



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

TESE DE DOUTORADO

Biocatálise na produção de moléculas orgânicas:
oxidoredutases de fungos marinhos para a síntese de álcoois quirais e lipase de
Candida antarctica na produção de amidas fenólicas graxas

Ana Maria Mouad

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

São Carlos
2014

Biocatálise na produção de moléculas orgânicas:
oxidorreduções de fungos marinhos para a síntese de álcoois quirais e lipase de
Candida antarctica na produção de amidas fenólicas graxas

Ana Maria Mouad

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Físico-Química
Orientador: Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

São Carlos
2014

Resumo

Neste trabalho, enzimas álcool-desidrogenases provenientes de fungos marinhos e a lipase imobilizada de *Candida antarctica* foram utilizadas para produção de compostos de interesse sintético e biológico. No capítulo 1, enzimas álcool-desidrogenases de fungos isolados da alga marinha *Bostrychia radicans* foram empregadas em reações de redução de cetonas fluoradas **1-5**. Os fungos identificados como *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197, *Eutypella* sp. CBMAI 1196, *Hidropisphaera* sp. CBMAI 1194 e *Xylaria* sp. CBMAI 119 atuaram como biocatalisadores nestas reações levando à produção de álcoois com elevada pureza enantiomérica. O fungo *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 destacou-se frente aos demais microrganismos, produzindo os álcoois (*S*)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol (**1a**) e (*R*)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol (**3a**) com excelentes conversões (100% e 97%) e excessos enantioméricos (*ee* >99%). Este fungo também apresentou enzimas álcool-desidrogenases ativas frente a cetonas dicarboniladas **4-5**, produzindo os álcoois 4,4,4-trifluoro-1-fenil-1,3-butanodiol (**4a**) e 4,4,4-trifluoro-1-(2-naftalenil)-1,3-butanodiol (**5a**) com 100% de conversão em ambos os casos e com purezas enantioméricas respectivas a 99% e 97%. Este foi o primeiro estudo realizado no Brasil com fluorocetonas dicarboniladas e com os fungos isolados da alga marinha *Bostrychia radicans*. No capítulo 2, a lipase comercial de *Candida antarctica* foi o biocatalisador empregado em reações de aminólise entre os ésteres linoleato de etila (**1**) e salicilato de etila (**3**), a amina graxa *N*-dodecilamina (**2**) e os aminoálcoois (**4-9**). A amina graxa *N*-dodecilamina (**2**) também foi utilizada em reações com o linoleato de etila (**1**), onde a lipase de *Candida antarctica* produziu a respectiva amida graxa **10** com rendimentos superiores a 95%. Os aminoálcoois foram selecionados para reações com o salicilato de etila (**3**), onde a lipase exibiu quimiosseletividade pelo grupo amino, produzindo predominantemente amidas fenólicas (**12-19**) com rendimentos entre 23-68%. A enzima CALB apresentou quimiosseletividade reduzida na reação com o 5-aminopentanol (**6**) onde os produtos amida **14** e éster **15** foram obtidos com rendimentos de 44 e 33%, respectivamente. O produto 2-hidroxi-*N*-(2-hidroxipropil)benzamida (**19**) foi obtido com rendimento superior a 90% a partir da reação catalisada pela lipase de *Candida antarctica*. Este produto foi selecionado como intermediário para a síntese de uma molécula hidrofóbica **21** que apresenta o éster oleato de etila em sua constituição. O produto **21** foi obtido com 75% de rendimento. As amidas fenólicas **12-21** produzidas neste trabalho são derivadas do ácido linoleico (*ômega* 6) e do ácido salicílico, os quais apresentam propriedades emolientes e antioxidantes. Estes compostos são interessantes para a formulação de produtos cosméticos de aplicação cutânea.

Neste processo biotecnológico as reações foram conduzidas na ausência de solventes orgânicos, evitando o tratamento de solventes voláteis e a formação de subprodutos. Os compostos foram analisados por Cromatografia líquida de alta eficiência e caracterizados por RMN (^1H , ^{13}C), EMAR e IV. A aplicação de reações de biocatálise seja através de células microbianas ou de enzimas isoladas foram muito promissoras na síntese de compostos orgânicos de interesse como álcoois enantiomericamente puros ou amidas graxas.

Abstract

In this work, alcohol dehydrogenase (ADHs) enzymes from marine fungi and immobilized lipase from *Candida antarctica* were employed for the production of compounds of biological and synthetic interest. In chapter 1, ADHs of fungi isolated from the marine alga *Bostrychia radicans* were used in reduction reactions of fluorinated ketones **1-5**. The fungi identified as *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197, *Eutypella* sp. CBMAI 1196, *Hidropisphaera* sp. CBMAI 1194 and *Xylaria* sp. CBMAI 119 acted as biocatalysts in these reactions leading to production of alcohols with high enantiomeric purity. The fungus *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 presented highlighted compared to other microorganisms producing the alcohols (*S*)-2,2,2-trifluoro-1-phenylethanol (**1a**) and (*R*)-1-(2,4,5-trifluorophenyl) ethanol (**3a**) with excellent conversions (100% and 97%) and enantiomeric excesses (*ee* > 99%). This fungus also exhibited ADHs enzymes active with dicarbonylated ketones, leading to the production of the alcohols 4,4,4-trifluoro-1-phenylbutane-1,3-diol (**4a**) and 4,4,4-trifluoro-1-(naphthalen-2-yl)butane-1,3-diol-1,3-butanediol (**5a**) with conversions of 100% in both cases and enantiomeric excess of 99%-97%, respectively. This was the first study conducted with dicarbonylated fluoroketones **4-5** and with fungi isolated from the marine alga *Bostrychia radicans* in Brazil. In chapter 2, immobilized lipase from *Candida antarctica* was used as biocatalyst in the aminolysis reaction between esters of ethyl linoleate (**1**) and ethyl salicylate (**3**), the fatty amine N-dodecylamine (**2**) and the aminoalcohols (**4-8**). Six aminoalcohols were selected for reactions with ethyl salicylate (**3**), where the lipase exhibited chemoselectivity by the amino groups, producing predominantly phenolic amides in yields of 23-63%. The CALB exhibited um reduction in chemoselectivity in the reaction with 5-aminopentanol (**6**) where the amide **14** and ester **15** products were obtained with 44% and 33% yields. The product 2-hydroxy-N-(2-hydroxypropyl) benzamide (**19**) was obtained in yield greater than 90% from the reaction catalyzed by lipase from *Candida antarctica*. This product was selected as reagent for the synthesis of a hydrophobic molecule **21** presenting ester ethyl oleate in its constitution. The product **21** was obtained in 75% yield. The phenolic amides **12-21** produced in this work are derived from linoleic acid (omega 6) and salicylic acid, which presents emollient and antioxidants properties. These compounds are interesting for the formulation of cosmetic products for skin application. In this biotechnological process, the reactions were carried out under solvent-free conditions and vacuum, avoiding the treatment of volatile solvents and by-product formation. The compounds were analyzed by high performance liquid chromatography and characterized by NMR (¹H, ¹³C), IR and HRMS. Applying

biocatalysis reactions, either through microbial cells or isolated enzymes were promising for the synthesis of organic compounds such as enantiomerically pure alcohols and fatty phenolic amides.

Dedico este trabalho aos meus pais, Luis Antônio e Maria Izildinha e aos meus irmãos Daniel e Mariana. Meus grandes amigos, companheiros incondicionais em todos os momentos.

"Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta."

Chico Xavier

Agradecimentos

A Deus, por estar sempre ao meu lado, me protegendo e abençoando com novas oportunidades de aprendizado pessoal e profissional.

Aos meus pais, Luis Antônio e Maria Izildinha, e aos meus irmãos, Daniel e Mariana. Obrigada pelo exemplo de amor, união, dignidade e determinação. Nossos laços nos fazem fortes onde quer que estejamos. Meu amor e gratidão por vocês não caberiam nas páginas de mil teses.

Ao Prof. Dr. André L.M. Porto, pela orientação profissional durante estes anos. Não poderia deixar de agradecer por sua maneira humana de conduzir toda uma equipe. Nesta oportunidade, enfatizo meu respeito e admiração por sua pessoa.

Aos amigos de laboratório que transformaram o ambiente de trabalho em uma segunda casa. Amigos com os quais pude aprender e compartilhar experiências: Natália, Lenilson, Julieta, Sandra, Irlon, William, Darlisson e outros tantos colegas que passaram pelo laboratório de Biocatálise.

Em especial, aos amigos Isac G. Rosset, Lenilson Coutinho e Natália Alvarenga pelas contribuições para a realização deste trabalho.

Aos técnicos João Pedro e Marília, profissionais sempre solícitos no laboratório.

Aos técnicos da CAQI-USP: André (Espectrometria de Infravermelho), João e Silvana (Ressonância Magnética Nuclear) e a Luciana Vizotto do laboratório de RMN da UFSCar pela obtenção dos espectros.

A equipe da Pós-Graduação, Andréia Cristina, Maria Silvia e Gustavo pela prestatividade e gentileza com que tratam todos os pós-graduandos.

Ao Instituto de Química de São Carlos da USP, onde realizei minha graduação, mestrado e doutorado. Agradeço a todos os profissionais (professores, técnicos, bibliotecários...) que participaram de alguma forma destas etapas em minha vida.

Aos meus familiares: família Giazzi, gigante no tamanho e no exemplo de amor, minha cunhada Ju, Tio “Zé” Mouad e em especial aos meus avôs Mario e Olimpio e avós Josefina e Mafalda que, mesmo em outro plano, sei que estiveram sempre ao meu lado.

Aos amigos: Nati Alvarenga, Renata, Nati Benatto, Cláudia, Stella, Talita, Karen, Ivan, Juliane, Rubiane, Marina e tantas pessoas especiais que torceram e compreenderam os eventuais momentos de ausência para que eu pudesse realizar este trabalho.

A CAPES pela bolsa de Doutorado.



Oxidoreductases de fungos marinhos para a síntese de álcoois quirais

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação das estruturas (1) primária (2) secundária (3) terciária (4) quaternária de enzimas	17
Figura 2 - Representação das principais interações responsáveis pela estrutura tridimensional das proteínas.....	18
Figura 3 - Representação esquemática de uma ligação enzima-substrato e sua catálise.....	19
Figura 4 - (A) Modelo encaixe induzido, (B) Modelo chave-fechadura.....	20
Figura 5 - Representação de um diagrama de energia frente uma reação catalisada e não catalisada.....	20
Figura 6 - Estrutura dos aminoácidos Glicina, Alanina e Cisteína.....	22
Figura 7 - Estruturas das coenzimas NAD ⁺ e NADP ⁺ destacando-se o seu centro reativo.....	27
Figura 8 - Representação da transferência de íons hidreto da nicotinamida na forma reduzida (NADH / NADPH) para o grupo carbonílico.	28
Figura 9 - Enantiômeros do fármaco Etambutol.....	29
Figura 10 - Moléculas fluoradas presentes em compostos bioativos.	31
Figura 11 - Fármacos contendo átomos de flúor.....	32
Figura 12 - (S) e (R)- álcoois precursores do fármaco APREPITANT.....	33
Figura 13 - Cetonas fluoradas utilizadas nas reações de biorredução com fungos marinhos... ..	43
Figura 14 - Fungos marinhos isolados da alga marinha <i>B. radicans</i>	46
Figura 15 - Regra de Prelog para redução da acetofenona.....	55
Figura 16 - Curso estereoquímico da produção dos (S)-álcoois 1a	56
Figura 17 - Cromatogramas obtidos por CG/FID das análises de (A) Padrão da 2,2,2-trifluoroacetofenona (1), (B) Padrão (±)- 2,2,2-trifluoro-feniletanol (1a).....	56
Figura 18 - Cromatogramas obtidos por CG/FID da reação de redução da 2,2,2-trifluoroacetofenona (1). Reação com (A) fungo <i>Botryosphaeria</i> sp. CBMAI 1197, (B) fungo <i>Eutypella</i> sp. CBMAI 1196.	57
Figura 19 - Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃) do S-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol (1a).....	59
Figura 20 - Espectro de massas de alta resolução do (S)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol (1a)....	59
Figura 21 - Espectro de absorção na região do infravermelho do (S)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol (1a).....	60
Figura 22 - Cromatogramas obtidos por CG/FID. Padrões da (A) cetona 2 (B) álcool racêmico.....	63
Figura 23 - Cromatogramas obtidos por CG/FID da reação de redução da cetona 2 . Reação com (A) fungo <i>Botryosphaeria</i> sp. CBMAI 1197, (B) fungo <i>Hidropisphaera</i> sp. CBMAI 1194.....	64
Figura 24 - Espectro de massas de alta resolução do 1-(2-(trifluorometil)fenil)etanol (2a)....	66
Figura 25 - Espectro de absorção na região do infravermelho do produto 2a	66
Figura 26 - Cromatogramas obtidos por CG/FID. (A) Padrão da (2,4,5-trifluoro)-trifluorometil-acetofenona (3). (B) Padrão do álcool racêmico 3a (C) Reação com o fungo <i>Botryosphaeria</i> sp. CBMAI 1197 após 7 dias.....	69
Figura 27 - Espectro de massas de alta resolução do 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol (3a).....	71

Figura 28 - Espectro de absorção na região do infravermelho do produto 3a	71
Figura 29 - Cromatogramas obtidos por CG/FID. (A) Padrão da dicetona 4 , (B) Padrão do álcool racêmico 4a , (C) Reações com fungo <i>Botryosphaeria</i> sp. CBMAI 1197 após 7 dias.....	74
Figura 30 - Possíveis enantiômeros e diastereoisômeros obtidos por redução de ambos grupos carbonílicos da cetona 4 com fungos marinhos.....	75
Figura 31 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do álcool 4a obtido pela redução com NaBH ₄	77
Figura 32 - Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do álcool 4a obtido pela redução com NaBH ₄	78
Figura 33 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do álcool 4a obtido pela redução com fungo <i>Botryosphaeria</i> sp. CBMAI 1197.....	79
Figura 34 - Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) do álcool 4a obtido pela redução com NaBH ₄	80
Figura 35 - Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) do álcool 4a obtido pela redução com fungo <i>Botryosphaeria</i> sp. CBMAI 1197.....	80
Figura 36 - Espectro de massas de alta resolução do 4,4,4-trifluoro-1-fenil-1,3-butanodionol (4a).....	81
Figura 37 - Espectro de massas de alta resolução do 4,4,4-trifluoro-1-fenil-1,3-butanodionol (4a).....	82
Figura 38 - Cromatogramas obtidos por CG/FID. (A) Padrão da dicetona 5 . (B) Padrão do álcool racêmico 5a	84
Figura 39 - Cromatogramas obtidos por CG/FID da reação de redução da dicetona 5 . Reação com (A) fungo <i>Botryosphaeria</i> sp. CBMAI 1197 após 7 dias, (B) fungo <i>Eutypella</i> sp. CBMAI 1196 após 7 dias, (C) fungo <i>Xylaria</i> sp. CBMAI 1195 após 7 dias.....	85
Figura 40 - Possíveis enantiômeros e diastereoisômeros obtidos por redução com fungos marinhos.....	86
Figura 41 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, MeOD ₄) do diol 5a obtido por redução com NaBH ₄	88
Figura 42 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz MeOD ₄) do diol 5a obtido por redução com fungo <i>Botryosphaeria</i> sp. CBMAI 1197.....	88
Figura 43 - Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, MeOD ₄) do diol 5a obtido por redução com NaBH ₄	90
Figura 44 - Espectro de massas de alta resolução do produto 5a obtido por redução com fungo marinho <i>Botryosphaeria</i> sp. CBMAI 1197.....	90
Figura 45 - Espectro de absorção na região do infra-vermelho do produto 5a obtido por redução com fungo marinho <i>Botryosphaeria</i> sp. CBMAI 1197.....	91
Figura 46 - Redução quimiosseletiva por levedura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	92
Figura 47 - Redução quimiosseletiva por microrganismo <i>Acinetobacter</i> sp. SC 13874.....	92

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Redução quimiosseletiva da (\pm)-2-feniltiociclo-hexanona com o fungo <i>Trametes rígida</i>	21
Esquema 2 - Hidroxilação regiosseletiva do terpeno Sclareol por fungo <i>Mucor Plumbeus</i>	21
Esquema 3 - Redução enantiosseletiva de uma cetona fluorada catalisada por <i>Mortierella ramanniana</i>	22
Esquema 4 - Resolução do éster (+/-)-2 <i>RS</i> ,3 <i>R</i> -3-(4-metoxifenil)glicidato com lipase de <i>Serratia marcescens</i>	24
Esquema 5 - Exemplo geral de reações catalisadas por oxigenases.	25
Esquema 6 - Exemplo geral de reação catalisada por oxidases.....	25
Esquema 7 - Oxidação de álcoois através de desidrogenases.....	26
Esquema 8 - Síntese do butirato de (<i>S</i>)-2-hidroxi-4-fenila através de ADHs.....	29
Esquema 9 - Biorredução de cetonas fluoradas para obtenção de precursores do fármaco Sulfona 30.....	30
Esquema 10 - Redução da α -clorocetona por enzima ADH <i>Hansenula polymorpha</i> SC 13824.....	31
Esquema 11 - Fluoração enantiosseletiva de aldeídos.....	33
Esquema 12 - Síntese do (<i>R</i>)-3,5-bis-trifluorometilfenil-etanol por ADHs presentes no fungo por <i>Penicillium expansum</i> EBK-9.....	34
Esquema 13 - Redução de 2,2,2-trifluorocetonas por fungo <i>Geotrichum candidum</i>	34
Esquema 14 - Redução de cetonas proquirais fluoradas em álcoois utilizados na síntese de fármacos.....	35
Esquema 15 - Produção dos enantiômeros de 1-(3-trifluorometil)fenil)etanol por diferentes microrganismos.....	36
Esquema 16 - Redução assimétrica da pentafluoracetofenona com <i>Synechococcus</i> sp.....	38
Esquema 17 - Redução regiosseletiva da 5 α -androstano-3,17-diona com algas marinhas.....	39

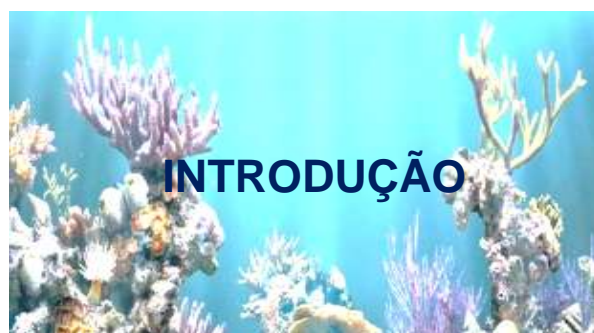
LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Intermediários quirais produzidos em larga escala por indústrias químicas.....	16
Tabela 2 - Classificação das enzimas segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular.....	23
Tabela 3 - Redução de cetonas 1-(4-fluorofenil)etanona e 1-(4-trifluorofenil)etanona por microrganismos.....	35
Tabela 4 - Métodos cromatográficos utilizados.....	48
Tabela 5 - Crescimento dos fungos em diferentes faixas de pH.....	52
Tabela 6 - Redução da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona (1) com fungos marinhos isolados da alga <i>Bostrychia radicans</i>	54
Tabela 7 - Redução da 1-(2-(trifluorometil)fenil)etanona (2) com fungos marinhos isolados da alga <i>Bostrychia radicans</i>	61
Tabela 8 - Redução da 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona (3) com fungos marinhos isolados da alga <i>Bostrychia radicans</i>	67
Tabela 9 - Medidas de rotação óptica dos álcoois 1a-3a	72
Tabela 10 - Redução da 4,4,4-trifluoro-1-fenil-1,3-butanodiona (4) com fungos marinhos isolados da alga <i>Bostrychia radicans</i>	73
Tabela 11 - Redução da 4,4,4-trifluoro-1-(2-naftil)-1,3-butanodiona (5) com fungos marinhos isolados da alga <i>Bostrychia radicans</i>	83
Tabela 12 - Medidas de rotação óptica dos álcoois 4a-5a	93

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Química verde e biocatálise.....	15
1.2 Enzimas.....	17
1.2.1 Classificação de enzimas.....	23
1.2.2 Oxidorredutases.....	24
1.2.3 Álcool-desidrogenases e seu potencial biotecnológico.....	28
1.3 Síntese assimétrica de compostos organofluoradas.....	31
1.4 Reações biocatalíticas com células íntegras.....	36
1.4.1 Microrganismos de origem marinha como biocatalisadores.....	37
2. OBJETIVOS	41
2.1 Objetivos específicos.....	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 Reagentes e solventes.....	43
3.2 Preparação dos alcoóis racêmicos.....	44
3.3 Coleta da alga marinha <i>Bostrychia radicans</i>	44
3.4 Isolamento de fungos presentes na alga marinha <i>Bostrychia radicans</i>	44
3.5 Composição da água do mar artificial.....	46
3.6 Composição do meio de cultura sólido e líquido para o crescimento dos fungos marinhos.....	46
3.6.1 Estudo da faixa de pH para crescimento dos fungos.....	47
3.7 Reações de redução com os fungos marinhos.....	47
3.8 Extração e purificação das reações para determinação dos rendimentos isolados dos alcoóis	47
3.9 Métodos de análise, identificação e caracterização dos compostos.....	48
3.9.1 Métodos cromatográficos.....	48
3.9.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	49
3.9.3 Espectrometria na região de absorção do Infravermelho (IV).....	49
3.9.4 Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (EM-IES).....	49
3.9.5 Medidas de rotação óptica.....	49
3.10 Evaporadores rotativos e agitadores orbitales.....	49
3.11 Outros equipamentos.....	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1 Otimização das condições de crescimento dos microrganismos em diferentes valores de pH.....	52
4.2 Reações de redução com 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona (1).....	54
4.2.1. Caracterização do produto (<i>S</i>)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol (1a).....	58
4.3 Reações de redução com 1-(2-(trifluorometil)fenil)etanona (2).....	61
4.3.1. Análises espectrais do produto 1-(2-(trifluorometil)fenil)etanol (2a).....	65
4.4 Reações de redução com 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona (3).....	67
4.4.1. Caracterização do produto 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol (3a).....	70
4.5 Medidas de configuração absoluta dos alcoóis quirais 1a-3a	72
4.6 Reações de redução de cetonas fluoradas dicarboniladas.....	73

4.6.1 Reação de redução com 4,4,4-trifluoro-1-fenil-1,3-butanodiona (4).....	73
4.6.2 Caracterização do produto 4,4,4-trifluoro-1-fenil-1,3-butanodionol (4a).....	76
4.7 Reação de redução com 4,4,4-trifluoro-1-(2-naftil)-1,3-butanodiona (5).....	83
4.7.1 Caracterização 4,4,4-trifluoro-1-(2-naftil)-1,3-butanodiona (5a).....	87
4.8 Medidas de configuração absoluta dos álcoois quirais 4a-5a	93
5. CONCLUSÃO	95
6. REFERÊNCIAS	97



1. INTRODUÇÃO

1.1 Química verde e biocatálise

Nas últimas décadas, as pesquisas na área química têm evoluído de forma indiscutível e contribuindo para avanços tecnológicos em diversos setores. No entanto, a crescente demanda por substâncias químicas provocou um aumento simultâneo na geração de subprodutos tóxicos, os quais causam impactos negativos ao meio ambiente. Em consequência, os aspectos ligados às questões ambientais têm recebido grande atenção, gerando um movimento que busca remodelar empreendimentos tecnocientíficos, aplicando metodologias menos impactantes aos ecossistemas (ZANDONAI *et al.* 2013).

Entre este movimento, encontra-se o conceito de *desenvolvimento sustentável*, definido como a “*capacidade de satisfazer as necessidades da geração atual sem comprometer as gerações futuras*”. Este conceito engloba o desenvolvimento econômico e ambiental de uma forma sustentável, visando à manutenção e melhoria da qualidade de vida global. Neste cenário, uma nova conduta pode ser inserida na área química, baseada nos princípios de *Química Sustentável* ou *Química Verde* (ZUIN & CORREA 2009).

A *Química Verde* pode ser definida como o *desenvolvimento de produtos e processos que eliminem ou reduzem o uso de materiais tóxicos*. Trata-se de uma abordagem de prevenção, concentrada na redução de riscos causados por compostos tóxicos e em metodologias que *substituam* estes compostos por substâncias ambientalmente benéficas (KAZLAUSKAS & KIM 2011).

Dentre seus princípios, busca-se promover reações químicas através de *reagentes catalíticos*, os quais induzam à produção de compostos orgânicos de forma *seletiva*, minimizando a formação de subprodutos. Os reagentes catalíticos são altamente seletivos, evitam a formação de resíduos e permitem sua reutilização, trazendo benefícios econômicos e ambientais nos processos químicos (GRUNWALD 2009).

Atendendo a estes requisitos, as *enzimas* compõem um grupo de reagentes catalíticos ideais, sendo as principais responsáveis pelo contínuo desenvolvimento da *biocatálise*, área que tem se estabelecido como ambientalmente benigna para síntese de compostos orgânicos nos últimos dez anos (CAO *et al.* 2013).

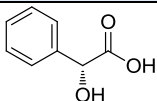

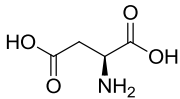

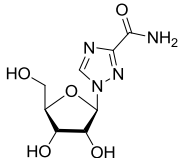

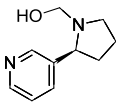

Embora as enzimas sejam catalisadores de reações que ocorrem em sistemas biológicos, as mesmas podem atuar com substratos não-naturais fora de seu sistema bioquímico considerados xenobióticos (MILETÍC *et al.* 2009). Estes catalisadores podem ser encontrados em diversas fontes renováveis, como plantas, vegetais, microrganismos

(terrestres e marinhos), animais ou comercialmente em suas formas isoladas (FABER 2004).

Independentemente de sua origem, a aplicação das enzimas, seja nos setores acadêmicos ou industriais, vem solidificando a biocatálise como área essencial para a produção de compostos de valor e atividades agregadas. As pesquisas envolvem um vasto campo, incluindo a descoberta de novas enzimas através de triagens com microrganismos, estudos do comportamento enzimático em diferentes condições e estudos de biologia molecular e engenharia genética (OLIVEIRA & MANTOVANI 2009).

Além de pesquisas na área acadêmica, metodologias biocatalíticas já são utilizadas em diversos processos industriais. Empresas como BASF, DSM, Yamasa e Lonza desenvolvem e aplicam processos biocatalíticos para produção em larga escala de um número considerável de blocos de construção opticamente ativos (Tabela 1) (OLIVEIRA & MANTOVANI 2009).

Tabela 1 - Intermediários quirais produzidos em larga escala por indústrias químicas.

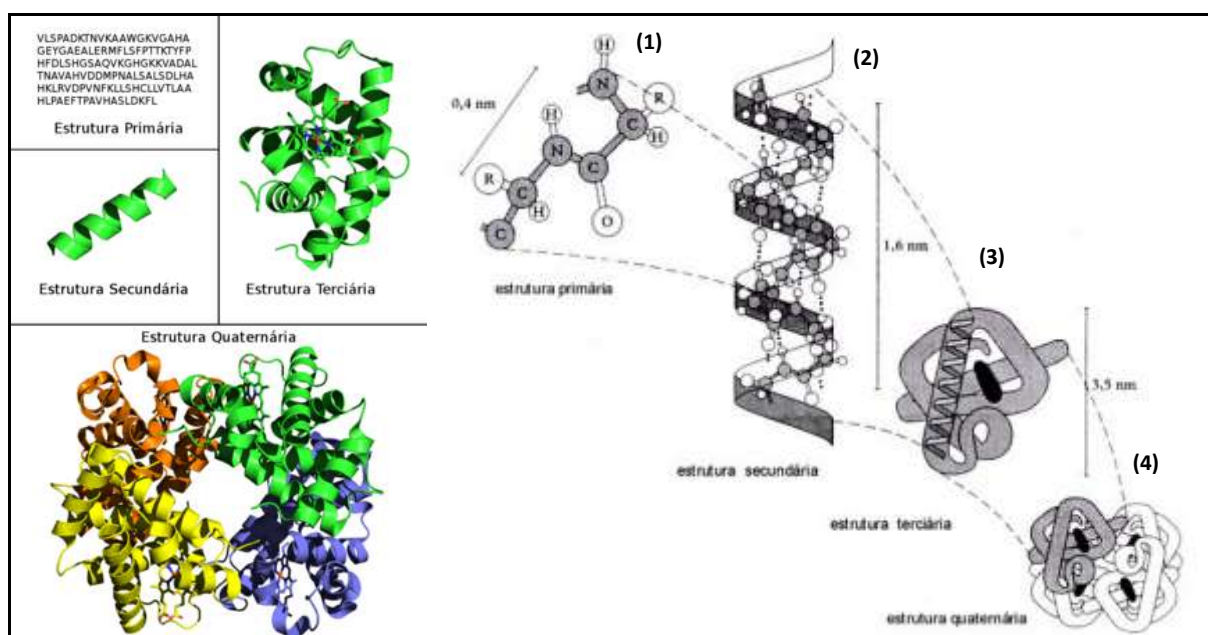
Compostos	Estrutura	Reação	Biocatalisador	Empresa
Ácido <i>R</i> -mandélico		Hidrólise	Nitrilase	
Ácido <i>L</i> -aspártico		Adição de amônia	Liase	
Antiviral ribavarina		Hidrólise	Fosforilase	
6-Hidróxi-S-nicotina		Adição de água	Célula íntegra/hidroxilase	

As vantagens na aplicação de enzimas estão diretamente relacionadas ao seu potencial catalítico, em geral muito maior do que catalisadores sintéticos, devido ao seu alto grau de especificidade por seus substratos. Além disso, as enzimas aceleram reações químicas específicas, atuando em condições suaves de temperatura, pressão e pH (LEHNINGER 2000, ILLANES 2008). Desta forma, o conhecimento das propriedades e da atividade enzimática frente a diferentes substratos torna-se essencial para o desenvolvimento de pesquisas e produtos de interesse.

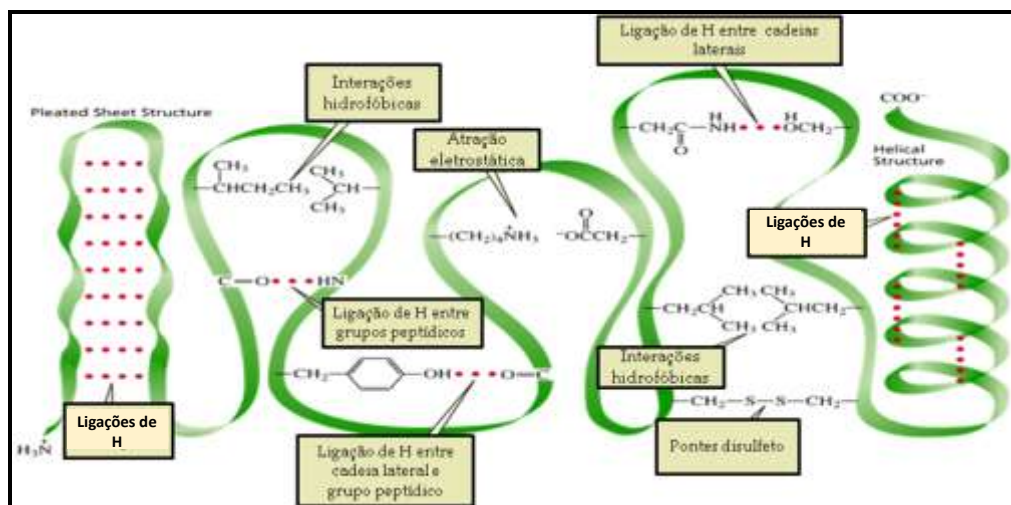
1.2 Enzimas

Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA, todas as enzimas são proteínas, macromoléculas orgânicas constituídas por resíduos de aminoácidos (SAID & PIETRO 2004). As unidades de aminoácidos são conectadas através de ligações peptídicas, formadas da junção de um átomo de carbono de um grupo carbonílico e de um átomo de nitrogênio de um grupo α -amino terminal de outro aminoácido (LEHNINGER 2000). Assim, cada enzima contém uma sequência específica de aminoácidos, a qual constitui sua estrutura primária e que após adquirir a forma de uma estrutura tridimensional de elevada complexidade (estruturas secundária, terciária e quaternária) passa a ser dotada de atividade catalítica biológica específica (Figura 1) (GRUNWALD 2009).

Figura 1 - Representação das estruturas (1) primária (2) secundária (3) terciária e (4) quaternária das enzimas.



Os principais tipos de interações responsáveis pela estrutura tridimensional das enzimas são formados por ligações hidrogênio, interações apolares (hidrofóbicas), pontes de dissulfeto (produzidas pela oxidação de resíduos de cisteína) e forças eletrostáticas entre resíduos de aminoácidos ionizados (ILLANES 2008). A Figura 2 representa esquematicamente os principais tipos de interações que são responsáveis pela estrutura terciária das enzimas.

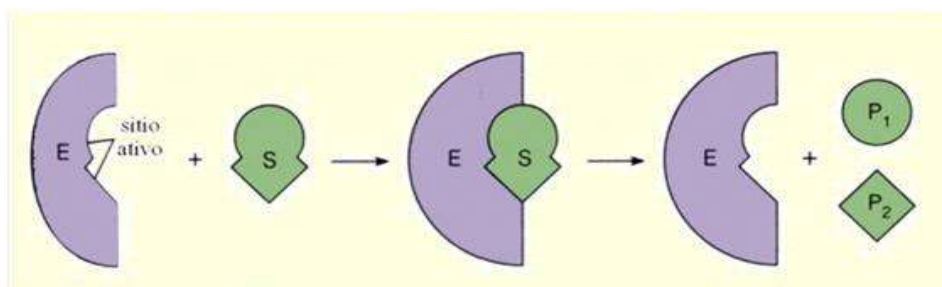
Figura 2 - Representação das principais forças de interações intramoleculares das proteínas.

As enzimas têm massas moleculares variando entre 12.000 até mais de um milhão de Daltons e embora apresentem uma estrutura tridimensional complexa, as reações catalíticas ocorrem em apenas uma pequena parte de sua estrutura, denominada de *sítio ativo* ou *sítio catalítico*, geralmente constituído por poucos resíduos de aminoácidos (LENHINGER 2000).

Para serem ativas, algumas enzimas não requerem nenhum tipo de grupo químico além de seus resíduos de aminoácidos. Outros requerem componentes químicos adicionais chamados de cofatores. Os cofatores são substâncias não protéicas de pequena massa molecular, que fornecem os “reagentes químicos necessários” para que as reações ocorram nos sítios catalíticos. Estes podem ser íons inorgânicos (K^+ , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+}), moléculas permanentemente ligadas à enzima chamadas de grupos prostéticos, ou ainda, moléculas orgânicas complexas denominadas coenzimas, como os derivados de vitaminas (flavina, tiamina, niacina), ácido ascórbico e dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH) ou fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) (SAID & PIETRO 2004, GRUNWALD 2009).

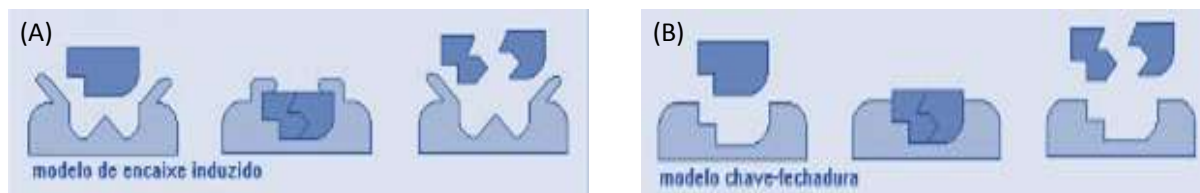
A ocorrência de reações enzimáticas inicia-se pela interação do substrato ligando-se ao sítio ativo da enzima, promovendo mudanças na constituição eletrônica proveniente destas interações químicas. Estas mudanças possibilitam que as reações químicas ocorram e levem a formação de produtos. Após a obtenção dos produtos, estes, por não mais terem ligações específicas com o sítio catalítico das enzimas, são dissociados e liberados no meio reacional, e o ciclo catalítico é regenerado para promover novas reações. Na Figura 3 é mostrada esquematicamente a interação do substrato com o sítio catalítico da enzima para uma reação catalisada.

