaliados *in vitro*. A mistura racêmica foi a que se apresentou mais efetiva sobre promastigotas de *L. braziliensis*, e a substância S foi a que apresentou a menor atividade. Na análise de citotoxicidade celular no macrófago sadio de murinos observou-se que a mistura racêmica foi a mais citotóxica e o S o menos citotóxico (citotoxicidade apenas a partir da concentração de 40 µg/mL) constatando que todas as substâncias avaliadas foram mais citotóxicas para o parasita do que para macrófagos.

Palavras-chave: Aduto Morita-Baylis-Hillman (AMBH). Bio-resolução Cinética. Lipase CALB. Atividade Biológica.

ABSTRACT

Title: Bioresolution of Morita-Baylis-Hillman adducts mediated by lipase CALB enzyme: bioactivity of their pure enantiomers.

This work aimed to perform the kinetic bioresolution of Morita Baylis Hillman adducts (MBHA) using CALB lipase derived from *Candida Antarctica* fungus. Initially three MBHA we synthesized using acrylonitrile and *m e p* nitro benzaldehyde. Subsequently the respective acetates from MBHA were prepared in high yields using acetyl chloride and TEA. Methodologies for bioresolution of AMBH (obtained from nitro aldehydes *m e p*) were successfully developed producing the R enantiomers with 99.9% of enantiomeric excess determined by gas chromatography (using the beta cyclodextrin chiral column). However, using the same methodology it was not possible performed the bioresolution of AMBH derived from the *o*-benzaldehyde. To obtain the S enantiomers, the hydrolysis reactions of esters obtained from biocatalysis were made and separated by liquid chromatography. These hydrolysis reactions were carried out using K_2CO_3 and methanol, yielding the S enantiomers with 100% and 10% of chemical yields and 86.8% and 97.48% of enantiomeric excesses respectively. Using the method of Mosher through double derivatization chemical shift values obtained from 1H NMR spectra generated a $\Delta\delta_{RS} >$ and $\Delta\delta_{RS} 0 < 0$, which indicates that the absolute configuration of the asymmetric carbon of AMBH hydrolyzed by enzyme is R. The values of $[\alpha]_D$ derived from *m* and *p* nitro aldehydes (S configuration) are +37 and +30 degrees. The values of $[\alpha]_D$ of S corresponding acetates are -7 and -9 degrees respectively. The AMBH obtained from the *m* nitro aldehyde were bioavaliados *in vitro* in a R/S, R and S forms. The racemate was the most effective on *L. braziliensis* promastigotes and the S enantiomer was the lowest active. In the cell cytotoxicity analysis which were evaluated in the safe murine macrophages, the racemate was the most cytotoxic and the S enantiomer the less cytotoxic (some cytotoxicity were only observed at concentrations over 40 mg/mL) concluding that all evaluated compounds were more cytotoxic for *L. braziliensis* parasite that the safe macrophage.

Keywords: Morita-Baylis-Hillman adduct, Kinetics bioresolutions, CALB Lipase, biological activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Estrutura cristalina da Lipase B de <i>Candida antarctica</i> suportando como ligante o açúcar N-Acetil-D-Glucosamina (22).....	35
Figura 1.2 Flexibilidade na superfície estrutural do cristal da CALB frente a solventes apolares.	36
Figura 1.3 Fêmea do Flebotômíneo vetor da Leishmaniose. Fonte: www.ribeiraopreto.sp.gov.br	41
Figura 1.4 Formas celulares do protozoário causador da Leishmania: (c) Amastigotas, (d) Promastigotas. Fonte: www.iwis.org.br	41
Figura 1.5 Ciclo de transmissão de parasitos do gênero <i>Leishmania</i> Fonte: Adaptado de < http://calazar.zip.net/ >.....	42
Figura 4.1 Esquematização mostrando o mecanismo de “encaixe induzido” proposto por Koshland.	53
Figura 4.2 Adutos de Morita Baylis-Hillman escolhidos para bio-resolução.....	54
Figura 4.3 Separação cromatográfica dos AMBH racêmicos, utilizando coluna quiral.	61
Figura 4.4 Caracterização da IHB no aduto (27) via QTAIM..	64
Figura 4.5 Cromatografia dos AMBH R (28b e 29b) opticamente puros, obtidos através da bio-resolução com a enzima lipase CALB.....	65
Figura 4.6 Cromatogramas dos AMBH S (28a e 29a) opticamente puros, obtidos através da hidrólise usando K_2CO_3 e Metanol.	67
Figura 4.7 Auxiliares de quiralidade (R/S-MTPA) e os diastereoisômeros de Mosher mostrando a blindagem eletrônica nos hidrogênios dos AMBH-R.	69
Figura 4.8 Expansão dos espectros de RMN ¹ H na faixa de (6,0 - 8,3 ppm) dos diastereoisômeros de Mosher.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Diferentes enantiômeros versus diferentes propriedades.	28
Tabela 1.2 Vantagens e desvantagens no uso de biocatalisadores em reações de biocatálise.	32
Tabela 1.3 Aplicações de Lipases de acordo com o tipo de reação catalisada.	34
Tabela 4.1 Resultados da reação de preparação dos adutos usando acetonitrila como solvente a temperatura ambiente.	55
Tabela 4.2 Principais dados espectroscópicos dos AMBH sintetizados 27, 28 e	56
Tabela 4.3 Resultados das reações de acetilações dos AMBH usando cloreto de acetila como solvente a temperatura ambiente.	58
Tabela 4.4 Principais dados espectroscópicos dos Ésteres sintetizados 30, 31 e 32.	59
Tabela 4.5 Resultados das reações de hidrólise catalisadas pela CALB.	63
Tabela 4.6 Valores de $[\alpha]_D$ dos AMBH R e dos ésteres S opticamente puros medidos a 25°C, $c=1,6\text{g}/100\text{ mL}$ em CHCl_3	68
Tabela 4.7 Valores específicos de deslocamentos químicos de RMN de ^1H para os diastereoisômeros de Mosher, bem como as magnitudes das medidas de $\Delta\delta^{\text{RS}}$	72

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.1 Esquema geral da reação de Morita-Baylis-Hillman R,R ₁ = H, alquil, aril, heteroaril. GEA = CO ₂ R,COR, CN, outros.	25
Esquema 1.2 Mecanismos propostos para a reação de Morita-Baylis- Hilman. Fonte: Esquema adaptado de Wagner-andré (2012).	26
Esquema 1.3 Resolução cinética do ácido tartárico frente à <i>peniciliim</i> <i>glaucus</i> , (Pasteur, 1858).	27
Esquema 1.4 Reação de hidrogenação assimétrica do ácido tíglico usando complexos de Ru dissolvidos em CO ₂ supercrítico.	30
Esquema 1.5 Reação aldol organocatalisada com amina quiral.	30
Esquema 1.6 Esterificação enantiosseletiva do (R/S)-ibuprofeno catalisada por Lipase.....	31
Esquema 1.7 Exemplo de uma reação de Oxidação Enantiosseletiva sem a presença de metal.....	38
Esquema 1.8 Exemplo de uma reação de Oxidação Enantiosseletiva com a presença de metal.....	39
Esquema 1.9 Exemplo de uma reação com uso do agente acilante (Éster vinílico).....	39
Esquema 4.1 Metodologia para a preparação dos adutos utilizando acrilonitrila a temperatura ambiente.	55
Esquema 4.2 Metodologia inicial de acetilação para a preparação dos ésteres provenientes dos AMBH.....	57
Esquema 4.3 Proposta de mecanismo do tipo SNAcilica para as reações de acetilação dos AMBH.....	58
Esquema 4.4 Reações de Bio-resolução dos ésteres racêmicos, catalisadas pela enzima CALB.	62
Esquema 4.5 Reações de hidrólises utilizando K ₂ CO ₃ e Metanol dos ésteres nitrados-(S) <i>m</i> e <i>p</i> , para obtenção dos AMBH nitrados (S) <i>m</i> e <i>p</i>	66

Esquema 4.6 Reações de esterificação de Mosher através da dupla derivatização com os AMBH (R) e os auxiliares de quiralidade R-MTPA e S-MTPA.	70
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 4.1** Inibição do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* na presença de diferentes concentrações das substâncias em estudo.74
- Gráfico 4.2** Citotoxicidade das substâncias para macrófagos peritoneais de camundongos suíços, incubados por 24h em estufa de CO₂ a 37°C na presença de diferentes concentrações das substâncias....75
- Gráfico 4.3** Viabilidade celular feita pelo método de redução do MTT, incubados por 24h em estufa de CO₂ a 37°C na presença de diferentes concentrações das substâncias e quantificados sob microscopia óptica na presença de azul de trypan.....75

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1 Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) de 2-(hidroxi(2-nitrofenil)metilêno)acrilonitrila (27).	100
Espectro 2 Expansão do Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) de (27) na região de 6,08 a 5,95.	100
Espectro 3 Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃ , 50MHz) de 2-(hidroxi(2-nitrofenil) metilêno)acrilonitrila (27).	101
Espectro 4 Espectro de Infravermelho em cm ⁻¹ de 2-(hidroxi(2-nitrofenil) metilêno)acrilonitrila (27).	101
Espectro 5 Cromatograma de 2-(hidroxi(2nitrofenil)metilêno)acrilonitrila (27).	102
Espectro 6 Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) de 2-(hidroxi(3-nitrofenil) metilêno)acrilonitrila (28).	102
Espectro 7 Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃ , 50MHz) de 2-(hidroxi(3-nitrofenil) metilêno)acrilonitrila (28).	103
Espectro 8 Espectro de Infravermelho em cm ⁻¹ de 2-(hidroxi(3-nitrofenil) metilêno)acrilonitrila (28).	103
Espectro 9 Cromatograma de 2-(hidroxi(3nitrofenil)metilêno)acrilonitrila (28).	104
Espectro 10 Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) de 2-(hidroxi(4-nitrofenil) metilêno)acrilonitrila (29).	104
Espectro 11 Expansão do Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) de (29) na região de 6,04 a 6,16.	105
Espectro 12 Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃ , 50MHz) de 2-(hidroxi(4-nitrofenil) metilêno)acrilonitrila (29).	105
Espectro 13 Espectro de Infravermelho em cm ⁻¹ de 2-(hidroxi(4-nitrofenil) metilêno)acrilonitrila (29).	106
Espectro 14 Cromatograma de 2-(hidroxi(4-nitrofenil)metilêno)acrilonitrila (29).	106
Espectro 15 Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) do Acetato de 2-ciano-1-(2-nitrofenil)alila (30).....	107

Espectro 16 Expansão do Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) de (30) na região de 4,85 a 5,01.	107
Espectro 17 Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃ , 50MHz) do Acetato de 2-ciano-1-(2-nitrofenil)alila (30).....	108
Espectro 18 Espectro de Infravermelho em cm ⁻¹ do Acetato de 2-ciano-1-(2-nitrofenil)alila (30).....	108
Espectro 19 Cromatograma do Acetato de 2-ciano-1-(2-nitrofenil)alila (30).	109
Espectro 20 Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) do Acetato de 2-ciano-1-(3-nitrofenil)alila (31).....	109
Espectro 21 Expansão do Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) de (31) na região de 4,84 a 5,00.	110
Espectro 22 Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃ , 50MHz) do Acetato de 2-ciano-1-(3-nitrofenil)alila (31).....	110
Espectro 23 Espectro de Infravermelho em cm ⁻¹ do Acetato de 2-ciano-1-(3-nitrofenil)alila (31).....	111
Espectro 24 Cromatograma do Acetato de 2-ciano-1-(3nitrofenil)alila (31).	111
Espectro 25 Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) do Acetato de 2-ciano-1-(4-nitrofenil)alila (32).....	112
Espectro 26 Expansão do Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) de (32) na região de 4,3 a 6,8.....	112
Espectro 27 Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃ , 50MHz) do Acetato de 2-ciano-1-(4-nitrofenil)alila (32).....	113
Espectro 28 Espectro de Infravermelho em cm ⁻¹ do Acetato de 2-ciano-1-(4-nitrofenil)alila (32).....	113
Espectro 29 Cromatograma do Acetato de 2-ciano-1-(4-nitrofenil)alila (32).	114
Espectro 30 Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) do Propanoato de (S)-((R)-2-ciano-1-(3-nitrofenil)alil) 3,3,3-trifluoro-2-metóxi-2-fenil (36).....	114

Espectro 31 Expansão do Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) de (36) na região de 3,5 a 8,5.....	115
Espectro 32 Expansão do Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) de (36) na região de 7,15 a 8,30.	115
Espectro 33 Expansão do Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) de (36) na região de 5,20 a 6,60.	116
Espectro 34 Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃ , 50MHz) do Propanoato de (S)-((R)-2-ciano-1-(3-nitrofenil)alil) 3,3,3-trifluoro-2-metóxi-2-fenil (36).....	116
Espectro 35 Espectro de Infravermelho em cm ⁻¹ do Propanoato de (S)-((R)-2-ciano-1-(3-nitrofenil)alil) 3,3,3-trifluoro-2-metóxi-2-fenil (36).....	117
Espectro 36 Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) do Propanoato de (R)-((R)-2-ciano-1-(3-nitrofenil)alil) 3,3,3-trifluoro-2-metóxi-2-fenil (39).....	117
Espectro 37 Expansão do Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) de (39) na região de 3,2 a 8,4.....	118
Espectro 38 Expansão do Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) de (39) na região de 7,15 a 8,30.	118
Espectro 39 Expansão do Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) de (39) na região de 5,20 a 6,60.	119
Espectro 40 Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃ , 50MHz) do Propanoato de (R)-((R)-2-ciano-1-(3-nitrofenil)alil) 3,3,3-trifluoro-2-metóxi-2-fenil (39).....	119
Espectro 41 Espectro de Infravermelho em cm ⁻¹ do Propanoato de (R)-((R)-2-ciano-1-(3-nitrofenil)alil) 3,3,3-trifluoro-2-metóxi-2-fenil (39).....	120
Espectro 42 Cromatograma do Propanoato de (S)-((R)-2-ciano-1-(4-nitrofenil)alil) 3,3,3-trifluoro-2-metóxi-2-fenil (37).....	120
Espectro 43 Expansão do Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) de (37) na região de 3,2 a 8,5.....	121

Espectro 44 Expansão do Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) de (37) na região de 7,00 a 8,6.	121
Espectro 45 Expansão do Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) de (37) na região de 5,95 a 6,65.	122
Espectro 46 Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃ , 50MHz) do Propanoato de (S)-((R)-2-ciano-1-(4-nitrofenil)alil) 3,3,3-trifluoro-2-metóxi-2-fenil (37).	122
Espectro 47 Espectro de Infravermelho em cm ⁻¹ Propanoato de (S)-((R)-2-ciano-1-(4-nitrofenil)alil) 3,3,3-trifluoro-2-metóxi-2-fenil (37). .	123
Espectro 48 Cromatograma do Propanoato de (R)-((R)-2-ciano-1-(4-nitrofenil)alil) 3,3,3-trifluoro-2-metóxi-2-fenil (40).	123
Espectro 49 Expansão do Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) de (40) na região de 3,2 a 8,8.	124
Espectro 50 Expansão do Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) de (40) na região de 7,00 a 8,50.	124
Espectro 51 Expansão do Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) de (40) na região de 6,00 a 6,64.	125
Espectro 52 Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃ , 50MHz) do Propanoato de (R)-((R)-2-ciano-1-(4-nitrofenil)alil) 3,3,3-trifluoro-2-metóxi-2-fenil (40).	125
Espectro 53 Espectro de Infravermelho em cm ⁻¹ do Propanoato de (R)-((R)-2-ciano-1-(4-nitrofenil)alil) 3,3,3-trifluoro-2-metóxi-2-fenil (40).	126

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α - Rotação Óptica

[α]_D - Rotação Óptica Específica

AMBH - Adutos de Morita-Baylis-Hillman

CALB - Lipase B de Candida Antarticta

CALA - Lipase A de Candida Antarticta

Asp - Ácido Aspártico

His - Histidina

Ser - Serina

CCDA - Cromatografia de Camada delgada Analítica

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

δ - Deslocamento químico

d - Dubleto

DCC - Diciclohexilcarbodiimida

DMAP - Dimetilaminopiridina

DABCO - 1,4 - diazabicyclo [2.2.2]octano

dd - Duplo dubleto

ddd - Duplo duplo dubleto

DBM - Departamento de Biologia Molecular da UFPB.

e.e - Excesso Enantiomérico

FDA - Food and Drug Administration

GEA - Grupos Elétron-atratores

ΔG - Energia Livre de Gibbs

Hz - Hertz

IV - Infravermelho

J - Constante de acoplamento

kDa - (Da-Dalton) Unidade de Massa Atômica

kS - Constante de velocidade do enantiômero S

kR - Constante de velocidade do enantiômero R

LHI - Ligação de Hidrogênio Intramolecular

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

LV - Leishmaniose Visceral

LC - Leishmaniose Cutânea

LVA - Leishmaniose Visceral Americana

m – multiplete

MTT - 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium

MTPA - Acido- α -Metóxi- α -Trifluorometil- α -fenilacético

OMS – Organização Mundial de Saúde

pH – Potencial Hidrogeniônico

ppm – partes por milhão

PSL – Proteína do Soro do Leite

QTAIM – Teoria quântica de átomos em moléculas

RMBH – Reação de Morita-Baylis-Hillman

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SEP – Substâncias Enantiomericamente Puras

SC – Supercrítico

s – Singleto

sl – Singleto largo

t – tripleto

TMS – Tetrametilsilano

TEA - Trietilamina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 Adutos de Morita Baylis Hillman e suas aplicações biológicas	25
1.2 Substâncias Enantiomericamente Puras (SEP).....	27
1.3 Catálise Assimétrica	29
1.4 Biocatálise	31
1.4.1 Enzimas Lipases.....	33
1.4.2 Enzima CALB (Lipase B de <i>Candida antarctica</i>).....	35
1.5 Resolução Cinética	37
1.6 Leishmaniose	40
2 OBJETIVOS	45
2.1 Objetivos gerais.....	45
2.2 Objetivos específicos	45
3 ESTRATÉGIAS	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
4.1 Síntese dos adutos de Morita Baylis-Hillman utilizando a Acrlonitrila	54
4.2 Síntese dos respectivos ésteres dos AMBH utilizando Cloreto de Acetila, TEA e Dicloro metano como solvente	57
4.3 Reações de Bio-resolução: Hidrólise dos Ésteres pela Enzima CALB (Lipase B de <i>Candida antarctica</i>)	60
4.4 Reações de hidrólise usando K_2CO_3 e Metanol como solvente, dos ésteres-S remanescentes das reações de bio-resolução	66
4.5 Determinação da configuração absoluta dos AMBH R (28b e 29b) usando a técnica de Mosher (dupla derivatização)	69
4.6 Atividade antipromastigota contra <i>Leishmania braziliensis</i> dos AMBH (28 S/R, 28b R e 28a S).....	73
4.7 Análises de citotoxicidade dos AMBH (28 S/R, 28b R e 28a S) sobre macrófagos murinos.....	74
5 CONCLUSÃO	78
6 PARTE EXPERIMENTAL	80

6.1	Materiais e Métodos.....	80
6.2	Procedimento geral para a reação de Morita-Baylis-Hillman utilizando a Acrilonitrila como solvente, obtenção dos racematos (27, 28 e 29).....	81
	AMBH 2-(hidroxi(2-nitrofenil)metilênilo)acrilonitrila (27)	82
	AMBH 2-(hidroxi(3-nitrofenil) metilênilo)acrilonitrila (28)	82
	AMBH 2-(hidroxi(4-nitrofenil) metilênilo)acrilonitrila (29)	83
6.3	Procedimento geral para a reação de acetilação dos AMBH utilizando Cloreto de acetila, obtenção dos racematos (30, 31 e 32)	84
	Éster Acetato de 2-ciano-1-(2-nitrofenil)alil (30)	84
	Éster Acetato de 2-ciano-1-(3-nitrofenil)alil (31)	85
	Éster Acetato de 2-ciano-1-(4-nitrofenil)alil (32)	85
6.4	Procedimento para a resolução cinética enzimática de (28) utilizando a enzima lipase CALB Novozym 435	86
6.5	Procedimento para a resolução cinética enzimática de (29) utilizando a enzima lipase CALB Novozym 435	86
6.6	Procedimento para a hidrólise química do éster S (31a) utilizando K ₂ CO ₃ e metanol como solvente.....	87
6.7	Procedimento para a hidrólise química do Éster R (32b) utilizando K ₂ CO ₃ e metanol como solvente.....	87
6.8	Procedimento para a determinação da configuração absoluta do AMBH R (28b) pelo método de Mosher	88
6.8.1	Reação do AMBH R (28b) com (R)- MTPA (34b)	88
	Éster de Mosher Propanoato de (R)-[(R)-2-ciano-1-(3-nitrofenil) alil] 3,3,3-trifluoro-2-metoxi-2-fenil (48)	88
6.8.2	Reação do AMBH R (28b) com (S)- MTPA (34a)	89
	Éster de Mosher Propanoato de (S)-[(R)-2-ciano-1-(3-nitrofenil) alil] 3,3,3-trifluoro-2-metoxi-2-fenil (45)	89
6.9	Procedimento para a determinação da configuração absoluta do AMBH R (29b) pelo método de Mosher	90
6.9.1	Reação do AMBH R (29b) com (R)- MTPA (34b)	90

Éster de Mosher Propanoato de (R)-[(R)-2-ciano-1-(4-nitrofenil) alil]	
3,3,3-trifluoro-2-metoxi-2-fenil (49)	91
6.9.2 Reação do AMBH R (29b) com (S)- MTPA (34a)	91
Éster de Mosher Propanoato de (S)-[(R)-2-ciano-1-(4-nitrofenil) alil]	
3,3,3-trifluoro-2-metoxi-2-fenil (46)	92
REFERÊNCIAS	94
ESPECTROS	100

Capítulo 1:

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Entre os meios acadêmicos, nas indústrias farmacêuticas e de defensivos agrícolas tem crescido nas últimas décadas, o interesse em sintetizar e produzir substâncias enantiomericamente puras (SEP), visto que existe uma relação altamente específica entre propriedades biológicas e quiralidade molecular.¹ Devido a isso se faz necessário um controle sobre as possíveis atividades biológicas dos enantiômeros isolados de qualquer fármaco quiral, essa exigência fica por conta da FDA ("Food and Drug Administration"- USA) e outros órgãos semelhantes.²

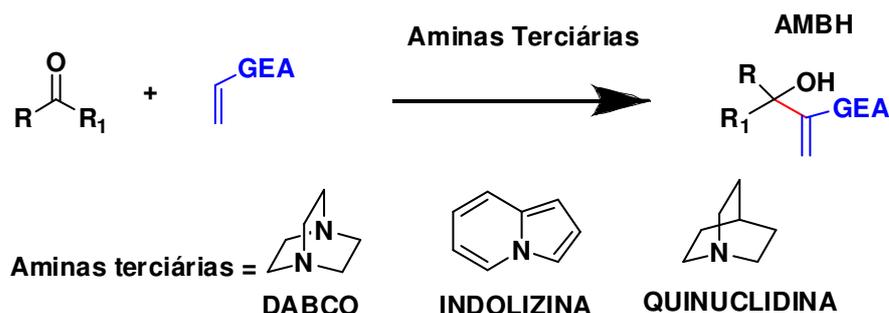
Desta forma, o projeto de pesquisa proposto aqui visa a obtenção de Adultos de Morita-Baylis-Hilman (AMBH) opticamente puros, visto que essas substâncias apresentam diversas atividade biológicas (antileishmania, antimalarial, anti-Chagássico, antimicrobiano, anticâncer, herbicida e antifúngico) testadas apenas na forma racêmica, não existindo ainda nenhum teste de atividade biológica que compare a bioatividade da mistura racêmica com os respectivos enantiômeros.^{3,4} Nesse trabalho utilizaremos a catálise enzimática (Biocatálise) que apresenta dentre outras características apreciáveis a especificidade molecular, utilizaremos como biocatalisador uma lipase denominada de CALB (Candida Antarctica) cuja a mesma possui bons relatos na literatura na resolução de alcoóis secundários racêmicos.⁵

Nesse trabalho pretende-se fazer uma nova avaliação *in vitro* contra a forma antipromastigota do parasito *Leishmania braziliensis*. Estas bioavaliações serão realizadas em parceria com o Laboratório de Leishmanioses, coordenadas pela professora Dr^a. Márcia Rosa de Oliveira, pesquisadora do Departamento de Biologia Molecular da UFPB (DBM).

1.1 Adutos de Morita Baylis Hillman e suas Aplicações Biológicas

Dentre as diversas reações da química orgânica que leva a formação da ligação carbono-carbono, destaca-se a reação de Morita-Baylis Hillman.⁶ cujo nome é uma homenagem aos seus pesquisadores precursores. A reação de Morita-Baylis-Hillman possui vantagens importantes como completa economia de átomos visto que é uma reação de síntese, experimentalmente a reação pode ser realizada em meio aquoso (química verde), outra vantagem é a formação de produtos multifuncionalizados.⁷

Esquema 1.1 Esquema geral da reação de Morita-Baylis-Hillman $R, R_1 = H$, alquil, aril, heteroaril. GEA = CO_2R, COR, CN , outros.



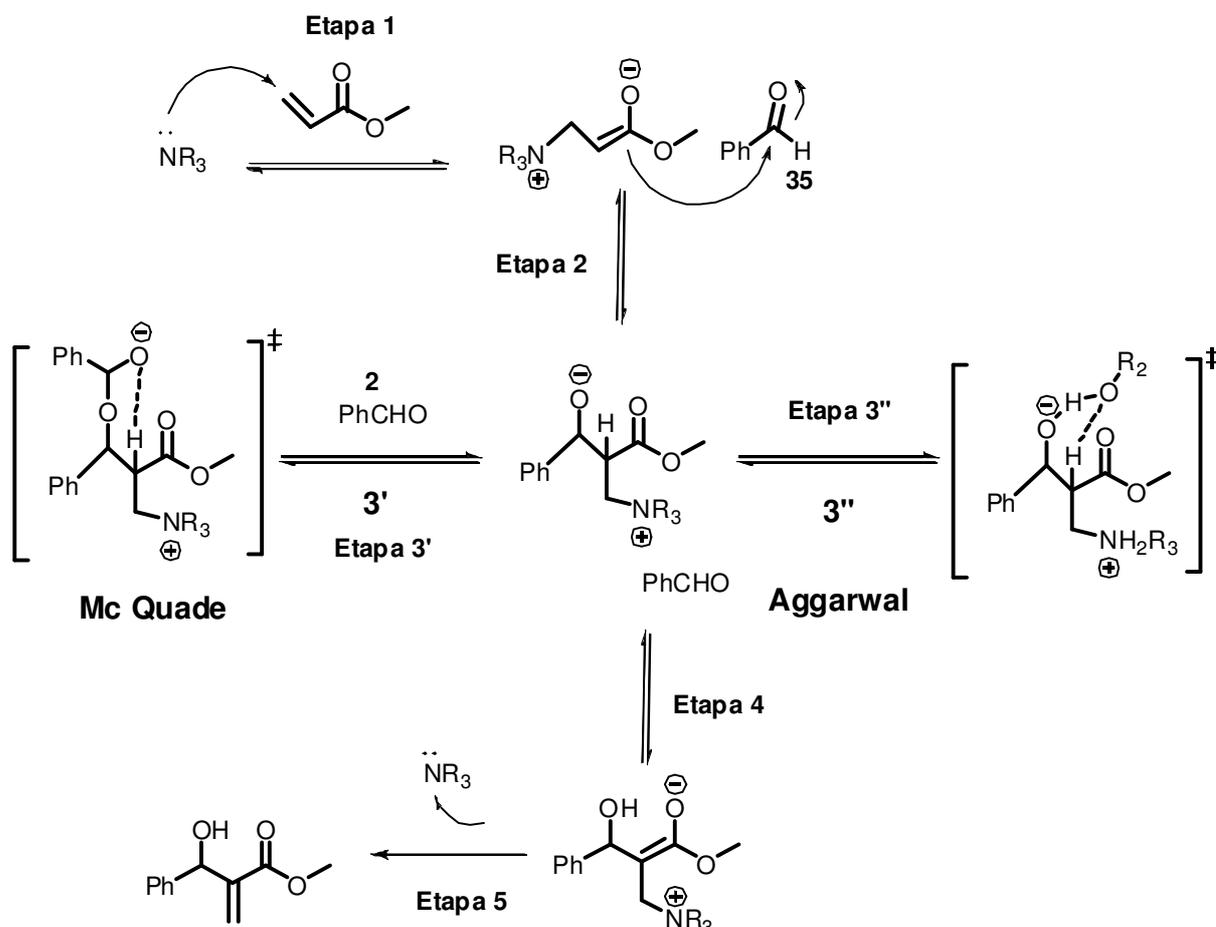
Esta reação de formação de um AMBH (Esquema 1.1) consiste basicamente no acoplamento entre aldeídos, cetonas ou iminas à alcenos ligados a grupos elétron-atratores (GEA), em presença de uma amina terciária como catalisador nucleofílico, sendo o 1,4 - diazabicyclo [2.2.2] octano (DABCO) o mais comum entre os catalisadores, levando aos correspondentes adutos de Morita-Baylis-Hillman (AMBH).⁸

A proposta de mecanismo para a reação de Morita Baylis Hillman está representada no Esquema 1.2, a (Etapa 1), desta reação envolve uma adição de Michael da amina terciária ao alceno ativado gerando o primeiro intermediário zwitteriônico. A (Etapa 2), consiste de uma adição aldólica ao aldeído gerando um segundo intermediário zwitteriônico. A próxima etapa envolve uma transferência de próton intramolecular

formando o intermediário proposto por McQuade (Etapa 3') e o proposto por Aggarwal (Etapa 3'').^{9,10}

A (Etapa 4), consiste na formação do álcool zwitterionico graças ao prototropismo, a (Etapa 5), consiste da eliminação da amina terciária (catalisador), ao ciclo catalítico e geração do aduto de AMBH.

Esquema 1.2 Mecanismos propostos para a reação de Morita-Baylis-Hilman. Fonte: Esquema adaptado de Wagner-andré (2012).¹¹



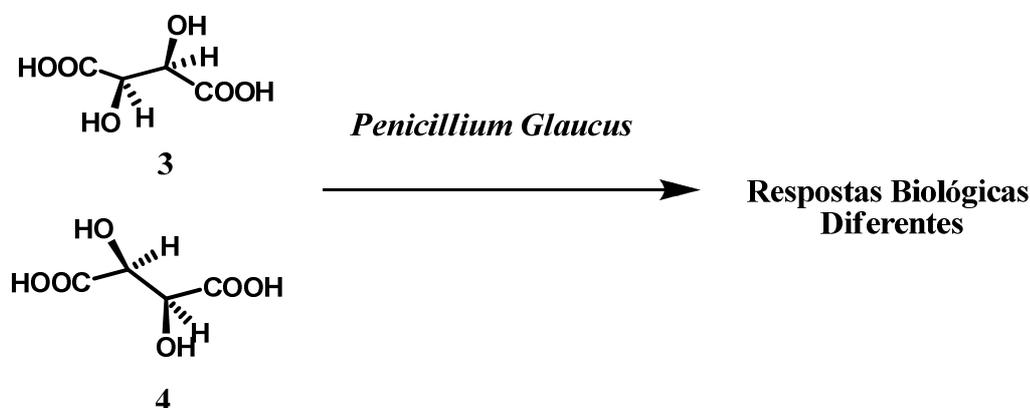
Nos últimos anos os adutos de Morita-Baylis-Hillman (AMBH) vêm sendo sintetizados em excelentes rendimentos e são uma nova classe de compostos bioativos. No ano de 1999 foi relatado na literatura por Kundu e colaboradores que alguns AMBH possuíam atividade contra o parasita *Plasmodium falciparun* causador da malária. Ao longo dos anos descobriu-se também AMBH com atividade biológica contra Doença de Chagas.¹² Em 2007 Vasconcellos e colaboradores descreveram pela primeira vez a

atividade *in vitro* de 16 AMBH contra as formas amastigota e promastigota de *Leishmania amazonensis*.

1.2 Substâncias Enantiomericamente Puras (SEP)

Em 1858, um experimento feito por PASTEUR demonstrou que o sistema biológico “*penicillium glaucus*” distinguia claramente os enantiômeros (R/R) do (S/S), ácido tartárico.

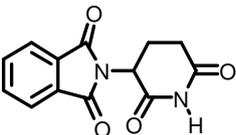
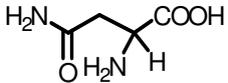
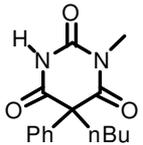
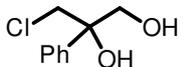
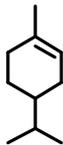
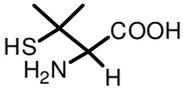
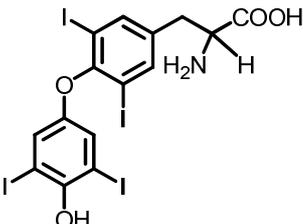
Esquema 1.3 Resolução cinética do ácido tartárico frente à *penicillium glaucus*, (Pasteur, 1858).



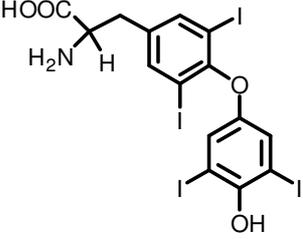
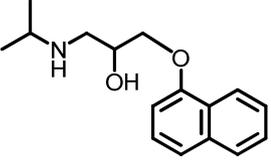
As diferentes respostas biológicas observadas em alguns substratos derivam da existência na molécula de centros de quiralidade. Os centros de quiralidade fazem com que as moléculas não possuam planos de simetria, gerando regiões espaciais diferentes de acordo com as disposições dos grupos que se ligam ao(s) centro(s) assimétrico(s) da molécula.¹³

Dentre as diversas moléculas quirais caracterizadas atualmente e que possuem aplicações industriais, observou-se que seus enantiômeros apresentam propriedades diferentes tais como: Sabor, aroma, atividade biológica dentre outras, (Tabela 1.1).¹⁴

Tabela 1.1 Diferentes enantiômeros versus diferentes propriedades.

Composto	Propriedades	
	Enantiômero <i>S</i>	Enantiômero <i>R</i>
5 Talidomida 	Teratígeno possante	Sedativo hipnótico
6 Asparagine 	Gosto amargo	Gosto doce
7 Bartibúricos 	Narcótico	Fator de "Crampes"
8 Cloropropanodiol 	Tóxico	Antifertilizante feminino
9 Limoneno 	Odor de limão	Odor de laranja
10 Penicilina 	Anti-artrítico	Tóxico
11 Tiroxina 	Hormônio tireoidídico	Anti-hipocolerterico

Continuação da tabela 1.1 Diferentes enantiômeros versus diferentes propriedades.

<p>12 Ibuprofeno</p> 	<p>Analgésico</p>	<p>Inativo e não tóxico</p>
<p>13 Propanolol</p> 	<p>Anti-hipertensivo</p>	<p>100 vezes menos ativo que o S</p>

No início da década de 60 depois de ter sido registrado mais de 10.000 casos de má formação de membros (focomelia) em crianças ao redor do mundo, o fármaco quiral Talidomida ingerido por gestantes para evitar enjoos matinais foi removido das prateleiras das farmácias. Um estudo depois revelou que o enantiômero *S* distômero (Inativo) foi o responsável por essa tragédia. Diante do fato ocorrido, a *Food and Drug Administration* (FDA) órgão responsável pelo controle e liberação de novas drogas, estreitou a relação entre quiralidade e atividade biológica na comercialização e ingestão de drogas racêmicas.¹⁵

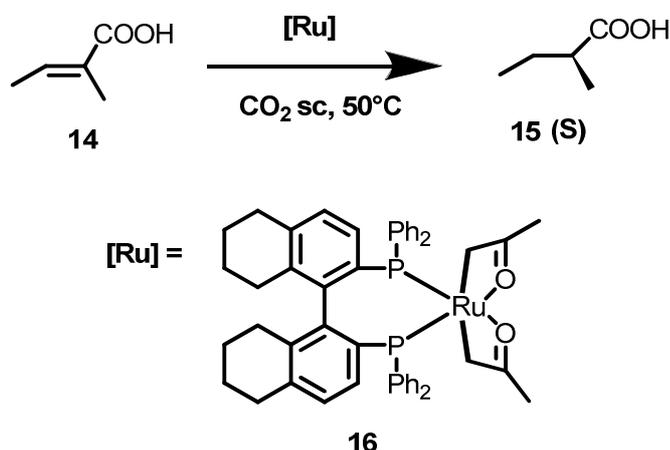
1.3 Catálise Assimétrica

Existem diversos métodos de obtenção de compostos enantiomericamente puros, dentre todos os métodos a catálise assimétrica é uma das mais utilizadas e citadas em termos industriais e de pesquisa. A catálise assimétrica é uma metodologia química constituída de

três ramos importantes: **Catálise Organometálica, catálise enzimática (biocatálise) e organocatálise.**¹⁶

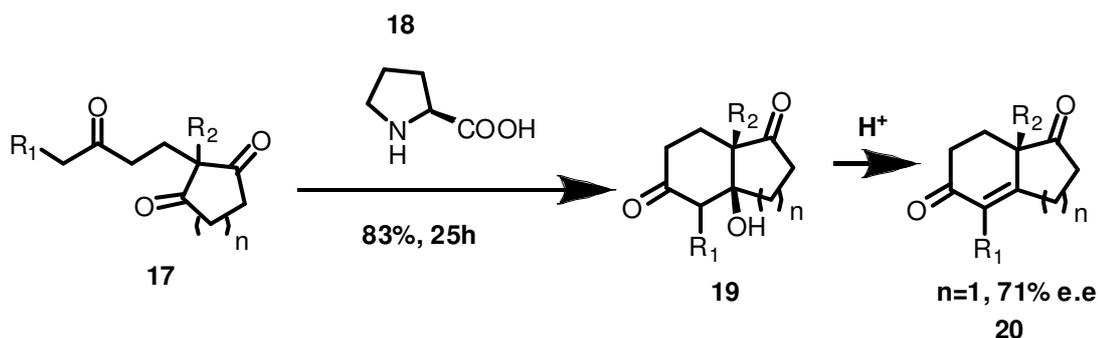
Na **catálise organometálica** temos o uso de catalisadores orgânicos com metais em suas estruturas. Podemos citar na literatura a hidrogenação do ácido tíglico (**14**), (Esquema 1.4), por complexos de rutênio (**16**), obtendo o ácido 2-bunatóico (**15**) com boa seletividade e e.e. em torno de 80%.¹⁷ Entretanto, existem reações em que o catalisador não é recuperado, indicando claramente as limitações ambientais.

Esquema 1.4 Reação de hidrogenação assimétrica do ácido tíglico usando complexos de Ru dissolvidos em CO₂ supercrítico.



Na **organocatálise** temos um processo no qual moléculas orgânicas contendo geralmente átomos de C, H, O, N, S e P, catalisam reações orgânicas, sem a necessitar de qualquer traço de metal.¹⁸

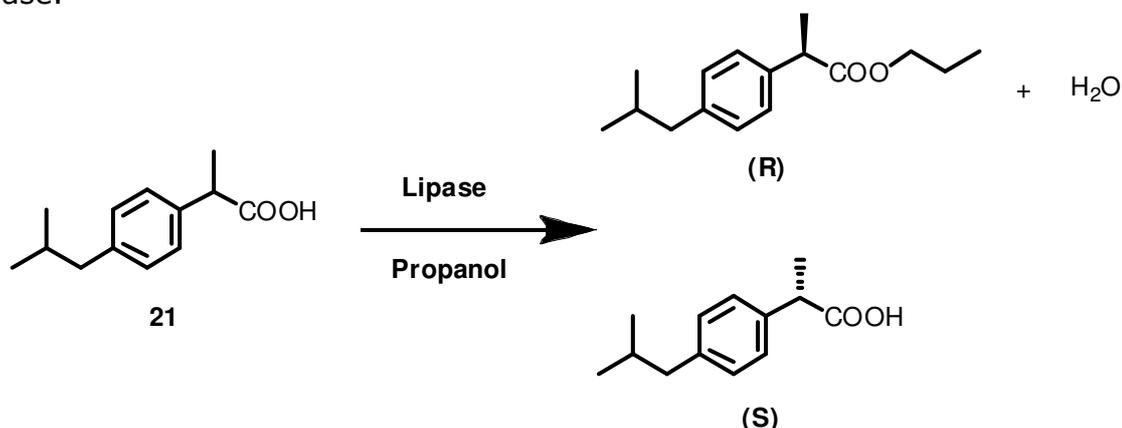
Esquema 1.5 Reação aldol organocatalisada com amina quiral.



No Esquema 1.5 observa-se a reação de anelação de Robinson assimétrica catalisada pela (*S*)-prolina (**18**), formando uma enona (**20**), derivada de álcool terciário cíclico (**19**).¹⁹

Na **catálise enzimática** utilizam-se geralmente enzimas como catalisadores frente a substratos pró-quirais ou misturas racêmicas, é bastante citada na literatura, visto que as enzimas possuem como principal característica a enantiosseletividade. Temos a reação de esterificação enantiosseletiva catalisada por Lipases usada com sucesso na resolução dos profenos (**21**), (Esquema 1.6).^{20,21}

Esquema 1.6 Esterificação enantiosseletiva do (R/S)-ibuprofeno catalisada por Lipase.



O uso da biocatálise frente à importância da “Química Fina” e no contexto ambiental mostra-se uma boa ferramenta na obtenção de substâncias opticamente puras, pois suas metodologias estão diretamente ligadas à química verde.

1.4 Biocatálise

Reações catalisadas por meios biológicos é um conceito claro e conciso para o termo biocatálise.²² A biocatálise atualmente está em crescimento acelerado e apresenta boa evolução no número de publicações ao longo dos anos, sendo uma área muito abrangente, possuindo diversas aplicações.²³

- ✓ Indústria farmacêutica;
- ✓ Indústrias alimentares (laticínios, cerveja, vinhos, sumos, panificação, óleos e gorduras, carnes e etc.);
- ✓ Indústria de antibióticos;
- ✓ Química fina

Os catalisadores biológicos mais utilizados em biocatálise são células íntegras de microorganismos, no entanto, o meio reacional deve ser controlado a fim de se manter o meio estável e eficiente.²³ Comercialmente pode-se utilizar enzimas imobilizadas ou isoladas, porém, o preço pode não ser acessível devido o alto preço agregado dependendo da enzima e do processo a ser catalisado.

Tabela 1.2 Vantagens e desvantagens no uso de biocatalisadores em reações de biocatálise.²⁴

Vantagens	Desvantagens
Condições reacionais brandas	Sensíveis a variações de temperatura
Ecologicamente corretos	Custos elevados para algumas enzimas
Catalisadores eficientes	Sensíveis a solventes orgânicos
Catalisadores seletivos	Algumas enzimas necessitam de co-fatores
Enantiosseletividade e diastereosseletividade	Possíveis riscos de contaminação
Quimiosseletividade e Regiosseletividade	Dificuldades na recuperação do biocatalisador

A Tabela 1.2 trás um breve enfoque informativo sobre algumas vantagens e desvantagens no desenvolvimento e utilização de enzimas em diversos processos muitos deles acompanhados de sínteses químicas. As enzimas são organizadas de acordo com o tipo de reação as quais

catalisam: Ligases (reação de síntese), Oxirredutases (reação de oxidação-redução), Isomerases (reação de isomerização), Transferases (reação de transferência de grupos), Liasas (reação de eliminação não hidrolíticas), Hidrolases (reação de hidrólise) e etc.⁵

As duas últimas vantagens mostradas na Tabela 1.2 merecem destaque especial no uso e aplicação de biocatalisadores, constitui a grande especificidade frente a substratos quirais, principalmente na obtenção de compostos opticamente puro compreendido pelo modelo encaixe induzido que será discutido mais á frente no capítulo 4.²⁵

1.4.1 Enzimas Lipases

O grupo de enzimas denominadas de Lipases (triacilglicerol acilhidrolases) pertence á classe das hidrolases que atualmente possuem em relação a outras classes de enzimas uma maior estimativa de uso industrial, cerca de 80% de utilização.²⁶

As Lipases são largamente empregadas em biocatálise, na obtenção e resolução cinética de diversos compostos tais como: Alcoóis quirais, ácidos carboxílicos, ésteres, entre outros, por meio de reações de hidrólise, esterificação e transesterificação, respectivamente.⁵

Na Tabela 1.3 se encontra algumas aplicações do uso de Lipases de acordo com o tipo de reação catalisada. Percebe-se claramente a multifuncionalidade das enzimas Lipases atestando a estimativa de uso cerca de 80% em relação às outras classes de enzimas. O elevado potencial tecnológico destas enzimas está relacionado a grandes vantagens, como boa disponibilidade para compra, custo de produção reduzido, certa estabilidade em condições de solventes orgânicos quando o sistema enfrenta condições adversas como por exemplos, pequenas variações de temperaturas e pH, são possíveis de serem reaproveitadas existindo na literatura diversas metodologias além de não necessitarem de co-fatores.²⁷

Tabela 1.3 Aplicações de Lipases de acordo com o tipo de reação catalisada.²⁶

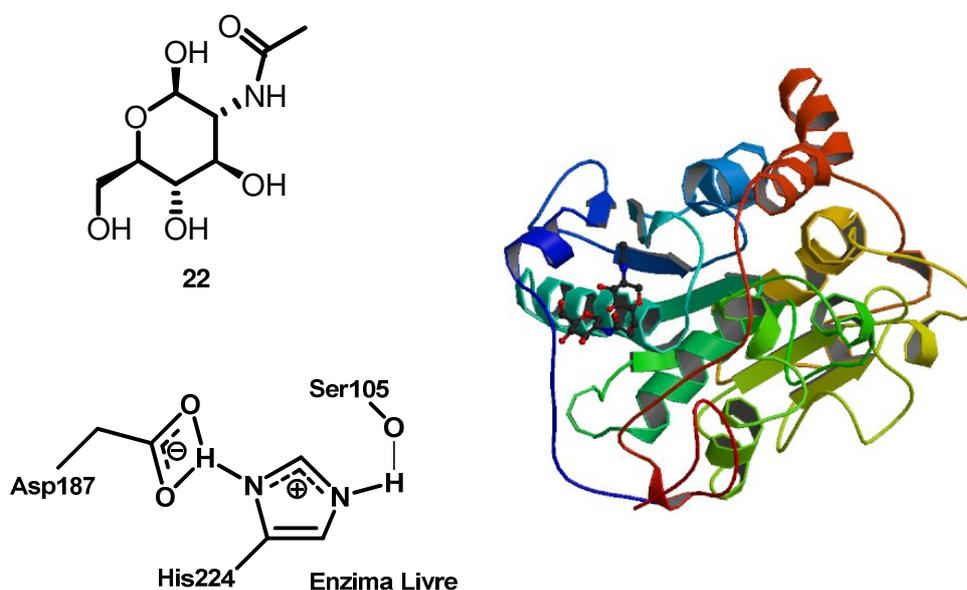
Tipos de Reações	Áreas de Aplicação	Aplicações	Produtos
Hidrólise	Alimentos (laticínios)	Hidrólise de gorduras do leite	Agentes flavorizantes para queijos e derivados
	Química (processamento de óleo)	Hidrólise de óleos e gorduras	Ácidos graxos, diglicerídeos e monoglicerídeos (emulsificantes, reagentes para análise de lipídeos)
	Química (detergente)	Remoção de manchas de óleos	Detergentes de uso em lavanderias e domésticos
	Medicina	Dosagem de triglicerídeos no sangue	Kits para diagnósticos
Esterificação	Indústria fina geral	Síntese de ésteres	Intermediários quirais ésteres, emulsificantes
	Indústria alimentícia	Esterificação ou transesterificação	Óleos ou gorduras, flavorizantes e na produção de aromatizantes
	Indústria farmacêutica	Síntese de intermediários em medicamentos	Antiinflamatórios (naproxeno, ibuprofeno, cetoprofen, suprofen)
Trans-esterificação	Indústria de combustíveis	Transesterificação em óleos vegetais	Produção de Biodiesel

As expectativas futuras para utilização de Lipases no meio científico e industrial estão diretamente relacionadas com a redução dos custos de produção e purificação, buscando novas metodologias produtoras de lipases, fazendo melhoramento genético, moldando propriedades apreciáveis para serem aplicadas na “química fina”, “química verde” em biotransformações.²⁸

1.4.2 Enzima CALB (Lipase B de *Candida antarctica*)

A enzima CALB é um tipo de Lipase obtida da levedura *Candida antarctica* cuja a origem e isolamento remetem a Antártica por isso a origem do nome.²⁹ A levedura *Candida antarctica* (*Aspergillus oryzae*) produz ainda outro tipo de Lipase a CALA, a Lipase A é mais termoestável e mais específica em substratos grandes, por exemplo, nos triglicerídeos, enquanto que a Lipase B hidrolisa uma ampla gama de ésteres.³⁰ Diversos estudos sobre conformação, estrutura, propriedades e características da enzima CALB foram realizados, sendo uma enzima muito bem caracterizada.

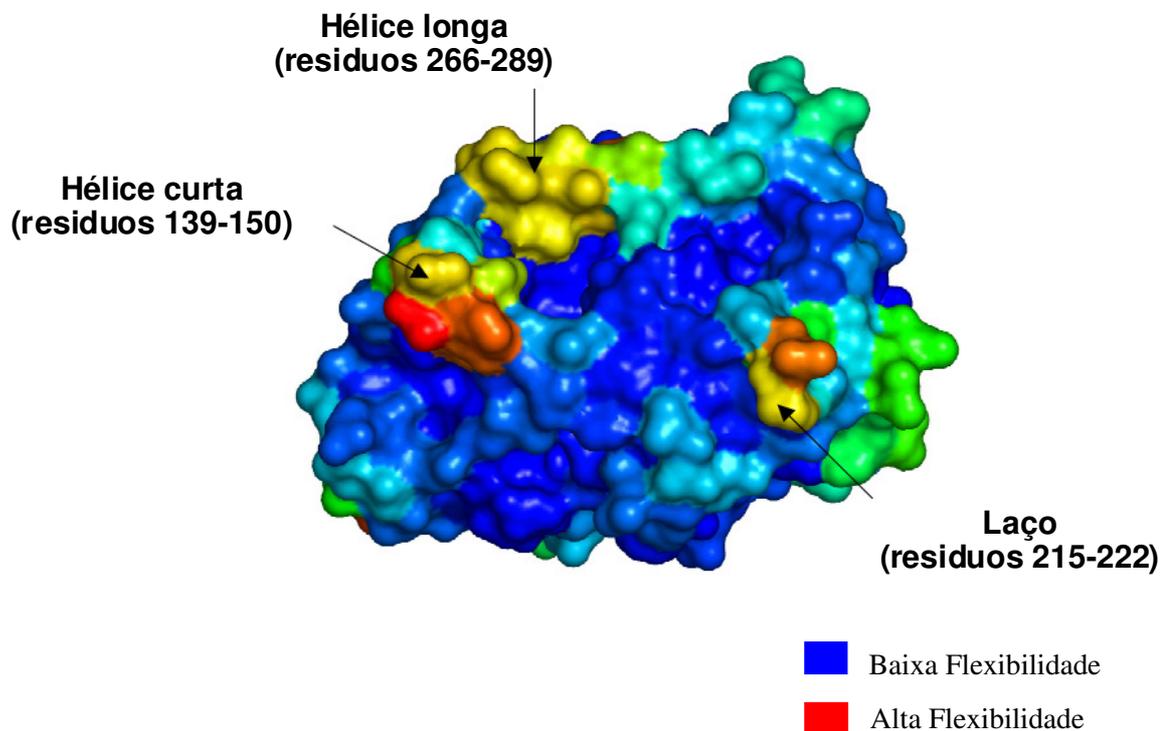
Figura 1.1 Estrutura cristalina da Lipase B de *Candida antarctica* suportando como ligante o açúcar N-Acetil-D-Glucosamina (22).^{31,5}



A Lipase CALB é uma proteína globular que apresenta 317 aminoácidos e um peso molecular estimado em 33 kDa, sua estrutura cristalina aponta a existência de uma α/β hidrolase com um centro ativo composto por uma tríade catalítica Ser105-His224-Asp187 (Figura 1.1).^{31,5}

Um estudo estrutural do centro ativo da enzima aponta a existência de uma hélice hidrofóbica responsável por uma das características mais apreciáveis da CALB a interface orgânica-água, essa hélice atua como uma superfície de ligação lipídica, onde ocorre à interface óleo-água. Trodler e Pleiss em 2008 fizeram um estudo de modelagem sobre a estrutura e flexibilidade da CALB frente a diferentes solventes orgânicos (Figura 1.1).³²

Figura 1.2 Flexibilidade na superfície estrutural do cristal da CALB frente a solventes apolares.



Os pesquisadores ao estudar a partir de simulações em água a flexibilidade da CALB mapeando a superfície estrutural do cristal, descobriram que a enzima possui flexibilidade reduzida em solventes não-polares essa redução não está apenas relacionada à interação entre as

moléculas do solvente orgânico e a proteína, mas também devido à interação com a água ligada a enzima na superfície do seu bolso localizado no sítio ativo enzimático.³²

A enzima CALB provou ser um catalisador versátil para uma ampla gama de biotransformações, proporcionando principalmente boa seletividade, estabilidade e enantiosseletividade na obtenção de alcoóis opticamente puros através de reações de hidrólises em água ou solvente orgânico em condições brandas.³³ A especificidade e alta estereosseletividade apresentada pela CALB são graças à existência no seu sítio ativo uma cavidade chamada de bolso de estereoespecificidade, no qual os enantiômeros de um determinado substrato são orientados estericamente durante a catálise.³⁴

1.5 Resolução Cinética

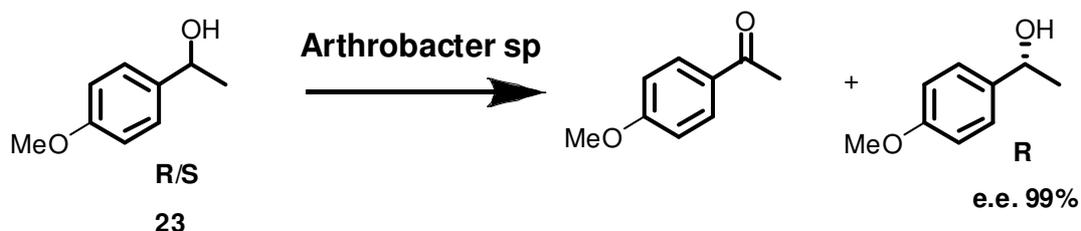
A possibilidade de obter substâncias opticamente puras e suas respectivas aplicações deve-se ao fato dos catalisadores biológicos, fazerem o reconhecimento de grupos pró-quirais, faces enantiotópicas e os enantiômeros de um racemato. Esse reconhecimento segundo A. G. Ogston ocorre devido à existência de três pontos de diferentes de interação entre o substrato e o sítio ativo da enzima (regra dos três pontos).^{35,36}

A resolução cinética de uma mistura racêmica como o próprio nome sugere é baseada nas diferenças de velocidades reacionais dos enantiômeros (R e S) em reações que utilizam reagentes assimétricos ou catalisadores quirais.³⁷ Cineticamente temos que a velocidade de uma reação que leva efetivamente a formação do produto é inversamente proporcional a variação de energia livre de Gibbs (ΔG^\ddagger) conseqüentemente as constantes de velocidade do enantiômero R e do enantiômero S de um dado composto são diferentes $k_R \neq k_S$, ou seja, o enantiômero que possui menor ΔG^\ddagger reage mais rapidamente que o outro resolvendo-se assim o racemato.^{38,5}

Esse fato não tira a possibilidade de ocorrer à reação do outro enantiômero complementar, porém como o catalisador biológico é específico ocorre uma ação mútua entre enzima e substrato obtendo-se na maioria das vezes grandes excessos enantioméricos. Por outro lado, a resolução cinética, apresenta uma limitação, consegue-se no máximo atingir 50% de conversão de um enantiômero do seu respectivo substrato quiral.³⁹

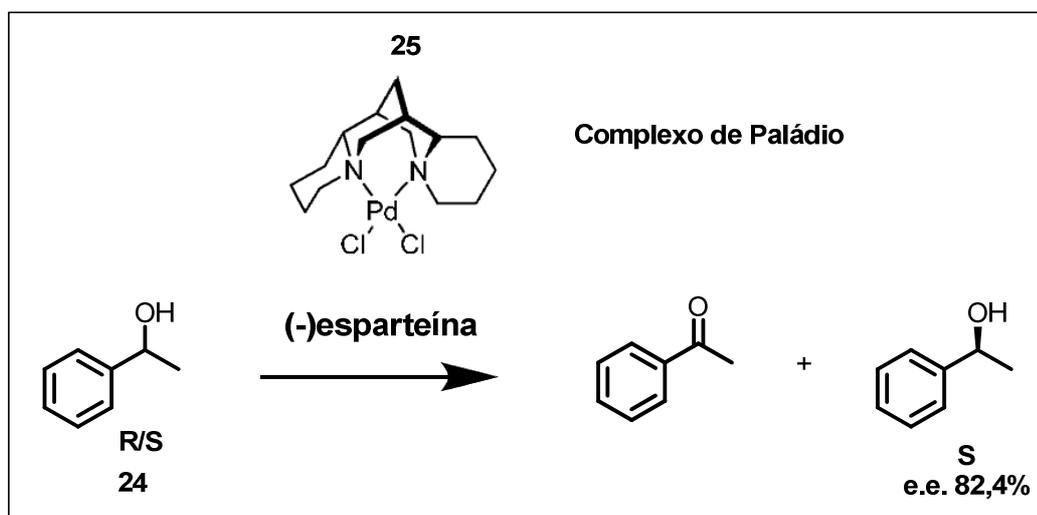
Na literatura têm-se relato de diversos compostos bioresolvidos principalmente alcoóis secundários, porém usando metodologias e biocatalisadores diferentes, geralmente enzimas disponíveis comercialmente ou células de microorganismos cultivadas e isoladas.⁴⁰ Temos a **Oxidação Enantiosseletiva** onde apenas um dos enantiômeros do álcool racêmico 1-(4-metóxfenil)etanol (**23**), é oxidado para cetona pelo biocatalisador enantiosseletivamente, obtendo assim o enantiômero R opticamente puro com 99% de e.e (Esquema 1.7).

Esquema 1.7 Exemplo de uma reação de Oxidação Enantiosseletiva sem a presença de metal.⁴¹



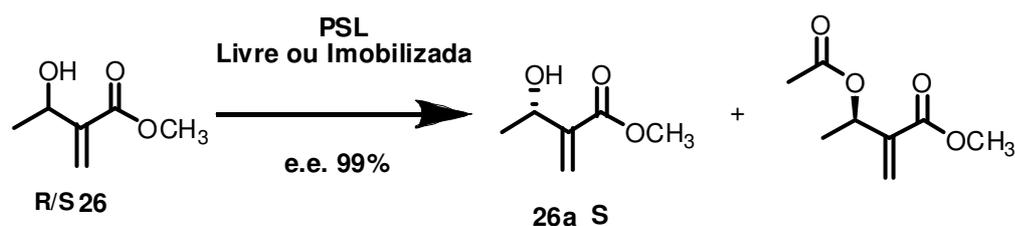
A *Arthrobacter sp.* apresentou excelente atividade enzimática na oxidação enantiosseletiva do álcool (R/S)- 1-(4-metóxfenil)etanol (**23**), (Esquema 1.7) acima. Outra metodologia bastante citada na literatura é a **Oxidação Enantiosseletiva** usando complexo contendo metal, como exemplo temos a oxidação do 1-Feniletanol (**24**), (Esquema 1.8).⁴¹

Esquema 1.8 Exemplo de uma reação de Oxidação Enantiosseletiva com a presença de metal.³³



Nesse trabalho desenvolvido por Muller constatou-se que sem a presença do complexo de paládio (**25**), a porcentagem de conversão é inferior a 1%.⁴² Outra metodologia muito reportada na literatura é o uso do agente acilante em reações de bio-resolução.⁴²

Esquema 1.9 Exemplo de uma reação com uso do agente acilante (Éster vinílico).⁴²



No Esquema 1.9 observamos a alta capacidade da enzima no reconhecimento molecular ao transferir o grupo acila para apenas um dos enantiômeros do (R/S)-AMBH (**26**) acima, e formação do S-AMBH (**26a**), opticamente puro. É importante ressaltar a importância na escolha do agente acilante e sua concentração nas reações, geralmente usa-se ésteres vinílicos visto que o grupamento vinil é um ótimo grupo abandonador.^{43,44} A técnica de resolução cinética a qual foi discutida

acima dá a possibilidade de obtenção de apenas um dos enantiômeros gerando um rendimento máximo de 50% de conversão.

Existe também a Resolução Cinética Dinâmica a qual supera essa limitação do poder conversivo, segundo a teoria de "Racemização", existe a possibilidade de se obter 100% de conversão do substrato quiral desejado, obtendo apenas um dos enantiômeros, porém, a grande desvantagem é complexidade no processo, muitas vezes é necessário o uso de combinações entre enzimas e substratos.⁴⁵ Diante dos exemplos de bio-resoluções apresentados aqui e de muitos outros disponíveis na literatura, não resta dúvidas da importância desta técnica para se obter compostos enantiomericamente puros. Vale frisar que a metodologia a ser usada no nosso trabalho será a resolução cinética, associada a sínteses orgânicas.

1.6 Leishmaniose

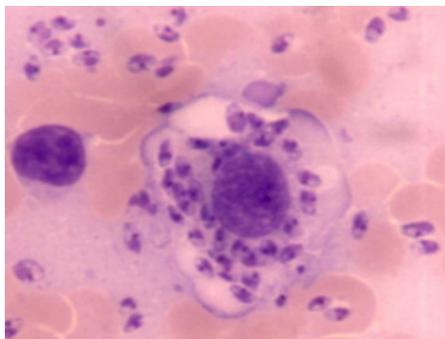
A leishmaniose ou Leishmaníase é uma doença causada por um protozoário unicelular do gênero *Leishmania*, da ordem *Kinetoplastida* e da família *Trypanosomatidae*. Existem várias espécies de *Leishmania* e todas são morfologicamente indistinguíveis as diferenciações para tratamento é feita através de anticorpos monoclonais e eletroforese com análise de isoenzimas ou análise genética, entre as espécies encontradas, a grande maioria das espécies de leishmaniose parasita o homem sendo considerada uma zoonose.⁴⁶ Temos como vetor responsável pela transmissão da leishmaniose na natureza as fêmeas hematófagas infectadas dos insetos denominados de flebotomíneos (Figura 1.3), pertencentes à Ordem Díptera, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae* e Gênero *Lutzomyia*, possuindo diversos nomes populares: mosquito-palha (cor de palha), birigui, péla égua, arrupiado, asa-dura, cangalhinha e etc.⁹

Figura 1.3 Fêmea do Flebotomíneo vetor da Leishmaniose. Fonte: www.ribeiraopreto.sp.gov.br.

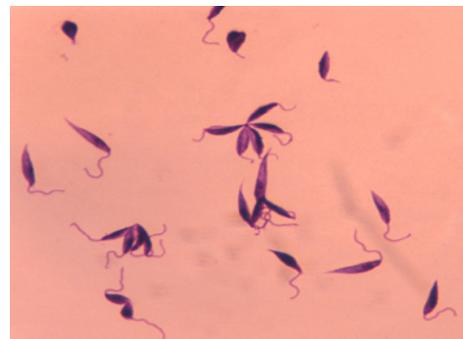


O protozoário causador da leishmaniose apresenta-se em duas formas celulares diferentes (Figura 1.4), as formas amastigotas e promastigotas (Figura 1.4c e 1.4d). As formas celulares amastigotas se desenvolvem e são encontradas no hospedeiro infectado possuindo um formato oval, enquanto que as formas promastigotas são encontradas apenas no vetor hospedeiro intermediário causador da doença “Mosquito Palha”, as células promastigotas possuem um flagelo rico em mitocôndrias que possibilitam movimentação facilitando assim o ciclo de vida do parasita.⁴⁷

Figura 1.4 Formas celulares do protozoário causador da Leishmania: (c) Amastigotas, (d) Promastigotas. Fonte: www.iwis.org.br



(c)

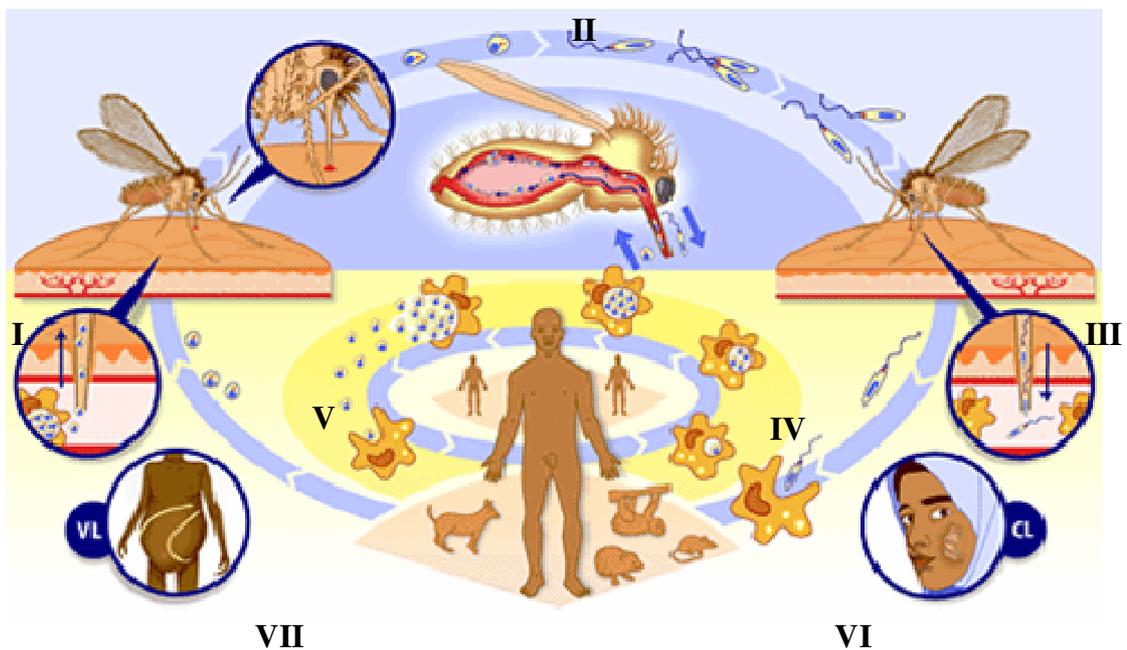


(d)

O ciclo biológico (Figura 1.5) inicia-se quando os flebotomíneos ingerem as formas amastigotas quando se alimentam do sangue infectado de um mamífero (**I**). Uma vez no tubo digestivo do inseto, estas formas diferenciam-se e replicam-se em promastigotas (**II**). Posteriormente, as formas promastigotas migram para a faringe misturando-se com a saliva e é repassado ao novo hospedeiro através da picada do inseto (**III**).

Na epiderme do hospedeiro, estas promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos onde no seu interior se diferenciam em amastigotas (**IV**). Estas amastigotas se multiplicam intensamente levando ao rompimento dos macrófagos e liberação destes parasitas, que serão fagocitadas por novos macrófagos, ocorrendo então à disseminação hematogênica para outros tecidos (**V**).⁴⁸

Figura 1.5 Ciclo de transmissão de parasitos do gênero *Leishmania* Fonte: Adaptado de <<http://calazar.zip.net/>>



As células parasitadas que migrarem para a epiderme causará a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (**VI**), porém se as células parasitadas migrarem para as vísceras temos a Leishmaniose Visceral Americana (LVA) (**VII**), também conhecida como calazar.

Segundo a Organização Mundial da Saúde 90% dos casos de leishmaniose visceral são registrados em Bangladesh, Brasil, Nepal, Índia e Sudão; 90 % dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem no Brasil, Bolívia e Peru e 90% dos casos da leishmaniose cutânea ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria.⁴⁹

Em relação ao tratamento das diversas formas de Leishmaniose a OMS incentiva o investimento em pesquisas de novas drogas.

As drogas a serem desenvolvidas visam o menor custo de produção, baixa toxicidade, redução dos efeitos colaterais e vias de administração menos dolorosa, estimulando a continuidade do tratamento pelo paciente espera-se que no futuro, possam existir drogas que proporcionem um tratamento mais ameno, uma vez que os tratamentos feitos atualmente é feito de maneira dolorosa, com injeções intralesionais.⁹

Capítulo 2:

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho tem como objetivo a bio-resolução cinética utilizando a enzima CALB (Lipase B de *Candida antarctica*) dos AMBH derivados dos *o*, *m* e *p* nitrobenzaldeídos e acrilonitrila, os quais possuem atividades biológicas estudadas apenas na forma racêmica (Leishmanicida, anti-Chagássica, anti-câncer, moluscicida entre outras), bem como um teste de atividade biológica inédito contra a forma antipromastigota do parasito *Leishmania braziliensis* comparando as bioatividades dos enantiômeros puros e o racemato do AMBH derivado do *m*-Nitro-benzaldeído.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Sintetizar os AMBH utilizando acrilonitrila e os aldeídos correspondentes.
- ✓ Sintetizar os ésteres dos respectivos AMBH utilizando cloreto de acetila.
- ✓ Desenvolver novos métodos de separação de enantiômeros dos AMBH racêmicos *via* cromatografia gasosa com colunas por fases quirais.
- ✓ Planejar, desenvolver e aperfeiçoar um método de bio-resolução dos AMBH quirais utilizando a enzima CALB (Lipase B de *Candida antarctica*), a fim de se obter excessos enanteoméricos altos ou até mesmo obter os enantiômeros opticamente puros.
- ✓ Bioavaliar a atividade específica dos enantiômeros isolados e a mistura racêmica *in vitro* dos AMBH contra a forma antipromastigota do parasito *Leishmania braziliensis*, bem como fazer o teste de

citotoxicidade em macrófagos murinos e obter seus índices terapêuticos (Laboratório Conveniado).

- ✓ Determinar a configuração absoluta do centro de quiralidade dos respectivos enantiômeros (R ou S) dos AMBH, utilizando a técnica de ressonância magnética nuclear de ^1H RMN ^1H através do "Método de Mosher".

- ✓ Medir a rotação óptica dos enantiômeros e determinar os respectivos $([\alpha]_D)$.

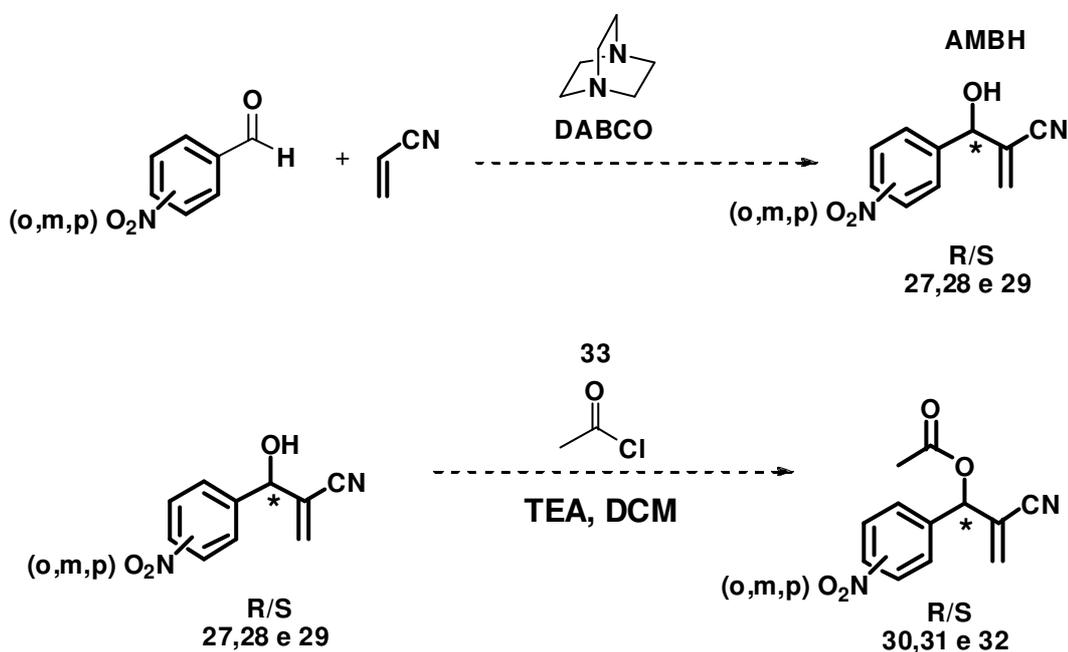
Capítulo 3:

Estratégias

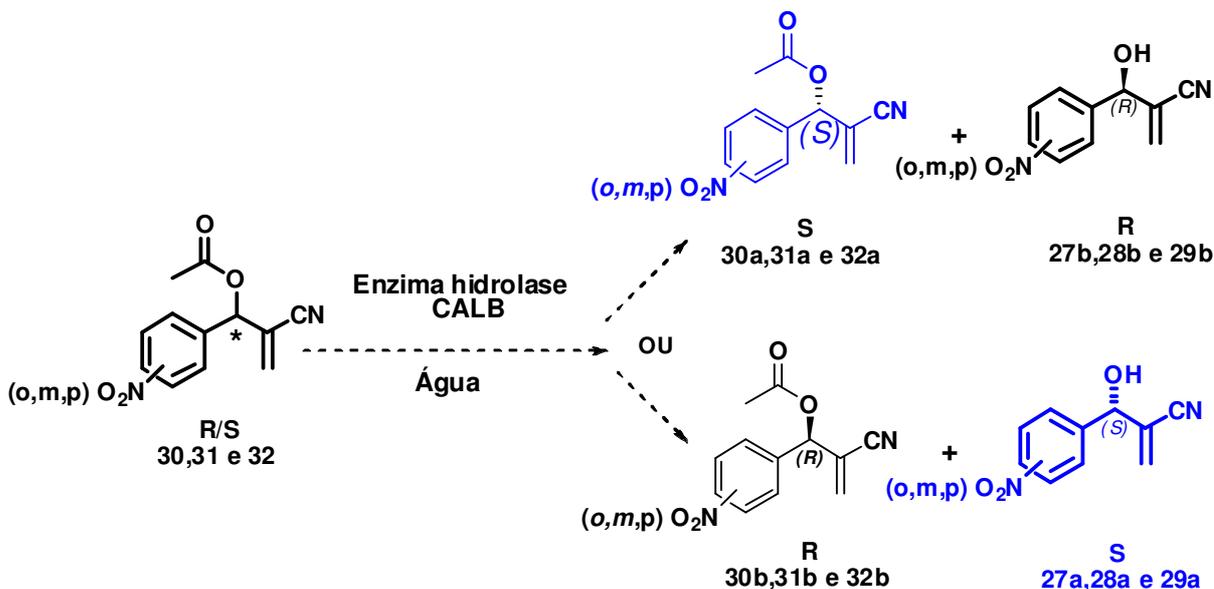
3. ESTRATÉGIAS

Diante do escopo geral do trabalho, pretende-se sintetizar e em seguida esterificar os AMBH racêmicos os quais são alcoóis secundários utilizando cloreto de acetila, (**33**) (Esquema 3.1), os acetatos formados serão hidrolisados posteriormente.

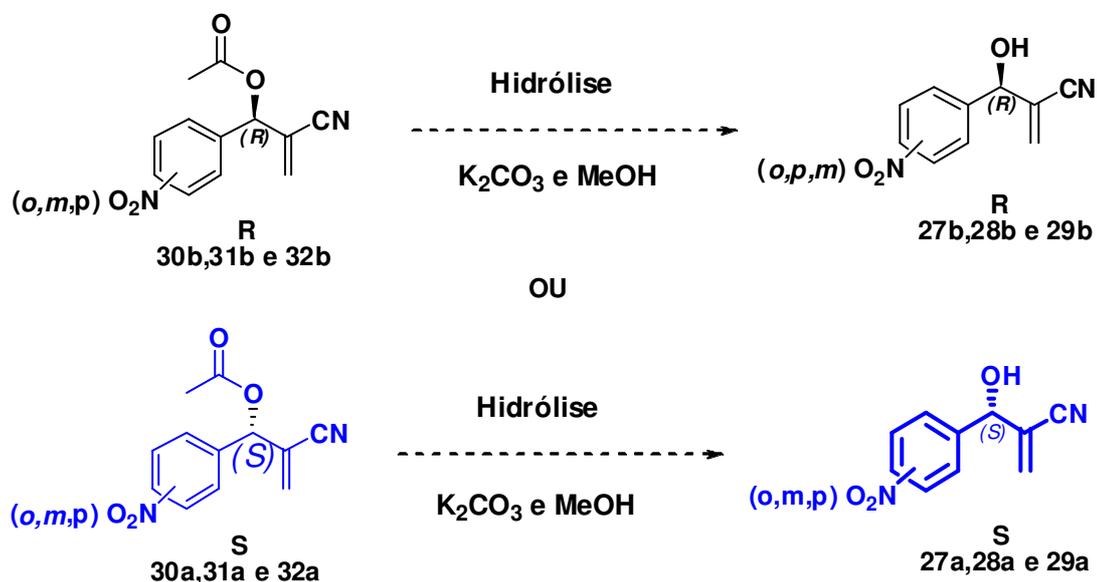
Esquema 3.1 Reações de preparação dos AMBH *o*, *m* e *p*, seguida de acetilação para a preparação dos acetatos provenientes dos AMBH.



A etapa seguinte (Esquema 3.2) serão as reações de biocatálise usando a enzima Lipase CALB e água como solvente. Espera-se que a enzima CALB atue seletivamente, hidrolisando apenas um dos enantiômeros dos respectivos ésteres, obtendo um dos enantiômeros dos respectivos AMBH.

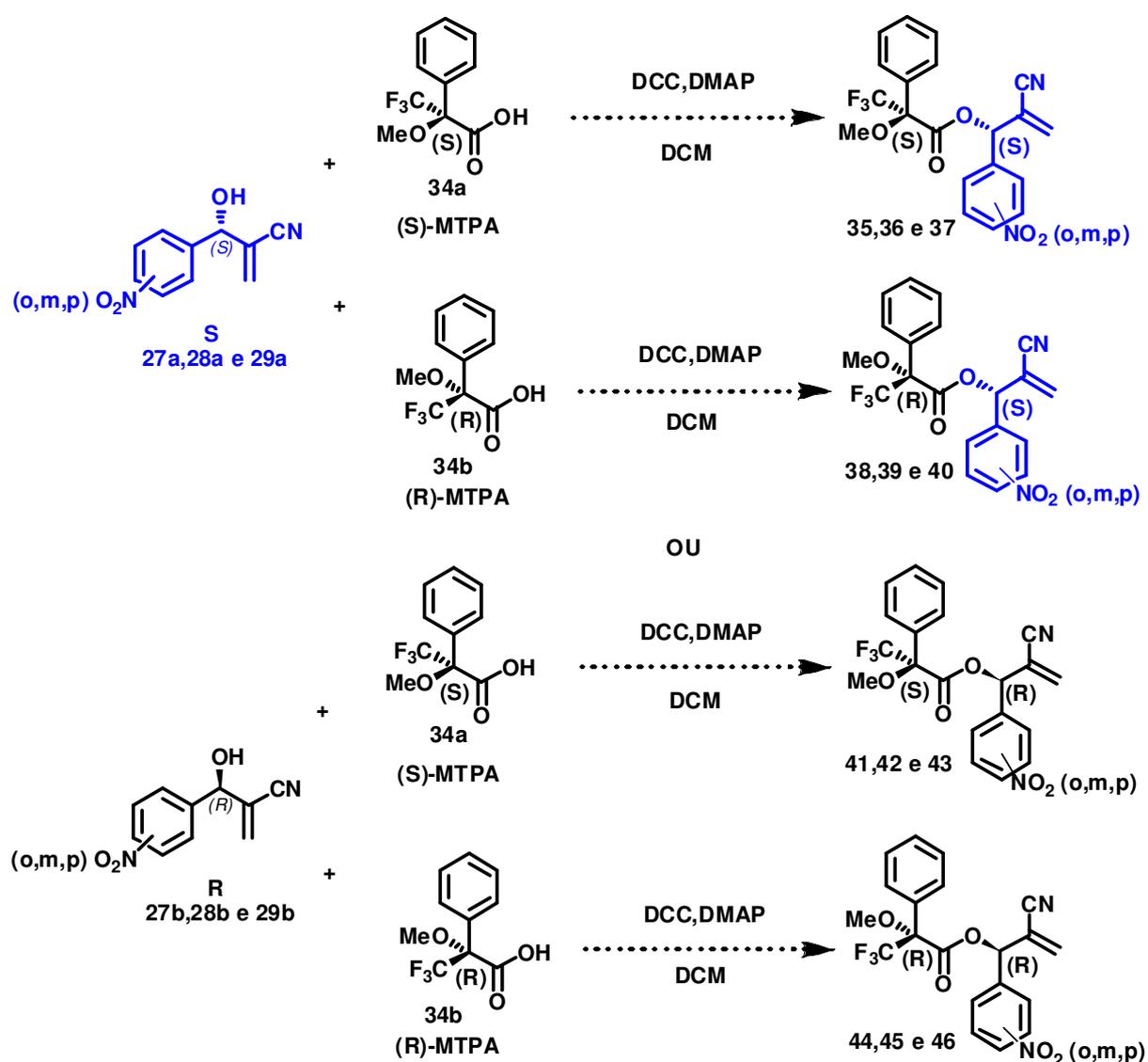
Esquema 3.2 Reações de Bio-resolução catalisadas pela Enzima CALB.

Os produtos das reações de biocatálise acima serão separados por cromatografia líquida, usando sílica como fase fixa e acetato de etila e hexano como eluente. As determinações dos excessos enantioméricos das estruturas serão feitas através de cromatografia gasosa usando coluna quiral com detector FID. Os acetatos remanescentes da (Esquema 3.3) serão hidrolisados usando K₂CO₃ e metanol como solvente a fim de se obter os outros enantiômeros dos AMBH complementares.

Esquema 3.3 Reações de hidrólise usando K₂CO₃ e Metanol como solvente dos ésteres provenientes das reações de bio-resolução.

A etapa subsequente representada pelo Esquema 3.4 será a determinação da configuração absoluta do carbono assimétrico dos enantiômeros dos AMBH resolvidos caso os mesmos sejam obtidos, através do “método de Mosher” usando a técnica da dupla derivatização. Espera-se determinar também se possível a rotação óptica das moléculas opticamente puras.

Esquema 3.4 Reações de esterificação entre os AMBH (*S* e *R*) com o (*S* e *R*)-MTPA de Mosher, e seus respectivos diastereoisômeros.



O Esquema 3.4 mostra o método da dupla derivatização e será utilizada a técnica de Ressonância Magnética Nuclear RMN¹H para

observar a influência do auxiliar de quiralidade (*R/S*)-MTPA (Acido- α -Metóxi- α -Trifluorometil- α -fenilacético) (34a e 34b) nos respectivos deslocamentos químicos dos hidrogênios dos respectivos ésteres diastereoisoméricos de Mosher (35 á 46).

A última etapa será a realização de uma avaliação *in vitro* contra a forma antipromastigota do parasito *Leishmania braziliensis*. Com os resultados, poderemos comparar as atividades dos enantiômeros isolados frente à atividade do racemato.