Figura 3 - Representação esquemática de uma interação enzima-substrato e sua catálise (E = enzima, S = substrato, P = produto).

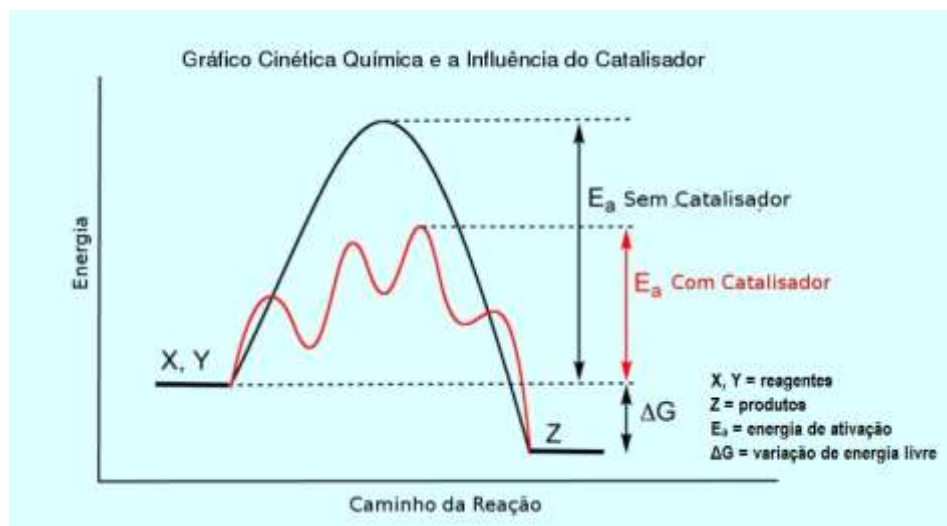


As conformações da estrutura protéica e do sítio ativo conferem às enzimas uma elevada especificidade. Devido à singularidade destas conformações estruturais, uma enzima seleciona somente um ou um número limitado de compostos para reagir, decorrente da orientação requerida (LEHNINGER 2000). Neste sentido, a molécula de um substrato deve também apresentar conformação adequada para acomodar-se no sítio catalítico. Alguns modelos empíricos foram propostos relacionando esta interação entre o sítio ativo das enzimas e a molécula do substrato.

De acordo com o modelo *chave-fechadura* proposto por Emil Fisher (1894), o sítio ativo teria uma forma geométrica única e complementar a do substrato. Contudo, este modelo de ligação rígida dificilmente explicaria porque as enzimas podem converter não apenas seus substratos naturais, mas também compostos xenobióticos que possuem características estruturais bastante diferentes (SONKARIA *et al.* 2004). Assim, um segundo modelo de sítio catalítico, denominado de *encaixe induzido* foi proposto por KOSHLAND Jr. (1958). Neste modelo a enzima apresenta uma estrutura flexível; durante a formação do complexo enzima-substrato (ES), a enzima pode mudar ligeiramente a sua conformação sob a influência da estrutura do substrato. Neste modelo uma mudança na conformação enzimática é induzida, que pode então orientar os grupos reativos do substrato ao sítio catalítico da enzima e favorecer a catálise. Este modelo de encaixe induzido tem sido utilizado para compreender a base da especificidade da catálise enzimática, especialmente frente aos substratos xenobióticos das reações biocatalíticas (YOUSEFF *et al.* 2003).

Figura 4 - (A) Modelo encaixe induzido, (B) Modelo chave-fechadura.

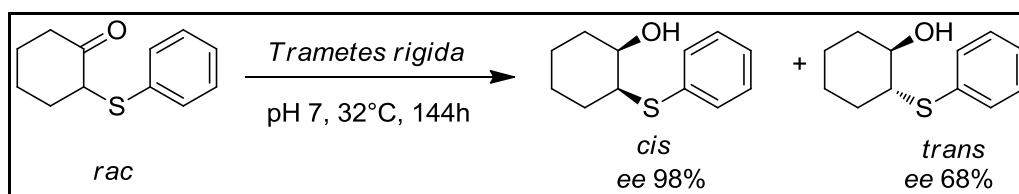
As enzimas reduzem a magnitude da barreira de energia a ser superada em uma reação química para que um substrato seja transformado em produto. Termodinamicamente, a magnitude desta barreira de energia pode ser expressa como mudança de energia livre ou energia total liberada na reação (Figura 5). Em virtude de sua interação em orientação favorável com o substrato, as enzimas reduzem esta barreira energética acelerando a velocidade das reações (da ordem de 10^{10} - 10^{23}), formando um complexo ativado no estado de transição. Em seguida, o produto é formado e a enzima é liberada intacta no meio, sem que seja consumida ou modificada durante o processo de catálise (ILLANES 2008). A Figura 5 representa um gráfico de energia livre em relação a uma reação química catalisada e não catalisada.

Figura 5 - Representação de um diagrama de energia frente uma reação catalisada e não catalisada.

Além de promoverem reações termodinamicamente favoráveis, as enzimas apresentam quimio- regio- e enantiosseletividade. A quimiosseletividade está relacionada ao fato das enzimas atuarem sob um grupo funcional específico, possibilitando que outros grupos funcionais reativos presentes na molécula permaneçam inalterados. Como resultado, unicamente um produto é obtido, sem ocorrência de reações competitivas. Por exemplo, a redução quimiosseletiva da (\pm)-2-feniltiociclo-hexanona, que apresenta em sua estrutura um

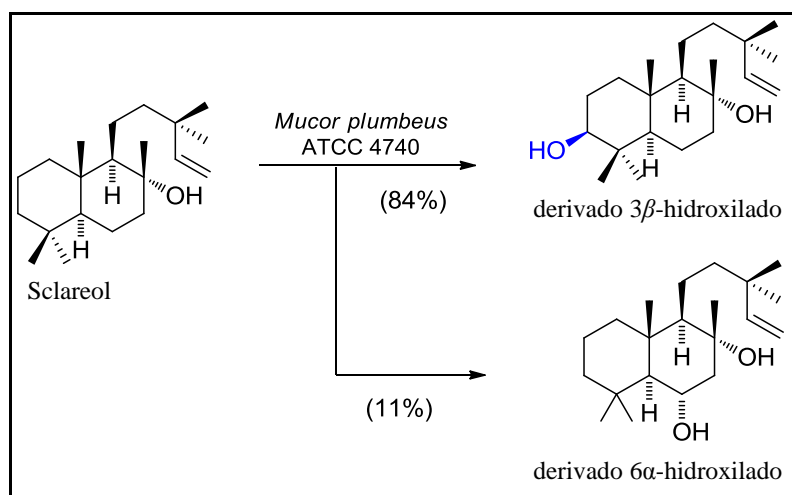
grupo carbonílico e um grupo sulfeto. Através do fungo *Trametes rigida* CCB 258, este composto foi seletivamente reduzido nos correspondentes *cis*- e *trans*-(2-feniltio)cicloexanois em excelentes purezas enantioméricas via uma reação de redução/resolução enzimática (Esquema 1) (PIOVAN *et al.* 2008).

Esquema 1 - Redução quimiosseletiva da (\pm)-2-feniltiociclo-hexanona com o fungo *Trametes rigida*.



Quanto à regioseletividade, as enzimas podem distinguir grupos funcionais idênticos situados em diferentes regiões de uma mesma molécula do substrato. Como exemplo, enzimas presentes no fungo *Mucor plumbeus* ATCC 4740 promoveram a hidroxilação regioseletiva do composto Sclareol, um terpeno isolado do óleo essencial *Salvia sclarea* muito utilizado como bloco de construção quiral para produção de fragrâncias. As enzimas do microrganismo produziram os derivados 3β e 6α -hidroxilados com rendimentos de 84% e 11% respectivamente (Esquema 2) (PATEL 2000).

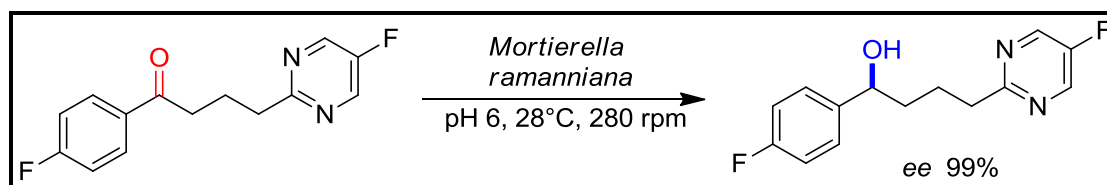
Esquema 2 - Hidroxilação regioseletiva do terpeno Sclareol por fungo *Mucor Plumbeus*



As enzimas também apresentam enantiosseletividade frente às reações que catalisam. Um exemplo de síntese enantiosseletiva é a produção do composto (*R*)-(+)-BMY 14802, uma molécula com propriedade antipsicótica. Através do sistema enzimático do fungo *Mortierella ramanniana* foi realizada a redução enantiosseletiva da 1-(4-fluorofenil)-4-[4-(5-fluoro-2-pirimidinil)-1-piperazinil]-1-butanona, sob condições brandas de pH e temperatura, obtendo-

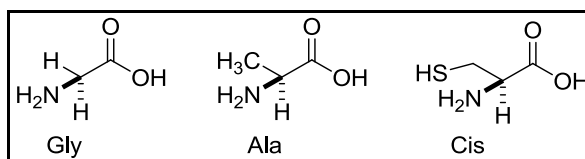
se o respectivo (*R*)-álcool com rendimento de 99% em apenas 48 horas (Esquema 3) (DEMIRJIAN 2001).

Esquema 3 - Redução enantiosseletiva de uma cetona fluorada catalisada por *Mortierella ramanniana*.



Estas propriedades seletivas estão intrinsecamente relacionadas à quiralidade presente nos resíduos de aminoácidos que constituem as enzimas. Todos os 20 aminoácidos, com exceção da glicina (aquiral), existem na forma natural de *L*-aminoácidos, designados pela Projeção de Fischer, sendo, portanto moléculas quirais enantiomericamente puras (Figura 6) (GRUNWALD 2009).

Figura 6 - Estrutura dos aminoácidos Glicina, Alanina e Cisteína.



Desta forma, qualquer quiralidade ou proquiralidade presente nas moléculas dos substratos poderá ser reconhecida pelo sítio catalítico quiral de uma enzima durante a catálise enzimática (GUTHMANN *et al.* 1996). Em compostos bioativos como fármacos e agroquímicos a atividade biológica pode depender da presença única ou predominante de um dos enantiômeros, enquanto o outro pode reduzir ou até mesmo inibir sua atividade (BONATTO *et al.* 2005). Em consequência, muito tem se pesquisado em reações assimétricas com enzimas, as quais podem produzir enantiômeros de forma altamente seletiva. Estas reações podem ser projetadas considerando o produto de interesse e a classe enzimática responsável por sua produção, sendo facilmente executáveis em laboratórios.

1.2.1 Classificação das enzimas

Aproximadamente 3.200 enzimas foram identificadas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM). Estima-se que há cerca de 25.000 enzimas que podem ser encontradas na natureza, sendo que muitas permanecem inexploradas em biocatálise e até mesmo desconhecidas (FABER 2004). A UIBBM classifica as enzimas em seis grupos e cada uma delas em subgrupos de acordo com os tipos de reações que catalisam no sistema biológico (Tabela 2) (SAID 2004).

Tabela 2 - Classificação das enzimas segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular.

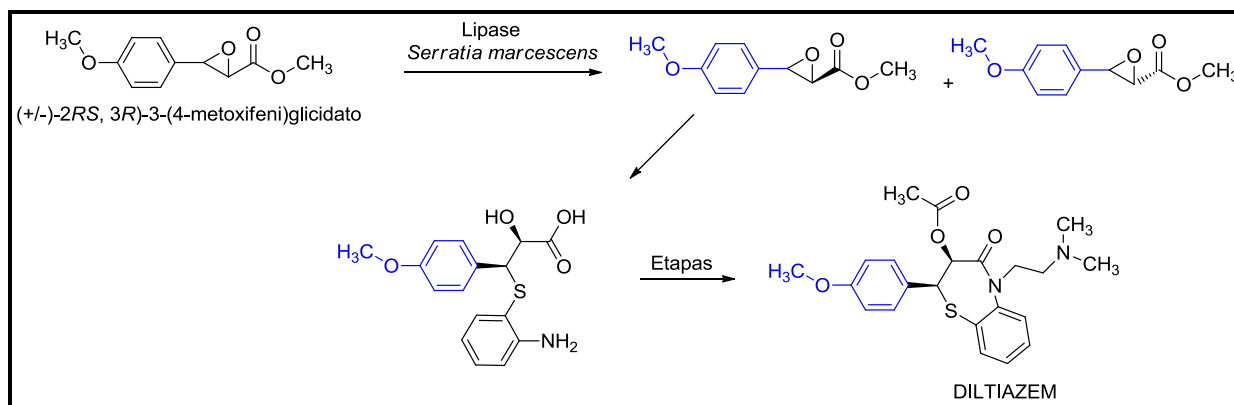
Número	Classes	Tipo de reação catalisada	Subclasse	Utilidade ^a
1	Oxidoredutases	Oxidação-redução: oxigenação de ligações C-H, C-C, C=C, ou remoção ou adição de átomos de hidrogênio equivalentes.	Oxigenases, oxidases, desidrogenases, redutases	25%
2	Transferases	Reações de transferência de grupos aldeídos, cetonas, metil, fosforil.	Transaldolases, transcetolases	5%
3	Hidrolases	Formação de ésteres, aminas, amidas, lactonas, epóxidos, nitrilas.	Esterases, lipases, peptidases, fosfatases	60%
4	Liasas	Adição-eliminação de pequenas moléculas em ligações C=C, C=N, C=O.	Descarboxilases, fosfatases	7%
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro da molécula para produzir isômeros	Racemases, epimerases	2%
6	Ligases	Formação e clivagem de ligações C-C, C-S, C-O, C-N e ésteres de fosfato	Sintetases	1%

^aUtilidade estimada da classe de enzimas em transformações de substratos não-naturais (Faber 2004).

Devido à tolerância a diferentes tipos de substratos não naturais as aplicações das enzimas em síntese orgânica não são uniformemente distribuídas de acordo com as classificações (FABER 2004). As hidrolases representam a maioria das enzimas aplicadas tanto em pesquisas acadêmicas quanto em processos industriais para a produção de fármacos, alimentos, detergentes, biodiesel e óleos vegetais (PINHEIRO 2006). Como exemplo de um processo tradicional, encontra-se a aplicação da lipase de *Serratia marcescens* para obtenção de um precursor do fármaco DILTIAZEM, um dos dez fármacos mais vendidos no mundo

para o tratamento de hipertensão arterial, através da resolução do éster (+/-)-2*RS*, 3*R*)-3-(4-metoxifenil)glicidato (BON *et al.* 2008) (Esquema 4).

Esquema 4 - Resolução do éster (+/-)-2*RS*, 3*R*)-3-(4-metoxifenil)glicidato com lipase de *Serratia marcescens*.



O segundo grupo de enzimas mais utilizado em reações químicas corresponde a classe das oxidorreduções. Estas enzimas promovem as reações de redução de cetonas para produção de álcoois quirais, os quais constituem um dos objetivos de estudos deste trabalho. Suas principais características serão discutidas a seguir.

1.2.2 Oxidorreduções

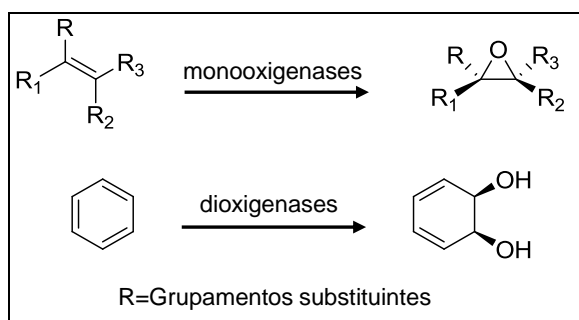
As oxidorreduções são enzimas intracelulares envolvidas em vias metabólicas de uma variedade de microrganismos, animais e vegetais. Também podem ser obtidas na forma isolada a partir de bactérias, tal como *Lactobacillus kefir* e da extração de órgãos e vísceras de animais (Horse liver) (FABER 2004). Estas enzimas promovem reações catalíticas tanto de importância fisiológica quanto reações com substratos não-naturais de interesse em síntese orgânica. Desta forma, microrganismos que apresentem oxidorreduções ativas são de interesse para o desenvolvimento de reações estereosseletivas de redução de cetonas proquirais.

As oxidorreduções catalisam reações de redução e oxidação envolvendo a transferência de elétrons, átomos de hidrogênio na forma de hidreto ou oxigênio (MATSUDA *et al.* 2009). Estas transferências ocorrem com a participação das coenzimas como os derivados de vitaminas (flavina, tiamina, niacina, ácido ascórbico) e NADH ou NADPH (SAID & PIETRO 2004, GRUNWALD 2009). A grande variedade de oxidorreduções conhecida (22 subclasses) pode ser classificada de acordo com a coenzima necessária para

promover a catálise ou de acordo com a natureza do substrato. Muitas destas enzimas destacam-se em processos biotecnológicos como as *oxigenases*, *oxidases*, *desidrogenases* e *redutases*.

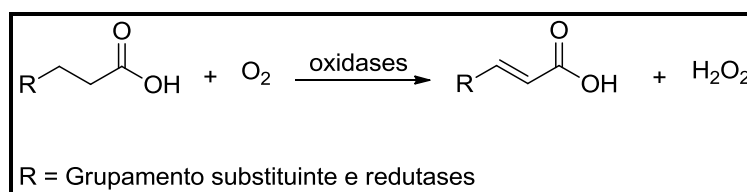
As *oxigenases* têm demonstrado particular interesse em reações de oxidação, já que são capazes de catalisar a funcionalização de ligações C-H ou C=C não ativadas, levando aos processos de hidroxilação e epoxidação, respectivamente (LI *et al.* 2010). Estas enzimas são denominadas de *monooxigenases* se incorporarem apenas um átomo de oxigênio em um substrato específico, enquanto as *dioxigenases* catalisam a inserção de ambos os átomos de oxigênio molecular ao substrato (Esquema 5) (FABER 2004).

Esquema 5 - Exemplo geral de reações catalisadas por oxigenases.



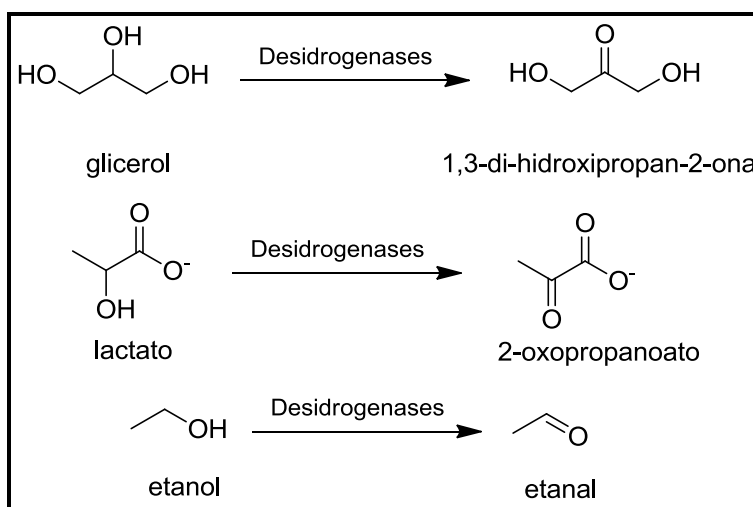
As *oxidases* incluem flavoproteínas ou hemoproteínas como as coenzimas que *catalisam* as reações de oxidação, onde o oxigênio molecular atua como aceptor de elétrons, sendo reduzido a peróxido de hidrogênio. Estas enzimas são extremamente específicas, reconhecendo apenas uma pequena variedade de substratos xenobióticos e por esta razão, sua aplicação em síntese orgânica é discreta quando comparada às oxigenases, e em especial, às desidrogenases (Esquema 6) (PINHEIRO 2006).

Esquema 6 - Exemplo geral de reação catalisada por oxidases.

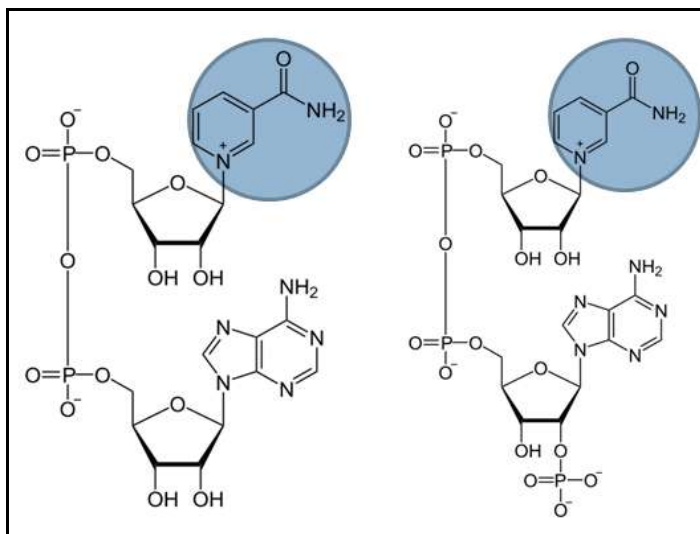


As *desidrogenases* (E.C.1.1.1) são enzimas que catalisam a redução de grupos carbonílicos, como cetonas e aldeídos (FABER 2004). Enzimas que reduzem grupos carbonílicos são classificadas como álcool-desidrogenases (ADHs), também referenciadas como carbonil-redutases ou cetorredutases (HOFF & SANDBY 2013). Estas enzimas também catalisam reações de oxidação de álcoois primários e secundários, como os substratos típicos (glicerol, lactato e etanol) em seus correspondentes compostos carbonilados (Esquema 7) (NAKAMURA *et al.* 2003).

Esquema 7 - Oxidação de álcoois através de desidrogenases.



Em reações de redução e oxidação, as principais coenzimas envolvidas são o dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH/NAD^+) e o seu análogo, o fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina ($\text{NADPH}/\text{NADP}^+$). As coenzimas de nicotinamida são diferenciadas pelo fato do NAD(P)^+ ser o principal receptor de elétrons em reações de oxidação de álcoois e o NAD(P)H , o principal doador de elétrons em biorreduções de grupos carbonílicos (FADERLONE 2004). Estas moléculas podem existir na forma oxidada como NAD^+ e NADP^+ e ambas sofrem redução reversível no anel nicotinamida onde o NAD^+ e NADP^+ recebem um íon hidreto ($:\text{H}^-$) com a oxidação do substrato, sendo então transformados em sua forma reduzida. O segundo hidreto removido do substrato é liberado para o meio aquoso (GRUNWALD 2009). Em sua estrutura, o anel nicotinamida contém o sítio no qual as reações ocorrem, sendo a porção restante da molécula responsável pelas interações intermoleculares (Figura 7) (SAHA & DEMIRJIAN 2000).

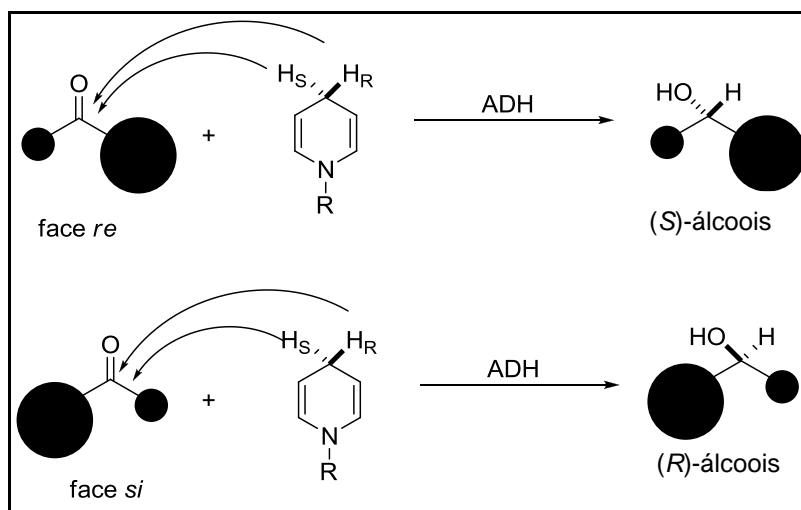
Figura 7 - Estruturas das coenzimas NAD^+ e NADP^+ destacando-se o seu centro reativo.

Quando as coenzimas NADH e NADPH estão envolvidas nas reações de redução de um grupo carbonílico ocorrem as seguintes etapas:

- A coenzima e substrato ligam-se temporariamente à enzima;
- O substrato é reduzido, enquanto a coenzima é oxidada;
- A coenzima e o produto são dissociados do sítio catalítico da enzima (MATSUDA *et al.* 2009).

No caso da redução de cetonas, a enzima é a álcool desidrogenase (ADH) que comumente tem a participação da coenzima NAD(P)H . O mecanismo é caracterizado pela transferência de um íon hidreto (2 elétrons) do centro reativo do anel nicotinamida do NAD(P)H para o grupo carbonílico do substrato. Esta transferência de elétrons pode ser realizada tanto para a *face re* quanto pela *face si* da cetona (TSUKIJI *et al.* 2004). A Figura 8 ilustra uma transferência de íons hidretos pelas *faces re* e *si* em um grupo carbonílico.

Figura 8 - Representação da transferência de íons hidreto da nicotinamida na forma reduzida (NADH / NADPH) para um grupo carbonílico.

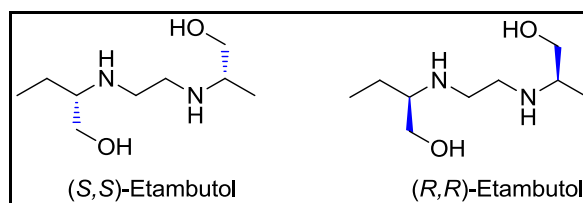


O curso estereoquímico de transferência de elétrons na redução de uma cetona proestereogênica é governado pelo tamanho dos grupos substituintes ligados ao carbono carbonílico. Foi postulada por Prelog (*Regra de Prelog*) que de acordo com o tamanho dos substituintes ligados ao grupo carbonílico é possível prever empiricamente por qual *face* da carbonila a transferência de íon hidreto ocorre preferencialmente. As duas *faces* de um centro trigonal plano presentes no grupo carbonílico, têm as designações de *face re* e *face si*, que são estabelecidas de acordo com as prioridades por número atômico segundo Cahn-Ingold-Prelog. Se a transferência de íon hidreto ocorrer pela *face re* da carbonila proestereogênica obtém-se (S)-álcoois e se ocorrer pela *face si* obtém-se (R)-álcoois (RESENDE 2007).

1.2.3 Álcool-desidrogenases e seu potencial biotecnológico

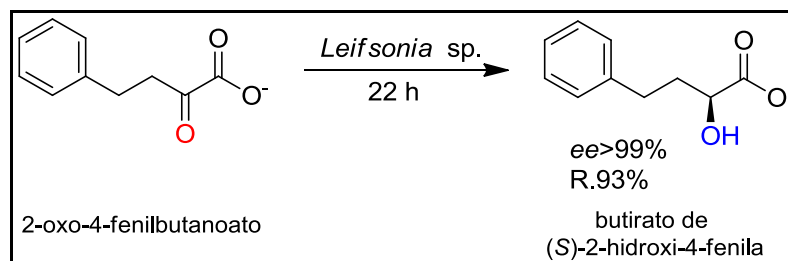
Do ponto de vista biotecnológico, as enzimas álcool-desidrogenases são de extrema importância em sínteses assimétricas, levando a produção de compostos quirais de alto valor agregado (CARBALLEIRA *et al.* 2009). A quiralidade é essencial em compostos de aplicação biotecnológica; em produtos como fármacos, fragrâncias e agroquímicos, a atividade biológica depende, em muitos casos, da predominância de um dos enantiômeros. Normalmente, um enantiômero exerce a atividade biológica enquanto outro é menos ativo, inativo ou mesmo tóxico.

Este é caso do fármaco *Etambutol*, no qual o enantiômero (S,S) é utilizado no tratamento para tuberculose, enquanto o (R,R) pode provocar cegueira (Figura 9) (SOUZA & VASCONCELLOS 2005).

Figura 9 - Enantiômeros do fármaco Etambutol.

Esta característica é de extrema importância biológica, uma vez que a maioria dos receptores endógenos de fármacos, como proteínas de membranas e enzimas, são compostos quirais. Como as enzimas são formadas por *L*-aminoácidos, sua quiralidade intrínseca permite ligações específicas entre seu sítio ativo e o substrato para formação do produto de interesse (LENHINGER 2000).

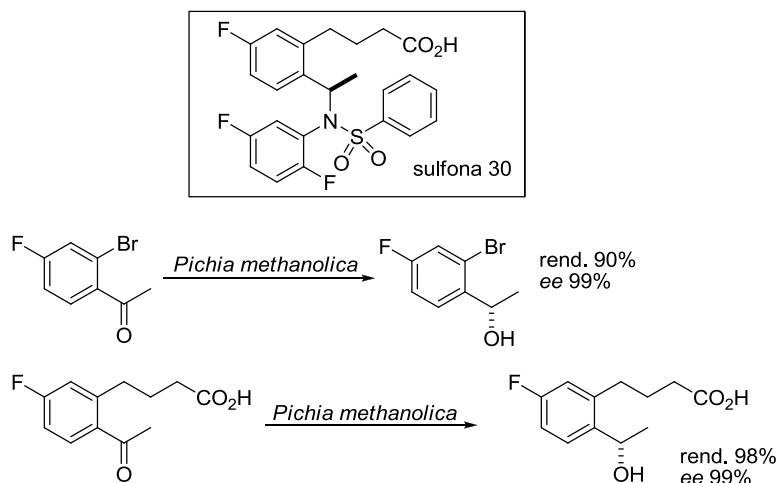
Neste contexto, as ADHs recebem constante atenção dos setores de pesquisa e desenvolvimento, pois catalisam a redução de uma cetona proquiral, gerando um centro estereogênico na molécula, conferindo-lhe quiralidade (ILLANES 2008). Através da redução assimétrica, as ADHs produzem álcoois quirais, conhecidos como “*chiral building blocks*” ou “*synthons*”, precursores de grande importância de moléculas bioativas mais complexas (NAKAMURA *et al.* 2003). Os álcoois quirais são utilizados em diversos setores industriais como o agroquímico, cosmético e especialmente, farmacêutico (XU *et al.* 2010). Estudos mostraram que álcool-desidrogenases do fungo *Leifsonia* sp. promovem redução assimétrica, produzindo o butirato de (*S*)-2-hidroxi-4-fenila (*ee* >99%), um importante bloco quiral utilizado na produção de fármacos hipertensivos (Esquema 8) (ZHENG & XU 2011).

Esquema 8 - Síntese do butirato de (*S*)-2-hidroxi-4-fenila através de ADHs.

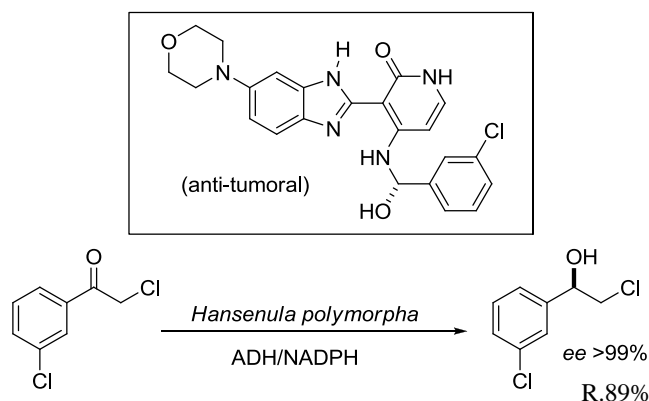
O fármaco *Sulfona* 30, utilizado no tratamento de Alzheimer, foi sintetizado através de um processo enzimático, que envolveu a redução de derivados da acetofenona contendo grupamento flúor. Estas moléculas foram reduzidas através de ADHs presentes no

microrganismo *Pichia methanolica* SC 13825, obtendo-se os respectivos álcoois com excelentes rendimentos e excessos enantioméricos (Esquema 9) (PATEL 2000).

Esquema 9 - Biorredução de cetonas fluoradas para obtenção de precursores do fármaco Sulfona 30.



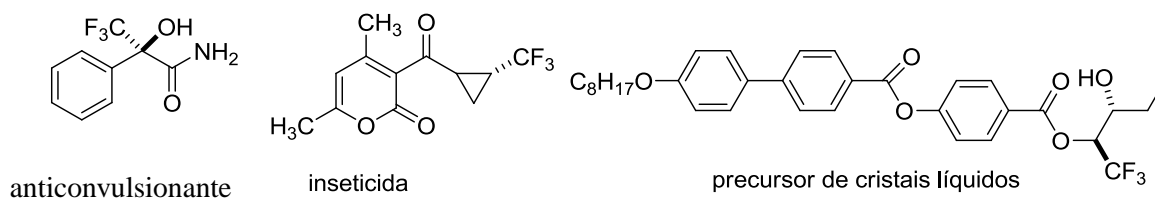
A obtenção do (S)-2-cloro-1-(3-clorofenil)etanol, um precursor utilizado como na síntese de um fármaco antitumoral, foi realizada por enzimas desidrogenases presentes no microrganismo *Hansenula polymorpha* SC 13824, envolvendo a coenzima NADPH. A redução da α -clorocetona produziu o respectivo álcool quiral com 89% de rendimento e excesso enantiomérico >99% (Esquema 10) (PATEL 2008).

Esquema 10 - Redução da α -clorocetona por enzima ADH *Hansenula polymorpha* SC 13824.

Dentre a diversidade de moléculas orgânicas que podem ser seletivamente reduzidas por ADHs, as que contêm grupamentos fluorados são particularmente interessantes.

1.3 Síntese assimétrica de compostos organofluoradas

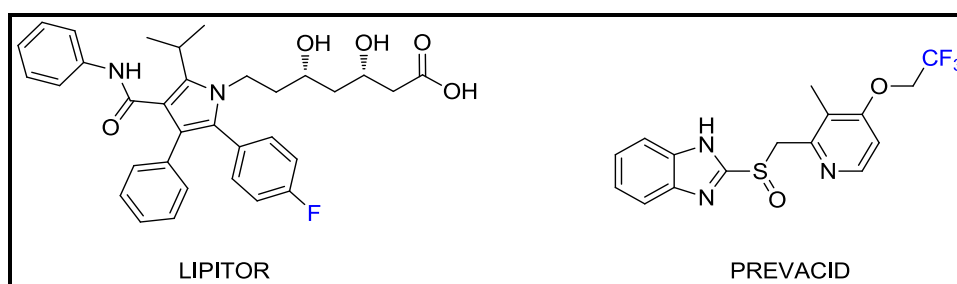
O elemento flúor é o mais eletronegativo da tabela periódica. Quando ligado ao carbono, ambos formam uma das ligações mais fortes em química orgânica, o que torna sua presença muito atrativa em síntese orgânica e na produção de fármacos, agroquímicos e cristais líquidos (Figura 10) (MURPHY *et al.* 2009).

Figura 10 - Moléculas fluoradas presentes em compostos bioativos.