Capítulo 4:

Resultados

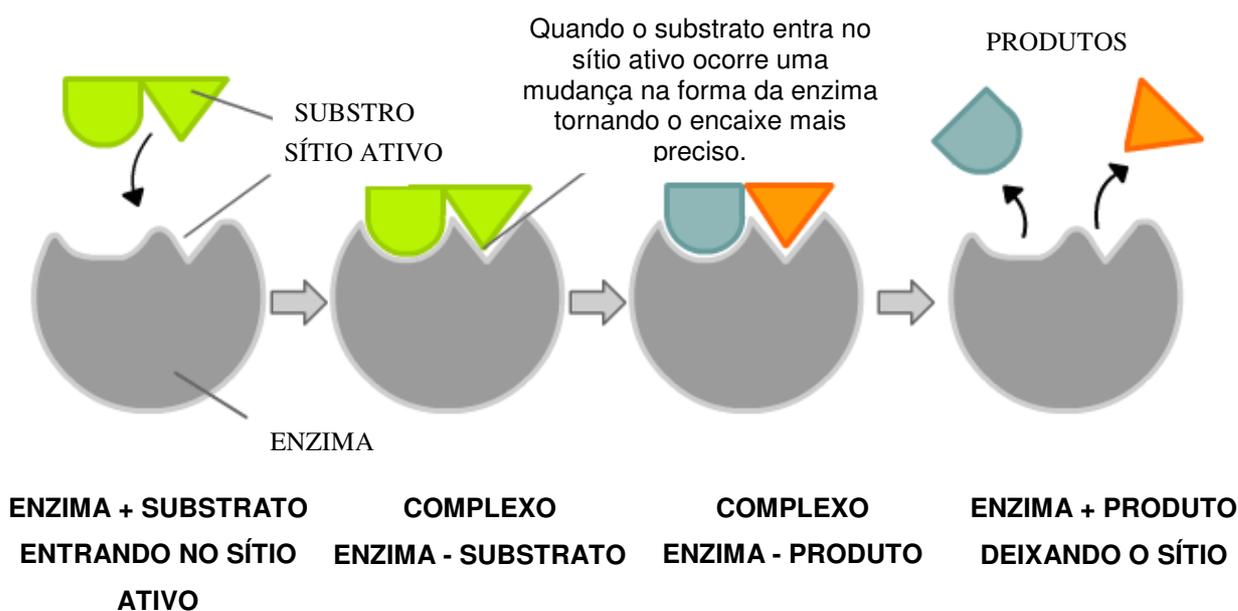
e

Discussões

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Este projeto está relacionado diretamente com a especificidade que as enzimas possuem frente a um determinado substrato quiral, interpretado pelo modelo “encaixe induzido” proposto por Koshland. A (Figura 4.1) tenta descrever o modelo proposto, mostrando que as enzimas não são estruturas totalmente rígidas, e sim estruturas sensíveis e maleáveis, mudando sua conformação durante a formação do complexo enzima-substrato.⁵⁰

Figura 4.1 Esquemática mostrando o mecanismo de “encaixe induzido” proposto por Koshland.



Dentre as enzimas mais usadas em reações de biocatálise temos as hidrolases, as quais participam de reações de hidrólises, dentre elas podemos citar a enzima CALB um tipo de Lipase derivada do fungo *Candida Antarctica* espera-se que as reações de bioresolução gerem AMBH enantiomericamente puros possibilitando o teste de atividade comparativo o qual foi discutido nas partes anteriores deste trabalho.

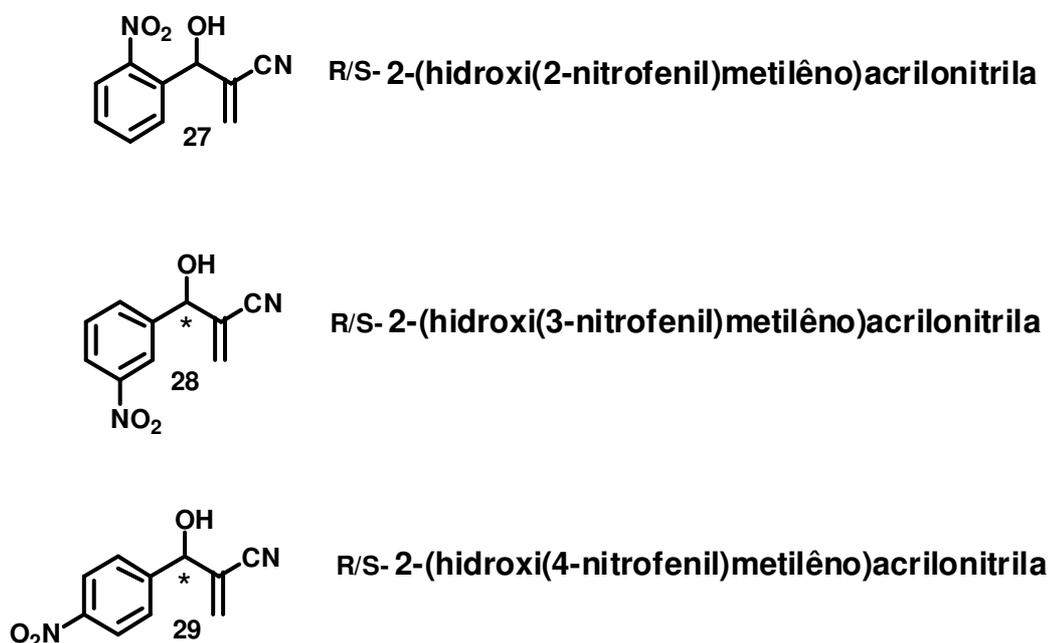
Nesta seção são apresentados os avanços e as dificuldades encontradas em cada etapa sintética desenvolvida neste trabalho,

juntamente com os resultados da avaliação contra a forma *Leishmania braziliensis* dos AMBH *m* [R/S (**28**), R (**28b**) e S (**28a**)].

4.1 Síntese dos adutos de Morita Baylis-Hillman utilizando a Acrilonitrila

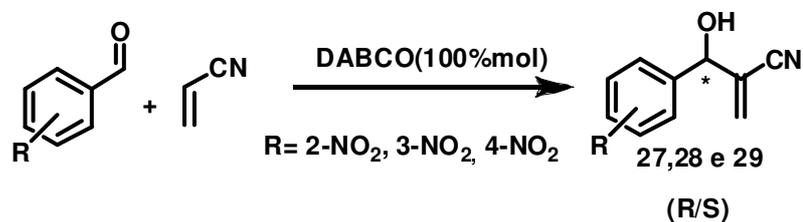
A pesquisa foi iniciada objetivando a escolha e síntese de uma classe de três AMBH cuja função química é álcool, os quais possuem em sua estrutura química um anel aromático substituído por um grupo nitro (NO₂) nas posições orto, meta e para. A escolha foi feita pela grande atividade Leishmanicida apresentada pelas moléculas racêmicas. Os Adutos de Morita Baylis-Hillman nitrados escolhidos estão mostrados na (Figura 4.2).⁵¹

Figura 4.2 Adutos de Morita Baylis-Hillman escolhidos para bio-resolução.



A preparação destes adutos foi feita utilizando a acrilonitrila como o grupo aceptor de Michael, seguindo a metodologia descrita na literatura.⁹ Essa metodologia faz o uso de 1mmol do respectivo aldeído, junto com 1mmol da Acrilonitrila em 100%mol de DABCO, submetidos às condições de temperatura ambiente (Esquema 4.1).

Esquema 4.1 Metodologia para a preparação dos adutos utilizando acrilonitrila a temperatura ambiente.



Estas reações foram acompanhadas pela técnica de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e os resultados obtidos estão descritos na Tabela 4.1.

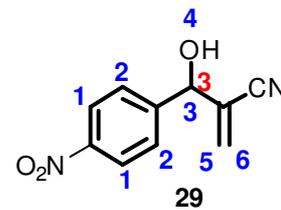
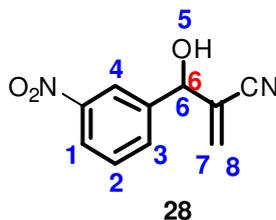
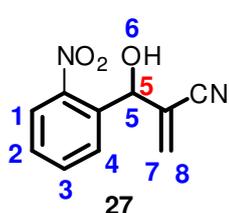
Tabela 4.1 Resultados da reação de preparação dos adutos usando acetonitrila como solvente a temperatura ambiente.

Aduto	Tempo	Rendimento
27	4 horas	90%
28	4 horas	95%
29	4 horas	100%

Pode-se ver na Tabela 4.1, que a metodologia experimental utilizada para a preparação dos adutos foi satisfatória, apresentando tempo e rendimento consideráveis. Tais resultados já eram esperados, visto que são reações bem efetivas como descrito na literatura.⁵¹

A identificação destes AMBH foi realizada através da avaliação dos espectros de IV, RMN¹H, RMN¹³C. Os principais dados espectroscópicos destes compostos estão listados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 Principais dados espectroscópicos dos AMBH sintetizados 27, 28 e 29.



AMBH	IV (cm ⁻¹)	RMN ¹ H (δppm)	RMN ¹³ C (δppm)
27	3452(-OH)	7,80 (<i>dd</i> , 8,8/4,0 Hz, 2H aromáticos); 7,97 (<i>dd</i> , 8,8/4,0 Hz, 2H aromáticos); 7,48 (<i>dd</i> , 4,0/1,2 Hz, 1H metilênico); 7,68 (<i>dd</i> , 4,0/1,2 Hz, 1H metilênico); 5,95 (<i>s</i> , 1H metínico).	132,02(carbinólico)
28	3345(-OH)	8,15 (<i>dd</i> , 8,8/4,0 Hz, 2H aromáticos); 8,22 (<i>dd</i> , 8,8/4,0 Hz, 2H aromáticos); 7,72 (<i>dd</i> , 4,0/1,2 Hz, 1H metilênico); 7,75 (<i>dd</i> , 4,0/1,2 Hz, 1H metilênico); 5,41 (1H metínico); 3,17 (<i>s</i> , 1H -OH).	132,08(carbinólico)
29	3481(-OH)	7,55 (<i>dd</i> , 8,8/4,0 Hz, 2H aromáticos); 8,19 (<i>dd</i> , 8,8/4,0 Hz, 2H aromáticos); 6,05 (<i>dd</i> , 4,0/1,2 Hz, 1H metilênico); 6,14 (<i>dd</i> , 4,0/1,2 Hz, 1H metilênico); 5,39 (1H metínico); 3,03 (<i>s</i> , 1H -OH).	127,27(carbinólico)

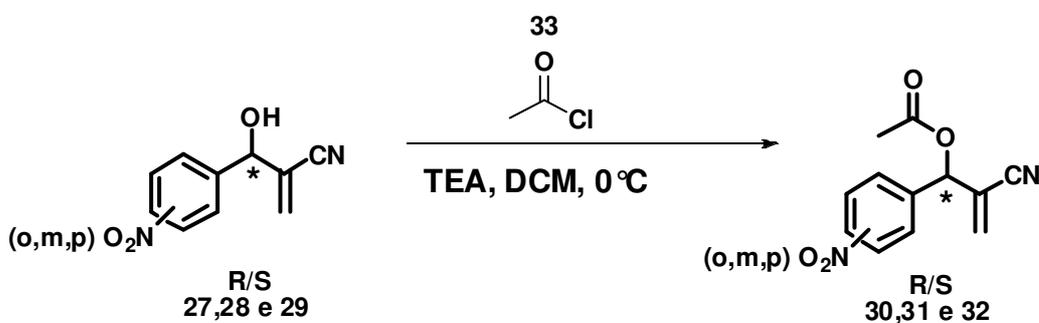
De forma geral, nos espectros de infravermelho, foi possível observar uma banda larga na faixa de 3345 e 3481 cm⁻¹ atribuída ao estiramento da ligação O-H. Nos espectros de RMN¹H dos AMBH foram observados a presença dos hidrogênios referentes aos anéis aromáticos, a presença dos hidrogênios metilênicos e metínicos. Para o AMBH nitrados *m* e *p* observou-se o hidrogênio referente a Hidroxila, porém para o AMBH

nitrado *o* não foi possível observá-lo. Nos espectros de RMN ^{13}C observou-se a presença de todos os carbonos e com destaque os sinais dos carbonos carbinólicos dos respectivos adutos. A estrutura dos AMBH foi confirmada de acordo com os dados da literatura.

4.2 Síntese dos respectivos ésteres dos AMBH utilizando Cloreto de Acetila, TEA e Dicloro metano como solvente

A segunda etapa de síntese deste trabalho envolveu uma reação de (Acetilação) para a preparação dos acetatos racêmicos (**30**, **31** e **32**) provenientes dos AMBH nitrados, que posteriormente foram hidrolisados pela Enzima CALB, com exceção do éster (**30**) que será discutido adiante. A proposta de síntese dos ésteres está representada pelo Esquema 4.2 Neste, utilizou-se o cloreto de acetila (**33**), TEA (trietilamina) e diclorometano como solvente, a 0°C .

Esquema 4.2 Metodologia inicial de acetilação para a preparação dos ésteres provenientes dos AMBH.



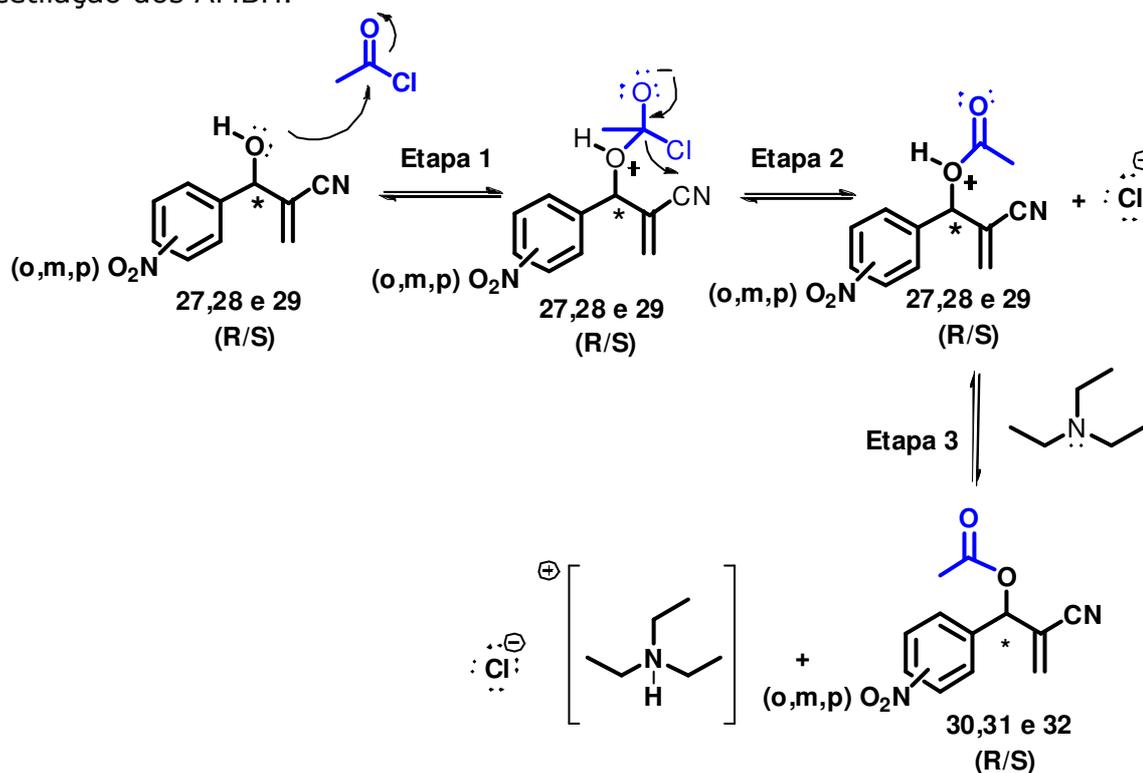
Estas reações foram acompanhadas pela técnica de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e os resultados obtidos estão descritos na (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 Resultados das reações de acetilações dos AMBH usando cloreto de acetila como solvente a temperatura ambiente.

Aduto	Tempo	Rendimento
30	6 horas	82%
31	5 horas	87%
32	4 horas	100%

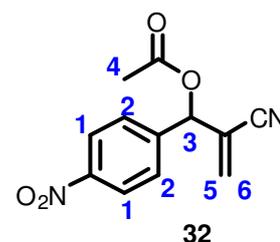
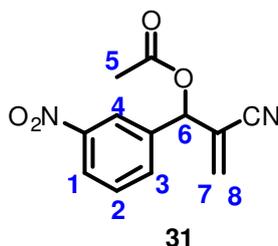
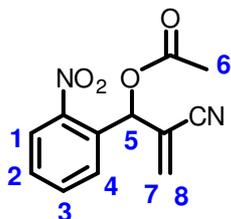
Este protocolo levou a formação dos produtos esperados, e com rendimentos bem acima do encontrado na literatura.⁵² No qual foi encontrado um único artigo com a reação acima e com rendimento inferior a 50%, porém usando outra metodologia. O (Esquema 4.3) a seguir mostra uma proposta de mecanismo do tipo S_NAcilica para as reações de acetilações. Na (Etapa 1) mostra o ataque nucleofílico a carbonila do cloreto de acetila essa é a etapa lenta da reação, a (Etapa 2) é rápida e ocorre a rehibridização do carbono da carbonila e expulsão do cloro na forma de cloreto.

Esquema 4.3 Proposta de mecanismo do tipo S_NAcilica para as reações de acetilação dos AMBH.



A etapa 3 finaliza o mecanismo no sentido direto da reação, onde a TEA neutraliza o hidrogênio oxônio formando como produtos os ésteres derivados dos AMBH e o sal de cloreto de amônio.

Tabela 4.4 Principais dados espectroscópicos dos Ésteres sintetizados 30, 31 e 32.



Ésteres	IV (cm ⁻¹)	RMN ¹ H (δ ppm)	RMN ¹³ C (δ ppm)
30	1751 (C=O)	7,78 (<i>m</i> , 1H aromáticos); 8,08 (<i>m</i> , 2H aromáticos); 7,76 (<i>m</i> , 1H aromáticos); 7,00 (<i>s</i> , 1H metínico); 6,16 (<i>s</i> , 2H metilênicos); 2,15 (<i>s</i> , 3H metílicos).	168,89 (Carbonila)
31	1751 (C=O)	8,15 (<i>dd</i> , 8,8/4,0 Hz, 2H aromáticos); 8,22 (<i>dd</i> , 8,8/4,0 Hz, 2H aromáticos); 7,72 (<i>dd</i> , 4,0/1,2 Hz, 1H metilênico); 7,75 (<i>dd</i> , 4,0/1,2 Hz, 1H metilênico); 5,17 (<i>s</i> , 1H metínico); 0,98 (<i>s</i> , 3H metílicos).	169,70 (Carbonila)
32	1751 (C=O)	7,78 (<i>m</i> , 1H aromático); 8,24 (<i>m</i> , 2H aromáticos); 7,65 (<i>m</i> , 1H aromáticos); 6,16 (<i>s</i> , 1H metínico); 5,17 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 1,2/0,7 Hz, 2H metilênico). 2,15 (<i>s</i> , 3H metílicos)	169,00 (Carbonila)

A identificação destes AMBH foi realizada através da avaliação dos espectros de IV, RMN¹H, RMN¹³C. Os principais dados espectroscópicos destes compostos estão listados na Tabela 4.4.

De forma geral, nos espectros de infravermelho, foi possível observar um forte estiramento na faixa de 1751 cm⁻¹, atribuídas à absorção da ligação C=O referente à carbonila de ésteres, e o desaparecimento da banda larga na faixa de 3345 e 3481 cm⁻¹ atribuída ao estiramento da ligação O-H. Nos espectros de RMN¹H dos AMBH foram observados a presença de multiplitos referentes aos anéis aromáticos, a presença dos hidrogênios metilênicos, metínicos e principalmente o aparecimento do singlete referente aos hidrogênios metílicos.

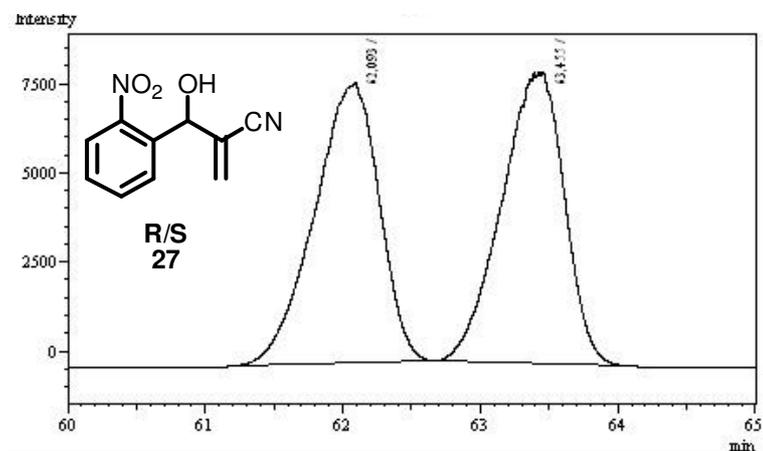
A presença do carbono da carbonila no espectro de RMN ¹³C na faixa de 168,89 e 169,70 ppm foi bastante importante para a elucidação destes compostos, pois ele confirma a presença da carbonila de éster (C=O) presente no acetatos. A estrutura dos AMBH foi confirmada de acordo com os dados da literatura.

4.3 Reações de Bio-resolução: Hidrólise dos Ésteres pela Enzima CALB (Lipase B de Candida antarctica)

O primeiro passo foi o desenvolvimento das metodologias de separação cromatográfica dos racematos (**27**, **28** e **29**) para serem utilizadas como padrão para observar os excessos enantioméricos das reações de bio-resolução e identificar os respectivos tempos de retenções dos enantiômeros que constituem os racematos.

A fase estacionária utilizada foi à coluna quiral beta ciclodextrina e a fase móvel foi o gás de arraste (N₂). A (Figura 4.3) abaixo trás os respectivos cromatogramas desenvolvidos bem como as condições de corrida.

Figura 4.3 Separação cromatográfica dos AMBH racêmicos, utilizando coluna quiral.

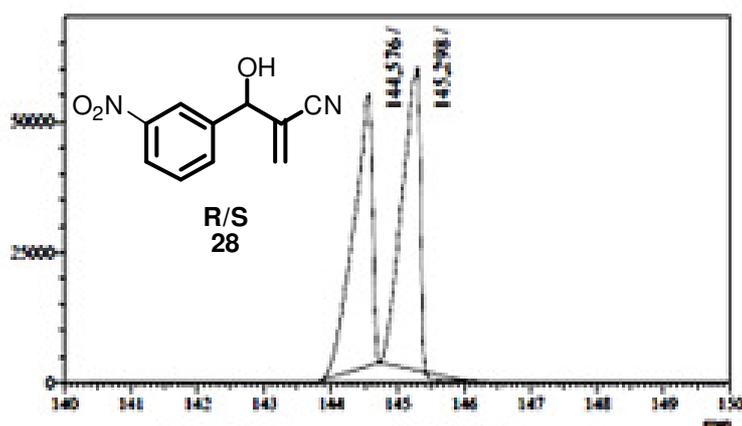


Peak#	Ret. Time	Area	Height	Height%	Area%
1	62,093	257562	7854	48,9606	49,8031
2	63,455	259599	8188	51,0394	50,1969
Total		517161	16042	100,0000	100,0000

Fluxo de gás = 0,5ml

Temperatura da coluna (Isoterma)= 180°C

Tempos de retenção P1 e P2 =62,09 e 63,45

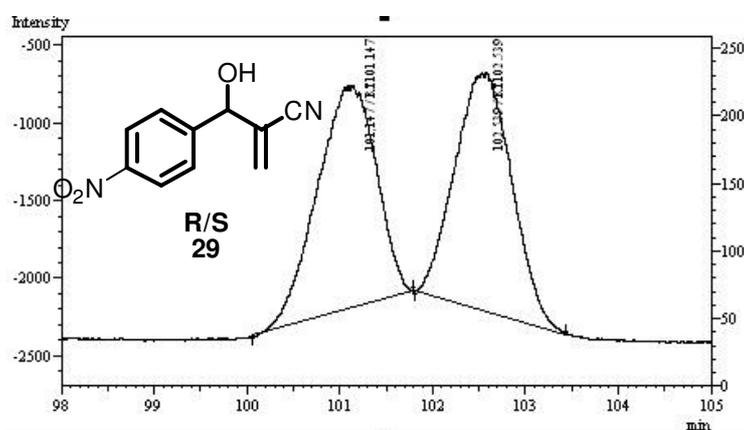


Peak#	Ret. Time	Area	Height	Height%	Area%
1	144,576	1054025	52007	47,2667	49,3929
2	145,298	1090242	58022	52,7333	50,6071

Fluxo de gás = 0,35ml

Temperatura da coluna (Isoterma)= 185 á 220°C

Tempos de retenção P1 e P2 = 144.57 e 145.29



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area%	Height%
1	101,147	63767	1433	49,2977	48,3158
2	102,539	65584	1533	50,7023	51,6842
Total		129351	2966	100,0000	100,0000

Fluxo de gás = 0,3ml

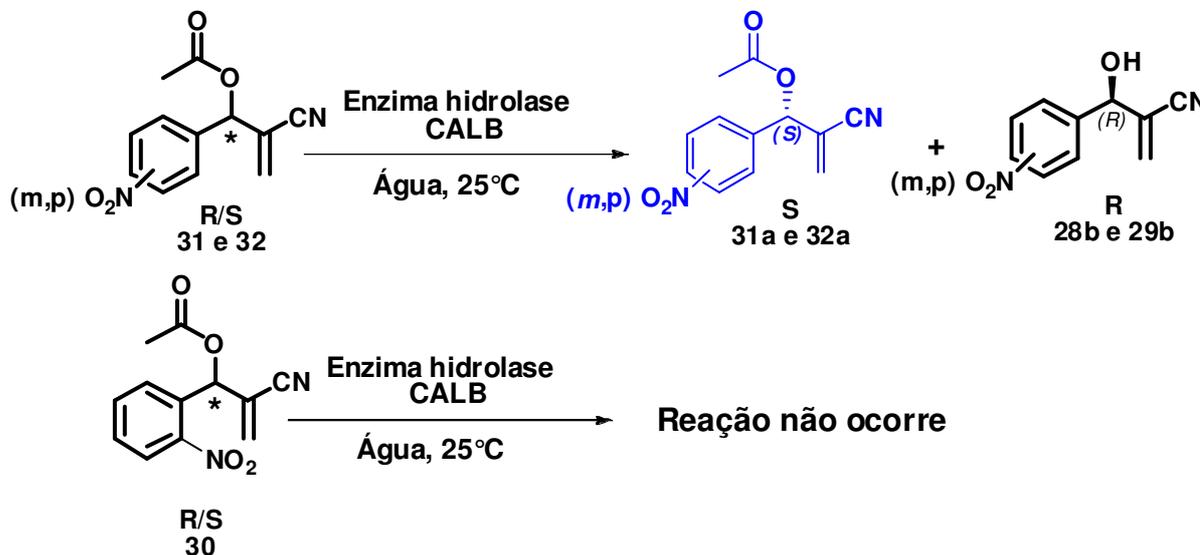
Temperatura da coluna (Isoterma)= 200°C

Tempos de retenção P1 e P2 = 101,14 e 102,539

Nos cromatogramas observa-se a existência de dois picos de aproximadamente mesma área e com tempos de retenção (**P1** e **P2**) diferentes. Isso acontece devido os enantiômeros interagirem diferentemente com a fase estacionária (beta ciclodextrina). Os cromatogramas mostrados aqui representam apenas uma determinada faixa de corrida, suficientemente necessária para identificação dos enantiômeros.

As reações de hidrólise foram realizadas com a enzima CALB comercial em meio reacional aquoso. Embora essa enzima seja bastante reativa em meio orgânico apolar, optamos por realizar a reação em água deionizada devido a baixa solubilidade dos adutos em hexano e heptano. Utilizamos a enzima CALB para as soluções dos três adutos mostrados conforme o Esquema 4.4.

Esquema 4.4 Reações de Bio-resolução dos ésteres racêmicos, catalisadas pela enzima CALB.



As reações de hidrólises catalisadas pela enzima Lipase CALB ocorreram apenas nos substratos (**31** e **32**) como mostra o (Esquema 4.4). Verificou-se que a enzima hidrolisa seletivamente os ésteres de configuração absoluta R, levando a formação dos enantiômeros R opticamente puros (**28b** e **29b**) respectivamente dos AMBH.

Estas reações foram acompanhadas pela técnica de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e análise em por cromatografia gasosa com coluna quiral para acompanhar a conversão e os excessos enantioméricos dos respectivos AMBH, os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 4.5.

Tabela 4. 5 Resultados das reações de hidrólise catalisadas pela CALB.

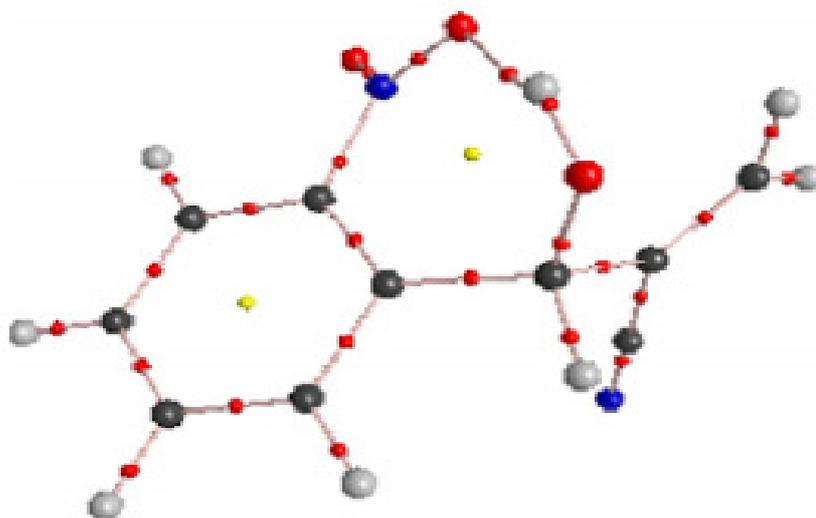
Éster Nitrado	Tempo	Rendimento (%) (R)-AMBH	Rendimento (%) (S)-Éster	e.e. % dos AMBH
<i>o</i>	30 dias		Não reagiu	
<i>m</i>	2 dias	42,9	47,6	99,3
<i>p</i>	2 dias	37,4	40,6	99,9

Na Tabela 4.5 mostra que a configuração absoluta do centro de quiralidade dos AMBH é *R*, mostrando que ela hidrolisa os ésteres *R*. Os excessos enantioméricos foram superiores a 99% determinados utilizando as áreas obtidas pelos cromatogramas mostrados na Figura 4.5 mais adiante.

Os ésteres e os AMBH opticamente ativos foram isolados e separados por cromatografia líquida usando sílica como fase estacionária e uma mistura de acetato de etila e hexano 10%-15%, gerando os rendimentos mostrados na Tabela 4.5. Ainda na Tabela 4.5 podemos notar que a reação de bio-resolução do éster (**30**) não ocorreu. Na tentativa de hidrólise, variamos as condições de reação tais como: pH, concentração da enzima Lipase CALB, concentração de substrato, tempo de reação (30 dias) e solvente, porém sem êxito. Uma possível explicação pode estar na posição orto do grupo nitro ligado ao anel aromático.

Em estudo teórico efetuado pelo nosso grupo de pesquisas no ano de 2007, foi caracterizado por QTAIM, a existência de uma Ligação de Hidrogênio Intramolecular (LHI) entre o oxigênio do grupo nitro e a hidroxila em (**27**) (Figura 4.4) ⁵³.

Figura 4.4 Caracterização da IHB no aduto (27) via QTAIM 53.

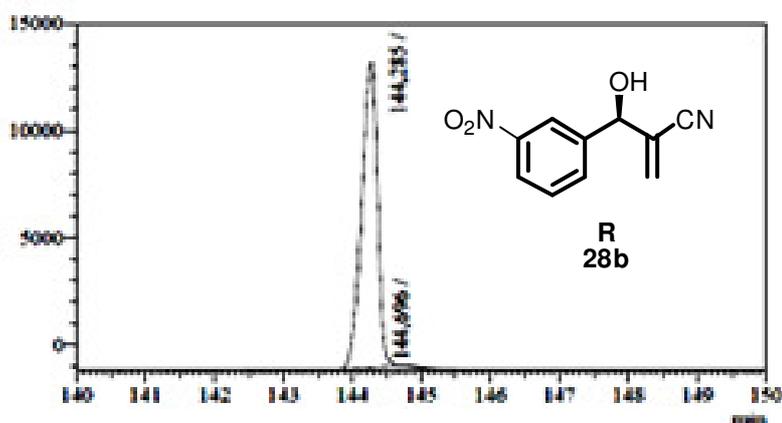


Essa comprovação teórica, embora a atuação da enzima seja no AMBH acetilado, serve para mostrar a proximidade entre o grupo nitro e a parte acetilada do AMBH que será hidrolisada no bolso da enzima e conseqüentemente ocorrerem às reações de hidrólise isso é apenas uma suposição devido a complexidade inerente no processo. Possa ser que esta modificação estérica conformacional particular, causada pelo grupo orto-nitro no AMBH possa impedir a atuação catalítica da enzima Lipase CALB, essa hipótese será estudada em um trabalho futuro o qual faremos a bio-resolução de AMBH com estruturas diferentes.

Dando seqüência ao trabalho, os resultados das análises cromatográficas das reações de bio-resolução para os AMBH S (**28a** e **29a**) estão descritos abaixo na Figura 4.5.

Para o AMBH (**27**) como já foi discutido, não foi possível analisar a reação de bio-resolução no cromatógrafo usando coluna quiral pelo fato de não ocorrer à reação de hidrólise. Os cromatogramas mostrados abaixo são referentes as reações de bio-resolução que geraram os AMBH nitrados *m* e *p* é (R), mais uma vez mais digo que será mostrado o método de determinação mais a frente neste capítulo.

Figura 4.5 Cromatografia dos AMBH R (28b e 29b) opticamente puros, obtidos através da bio-resolução com a enzima lipase CALB.

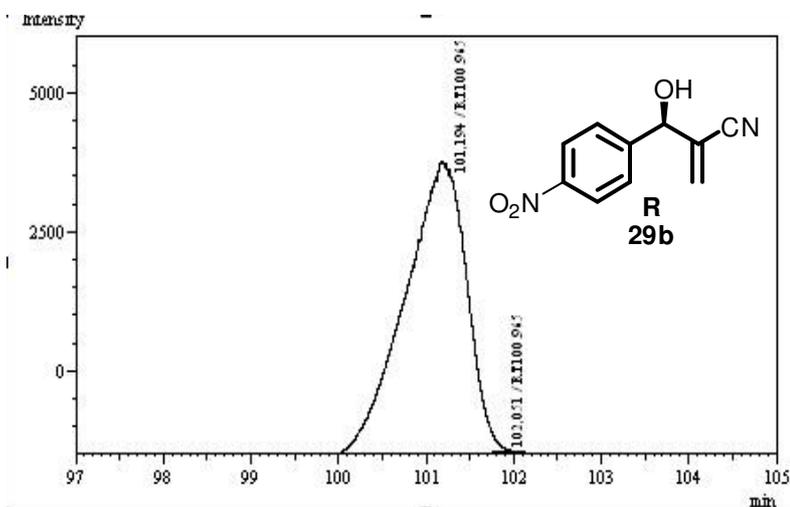


Peak#	Ret. Time	Area	Height	Height%	Area%
1	144.285	228275	14273	99.9992	99.9981
2	144.696	271	0	0.0008	0.1187

Fluxo de gás = 0,35ml

Temperatura da coluna (Isoterma)= 185 á 220°C

Tempo de retenção P1 = 144,28



Ret. Time	Area	Height	Height%	Area%
.01,194	262275	5296	99,9278	99,5638
.02,051	1149	4	0,0722	0,4362
Total	263424	5300	100,0000	100,0000

Fluxo de gás = 0,3ml

Temperatura da coluna (Isoterma)= 200°C

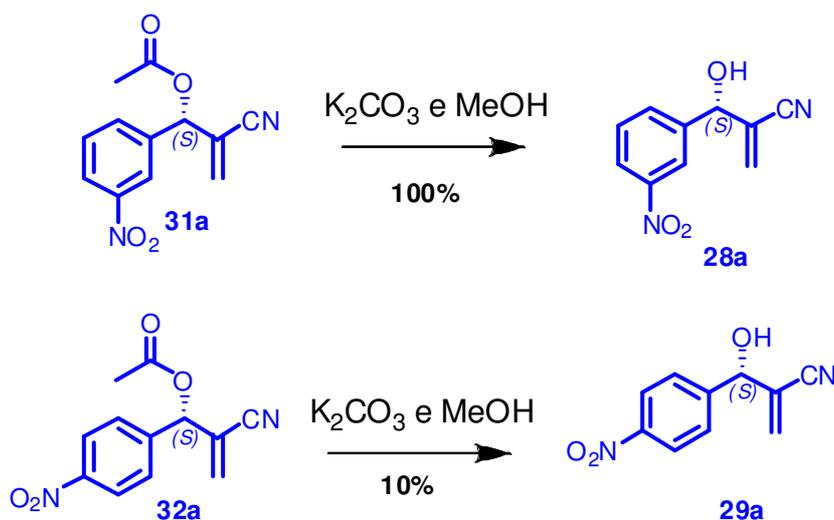
Tempos de retenção P1 = 101,19

De acordo com a Figura 4.5 acima, obtivemos ótimos resultados na bio-resolução dos AMBH (**28** e **29**), observamos nos cromatogramas quase que a existência de apenas um único pico, com tempos de retenções bem próximos dos picos dos cromatogramas dos respectivos racematos mostrados anteriormente. Tivemos quase que uma completa separação enantiomérica obtendo excessos enantioméricos (e.e.) para o AMBH (**28**) de 99,3% e 99,9% para o AMBH (**29**). Esse resultado é inédito na literatura para essas moléculas, isso mostra a grande enantiosseletividade da enzima Lipase CALB, o modelo encaixe induzido atuando.

4.4 Reações de hidrólise usando K_2CO_3 e Metanol como solvente, dos ésteres-S remanescentes das reações de bio-resolução

Dando sequência ao trabalho, a próxima etapa foi às sínteses dos outros enantiômeros dos AMBH S (**28a** e **29a**), para isso necessitou-se hidrolisar os respectivos ésteres S (**31a** e **32a**) provenientes da reação de biocatálise e devidamente separados por cromatografia líquida. As reações de hidrólise foram feitas usando K_2CO_3 e Metanol como solvente em banho de gelo como representadas no Esquema 4.5.

Esquema 4.5 Reações de hidrólises utilizando K_2CO_3 e Metanol dos ésteres nitrados-(S) m e p, para obtenção dos AMBH nitrados (S) m e p.

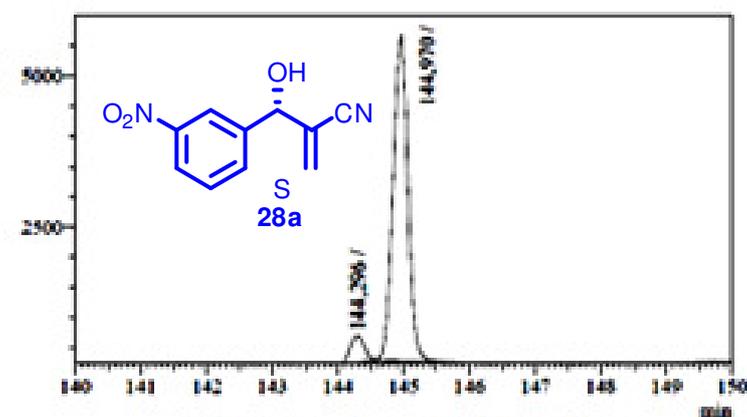


Essas reações de hidrólises usando essa metodologia geraram os AMBH S (**28a** e **29a**) complementares das respectivas misturas racêmicas. A conversão para obtenção de **28a** foi de 100% um ótimo resultado, porém na obtenção de **29a** tivemos uma conversão de apenas 10%, e formação de outro produto durante a reação, observamos que ocorre a formação do AMBH seguida de sua degradação. Essa discrepância na conversão para o AMBH nitrado *p*, pode ter haver com o efeito eletrônico do substituindo nitro nesta posição. O grupo nitro na posição *p* gerará uma forma canônica que possui uma deficiência eletrônica no carbono vizinho ao carbono assimétrico que possui um hidrogênio

tornando-o mais ácido, conseqüentemente sua base conjugada mais estável visto que o meio é básico. Por ressonância eletrônica isso pode gerar um intermediário mais estável levando a formação de um produto químico diferente do esperado.

A identificação da obtenção dos AMBH S foi feita novamente pela análise cromatográfica usando o mesmo método e condições de corrida usadas anteriormente nas reações de bio-resolução. Os resultados obtidos experimentalmente são mostrados na Figura 4.6.

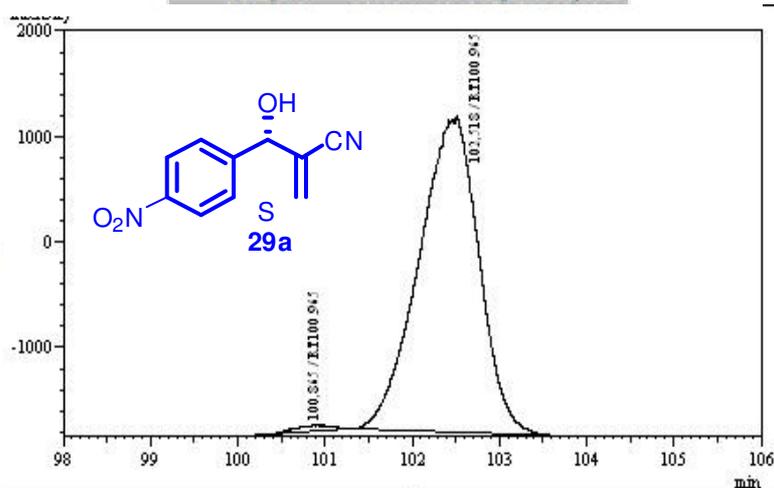
Figura 4.6 Cromatogramas dos AMBH S (28a e 29a) opticamente puros, obtidos através da hidrólise usando K_2CO_3 e Metanol.



Fluxo de gás = 0,35ml

Temperatura da coluna (Isoterma)= 185 á 220°C

Tempo de retenção P2 = 144.97



Fluxo de gás = 0,3ml

Temperatura da coluna (Isoterma)= 200°C

Tempos de retenção P2 = 102,51

De acordo com a Figura 4.6 acima, obtivemos também ótimos resultados na obtenção dos AMBH complementares opticamente puros, observamos novamente nos cromatogramas, quase a existência de apenas um único pico, com mesmo tempo de retenção, porém complementar aos picos dos cromatogramas dos respectivos racematos. Tivemos também altos excessos enantioméricos (e.e.) para o AMBH S **28a** de 86.8% e 97,48% para o AMBH **29a**.

Com os resultados desses cromatogramas chegamos à completa separação dos enantiômeros das respectivas misturas racêmicas, esses resultados são de grande importância frente à “tecnologia quiral”. Desenvolvemos uma metodologia de separação dos enantiômeros para os AMBH (**28** e **29**). São resultados promissores, pois essas moléculas possuem diversas atividades biológicas tais como (Leishmanicida, anti-Chagássica, anti-câncer, moluscicida entre outras) essas atividades foram recentemente revisadas pelo nosso grupo.⁵⁴

Após a separação dos enantiômeros utilizando a resolução cinética com a enzima CALB, determinou-se as rotações ópticas e seus respectivos $[\alpha]_D$, dos enantiômeros R dos AMBH (**28b** e **29b**) bem como dos respectivos ésteres S (31a e 32a) a (Tabela 4.6) possui os valores determinados.

Tabela 4.6 Valores de $[\alpha]_D$ dos AMBH R e dos ésteres S opticamente puros medidos a 25°C, c=1,6g/100 mL em CHCl₃.

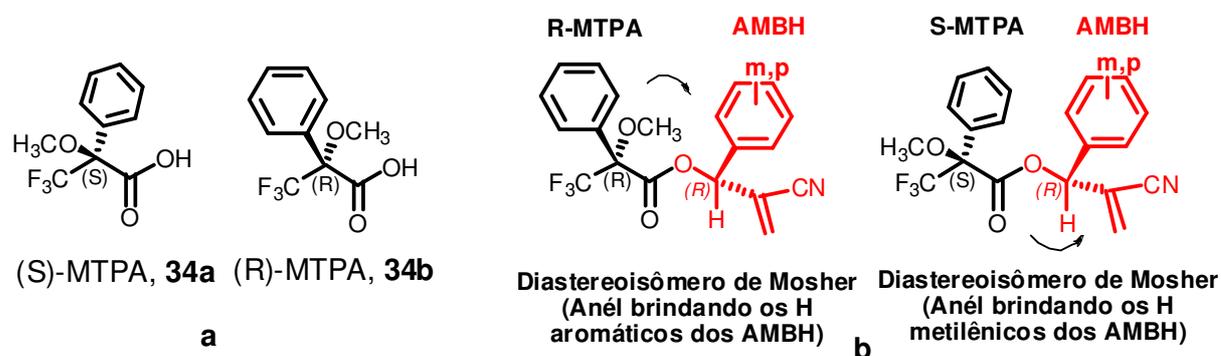
Estruturas AMBH (R)	$[\alpha]_D$
28b	+37
29b	+30
Ésteres (S)	
31a	-7
32a	-9

4.5 Determinação da configuração absoluta dos AMBH R (28b e 29b) usando a técnica de Mosher (dupla derivatização)

Dando sequência ao trabalho, determinaram-se a configuração absoluta dos enantiômeros dos AMBH nitrados *m* e *p* opticamente puros derivados dos respectivos acetatos os quais a enzima CALB hidrolisava. Usou-se o protocolo da dupla derivatização desenvolvido por Mosher em 1973.⁵⁵

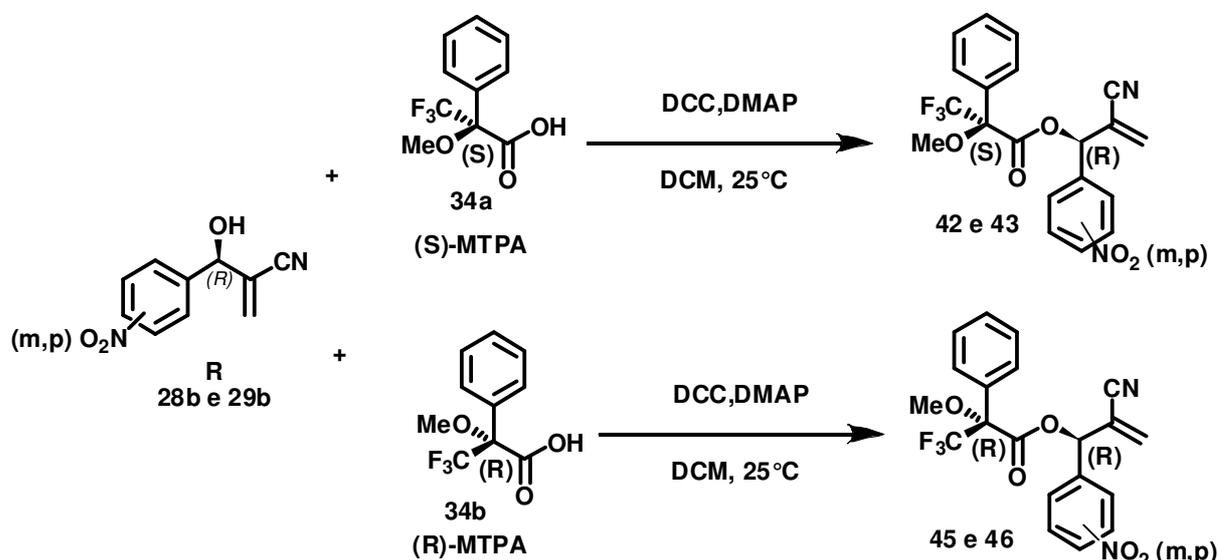
O interesse despertado por este método baseia-se tanto na possibilidade de trabalhar com amostras em pequenas quantidades, quanto devido a sua simplicidade. Entretanto, este método requer a presença de grupos funcionais específicos na molécula, tais como $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{NH}_2$ e $-\text{OH}$, necessários para ligar o substrato ao reagente. Portanto, mostra-se útil apenas para alcoóis primários e secundários, amins primárias e secundárias e para ácidos carboxílicos⁵⁶. A técnica utiliza-se de auxiliares de quiralidade opticamente puros (Figura 4.7a) que possuem em suas estruturas químicas substituintes aromáticos que irão interagir com os hidrogênios dos respectivos substratos (Figura 4.7b) os quais se pretende determinar a configuração absoluta, essa interação ocorre na forma de blindagem eletrônica que será observada pelos espectros de RMN¹H obtidos experimentalmente sob mesmas condições de análises.

Figura 4.7 Auxiliares de quiralidade (R/S-MTPA) e os diastereoisômeros de Mosher mostrando a blindagem eletrônica nos hidrogênios dos AMBH-R.



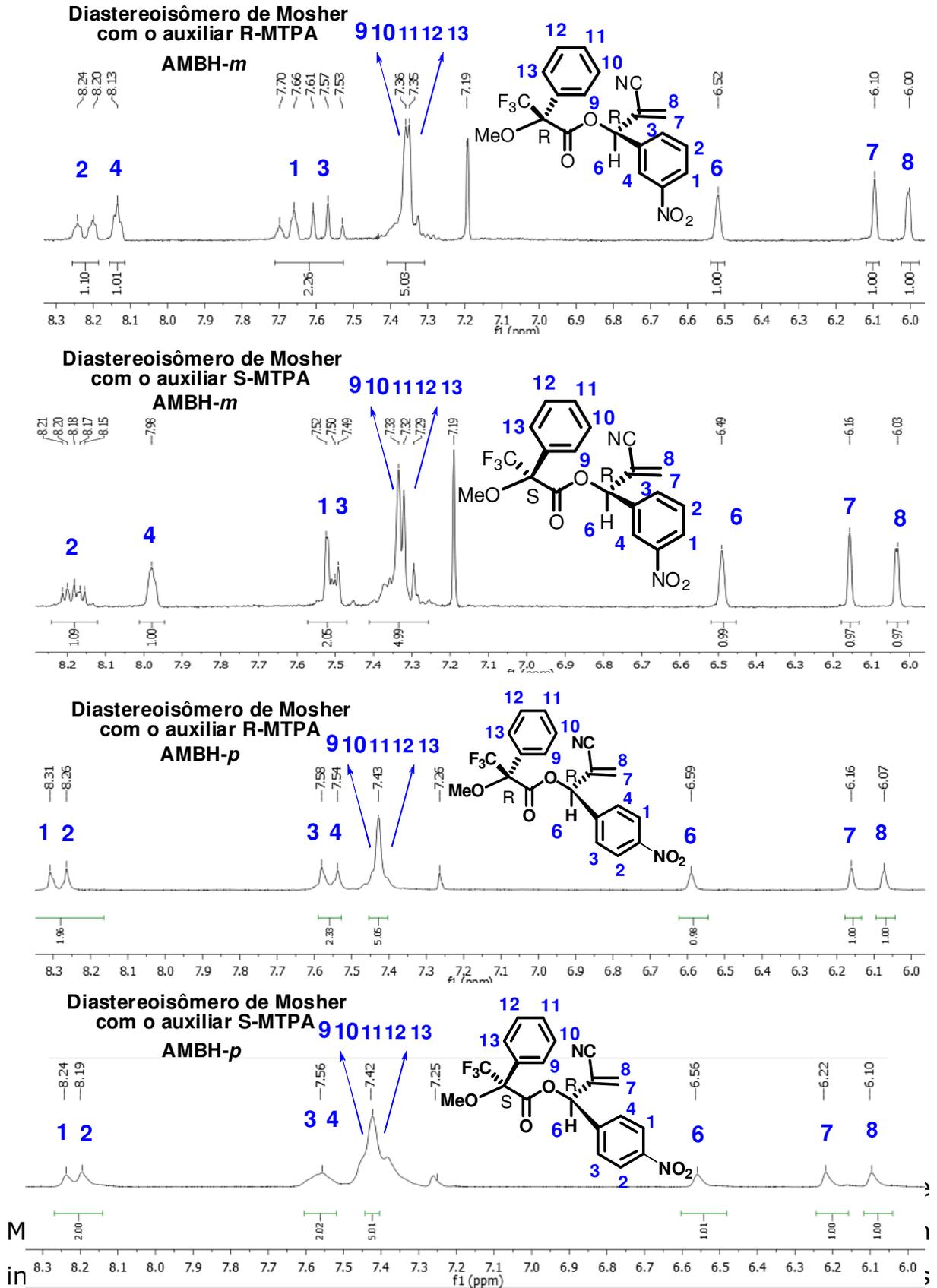
Os auxiliares de quiralidade utilizados experimentalmente foram os respectivos ácidos carboxílicos de Mosher (*R*)-MTPA e (*S*)-MTPA (Acido- α -Metóxi- α -Trifluorometil- α -fenilacético) e estão representados na Figura 4.6a. As reações de esterificação dos AMBH R (**28b** e **29b**) com os respectivos ácidos carboxílicos de Mosher (*R*)-MTPA e (*S*)-MTPA (Acido- α -Metóxi- α -Trifluorometil- α -fenilacético) enantiomericamente puros estão representadas no Esquema 4.6.⁵⁷

Esquema 4.6 Reações de esterificação de Mosher através da dupla derivatização com os AMBH (R) e os auxiliares de quiralidade R-MTPA e S-MTPA.



Essas reações foram bem trabalhosas devido às dificuldades de purificação, e serem realizadas em pequena escala, partindo apenas de 20mg do álcool opticamente puro. Porém obtivemos rendimentos regulares acima de 65%, depois que os dois ésteres diastereoisoméricos são preparados, seus espectros de RMN¹H foram registrados e comparados nas mesmas condições de solvente (CHCl₃), temperatura (25°C) e concentração (8mg/ml). Na Figura 4.8 abaixo temos os espectros de RMN¹H para os quatro diastereoisômeros obtidos com os R e S-MTPA e os AMBH nitrado *m* e *p*.

Figura 4.8 Expansão dos espectros de RMN1H na faixa de (6,0 - 8,3 ppm) dos diastereoisômeros de Mosher.



Da Figura 4.8 observamos que no diastereoisômero de Mosher R observamos que ocorreu uma blindagem nos hidrogênios metilênicos do *m*-AMBH enquanto que no diastereoisômero de Mosher S ocorreram blindagem nos hidrogênios aromáticos, isso determina que a configuração eletrônica do *m*-AMBH é R. Para o *p*-AMBH observamos o mesmo comportamento de blindagem e desblindagem eletrônica apresentado pelo *m*-AMBH, confirmando também que a configuração do carbono assimétrico do *p*-AMBH é R.

Tabela 4.7 Valores específicos de deslocamentos químicos de RMN de ¹H para os diastereoisômeros de Mosher, bem como as magnitudes das medidas de Δδ^{RS}.

AMBH- <i>m</i>		δ _H		
Diastereoisômero de Mosher (R)-MTPA	Diastereoisômero de Mosher (S)-MTPA			Δδ ^{RS}
H1- 6.10	H1- 6.16	Δδ ^{RS} < 0		-0,06
H2- 6.00	H2- 6.03			-0,03
H3- 8.13	H3- 7.98			0,15
H4- 8.22	H4- 8.18			0,04
H7- 7.61	H7- 7.50	Δδ ^{RS} > 0		0,11
H8- 7.61	H8- 7.50			0,11

AMBH- <i>p</i>		δ _H		
Diastereoisômero de Mosher (R)-MTPA	Diastereoisômero de Mosher (S)-MTPA			Δδ ^{RS}
H1- 6.07	H1- 6.10	Δδ ^{RS} < 0		-0,03
H2- 6.16	H2- 6.22			-0,06
H3- 8.26	H3- 8.19			0,07
H4- 8.31	H4- 8.24			0,07
H7- 7.56	H7- 7.54	Δδ ^{RS} > 0		0,02
H8- 7.58	H8- 7.56			0,02

A Tabela 4.7 trás os valores de deslocamentos químicos dos hidrogênios metilênicos e aromáticos que sofreram o efeito de blindagem dos reagentes auxiliares de Mosher, os valores geraram um $\Delta\delta^{\text{RS}} > 0$ e $\Delta\delta^{\text{RS}} < 0$ confirmando que a configuração absoluta do carbono assimétrico dos AMBH nitrados *m* e *p* é R, com isso concluímos que a enzima hidrolisa os enantiômeros R dos respectivos acetatos.

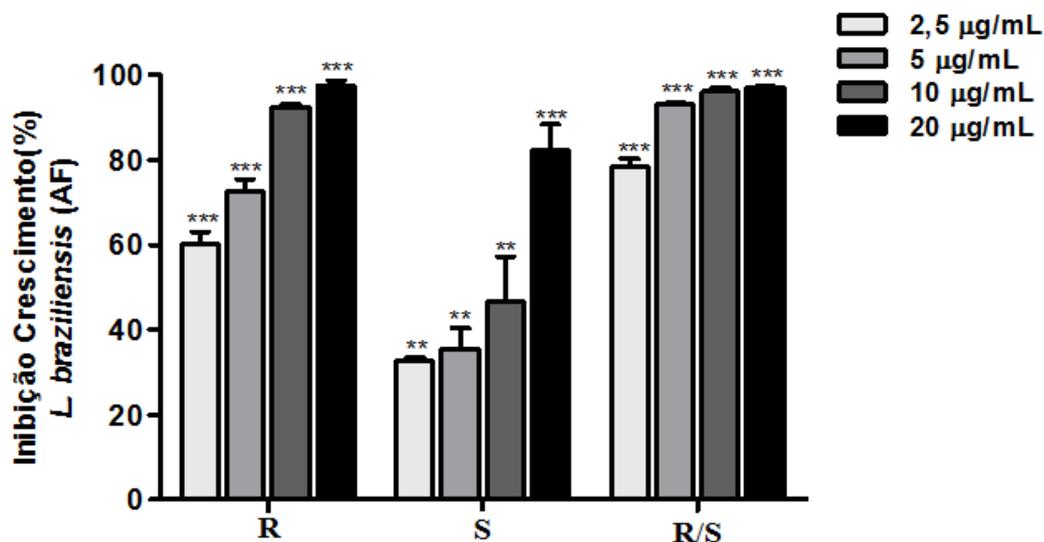
4.6 Atividade antipromastigota contra *Leishmania braziliensis* dos AMBH (28 S/R, 28b R e 28a S)

Todos os testes de atividades biológicas antes do nosso trabalho foram feitos usando apenas o racemato. Esse trabalho desenvolvido possibilitou um novo teste de atividade biológica com os enantiômeros separados e o racemato e ver suas respectivas ações biológicas, pois sabemos que fármacos quirais interagem diferentemente nos organismos.

Sabe-se que os enantiômeros de fármacos quirais podem causar efeitos benéficos ou maléficos ou até mesmo apenas um dos enantiômeros possuir atividade para determinada patologia. Diante disso, se faz necessário refazer o teste de atividade biológica contra as formas antipromastigotas de *Leishmania braziliensis* usando as estruturas (**28**, **28b** e **28a**) do (AMBH- *m* -NO₂) e verificar os resultados para efeitos comparativos.

Para avaliar a atividade antipromastigota das substâncias os ensaios foram realizados sob crescimento de formas antipromastigotas de *L. braziliensis* cultivadas na presença dessas moléculas (Gráfico 4.1).

Gráfico 4.1 Inibição do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* na presença de diferentes concentrações das substâncias em estudo.



A mistura racêmica foi a que se apresentou mais efetiva sobre promastigotas de *L. braziliensis*, e a substância (**S**) foi a que apresentou uma menor atividade antileishmania (Gráfico 4.1). Esse resultado é muito promissor economicamente, visto que a substância pode ser ingerida na sua forma racêmica. Não conseguimos encontrar na literatura esse mesmo comportamento observado, não existem outras substâncias racêmicas que possuem atividade *Antipromastigota* de *Leishmania Brazilienses* estudadas onde a mistura racêmica se mostrou mais efetiva que os seus enantiômeros separados.

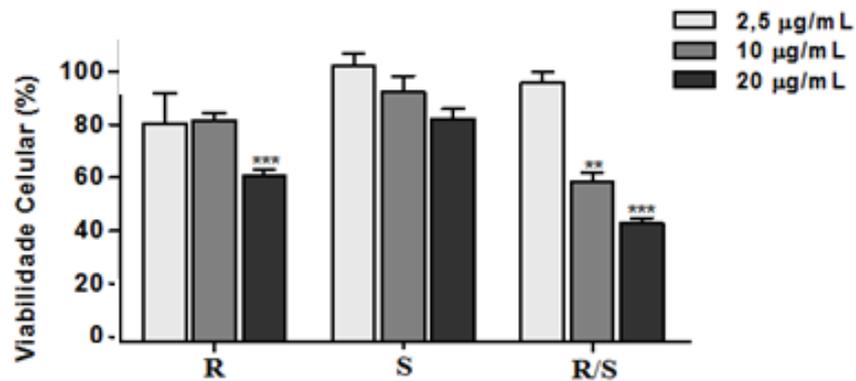
4.7 Análises de citotoxicidade dos AMBH (28 S/R, 28b R e 28a S) sobre macrófagos murinos

Para análise da citotoxicidade, macrófagos peritoneais de camundongos suíços foram incubados durante 24h na presença dos enantiômeros e da mistura racêmica. Foram utilizadas duas metodologias para análise da viabilidade celular: o ensaio com corante vital azul de tripan e o ensaio do MTT.

No ensaio com azul de tripan (Gráfico 4.2) avaliamos a integridade da membrana celular.

Gráfico 4.2 Citotoxicidade das substâncias para macrófagos peritoneais de camundongos suíços, incubados por 24h em estufa de CO₂ a 37°C na presença de diferentes concentrações das substâncias.

A) Azul de Tripán (n = 2)

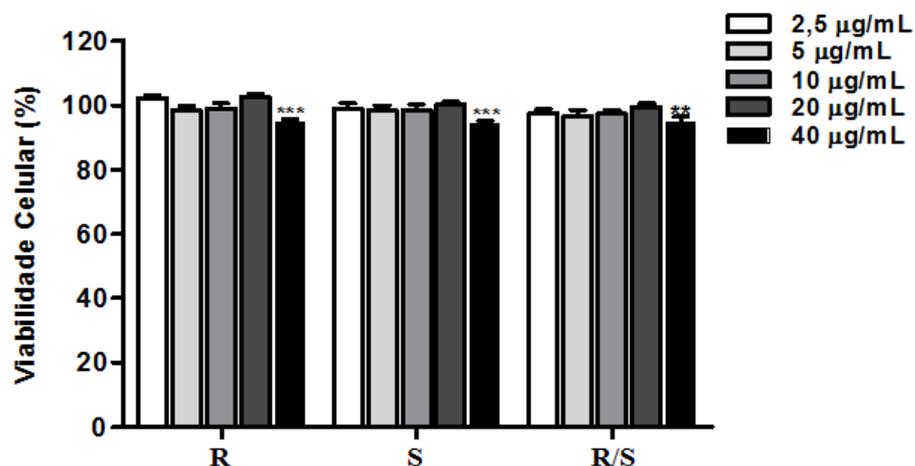


Observou-se que a mistura racêmica foi a mais citotóxica e o (**S**) o menos citotóxico, no ensaio usando o corante azul de tripan tivemos as análises em quadruplicata.

O ensaio de redução do MTT (Gráfico 4.3) avaliamos a atividade de enzimas desidrogenases mitocondriais.

Gráfico 4.3 Viabilidade celular feita pelo método de redução do MTT, incubados por 24h em estufa de CO₂ a 37°C na presença de diferentes concentrações das substâncias e quantificados sob microscopia óptica na presença de azul de trypan.

B) MTT (n = 4)



Os resultados revelaram que apenas a partir da concentração de 40 µg/mL começou a existir citotoxicidade sobre macrófagos murinos para todas as substâncias, no ensaio de MTT tivemos as análises em duplicata. Nas duas metodologias utilizadas para avaliar a citotoxicidade para macrófagos murinos, pode ser constatado que todas as substâncias avaliadas foram mais citotóxicas para o parasita do que para macrófagos.

Capítulo 5:

Conclusão

5 CONCLUSÃO

Diante do trabalho realizado podemos concluir que as reações de sínteses dos AMBH selecionados, bem como os respectivos acetatos geraram os produtos esperados em altos rendimentos. Desenvolveu-se com sucesso *via* cromatografia gasosa com coluna quiral dois novos métodos de separação enantiomérica, para os AMBH racêmicos nitrados *o* e *m*, para o AMBH racêmico nitrado *p* já existia uma metodologia desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisas. Desenvolveu-se também, metodologias novas para bio-resolução dos AMBH racêmicos nitrados *m* e *p*, utilizando a enzima CALB (Lipase B de *Candida antarctica*), os resultados mostraram que a enzima hidrolisa enantiomericamente o acetato *m* e *p* com configuração absoluta R, a bio-resolução do AMBH racêmico nitrado *o* não foi possível ser feita, pois a reação de biocatálise não ocorreu.

Obteve-se excessos enantioméricos de 99,3% para o AMBH-R-*m* e 99,9% para o AMBH-R-*p*, as reações de hidrólise usando K_2CO_3 e metanol como solvente geraram os enantiômeros complementares dos AMBH-S-*m* e *p* opticamente puros, com excessos enantioméricos de 86,8% e 97,48% e rendimentos reacionais de 100% e 10% respectivamente. Os valores de rotação óptica específica determinados para os (AMBH-R *m* e *p*) foram +37 e +30, para os (Acetatos-S *m* e *p*) os valores foram -7 e -9 esses valores são todos inéditos. A configuração absoluta do carbono assimétrico dos AMBH *m* e *p* os quais a CALB hidrolisa é R determinada através do método da dupla derivatização com MTPA desenvolvido por Mosher. O teste de atividade biológica contra as formas promastigotas de *L. braziliensis* mostrou que mistura racêmica do AMBH nitrado *m* foi a mais efetiva, porém a mais citotóxica, o enantiômero S apresentou menor bioatividade e é o menos citotóxico.

Capítulo 6:

Parte

Experimental

6 PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Materiais e Métodos

Todos os reagentes utilizados nas sínteses foram adquiridos comercialmente, os aldeídos a acrilonitrila e o cloreto de acetila adquiridos da Acros, a Enzima Lipase CALB da (Novozym 435), solventes adquiridos da Tedia e da Vetec, os auxiliares de quiralidade de Mosher (R) e (S)-MTPA adquiridos da Aldrich, onde todos continham excelente grau de pureza e foram utilizados sem prévia purificação. Todas as reações bem como os produtos formados foram acompanhadas pela técnica de cromatografia de camada delgada analítica (CCDA), onde foi utilizado cromatofolhas de alumínio da marca Macherey-Nagel, suportadas em Gel de Sílica 60 (fase estacionária), contendo indicador de fluorescência a 254nm, e uma mistura de Acetato de Etila / Hexano como fase móvel, sendo irradiadas em câmara de ultravioleta.

A purificação dos produtos foi feita utilizando a técnica de cromatografia em coluna do tipo flash, utilizando gel de sílica (fase estacionária) da marca Acros, apresentando uma granulometria de 0.035 - 0.070mm, e uma mistura de Acetato de Etila / Hexano, como fase móvel. As soluções orgânicas foram secas sobre Na₂SO₄ anidro e os solventes foram evaporados sob pressão reduzida e temperatura controlada em evaporador rotatório da marca Fisaton.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) ¹H e ¹³C foram registados usando Varian Mercury Spectra AC 20 espectrómetro (200 MHz para ¹H, 50 MHz para ¹³C). Os desvios químicos foram referidos em relação ao tetrametilsilano interno (0,00 ppm δ) para ¹H e CDCl₃ (ppm δ 77,0) para ¹³C. Os desdobramentos químicos referentes a cada acoplamento dos hidrogênios foram expressos da seguinte forma: singleto (s), singleto largo (sl), dubleto (d), tripleto (t), sexteto (sex), duplo dubleto (dd), duplo duplo dubleto (ddd) e multipletto (m). Os deslocamentos químicos (δ) foram medidos em partes por milhão (ppm) e

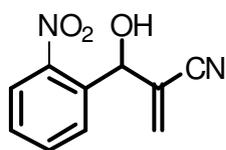
as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais dos carbonos foram observados pelo uso da técnica de APT, onde são colocados em fase "para cima" carbonos quaternários e metilenos e em fase "para baixo" carbonos de metino e metila.

Os espectros de Infravermelho (FT-IR) foram registados num espectrofotómetro Shimadzu modelo IRPrestige-21 em pastilhas de KBr. Análise por espectrometria de massa foi realizada em cromatografia em fase gasosa espectrometria de massa (GC-MS) análise (SHIMADZU GCMS-QP2010). A separação foi realizada por CG-QP2010-Shimatzu com capilar quiral β -ciclodextrina-CYCLODEX-B (30m \times 0,25 mm \times 0,25 mm) usando N_2 como gás de arraste, com de pressão de cabeça de 2,4 kg/cm². As rotações ópticas foram medidas com polarímetro-341 - Perkin Elmer.

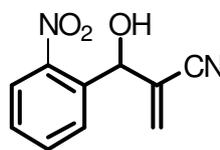
6.2 Procedimento geral para a reação de Morita-Baylis-Hillman utilizando a Acrilonitrila como solvente, obtenção dos racematos (27, 28 e 29)

Em um balão de 25 mL, foi adicionado 151 mg (1mmol) dos respectivos orto, meta e para nitrobenzaldeído, 0,4 mL de acrilonitrila (6 mmol) e 112 mg (1 mmol) de DABCO. A reação ficou sob agitação magnética e a 0°C, sendo acompanhada por CCDA. O isolamento foi feito concentrando a mistura reacional à pressão reduzida, para a retirada da acrilonitrila. Em seguida, a mistura reacional concentrada foi transferida para uma coluna cromatográfica contendo 10g de sílica gel flash previamente empacotada, utilizando inicialmente um eluente de Acetato de Etila/Hexano (30%), seguido do aumento gradativo da polaridade da fase móvel. As frações foram reunidas, e a obtenção do produto foi efetuada pela evaporação dos solventes em evaporador rotatório.

AMBH 2-(hidroxi(2-nitrofenil)metilênilo)acrilonitrila (27)



RMN¹H



RMN¹³C

RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz, δ ppm): 5,95 (s, 1H); 6,05 (d, 1H, 1Hz); 6,08 (d, 1H, 1.2 Hz); 7,48 (ddd, 1H, 7,6 /1,6/0,6 Hz); 7,68 (ddd, 1H,); 7,80 (dd, 1H, 7,8/1,2 Hz); 7,97 (dd, 1H, 8,0/1,0 Hz).

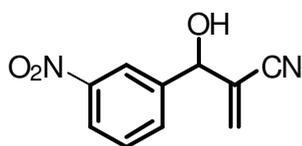
RMN¹³C-ATP (CDCl₃, 50 MHz, δ ppm): 68,76; 116,36; 123,91; 124,83; 128,82; 129,46; 132,02; 134,00; 134,06; 142,34.

IV (cm⁻¹): 3452; 2230; 1527 e 1352 (Deformação axial assimétrica e simétrica de NO₂).

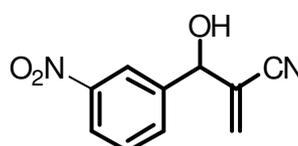
Massa (m/z): 204

Aspecto Físico: Líquido viscoso

AMBH 2-(hidroxi(3-nitrofenil) metilênilo)acrilonitrila (28)



RMN¹H



RMN¹³C

RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz, δ ppm): 3,17 (sl, 1H); 5,41 (s, 1H); 6,07 (dd, 1H, 1,0 Hz); 6,17 (dd, 1H, 1,4 Hz); 7,55 (t, 1H, 8,0 Hz); 7,72 (m, 1H); 8,15 (ddd, 1H, 8,0/2,2/1,0 Hz); 8,22 (dd, 1H, 4,2/1,8 Hz).

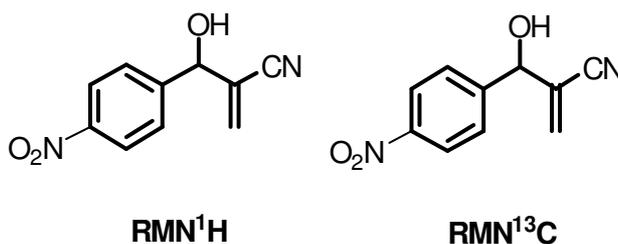
RMN¹³C-ATP (CDCl₃, 50 MHz, δ ppm): 73,88; 117,29; 122,31; 124,50; 126,28; 130,79; 132,08; 133,49; 142,24; 149,20.

IV (cm⁻¹): 3345; 2229; 1520 e 1350 cm⁻¹ (Deformação axial assimétrica e simétrica de NO₂).

Massa (m/z): 204

Aspecto Físico: Líquido viscoso

AMBH 2-(hidroxi(4-nitrofenil) metilênilo)acrilonitrila (29)



RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz, δ ppm): 3,03 (s, 1H); 5,39 (sl, 1H); 6,05 (dd, 1H, 4,0/1,2 Hz); 6,14 (dd, 1H, 4,0/1,0 Hz); 7,55 (dd, 2H, 8,8/4,0 Hz); 8,19 (dd, 2H, 8,8/4,0 Hz).

RMN¹³C-ATP (CDCl₃, 50 MHz, δ ppm): (CDCl₃, 50 MHz, δ ppm): 73,13; 116,20; 123,97; 125,23; 127,27; 131,03; 145,93; 147,88.

IV (cm⁻¹): 3481; 2225; 1523 e 1350 (Deformação axial assimétrica e simétrica de NO₂).

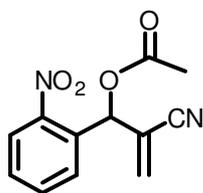
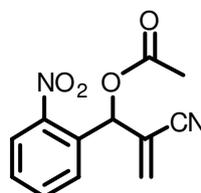
Massa (m/z): 204

Aspecto Físico: Líquido viscoso

6.3 Procedimento geral para a reação de acetilação dos AMBH utilizando Cloreto de acetila, obtenção dos racematos (30, 31 e 32)

Em um balão de 250 mL, foi adicionado 2.1146g (10,3 mmol,) dos respectivamente AMBH racêmicos (**27**, **28** e **29**), em seguida (1,5 mL) de trietilamina (TEA), em 25 mL de diclorometano a 0 °C. Com auxílio de um funil de separação gotejou-se uma mistura de 2,0 mL de cloreto de acetila e 25 mL de diclorometano. Após reagir por 3 horas lavou-se com solução aquosa de bicarbonato de sódio e a fase orgânica foi extraída com diclorometano e secou-se sob sulfato de sódio. Após concentração, o material bruto foi sujeito a cromatografia flash em coluna de gel de sílica em 10% de acetato de etila / hexano e aumento gradativo da polaridade da fase móvel. As frações foram reunidas, e a obtenção do produto foi efetuada pela evaporação dos solventes em evaporador rotatório.

Éster Acetato de 2-ciano-1-(2-nitrofenil)alil (**30**)

RMN¹HRMN¹³C

RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz, δ ppm): 8,08 (m, 2 H); 7,78 (m, 1H); 7,76 (m, 1 H); 7,00 (s, 1H); 6,16 (s, 2H); 2,15 (s, 3H).

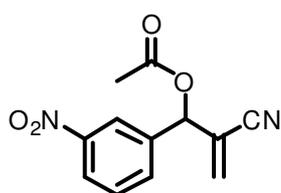
RMN¹³C-ATP (CDCl₃, 50 MHz, δ ppm): 20,78; 69,83; 115,90; 121,02; 125,24; 128,46; 131,42; 134,98; 135,11; 147,674; 168,89.

IV (cm⁻¹): 1751; 2229; 1531 e 1350 cm⁻¹(Deformação axial assimétrica e simétrica de NO₂).

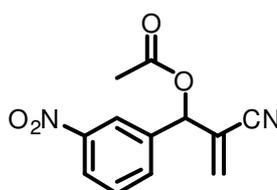
Massa (m/z): 246

Aspecto Físico: Líquido viscoso

Éster Acetato de 2-ciano-1-(3-nitrofenil)alil (31)



RMN¹H



RMN¹³C

RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz, δ ppm): 8,24 (m, 2 H); 7,78 (m, 1H); 7,65 (m, 1 H); 5,17 (s, 1H); 4,93 (dd, *J* = 1,2/0,7 Hz, 2H); 0,98 (s, 3H).

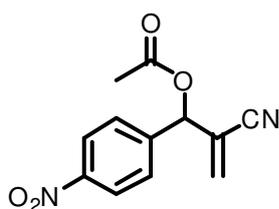
RMN¹³C-ATP (CDCl₃, 50 MHz, δ ppm): 21,5; 73,9; 116,3; 122,6; 122,7; 124,9; 130,8; 133,6; 133,9; 138,4; 149,2; 169,7.

IV (cm⁻¹): 1751; 2229; 1520; 1350 cm⁻¹

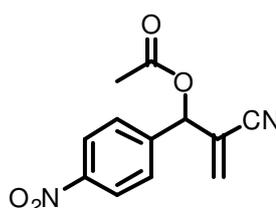
Massa (m/z): 246

Aspecto Físico: Líquido viscoso

Éster Acetato de 2-ciano-1-(4-nitrofenil)alil (32)



RMN¹H



RMN¹³C

RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz, δ ppm): 8,08 (dd, 7,6/4,0 Hz, 2H); 7,78 (dd, 7,5/4,0 Hz, 2H); 7,76 (m, 1 H); 7,00 (s, 1H); 6,16 (s, 1H); 2,15 (s, 3H).

RMN¹³C-ATP (CDCl₃, 50 MHz, δ ppm): 20,87; 73,40; 73,50; 104,98; 115,52; 122,00; 124,21; 127,79; 131,42; 133,24; 142,42; 148,31; 169,00.

IV (cm⁻¹): 1751; 2229; 1523; 1350 cm⁻¹

Massa (m/z): 246

Aspecto Físico: Líquido viscoso

6.4 Procedimento para a resolução cinética enzimática de (28) utilizando a enzima lipase CALB Novozym 435

Foi adicionado 50 mg da enzima Lipase CALB em 50 mg (0,39 mmol) de (**31**) em um erlenmeyer de 50 mL. Em seguida adicionou-se 10 mL de água deionizada á mistura, deixando em constante agitação no shak 200 rpm durante 48 horas a qual foi acompanhada por CGMS. Após termino da reação, filtrou-se em funil simples e lavou-se com acetato de etila a fim de remover a enzima. A mistura foi posta em funil de separação onde se removeu a fase orgânica com acetato de etila em seguida secou-se com sulfato de sódio anidro e concentrado em rota evaporador. Por fim, o AMBH foi separado por cromatografia utilizando como eluente uma mistura de 10% de acetato/hexano. Obteve-se uma massa do AMBH R (**28b**) de 18,7 mg (0,09 mmol) e 20,3 mg (0,08 mmol) do Éster S (**31a**).

6.5 Procedimento para a resolução cinética enzimática de (29) utilizando a enzima lipase CALB Novozym 435

Foi adicionado 80 mg da enzima Lipase CALB em 80 mg (0,39 mmol) de (**32**) em um erlenmeyer de 50 mL. Em seguida adicionou-se 10 mL de água deionizada á mistura, deixando em constante agitação no shak 200 rpm durante 48 horas a qual foi acompanhada por CGMS. Após

termino da reação filtrou-se em funil de filtração e lavou-se com acetato de etila a fim de remover a enzima. A mistura foi posta em funil de separação onde se removeu a fase orgânica com acetato de etila em seguida secou-se com sulfato de sódio anidro e concentrado em rota evaporador. Por fim, o AMBH foi separado por cromatografia utilizando como eluente uma mistura de 10% de acetato/hexano. Obteve-se uma massa de AMBH S (**29b**) 34,3 mg (0,17mmol) e 38,1 mg (0,15 mmol) do éster S (**32a**).

6.6 Procedimento para a hidrólise química do éster S (31a) utilizando K₂CO₃ e metanol como solvente

Em um balão de 25 mL pesou-se 38,1 mg (0,155 mmol) do éster S (**31a**) e 40mg (0,3 mmol) de K₂CO₃, em seguida adicionou-se 2 ml de MeOH, após reagir por 6 horas em banho de gelo. A extração foi feita em um funil de separação onde se lavou a solução aquosa com dicloro metano e posterior secagem Na₂SO₄ para eliminar os resquícios de água. Em seguida a mistura foi concentrada em rota evaporador e posterior isolamento usando cromatografia flash em coluna de gel de sílica em 10% de acetato de etila / hexano e aumento gradativo da polaridade da fase móvel. As frações foram reunidas, e a obtenção do produto foi efetuada pela evaporação dos solventes em evaporador rotatório com uma massa de 31,5 mg (0,15 mmol) do AMBH S (**28a**) e rendimento de 100%.

6.7 Procedimento para a hidrólise química do Éster R (32b) utilizando K₂CO₃ e metanol como solvente

Em um balão de 25 mL pesou-se 37 mg (0,15 mmol) do éster S (**32a**) e 40mg (0,3 mmol) de K₂CO₃, em seguida adicionou-se 2 ml de MeOH, após reagir por 6 horas em banho de gelo. A extração foi feita em um funil de separação onde se lavou a solução aquosa com dicloro metano e posterior secagem Na₂SO₄ para eliminar os resquícios de água. Em seguida a mistura foi concentrada em rota evaporador e posterior

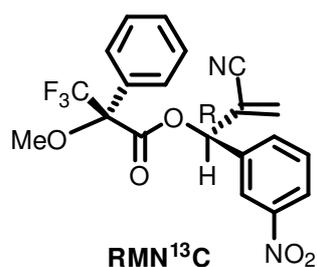
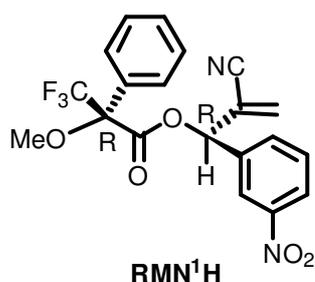
isolamento usando cromatografia flash em coluna de gel de sílica em 10% de acetato de etila / hexano e aumento gradativo da polaridade da fase móvel. As frações foram reunidas, e a obtenção do produto foi efetuada pela evaporação dos solventes em evaporador rotatório com uma massa de 3,06 mg (0,015 mmol) do AMBH S (**29a**) e rendimento de 10%.

6.8 Procedimento para a determinação da configuração absoluta do AMBH R (**28b**) pelo método de Mosher

6.8.1 Reação do AMBH R (**28b**) com (R)- MTPA (**34b**)

Em um balão de 25 mL foram colocados 20 mg (0,041 mmol) do AMBH R (**28b**), 30 mg (0,13 mmol) do (R) – MTPA (**34b**), 20 mg (0,097 mmol) de DCC e (0,016 mmol) 2,0 mg DMAP em 4 ml de diclorometano seco. Esta mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 8h. A solução aquosa foi extraída três vezes com diclorometano, e secou-se sob sulfato de sódio. Após concentração, o material bruto foi sujeito a cromatografia flash em coluna sobre gel de sílica com hexano o primeiro para remover DCU e seguido com (15% acetato de etilo / hexano). O (R) - [(R)-2-ciano-1-(3-nitrofenil)-alil]3,3,3-trifluoro-2-metoxi-2fenilpropanoato obtido (**39**) foi isolado com 67% de rendimento.

Éster de Mosher Propanoato de (R)-[(R)-2-ciano-1-(3-nitrofenil) alil] 3,3,3-trifluoro-2-metoxi-2-fenil (**48**)



RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz, δ ppm): 8,24 (m, 2 H); 7,69 (m, 2H); 7,35 (m, 5 H); 6,51 (s, 1H); 6,09 (s, 1H); 6,0 (s, 1H); 3,41 (s, 3H).

RMN¹³C-ATP (CDCl₃, 50 MHz, δ ppm): 22,67, 29,67, 31,89, 74,66, 115,00, 120,15, 120,73, 122,04, 124,68, 125,89, 127,15, 128,70, 130,07, 130,37, 130,98, 133,03, 133,41, 136,34, 148,51, 165,01.

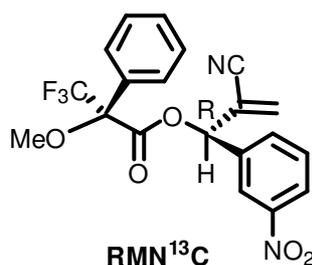
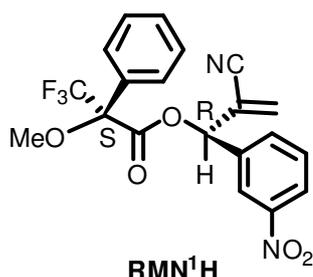
IV (cm⁻¹): 2918, 2848, 2231, 1770, 1533, 1450, 1352, 1263, 1222, 1010 cm⁻¹;

Aspecto: Líquido viscoso

6.8.2 Reação do AMBH R (28b) com (S)- MTPA (34a)

Em um balão de 25 mL foram colocados 20 mg (0,041 mmol) do AMBH R (**28b**), 30 mg (0,13 mmol) do (S) – MTPA (**34a**), 20 mg (0,097 mmol) de DCC e (0,016 mmol) 2,0 mg DMAP em 4 ml de diclorometano seco. Esta mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 8 h. A solução aquosa foi extraída três vezes com diclorometano, e secou-se sob sulfato de sódio. Após concentração, o material bruto foi sujeito a cromatografia flash em coluna sobre gel de sílica com hexano o primeiro para remover DCU e seguido com (15% acetato de etilo / hexano). O (S) -[(R)-2-ciano-1-(3-nitrofenil)-alil]3,3,3-trifluoro-2-metoxi2fenilpropanoato obtido (**36**) foi isolado com 75% de rendimento.