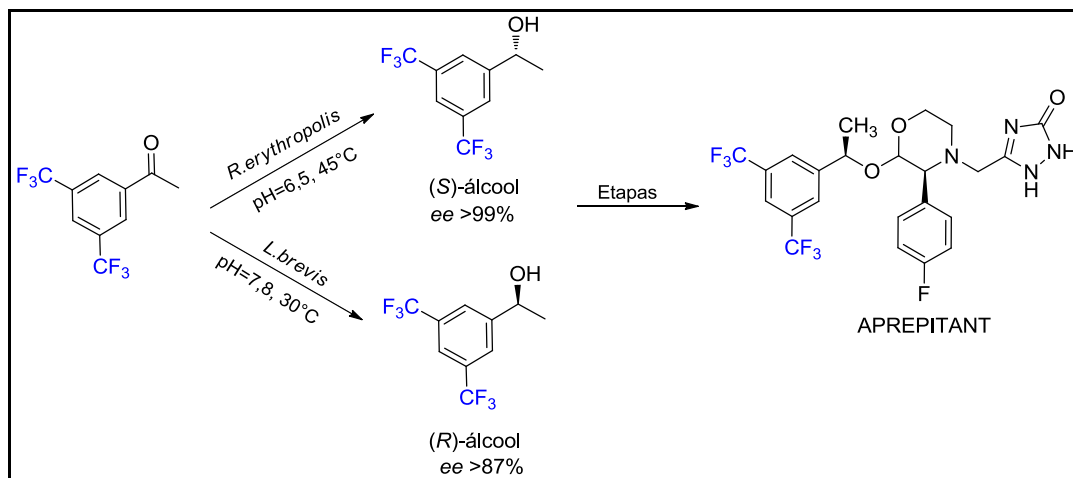
A presença do átomo de flúor nestas moléculas lhes confere alta estabilidade, evitando decomposições metabólicas indesejáveis. Sua presença afeta de forma acentuada a acidez ou basicidade de grupos funcionais adjacentes através de concomitantes alterações eletrônicas, lipofílicas e metabólicas (O'HAGAN 2008). Seu pequeno tamanho (1,35 Å) junto a sua alta eletronegatividade, fazem do flúor o melhor substituinte para minimizar impedimentos estéricos, sendo muitas vezes, substituído pelo hidrogênio e pelo grupo hidroxila em suas diversas aplicações (O:1,47 Å; H:1,2 Å) (O'HAGAN 2007). O interesse no átomo de flúor como substituinte para o hidrogênio é devido a seu elevado efeito polarizante junto a pouca mudança nos efeitos estéricos (HOFF & SUNDBY 2013).

Estudos de modelagem molecular mostram que muitos compostos organofluorados têm potencial para se tornarem fármacos em virtude de sua estabilidade metabólica e lipofilicidade, quando comparadas aos compostos análogos não-fluorados (LAM *et al.* 2009). Cerca de 1/5 dos fármacos presentes no mercado apresenta o flúor em sua constituição, incluindo dois dos medicamentos mais vendidos pela indústria farmacêutica: Lipitor e Prevacid (Figura 11) (O'HAGAN 2006, SASAKI *et al.* 2005).

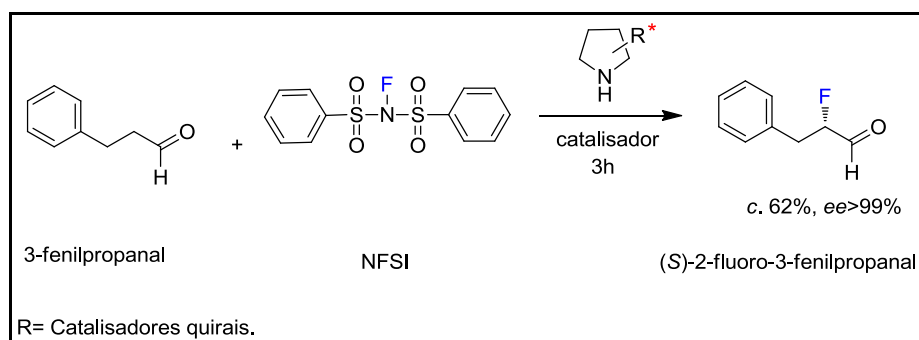
Figura 11 - Fármacos contendo átomos de flúor.



Em relação aos fármacos, a presença de átomos de flúor em posições estratégicas pode torná-los mais resistentes à ação de enzimas no organismo. Em destaque, o grupo trifluorometil tem sido amplamente utilizado em substituição ao grupo metila, pois sua presença resulta em mudanças na lipofilicidade ou biodisponibilidade da molécula, que tem consequências na penetração da membrana celular e interações com moléculas hidrofóbicas (PARK *et al.* 2001). Como exemplo, um dos mais importantes e investigados blocos de construção quiral consiste no álcool 1-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)etanol, precursor do fármaco APREPITANT, indicado para prevenção de náuseas associadas a ciclos de quimioterapia. Neste caso, ambos os enantiômeros podem ser utilizados dependendo do interesse da rota sintética. A redução da cetona 1-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)etanona foi promovida por ADHs presentes no microrganismo *Rhodococcus erythropolis*, obtendo-se o (*S*)-álcool com *ee* >99%, enquanto o microrganismo *Lactobacillus brevis* expressou enzimas que produziram o (*R*)-álcool com *ee* >87%. Neste caso, a porção 3,5-ditri-fluorometilfenil assegura alta lipofilicidade e boa penetração do fármaco nas membranas (JIANG *et al.* 2009) (Figura 12).

Figura 12 - (S) e (R)- álcoois precursores do fármaco APREPITANT.

Desta forma, muitos estudos são direcionados para a inserção de átomos de flúor em moléculas orgânicas, por exemplo, casos como a fluoração enantiosseletiva de aldeídos (3-fenilpropanal) com o reagente doador de flúor (*N*-fluorodibenzenossulfonimida ou NFSI) via catalisadores orgânicos para produção de um centro quiral (Esquema 11) (MARIGO *et al.* 2005). Nestes casos, posteriormente são realizadas reações de redução com reagentes químicos, como boro-hidreto de sódio, para obtenção de álcoois de interesse.

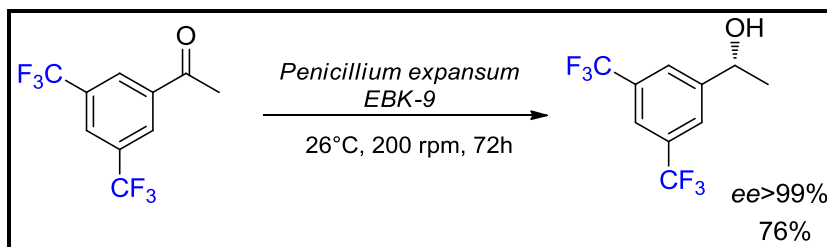
Esquema 11 - Fluoração enantiosseletiva de aldeídos.

Em outros casos, cetonas proquirais fluoradas já contêm em sua estrutura átomos de flúor, o que torna seu estudo de grande interesse para produção de álcoois quirais por biocatálise. No entanto, são raros os biocatalisadores que podem catalisar especificamente transformações seletivas em compostos fluorados (CAO *et al.* 2013).

Como exemplo, enzimas álcool-desidrogenases presentes no fungo terrestre *Penicillium expansum* EBK-9 promoveram a redução da 3,5-bis(trifluorometil)acetofenona, produzindo o composto (R)-3,5-bis-trifluorometilfenil-etanol, um precursor na síntese de

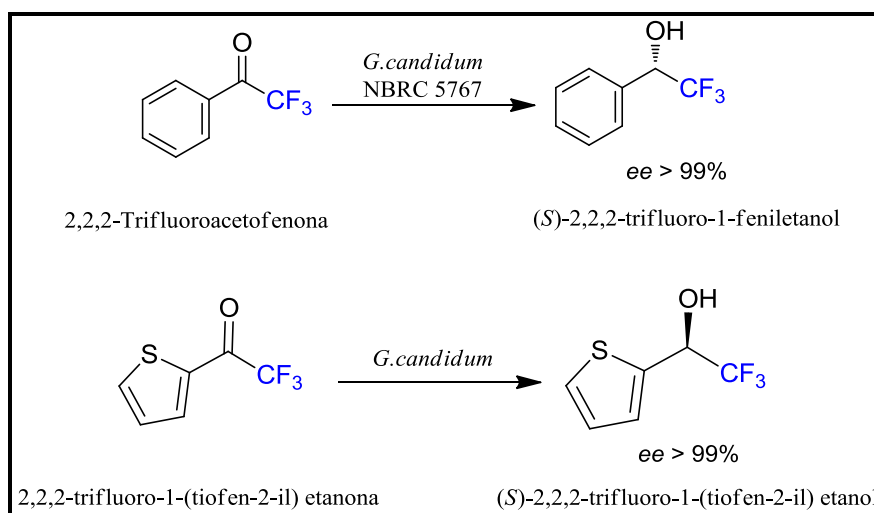
fármacos indicados contra emesis (vômito). Em 72 horas e sob temperatura ambiente, o álcool quiral foi obtido com $ee > 99\%$ (KURBANOGLU *et al.* 2009) (Esquema 12).

Esquema 12 - Síntese do (*R*)-3,5-bis-trifluorometilfenil-etanol por ADHs presentes no fungo por *Penicillium expansum* EBK-9.



Enzimas presentes no fungo *Geotrichum candidum* NBRC 5767 também realizaram a conversão da 2,2,2-trifluoroacetona no respectivo (*S*)-álcool com excelente excesso enantiomérico ($> 99\%$) (CAO 2013). Este fungo também catalisou a redução da 2,2,2-trifluoro-1-(tiofen-2-il)etanona, levando a produção do respectivo (*S*)-álcool com excesso enantiomérico $> 99\%$ (MATSUDA *et al.* 2000) (Esquema 13).

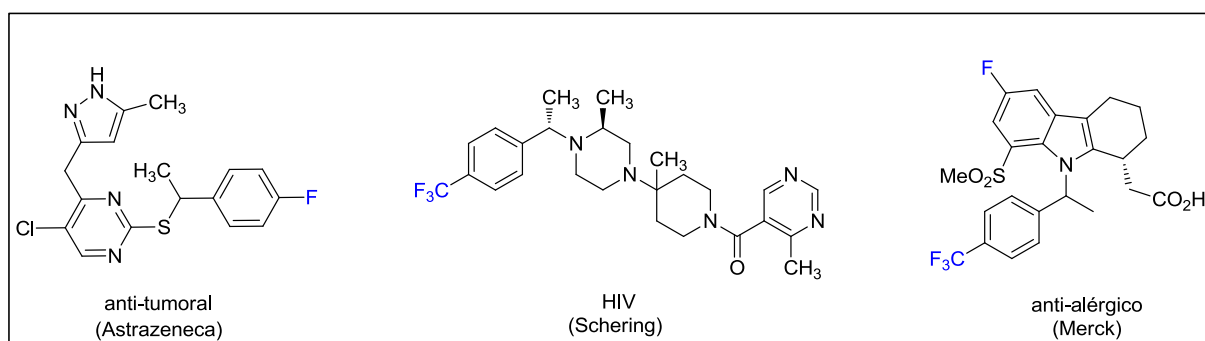
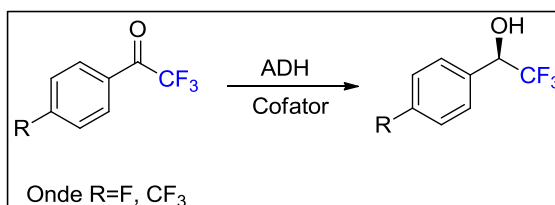
Esquema 13 - Redução de 2,2,2-trifluoroacetonas por fungo *Geotrichum candidum*.



Em estudos biocatalíticos, as cetonas 1-(4-fluorofenil)etanona e 1-(4-trifluorofenil)etanona têm recebido grande atenção. Estes substratos podem ser transformados nos respectivos álcoois quirais 1-(4-fluorofenil)etanol e 1-(4-trifluorofenil)etanol através de enzimas álcool desidrogenases. Estes álcoois podem atuar como blocos de construção de moléculas bioativas, as quais são incorporadas em fármacos de ação antitumorais,

antialérgicos e no tratamento de síndrome de imunodeficiência adquirida (HIV) (Esquema 14) (HOFF & SUNDBY 2013).

Esquema 14 - Redução de cetonas proquirais fluoradas em álcoois utilizados na síntese de fármacos.



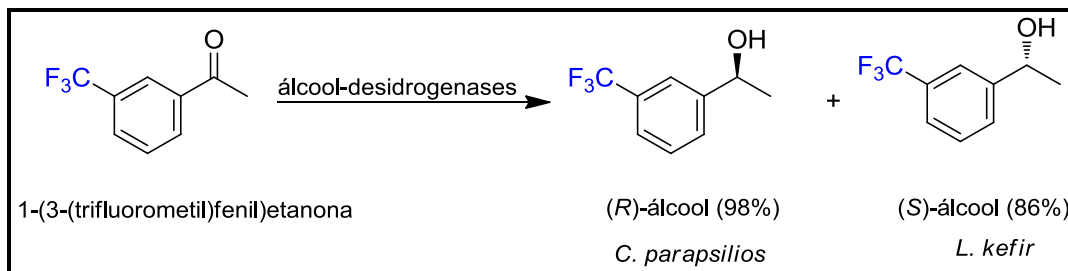
Com o objetivo de produzir álcoois quirais fluorados a partir das 1-(4-fluorofenil)etanona e 1-(4-trifluorofenil)etanona, foram realizadas reduções biocatalisadas por diferentes microrganismos, tais como *Pyrococcus furiosus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida magnoliae*, os quais demonstraram elevado potencial enzimático (Tabela 3) (HOFF & SUNDBY 2013).

Tabela 3 - Redução de cetonas 1-(4-fluorofenil)etanona e 1-(4-trifluorofenil)etanona por microrganismos.

Biocatalisador	Cofator/pH	ee (%)	ee %	Configuração
<i>Pyrococcus furiosus</i>	NADH/ 6.5	99	99	S
<i>Sacharomices salmonicolor</i>	NADPH/6.5	92	99	S
<i>Candida magnoliae</i>	NADPH/6.5	99	99	R

Compostos aromáticos fluorados também são utilizados em agricultura como pesticidas, herbicidas e inseticidas (MURPHY *et al.* 2009). O composto 1-(3-trifluorometil)fenil)etanol pode ser usado como precursor de um antifúngico utilizado em herbicidas. O enantiômero (*S*)-álcool foi obtido com 98% de excesso enantiomérico utilizando enzimas álcool-desidrogenases do fungo *Candida parapsilios*, ao passo que o microrganismo *Lactobacillus kefir* promoveu a conversão da 1-(3-(trifluorometil)fenil) etanona em 86% ao respectivo (*R*)- álcool (Esquema 15) (HOFF & SUNDBY 2013).

Esquema 15 - Produção dos enantiômeros de 1-(3-trifluorometil)fenil)etanol por diferentes microrganismos.



Estes estudos demonstram o interesse em reações de redução assimétrica de fluoro-metilcetonas. A aplicação de células microbianas na síntese de compostos fluorados é rara e tem grande potencial a ser investigado (NIE *et al.* 2011, CAO *et al.* 2013). Neste contexto, torna-se interessante explorar o potencial enzimático de microrganismos naturais que apresentem enzimas ativas frente a esta classe de compostos (PEDRINI *et al.* 2009, NAKAMURA *et al.* 2000).

1.4 Reações biocatalíticas com células íntegras

A capacidade de biotransformação dos microrganismos e de suas enzimas para a produção de uma ampla variedade de compostos de química fina é bem conhecida (GONÇALVES *et al.* 2010). Reações biocatalíticas utilizando células íntegras de microrganismos apresentam diversas vantagens. Em geral, os processos que utilizam células íntegras de microrganismos são de baixo custo e especialmente interessantes para aplicação em sistemas dependentes de cofatores, pois suas células já contêm as enzimas álcool-desidrogenases, os cofatores e os respectivos sistemas de regeneração, tornando o processo enzimático bastante viável economicamente (ZILBEYAZ & KURBANOGLU 2008). Especificamente, reações biocatalíticas não requerem purificação enzimática e ocorrem através de processos operacionais simples. Além disso, células íntegras podem ser diretamente utilizadas na reação enzimática, resultando em processos de biotransformação mais simples (LIU *et al.* 2013).

Os microrganismos são muito interessantes em processos que envolvem biorreduções, pois são robustos e podem ser cultivados facilmente em laboratório utilizando condições otimizadas (WOHLGEMUTH 2010). Neste contexto, com a enorme biodiversidade de microrganismos em variados habitats, a busca por novos biocatalisadores torna-se um objetivo de investigação para o meio científico. Entre estes habitats, o ambiente marinho pode

representar uma fonte renovável de biocatalisadores para produção de compostos enantiomericamente enriquecidos.

1.4.1 Microrganismos de origem marinha como biocatalisadores

A *bioprospecção enzimática* representa a atividade de explorar legalmente a diversidade de vida em um determinado local em busca de novos biocatalisadores. Sem dúvida, o ecossistema marinho representa um reservatório de diversidade microbiana ainda inexplorada na sua magnitude. Com bilhões de anos de evolução, os oceanos contêm algumas das mais antigas e resistentes formas de vida (REID *et al.* 2011).

Desta forma, o *habitat marinho* representa um ambiente com grande potencial para a realização de bioprospecções, pois seus microrganismos, esponjas, moluscos, animais e algas marinhas podem oferecer uma diversidade de novas enzimas ativas frente à biotransformação de substratos de interesse (DA MATA *et al.* 2011).

Biocatalisadores marinhos podem realizar processos notáveis e incomuns devido a propriedades adquiridas como resultado de milhões de anos de evolução como: tolerância a elevadas concentrações salina, termoestabilidade, barofilicidade, adaptação a baixas temperaturas e facilidade de cultivo em larga escala são algumas das vantagens para abordagens biotecnológicas (DEBASHISH *et al.* 2005). Enzimas que apresentam atividade ótima em elevadas concentrações salinas, diferentes faixas de pH e temperatura são de grande interesse, pois são robustas para interagir com substratos até mesmo em condições extremas. Ainda, estas enzimas podem levar a novas propriedades químicas e estereoquímicas em processos reacionais (ANTRANIKIAN *et al.* 2005). Desta forma, estudos biocatalíticos dirigidos envolvendo a escolha de substratos e condições reacionais adequadas devem ser realizados para explorar a biodiversidade microbiana marinha.

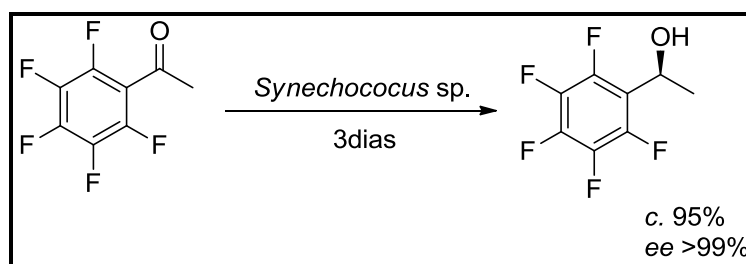
No período de 1973-2007 os microrganismos marinhos foram objetos de patentes, dentre os quais 53% e 33% correspondiam, respectivamente, aos setores químicos e farmacológicos, seguidos dos setores alimentícios, cosméticos e agroquímicos (TRINCONE 2011). Inseridas numa diversidade enzimática entre estes organismos, enzimas ativas têm sido encontradas entre a classe das oxidoredutases, despertando grande interesse tanto no meio acadêmico quanto nos setores industriais.

Em reações com enzimas desidrogenases, diferentes estereosseletividades foram observadas em relação aos biocatalisadores terrestres, adicionando flexibilidade no que diz respeito à tolerância a elevadas concentrações salina e resistência a solventes orgânicos

(TRINCONE 2011). Como exemplo, tem-se a aplicação do microrganismo marinho *Pyrococcus furiosus* em reduções de uma variedade de alquil e aril cetonas, além de α - e β -cetoésteres (FERRER *et al.* 2007). A enzima ADH presente neste microrganismo exibiu elevada tolerância frente a diferentes solventes orgânicos, tais como dimetilsulfóxido, *iso*-propanol, metil-*tert*-butil éter e hexano. Portanto, esta enzima pode ser utilizada em meio apolar, especialmente no caso de cetonas que apresentam baixa solubilidade em soluções aquosas tamponadas (ZHU *et al.* 2006).

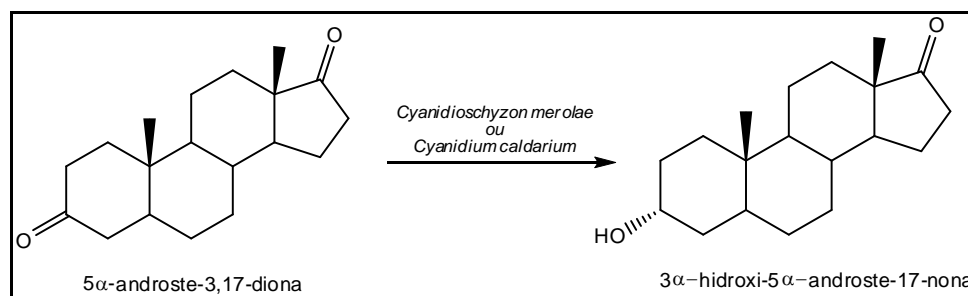
Estudos realizados com a cianobactéria *Synechococcus* sp. demonstraram que este organismo reduziu enantiosseletivamente a 2,3,4,5,6-pentafluoracetofenona. A cetona pentafluorada foi adicionada ao meio de cultivo da cianobactéria e em apenas três dias de reação produziu o respectivo (*S*)-álcool, com ótimo rendimento (95%) e excesso enantiomérico (*ee* >98%) (Esquema 16) (UTSUKIHARA *et al.* 2006).

Esquema 16 - Redução assimétrica da pentafluoracetofenona por *Synechococcus* sp.



Em relação às algas marinhas, diversos metabólitos secundários bioativos já foram isolados. Terpenóides, carotenóides e compostos fenólicos são alguns dos exemplos de moléculas isoladas, as quais podem apresentar atividade biológica (antibacteriana, antiviral e antioxidante) de interesse farmacêutico (RODRIGUEZ *et al.* 2012). No entanto, a busca por enzimas ativas em algas marinhas e seus microrganismos associados é rara e poucos trabalhos são encontrados na literatura. No Brasil, o campo de pesquisa ainda é muito pouco explorado apesar da diversidade de sua flora marinha.

Reações estereo- e regiosseletivas foram realizadas com espécies de algas marinhas frente ao substrato 5 α -androstano-3,17-diona, um esteróide disponível comercialmente e utilizado na síntese de muitos hormônios esteroidais, incluindo a testosterona. As algas marinhas *Cyanidioschyzon merolae* e *Cyanidium caldarium* produziram regio- e estereosseletiva o 3 α -(*S*)-álcool com rendimento de 75% (Esquema 17) (UTSUKIHARA *et al.* 2006).

Esquema 17 - Redução regioesletiva da 5 α -androstandio-3,17-diona com algas marinhas.

As algas vermelhas (*Rhodophyta*) também se destacam como fontes de inúmeros produtos naturais, sendo amplamente distribuídas em mares temperados quentes e tropicais (PEREIRA & TEIXEIRA 1998). A alga marinha vermelha *Bostrychia radicans*, pertencente à família Rhodomelaceae, é encontrada de forma abundante em ambientes tropicais com diferentes salinidades, como lagoas, manguezais, água doce e estuários (KARSTEN & KIRST 1989). No litoral brasileiro, estas espécies encontram-se em sistemas de estuário¹ associados com mangues ou habitats rochosos. Até o momento, a espécie *Bostrychia radicans* tem sido estudada em termos de taxonomia e fisiologia, os quais demonstraram a presença de metabólitos secundários, como compostos fenólicos e amidas (OLIVEIRA *et al.* 2012).

No entanto, ao alcance de nosso conhecimento, o potencial enzimático presente na alga *Bostrychia radicans* foi explorado de forma inédita no grupo de Biocatálise e Química Orgânica do Instituto de Química de São Carlos. Em estudos prévios, a alga *B. radicans* apresentou enzimas ADHs que promoveram a redução de iodoacetofenonas, produzindo os respectivos álcoois quirais com elevados excessos enantioméricos (MOUAD *et al.* 2011).

No atual trabalho, microrganismos isolados da alga *B. radicans* foram utilizados para promover reações de redução de cetonas fluoradas. Estas reações são de grande interesse em um contexto científico e biotecnológico, pois busca-se a descoberta de enzimas de ambiente marinho e a obtenção de álcoois enantiomericamente puros contendo o átomo de flúor em suas estruturas químicas.

¹ Ambiente aquático de transição entre um rio e o mar.



2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi reduzir cetonas fluoradas proquirais empregando enzimas álcool-desidrogenases presentes em fungos isolados da alga marinha *Bostrychia radicans*.

2.1 Objetivos específicos

- Realização de triagens biocatalíticas de fungos isolados da alga marinha *Bostrychia radicans*.
- Obtenção de álcoois quirais organofluorados a partir de enzimas ADHs presentes em fungos marinhos.

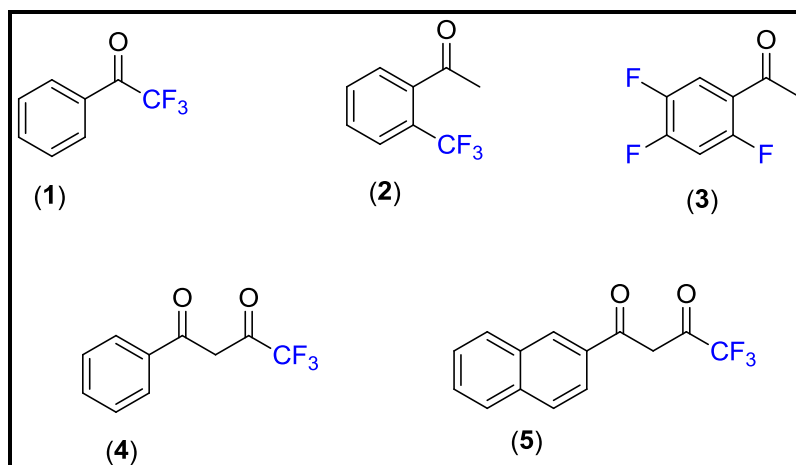


3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e solventes

Para o desenvolvimento das reações biocatalíticas foram selecionadas as seguintes cetonas fluoradas comerciais (Sigma-Aldrich): 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona (**1**), 1-(2-(trifluorometil)fenil)etanona (**2**), 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona (**3**), 4,4,4-trifluoro-1-fenilbutano-1,3-diona (**4**) e 4,4,4-trifluoro-1-(naftalen-2-il) butano-1,3-diona (**5**). Os solventes (acetato de etila, hexano) foram adquiridos da marca Synth, Vetec, Merck e Tedia e utilizados sem prévia purificação. Os solventes deuterados (CDCl_3 e MeOD_4) foram obtidos pela Tedia.

Figura 13 - Cetonas fluoradas utilizadas nas reações de biorredução com fungos marinhos.



3.2 Preparação dos álcoois racêmicos

Para produção dos padrões químicos (racêmicos) dos álcoois, foram realizadas reações de redução com o reagente NaBH₄ (boro-hidreto de sódio). As reações foram conduzidas em um balão de 25 mL sob agitação magnética e temperatura ambiente, onde foram adicionados 5,0 mL de metanol e 50 mmol da cetona fluorada correspondente, além de um excesso de boro-hidreto de sódio. As reações foram mantidas em agitação magnética e monitoradas por cromatografia em camada delgada utilizando placas de sílica gel. Em seguida, as placas foram reveladas em solução de anisaldeído/ácido sulfúrico/ácido acético (1 mL/1 mL/100 mL). Após a reação ser completada adicionou-se água destilada (1 mL), evaporou-se o metanol sob vácuo no rotaevaporador. Em seguida, adicionou-se 15 mL de água destilada e realizou-se extração com acetato de etila (3 x 20 mL). À fase orgânica adicionou-se Na₂SO₄ anidro, filtrou-se e concentrou-se sob vácuo no rotoevaporador. Os produtos **1a-5a** foram purificados por cromatografia em coluna utilizando sílica gel e uma mistura de eluentes (hexano/acetato de etila). Os rendimentos obtidos para os produtos **1a-5a** foram superiores a 85%. Por fim, as análises por cromatografia em fase gasosa foram realizadas utilizando colunas quirais.

3.3 Coleta da alga marinha *Bostrychia radicans*

A coleta da alga marinha *Bostrychia radicans* foi realizada pela Profa. Dra. Hosana M. Deboni, docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP) em setembro de 2007, no Manguezal da Praia Brava, Ubatuba- São Paulo. Após a coleta, pequenas porções das algas foram separadas em embalagens plásticas e mantidas sob refrigeração (4 °C). A identificação da espécie foi realizada pela Dra. Nair S. Yokoya do Instituto de Botânica de São Paulo (IB/SP).

3.4 Isolamento de fungos presentes na alga marinha *Bostrychia radicans*

O isolamento dos fungos foi realizado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho (FCFRP/USP), sob a orientação da Profa. Dra. Hosana M. Deboni. A alga *B. radicans* foi lavada com água do mar para remoção de impurezas (areia, folhas). A desinfecção superficial deste material para o isolamento dos microrganismos foi realizada por três diferentes metodologias:

- (a) Imersão em etanol 70% por 15 segundos e três lavagens em água do mar esterilizada;
- (b) Imersão em etanol 70% por 10 segundos, seguidas de imersão em hipoclorito de sódio 0,01% por 5 segundos e três lavagens em água do mar esterilizada;
- (c) Imersão em etanol 70% por 5 segundos, seguidas de imersão em hipoclorito de sódio 0,01% por 15 segundos e três lavagens em água do mar esterilizada.

As amostras esterilizadas da alga foram fragmentadas com uso de pinça e bisturi cirúrgico estéreis e os fragmentos foram transferidos para placas de Petri com meio de cultivo sólido de agar e batata-dextrose (BDA).

O meio agar foi preparado pesando-se 20 g de alga (*B. radicans*) que foram trituradas em liquidificador contendo 200 mL de água do mar esterilizada. Em seguida foram adicionados cloranfenicol (200 mg), agar (15 g) e água do mar (1 L). As placas foram incubadas em estufa a 28 °C e os microrganismos que se desenvolveram nas placas foram sucessivamente repicados até a obtenção das linhagens puras. Os fungos foram identificados pela Dra. Lara D. Sette do Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrárias da Universidade de Campinas (CPQBA/UNICAMP) e depositados na coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria de Universidade de Campinas (CBMAI/UNICAMP). A identificação baseou-se na utilização de métodos de taxonomia convencional e molecular, através de observações macro e microscópicas seguindo métodos da literatura (SAMSON *et al.* 2002). Foram obtidas linhagens as seguintes linhagens (Figura 14).

Figura 14 - Fungos marinhos isolados da alga marinha *B. radicans*.*Botryosphaeria* sp.
CBMAI 1197*Eutypella* sp.
CBMAI 1196*Hidropisphaera* sp.
CBMAI 1194*Xylaria* sp.
CBMAI 1195

3.5 Composição da água do mar artificial

A água do mar artificial foi preparada com os seguintes sais (1L): $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,26 g), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (9,68 g), KCl (0,61 g), NaCl (30,0 g), Na_2HPO_4 (0,014 mg), Na_2SO_4 (3,47 g), NaHCO_3 (0,17 g), KBr (0,1 g), $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,040 g), H_3BO_3 (0,030 g).

3.6 Composição do meio de cultura sólido e líquido para o crescimento dos fungos marinhos

i) *Procedimento para preparar o meio líquido de malte (2%)*: Em um recipiente de 2,0 L foram adicionados 1L de água do mar artificial e 20,0 g de extrato de malte. A mistura foi agitada e o pH do meio foi ajustado em 5,5 para o fungo *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 e em 7,0 para os demais fungos, com solução de KOH 2,0 M ou HCl 0,5 M, sendo esta posteriormente autoclavada (120 °C, 20 minutos).

ii) Em um frasco tipo *shott* foram adicionados água do mar artificial (1 L), extrato de malte (30 g), peptona de farinha de soja (3 g) e agar (15 g). O pH do meio foi ajustado 5,5 para o fungo *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 e em 7,0 para os demais fungos, com solução de KOH 2,0 M ou HCl 0,5 M, sendo esta posteriormente autoclavada (120 °C, 20 minutos).

As cepas fúngicas utilizadas foram preservadas em placas de Petri em meio malte 2% (MA2) em geladeira sob temperatura de 4 °C e os repiques para sua manutenção foram realizados a cada três meses. Todos os meios utilizados foram da Marca Acumedia ®.

3.6.1 Estudo da faixa de pH para crescimento dos fungos

Os fungos marinhos foram cultivados em meio de cultura de extrato de malte 2% nos seguintes valores de pH: 4,5; 5,5; 6,5; 7,5; 8,5; 9,5. Após o inóculo, os frascos Erlenmeyer foram condicionados em um agitador orbital (150 rpm, 32°C). O crescimento microbiano foi avaliado a cada 24 horas durante 7 dias.

3.7 Reações de redução com os fungos marinhos

Em frascos Erlenmeyer de 250 mL foi adicionado o meio de cultura de extrato de malte 2% (100 mL). Os fungos (*Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197, *Eutypella* sp. CBMAI 1196, *Hidropisphaera* sp. CBMAI 1194 e *Xylaria* sp. CBMAI 1195) foram cultivados por 2 dias em agitação orbital (150 rpm, 32 °C). Após este período, adicionou-se ao meio de cultivo as cetonas fluoradas **1-5** (50 mg) previamente dissolvidas em 300 µL de DMSO. As reações foram mantidas em agitação orbital (150 rpm, 32 °C, 7 dias).

3.8 Extração e purificação das reações para determinação dos rendimentos isolados dos álcoois

Após as reações serem completadas (7 dias), foi realizada uma filtração das células microbianas em funil de Buchner sob vácuo em capela de fluxo laminar. Os produtos obtidos das reações biocatalisadas foram extraídos com acetato de etila (3 x 30 mL) em funil de separação. À fase orgânica adicionou-se Na₂SO₄ anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente sob pressão reduzida para obtenção do extrato. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna para determinação dos rendimentos e analisados das seguintes formas.

3.9 Métodos de análise, identificação e caracterização dos compostos

3.9.1 Métodos cromatográficos

As cromatografias de absorção foram realizadas em colunas de sílica gel *flash* 60 (230-400 da Across Organics). Para cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 F₂₅₄ da Sorbent Technologies, com espessura de 0,20 mm contendo indicador de fluorescência. Os eluentes utilizados foram: hexano, acetato de etila em diferentes polaridades. As cromatofolhas foram analisadas em uma câmara com luz UV (254 nm) e reveladas com solução de anisaldeído (100 mL de ácido acético, 1 mL de *p*-anisaldeído, 1 mL de H₂SO₄) ou com solução alcoólica de vanilina (135 mL de H₂O destilada, 30 mL de H₂SO₄, 35 mL de MeOH, 3 g de vanilina). Como fase móvel foram utilizadas misturas de solventes (hexano e acetato de etila).

Os produtos das reações foram analisados utilizando um cromatógrafo da marca Shimadzu, modelo GC2010, equipado com auto-injetor AOC 20i com um detector de ionização de chama (FID-Flame Ionization Detector), utilizando nitrogênio como gás de arraste (74 KPa). As reações foram analisadas utilizando a coluna capilar de sílica fundida VARIAN WCOST (25m x 0,25 mm x 0,39 mm), fase estacionária CP-Chirasil-Dex CB, com as temperaturas do injetor e detector a 200°C. As condições de análise utilizadas encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 - Métodos cromatográficos utilizados.

Composto	T _i (°C)	t _i (min)	T _f (min)	t _f (min)	r (°C/min)
1	70	2	150	6	2
1a	70	2	150	6	2
2	85	2	165	8	2
2a	85	2	165	8	2
3	90	2	150	6	2
3a	90	2	150	6	2
4	140	2	190	4	2
4a	140	2	190	4	2
5	160	2	200	15	3
5a	160	2	200	15	3

3.9.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN¹H e RMN¹³C foram obtidos nos espectrômetros: Bruker/AC-500(CAQI-IQSC) - Frequências: 500 MHz (RMN¹H) e 125 MHz (RMN¹³C), Bruker/AVANCE III (DQ-UFSCar, Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira) - Frequências: 400 MHz (RMN¹H) e 100 MHz (RMN¹³C). Os solventes deuterados utilizados foram clorofórmio (CDCl₃) e metanol (MeOD₄). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm) e referenciados em relação ao padrão interno tetrametilsilano (TMS) e aos solventes deuterados (CDCl₃, δ 7,27, MeOD₄ 3,31).

3.9.3 Espectrometria na região de absorção do Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier Bomem/MB-102 e calibração interna. As amostras foram preparadas na forma de filmes em pastilha de silício (amostras líquidas). As frequências de absorção foram expressas em cm⁻¹.