Éster de Mosher Propanoato de (S)-[(R)-2-ciano-1-(3-nitrofenil) alil] 3,3,3-trifluoro-2-metoxi-2-fenil (45)



RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz, δ ppm): 8,24 (m, 2 H); 7,69 (m, 2H); 7,35 (m, 5 H); 6,51 (s, 1H); 6,09 (s, 1H); 6,0 (s, 1H); 3,41 (s, 3H).

RMN¹³C-ATP (CDCl₃, 50 MHz, δ ppm): 29,67; 56,00; 74,91; 114,36; 115,25; 120,10; 120,98; 121,94; 124,53; 125,85; 126,91; 128,5; 129,99; 130,21; 131,10; 132,83; 134,19; 136,13; 148,41; 165,00.

IV (cm⁻¹): 2920, 2850, 2231, 1759, 1535, 1454, 1352, 1271, 1236, 1020cm⁻¹.

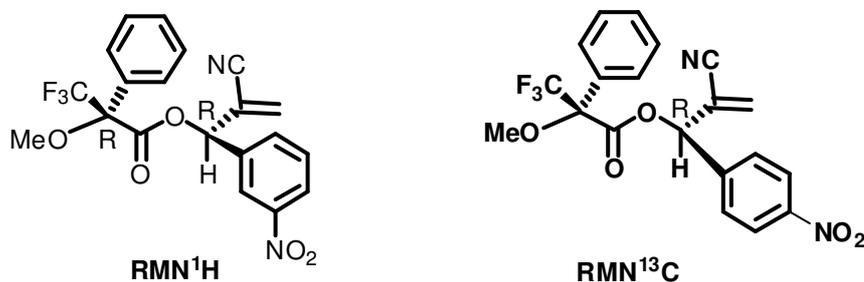
Aspecto: Líquido viscoso

6.9 Procedimento para a determinação da configuração absoluta do AMBH R (29b) pelo método de Mosher

6.9.1 Reação do AMBH R (29b) com (R)- MTPA (34b)

Em um balão de 25 mL foram colocados 20 mg (0,041 mmol) do AMBH R (**29b**), 30 mg (0,13 mmol) do (R) – MTPA (**43b**), 20 mg (0,097 mmol) de DCC e (0,016 mmol) 2,0 mg DMAP em 4 ml de diclorometano seco. Esta mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 8 h. A solução aquosa foi extraída três vezes com diclorometano, e secou-se sob sulfato de sódio. Após concentração, o material bruto foi sujeito a cromatografia flash em coluna sobre gel de sílica com hexano o primeiro para remover DCU e seguido com (15% acetato de etilo / hexano). O (R) -[(R)-2-ciano-1-(4-nitrofenil)-alil]3,3,3-trifluoro-2-metoxi2fenilpropanoato obtido (**40**) foi isolado com 70% de rendimento.

Éster de Mosher Propanoato de (R)-[(R)-2-ciano-1-(4-nitrofenil)alil] 3,3,3-trifluoro-2-metoxi-2-fenil (49)



RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz, δ ppm): 8,28 (d, $J = 10,0$ Hz, 2H); 7,56 (d, $J = 10,0$ Hz, 2H); 7,43 (m, 5 H); 6,59 (s, 1H); 6,16 (s, 1H); 6,07 (s, 1H); 3,48 (s, 3H).

RMN¹³C-ATP (CDCl₃, 50 MHz, δ ppm): 22,67, 29,67, 31,89, 74,66, 115,00, 120,15, 120,73, 122,04, 124,68, 125,89, 127,15, 128,70, 130,07, 130,37, 130,98, 133,03, 133,41, 136,34, 148,51, 165,01.

IV (cm⁻¹): 2922, 2850, 2229, 1759, 1533, 1450, 1352, 1271, 1236, 1018cm⁻¹;

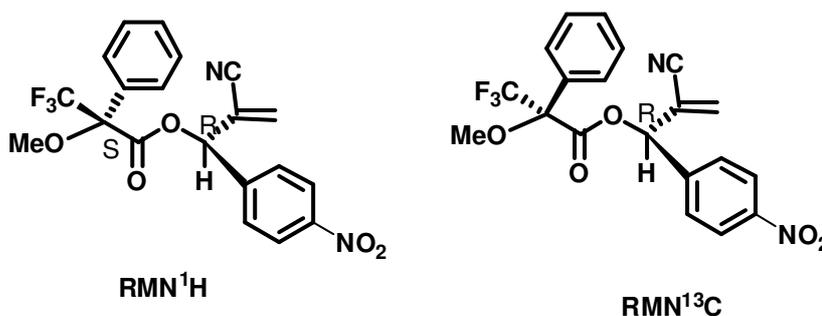
Aspecto: Líquido viscoso

6.9.2 Reação do AMBH R (29b) com (S)- MTPA (34a)

Em um balão de 25 mL foram colocados 20 mg (0,041 mmol) do AMBH R (**29b**), 30 mg (0,13 mmol) do (R) – MTPA (**43a**), 20 mg (0,097 mmol) de DCC e (0,016 mmol) 2,0 mg DMAP em 4 ml de diclorometano seco. Esta mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 8 h. A solução aquosa foi extraída três vezes com diclorometano, e secou-se sob sulfato de sódio. Após concentração, o material bruto foi sujeito a cromatografia flash em coluna sobre gel de sílica com hexano o primeiro para remover DCU e seguido com (15% acetato de etilo / hexano). O (S)

-[(R)-2-ciano-1-(4-nitrofenil)-alil]3,3,3-trifluoro-2-metoxi2fenilpropanoato obtido (**37**) foi isolado com 80% de rendimento.

Éster de Mosher Propanoato de (S)-[(R)-2-ciano-1-(4-nitrofenil) alil] 3,3,3-trifluoro-2-metoxi-2-fenil (46)



RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz, δ ppm): 8,21 (d, $J = 10,0$ Hz, 2H); 7,56 (s, 2H); 7,42 (m, 5 H); 6,56 (s, 1H); 6,22 (s, 1H); 6,10 (s, 1H); 3,41 (s, 3H).

RMN¹³C-ATP (CDCl₃, 50 MHz, δ ppm): Não foi possível verificar todos os picos devido a pequena quantidade de amostra e o tempo pequeno de análise de máquina.

IV (cm⁻¹): 2922, 2850, 2229, 1759, 1533, 1450, 1352, 1271, 1236, 1018cm⁻¹.

Aspecto: Líquido viscoso

Referências

REFERÊNCIAS

1. BARREIRO, E.J.; FERREIRA, V.F.; COSTA, P.R.R.; **Química Nova**, 20, 647-659, 1997.
2. Strauss, U. T.; Felfer, U.; Faber, K.; **Tetrahedron: Assymetry**, 10, 107, 1999.
3. BARBOSA, T. P., JUNIOR, C. G. L., SILVA, F. P. L., LOPES, H. M., FIGUEIREDO, L. R. F., SOUSA, S. C. O., BATISTA, G. N., SILVA, T. G., SILVA, T. M. S., OLIVEIRA, M. R., VASCONCELLOS, M. L. A. A., Improved synthesis of seven aromatic Baylis-Hillman adducts (BHA): Evaluation against *Artemia salina* Leach. and *Leishmania chagasi*, **European Journal of Medicinal Chemistry**, 44, 1726, 2009.
4. LIMA-JUNIOR, C.G.; VASCONCELLOS, M.L.A.A. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, 20, 3954, 2012.
5. ALTAS, M. C. J. C. **Resolução Cinética Enzimática de Álcoois Secundários em Água por Tecnologia de Miniemulsões**. 84 f. (Dissertação em Biotecnologia) – Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa 2010.
6. MA, G. N.; JIANG, J. J., SHI, M.; WEIB, Y. **Chemical Communications**, DOI: 10.1039/b909405a, 5496–5514, 2009.
7. VASCONCELLOS, M. L. A. A., SILVA, T. M. S., CÂMARA, C. A., MARTINS, R. M., LACERDA, K. M., LOPES, H. M., PEREIRA, V. L. P., DE SOUZA, R. O. M. A., CRESPO, L. T. C. **Pest Management Science**, 62, 288, 2006.
8. BASAVAIHAH, D., RAO, K. V., REDDY, R. J., The Baylis-Hillman reaction: a novel source of attraction, opportunities, and challenges in synthetic chemistry, **Review Chemical Society**, 36, 1581, 2007.
9. SILVA, F. P. L. **Síntese de novos adutos de Morita-Baylis-Hillman: bioisosterismo clássico na otimização de leishmanicidas**. 162 f. (Dissertação de Mestrado em Química Orgânica)-Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 2007.
10. a) MCQUADE, D. T., PRICE, K. E., BROADWATER, S. J., JUNG, H. M., Baylis- Hillman mechanism: a new interpretation in aprotic solvents, **Organic Letters**, 7,147, 2005a. b) MCQUADE, D. T., PRICE, K. E., BROADWATER, S. J., WALKER, B. J., A new interpretation of the Baylis Hillman mechanism, **Journal Organic Chemistry**, 70, 3980, 2005b.

11. SILVA, W. A. V. **(S)-2-hidroxiopropanoato de 2-n,n-dimetilaminoetila: síntese e investigação da atividade organocatalítica na reação de Morita-Baylis-Hilman.** 129 f. (Dissertação de Mestrado em Química Orgânica)-Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 2012.
12. KUNDU, M. K., SUNDAR, N., KUMAR, S. K., BHAT, S. V., BISWAS, S. V. N., Antimalarial activity of 3-hydroxyalkyl-2-methylene-propionic acid derivatives, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 9, 731, 1999.
13. SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. Química Orgânica, 10^o edição, volume 1, Rio de Janeiro 2012 (LTC).
14. HALGAS, J. Biocatalysts in Organic Synthesis, Studies in Organic Chemistry, volume 46, Amsterdam 1992 (Elsevier).
15. FABROS, S.; SMITHI, R.L.; WILLIAN, R.T.; **Nature**, 13-29, 1990.
16. COELHO, F.; AMARANTE, G.W.; **Química Nova**, 32, 467-481, 2009.
17. XIAO, J.; NEFKENS, S. C. A.; JESSOP, P. G.; IKARIYA, T.; NOYORI, R.; **Tetrahedron Letters**, 37, 2813, 1996.
18. HAJOS, Z. G.; PARRISH, D. R.; **Journal Organic Chemistry**, 39, 1615, 1974.
19. a) ALLEMANN, C.; GORDILLO, R.; CLEMENTE, F.R.; CHEONG, P. H.; HOUK, K. N. **Accounts of Chemical Research**, 37, 558-569, 2004. b) List, B.; Pojarliev, P.; Biller, W. T.; Martin, H. J. The prolinecatalyzed direct asymmetric three-component Mannich reaction: scope, optimization, and application to the highly enantioselective synthesis of 1,2-amino alcohols. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 827-33, 2002.
20. CHAMORRO, S.; ALCÁNTARA, A. R.; DE LA CASA, R. M.; SINISTERRA, J. V.; SANCHÉZ-MONTERO, J. M.; *J. Mol. Catal. B: Enzym*, 11, 939, 2001.
21. MARGOLIN, A. L.; **Enzyme Microb. Technol**, 15, 266, 1993.
22. DEMIRJIAN, D. C.; SHAH, P. C.; MORIS-VAS, F.; *Biocatalysis- From discovery To Application*, 1, 200, 1999.
23. **Portal Laboratórios Virtuais de Processos Químicos**, <http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?Itemid=201&id=96&option=com_content&task=view>. Acessado em: 05 de abril de 2013.
24. ARAÚJO, L. **Busca de Álcool Desidrogenases para Aplicação em Oxidação enantiosseletiva de Álcoois.** 116 f. (Dissertação em

Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo 2010.

25. FERSHT, A.; *Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding*, New York 1998 (Freeman).

26. KRISHNA, S. H. **Biotechnology Advances**, 20, 239, 2002.

27. DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. **Química Nova**, 27, 623, 2004.

28. ARAUJO, L. T. C. A. **Aplicações de Lipases**. 64 f. (Monografia em Biologia) – Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 2009.

29. HOEGH, I.; PATKAR, S.; HALKIER, T.; HANSEN, M. T. **Canadian Journal of Botany**, 73, 869, 1995.

30. ANDERSON, E., LARSSON, K., KIRK, O. **Biocatal. Biotrans.**, 16, 181, 1998.

31. UPPENBERG, J.; HANSEN, M. T.; PATKAR, S.; JONES, T. A. **Structure**, 2, 293, 1994.

32. TRODLER, P.; PLEISS, J. **BMC Structural Biology**, 8, 1472-6807, 2008.

33. KIRK, O.; BJÖRKKLING, F.; GODTFREDSSEN, S. E.; LARSEN, T. O. **Biocatalysis**, 6, 127-134, 1992.

34. MAGNUSSON, A. O.; TAKWA, M.; HAMBERG, K. Hult, **Accounts of Chemical Research**, 44, 4582, 2005.

35. PINHEIRO, L. **Multibiorreações e suas aplicações para as sínteses de compostos enantiomericamente puros**. 239 f. (Tese de Doutorado em Química Orgânica) – Instituto de Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2006.

36. OGSTON, A. G. **Nature** 162, 963, 1948.

37. FABER, k. **Journal European Chemistry**, 7, 5004-5010, 2001.

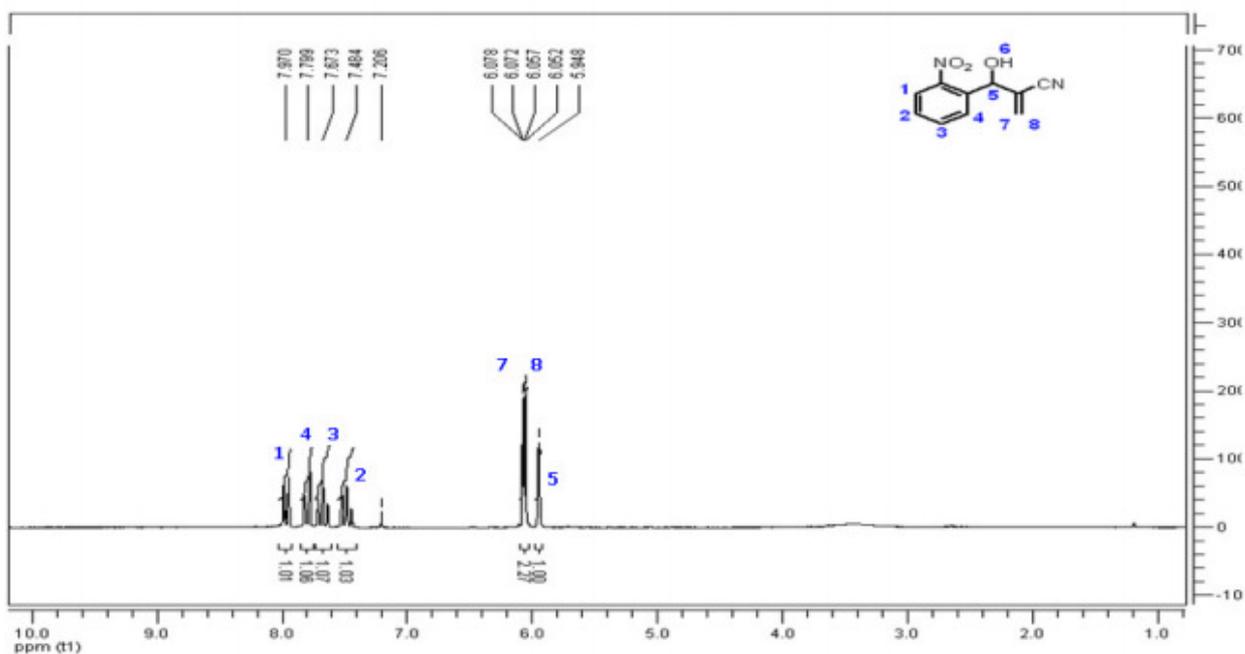
38. KEITH, J. M.; LARROW, J. F.; JACOBSEN, E. N. **Advanced Synthesis Catalysis**, 343, 5, 2001.

39. KAMAL, A.; AZHAR, M. A.; KRISHNAJI, T.; MALIK, M. S.; AZEEZA, S. **Coordination Chemistry Reviews**, 252, 569, 2008.
40. FABER, K.; **Biotransformations in Organic Chemistry**, 3ª edição, Berlin 1997 (Springer-Verlag).
41. ARAÚJO, L. S. ; ANDRADE, L. H. ; KAGOHARA, E. ; PELEGRINI, T.G. ; PELLIZARI, V.H . **Marine Drugs**, 9, 889-905, 2011.
42. MUELLER, J. A; JENSEN, D. R; SIGMAN, M. S. **Journal American Chemistry Society**, 124, 8202-8203, 2002.
43. NASCIMENTO, M. G.; ZANOTTO, S. P.; MELEGARI, S. P.; FERNANDES, L.; SA, M. M. **Tetrahedron Asymmetry**, 14, 3111-3115, 2003.
44. WANG, J. Y.; MA, C. L.; BAO, Y. M.; XU, P. S. **Enzyme and Microbial Technology**, 51, 40-46, 2012.
45. BENAÏSSI, K.; POLIAKOFF, M.; THOMAS, N. R. **Green Chemistry**, 11, 617, 2009.
46. BRANDÃO-FILHO S, P. **Eco-epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana associada à Leishmania (Viannia) braziliensis na Zona da Mata Atlântica do Estado de Pernambuco, Brasil**. (Tese de Doutorado), Universidade de São Paulo, São Paulo 2001.
47. FORATTINI, O. P., Entomologia Médica, 4ª edição, São Paulo 1973 (Edgard Blücher).
48. World Health Organization/Special Programme for Research and training in Tropical Diseases – TDR, **Life cycle of Leishmaniai**, 2007. Disponível em: <www.who.int/tdr/diseases/leish/lifecycle.htm>. Acessado em: 02 de abril de 2012.
49. RATH, S., TRIVELIN, L. A., IMBRUNITO, T. R., TOMAZELA, D. M., JESUS, M. N., MARZAL, P. C., Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, 26, 550-553, 2003.
50. Faber, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 2ª edição, Heidelberg 1995 (Springer).
51. JUNIOR, C. G. L; DE ASSIS, P. A. C.; SILVA, F. P. L.; SOUSA, S. C. O.; DE ANDRADE, N. G.; BARBOSA, T. P.; NERÍS, P. L. N.; SEGUNDO, L. V. G.; ANJOS, I. C; CARVALHO, G. A. U.; ROCHA, G.B.; OLIVEIRA, M. R.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. Efficient synthesis of 16 aromatic Morita-Baylis-Hillman adducts: Biological evaluation on *Leishmania amazonensis* and *Leishmania chagasi*, **Bioorganic Chemistry**, 38, 279-284, 2010.

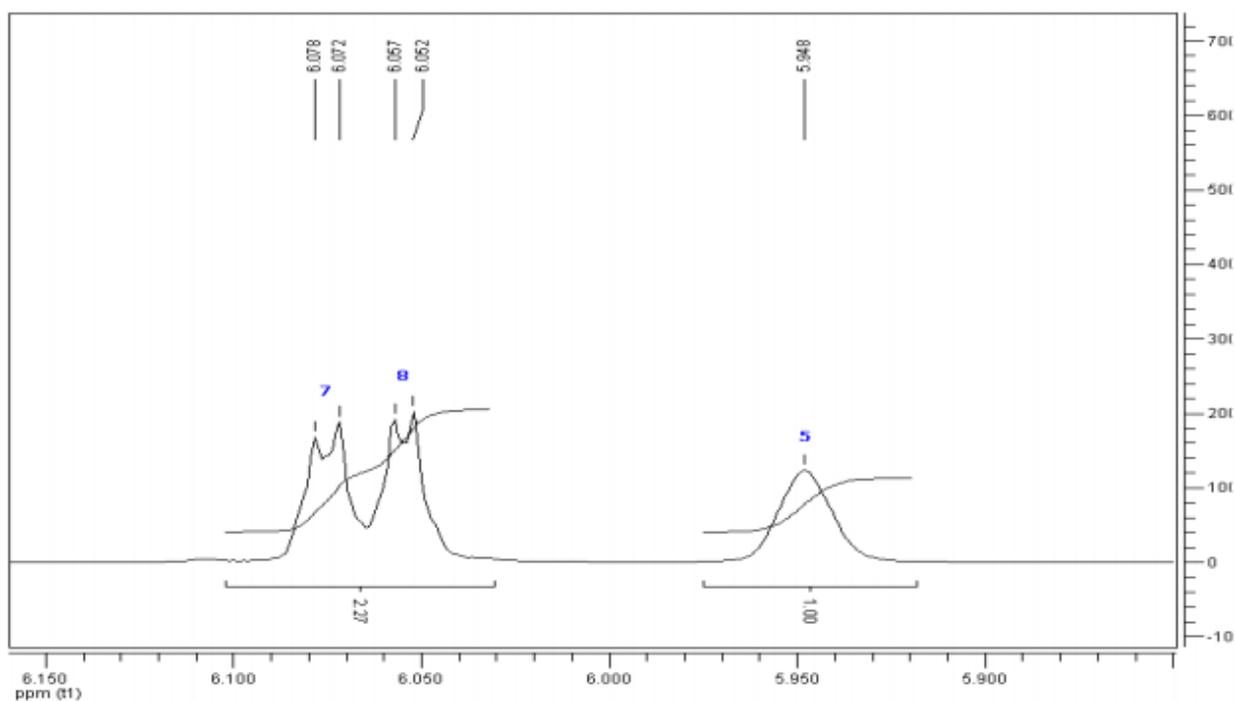
52. SABATINO, D.; PROULX, C.; POHANKOVA, P.; ONG, H.; LUBELL, W. D. Structure-Activity relationships of GHRP-6 Azapeptide Ligands of the CD36 Scavenger Receptor by solid-phase Submonomer Azapeptide Synthesis, **Journal of the American Chemistry Society**, 133, 12493-12506, 2011.
53. FILHO, E. B. A., VENTURA, E., DO MONTE, S. A., OLIVEIRA, B. G., JUNIOR, C. G. L., ROCHA, G. B., VASCONCELLOS, M. L. A. A., Synthesis and conformational study of a new class of highly bioactive compounds, **Chemical Physics Letters**, 499, 336, 2007.
54. LIMA-JUNIOR, C. G.; VASCONCELLOS, MÁRIO L. A. A. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 20, 1-18, 2012.
55. MOSHER, D. J. A., Nuclear magnetic resonance enantiomer reagents. Configurational correlations via nuclear magnetic resonance chemical shifts of diastereomeric mandelate, O-methylmandelate, and α -methoxy- α -trifluoromethylphenylacetate (MTPA) esters". **Journal of the American Chemical Society**, 95, 512-519, 1973.
56. BARREIROS, M. L.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P., Utilização de RMN de ^1H na determinação da configuração absoluta de alcoóis, **Química Nova**, 28, 1061-1065, 2005.
57. FÁVERO, R. P., SERRANO, S. H. P., TAVARES, L. C., Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos, **Química Nova**, 32, 1013, 2009.

Espectros

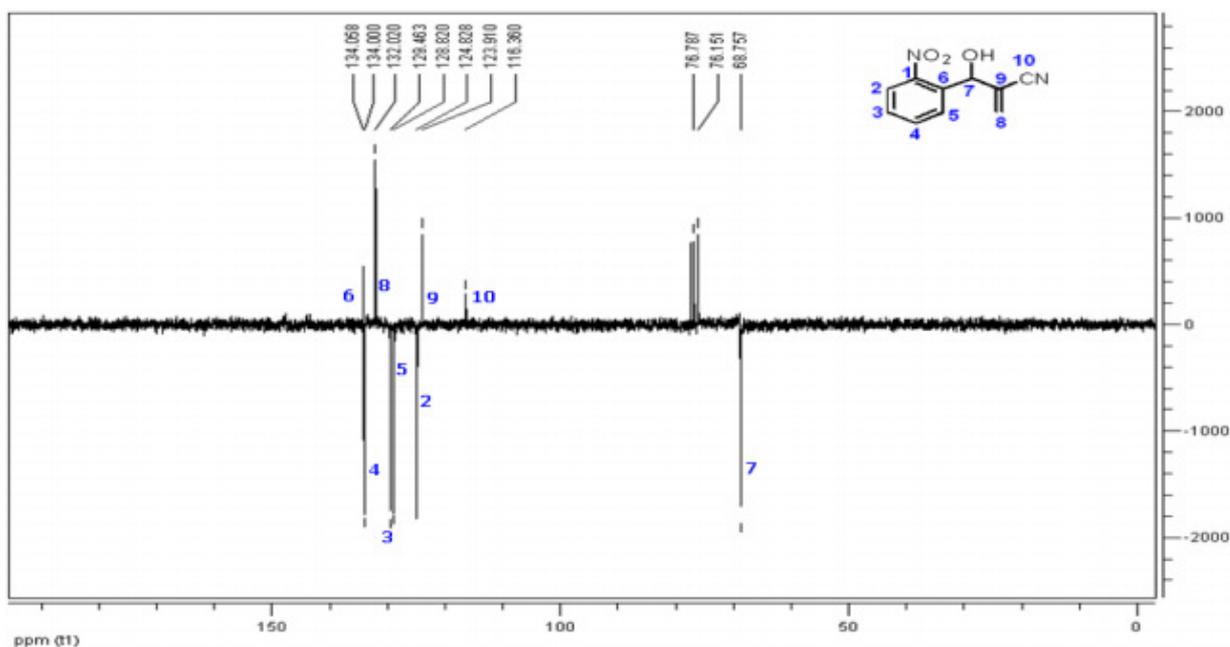
ESPECTROS



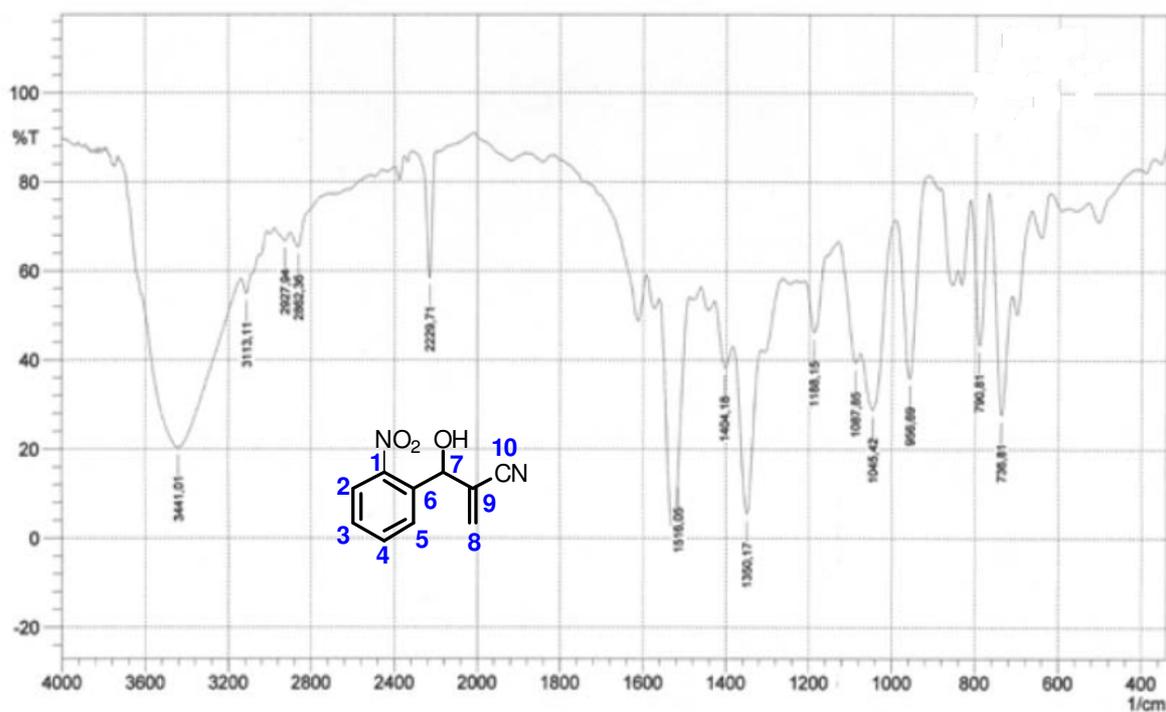
Espectro 1 Espectro de RMN^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de 2-(hidroxi(2-nitrofenil)metilêno)acrilonitrila (27).



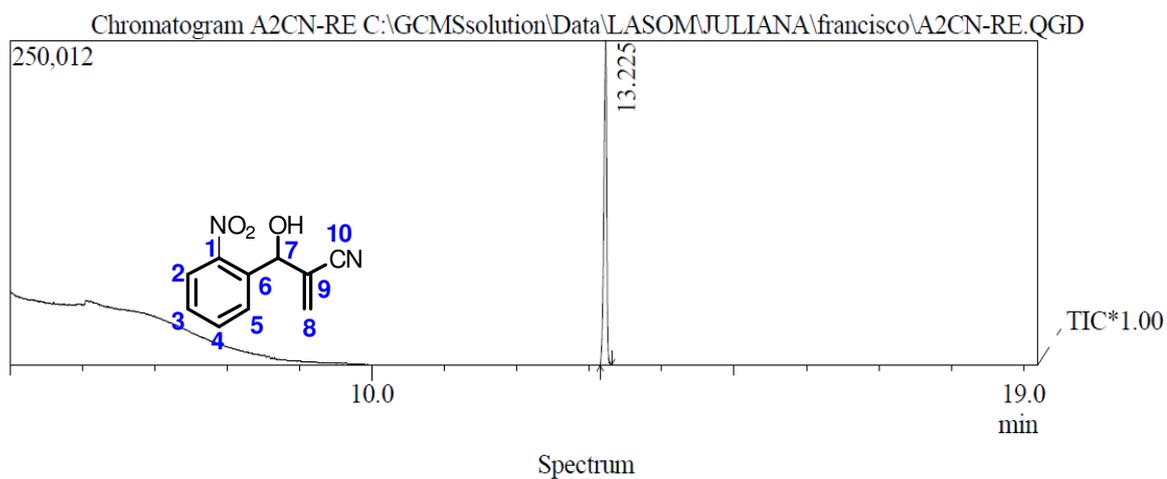
Espectro 2 Expansão do Espectro de RMN^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de (27) na região de 6,08 a 5,95.



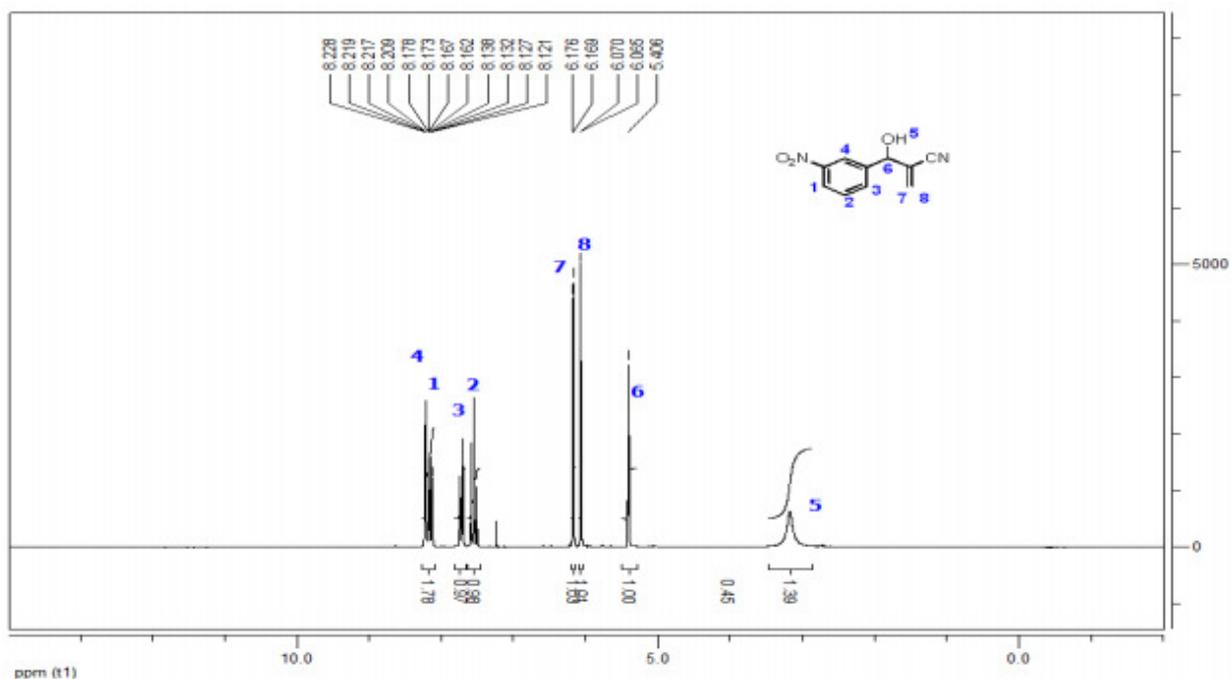
Espectro 3 Espectro de RMN¹³C-APT (CDCl₃, 50MHz) de 2-(hidroxi(2-nitrofenil) metilêno)acrilonitrila (27).



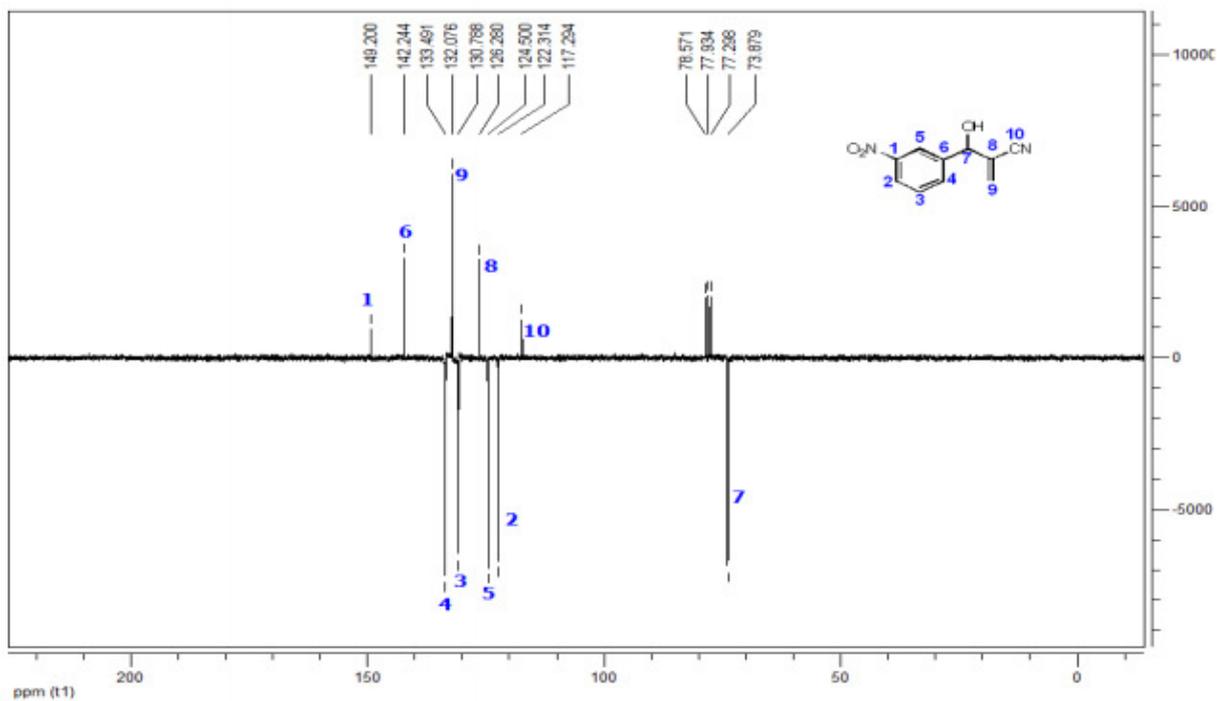
Espectro 4 Espectro de Infravermelho em cm⁻¹ de 2-(hidroxi(2-nitrofenil) metilêno)acrilonitrila (27).



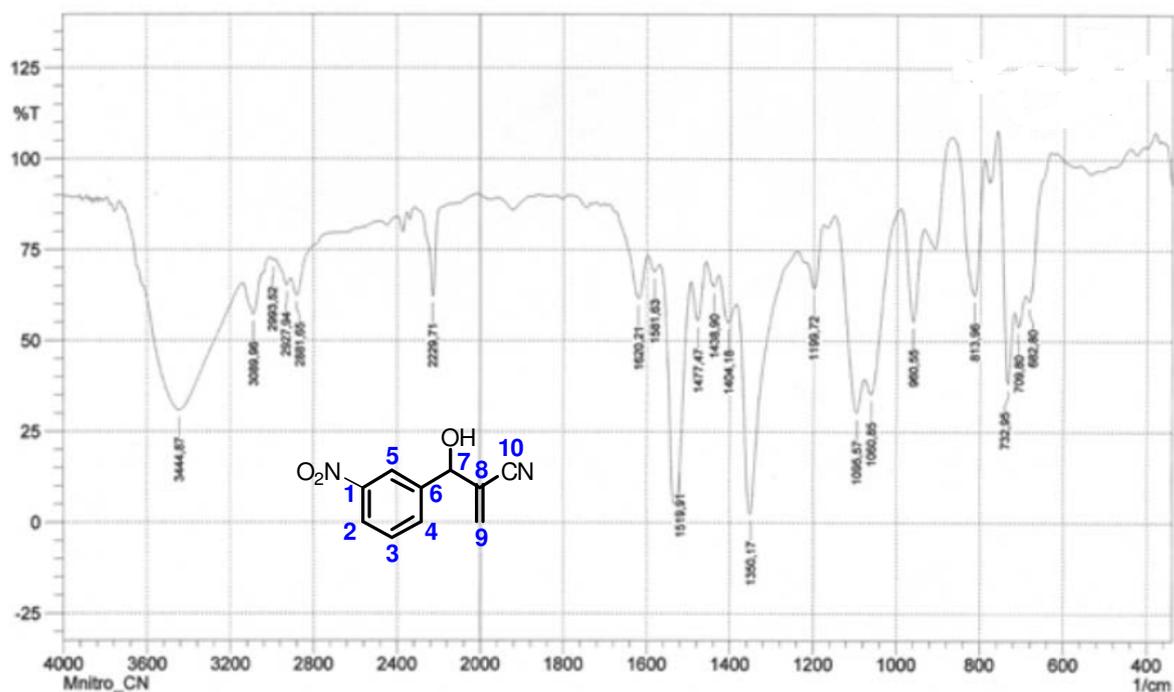
Espectro 5 Cromatograma de 2-(hidroxi(2-nitrofenil)metilêno)acrilonitrila (27).



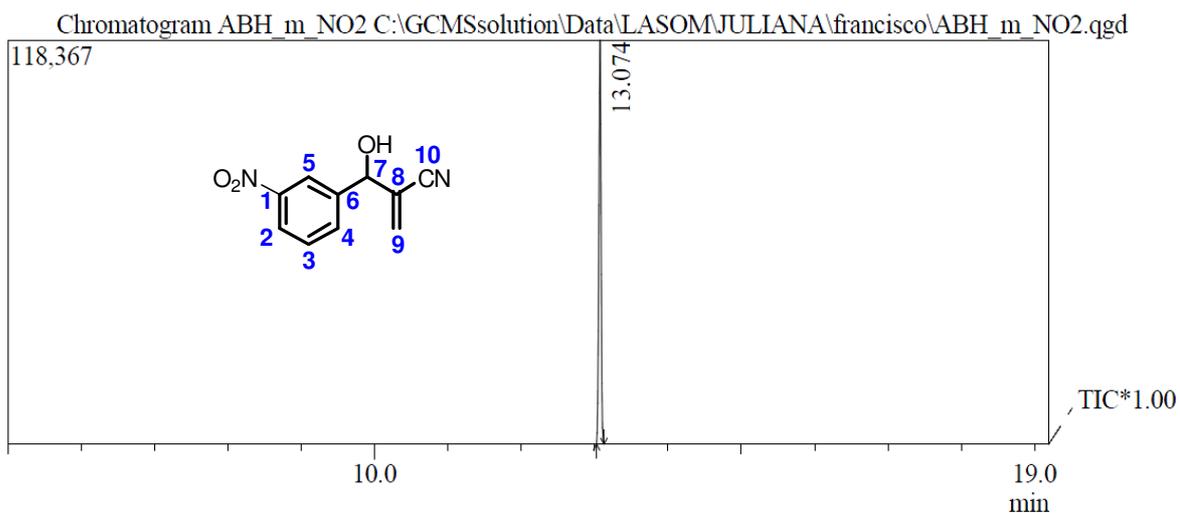
Espectro 6 Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 2-(hidroxi(3-nitrofenil)metilêno)acrilonitrila (28).



Espectro 7 Espectro de RMN¹³C-APT (CDCl₃, 50MHz) de 2-(hidroxi(3-nitrofenil)metilêno)acrilonitrila (28).

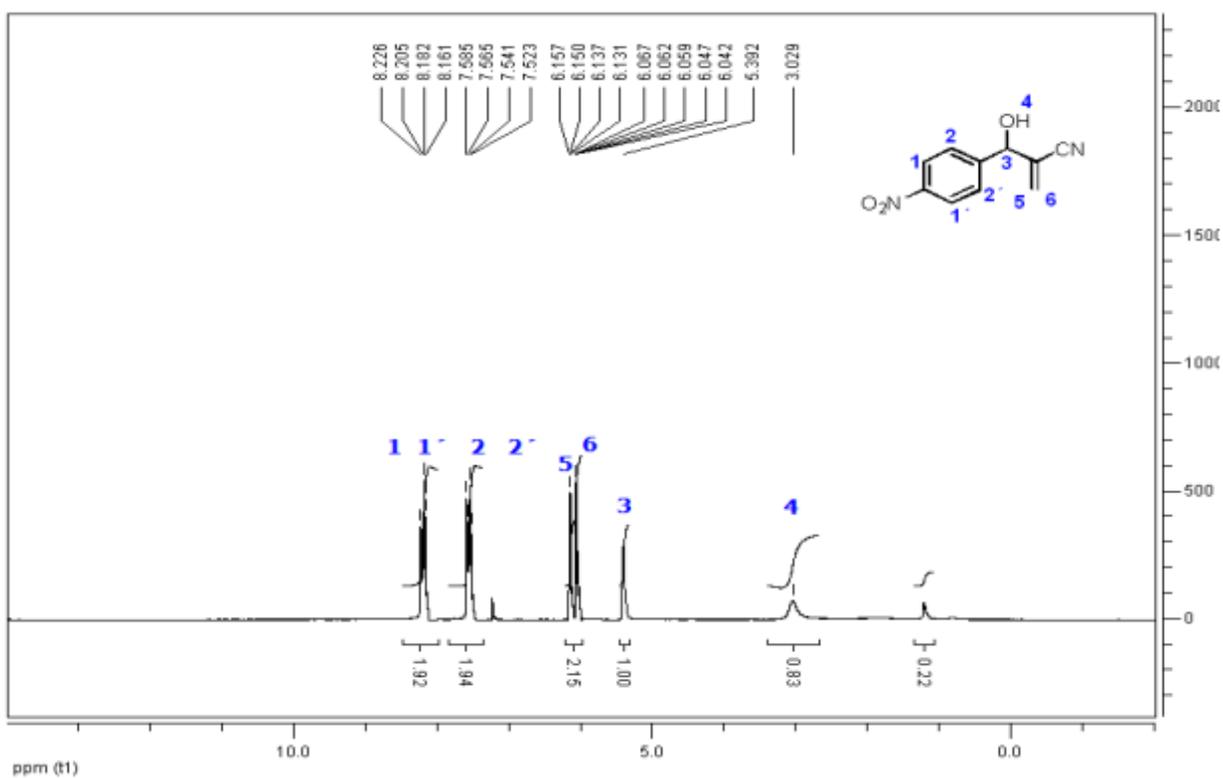


Espectro 8 Espectro de Infravermelho em cm⁻¹ de 2-(hidroxi(3-nitrofenil)metilêno)acrilonitrila (28).

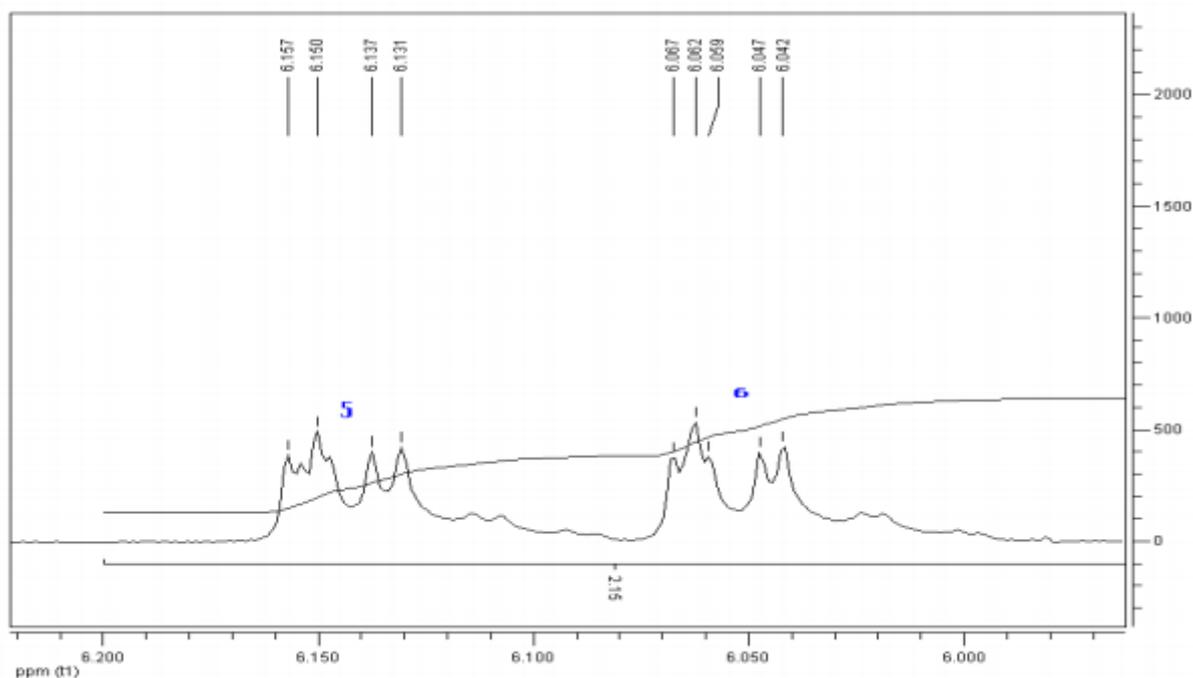


Spectrum

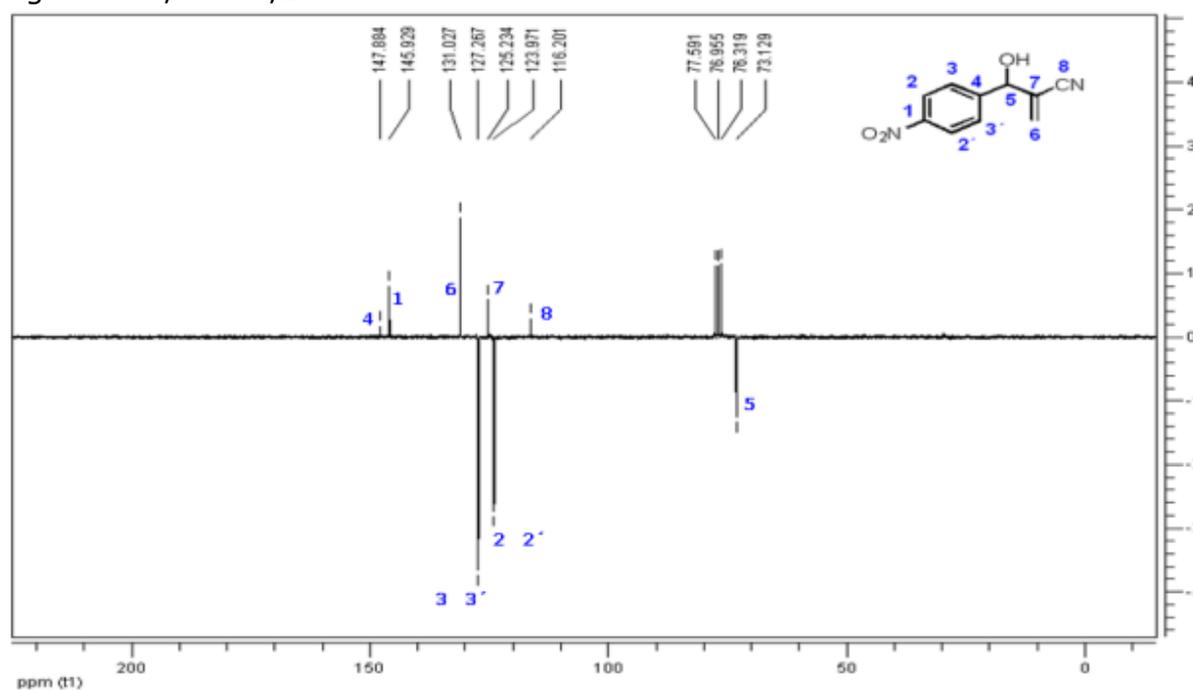
Espectro 9 Cromatograma de 2-(hidroxi(3-nitrofenil)metilêno)acrilonitrila (28).



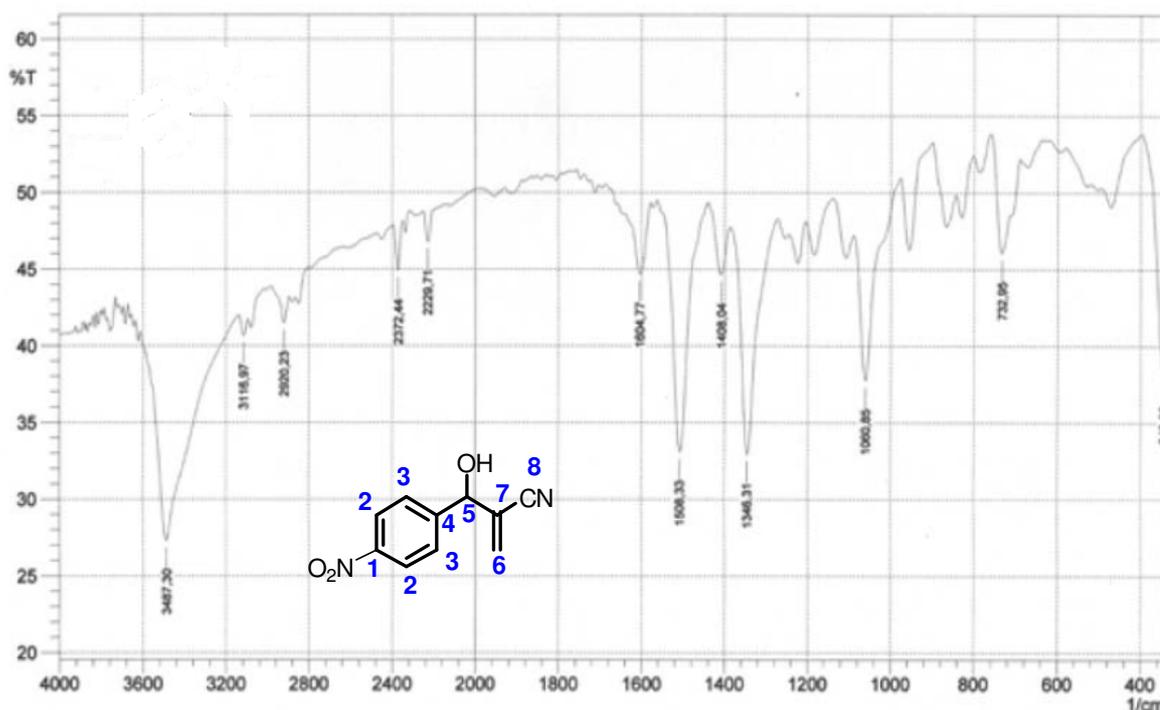
Espectro 10 Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz) de 2-(hidroxi(4-nitrofenil)metilêno)acrilonitrila (29).



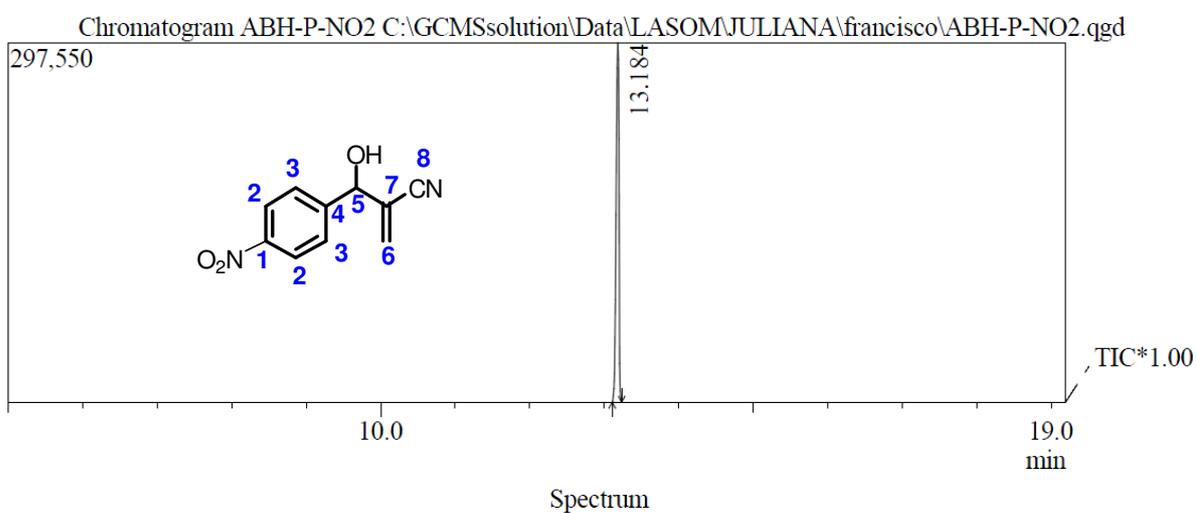
Espectro 11 Expansão do Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz) de (29) na região de 6,04 a 6,16.



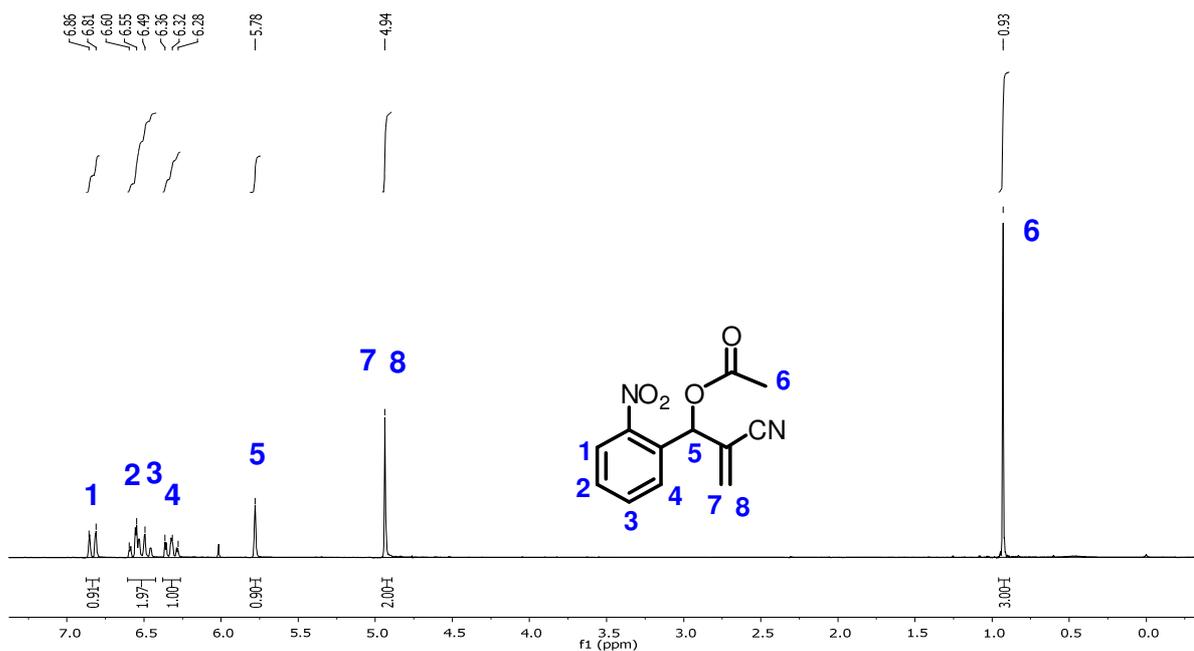
Espectro 12 Espectro de RMN¹³C-APT (CDCl₃, 50MHz) de 2-(hidroxi(4-nitrofenil) metilêno)acrilonitrila (29).



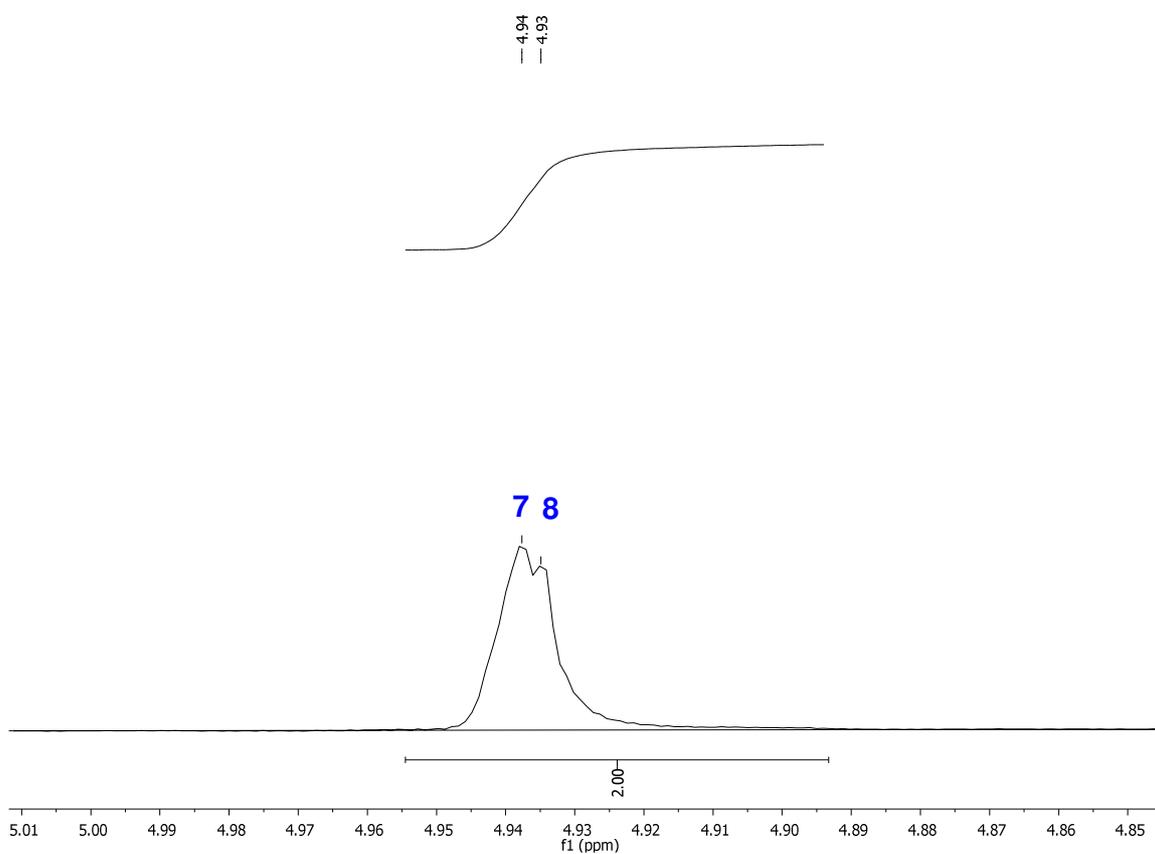
Espectro 13 Espectro de Infravermelho em cm^{-1} de 2-(hidroxi(4-nitrofenil) metilêno)acrilonitrila (29).



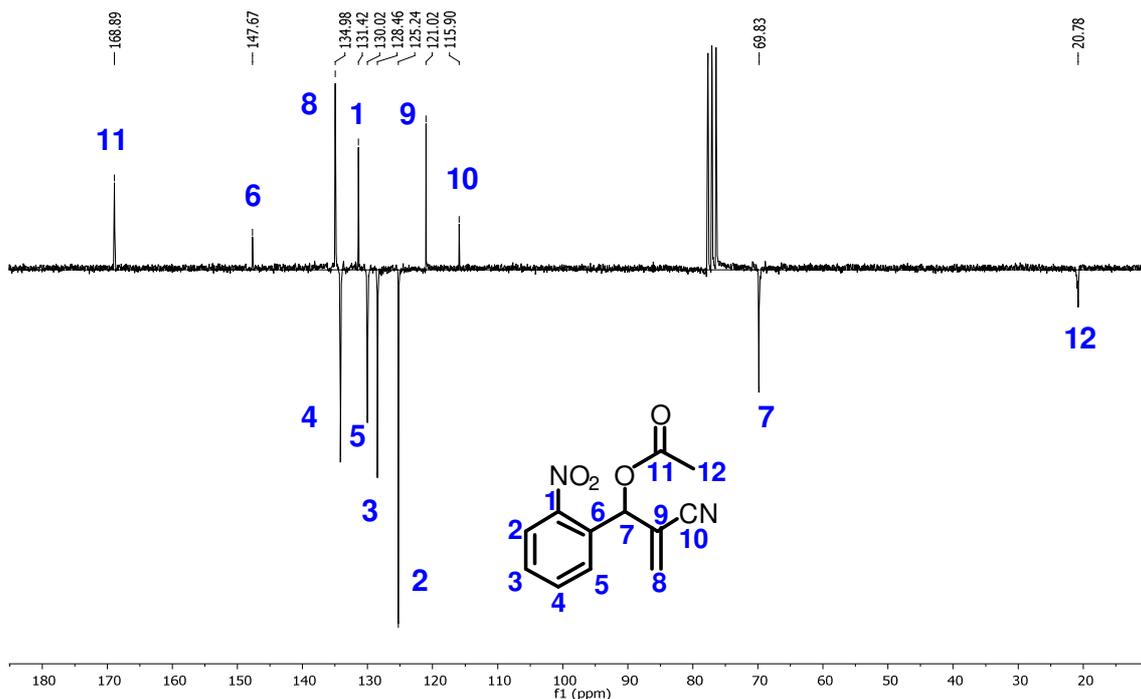
Espectro 14 Cromatograma de 2-(hidroxi(4-nitrofenil) metilêno)acrilonitrila (29).



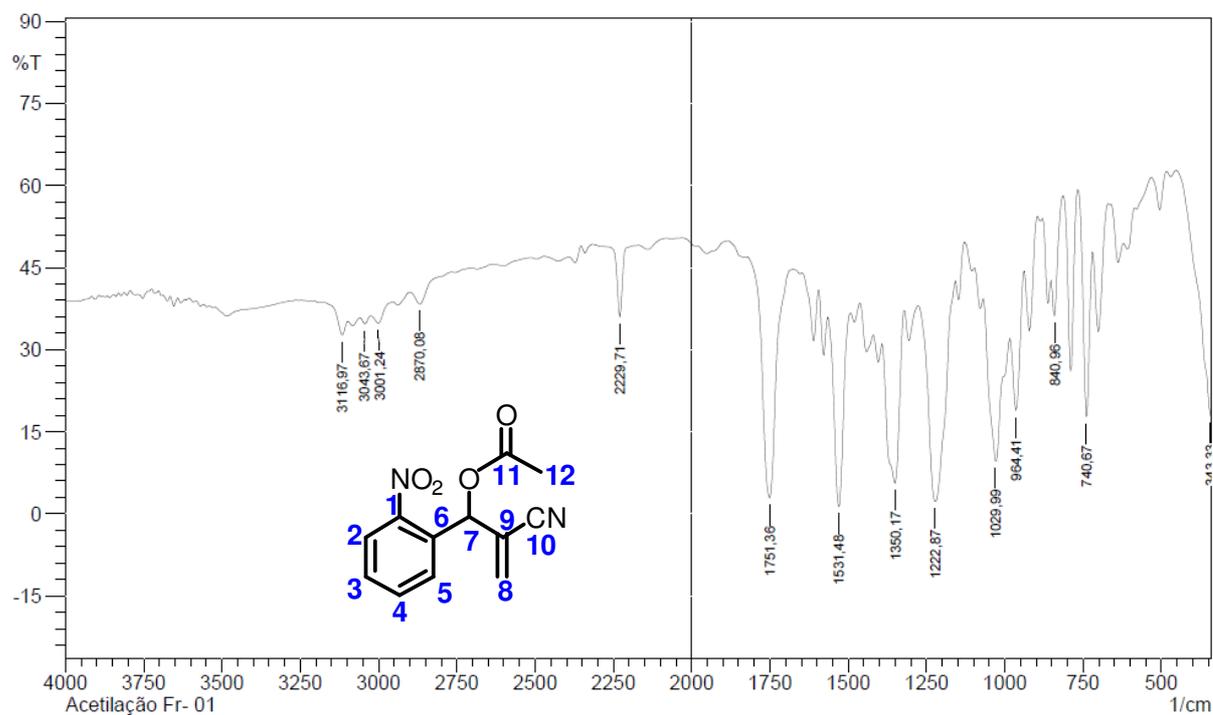
Espectro 15 Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz) do Acetato de 2-ciano-1-(2-nitrofenil)alila (30).



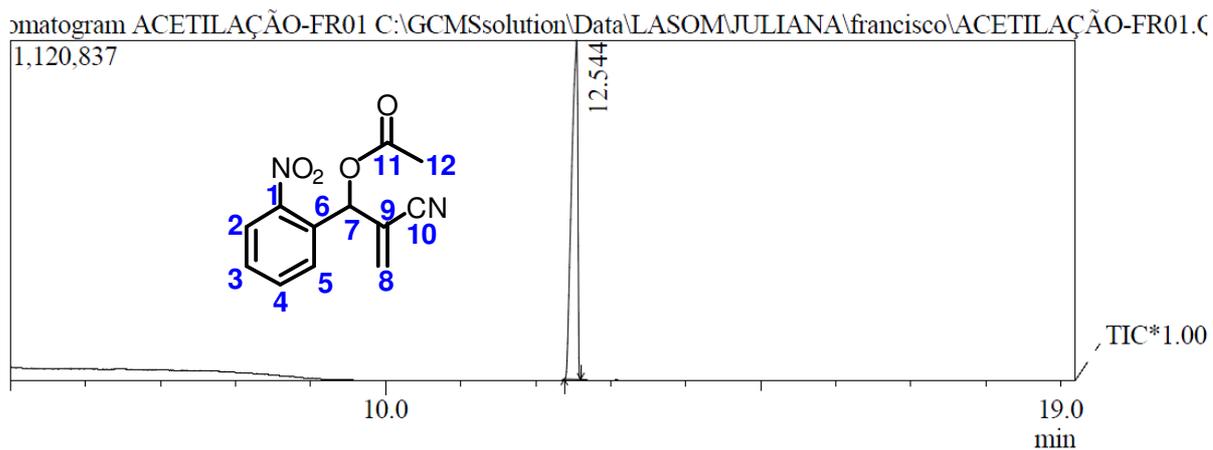
Espectro 16 Expansão do Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz) de (30) na região de 4,85 a 5,01.



Espectro 17 Espectro de RMN¹³C-APT (CDCl₃, 50MHz) do Acetato de 2-ciano-1-(2-nitrofenil)alila (30).

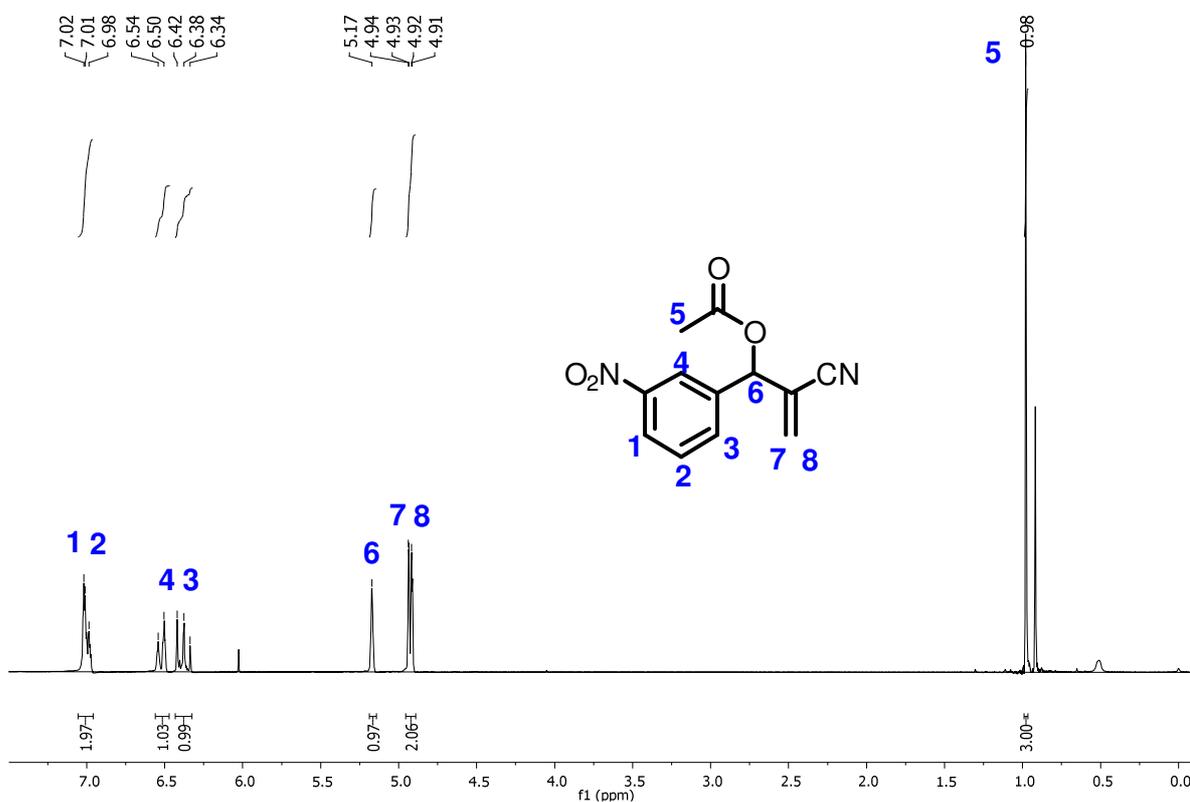


Espectro 18 Espectro de Infravermelho em cm⁻¹ do Acetato de 2-ciano-1-(2-nitrofenil)alila (30).

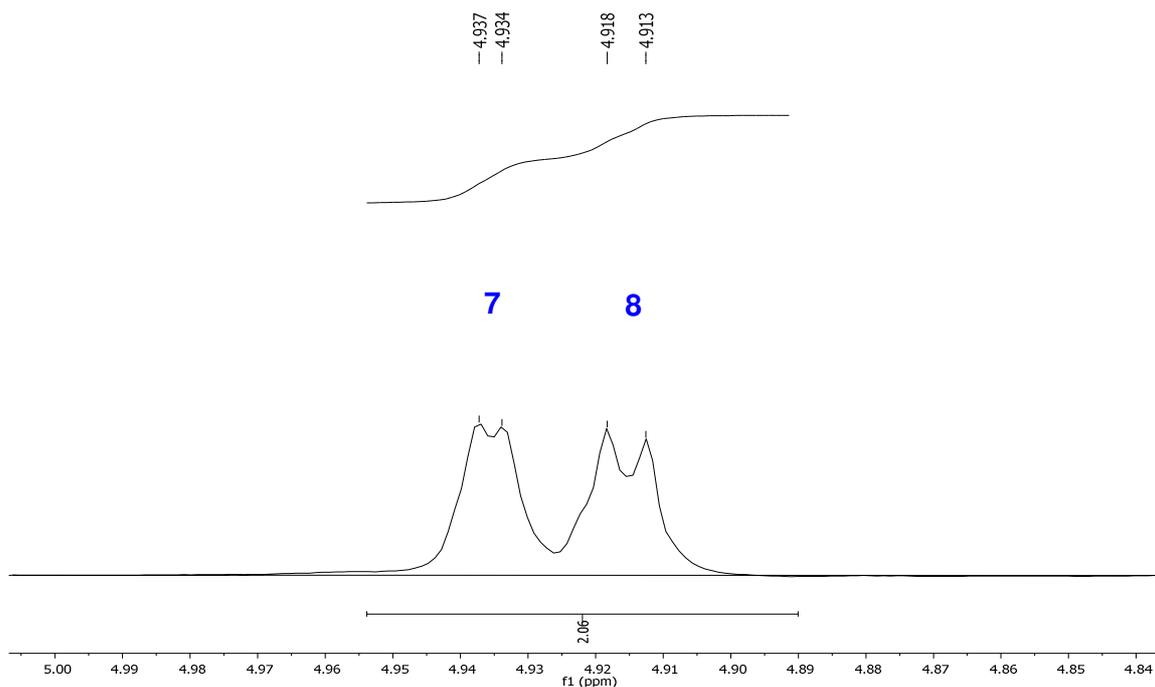


Spectrum

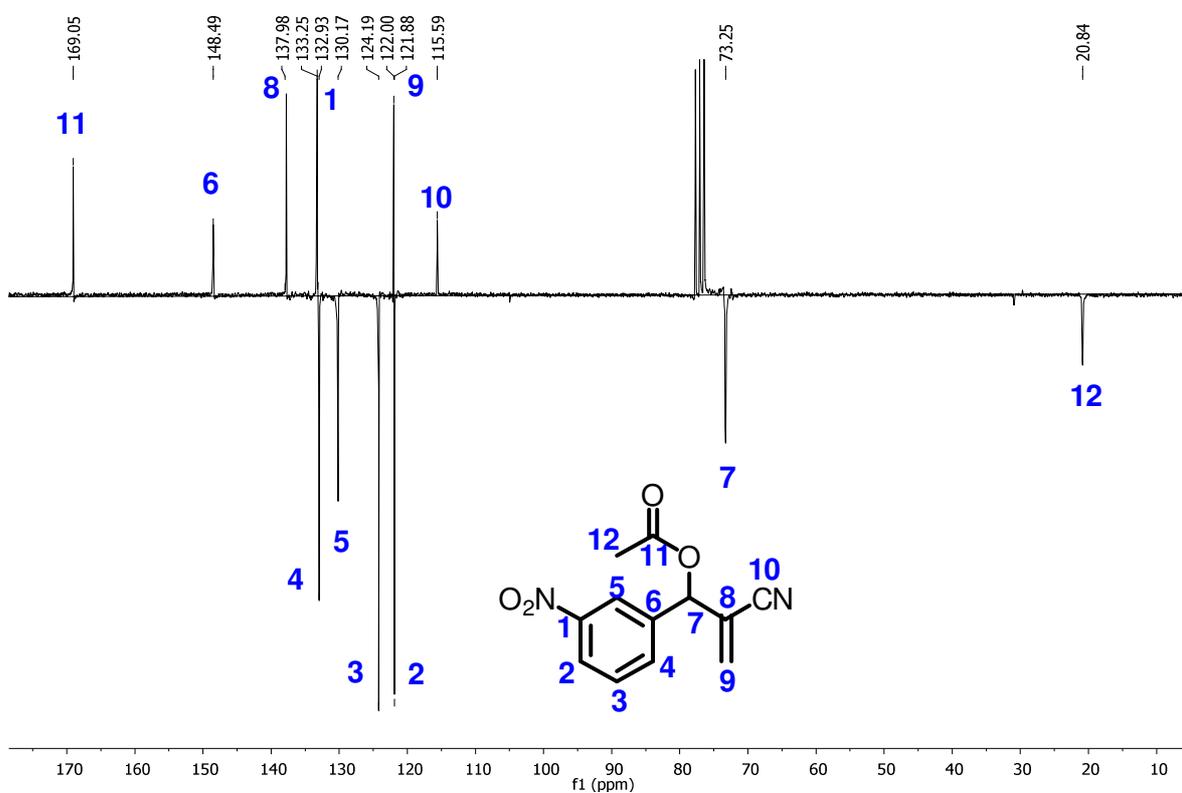
Espectro 19 Cromatograma do Acetato de 2-ciano-1-(2-nitrofenil)alila (30).



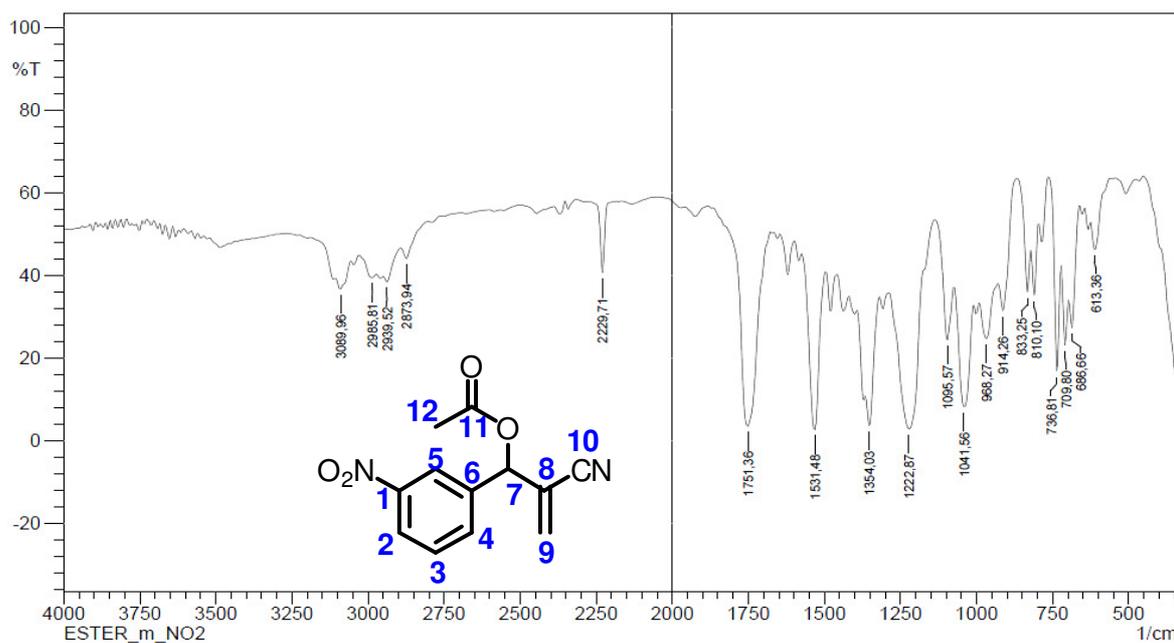
Espectro 20 Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz) do Acetato de 2-ciano-1-(3-nitrofenil)alila (31).



Espectro 21 Expansão do Espectro de RMN^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de (31) na região de 4,84 a 5,00.

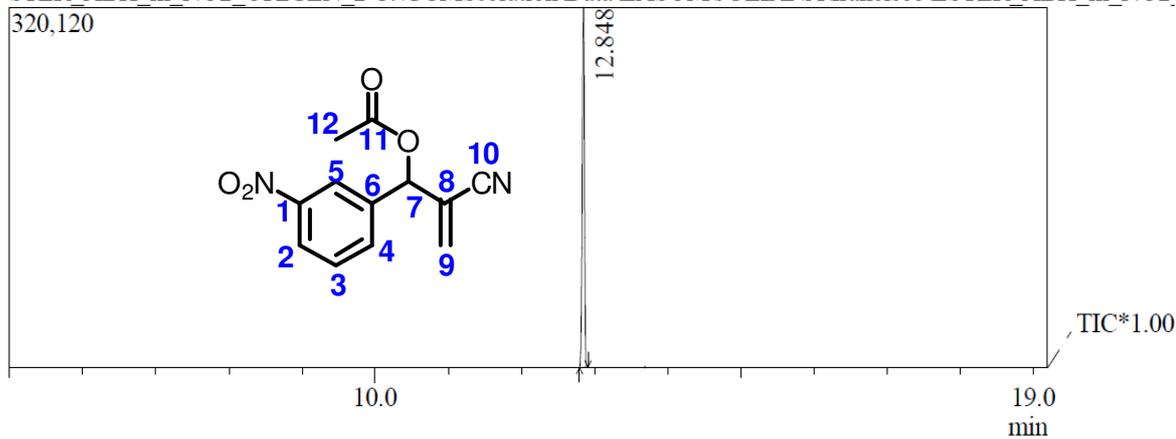


Espectro 22 Espectro de RMN^{13}C -APT (CDCl_3 , 50MHz) do Acetato de 2-ciano-1-(3-nitrofenil)alila (31).



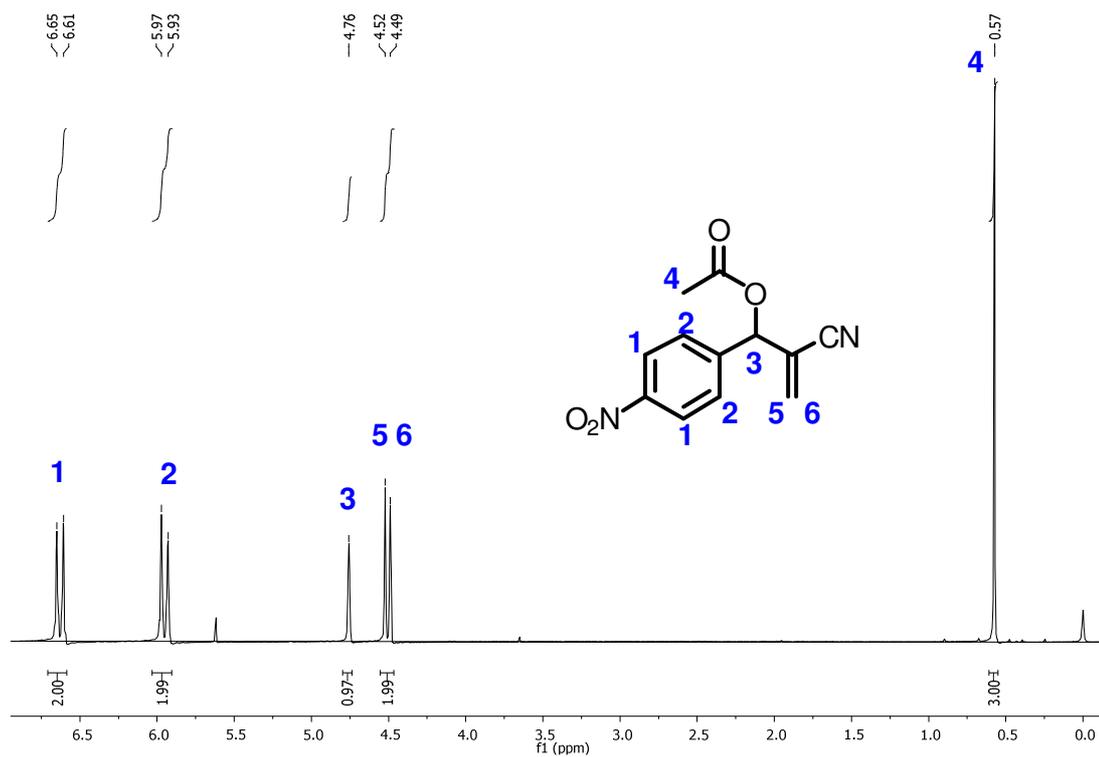
Espectro 23 Espectro de Infravermelho em cm^{-1} do Acetato de 2-ciano-1-(3-nitrofenil)alila (31).