3.9.4 Espectrometria de Massas de Alta Resolução

As análises foram realizadas no espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo/tempo voo, operando no modo MS positivo no aparelho modelo: MicroTOF-QII, com detector Bruker Daltonis (Bremen Alemanha).

3.9.5 Medidas de rotação óptica

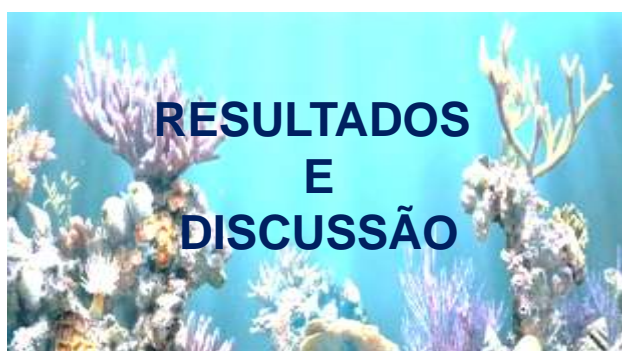
As medidas de rotação óptica foram realizadas no DQ-UFSCar em um polarímetro Perkin-Elmer modelo 241 (Waltham MA, USA) equipado com lâmpada de Na ($\lambda = 589$ nm). As amostras foram diluídas em 1 mL de CHCl₃ grau espectroscópico e os experimentos foram realizados a 25°C. O equipamento é de responsabilidade do Prof. Dr. Timothy John Brocks.

3.10 Evaporadores rotativos e agitadores orbitales

Para remoção dos solventes foram utilizados rotaevaporadores das marcas Fisaton e Tecnal T-210, equipados com bomba de vácuo TE-058 e refrigeração Tecnal modelo TE-2005. O crescimento dos fungos e as reações de biorredução foram realizadas em agitador rotativo modelo Tecnal TE-421 ou Superhom G-25.

3.11 Outros equipamentos

Balança analítica modelo AY-220 marca Shimadzu, capela de fluxo laminar marca Veco, autoclave vertical modelo Phoenix, pHmetro modelo 8010 da marca Qualxtron e UV modelo TE-540 da Tecnal.



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização das condições de crescimento dos microrganismos em diferentes valores de pH

Previamente à realização das reações de redução, foi realizado um estudo visando encontrar o melhor pH para o crescimento dos microrganismos *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197, *Eutypella* sp. CBMAI 1196, *Hidropisphaera* sp. CBMAI 1194 e *Xylaria* sp. CBMAI 1195. Este estudo foi realizado após constatar que os fungos apresentavam diferentes crescimentos de massa micelial em pH 7,5-8,0. Entre estes, o fungo *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 não apresentava crescimento similar aos demais nas mesmas condições de cultivo. Assim, foram selecionadas diferentes faixas de pH para avaliar o crescimento dos microrganismos (Tabela 5). Os fungos foram cultivados em meio de cultura de extrato de malte 2%. Após o inóculo dos fungos, os frascos Erlenmeyer foram condicionados em um agitador orbital (150 rpm, 32°C). O crescimento microbiano foi avaliado a cada 24 horas durante 7 dias. Os resultados quantitativos de crescimento microbiano foram estimados de acordo com a massa fúngica obtida (Tabela 5).

Tabela 5 - Crescimento dos fungos em diferentes faixas de pH.

pH	<i>Botryosphaeria</i> sp. CBMAI 1197 m (g)	<i>Eutypella</i> sp. CBMAI 1196 m (g)	<i>Hidropisphaera</i> sp. CBMAI 1194 m (g)	<i>Xylaria</i> sp. CBMAI 1195 m (g)
4,5	5,3	3,5	4,0	3,9
5,5	6,1	4,5	4,1	4,2
6,5	5,1	4,7	4,9	4,6
7,5	3,6	5,3	5,1	5,1
8,5	3,3	5,0	5,1	5,1
9,5	3,5	4,9	4,3	3,9

m=massa obtida após filtração e secagem em estufa. Estudo realizado em duplicatas.

Embora os fungos marinhos apresentaram crescimento em toda faixa de pH estabelecida (pH 4,5-9,5), os fungos *Eutypella* sp. CBMAI 1196, *Hidropisphaera* sp. CBMAI 1194 e *Xylaria* sp. CBMAI 1195 apresentaram crescimento mais expressivo em pH próximo ao neutro e em pH=8,5, observando-se um decréscimo em pH 9,5. No caso do fungo *Xylaria* sp. CBMAI 1195, um decréscimo mais significativo foi observado. Em relação ao fungo *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197, embora foi observado crescido em pH neutro, observou-se um crescimento mais significativo em pH ácido (pH 5,5-6,5).

Comparando-se estes valores com estudos da literatura, observou-se uma concordância, pois o pH ótimo para o crescimento do microrganismo *Botryosphaeria* sp. pode ser observado entre pH 5,8-6,0 (MESSIAS 2009). O estudo destas condições é favorável para a aplicação em reações de redução, pois é descrito que o pH influencia diretamente o desempenho das reações e que, em alguns casos são até mesmo potencializados entre as faixas 5,0-7,0 (ZILBEYAS & KURBANOGLU 2008). Ainda, os resultados obtidos estão de acordo com o crescimento da maioria dos fungos filamentosos, que se desenvolvem em pH ácido, e geralmente próximo de pH 5,0 (LINDE *et al.* 2012).

Estima-se que o reino Fungi apresente aproximadamente 1,5 milhão de espécies com representantes habitando praticamente todos os ecossistemas do planeta. Estas espécies eucariotas e heterotróficas são altamente eficientes na degradação de uma ampla variedade de substratos, tornando-se importante dispensar atenção para suas condições de cultivo específicas (AZEVEDO 2002). Destaca-se a importância do cultivo de fungos em condições específicas tanto para a produção de massa micelial quanto para aplicação em estudos biocatalíticos, pois o metabolismo dos fungos pode elevar a produção de enzimas de acordo com as condições de cultivo.

4.2 Reações de redução com 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona (1)

Inicialmente, as reações de redução com os fungos marinhos isolados da alga *B. radicans* foram realizadas com o substrato 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona (1). Após a interrupção das reações, realizaram-se as etapas de filtração, extração e análises por cromatografia em fase gasosa, obtendo-se os resultados que se encontram na Tabela 6.

Tabela 6 - Redução da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona (1) com fungos marinhos isolados da alga *Bostrychia radicans*.^a

(1) $\xrightarrow[150 \text{ rpm, } 32^\circ\text{C}]{\text{Fungos marinhos}}$ (1a)

Tempo (dias)	c (%) cetona	c (%) álcool	ee (%) álcool (ca)
<i>Botryosphaeria</i> sp. CBMAI 1197			
7	0	100	99 (S)
<i>Eutypella</i> sp. CBMAI 1196			
7	62	38	99 (S)
<i>Hidropisphaera</i> sp. CBMAI 1194			
7	94	6	99 (S)
<i>Xylaria</i> sp. CBMAI 119			
7	95	5	99 (S)

^aCondições reacionais: As reações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura MA2%, 50 mg de cetona dissolvida em 300 μL de DMSO. As reações biocatalisadas foram analisadas por CG/FID após as extrações (7 dias, 130 rpm, 30 $^\circ\text{C}$). c = concentração, c = conversão. ee = excesso enantiomérico.

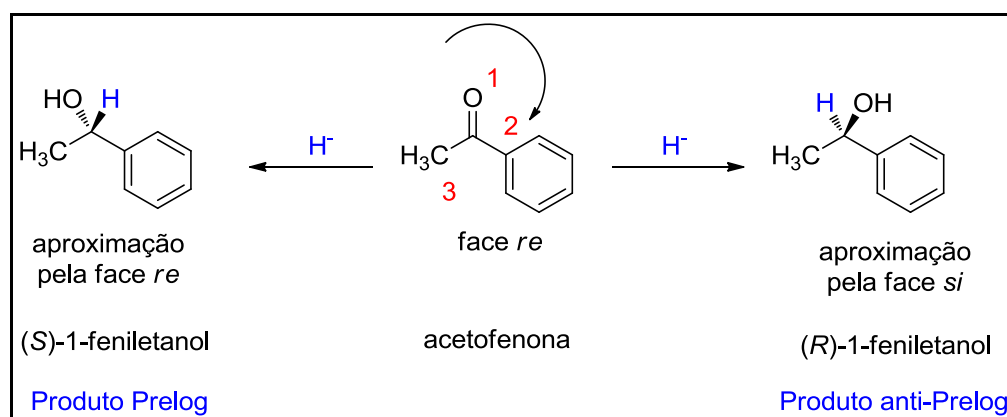
Como observado na Tabela 6, as reações biocatalisadas mostraram resultados diferentes de conversão da cetona **1** ao respectivo álcool **1a** frente aos microrganismos utilizados. Entre eles, o fungo *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 produziu 100% do respectivo S-álcool **1a** com elevado excesso enantiomérico ($ee >99\%$). Portanto este fungo foi um excelente biocatalisador frente à redução da 2,2,2-trifluoro-acetofenona (**1**).

A redução com o fungo *Eutypella* sp. CBMAI 1196 também produziu o S-álcool **1a** com excelente pureza enantiomérica ($ee >99\%$), no entanto, a conversão da cetona **1** foi moderada, com produção de 38% no álcool quiral **1a**. Os álcoois quirais obtidos pelas biorreduções com os fungos *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 e *Eutypella* sp. CBMAI 1196 foram obtidos com rendimentos de 85 e 35%, respectivamente.

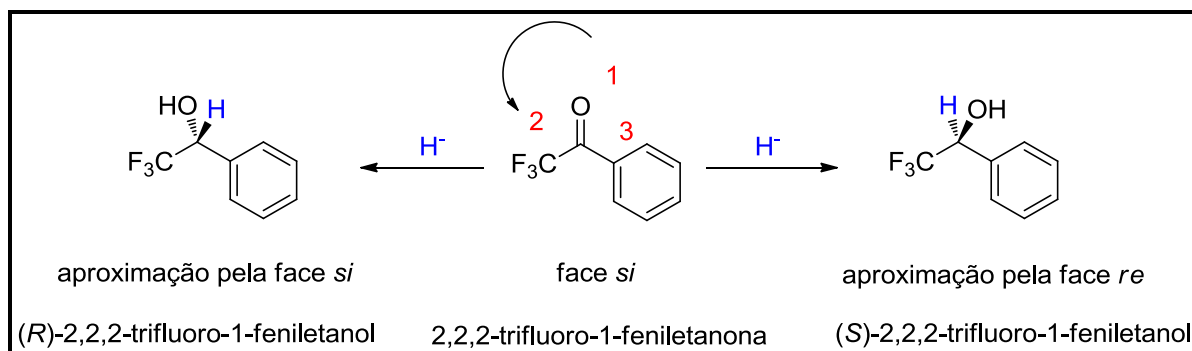
Em relação ao uso dos fungos *Hidropisphaera* sp. CBMAI 1194 e *Xylaria* sp. CBMAI 119 como biocatalisadores, observou-se que as conversões obtidas foram bastante discretas, com 6% e 5%, no respectivo álcool **1a** produzido, embora ambos os microrganismos foram seletivos na produção do álcool quiral **1a** (*ee* >99%).

É reconhecido que em reações de redução de cetonas, a transferência de um íon hidreto de uma coenzima (NADH) ao substrato pode ocorrer tanto pela face *re* quanto pela face *si* de um grupo carbonílico (NAKAMURA 2009). O curso estereoquímico de muitas reduções de cetonas pode ser predito pelo modelo empírico descrito como Regra de Prelog. Neste modelo, se a transferência do hidreto de uma molécula de NADH ocorrer pela face *re*, são obtidos (*S*)-álcoois e quando a transferência ocorrer pela face *si*, são obtidos (*R*)-álcoois (PRELOG 1964). Este é o curso estereoquímico de moléculas como a acetofenona (Figura 15).

Figura 15 - Regra de Prelog para redução da acetofenona.



Neste estudo, as células íntegras dos fungos marinhos apresentaram as enzimas álcool-desidrogenases e as coenzimas necessárias para produzir, em todos os casos, o (*S*)-2,2,2-trifluoro-1-fenilálcool **1a**. No entanto, observou-se que a redução da cetona **1** ocorreu através de um curso estereoquímico diferente do que ocorre com seus análogos não-fluorados, tal como a acetofenona, representando um produto anti-Prelog (Figura 16).

Figura 16 - Curso estereoquímico da produção de (*S*)-álcool **1a**.

As explicações podem se referir ao volume do grupo trifluorometila, o qual afeta o curso da redução estereoquímica. O grupo trifluorometila pode ser reconhecido pela enzima ADH marinha como um substituinte volumoso. Este fenômeno pode ser compreendido através da comparação do raio dos grupamentos trifluorometila (2,2 Å), grupo fenil (1,62 Å) e grupo metila (1,10 Å) (NAKAMURA 1998).

Os cromatogramas dos padrões e dos resultados obtidos na biorredução da 2,2,2-trifluoro-acetofenona (**1**) estão apresentados nas Figuras 17-18.

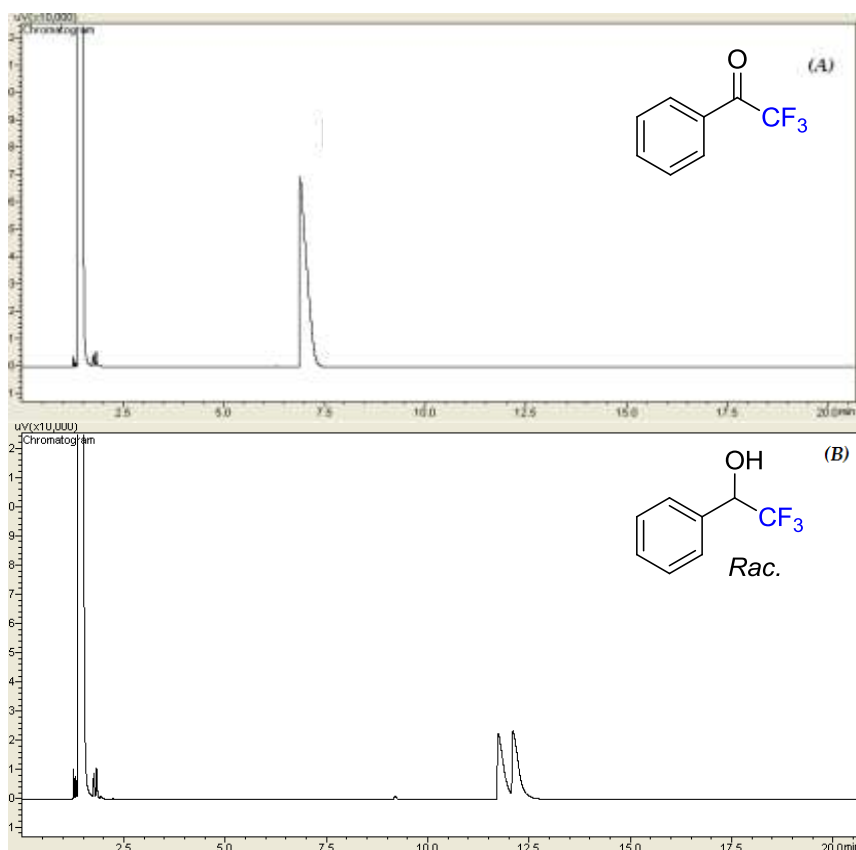
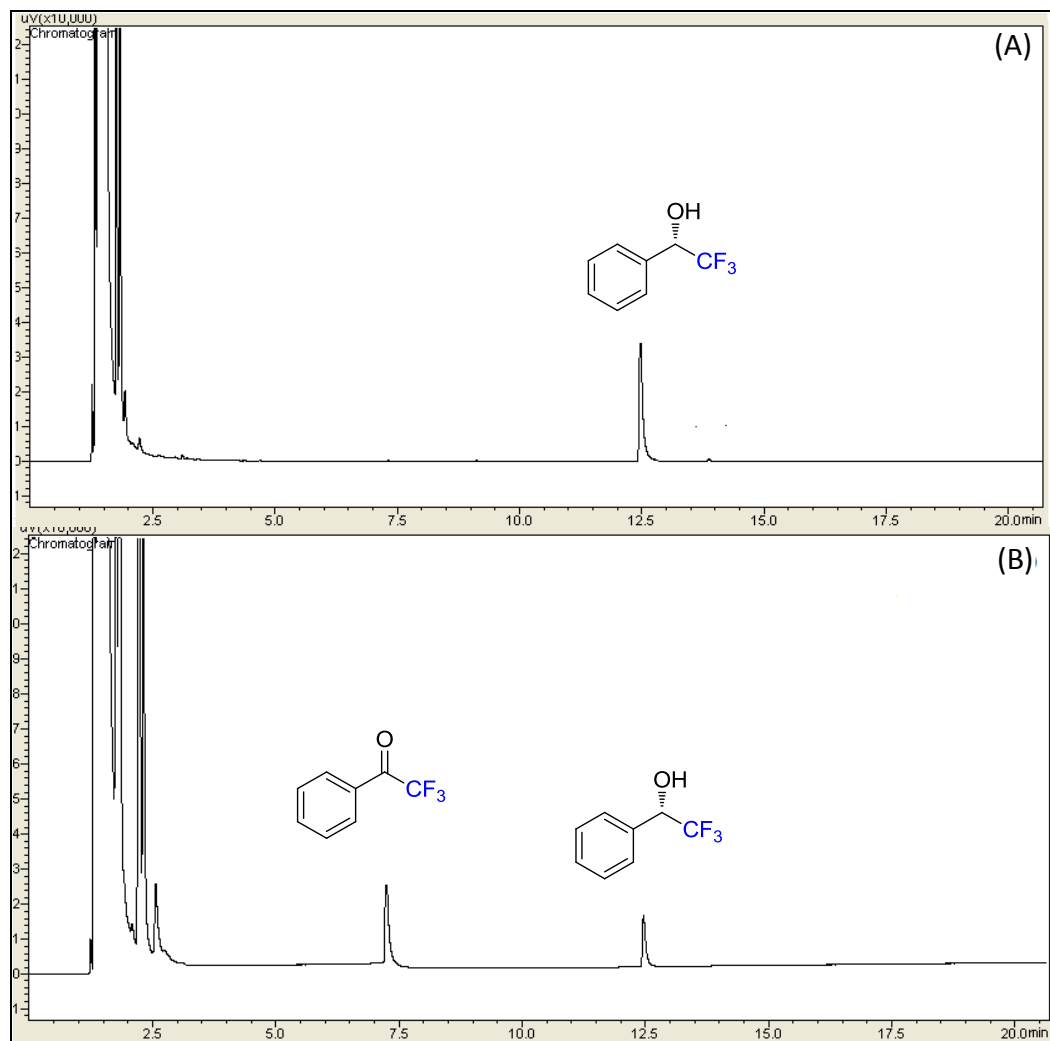
Figura 17 - Cromatogramas obtidos por CG/FID das análises de (A) Padrão da 2,2,2-trifluoro-acetofenona (**1**), (B) Padrão (\pm)-2,2,2-trifluoro-feniletanol (**1a**).

Figura 18 - Cromatogramas obtidos por CG/FID da reação de redução da 2,2,2-trifluoro-acetofenona (1). Reação com (A) fungo *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197, (B) fungo *Eutypella* sp. CBMAI 1196.



4.2.1. Caracterização do produto (*S*)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol (**1a**)

O produto (*S*)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol (**1a**) obtido através da reação de redução com o fungo *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 foi analisado através de ressonância magnética de próton, espectrometria de massas de alta resolução e por espectrometria de absorção na região do infravermelho.

O espectro de RMN ^1H apresentou um sinal singlete referente ao hidrogênio da ligação O-H em δ_{H} 3,26 (s, 1H), um sinal quarteto em δ_{H} 4,97 (q, 1H, $J=20,1$ Hz) e um sinal singlete em δ_{H} 7,46 (s, 5H) referente aos hidrogênios do anel aromático (Figura 19).

O espectro de massas de alta resolução comprovou a formação do produto, pois através do método de ionização positivo foi observado o pico do íon molecular, de m/z 177,0440 cujo valor é corresponde ao produto **1a** (176,0440 g/mol) (Figura 20).

O espectro de absorção na região do infravermelho apresentou uma banda larga e intensa em 3397 cm^{-1} , atribuída as vibrações de deformação axial da ligação O-H. Na região de $1267\text{-}1128\text{ cm}^{-1}$ foram apresentadas bandas referentes à absorção associada as vibrações de deformação angular da ligação C-O, sendo a banda intensa em 1128 cm^{-1} referente ao álcool secundário e uma banda em 706 cm^{-1} , referente a absorção de ligações C-H do anel aromático do produto *S*-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol (**1a**) (Figura 21).

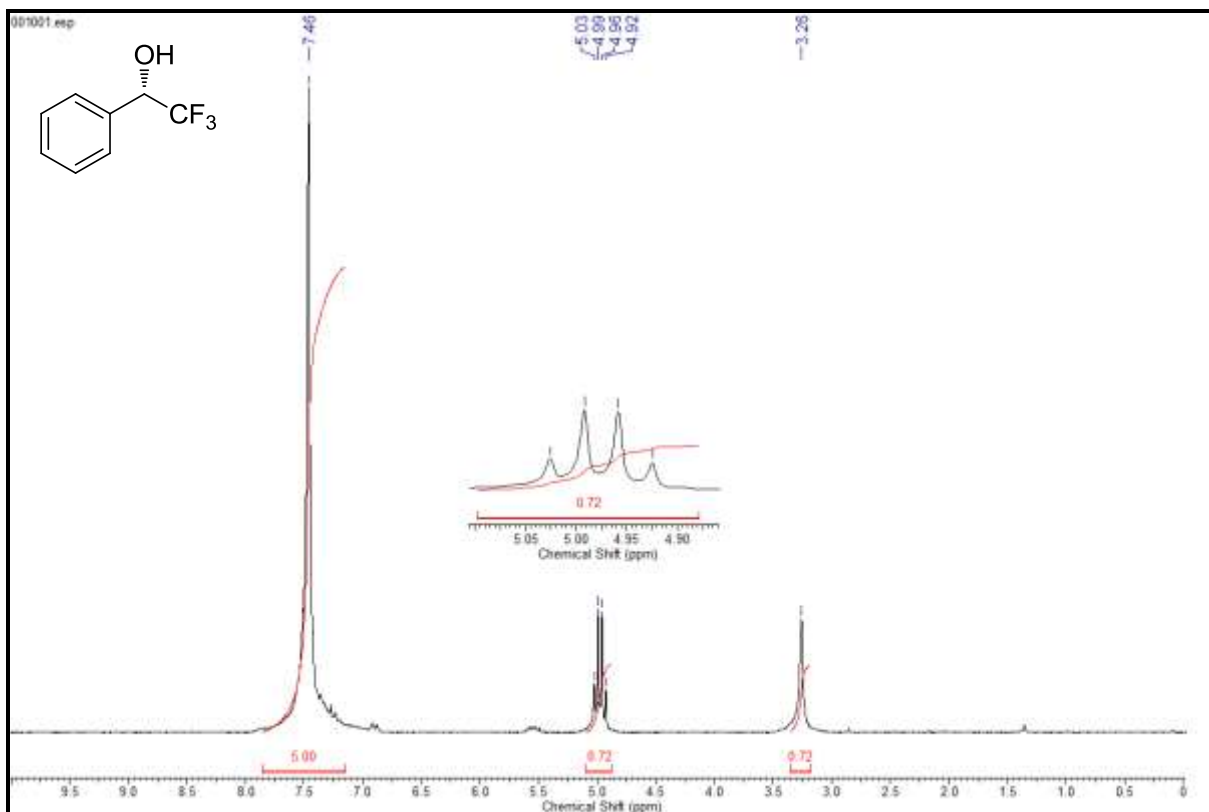
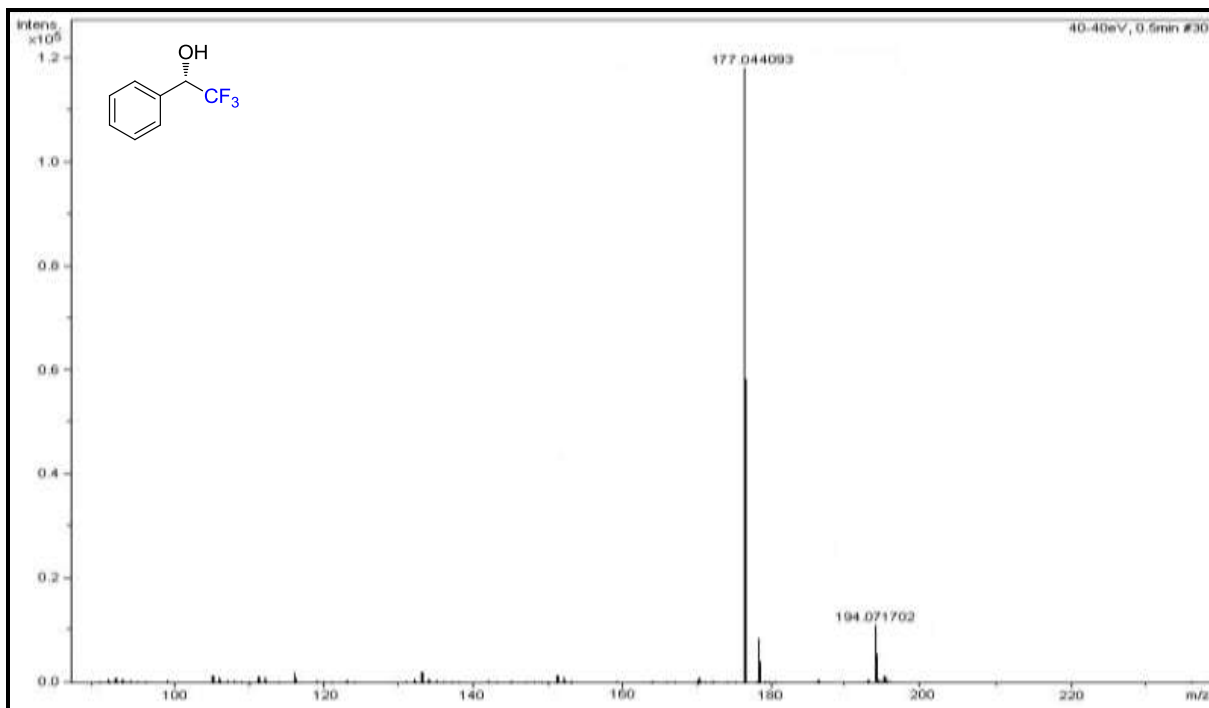
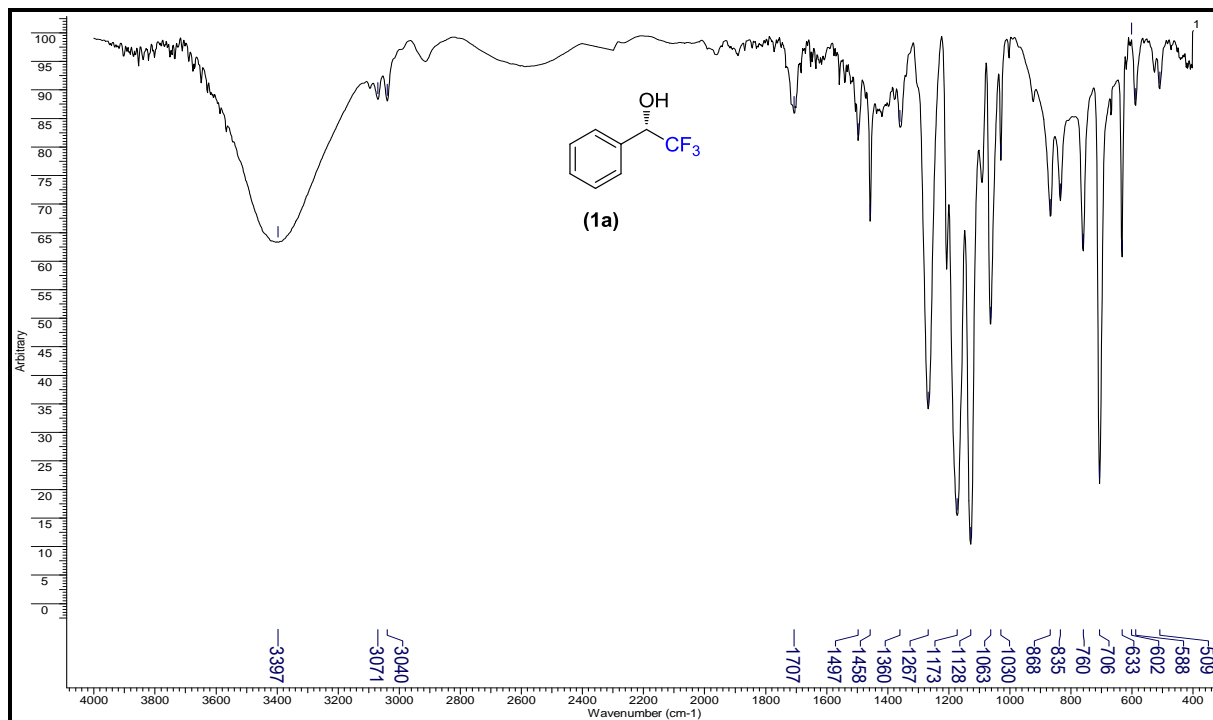
Figura 19 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3) do *S*-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol (**1a**).**Figura 20** - Espectro de massas de alta resolução do (*S*)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol (**1a**).

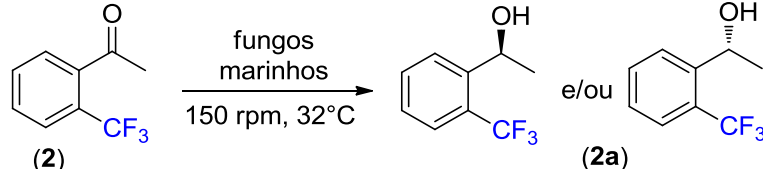
Figura 21 - Espectro de absorção na região do infravermelho do (*S*)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol (**1a**).



4. 3 Reações de redução da 1-(2-(trifluorometil)fenil)etanona (**2**)

A cetona 1-(2-(trifluorometil)fenil)etanona (**2**) foi utilizada como substrato para as reações de redução com os fungos isolados da alga marinha *B. radicans*. As reações foram promovidas em agitador orbital como descrito no procedimento experimental. Após 7 dias foram realizadas as extrações e filtrações reacionais, seguidas das análises por cromatografia em fase gasosa. Os resultados obtidos das biorreduções estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Redução da 1-(2-(trifluorometil)fenil)etanona(**2**) com fungos marinhos isolados da alga *Bostrychia radicans*.^a

			
Tempo (dias)	c (%) cetona	c (%) álcool	ee (%) álcool (ca)
<i>Botryosphaeria</i> sp. CBMAI 1197			
7	54	46	99 (S)
<i>Eutypella</i> sp. CBMAI 1196			
7	84	16	99 (S)
<i>Hidropisphaera</i> sp. CBMAI 1194			
7	60	40	58 (R)
<i>Xylaria</i> sp. CBMAI 1195			
7	98	2	99 (S)

^aCondições reacionais: As reações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura MA2%, 50 mg de cetona dissolvida em 300 µL de DMSO. As reações biocatalisadas foram analisadas por CG/FID após as extrações das reações (7 dias, 130 rpm, 30 °C). c = concentração, c = conversão, ee = excesso enantiomérico. ca = configuração absoluta.

Nas reações com a cetona **2** os melhores biocatalisadores foram os fungos marinhos *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 e *Hidropisphaera* sp. CBMAI 1194, os quais apresentaram enzimas ativas para produzir álcoois quirais antípodos.

A redução da cetona fluorada **2** com o fungo *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 foi seletiva, produzindo apenas o (S)-álcool **2a** com 99% de excesso enantiomérico. A reação ocorreu produzindo o álcool quiral com valor de conversão moderado (46%) e 40% de rendimento isolado.

As enzimas ADHs do fungo *Hidropisphaera* sp. CBMAI 1194 produziram o (R)-álcool **2a**, antípoda, com menor seletividade já que obteve-se um ee de 58%. A conversão

neste caso também foi moderada (40%) com 33% de rendimento isolado. Observou-se neste estudo que os valores de conversões foram similares (46 e 40%) no entanto, a redução com o fungo *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 produziu um único enantiômero, o *S*-álcool **2a** com *ee* >99%, ao passo que a reação com o fungo *Hidropisphaera* sp. CBMAI 1194 formou o antípoda, o *R*-álcool **2a**. Este fato pode ser ocasionado pela presença de diferentes oxidorreduções nas células totais dos fungos marinhos, as quais podem gerar produtos com estereosseletividades opostas (YADAV *et al.* 2008).

Os valores moderados de conversões podem estar relacionados também à presença do grupo trifluorometil na posição *orto*- do anel. Estudos descrevem que substituintes na posição *orto*- em relação ao grupo cetona, podem dificultar sua redução pois a face da carbonila pode estar estericamente impedida pelo substituinte fluorado, o qual apresenta carga parcialmente negativa dificultando a aproximação do íon hidreto (ANDRADE *et al.* 2005).

Em relação às reações com os fungos *Eutypella* sp. CBMAI 1196 e *Xylaria* sp. CBMAI 1195, não foram observados valores significantes nas conversões, demonstrando que nestas condições as enzimas não atuam eficientemente na biorredução do grupo carbonílico. Os cromatogramas da 2-(trifluorometil)-acetofenona (**2**), do álcool racêmico **2a** e das reações de redução com os fungos marinhos *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 e *Hidropisphaera* sp. CBMAI 1194 estão nas Figuras 22-23.