STER_ABH_m_NO2_ORIGEN_2 C:\GCMSSolution\Data\LASOM\JULIANA\francisco\ESTER_ABH_m_NO2

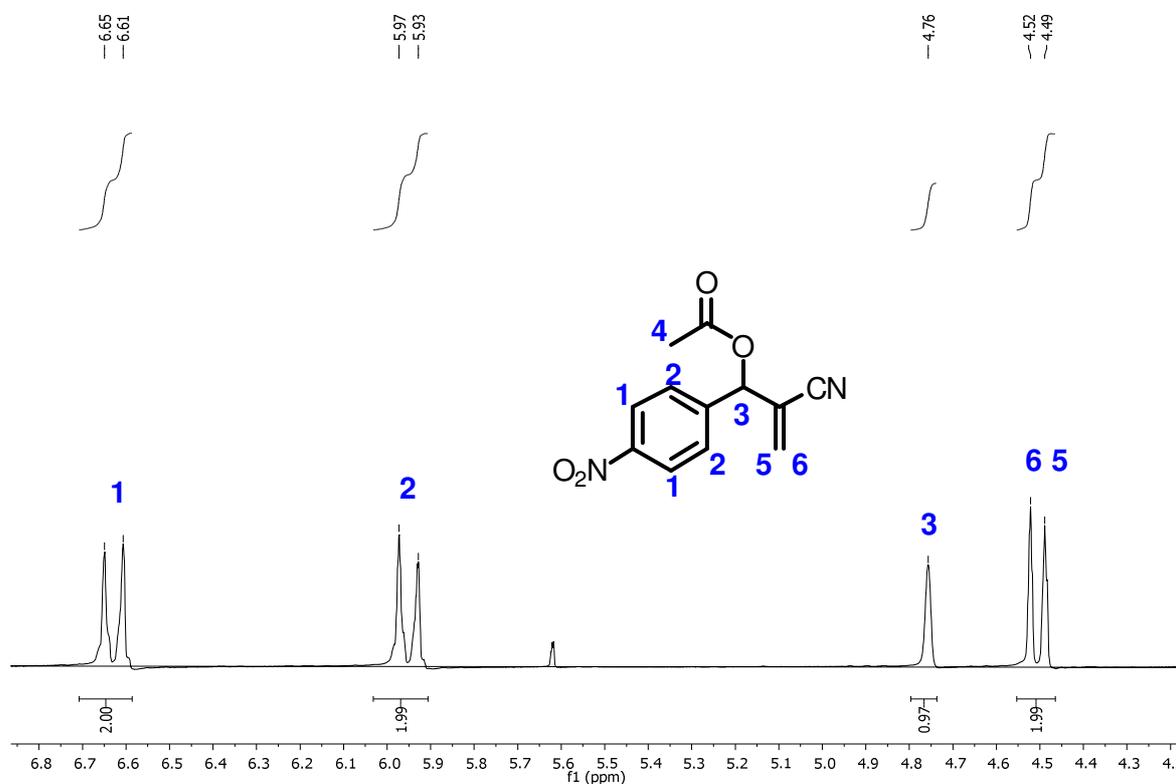


Spectrum

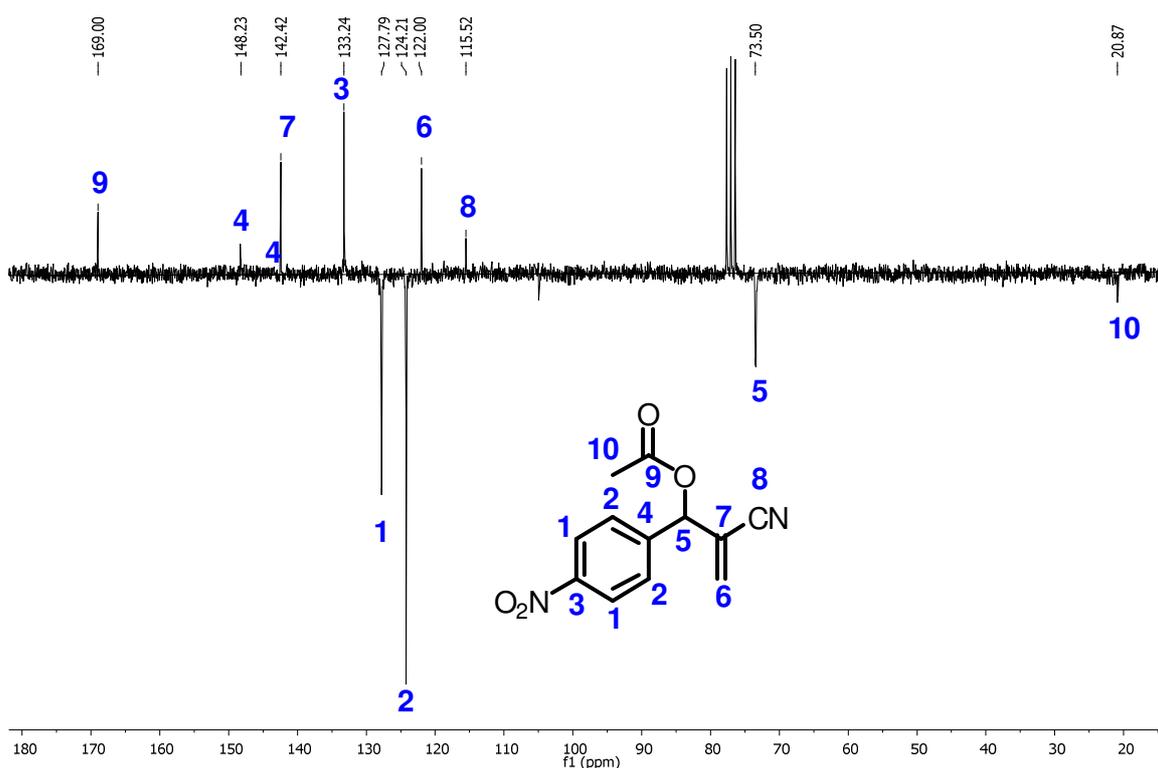
Espectro 24 Cromatograma do Acetato de 2-ciano-1-(3-nitrofenil)alila (31).



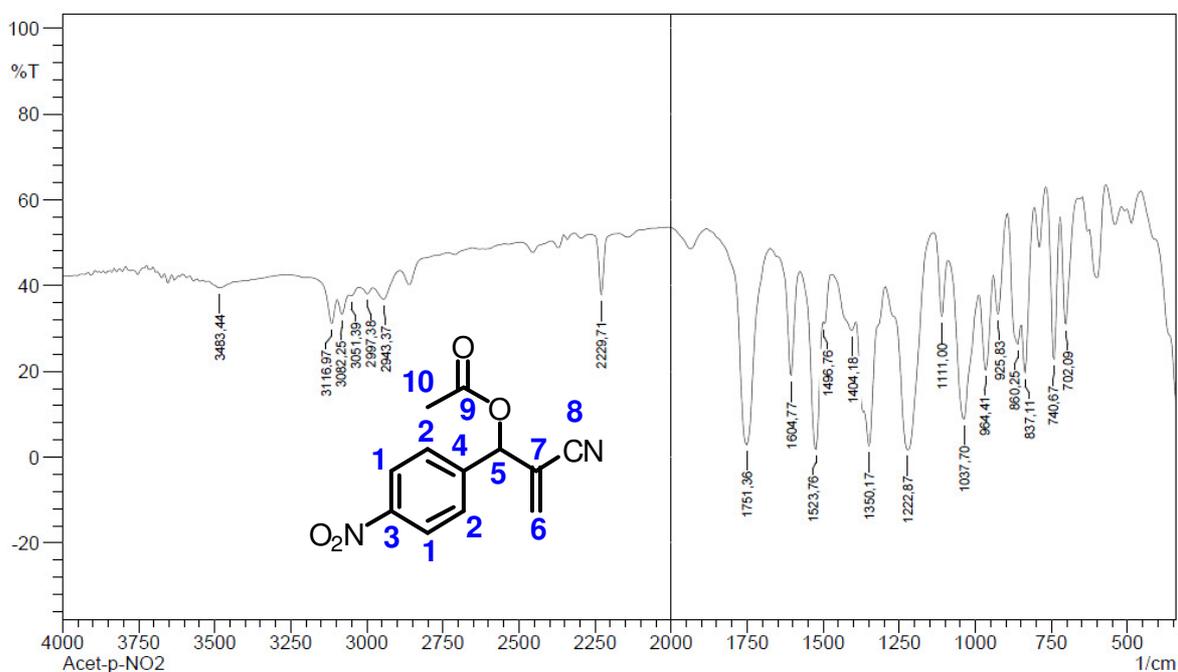
Espectro 25 Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz) do Acetato de 2-ciano-1-(4-nitrofenil)alila (32).



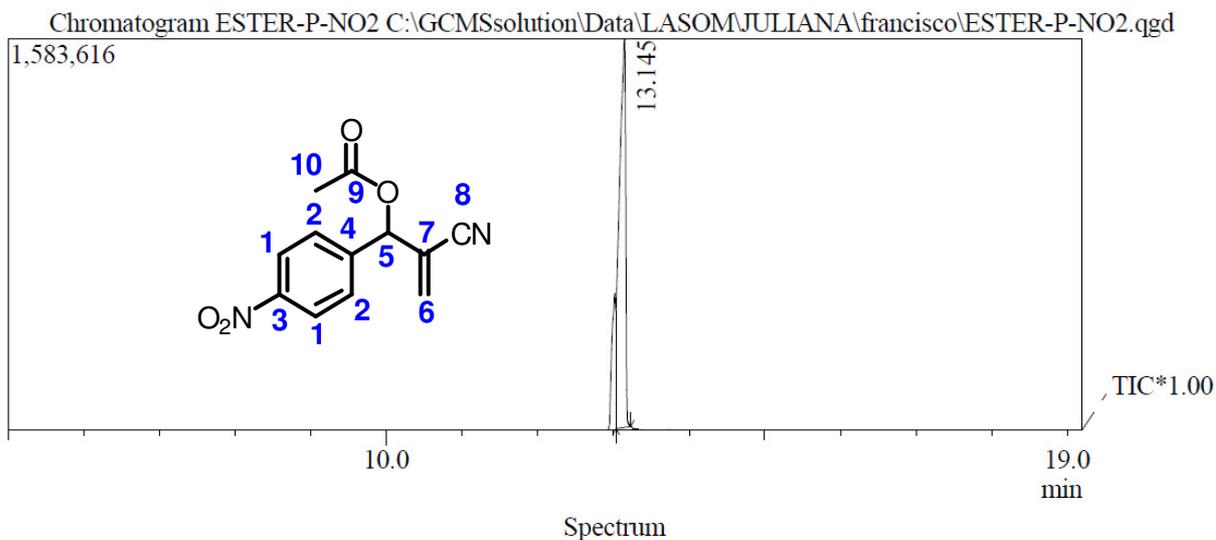
Espectro 26 Expansão do Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz) de (32) na região de 4,3 a 6,8.



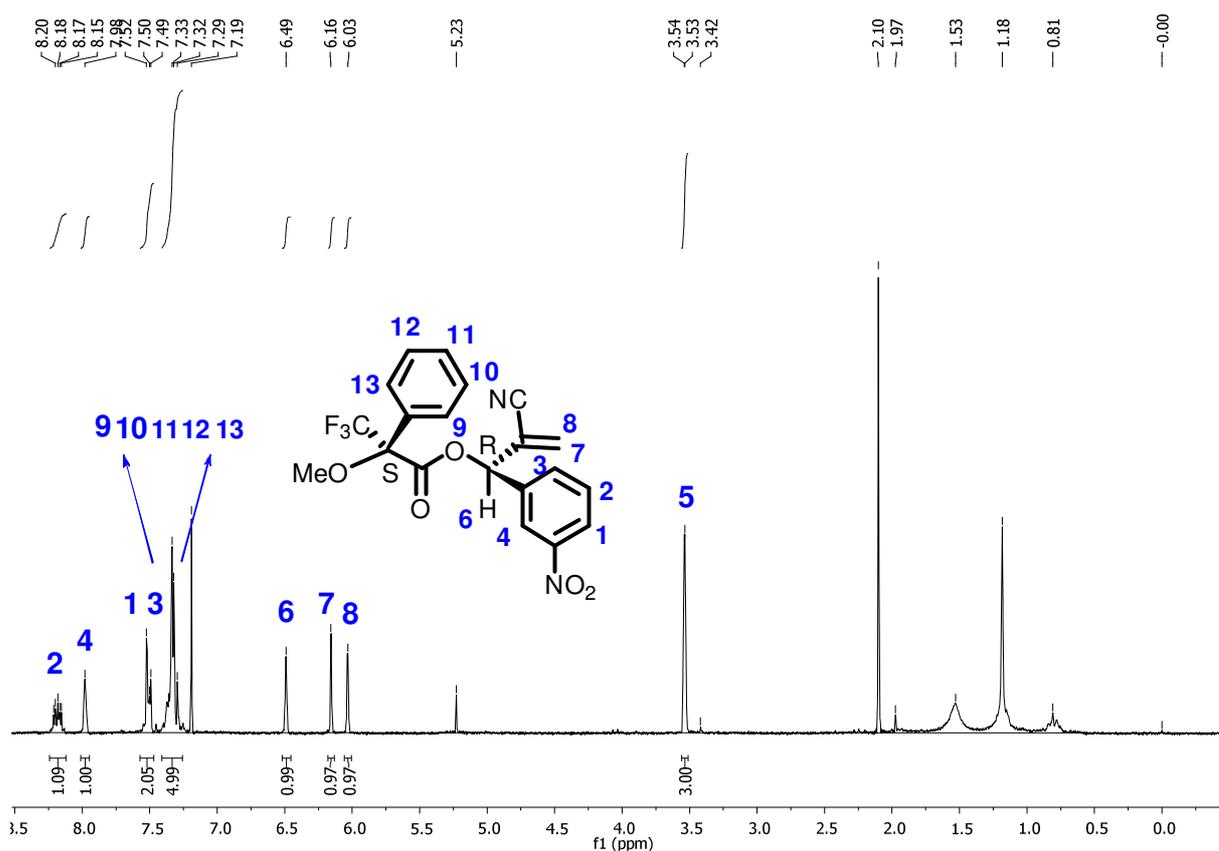
Espectro 27 Espectro de RMN¹³C-APT (CDCl₃, 50MHz) do Acetato de 2-ciano-1-(4-nitrofenil)alila (32).



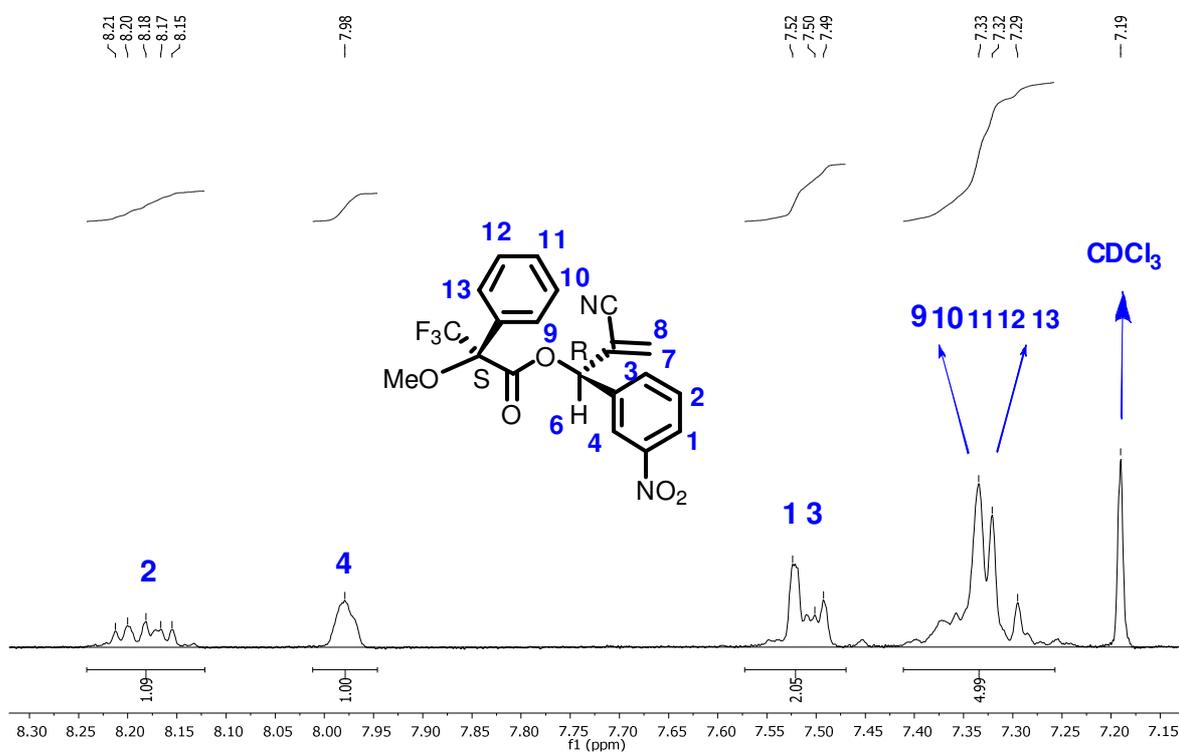
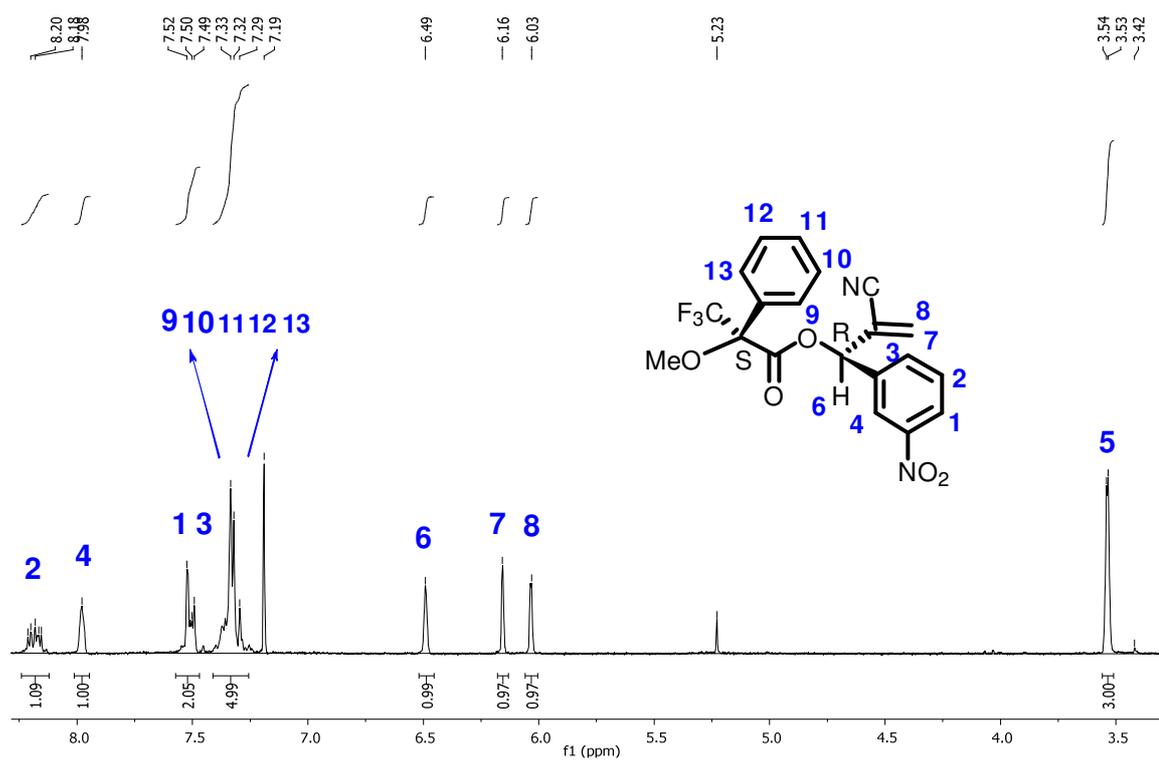
Espectro 28 Espectro de Infravermelho em cm⁻¹ do Acetato de 2-ciano-1-(4-nitrofenil)alila (32).

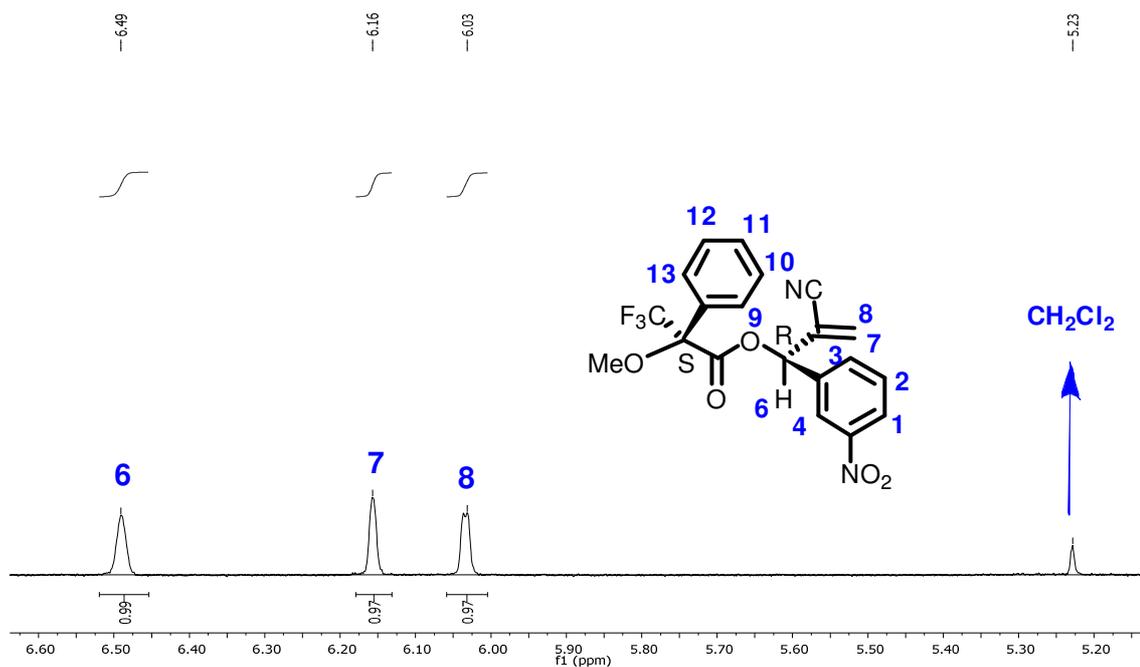


Espectro 29 Cromatograma do Acetato de 2-ciano-1-(4-nitrofenil)alila (32).

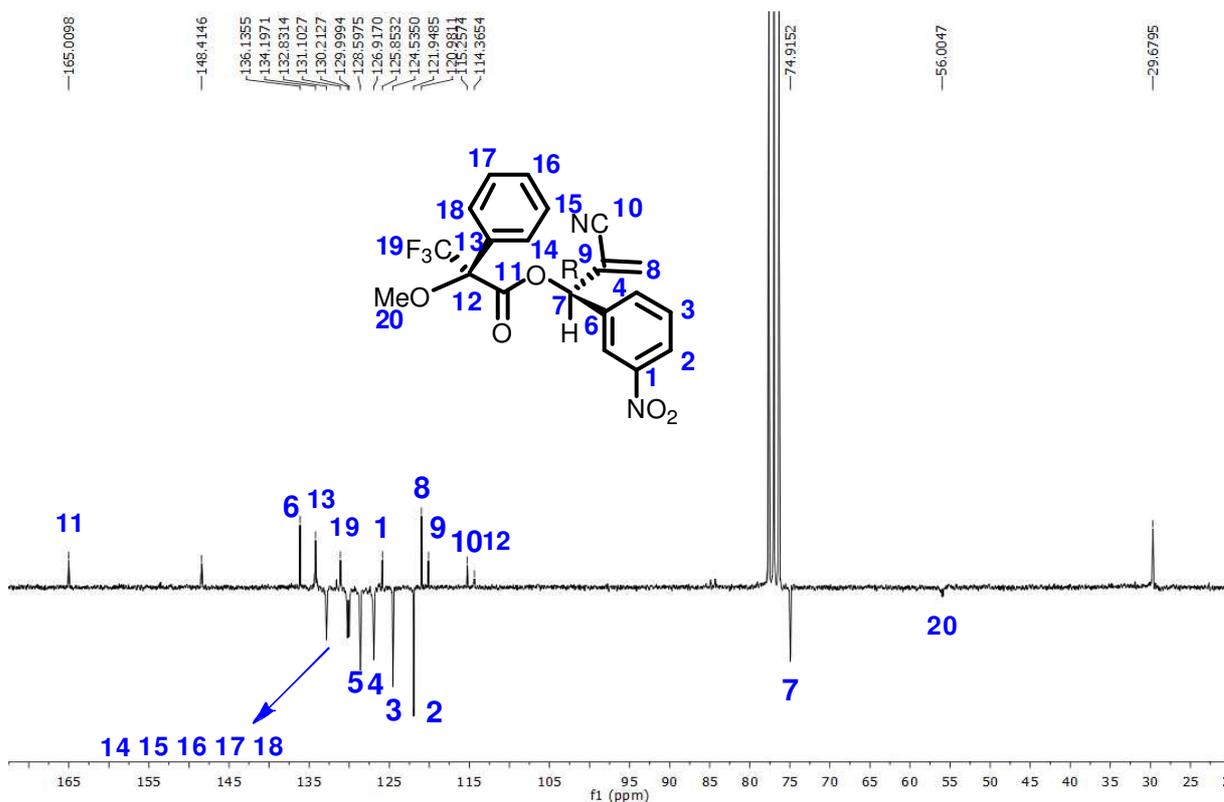


Espectro 30 Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz) do Propanoato de (S)-((R)-2-ciano-1-(3-nitrofenil)alil) 3,3,3-trifluoro-2-metóxi-2-fenil (36).

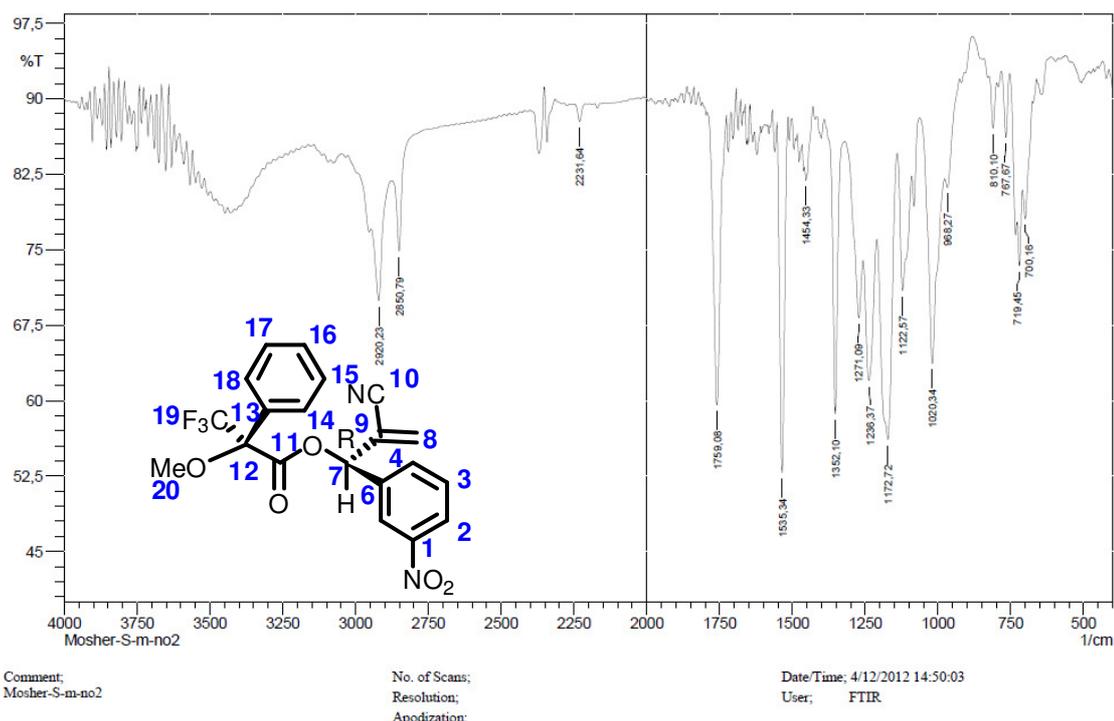




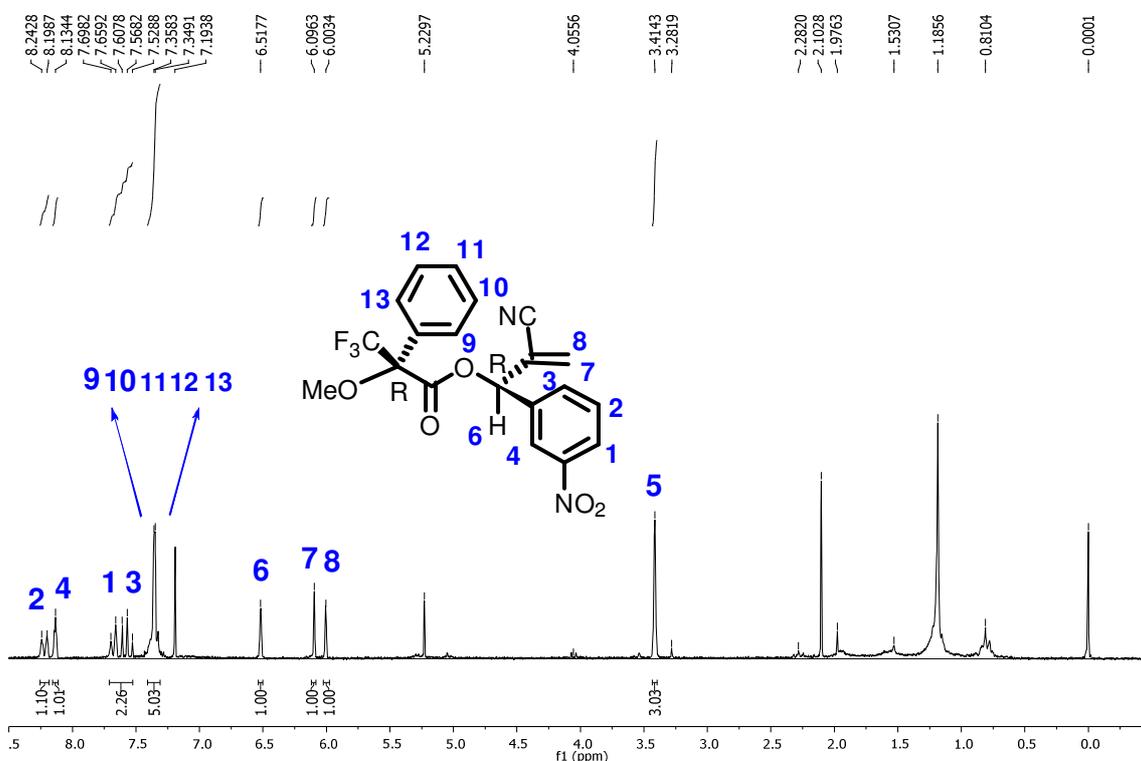
Espectro 33 Expansão do Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz) de (36) na região de 5,20 a 6,60.

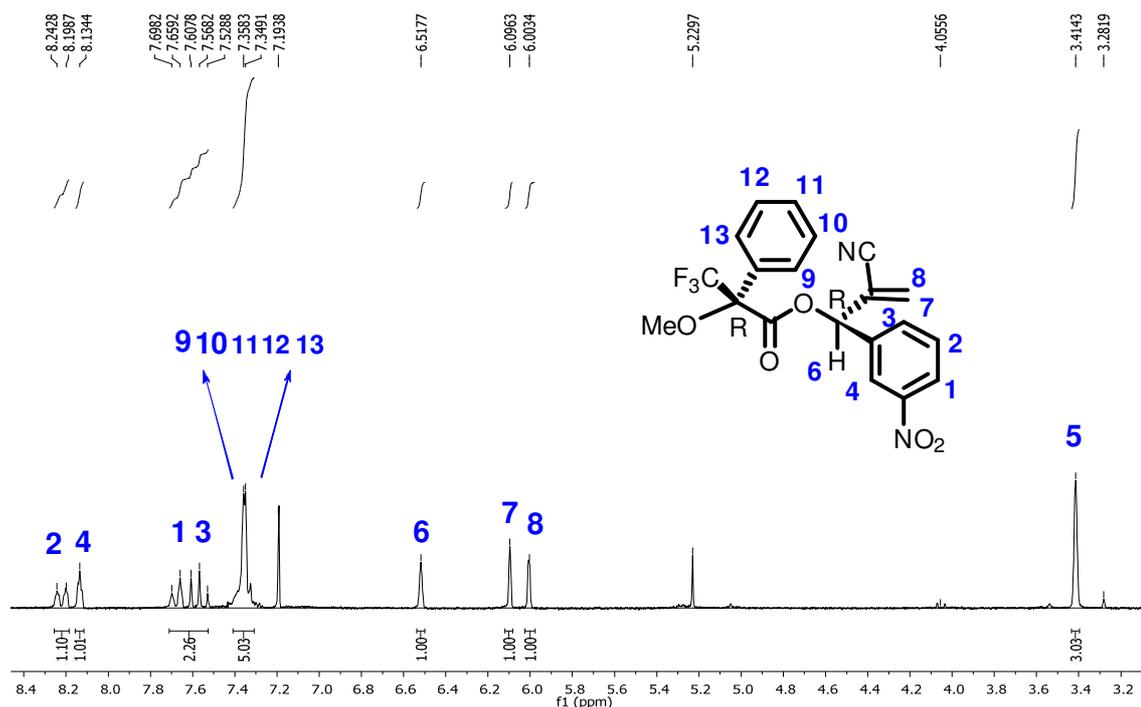


Espectro 34 Espectro de RMN¹³C-APT (CDCl₃, 50MHz) do Propanoato de (S)-((R)-2-ciano-1-(3-nitrofenil)alil) 3,3,3-trifluoro-2-metóxi-2-fenil (36).

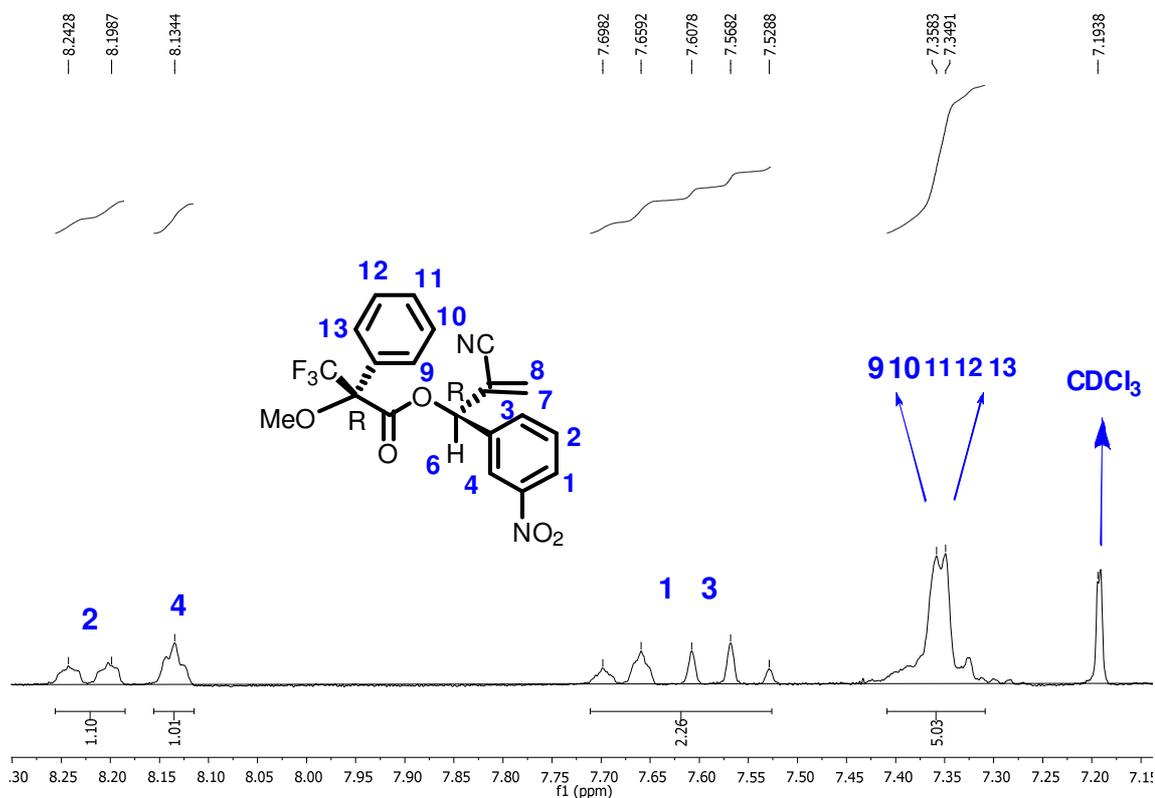


Espectro 35 Espectro de Infravermelho em cm^{-1} do Propanoato de (S)-((R)-2-ciano-1-(3-nitrofenil)alil) 3,3,3-trifluoro-2-metóxi-2-fenil (36).

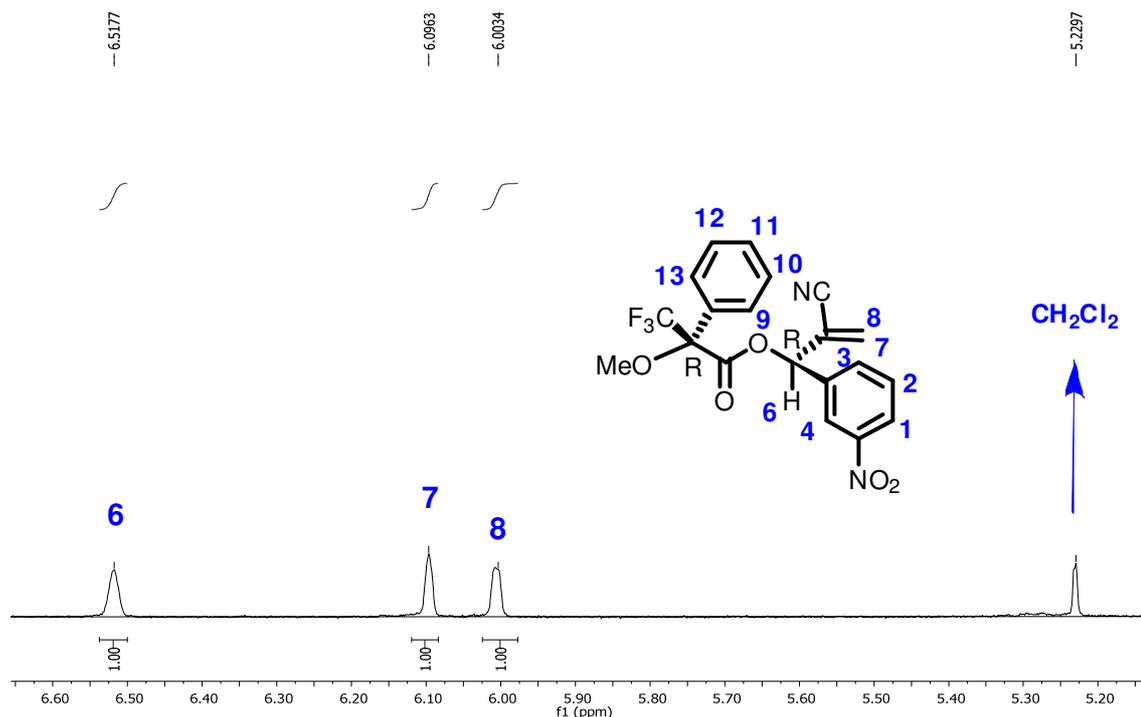




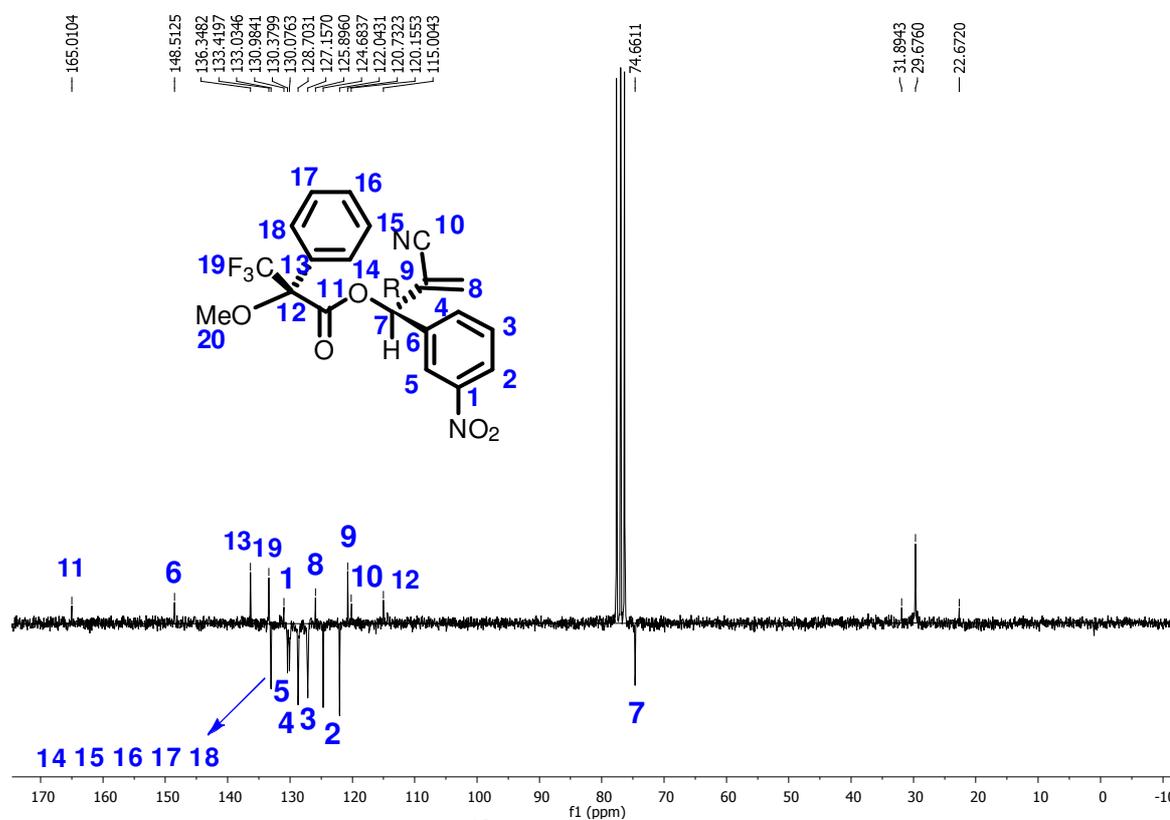
Espectro 37 Expansão do Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz) de (39) na região de 3,2 a 8,4.



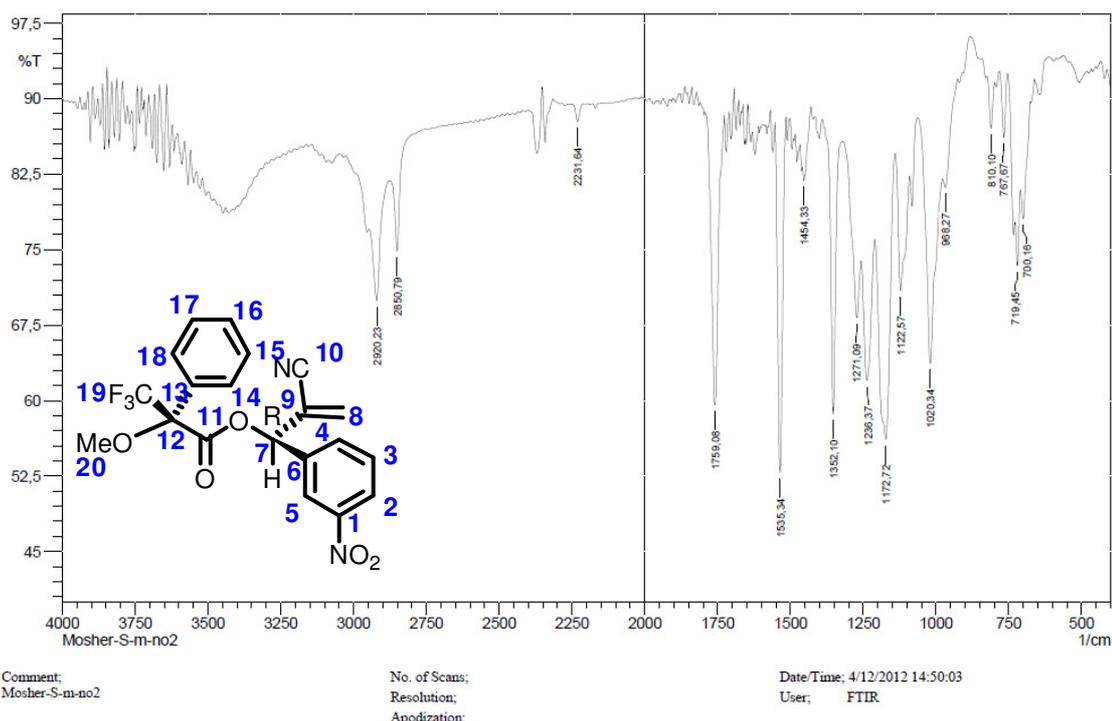
Espectro 38 Expansão do Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz) de (39) na região de 7,15 a 8,30.



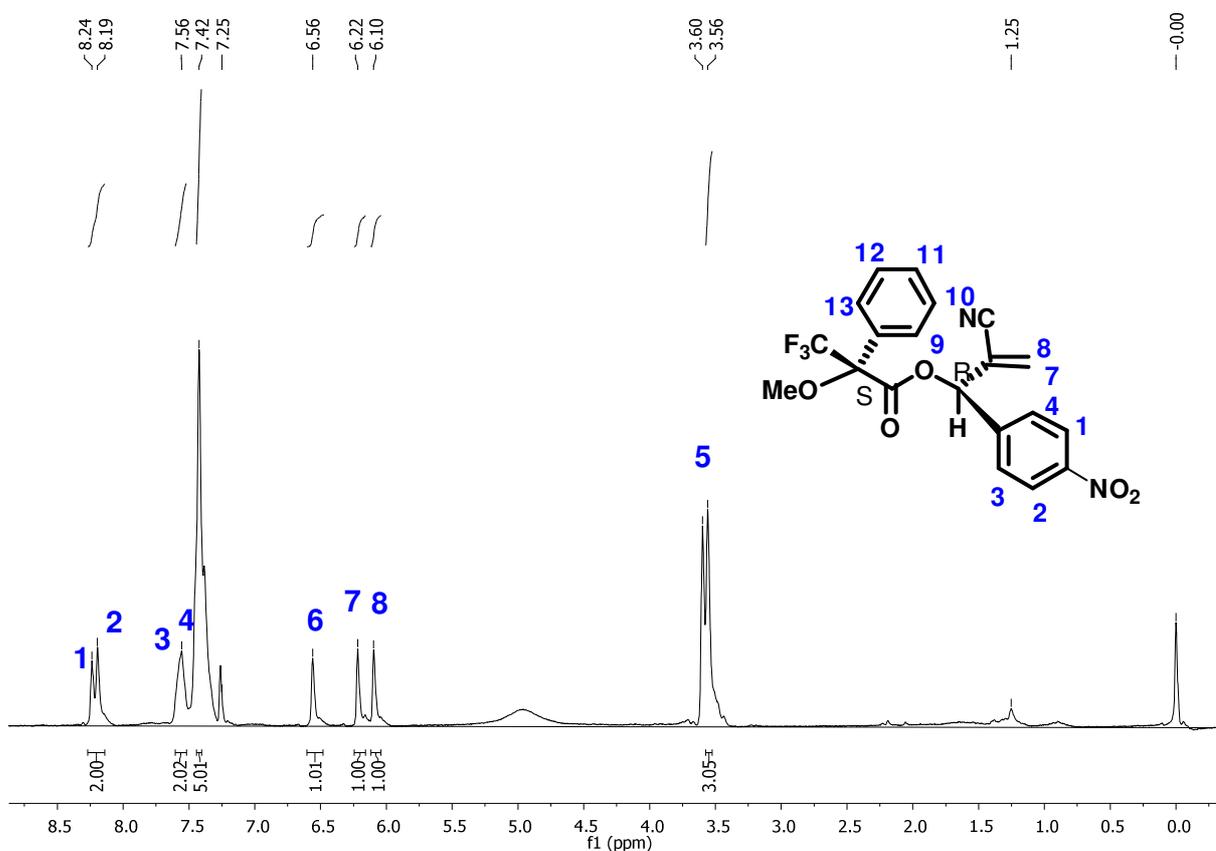
Espectro 39 Expansão do Espectro de RMN^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de (39) na região de 5,20 a 6,60.



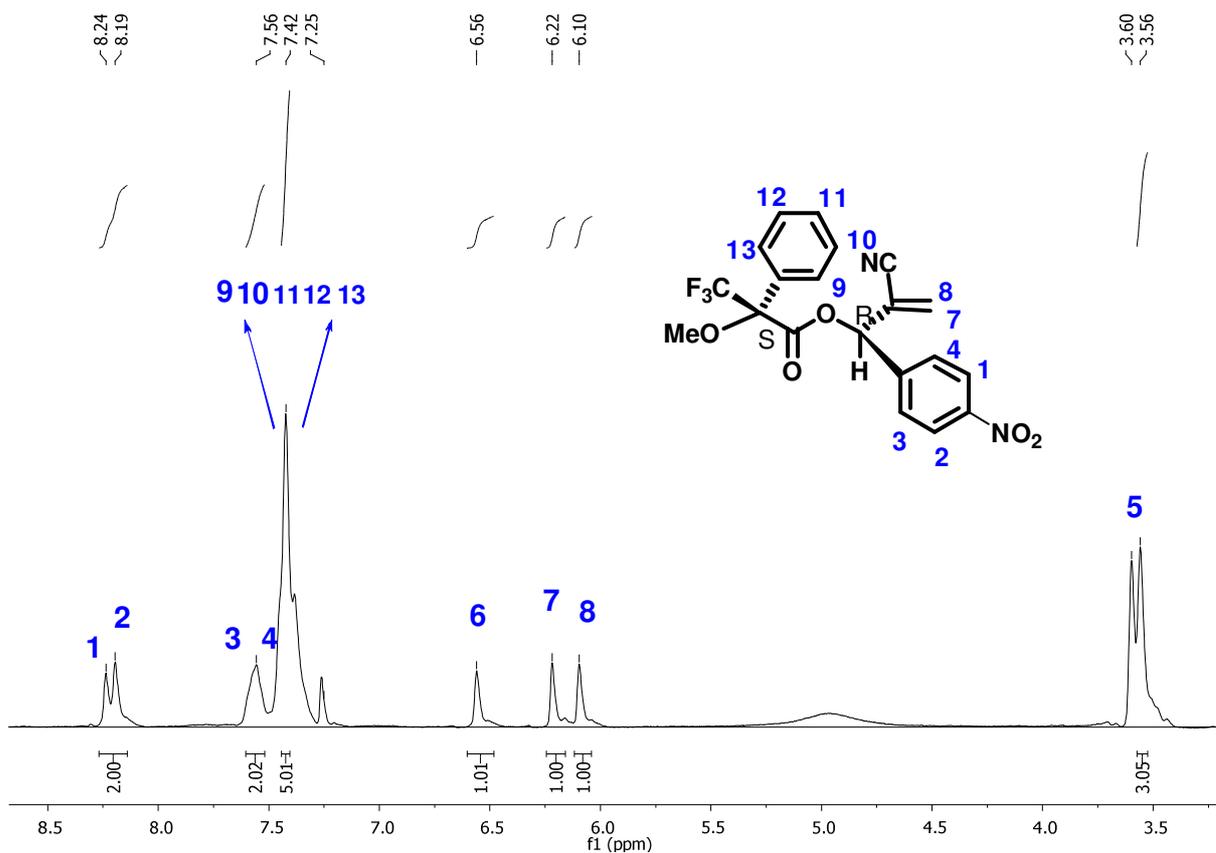
Espectro 40 Espectro de RMN^{13}C -APT (CDCl_3 , 50MHz) do Propanoato de (R)-((R)-2-ciano-1-(3-nitrofenil)alil) 3,3,3-trifluoro-2-metóxi-2-fenil (39).



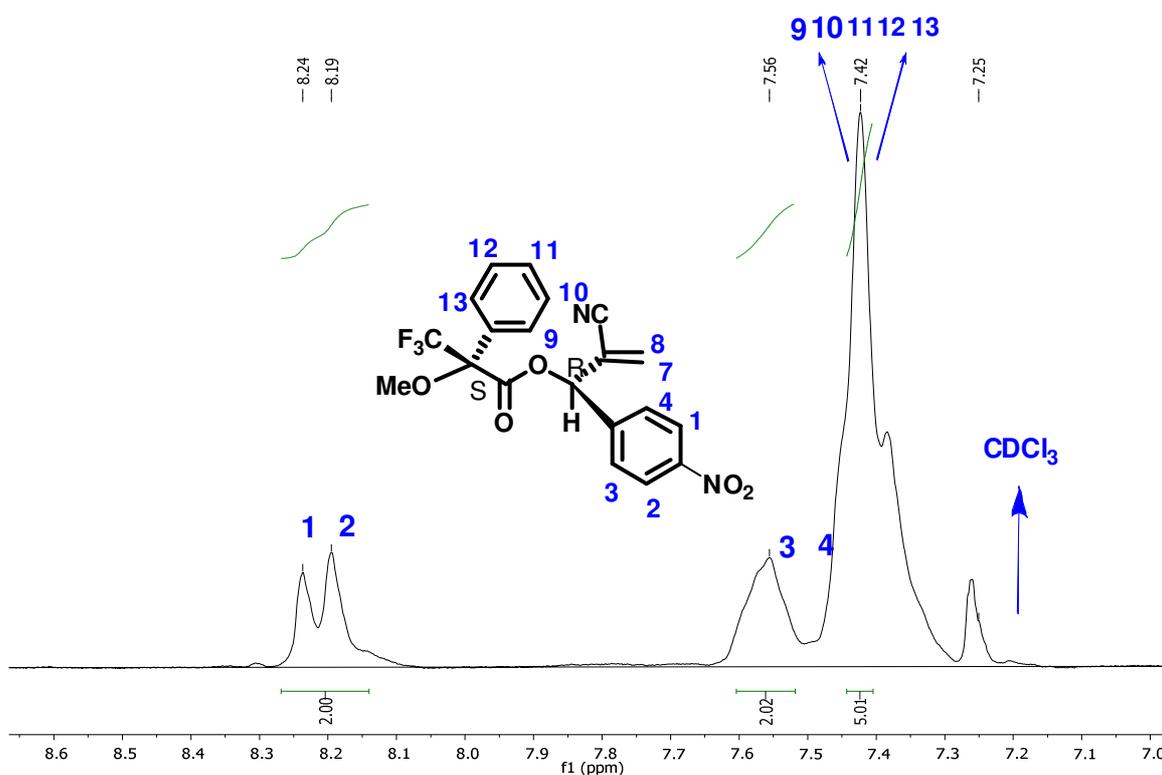
Espectro 41 Espectro de Infravermelho em cm^{-1} do Propanoato de (R)-((R)-2-ciano-1-(3-nitrofenil)alil) 3,3,3-trifluoro-2-metóxi-2-fenil (39).



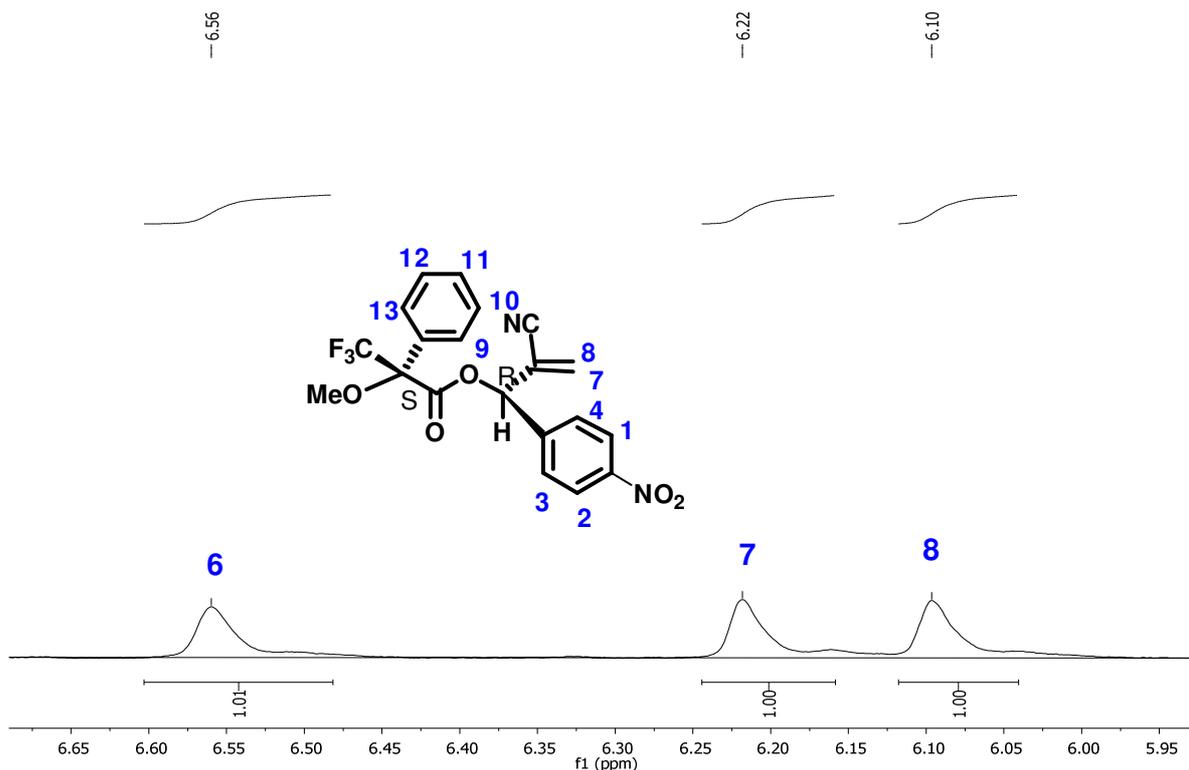
Espectro 42 Cromatograma do Propanoato de (S)-((R)-2-ciano-1-(4-nitrofenil)alil) 3,3,3-trifluoro-2-metóxi-2-fenil (37).



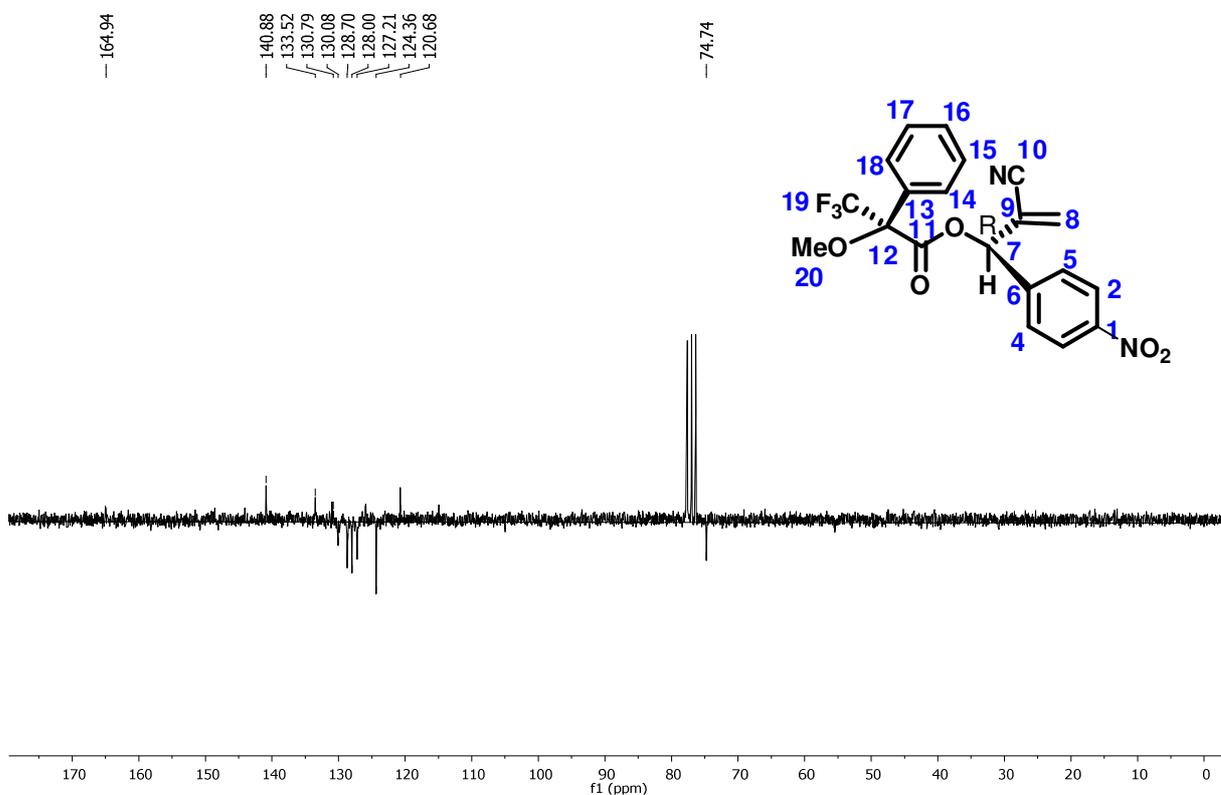
Espectro 43 Expansão do Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz) de (37) na região de 3,2 a 8,5.



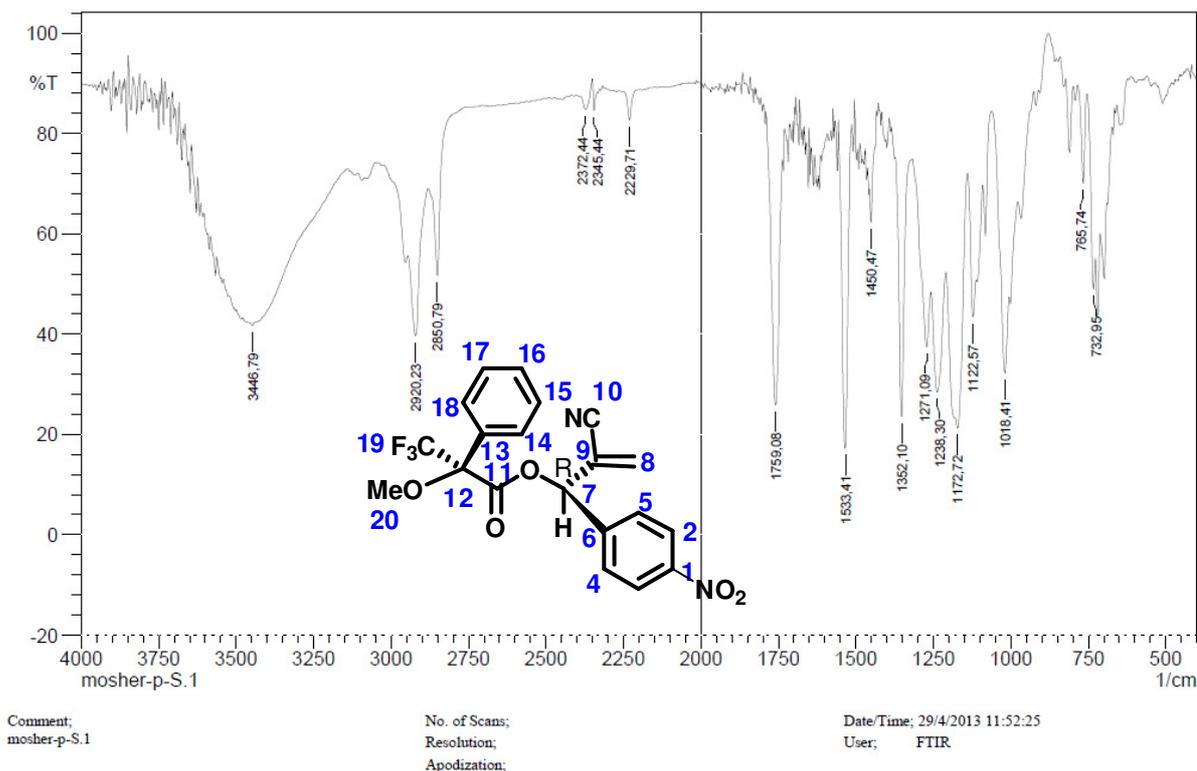
Espectro 44 Expansão do Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz) de (37) na região de 7,00 a 8,6.



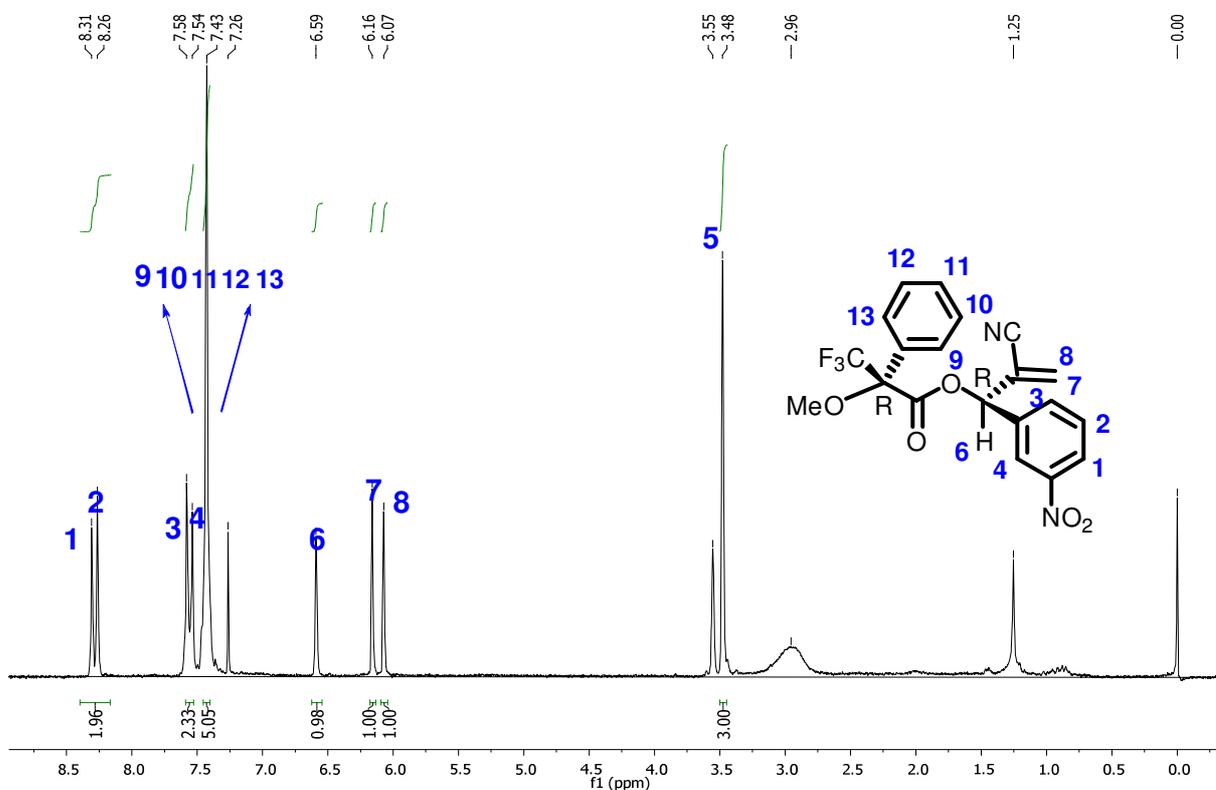
Espectro 45 Expansão do Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz) de (37) na região de 5,95 a 6,65.



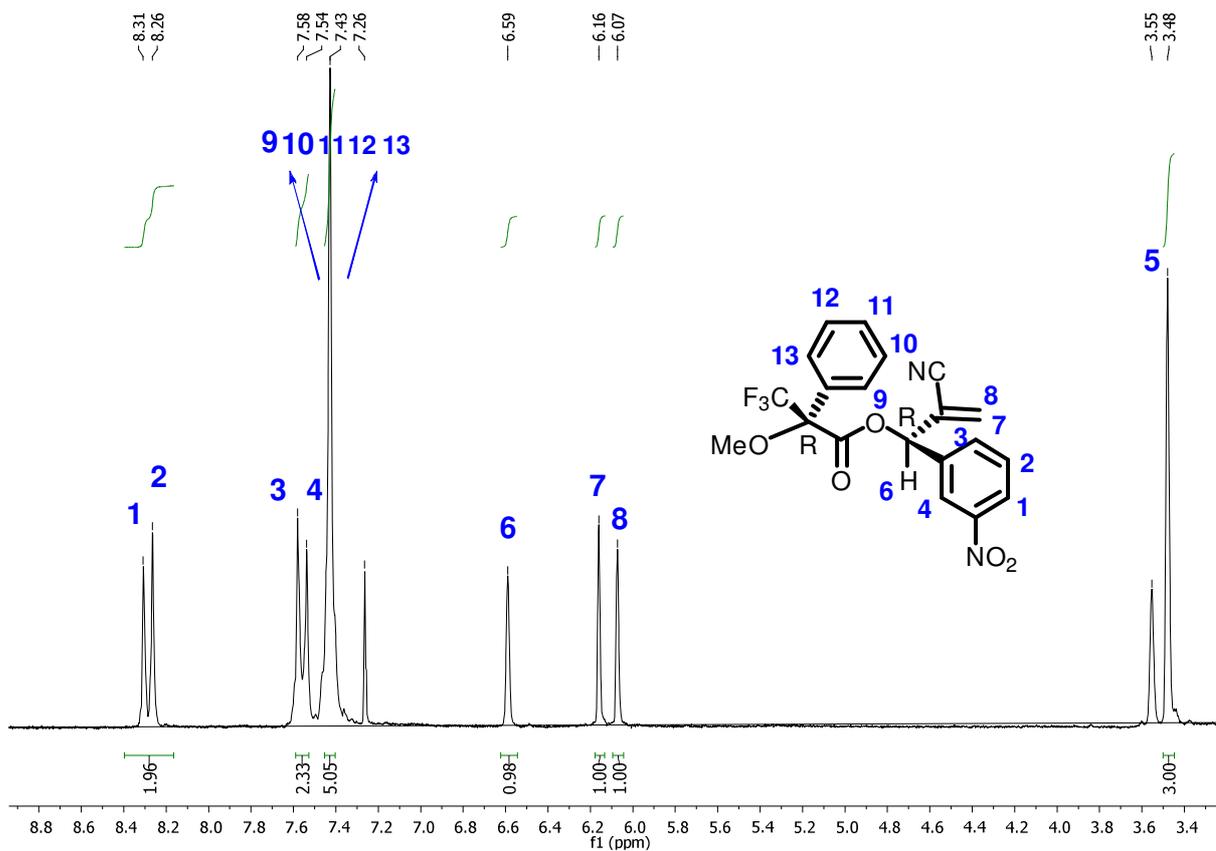
Espectro 46 Espectro de RMN¹³C-APT (CDCl₃, 50MHz) do Propanoato de (S)-((R)-2-ciano-1-(4-nitrofenil)alil) 3,3,3-trifluoro-2-metóxi-2-fenil (37).



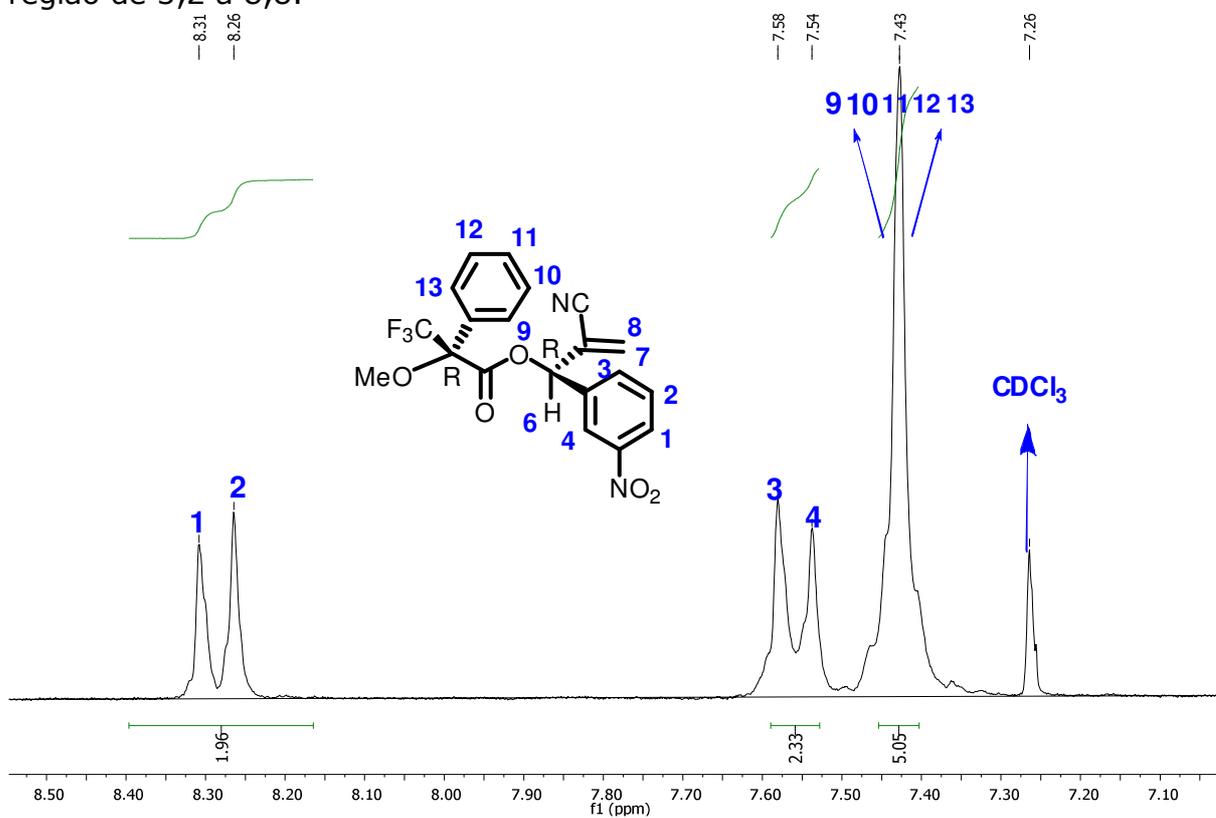
Espectro 47 Espectro de Infravermelho em cm^{-1} Propanoato de (S)-((R)-2-ciano-1-(4-nitrofenil)alil) 3,3,3-trifluoro-2-metóxi-2-fenil (37).



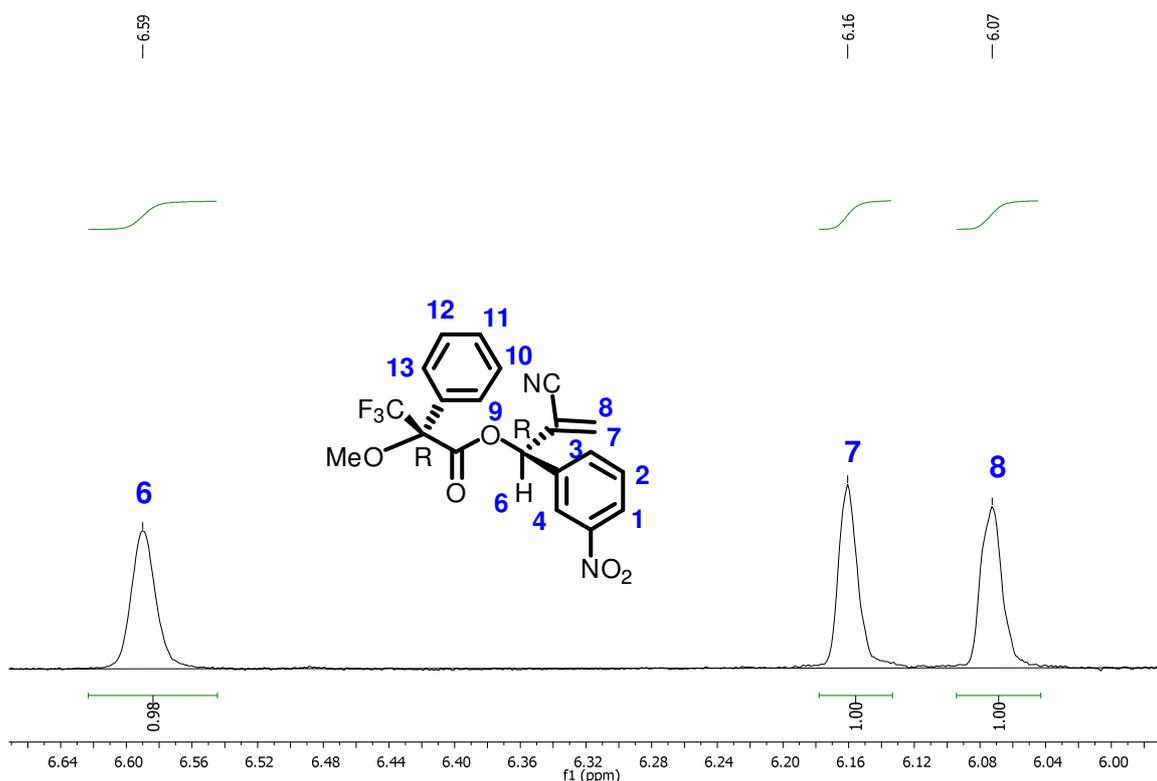
Espectro 48 Cromatograma do Propanoato de (R)-((R)-2-ciano-1-(4-nitrofenil)alil) 3,3,3-trifluoro-2-metóxi-2-fenil (40).



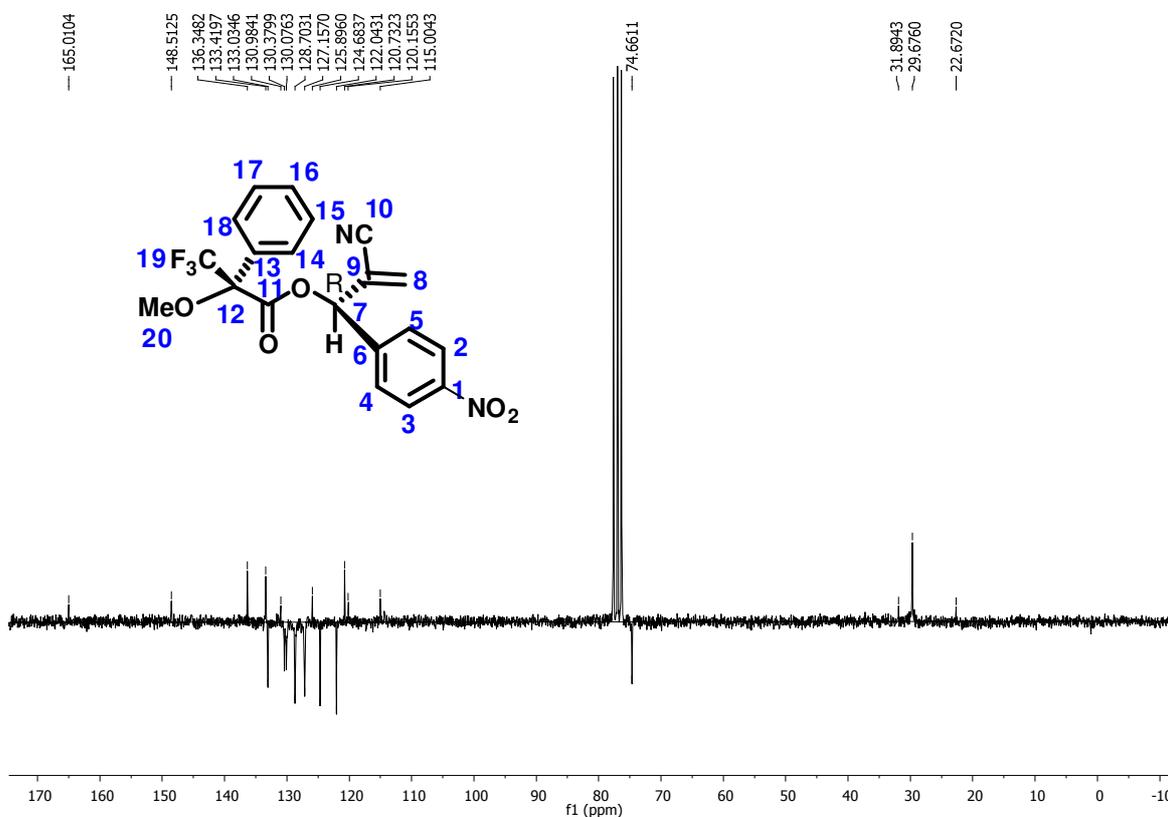
Espectro 49 Expansão do Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz) de (40) na região de 3,2 a 8,8.



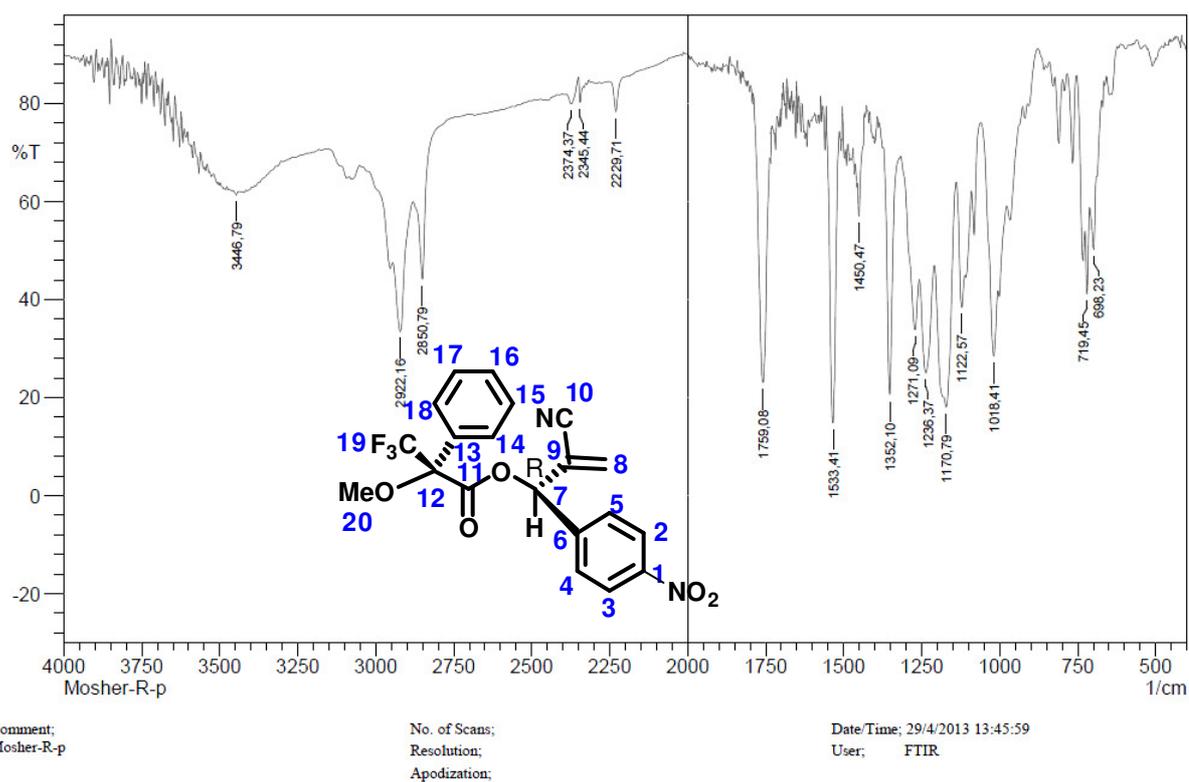
Espectro 50 Expansão do Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz) de (40) na região de 7,00 a 8,50.



Espectro 51 Expansão do Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz) de (40) na região de 6,00 a 6,64.



Espectro 52 Espectro de RMN¹³C-APT (CDCl₃, 50MHz) do Propanoato de (R)-((R)-2-ciano-1-(4-nitrofenil)alil) 3,3,3-trifluoro-2-metóxi-2-fenil (40).



Espectro 53 Espectro de Infravermelho em cm^{-1} do Propanoato de (R)-((R)-2-ciano-1-(4-nitrofenil)alil) 3,3,3-trifluoro-2-metóxi-2-fenil (40).