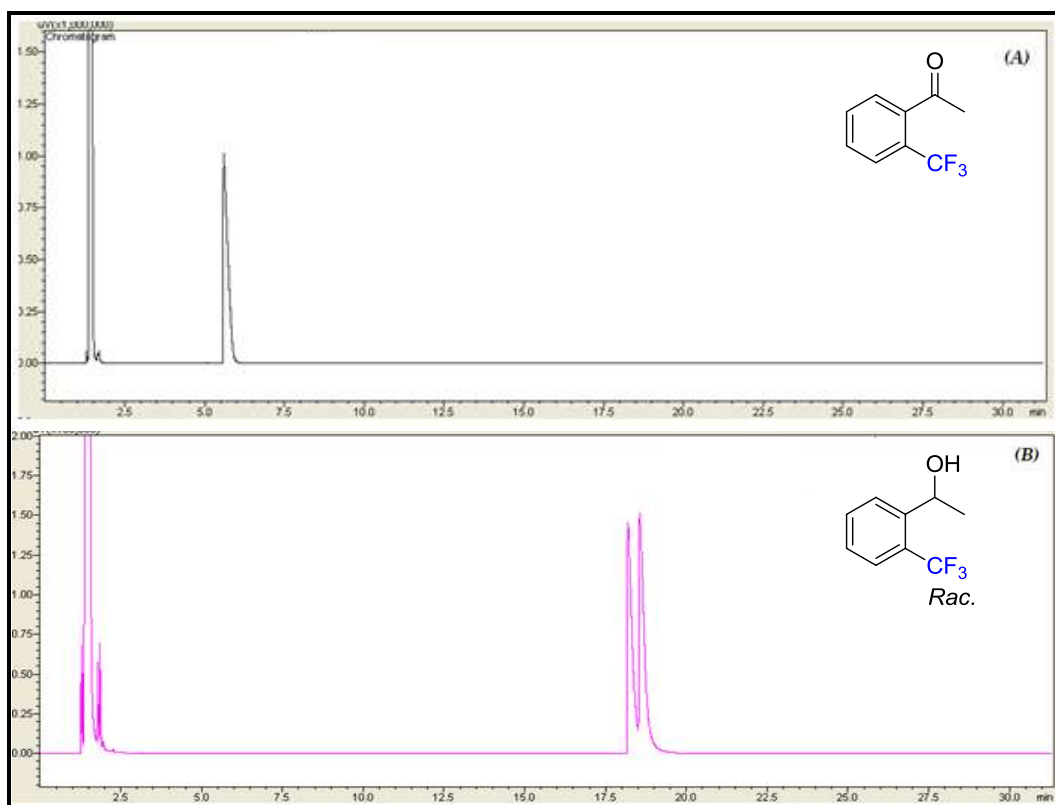
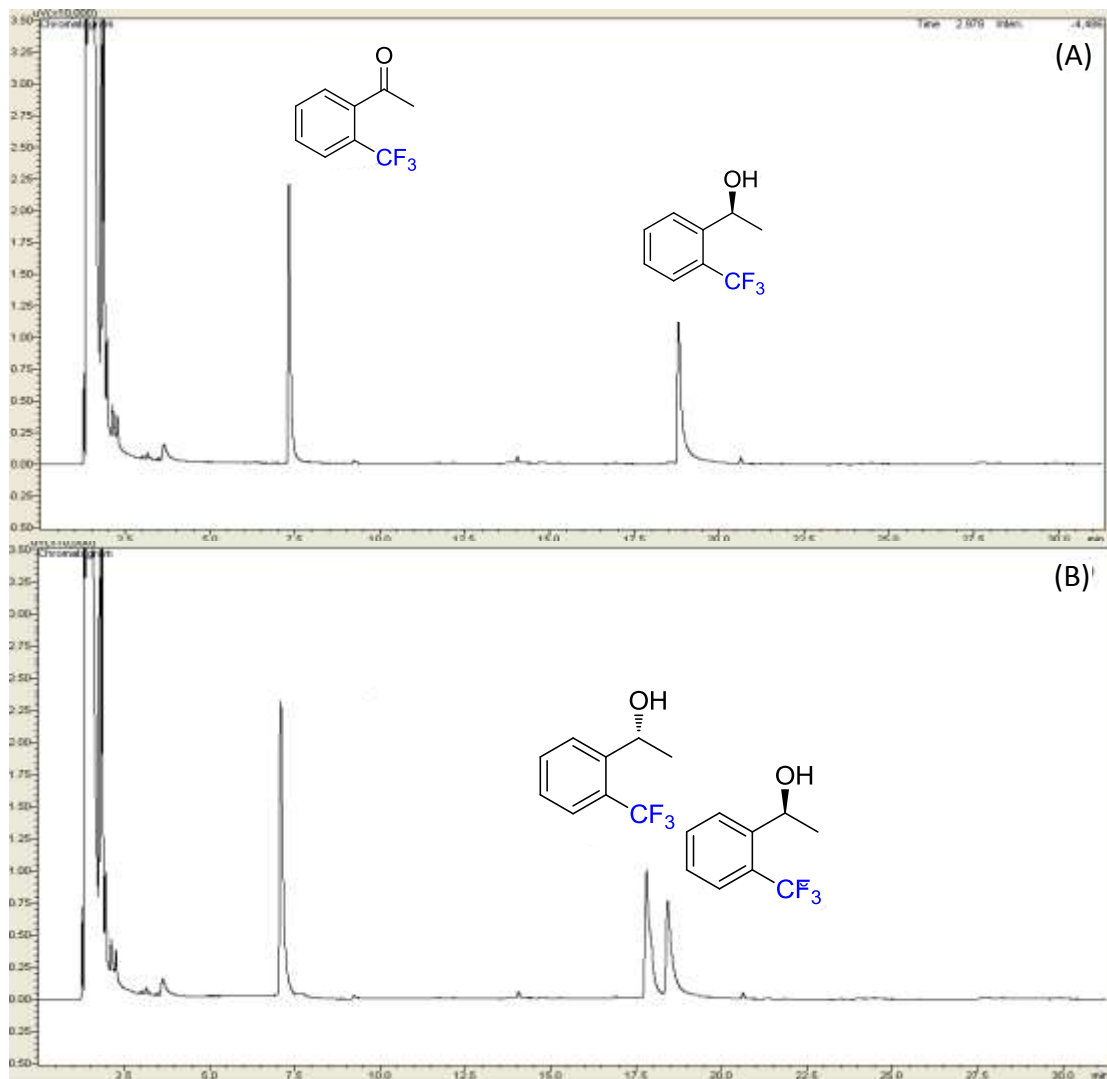
Figura 22 - Cromatogramas obtidos por CG/FID. Padrões da (A) cetona **2** (B) álcool racêmico.

Figura 23 - Cromatogramas obtidos por CG/FID da reação de redução da cetona **2**. Reação com (A) fungo *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 (B) fungo *Hidropisphaera* sp. CBMAI 1194.

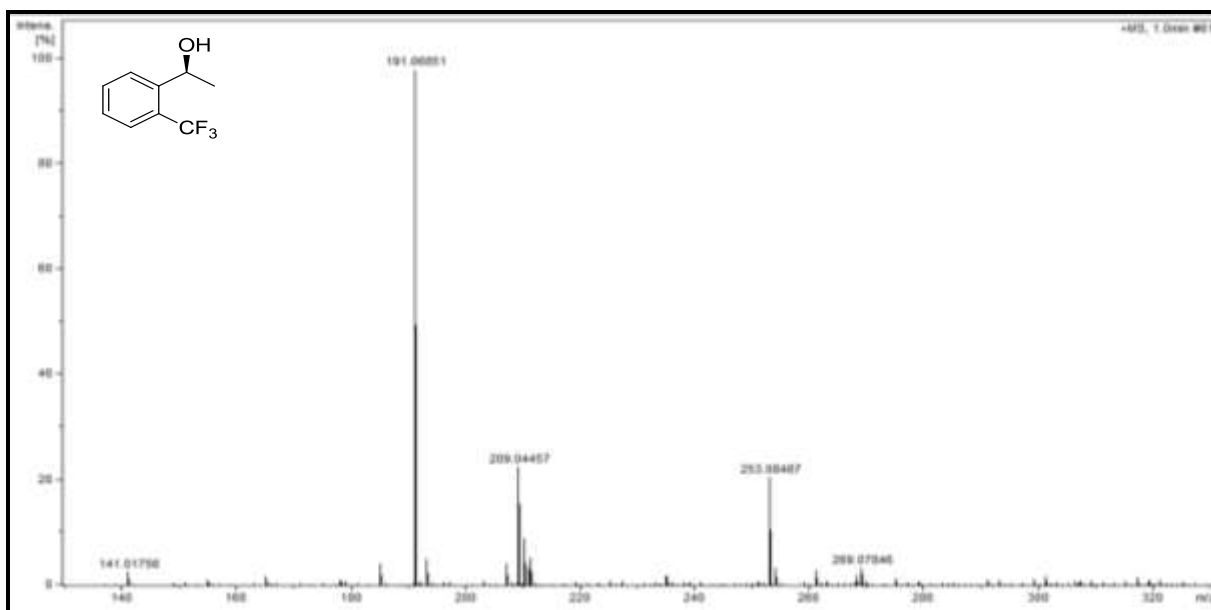
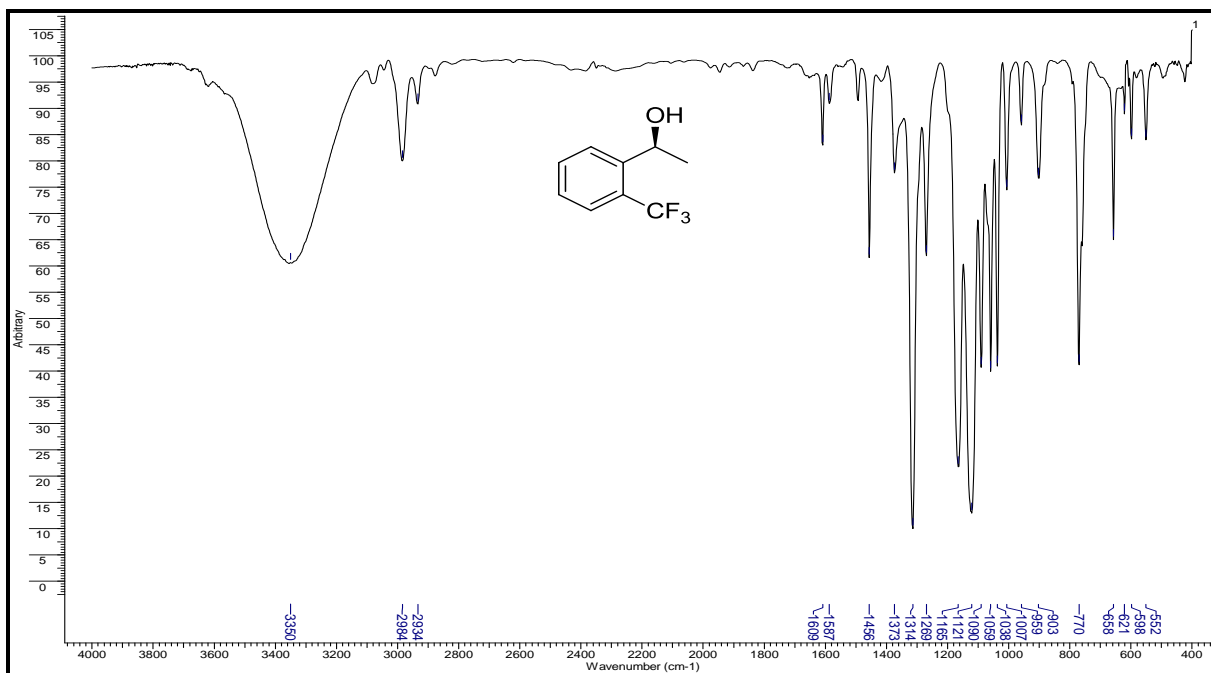


4.3.1. Caracterização do 1-(2-(trifluorometil)fenil)etanol (**2a**)

O 1-(2-(trifluorometil)fenil)etanol (**2a**) obtido através da reação de redução com o fungo *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 foi analisado através espectrometria de massas de alta resolução e por espectrometria de absorção na região do infravermelho. As análises por ressonância magnética do álcool **2a** foram recentemente publicadas na literatura por nosso grupo (RIBEIRO *et al.* 2013).

O espectro de massas de alta resolução confirmou a formação do produto **2a**, pois através do método de ionização positivo foi observado o pico do íon molecular, de massa m/z 191,0685, correspondente a massa molecular do produto (190,0685 g/mol) (Figura 24).

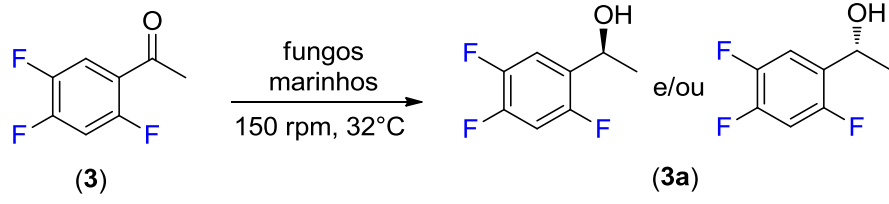
O espectro de absorção na região do infravermelho apresentou uma banda larga e intensa em 3350 cm^{-1} , atribuída a vibrações de deformação axial da ligação O-H. Com grande intensidade, foi observada uma banda em 1314 cm^{-1} , referente a vibrações de deformação angular da ligação entre o carbono e flúor (C-F). Em 1090 cm^{-1} observou-se uma banda atribuída a vibrações de deformação angular da ligação C-O do álcool secundário **2a** e uma banda em 770 cm^{-1} , referente à deformação angular de ligações C-H do anel aromático (Figura 25).

Figura 24 - Espectro de massas de alta resolução do 1-(2-(trifluorometil)fenil)etanol (**2a**).**Figura 25** - Espectro de absorção na região do infravermelho do produto **2a**.

4.4 Reações de redução com 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona (**3**)

Reações de biorredução foram promovidas com a cetona 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona (**3**). As reações foram conduzidas sob agitação orbital, 32°C em meio malte 2%. Após o processo de extração e filtração, foram analisados através de cromatografia em fase gasosa. Os resultados são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Redução da 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona (**3**) com fungos marinhos isolados da alga *Bostrychia radicans*.^a

			
Tempo (dias)	c (%) cetona	c (%) álcool	ee (%) álcool (ca)
<i>Botryosphaeria</i> sp. CBMAI 1197			
7	3	97	99 (R)
<i>Eutypella</i> sp. CBMAI 1196			
7	100	0	-
<i>Hidropisphaera</i> sp. CBMAI 1194			
7	0	100	53 (S)
<i>Xylaria</i> sp. CBMAI 1195			
7	100	0	-

^aCondições reacionais: As reações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura MA2%, 50 mg de cetona dissolvida em 300 µL de DMSO. As reações biocatalisadas foram analisadas por CG/FID após as extrações das reações (7 dias, 130 rpm, 30 °C). c = conversão. c=concentração, ee = excesso enantiomérico. ca = configuração absoluta.

Em estudos realizados em nosso grupo por RIBEIRO *et al.* a cetona **3** foi utilizada como substrato em reações de acetilação enantiosseletiva, empregando a enzima lipase de *Candida antarctica* como biocatalisador. A reação levou a produção do respectivo (S)-álcool (**3a**) com 50% de conversão e ee > 99% (RIBEIRO *et al.* 2013).

No caso deste estudo, as enzimas oxidorredutases presentes no fungo marinho *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 conduziram a formação do (R)-álcool (**3a**), ou seja, o antípoda quiral com 97% de conversão e ee >99% com rendimento isolado de 90%. Provavelmente, o sítio ativo da enzima álcool-desidrogenase e o encaixe do substrato **3** apresentaram maior compatibilidade, favorecendo uma redução altamente seletiva. Desta

forma, o fungo marinho *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 confirmou ser um excelente biocatalisador para produção do álcoois quirais.

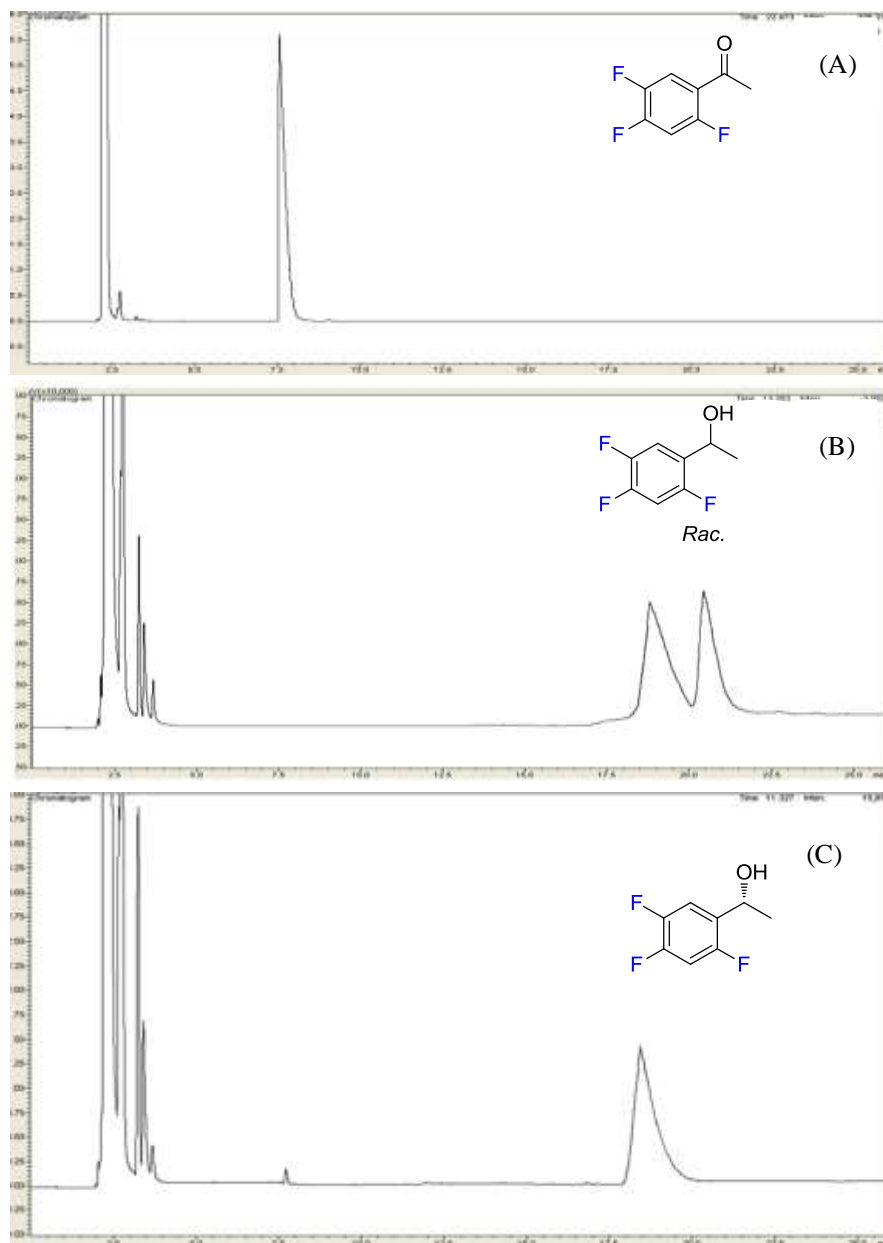
Os estudos realizados com as cetonas **2** e **3** apresentaram resultados similares nas biorreduções. Os fungos *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 e *Hidropisphaera* sp. CBMAI 1194 apresentaram enzimas álcool-desidrogenases ativas de forma significativa. Em relação ao fungo *Hidropisphaera* sp. CBMAI 1194, obteve-se uma conversão total (100%) da cetona **3**, porém com excesso enantiomérico moderado (*ee* 53%) do (*S*)-álcool **3a**.

Nos casos das reações da cetona **3** com os fungos *Eutypella* sp. CBMAI 1196 e *Xylaria* sp. CBMAI 1195 não foi observado um bom desempenho enzimático. Possivelmente, as condições em que as reações foram realizadas não favoreceram a atividade das álcool-desidrogenases presentes nestes fungos.

Um estudo realizado por SOLOSHONOK *et al.* demonstrou que a estereoquímica desta classe de reações é fortemente influenciada pela presença de um ou mais átomos de flúor na molécula do substrato. Em relação aos elevados valores de conversão, a presença de três átomos de flúor deve causar influência eletrônica no substrato, tornando o carbono da carbonila mais susceptível (eletrofílico) a reação de redução pelo íon hidreto da enzima. Como foram observadas neste caso tanto a produção de *S* quanto de *R*-álcoois, o curso estereoquímico da reação foi influenciado pela natureza do biocatalisador e do substrato.

Os cromatogramas obtidos por GC/FID da cetona **3**, do álcool racêmico **3a** e da reação de redução com o fungo marinho *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 são apresentados na Figura 26.

Figura 26 - Cromatogramas obtidos por CG/FID. (A) Padrão da (2,4,5-trifluoro)-trifluorometilacetofenona (**3**). (B) Padrão do álcool racêmico **3a** (C) Reação com o fungo *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 após 7 dias.

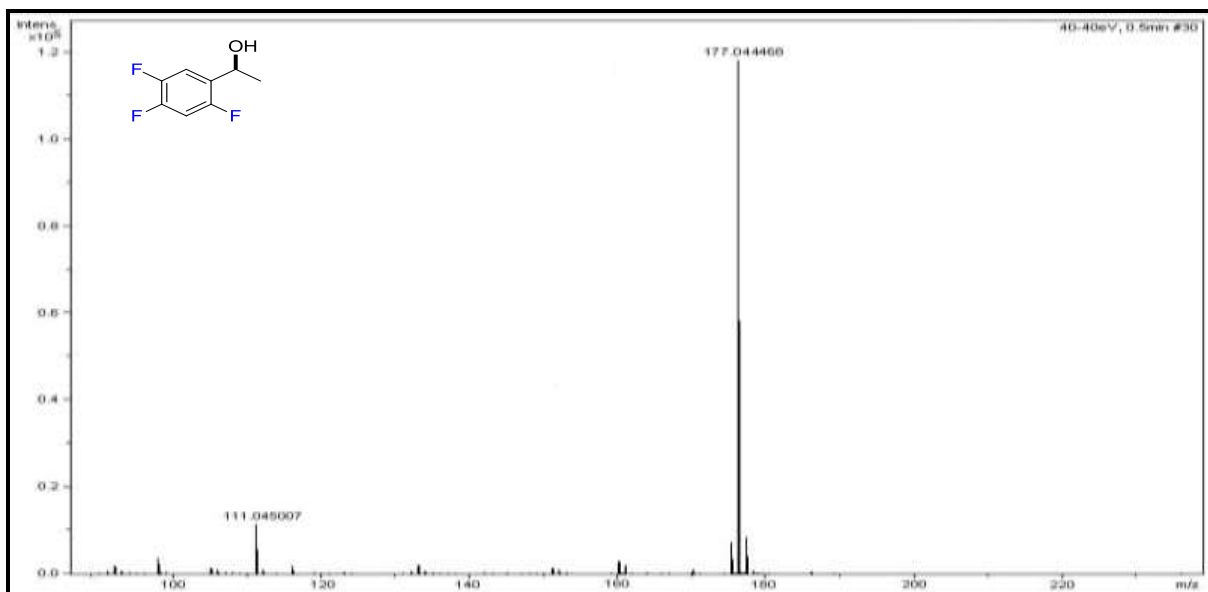
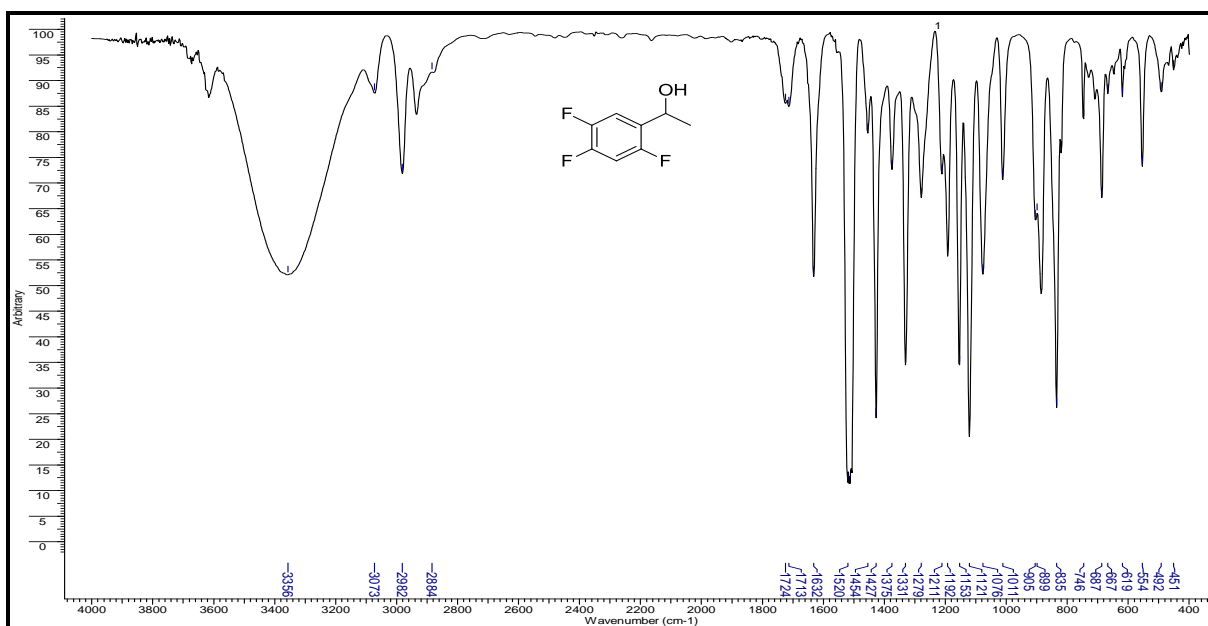


4.4.1. Caracterização do produto 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol (3a)

O produto 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol **3a** obtido através da reação de redução com o fungo *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 foi analisado através espectrometria de massas de alta resolução e por espectrometria de absorção na região do infravermelho. As análises de ressonância magnética do álcool **3a** foram recentemente publicadas na literatura por nosso grupo de pesquisa (RIBEIRO *et al.* 2013).

O espectro de massas de alta resolução confirmou a formação do produto, pois através do método de ionização positivo foi observado o pico do íon molecular de m/z 177,0446, que corresponde a massa molecular do produto (176,0446 g/mol) (Figura 27).

O espectro de absorção na região do infravermelho apresentou as bandas características de vibrações de deformação axial da ligação O-H (3356 cm^{-1}), bandas referentes às vibrações de deformação angular de ligações C-F (1375 e 1331 cm^{-1}), uma banda atribuída a vibrações de deformação angular da ligação C-O do álcool secundário (1121 cm^{-1}) e bandas abaixo de 800 cm^{-1} referentes a ligações C-H do anel aromático (SILVERSTEIN 2006) (Figura 28).

Figura 27 - Espectro de massas de alta resolução do 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol (**3a**).**Figura 28** - Espectro de absorção na região do infravermelho do produto **3a**.

4.5 Medidas de configuração absoluta dos álcoois quirais 1a-3a

As medidas de rotação óptica dos álcoois quirais (*S*)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol (**1a**), (*S*)-1-(2-(trifluorometil)fenil)etanol (**2a**) e (*R*)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol (**3a**) foram determinadas comparando-se os sinais de rotação apresentados pelos produtos com valores encontrados na literatura (Tabela 9).

Tabela 9 - Medidas de rotação óptica dos álcoois **1a-3a**.

álcoois	Rotação óptica experimental $[\alpha]_D^{25}$	Rotação óptica - Literatura $[\alpha]_D^{25}$
(<i>S</i>)- 1a	+16,0 (<i>c</i> 1,7, CHCl ₃ , <i>ee</i> >99%).	+23,5 (<i>c</i> 0,5, CHCl ₃) (Inoue <i>et al.</i> 2005b)
(<i>S</i>)- 2a	-21,0 (<i>c</i> 1,05, CHCl ₃ , <i>ee</i> >99%).	-22,3 (MeOH) (Naemura <i>et al.</i> 1996)
(<i>R</i>)- 3a	+16,0 (<i>c</i> 1,03, CHCl ₃ , <i>ee</i> >99%).	-29,9 (<i>c</i> 0,5, CHCl ₃) (Yu <i>et al.</i> 2011).

c. concentração

4.6 Reações de redução de cetonas fluoradas dicarboniladas

4.6.1 Reação de redução com 4,4,4-trifluoro-1-fenil-1,3-butanodiona (4)

Cetonas fluoradas dicarboniladas foram selecionadas para as biorreduções com o objetivo de avaliar o potencial enantio- e quimiosseletivo de álcool-desidrogenases presentes nos fungos marinhos *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197, *Eutypella* sp. CBMAI 1196, *Hidropisphaera* sp. CBMAI 1194 e *Xylaria* sp. CBMAI 1195.

Através deste estudo, buscou-se avaliar o potencial enzimático frente a dois grupos carbonílicos presentes no mesmo substrato. As reações iniciais foram realizadas com o substrato 4,4,4-trifluoro-1-fenil-1,3-butanodiona (4) seguindo o procedimento experimental. Após 7 dias, as reações foram extraídas e analisadas por cromatografia em fase gasosa. Os resultados estão sumarizados na Tabela 10.

Tabela 10 - Redução da 4,4,4-trifluoro-1-fenil-1,3-butanodiona (4) com fungos marinhos isolados da alga *Bostrychia radicans*.^a

Reaction scheme: 4,4,4-trifluoro-1-phenyl-1,3-butanedione (4) $\xrightarrow[150 \text{ rpm, } 32^\circ\text{C}]{\text{fungos marinhos}}$ 4,4,4-trifluoro-1-phenyl-1,3-butanediol (4a)

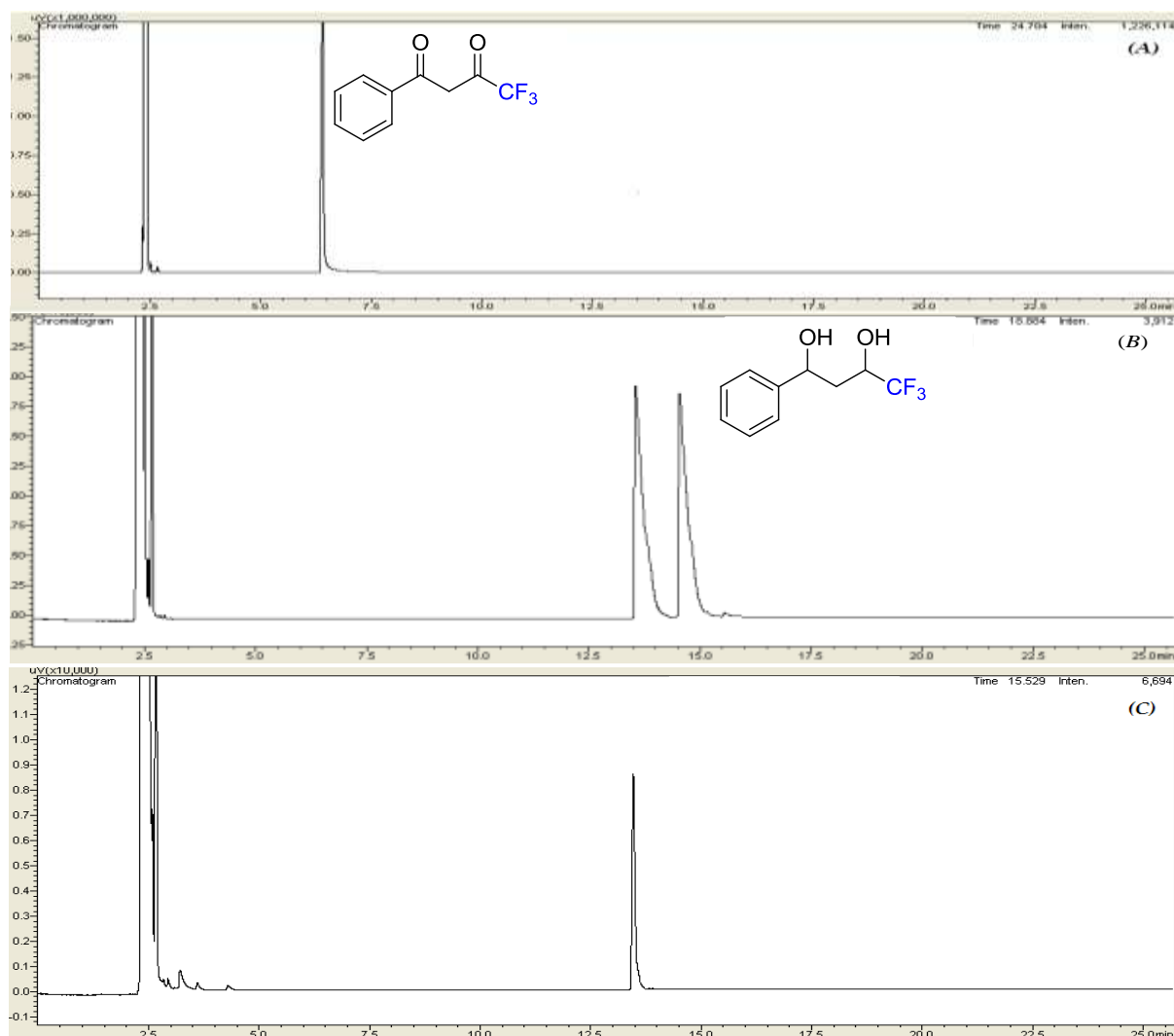
Tempo (dias)	c (%) cetona	c (%) álcool	ee (%) álcool (ca)
<i>Botryosphaeria</i> sp. CBMAI 1197			
7	0	100	99
<i>Eutypella</i> sp. CBMAI 1196			
7	97	3	99
<i>Hidropisphaera</i> sp. CBMAI 1194			
7	-	-	-
<i>Xylaria</i> sp. CBMAI 1195			
7	10	90	99

^aCondições reacionais: As reações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura MA2%, 50 mg de cetona dissolvida em 300 μL de DMSO. As reações biocatalisadas foram analisadas por CG/FID após as extrações das reações (7 dias, 130 rpm, 30 $^\circ\text{C}$). c=concentração. c = conversão. ee = excesso enantiomérico. ca = configuração absoluta.

Os resultados demonstraram que os fungos *Xylaria* sp. CBMAI 1195 e *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 apresentaram enzimas ativas, as quais promoveram a formação dos álcoois quirais com excelentes conversões (90-100%), *ee* >99% e rendimentos respectivos a 73 e 79%.

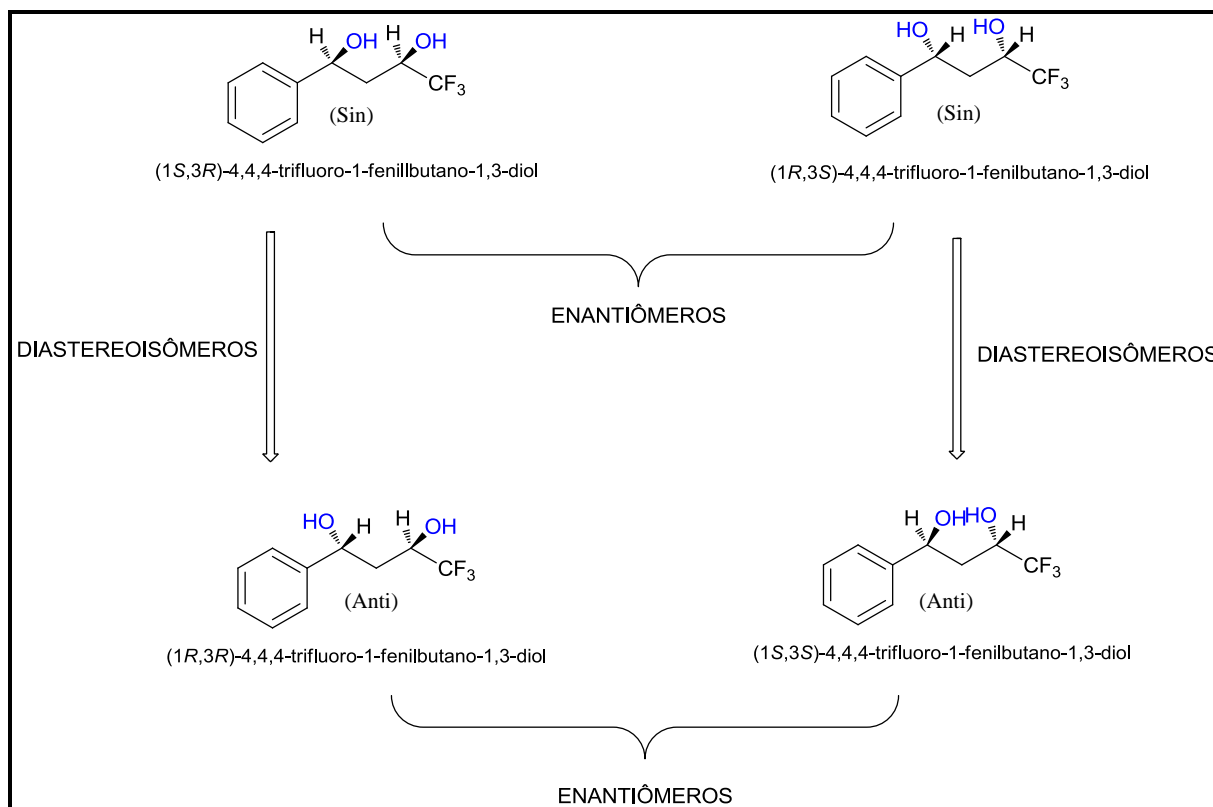
Quanto aos fungos *Eutypella* sp. CBMAI 1196 e *Hidropisphaera* sp. Br-27, não foram observadas reações de redução significantes. Os cromatogramas das análises envolvendo a redução da dicetona **4** estão na Figura 29.

Figura 29 - Cromatogramas obtidos por CG/FID. (A) Padrão da dicetona **4**, (B) Padrão do álcool racêmico **4a**, (C) Reações com fungo *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 após 7 dias.



A redução de ambos os grupos carbonílicos da cetona **4** com os fungos marinhos *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 ou com NaBH_4 pode levar à produção de quatro álcoois quirais **4a** que compõem uma *mistura de enantiômeros e diastereoisômeros*, como demonstrado na Figura 30.

Figura 30 - Possíveis enantiômeros e diastereoisômeros obtidos por redução de ambos grupos carbonílicos da cetona **4** com fungos marinhos.



Quando o padrão químico obtido por redução com NaBH_4 foi analisado por CG-FID foi possível observar apenas dois sinais, que, a princípio, poderiam indicar que ocorreu a separação de diastereoisômeros (*Sin/Anti*) e que no entanto, não ocorreu a separação dos enantiômeros (*Sin/Sin* ou *Anti/Anti*). Todavia, caso houvesse ocorrido a separação de diastereoisômeros, seria possível visualizar um conjunto de sinais de forma mais expressiva que o outro, o que não ocorreu, uma vez que os picos apresentam as mesmas intensidades e áreas.

O padrão químico também foi analisado por RMN ^1H , onde possivelmente a reação de redução promovida pelo NaBH_4 ocorreu primeiramente com a entrada do íon hidreto no carbono da carbonila α em relação ao grupo CF_3 , ou seja, no carbono mais deficiente de elétrons (mais eletrofílico). A entrada do segundo íon hidreto na carbonila adjacente foi então

direcionada pela entrada do primeiro íon hidreto, levando a formação de uma *mistura estereoisomérica* com 4 compostos.

Contudo, dois enantiômeros foram obtidos de forma majoritária devido a esta indução pelo íon hidreto. Portanto pode-se concluir que ocorreu a separação dos enantiômeros do álcool **4a** de apenas um par de diastereoisômeros e que o par de diastereoisômeros minoritário provavelmente não saiu no cromatograma por GC/FID. Através destas análises foi possível sugerir que existe apenas um par de diastereoisômeros (*Sin* ou *Anti*).

Este fato pode ser comprovado através das reações de redução com os fungos marinhos, pois as análises por GC/FID exibiram cromatogramas com apenas um único sinal. No entanto, apenas a análise por GC/FID não possibilitou reconhecer a presença de dois diastereoisômeros. Este reconhecimento foi possível através da análise de RMN ^1H , na qual o espectro apresentou sinais que sugerem a presença de um par de diastereoisômeros (majoritário e minoritário). Estas análises indicam que ocorreu a formação de uma mistura estereoisomérica, confirmando a separação dos enantiômeros de um par de diastereoisômero majoritário por GC/FID. Os espectros de RMN ^1H e de RMN ^{13}C do álcool **4a** obtido pela redução com NaBH_4 e com o fungo marinho *Botryosphaeria* sp. 1197 podem ser observados junto à caracterização destes compostos.

4.6.2 Caracterização do produto 4,4,4-trifluoro-1-fenil-1,3-butanodionol (**4a**)

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do álcool **4a** obtido pela redução com NaBH_4 apresentou os seguintes sinais para o diastereoisômero majoritário: sinais multipletos em δ_{H} entre 1,92-2,10 referentes aos hidrogênios metilênicos (m, 2H), sinais multipletos em δ_{H} 4,17-4,21 (m, 1H) referentes ao hidrogênio ligado aos carbonos na posição α em relação ao grupamento trifluorometila, um singlete largo em δ_{H} 4,63 (sl, 2H) referente aos hidrogênios das hidroxilas e sinais duplos dubletos referentes ao hidrogênio ligado ao carbono na posição γ em relação ao grupamento trifluorometila em δ_{H} 4,95 (dd, $J=2,8$ Hz, $J=9,2$ Hz, 1H). Também foram apresentados sinais multipletos em δ_{H} 7,25-7,33 referentes a hidrogênios do anel aromático (m, 5H).

Em relação ao diastereoisômero minoritário foram observados sinais multipletos em δ_{H} 4,02-4,04 (m, 1H) referentes ao hidrogênio ligado ao carbono na posição α em relação ao grupamento trifluorometila, um singlete largo em δ_{H} 3,6 (sl, 2H) referente aos hidrogênios das hidroxilas e duplos dubletos em δ_{H} 4,82 (dd, $J=4,4$ Hz, $J=9,2$ Hz, 1H) referentes ao hidrogênio ligado ao carbono na posição γ em relação ao grupamento trifluorometila (Figura 31). A

Figura 32 mostra uma expansão da região dos hidrogênios nas posições α e γ em relação ao grupo trifluorometila, demonstrando os diastereoisômeros majoritários e minoritários (Figura 32).

Figura 31 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do álcool **4a** obtido pela redução com NaBH_4 .

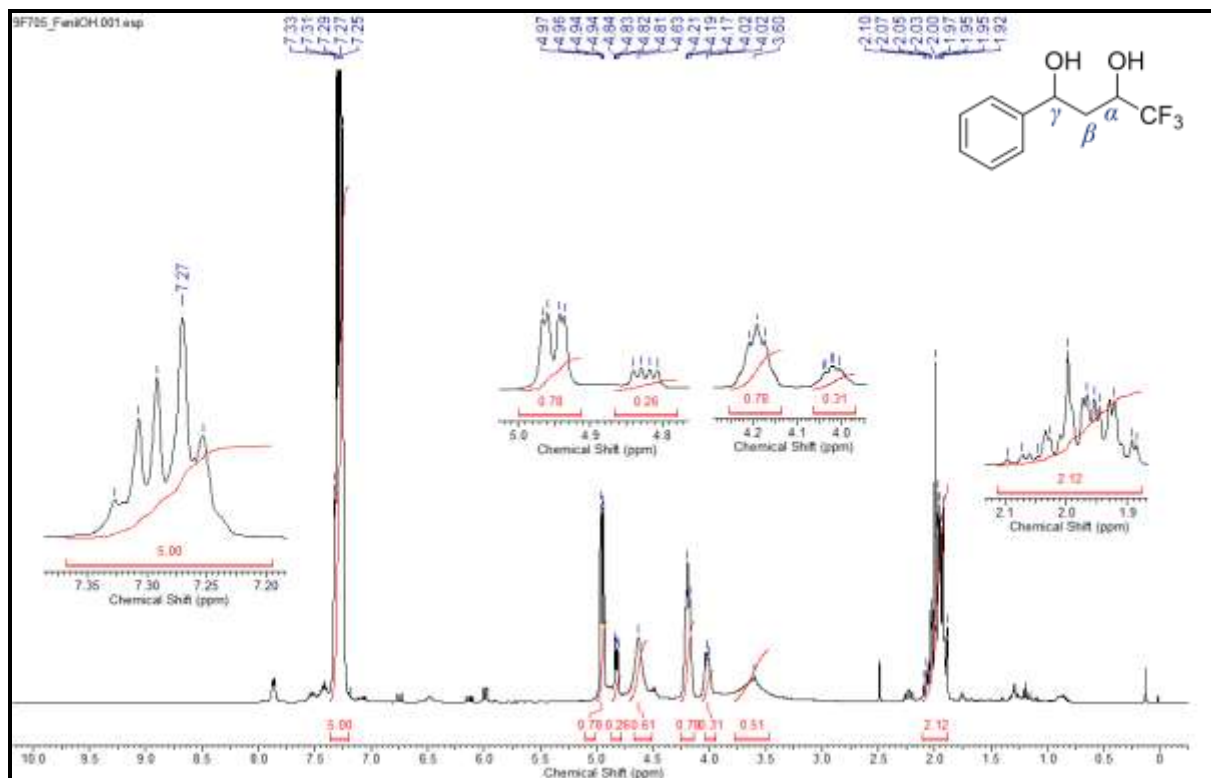
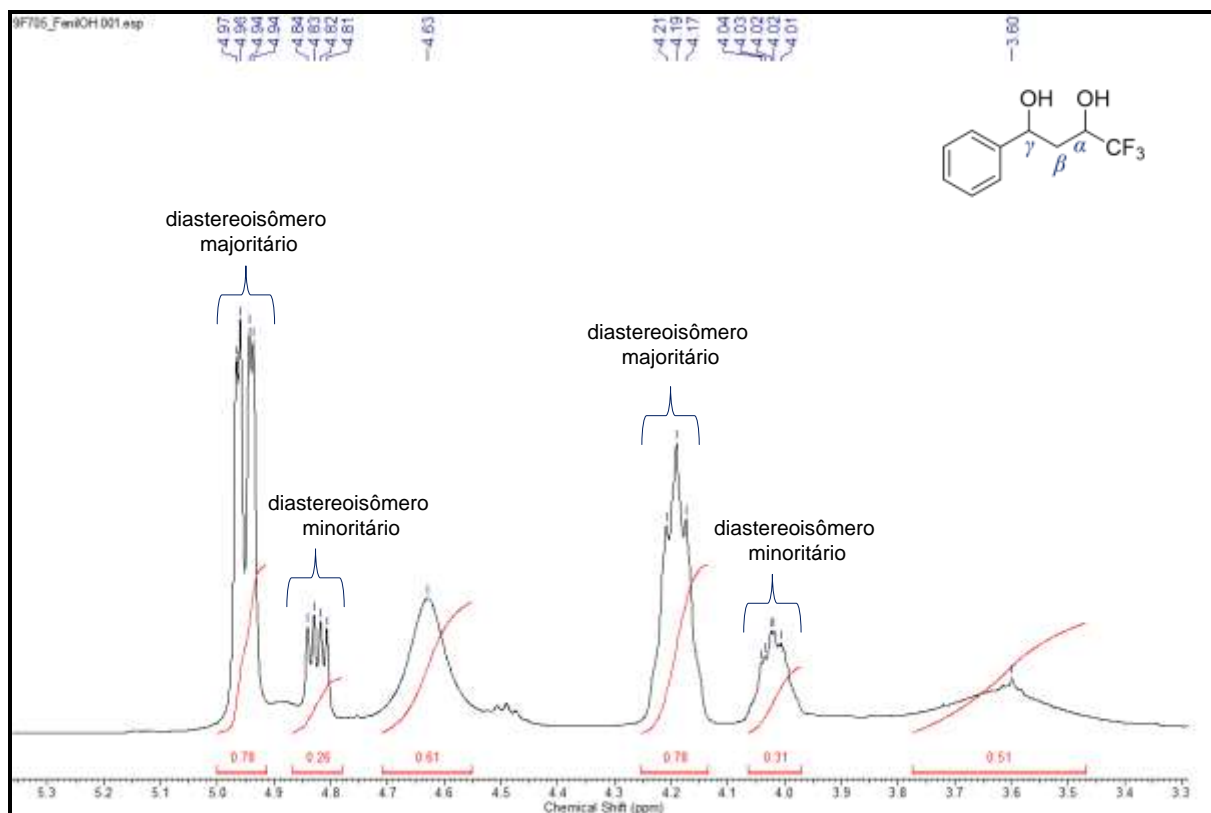


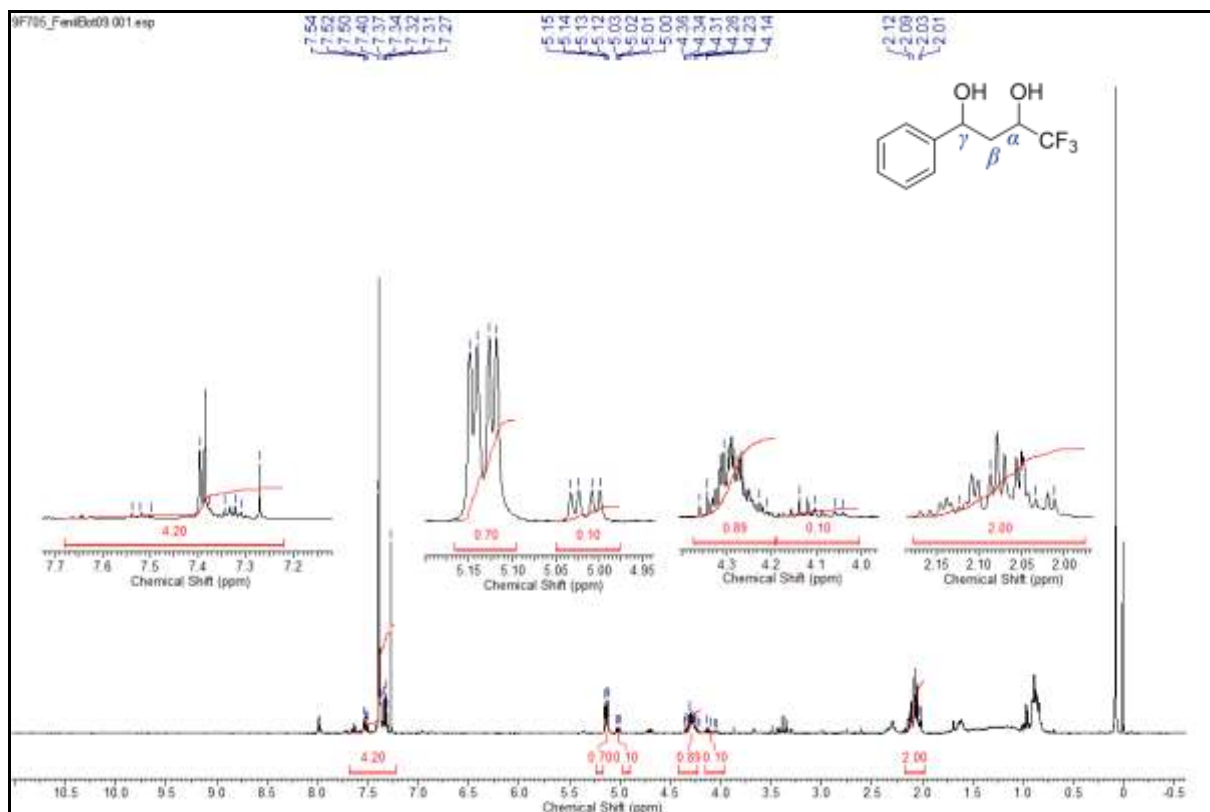
Figura 32 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do álcool **4a** obtido pela redução com NaBH_4 .



Em relação ao espectro de RMN ^1H do álcool **4a** obtido pela redução com o fungo *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 observou-se os seguintes sinais para o diastereoisômero majoritário: sinais multipletos em δ_{H} entre 2,01-2,12 referentes a hidrogênios metilênicos (m, 2H), sinais multipletos referentes ao hidrogênio ligado ao carbono na posições α em relação ao grupamento trifluorometila em δ_{H} 4,21-4,36 (m, 1H) e sinais duplos dubletos em δ_{H} 5,13 referentes ao hidrogênio ligado ao carbono na posição γ em relação ao grupamento trifluorometila (dd, $J=3,4$ Hz, $J=8,9$ Hz, 1H). Também foram apresentados sinais multipletos em δ_{H} 7,31-7,54 referentes a hidrogênios do anel aromático (m, 5H).

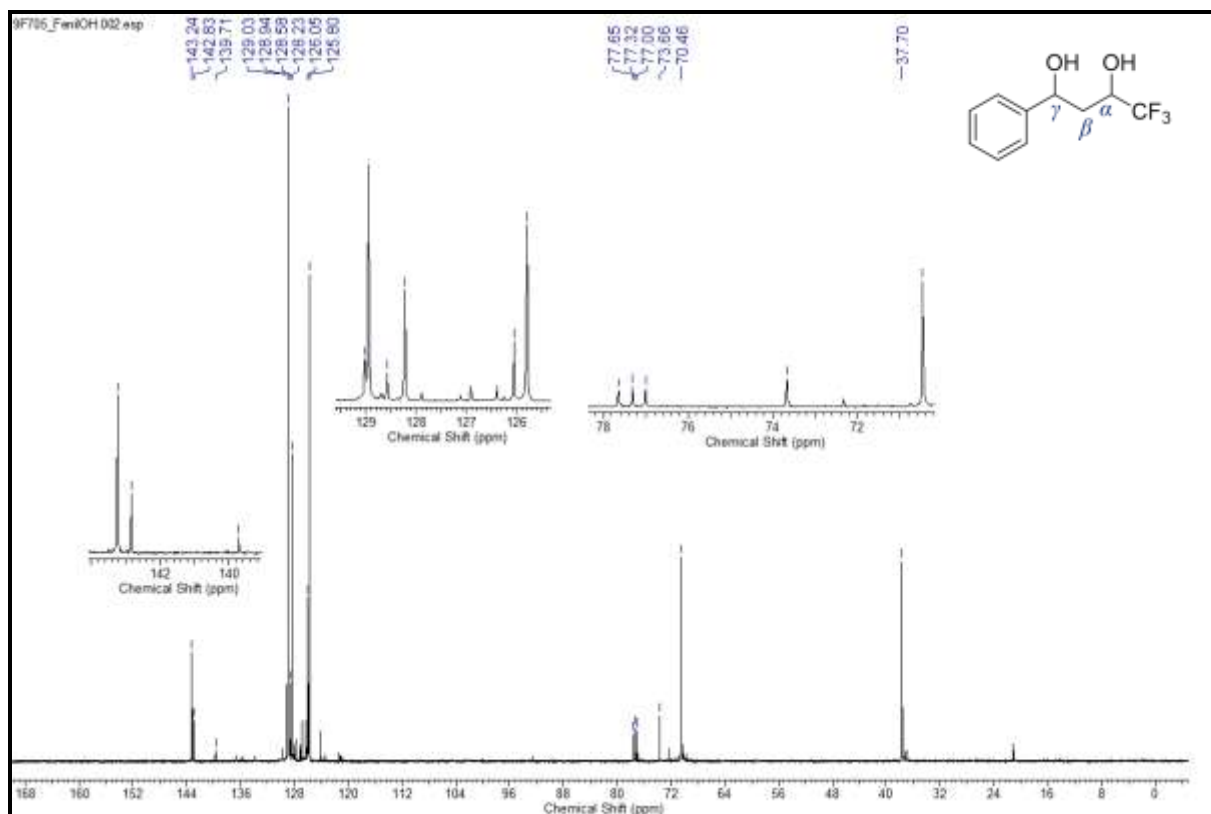
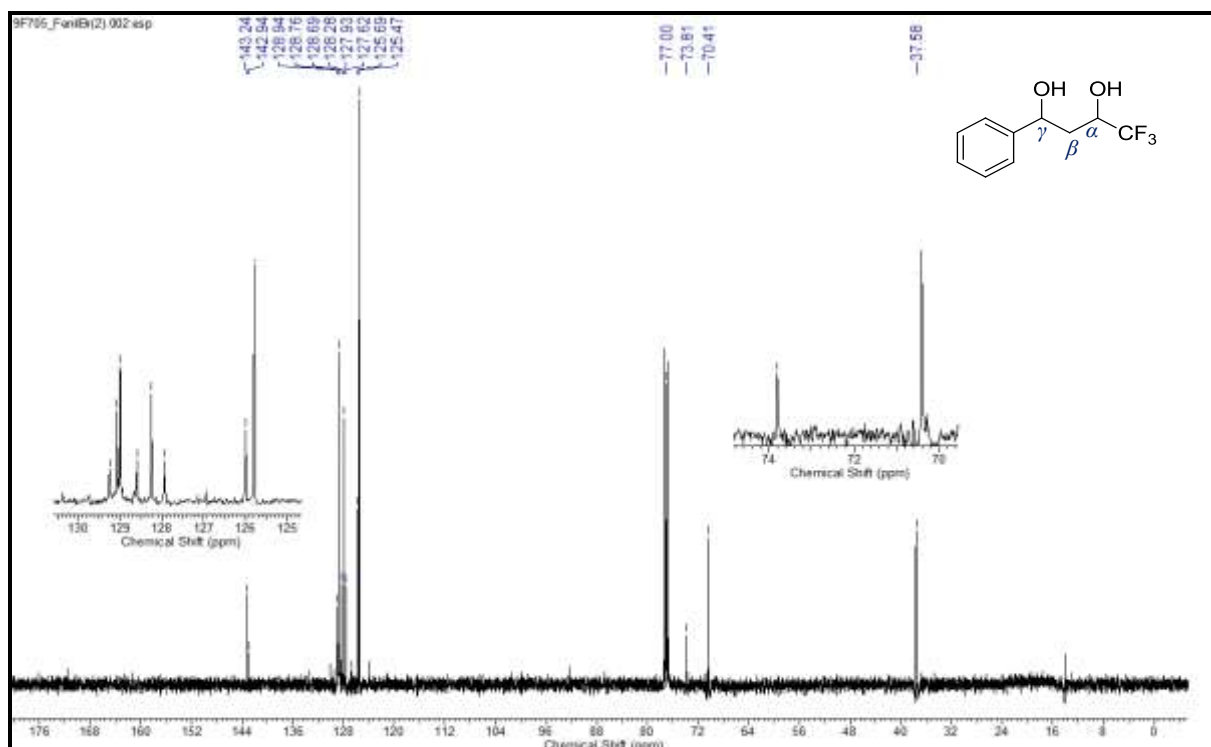
Em relação ao diastereoisômero minoritário foram observados sinais multipletos em δ_{H} 4,10-4,14 (m, 1H) referentes ao hidrogênio ligado ao carbono na posição α em relação ao grupamento trifluorometila e duplos dubletos em δ_{H} 4,86 referentes ao hidrogênio ligado ao carbono na posição γ em relação ao grupamento trifluorometila (d, $J=3,7$ Hz, $J=9,5$ Hz, 1H) (Figura 33).

Figura 33 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do álcool **4a** obtido pela redução com fungo *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197.



O espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do álcool **4a** obtido pela redução com NaBH_4 apresentou uma linha espectral referente ao carbono metilênico (δ 37,7) uma linha espectral referente ao carbono γ em relação ao grupamento trifluorometila (δ 70,4), uma linha espectral referente ao carbono α em relação ao grupamento trifluorometila (δ 73,6), cinco linhas espectrais referentes a carbonos do anel aromático (δ 125,8; 126,0; 128,2; 128,5; 128,6; 128,9), uma linha espectral referente ao carbono sp^2 do anel aromático (δ 139,7) e uma linha espectral referente ao carbono do grupamento trifluorometila (δ 143,2). Outros sinais espectrais sugerem a presença do diastereoisômero minoritário. Entretanto, estas análises não são conclusivas para a caracterização completa dos diastereoisômeros (Figura 34).

O espectro de RMN ^{13}C do álcool **4a** obtido pela redução com o fungo *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 apresentou uma linha espectral referente ao carbono metilênico (δ 37,6) uma linha espectral referente ao carbono γ em relação ao grupamento trifluorometila (δ 70,4), uma linha espectral referente ao carbono α em relação ao grupamento trifluorometila (δ 73,8), cinco linhas espectrais referentes a carbonos do anel aromático (δ 125,4; 125,7; 127,6; 127,9; 128,3) bem como uma linha espectral referente ao carbono do grupamento trifluorometila (δ 143,2) (Figura 36).

Figura 34 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do álcool **4a** obtido pela redução com NaBH_4 .**Figura 35** - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do álcool **4a** obtido pela redução com fungo *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197.

A análise espectral de massas de alta resolução do composto obtido pela reação com o fungo *Botryosphaeria* sp. 1197 apresentou o pico do íon molecular m/z no valor de 221,0722, correspondente ao composto **4a** (220,0722g/mol) (Figura 36).

O espectro de absorção na região do infravermelho do composto **4a** apresentou as bandas características das vibrações de deformação axial das ligações O-H (3401 cm^{-1}), bandas referentes às vibrações de deformação angular das ligações C-F (1267 cm^{-1}), uma banda atribuída a vibrações de deformação angular de ligações C-O dos álcoois secundários ($1167\text{-}1119\text{ cm}^{-1}$) e uma banda em 700 cm^{-1} referentes a ligações C-H do anel aromático (SILVERSTEIN, 2006) (Figura 37).

Figura 36 - Espectro de massas de alta resolução do 4,4,4-trifluoro-1-fenil-1,3-butanodionol (**4a**).

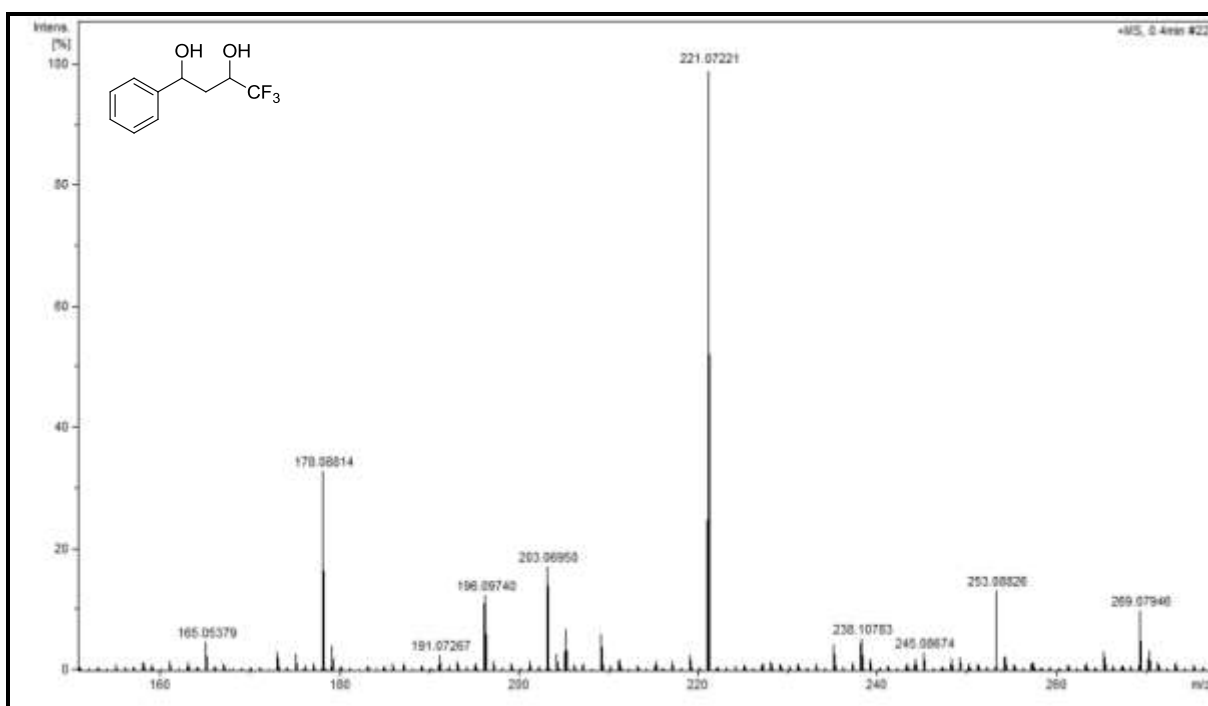
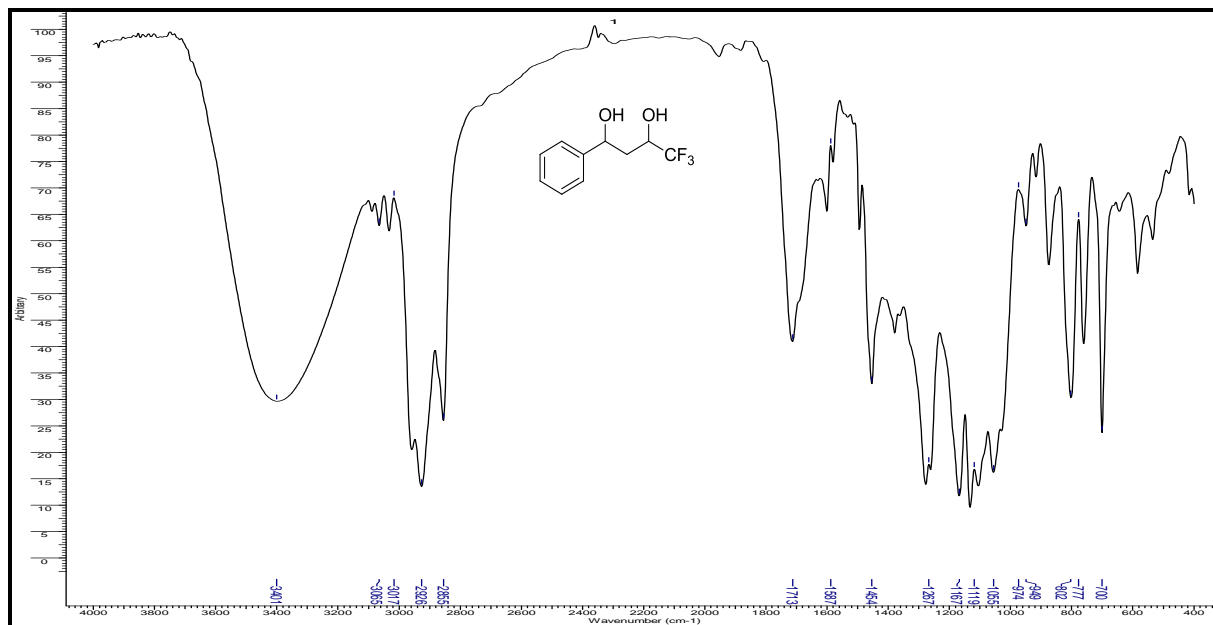


Figura 37 - Espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}) do diol **4a**.

4.7 Reação de redução com 4,4,4-trifluoro-1-(2-naftil)-1,3-butanodiona (5)

Uma triagem também foi promovida com o composto 4,4,4-trifluoro-1-(2-naftil)-1,3-butanodiona (5) seguindo o procedimento experimental. Após 7 dias, as reações foram extraídas e analisadas por cromatografia em fase gasosa. No caso de reações de redução da dicetona 5, todos os fungos apresentaram excelente potencial biocatalítico (Tabela 11).

Tabela 11 - Redução da 4,4,4-trifluoro-1-(2-naftil)-1,3-butanodiona (5) com fungos marinhos isolados da alga *Bostrychia radicans*.^a

CC(=O)CC(=O)C1=CC=C2C=CC=CC2=C1.CF3
 $\xrightarrow[150\text{ rpm, }32^\circ\text{C}]{\text{fungos marinhos}}$
CC(O)CC(O)C1=CC=C2C=CC=CC2=C1.CF3

Tempo (dias)	c (%) cetona	c (%) álcool	ee (%) álcool (ca)
<i>Botryosphaeria</i> sp. CBMAI 1197			
7	5	95	99
<i>Eutypella</i> sp. CBMAI 1196			
7	8	92	99
<i>Hidropisphaera</i> sp. CBMAI 1194			
7	5	95	99
<i>Xylaria</i> sp. CBMAI 1195			
7	0	100	99

^aCondições reacionais: As reações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura MA2%, 50 mg de cetona dissolvida em 300 μ L de DMSO. As reações biocatalisadas foram analisadas por CG/FID após as extrações das reações (7 dias, 130 rpm, 30 °C). c = concentração. c = conversão. ee = excesso enantiomérico. ca = configuração absoluta.

Neste estudo, todos os fungos marinhos apresentaram enzimas ADHs ativas, as quais produziram o álcool quiral 5a com conversões superiores a 92% e excessos enantioméricos elevados (ee >99%). Os cromatogramas das análises envolvendo a redução da dicetona 5 estão nas Figuras 38 e 39.

Figura 38 - Cromatogramas obtidos por CG/FID. **(A)** Padrão da dicetona **5**. **(B)** Padrão do álcool racêmico **5a**.

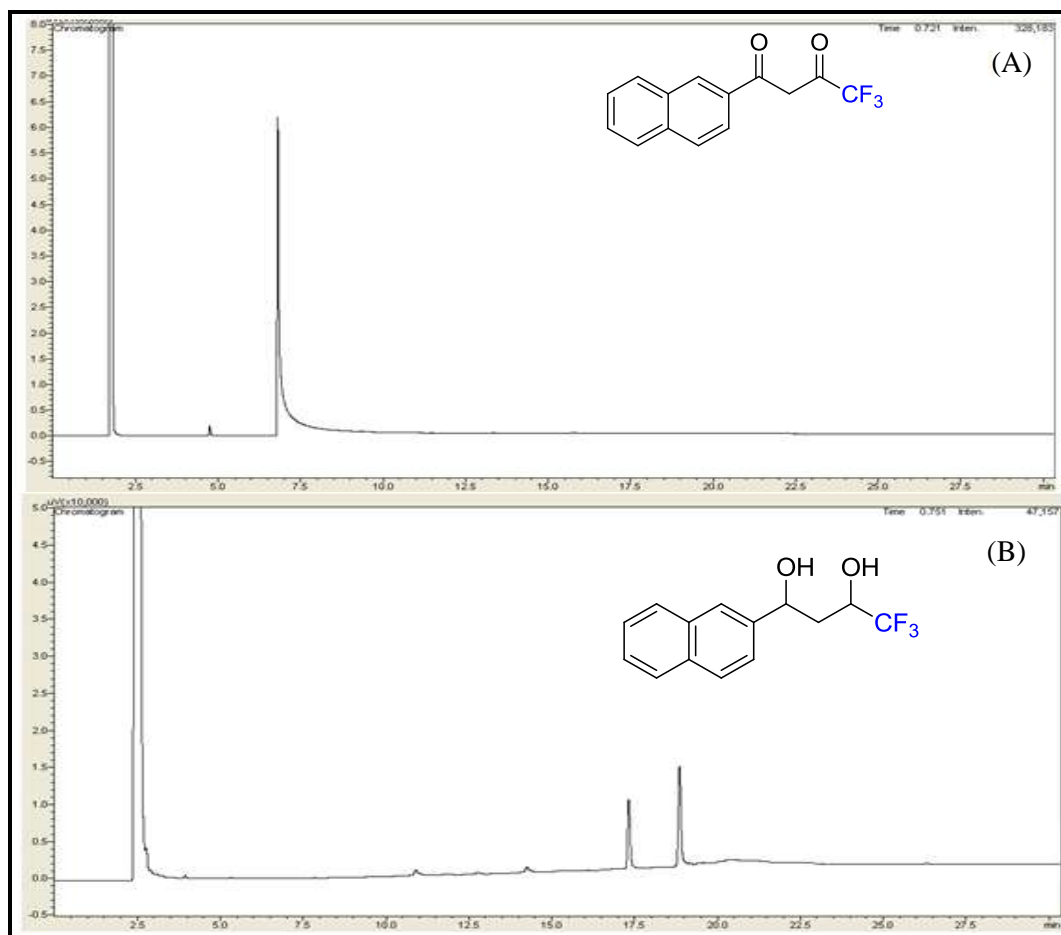
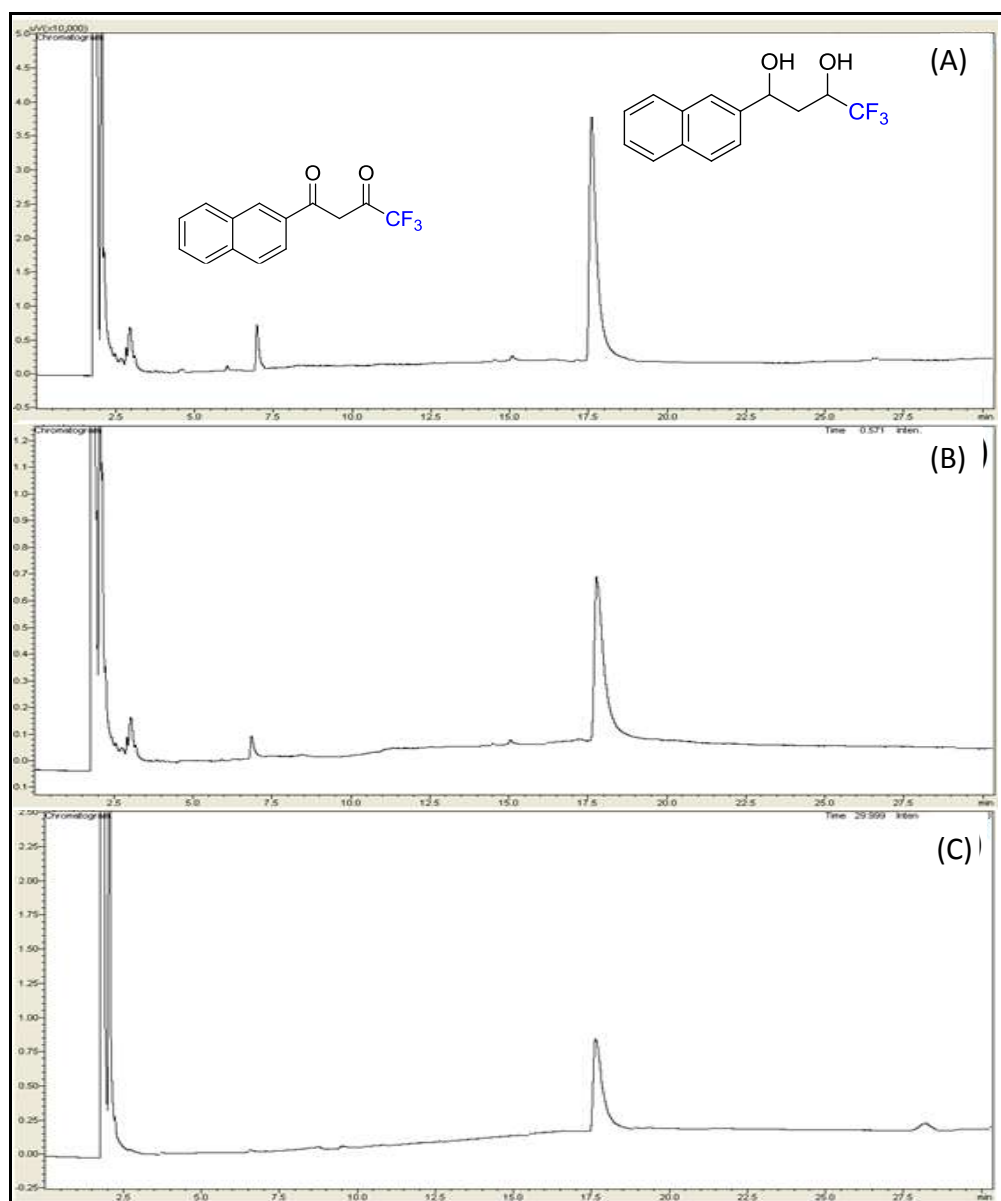
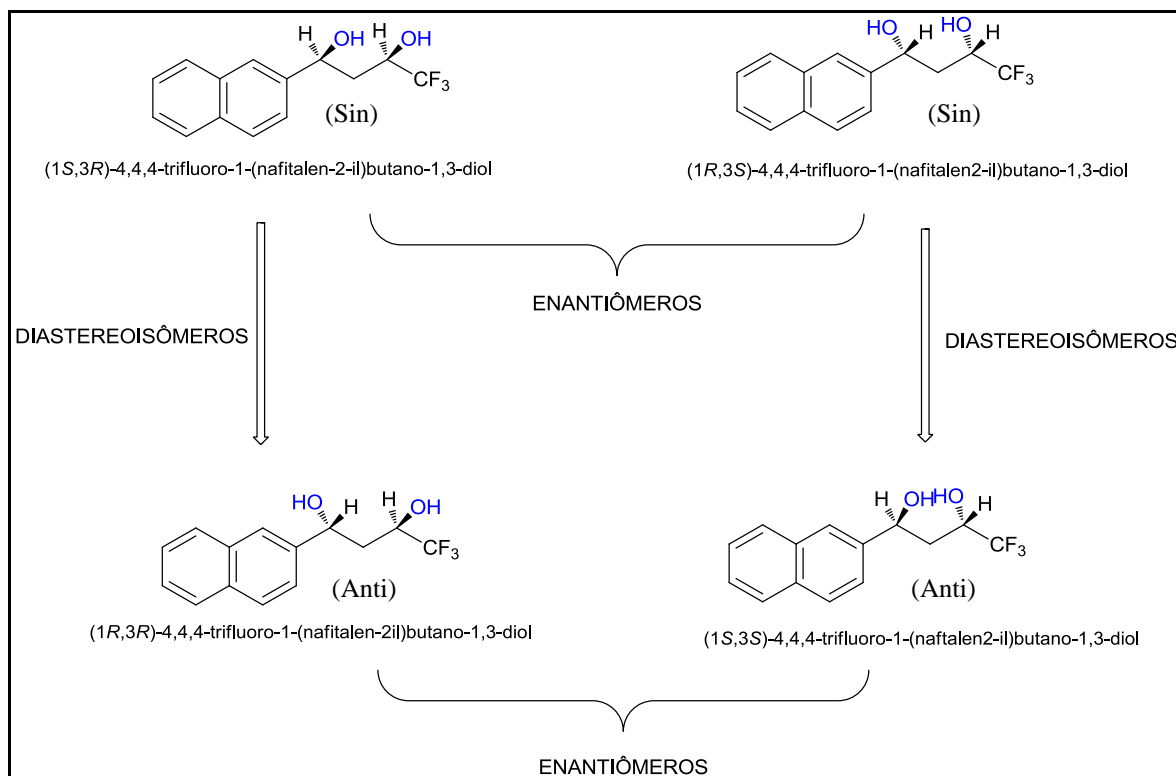


Figura 39 - Cromatogramas obtidos por CG/FID da reação de redução da dicetona **5**. Reação com (A) fungo *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 após 7 dias, (B) fungo *Eutypella* sp. CBMAI 1196 após 7 dias, (C) fungo *Xylaria* sp. CBMAI 1195 após 7 dias.



Os cromatogramas do álcool **5a** obtidos pela redução com NaBH_4 e com os fungos marinhos apresentaram perfil similar aos obtidos com a cetona **4a**, onde foi possível observar a presença de apenas um pico, relativo ao produto obtido por redução com os fungos marinhos. A redução da cetona **5** com fungos marinhos também pode levar a produção de uma *mistura de enantiômeros e diastereoisômeros*, como demonstrado na Figura 40.

Figura 40 - Possíveis enantiômeros e diastereoisômeros obtidos por redução com fungos marinhos.



Quando o padrão químico obtido por redução com NaBH_4 foi analisado por CG-FID, observou-se apenas dois sinais, indicando a separação de diastereoisômeros. No entanto, os dois sinais foram obtidos com intensidades e áreas aproximadas, indicando a separação apenas dos enantiômeros.

Através das análises realizadas por RMN ^1H foi possível observar que na reação de redução promovida pelo NaBH_4 , a entrada do íon hidreto também ocorreu inicialmente no carbono da carbonila α em relação ao grupo CF_3 e que a entrada do segundo íon hidreto na carbonila adjacente foi direcionada pela entrada do primeiro íon hidreto, levando a formação de uma mistura estereoisomérica com os 4 compostos.

Da mesma forma, dois enantiômeros também foram obtidos de forma majoritária devido a esta indução. Portanto pode-se concluir que ocorreu a apenas separação dos enantiômeros do álcool **5a** através da análise em GC/FID. Provavelmente não foi detectada a

presença do diastereoisômero minoritário por GC/FID. Este fato pode ser observado através das reações de redução, pois os cromatogramas dos fungos marinhos exibem apenas um sinal, indicando a separação apenas de um enantiômero. No entanto, através da análise de RMN ^1H , foi possível reconhecer sinais de outro diastereoisômero. Os espectros de RMN ^1H do álcool **5a** obtido pela redução com NaBH_4 e com o fungo marinho *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 podem ser observados junto à caracterização destes compostos.

4.7.1 Caracterização 4,4,4-trifluoro-1-(2-naftil)-1,3-butanodiona (**5a**)

Em relação ao espectro de RMN ^1H do álcool **5a** obtido pela redução com o NaBH_4 observou-se sinais multipletos em δ_{H} entre 1,86-2,19 referentes a hidrogênios metilênicos (m, 2H), sinais multipletos em δ_{H} 4,29-4,37 referentes ao hidrogênio ligado ao carbono na posição α em relação ao grupamento trifluorometila (m, 1H), um sinal singlete largo em δ_{H} 4,57 referente ao hidrogênio hidroxílico (sl, 1H) e sinais dubletos referentes ao hidrogênio ligado ao carbono na posição γ em relação ao grupamento trifluorometila [δ_{H} 5,02 (d, $J=10,6$ Hz, 1H), δ_{H} 5,07 (d, $J=10,6$ Hz, 1H)]. Os sinais em δ_{H} 5,02 e δ_{H} 5,07 não foram bem resolvidos, o que corresponde a um duplo dubleto. Também foram observados sinais multipletos em δ_{H} 7,45-7,57 (m, 3H) e δ_{H} 7,83-8,04 (m, 3H) referentes a hidrogênios dos dois anéis aromáticos (Figura 41).

Em relação ao espectro de RMN ^1H do álcool **5a** obtido pela redução com o fungo *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 observou-se sinais multipletos em δ_{H} entre 1,86-2,09 referentes a hidrogênios metilênicos (m, 2H), sinais multipletos em δ_{H} 4,31-4,35 referentes a hidrogênio na posição α em relação ao grupamento trifluorometila (m, 1H), bem como os sinais dubletos referentes ao hidrogênio ligado ao carbono na posição γ em relação ao grupamento trifluorometila [δ_{H} 5,02 (d, $J=10,1$ Hz, 1H), δ_{H} 5,08 (d, $J=10,3$ Hz, 1H)]. Os sinais em δ_{H} 5,02 e δ_{H} 5,08 não foram bem resolvidos, o que corresponde na realidade a um duplo dubleto. Também foram observados sinais multipletos em δ_{H} 7,45-7,49 (m, 3H) e δ_{H} 7,83-7,90 (m, 3H) referentes a hidrogênios dos dois anéis aromáticos (Figura 42).

Figura 41 - Espectro de RMN ¹H (500 MHz, MeOD₄) do diol **5a** obtido por redução com NaBH₄.

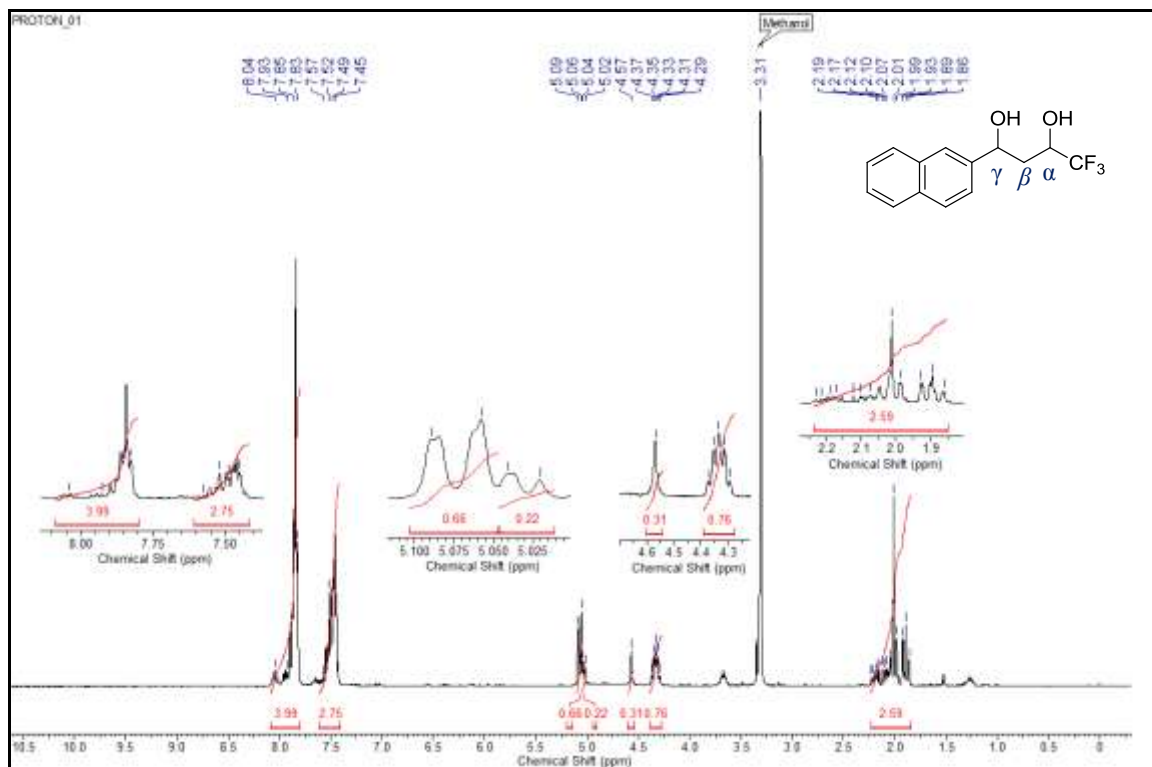
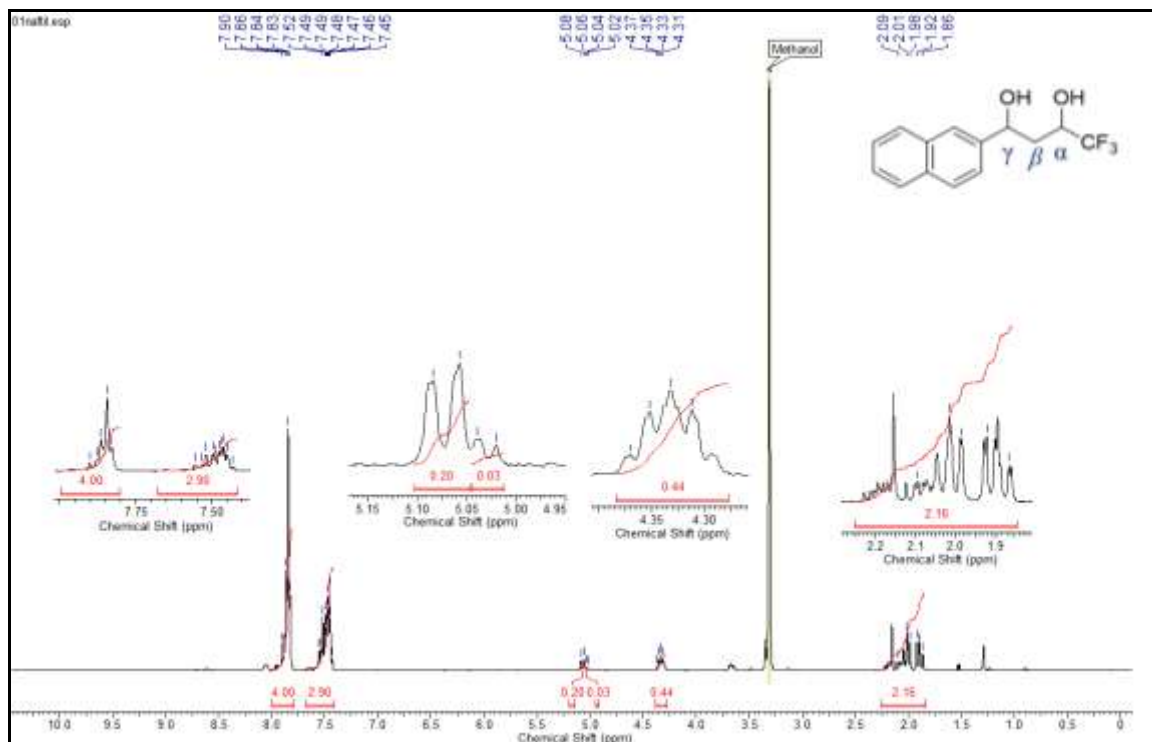


Figura 42 - Espectro de RMN ¹H (500 MHz MeOD₄) do diol **5a** obtido por redução com fungo *Otryosphaeria* sp. CBMAI 1197.



O espectro de RMN ^{13}C do álcool **5a** obtido pela redução com NaBH_4 apresentou uma linha espectral referente ao carbono metilênico (δ 36,0), duas linhas espectrais referentes aos carbonos carbinólicos em (δ 68,2 e 70,4), dez linhas espectrais referentes aos carbonos dos anéis aromáticos (δ 125,4; 125,5; 127,1; 127,5; 129,0; 129,07; 129,3; 129,6; 134,8; 135,3) e uma linha espectral referente ao carbono do grupamento trifluometílico (δ 144,6) (Figura 43).

A análise espectral de massas de alta resolução realizada para o composto **5a** obtido pela reação com o fungo marinho apresentou o pico do íon molecular m/z no valor de 271,0861, correspondente ao composto **5a** (220,0722g/mol) (Figura 44).

O espectro de absorção na região do infravermelho do composto **5a** apresentou as bandas características de vibrações de deformação axial das ligações O-H (3397 cm^{-1}), bandas referentes às vibrações de deformação angular das ligações C-F (1261 cm^{-1}), uma banda atribuída a vibrações de deformação angular das ligações C-O ($1167\text{-}1132\text{ cm}^{-1}$) e bandas em $762\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ referentes a ligações C-H dos anéis aromáticos (SILVERSTEIN, 2006) (Figura 45).

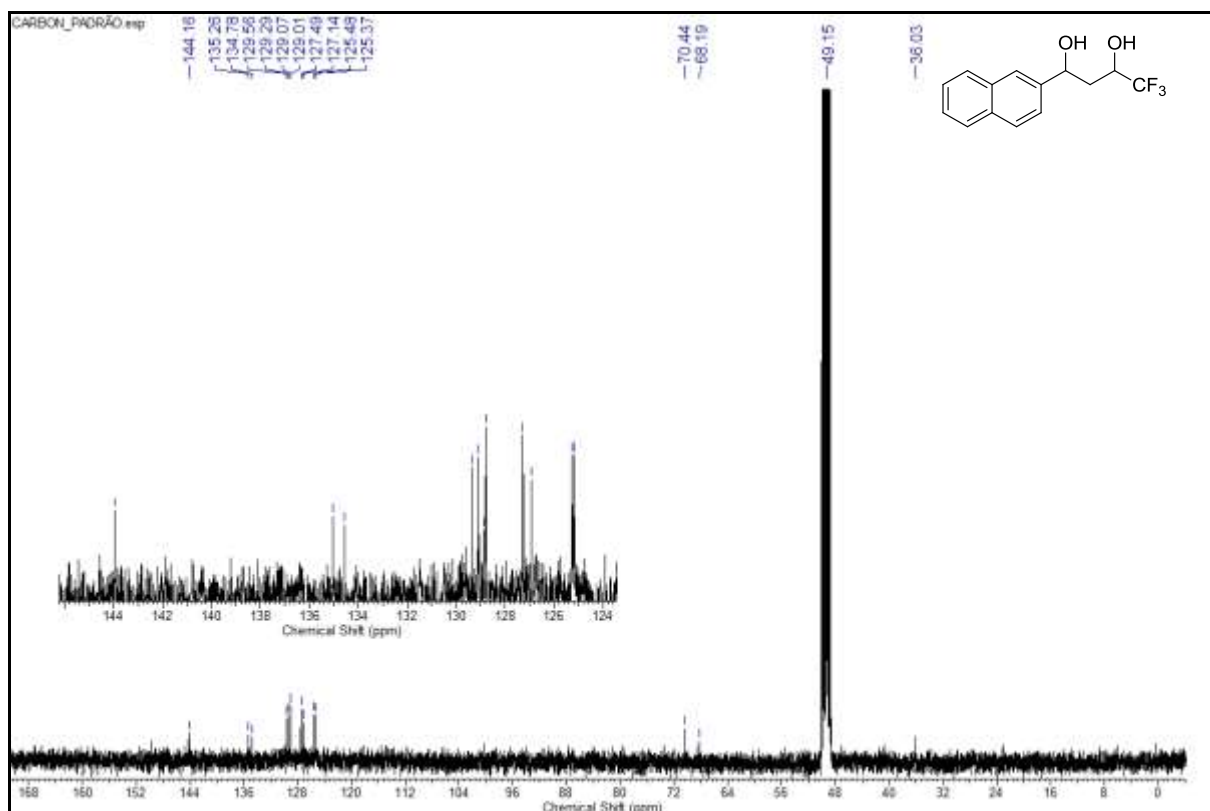
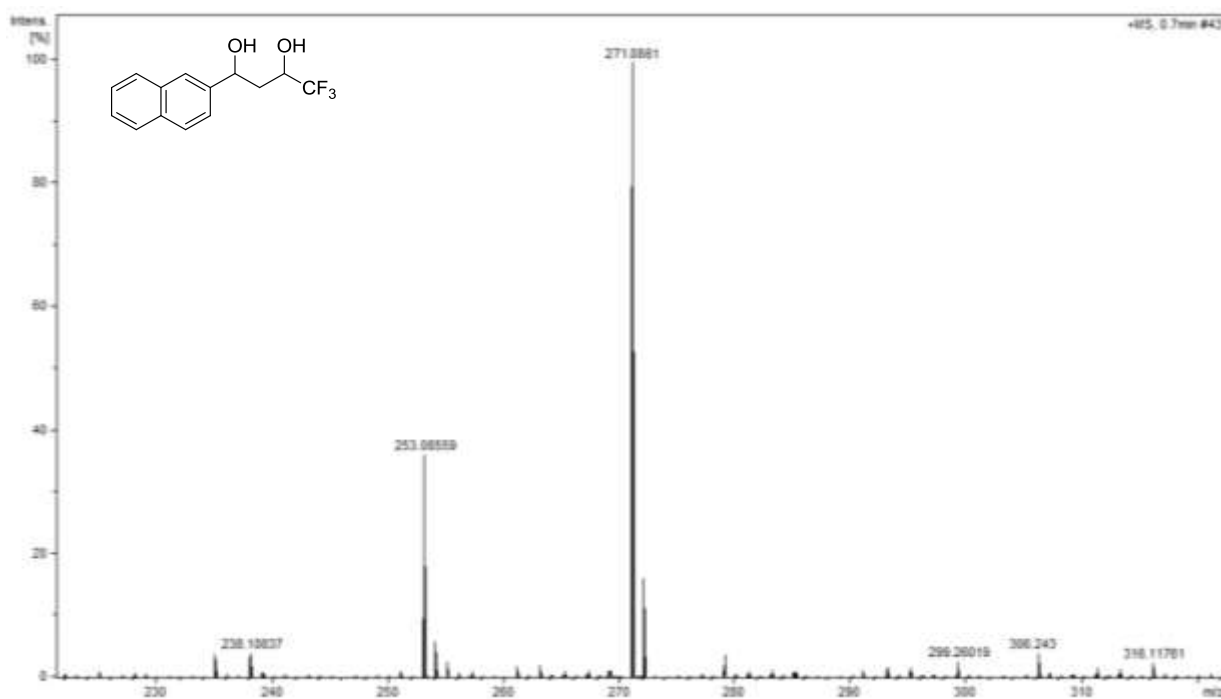
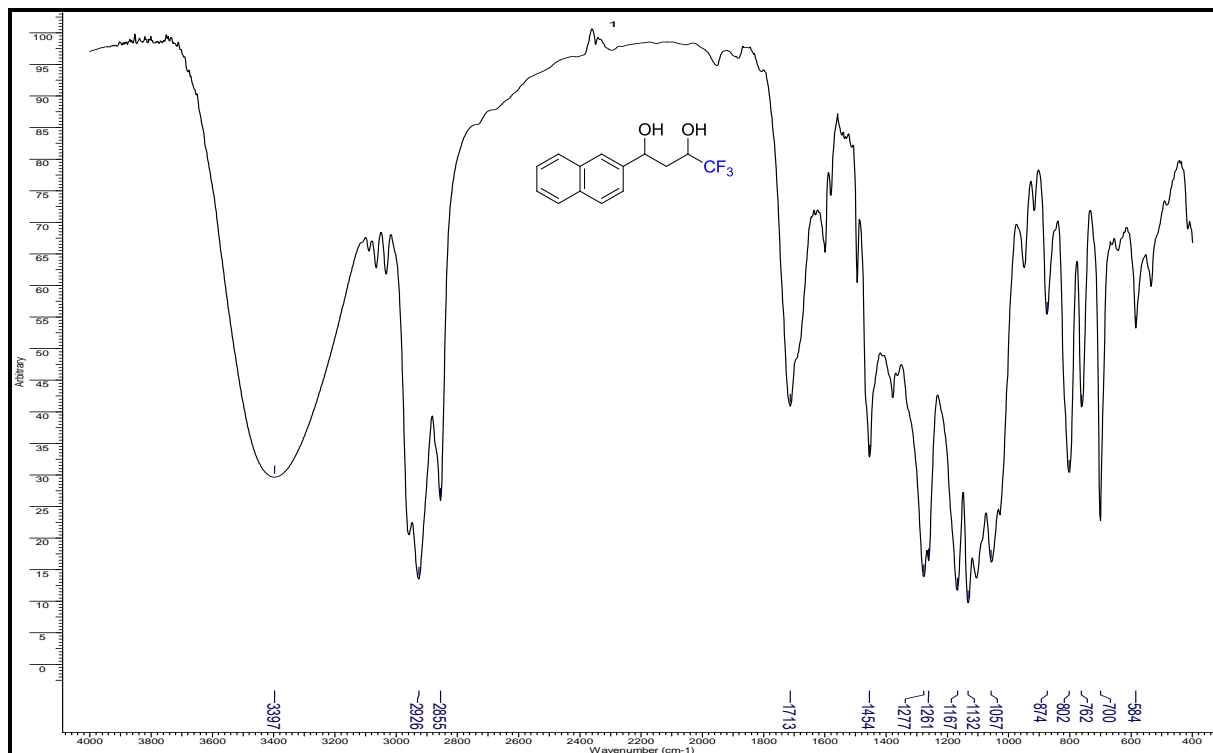
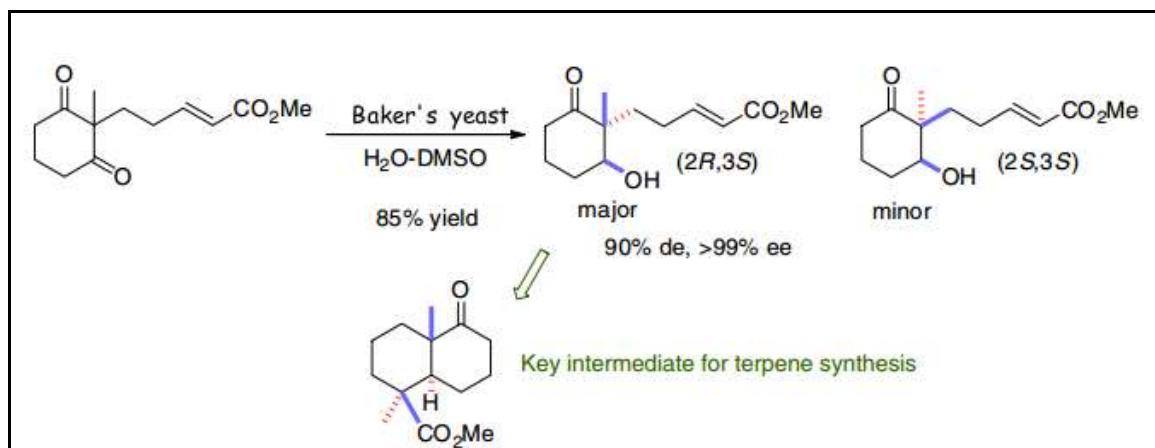
Figura 43 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD_4) do diol **5a** obtido por redução com NaBH_4 .**Figura 44** - Espectro de massas de alta resolução do produto **5a** obtido por redução com fungo marinho *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197.

Figura 45 - Espectro de absorção na região do infra-vermelho do produto **5a** obtido por redução com fungo marinho *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197.

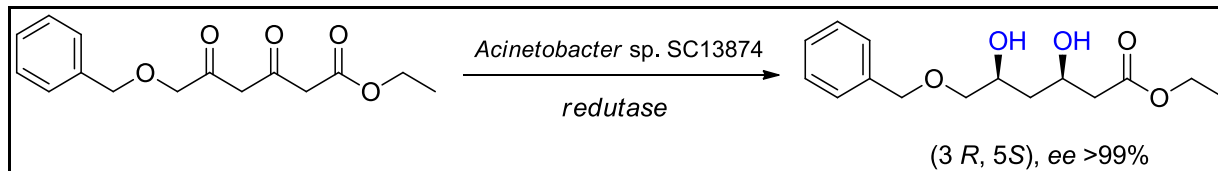


Neste trabalho, os microrganismos marinhos apresentaram-se como potenciais biocatalisadores para redução de cetonas dicarboniladas, comprovando a presença de enzimas ADHs e mostrando sua aplicabilidade para produção de álcoois quirais fluorados. Através destas enzimas, observou-se a produção de uma mistura estereoisomérica **4a-5a**, com formação predominante de pares de um diastereoisômero.

Reduções de dicetonas de forma quimiosseletiva e enantiosseletiva têm sido conduzidas com sucesso através de biocatálise. Como exemplo, o composto carboxilato de metil(-)-1,4-dimetil-5-oxodecahidronaftaleno, um intermediário na síntese de terpenóides, foi sintetizado empregando a levedura de *Saccharomyces cerevisiae* na redução assimétrica da cetona aril-ciclo-hexanediona (Figura 46) (MATSUDA *et al.* 2009).

Figura 46 - Redução quimiosseletiva por levedura de *Saccharomyces cerevisiae*.

O microrganismo *Acinetobacter* sp. SC 13874 reduziu o composto ácido 3,5-dioxo-6-(benziloxi)hexanóico a correspondente (3*R*,5*S*)-diois, utilizados como intermediários para a produção de inibidores da enzima HMG-CoA redutase, com elevadas conversões e excessos enantioméricos (GUO *et al.* 2006) (Figura 47).

Figura 47 - Redução quimiosseletiva por microrganismo *Acinetobacter* sp. SC 13874.

Ao alcance de nosso conhecimento, este trabalho foi pioneiro tanto na redução das cetonas **4** e **5**, quanto na utilização dos fungos marinhos isolados da alga marinha *B.radicans* como biocatalisadores.

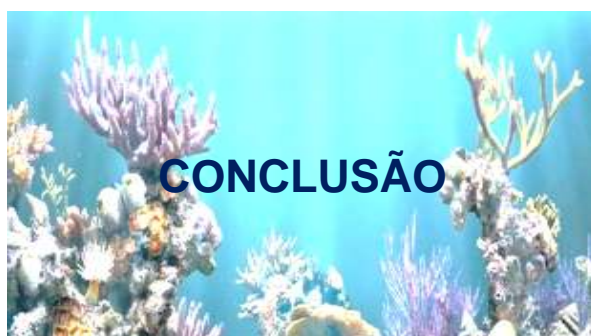
4.8 Medidas de configuração absoluta dos álcoois quirais 4a-5a.

As medidas de rotação óptica dos álcoois quirais 4,4,4-trifluoro-3-hidroxi-1-fenilbutanol (**4a**) e 4,4,4-trifluoro-3-hidroxi-1-(naftalen-2-il) butanol (**5a**) foram determinadas através de medidas de rotação óptica (Tabela 12).

Tabela 12 - Medidas de rotação óptica dos álcoois **4a-5a**.

álcoois	Rotação óptica experimental $[\alpha]_D^{25}$	Rotação óptica - Literatura $[\alpha]_D^{25}$
4a	-1,45 (<i>c</i> 1.3, CHCl ₃ , >99% <i>ee</i>).	-
5a	-1.72 (<i>c</i> 1.9, CHCl ₃ , >99% <i>ee</i>).	-

c = concentração.



5. CONCLUSÃO

Microrganismos que podem catalisar especificamente compostos fluorados são raros na literatura (Cao *et al.* 2013). Neste trabalho fungos isolados da alga marinha *Bostrychia radicans* promoveram a redução de cetonas fluoradas com elevadas conversões e de forma altamente seletiva.

Previamente à realização das reações de redução, foi realizado um estudo em busca do melhor pH para o crescimento dos microrganismos, onde o fungo *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 apresentou crescimento mais significativo em pH ácido. O cultivo dos fungos marinhos em diferentes faixas de pH (4,5-5,5) mostrou-se importante para a maior de produção de massa micelial e do metabolismo fúngico.

O fungo *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 apresentou excelente potencial biocatalisador frente a cetona 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona (**1**), produzindo o respectivo *S*-álcool **1a** com 100% de conversão e elevado excesso enantiomérico (*ee* 99%). A redução com o fungo *Eutypella* sp. CBMAI 1196 também produziu o *S*-álcool **1a** com excelente pureza enantiomérica (*ee* >99%), porém com moderada conversão ao álcool quiral **1a** (38%). Neste estudo, as células íntegras dos fungos marinhos apresentaram as enzimas álcool-desidrogenases que conduziram as reações através de um curso estereoquímico diferente de análogos não-fluorados, representando um produto anti-Prelog.

Nas reações de redução da cetona 1-(2-(trifluorometil)fenil)etanona (**2**), os fungos *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 e *Hidropisphaera* sp. CBMAI 1194 apresentaram enzimas ativas para produção dos respectivos (*S*) e (*R*)-álcool, com valores de conversões moderadas (46 e 40%). Os valores de conversões moderados podem estar relacionados também à presença do grupo trifluorometil na posição *orto*- do anel (ANDRADE *et al.* 2005). No entanto o fungo *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 apresentou-se mais seletivo, levando ao (*S*)-álcool com *ee* >99%.

No caso das reações com a 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona (**3**), o fungo marinho *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 conduziu a formação do (*R*)-álcool (**3a**), ou seja, o antípoda quiral com 97% de conversão e *ee* >99%.

Os fungos marinhos *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 e *Xylaria* sp. 1195 catalisaram a redução da dicetona **4** com elevadas conversões (*c* >90%), produzindo álcoois quirais com elevados excessos enantioméricos (*ee* >99%). No caso da cetona **5**, todos os microrganismos apresentaram enzimas ativas para produção dos álcoois quirais, com conversões de 93-95% e

$ee > 99\%$. As análises indicaram que as ADHs dos fungos marinhos produziram uma mistura estereoisomérica dos álcoois **4a** e **5a**, com formação predominante de um dos enantiômeros.

Os fungos marinhos associados à alga *Bostrychia radicans* apresentaram enzimas desidrogenases com excelente potencial biocatalisador frente aos substratos investigados neste trabalho. Entre os biocatalisadores estudados, o fungo *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197 destacou-se frente a cinco cetonas selecionadas para o estudo proposto. Este trabalho também demonstrou a importância da realização de triagens com microrganismos, devido à variabilidade encontrada nas conversões. Os resultados são consistentes com estudos de reações de redução de cetonas, onde se observou que a atividade de enzimas provenientes de células microbianas depende da estrutura do composto xenobiótico e da presença de enzimas ativas (Rocha *et al.* 2012).

Os microrganismos marinhos assim são de particular interesse na busca por novos biocatalisadores e descobertas de novas enzimas, devido ao grande potencial de metabólitos secundários. Apesar da grande extensão da costa marítima no país, o potencial biocatalítico de organismos marinhos (fungos, bactérias, algas) ainda é pouco explorado. A facilidade de sua manutenção permite o direcionamento de suas enzimas para a produção de substâncias de interesse, mesmo que os substratos sejam exógenos ao seu metabolismo natural. Assim, os fungos marinhos investigados neste trabalho mostraram-se excelentes biocatalisadores para a redução de cetonas fluoradas.

6. REFERÊNCIAS

- ALLEN, G.; LOWE, G. Investigation of the active site of papain with fluorescent probes. **Journal of Biochemical**, v. 133, p. 678-686, 1973.
- ANTRANIKIAN, G.; VORGIAS, C.E.; BERTOLDO, C. Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. **Advanced Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 96, p. 219-262. 2005.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, W.J.; ARAÚJO, W.L.; PEREIRA, J.O. Microorganismos Endofíticos e seu Papel em Plantas Tropicais. **Biociencia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria**. Caxias do Sul: Educs, 2002. p.269-294.
- BIZERRA, A.M.C.; MONTENEGRO, T.G.C.; LEMOS, T.L.G.; OLIVEIRA, M.; MATTOS, M.C.; LAVANDERA, I.; GONZALO, G. Enzymatic regioselective production of chloramphenicol esters. **Tetrahedron**, v. 67, p. 2858-2862. 2011.
- BONATO, S.P.; JABOR, V. A. P. Análise enantiosseletiva de fármacos: Contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 28, p. 683-689, 2005.
- BON, E.P.S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. 506 p.
- BRAUTIGAM, S.; DENNEWALD, D.; SCHURMAN, M.; WEUSTERS-BOTZ. Whole-cell biocatalysis: Evaluation of new hydrophobic ionic liquids for efficient asymmetric reduction of prochiral ketones. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 310-316, 2009.
- CARBALLEIRA, J. D.; QUEZADA, M. A.; HOYOS, P.; SIMEÓ, Y.; HERNAIZ, M. J.; HERNAIZ, M. J.; ALCANTARA, A. R.; SINISTERRA, J. V. Microbial cells as catalysts for stereoselective red-ox reactions. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 686-714, 2009.
- CAO, C.; FUKAE, T.; YAMAMOTO, T.; KANAMARU, S.; MATSUDA, T. Purification and characterization of fluorinated ketone reductase from *Geotrichum candidum* NBRC 5767. **Biochemical Engineering Journal**, v. 76, p.13-16, 2013.
- COUTURIER, L.; YVERGNAUX, F. Combined structural and biological activities for new polyunsaturated fatty derivatives obtained by biotechnological process. **International Journal of Cosmetic Science**. v. 31, p. 209-234, 2009.
- DEBASHISH, G.; MALAY, S.; BARINDRA, S.; JOYDEEP, M. Marine enzymes. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 96, p. 189-218, 2005.
- DEMIRJIAN, D.C.; MORÍS-VARAS, F.; CASSIDY, C.S. Enzymes from extremophiles. **Currently Opinion in Chemical Biology**. v.5, p. 144-151, 2001.
- DA MATTA, C. B.; SOUZA, E. T.; QUEIROZ, A. C.; LIRA, D.; P.; ARAÚJO, M. V. Antinociceptive and anti-inflammatory activity from algae of the genus *Caulerpa*. **Marine Drugs**, v. 9, p. 307, 318, 2011.
- FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**. 5.ed. Berlin: Springer-Verlag, 2004.
- FARDELONE, L.C. **Síntese assimétrica de precursores de aminoalcoois via redução biocatalítica de compostos carbonílicos pró-quirais**. Tese (Doutorado)- Instituto de Química, Universidade de Campinas, Campinas, 2004.

- FERRER, M.; GOLYSHINA, O.; BELOQUI, A.; GOLYSHIN, P.N. Mining enzymes from extreme environments. **Current Opinion in Microbiology**. v. 10, p. 207–214, 2007.
- GRUNWALD, P. **Biocatalysis: biochemical fundamental and applications**. London: Imperial College, 2009. 1035 p.
- GUPTA, R.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 64, p. 763-781, 2004.
- GUTMANN, O.; SCHWERDTFEGGER, R.; RIEKS, A.; ANTRANIKIAN, G.; KASHE, V.; BRUNNER, G. Enzyme catalysed reactions, enantioselectivity and stability under high hydrostatic pressure. **Process Technology Proceedings**. v. 12, p. 127-131, 1996.
- HAI YU, S.; HUANG, H.; HARSHAL, C.; MINGCHI, S.; HAOJIE ZHENG, XI C. Highly Efficient Chemoenzymatic Synthesis of Naturally Occurring and Unnatural α 2,6-Linked Sialosides: A *P. damsela* α 2,6-Sialyltransferase with Extremely Flexible Donor substrate Specificity. **Angewandte Chemie International Edition**. v. 45, p. 3938-3944, 2006.
- HOFF, B.H.; SUNDBY, E. Preparation of pharmaceutical important fluorinated 1-arylethanol using isolated enzymes. **Bioorganic Chemistry**, v. 51, p. 31-47, 2013.
- HOOK, I.I.; RYAN, S.; SHERIDAN, H. Biotransformations of aliphatic and aromatic ketones, including several monoterpenoid ketones and their derivatives by five species of marine microalgae. **Photochemistry**, v. 63, p. 31-39, 2003.
- ILLANES, A. **Enzyme biocatalysts: principles and applications**. New York: Springer, 2008. 391 p.
- LAM, Y. H.; STEVEN, J. S.; VERONIQUE, G. Recent progress in the use of fluoroorganic compounds in pericyclic reactions. **Tetrahedron**, v. 65 p.9905-9933, 2009.
- LEANDRINI, A. L. O.; SILVA, D. B.; TURATTI, I. C. C.; YOKOYA, N. S.; DEBONSI, H. M. Volatile constituents of Brazilian *Bostrychia* species (*Rhodmelaceae*) from mangrove and rocky shore. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 761-765, 2009.
- LEHNINGER, P.; DAVID, L.N.; MICHAEL, M.C. **Principles of biochemistry**. 4. ed. New York: Worth Publishers, 2000. p.123.
- LINDE, A.G.; COLAUTO, N.B.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; CARVALHO, L.R.M.; AIZONO, P. M. Temperature and pH conditions for mycelial growth of *Agaricus brasiliensis* on axenic cultivation. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. v.29, p. 307-312, 2012.
- KASLAUSKAS, R.; TAO, J. **Biocatalysis for green chemistry and chemical process development**. New York: John Wiley, 2011. 479 p.
- KURBANOGLU, E. B.; ZILBEYAZ, K.; TASKIN, M.; KURBANOGLU, N. Total production of (R)-3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl ethanol by asymmetric reduction of 3,5-bis(trifluoromethyl)-acetophenone in the submerged culture of *Penicillium expansum* isolate. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.20, p. 2759-2763, 2009.
- MILETIĆ, N.; VULKOVIC, Z. NASTASOVIC, A. LOOS, K. Macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins- Versatile immobilization supports for biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, p. 196-201, 2009.

- MARSAIOLI, A.; PORTO, A.L.M. **Biocatálise e biotransformação-fundamentos e aplicações**. Salto:Schoba, 2010. v.1.
- MATSUDA, T.; YAMANAKA, R.; NAKAMURA, K. Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. **Tetrahedron: Assymetry**, v. 20, p. 513-557, 2009.
- MESSIAS, J.M.; DA COSTA, B.Z.; LIMA, V.M.G.; DEKKER, R.F.H.; REZENDE, M.I.; KRIEGER, N.; BARBOSA, A.M. Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 426-431, 2009.
- MILETIĆ, N.; VULKOVÍČ, Z. NASTASOVIĆ, A. LOOS, K. Macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins- Versatile immobilization supports for biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 56, p.196-201, 2009.
- MOUAD, A. M.; MARTINS, M, P.; DEBONSI, H. M.; OLIVEIRA, A.L.L.; FELICIO, R.; YOKOYAC, N.; FUJIC, M.; MENEZES, C.; PORTO, A.L.M. Bioreduction of acetophenone derivatives by red marine algae *Bostrychia radicans* and *B. tenella*, and marine bacteria associated. **Helvetica Chimica Acta**. v. 94, 2011.
- MURPHY, C. D.; BENJAMIN, R. C.; AMADIO, J. Metabolism of fluoroorganic compounds in microorganisms: impacts for the environment and the production of fine chemicals. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, p. 617-629, 2009.
- MOLINARI, F.; ROMANO, D.; GANDOLFI, R.; GUALANDRIS, R.; FERRARA, N. Biocatalysis for use in pharmaceutical manufacturing. **Journal of Biotechnology**, v.131, p. 98-121, 2007.
- NAEMURA, K.; MURATA, M.; TANAKA, R.; HIROSE, K.; TOBE, Y. Enantioselective acylation of alcohols catalyzed by lipase ql from *Alcaligenes* sp.: a predictive active site model for lipase QL to identify the faster reacting enantiomer of an alcohol in this acylation. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.7, p. 1581-1584, 1996.
- NAKAMURA, K.; TAKENAKA, K.; FUJII, M.; IDA, Y. Asymmetric synthesis of both enantiomers of secondary alcohols by reduction with a single microbe. **Tetrahedron Letters**, v. 43, p. 3629–3631, 2002.
- NAKAMURA, K.; YAMANAKA, R.; MATSUDA T.; HARADA T. Recent developments in assymmetric reduction of ketones with biocatalysts. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, p. 2659-2681, 2003.
- NIE, J.; HONG-CHAO, G., CAHARD, D. JUM-HAM, M. Asymmetric construction of stereogenic carbon centers featuring a trifluoromethyl group from prochiral trifluoromethylated substrates. **Chemical Review**, p. 455-529, 2011.
- O'HAGAN, D. Understanding organofluorine chemistry: An introduction to the C–F bond. **Chemical Society Reviews**, v. 37, p. 308-319, 2008.
- OLIVEIRA, G.L.; MANTOVANI, M.S. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p.742-756, 2009.
- PATEL,R.N. Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 252, p. 659-701, 2008.

- PATEL, R. **Stereoselective biocatalysis**. New York: Marcel Decker. 2000. 932 p.
- PEDRINI, P.; GIOVANNINIA, P.P.; MANTOVANIA, M.; ANDREOTTI, E.; COLALONGOC, C. Reduction screening with endophytic fungi: Synthesis of homochiral secondary alcohols. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 53, p. 180-187, 2000.
- PINHEIRO, L. **Multibiorreações e suas aplicações para as sínteses de compostos enantiomericamente puros**. 2006. 250 f. Tese (Doutorado)-Instituto de Química, Universidade de Campinas, Campinas, 2006.
- PIOVAN, L.; KAGOHARA, E.; RICCI, L.; KEPPLER, A.F.; CAPELARI, M.; ANDRADE, L.H. PORTO, A.L.M. COMASSETO, J.V. Chemoselective screening for the reduction of a chiral functionalized (\pm)-2- (phenylthio)cyclohexanone by whole cells of Brazilian micro-organisms. **Tetrahedron**, v. 19, p. 2385-2389, 2008.
- RAMACHANDRAN, P.V.; TEODOROVIC, A.V.; BROWN, H.C. Chiral synthesis via organoboranes selective reductions. Asymmetric reduction of trifluoromethyl ketones by B-Chlorodiisopinocampheylborane in high enantiomeric purity. **Tetrahedron**, v. 49, p-1725-1738, 1993.
- REID, E.; WORTHY, C. A.; PROBERT, I.; ALI, S.; NAPIER, J.; LITTLECHILD, J.; PAUL J.; ALLEN, M. Coccolithophores: functional biodiversity, enzymes and bioprospecting. **Marine Drugs**, v.9, p. 586-602, 2011.
- RESENDE, C. Wladimir Prelog e a estereoquímica das moléculas orgânicas-Um centenário de nascimento. **Química Nova**, v.30, p. 1046-1053, 2007.
- RIBEIRO, S.S.; RAMINELLI, C.; PORTO, A.L.M. Enzymatic resolution by CALB of Organofluorine compounds under conventional condition and microwave irradiation. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 154, p.53-59, 2013.
- SAHA, B.; DERMIJIAN, D.C. **Applied biocatalysis in specialty chemicals and pharmaceuticals**. Oxford:University Press, 2000. 308 p.
- SAID, S.; PIETRO, C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. 416 p.
- SASAKI, S.; YAMAUCHI, T.; KUBO, H.; KANAI, M.; ISHII, A.; HIGASHIYAMA, K. Chemoselective reduction of ketones: Trifluoromethylketones versus methylketones. **Tetrahedron Letters**, v. 46, p.1497-1500, 2005.
- SONKARIA, S.; BOUCHER, G.; FLOREZ-ALVAREZ, J. Evidence for “lock and key” character in an anti-phosphonate hydrolytic antibody catalytic site augmented by non-reaction centre recognition. **Journal of Biochemistry**, v. 381, p. 125-130, 2004.
- SOLOSHONOK, V.A.; AVILOV, D.V.; KUKHAR, V.P. Asymmetric aldol reactions of trifluoromethyl ketones with a chiral Ni (ii) complex of glycine: stereocontrolling effect of the trifluoromethyl group. **Tetrahedron**, v.52, p.12433-12442, 1996.
- SOUZA, M. V. N. S.; VASCONCELOS, T. R. A. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. **Química Nova**, v. 28, p.678-682, 2005.
- TRINCONI, A. Marine biocatalysts: enzymatic features and applications. **Marine Drugs**. v.9, p. 478-499, 2011.

- TSUKIJI, S.; PATTNAIK, S.B.; SUGA, H.J. **Journal of American Chemistry Society**, v.126, p. 5044, 2004.
- UTSUKIHARA, T.; CHAIA, W.; KATOA, N.; NAKAMURAB, K.; HORIUCHIA,A. Reduction of (+)- and (-)-camphorquinones by cyanobacteria. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 60, p. 145–150, 2009.
- WOHLGEMUTH, R. Asymmetric biocatalysis with microbial enzymes and cells. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, p. 283-292, 2010.
- XU, C.; ZHONGHUA, Y.; RONG, Z. GAI, Y. Production of chiral aromatic alcohol by asymmetric reduction with vegetable catalyst. **Chinese Journal of Chemical Engineering**. v. 18, p. 1029-1033, 2010.
- YU, F.; WU, Z.F.; ZHOU, J.; CHAN, A.S.C. Cobalt (II)-catalyzed asymmetric hydrosilylation of simple ketones using dipyridylphosphine ligands in air. *Organic & Biomolecular Chemistry*. v. 9, p. 5652-5654, 2011.
- ZANDONAI, D. P.; SAQUETO, K, C.; ABREU, S. C. S. R.; LOPES, A. P.; ZUIN, V. G. Química verde e formação de profissionais do campo da química: relato de uma experiência didática para além do laboratório de ensino. **Revista Virtual de Química**, 2013. No prelo.
- ZHENG, G.W.; XU, J. H. New opportunities for Biocatalysis: Driving the synthesis of chiral chemicals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 784-792, 2011.
- ZILBEYAZ, K.; KURBANOGLU, E.B. Production of (*R*)-1-(4-Bromo-phenyl)-ethanol by locally isolated *Aspergillus niger* using ram horn petone. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1549-1552. 2008.
- ZUIN, V.G.; CORREA, A. G. **Química Verde: fundamentos e aplicações**. São Carlos:EDUFSCAR, 2009. 172 p.



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

Capítulo 2

Lipase de *Candida antarctica* na produção de amidas fenólicas graxas

Ana Maria Mouad

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

Co-orientador: Dr. Florent Yvergnaux



São Carlos, 2014

*Dans la vie, tu as deux choix le matin:
soit tu te recouches pour poursuivre ton
rêve, soit tu te lèves pour le réaliser.*

Remerciements

Je remercie Monsieur le Président Gérard Josset, de m'avoir accueillie au sein du Centre de Recherche Solabia. Je ne pouvais pas manquer de vous remercier pour votre sympathique accent portugais.

Monsieur le Directeur, Florent Yvergnaux, pour votre attention depuis les premiers contacts par mail, je vous remercie beaucoup pour tout votre soutien; j'adresse tout mon respect à votre personne, en tant que professionnel et en tant qu'être humain.

A l'équipe de chimie, Mario Gonçalves, Delphine et Laurent, pour la bonne volonté, amitié et patience de m'enseigner de nouvelles techniques. A Laura, Caroline, Thibaut, Julie pour votre attention et toute l'aide, sans laquelle je n'aurai pas pu faire le travail proposé. Les portes du Brésil seront toujours ouvertes pour vous.

A Celine Berger, je n'ai pas de mot pour vous remercier de votre manière gentille de me traiter chez Solabia et pour l'attention que vous et votre mari m'avez portée.

Aina Queiroz, minha amiga franco-brasileira, je te remercie éternellement. Il y a des choses dans la vie que nous ne pouvons pas expliquer, mais qui restent gravées. Tendrement.

Roxane, quelle amie j'ai gagnée ... des expériences, des lieux et des choses en commun que nous avons partagées. Je ne t'oublierai jamais.

Melanie, "animatrice américaine", quelle grâce le travail aurait eut sans votre présence? Merci ma chère.

Merci a toute la société Bioeurope du groupe Solabia.

De bonnes choses que j'appris, de bonnes personnes que j'ai connues, des beaux lieux que j'ai visités, un pays qu'il est venu avec moi. Tout cela n'aurait pas eu lieu sans cette rencontre.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Centro de pesquisas onde foi realizado o Doutorado Sanduíche, Anet-França.....	113
Figura 2 - Constituintes fisiológicos da pele.....	115
Figura 3 - Estruturas superficial (A) e interna (B) da epiderme.....	117
Figura 4 - Estrutura molecular da cistina.....	118
Figura 5 - Moléculas hidrofílicas ou <i>NMFs</i>	118
Figura 6 - Estrutura das ceramidas do tipo 1, 3 e 5.....	119
Figura 7 - (A) Molécula de colesterol, (B) Ácidos graxos saturados e insaturados.....	120
Figura 8 - Modelo “tijolos e cimento” da camada córnea.....	122
Figura 9 - Antioxidantes naturais da pele: vitamina E, vitamina C e catalase.....	124
Figura 10 - (A) Ácido cinâmico obtido a amônia-liase, (B) Ácidos fenólicos.....	127
Figura 11 - Ácido salicílico e sua participação na formulação de cosméticos.....	129
Figura 12 - Derivado lipofílico do ácido salicílico.....	131
Figura 13 - Creme <i>Visionnaire</i> produzido com molécula anfifílica [LR 2412] pela LANCÔME.....	132
Figura 14 - Grupos funcionais sob os as lipases atuam.....	134
Figura 15 - Principais reações catalisadas por lipases.....	134
Figura 16 - Palmitato de isopropila e ácido 2-(2-etil-hexil)-hexadecanoico.....	135
Figura 17 - Estrutura química de amida fenólica com propriedades antioxidantes.....	139
Figura 18 - Estrutura e empacotamentos dos ácidos esteárico e oléico.....	142
Figura 19 - Estrutura do estradiol.....	142
Figura 20 - Estrutura molecular da ômega- <i>o</i> -acilceramida ou ceramida tipo 1.....	143
Figura 21 - Mecanismo catalítico da CALB em reações de aminólise.....	160
Figura 22 - Cromatograma obtido por CLAE do padrão linoleato de etila (1).....	161
Figura 23 - Cromatogramas obtidos por CLAE das análises da reação de aminólise entre o linoleato de etila (1) e a <i>N</i> -dodecilamina (2) catalisada por (A) CALB na proporção 0,8:1 dos reagentes (B) CALB na proporção 1:1 dos reagentes (C) CALB na proporção 1:1 dos reagentes.....	162
Figura 24 - Efeito da concentração enzimática sob o rendimento reacional.....	164
Figura 25 - Cromatogramas obtidos por CLAE das análises das reações de aminólise entre 1 e 2 com (A) 0,6 g de enzima/mol substratos (B) 1,2 g de enzima/mol substratos (C) 2,5 g de enzima/mol substratos (D) 5,0 g de enzima/mol substratos (E) 10 g de enzima/mol substratos.....	163
Figura 26 - Cromatograma obtido por CLAE do produto 10 após purificação.....	164
Figura 27 - Preparação do produto <i>N</i> -dodecilnonadeca-9,12-dienamida (10) em reator de 1 L.....	167
Figura 28 - Espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}) para a (9Z,12Z)- <i>N</i> -dodeciloctadeca-9,12-dienamida (10).....	169
Figura 29 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, MeOD_4) da (9Z,12Z)- <i>N</i> -dodeciloctadeca-9,12-dienamida (10) obtida por CALB.....	169
Figura 30 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD_4) da (9Z,12Z)- <i>N</i> -dodeciloctadeca-9,12-dienamida (10) obtida por CALB.....	170
Figura 31 - Espectro de massas de alta resolução da (9Z,12Z)- <i>N</i> -dodecilnonadeca-9,12-	

dienamida (10).....	170
Figura 32 - Cromatogramas obtidos por CLAE do (A) Padrão do salicilato de etila, Reações com (B) 2,5 g de enzima/ mol de salicilato de etila (C) 5,0 g/mol lipase (D) 10 g/mol lipase.....	173
Figura 33 - Placa de CCD contendo spots do salicilato de etila (3) e produto <i>N</i> -dodecil-2-hidroxi-benzamida (11) (<i>spot</i> 5).....	174
Figura 34 - Cromatograma obtido por CLAE do produto <i>N</i> -dodecil-2-hidroxi-benzamida (11) purificado.....	175
Figura 35 - Espectro de absorção na região do infravermelho (cm ⁻¹) da <i>N</i> -dodecil-2-hidroxi-benzamida (11).....	177
Figura 36 - Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, MeOD ₄) da <i>N</i> -dodecil-2-hidroxi-benzamida (11) obtida pela reação de aminólise.	177
Figura 37 - Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, MeOD ₄) da <i>N</i> -dodecil-2-hidroxi-benzamida (11) obtido pela reação de aminólise.	178
Figura 38 - Espectro de massas de alta resolução da <i>N</i> -dodecil-2-hidroxi-benzamida (11).....	178
Figura 39 - Amina primária etanolamina (4) e secundária 2-(metil)aminoetanol (5).....	181
Figura 40 - Cromatogramas obtidos por CLAE das reações de aminólise entre salicilato de etila (3) e aminoálcoois (4-5) (A) Padrão no salicilato de etila, (B) Reação de aminólise com aminoálcool 4, (C) Reação de aminólise com aminoálcool 5 catalisada por CALB.....	182
Figura 41 - Espectro de absorção na região do infravermelho (cm ⁻¹) da 2-hidroxi- <i>N</i> -(2-hidroxi- <i>etil</i>)benzamida (12).....	182
Figura 42 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, MeOD ₄) da 2-hidroxi- <i>N</i> -(2-hidroxi- <i>etil</i>) benzamida (12).	184
Figura 43 - Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, MeOD ₄) da 2-hidroxi- <i>N</i> -(2-hidroxi- <i>etil</i>) benzamida (12).....	185
Figura 44 - Espectro de massas de alta resolução da 2-hidroxi- <i>N</i> -(2-hidroxi- <i>etil</i>) benzamida (12).....	185
Figura 45 - Espectro de absorção na região do infravermelho (cm ⁻¹) para a 2-hidroxi- <i>N</i> -(2-hidroxi- <i>etil</i>)- <i>N</i> -metilbenzamida (13).....	187
Figura 46 - Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, MeOD ₄) da 2-hidroxi- <i>N</i> -(2-hidroxi- <i>etil</i>)- <i>N</i> -metilbenzamida (13).....	187
Figura 47 - Espectro de massas de alta resolução da 2-hidroxi- <i>N</i> -(2-hidroxi- <i>etil</i>)- <i>N</i> -metilbenzamida (13).....	188
Figura 48 - Cromatogramas obtidos por CLAE das análises de (A) Padrão do salicilato de etila, (B) Reação de aminólise com o 5-aminopentanol (6) catalisada por CALB.....	190
Figura 49 - Espectro de absorção na região do infravermelho (cm ⁻¹) da 2-hidroxi- <i>N</i> -(5-hidroxi- <i>pentil</i>)benzamida (14).....	192
Figura 50 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, MeOD ₄) da 2-hidroxi- <i>N</i> -(5-hidroxi- <i>pentil</i>)benzamida (14).....	192
Figura 51 - Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, MeOD ₄) da 2-hidroxi- <i>N</i> -(5-hidroxi- <i>pentil</i>)benzamida (14).....	193
Figura 52 - Espectro de massas de alta resolução da 2-hidroxi- <i>N</i> -(5-hidroxi- <i>pentil</i>) benzamida (14).....	193

Figura 53 - Cromatogramas obtidos por CLAE das análises de (A) Padrão do salicilato de etila, (B) Reação de aminólise entre salicilato de etila e tiramina catalisada por CALB.....	195
Figura 54 - Espectro de absorção na região do infravermelho da 2-hidroxi- <i>N</i> -(4-hidroxifenetil)benzamida (16).....	196
Figura 55 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, MeOD ₄) da 2-hidroxi- <i>N</i> -(4-hidroxifenetil)benzamida (16).....	197
Figura 56 - Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, MeOD ₄) da 2-hidroxi- <i>N</i> -(4-hidroxifenetil)benzamida (16).....	197
Figura 57 - Espectro de massas de alta resolução da 2-hidroxi- <i>N</i> -(4-hidroxifenetil)benzamida (16).....	198
Figura 58 - Cromatogramas obtidos por CLAE das análises de (A) Padrão do salicilato de etila, (B) Reação de aminólise entre salicilato de etila (3) e 1,3-diaminopropan-2-ol (8) catalisada por CALB.....	200
Figura 59 - Cromatogramas obtidos por CLAE das análises de (A) Padrão do salicilato de etila, (B) Reação entre salicilato de etila (3) e 1-amino-2-propanol (9) catalisada por CALB.....	201
Figura 60 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, MeOD ₄) dos produtos 17 e 18	203
Figura 61 - Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, MeOD ₄) dos produtos 17 e 18	203
Figura 62 - Espectro de absorção na região do infravermelho (cm ⁻¹) da 2-hidroxi- <i>N</i> -(2-hidroxipropil)benzamida (19).....	205
Figura 63 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, MeOD ₄) da 2-hidroxi- <i>N</i> -(2-hidroxipropil)benzamida (19).....	205
Figura 64 - Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, MeOD ₄) da 2-hidroxi- <i>N</i> -(2-hidroxipropil)benzamida (19).....	206
Figura 65 - Espectro de massas de alta resolução da 2-hidroxi- <i>N</i> -(2-hidroxipropil)benzamida (19).....	206
Figura 66 - Cromatogramas obtidos por CLAE das análises de (A) Padrão do salicilato de etila, (B) Reação com o 1-amino-2-propanol (9) catalisada por CALB (C) Reação de formação do produto 21 com CALB.....	209
Figura 67 - Produtos selecionados para estudo de atividade biológica.....	210
Figura 68 - Espectro de absorção na região do infravermelho (cm ⁻¹) de 1-(2-hidroxibenzamido)propano-2-ila (21).....	212
Figura 69 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, MeOD ₄) de oleato de 1-(2-hidroxibenzamido)propano-2-ila (21).....	212
Figura 70 - Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, MeOD ₄) de oleato de 1-(2-hidroxibenzamido)propano-2-ila (21).....	213
Figura 71 - Espectro de massas de alta resolução de oleato de 1-(2-hidroxibenzamido)propano-2-ila (21).....	213

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 -Produção de ácidos graxos livres e ceramidas através de hidrólise enzimática.....	119
Esquema 2 - Esquema geral da peroxidação lipídica.....	125
Esquema 3 - Mecanismo de peroxidação lipídica.....	125
Esquema 4 - Formação de radicais alcóxila e peróxila.....	126
Esquema 5 - Reação entre o ácido salicílico e o radical hidroxila.	128
Esquema 6 - Reação de lipofiliação (esterificação) do ácido cafeico.....	130
Esquema 7 - Exemplo de reação de hidrólise de triacilglicerídeos.....	133
Esquema 8 - Síntese industrial do palmitato de arcorbitila via CALB.....	136
Esquema 9 - Acilação do retinol por lipase CALB.....	136
Esquema 10 - Reação de aminólise via lipase de <i>Candida antarctica</i>	137
Esquema 11 - Síntese da octanamida via reação de aminólise.....	137
Esquema 12 - Síntese de molécula análoga à ceramidas.....	138
Esquema 13 - Exemplo de produção de amidas fenólicas graxas por biocatálise.....	140
Esquema 14 - Reação de aminólise para produção de amida graxa.....	144
Esquema 15 - Reagentes utilizados e produtos obtidos através das reações com CALB...	149
Esquema 16 - Reação de aminólise entre Linoleato de etila (1) e <i>N</i> -dodecilamina (2).....	158
Esquema 17 - Reação de aminólise entre salicilato de etila (3) e <i>N</i> -dodecilamina (2) catalisada por CALB.....	171
Esquema 18 - Reação ácido-base para remoção do salicilato de etila remanescente.....	180
Esquema 19 - Reação de aminólise catalisada por CALB entre salicilato de etila (3) e (A) etanolamina (4), (B) 2-(metilamino)etanol (5).....	178
Esquema 20 - Reações entre salicilato de etila (3) e 5-amino-pentanol (6).....	188
Esquema 21 - Reação de aminólise entre salicilato de etila (3) e tiramina (7).....	194
Esquema 22 - (A) Reação de aminólise entre salicilato de etila e 1,3-diaminopropan-2-ol (8) catalisada por CALB, (B) Reação entre salicilato de etila e 1-amino-2-propanol (9) catalisada por CALB.	199
Esquema 23 - Síntese do composto bioativo oleato de oleato de 1-(2-hidroxi-benzamido)propan-2-ila (21) em duas etapas.....	208

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lipofilização de ácidos fenólicos.....	130
Tabela 2 - Nome químico e descrição de alguns ácidos graxos com propriedades biológicas.....	140
Tabela 3 - Estudo do efeito das proporções molares de linoleato de etila (1) e N-dodecilamina (2) na síntese de (9Z,12Z)-N-dodeciloctadeca-9,12-dienamida (10).....	151
Tabela 4 - Estudo do efeito da proporção enzimática na síntese de (9Z,12Z)-N-dodeciloctadeca-9,12-dienamida (10).....	152
Tabela 5 - Concentrações enzimáticas estudadas para padronização da síntese de N-dodecil-2-hidroxibenzamida (11).....	153
Tabela 6 - Condições de análise por cromatografia líquida de alta eficiência.....	155
Tabela 7 - Resultados de reações entre o linoleato de etila (1) e a N-dodecilamina (2) em diferentes proporções molares catalisada por CALB.....	159
Tabela 8 - Rendimentos das reações entre linoleato de etila (1) e N-dodecilamina (2) promovidas com diferentes proporções enzimáticas.....	163
Tabela 9 - Rendimentos das reações entre o salicilato de etila (3) e a N-dodecilamida (2) promovidas com diferentes concentrações enzimáticas.....	171

ÍNDICE

APRESENTAÇÃO	112
1 INTRODUÇÃO	115
1.1 A pele, um órgão multifuncional.....	115
1.2 Epiderme.....	116
1.2.1. Moléculas produzidas durante a diferenciação dos queratinócitos.....	117
1.2.2 Processo de queratinização da camada córnea.....	120
1.2.3 A organização molecular na camada córnea.....	121
1.3 Modificações no conteúdo lipídico e sua relação com doenças e envelhecimento precoce.....	122
1.4 Os radicais livres e o estresse oxidativo.....	123
1.5 Peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados.....	124
1.6 Os antioxidantes.....	126
1.6.1 Ácidos fenólicos.....	127
1.6.2 Ácido salicílico.....	129
1.7 Lipases e sua aplicação no setor cosmético e farmacêutico.....	133
1.8 Ácidos graxos.....	140
1.8.1 Aplicação tópica de ácidos graxos insaturados.....	142
2. OBJETIVOS	146
2.1 Objetivos específicos.....	146
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS	148
3.1 Reagentes e solventes.....	150
3.2 Reações entre linoleato de etila (1) e <i>N</i> -dodecilamina (2) catalisadas por CALB	150
3.2.1 Estudo da proporção molar dos reagentes sob o rendimento reacional	150
3.2.2 Estudo do efeito da proporção enzimática sob o rendimento reacional.....	151
3.3 Reações entre <i>N</i> -dodecilamina (2) e salicilato de etila (3) catalisada por CALB.....	152
3.3.1 Reação de hidrólise para separação do salicilato de etila (3)	154
3.4 Reações com os aminoálcoois (4-9) e salicilato de etila (3) catalisadas por CALB..	154
3.5 Métodos analíticos, identificação e caracterização dos compostos.....	154
3.5.1 Métodos cromatográficos.....	154
3.5.1.1 Cromatografia de absorção	154
3.5.1.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	154
3.5.2 Espectrometria na região de absorção do Infravermelho (IV).....	155
3.5.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	155
3.5.4 Espectrometria de Massas de alta resolução (EMAR).....	156
3.6 Evaporadores rotativos.....	156
3.7 Outros equipamentos.....	156
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	158
4.1 Reações entre linoleato de etila (1) e <i>N</i> -dodecilamina (2) catalisadas por CALB.....	158
4.1.1 Estudo da proporção molar dos reagentes sob o rendimento reacional	158
4.1.2 Estudo do efeito da proporção de CALB sob o rendimento reacional	163
4.1.3 Caracterização da (9 <i>Z</i> , 12 <i>Z</i>)- <i>N</i> -dodeciloctadeca-9-12-dienamida (10) obtida por CALB	168

4.2 Reações entre <i>N</i> -dodecilamina (2) e salicilato de etila (3) catalisadas por CALB.....	171
4.2.1 Caracterização da <i>N</i> -dodecil-2-hidroxibenzamida (11) obtida por CALB	176
4.3 Reações com aminoálcoois (4-9) e salicilato de etila (3) catalisadas por CALB.....	179
4.3.1 Síntese da 2-hidroxi- <i>N</i> -(2-hidroetil)benzamida (12) e 2-hidroxi- <i>N</i> -(2-hidroetil)- <i>N</i> -metilbenzamida (13) catalisadas por CALB	179
4.3.1.1 Caracterização da 2-hidroxi- <i>N</i> -(2-hidroxietil)benzamida (12) obtida por CALB	183
4.3.1.2 Caracterização da 2-hidroxi- <i>N</i> -(2-hidroxietil)- <i>N</i> -metilbenzamida (13) obtida por CALB.....	186
4.3.2 Síntese da 2-hidroxi- <i>N</i> -(5-hidroxipentil)benzamida (14) catalisada por CALB	188
4.3.2.1 Caracterização da 2-hidroxi- <i>N</i> -(5-hidroxipentil)benzamida(14) obtida por CALB	190
4.3.3 Síntese da 2-hidroxi- <i>N</i> -(4-hidroxifenetil)benzamida (16) catalisada por CALB...	194
4.3.3.1 Caracterização da 2-hidroxi- <i>N</i> -(4-hidroxifenetil)benzamida (16) obtida por CALB.....	195
4.3.4 Sínteses da <i>N</i> -(3-amino-2-hidroxipropil)-2-hidroxibenzamida (17) e 2-hidroxi- <i>N</i> -(2-hidroxipropil)benzamida (19) catalisadas por CALB	199
4.3.4.1 Caracterização da <i>N</i> -(3-amino-2-hidroxipropil)-2-hidroxibenzamida (17) obtida por CALB	202
4.3.4.2. Caracterização da 2-hidroxi- <i>N</i> -(2-hidroxipropil)-benzamida (19) obtida por CALB	204
4.4 Reação da 2-hidroxi- <i>N</i> -(2-hidroxipropil)-benzamida (19) e o oleato de etila (20) catalisada por CALB.....	207
4.4.1. Caracterização do oleato de 1-(2-hidroxibenzamido)propano-2-ila (21) obtida por CALB	211
5. CONCLUSÃO	215
6. REFERÊNCIAS	217

Apresentação

Os cosméticos são produtos comercialmente disponíveis utilizados para melhorar a aparência da pele. Desde o final da década de 1980, um aumento na demanda do mercado consumidor por produtos mais eficazes tem impulsionado o desenvolvimento nos setores de pesquisa de matérias-primas cosméticas (MAUGARD 2003). O resultado pode ser observado pela produção de ingredientes voltados não apenas para o lado estético, mas que causem efeitos benéficos à saúde. Entre estes ingredientes, encontram-se os antioxidantes, destinados a proteger a pele dos efeitos nocivos da radiação ultravioleta e do envelhecimento causado pelos radicais livres.

A pele é constituída por uma barreira protetora denominada camada córnea, a qual é mantida por um filme *hidrolipídico*. Esta barreira limita a permeabilidade de produtos através da pele, onde se faz necessário que moléculas apresentem propriedades físico-químicas ideais para atuar neste ambiente (KIM *et al.* 2010). Neste contexto, moléculas anfifílicas (presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos) poderão ser componentes ideais em formulações cosméticas atuando contra a ação de radicais livres e o consequente envelhecimento cutâneo. Desta forma, se a bicamada lipídica sofre um dano, a aplicação destes produtos terá a tendência natural de levar a sua regeneração e de protegê-la contra ação de novos radicais livres. Em geral, os processos químicos industriais aplicados para a obtenção destas moléculas envolvem reações de hidrólise e de interesterificação, utilizadas para modificar suas características físicas, mantendo sua atividade. As limitações desses processos estão associadas, principalmente, aos tipos de catalisadores químicos empregados, envolvendo temperaturas superiores a 200°C, gerando subprodutos indesejáveis, bem como um elevado gasto energético (SCHORKEN & KEMPERS 2009).

Neste trabalho, foi desenvolvido um processo biotecnológico onde a enzima lipase de *Candida antarctica* foi utilizada gerando produtos com altos rendimentos em um processo livre de solventes. Neste contexto, a tecnologia enzimática vem se apresentando como uma alternativa atrativa para a exploração na indústria de produtos cosméticos. O trabalho descrito neste capítulo foi desenvolvido durante o Doutorado Sanduíche, realizado no Centro de pesquisas francês *BioEurope Solabia Groupe*. Criado em 1972, O grupo *Solabia* é especializado na manufatura de matérias-primas destinadas a um vasto campo de aplicações nas áreas cosmética, farmacêutica, nutricional e biotecnológica. Com domínio de conhecimentos complementares em química fina e extração vegetal, emprega metodologias que envolvem diferentes tipos de reações por biocatálise. Composto por quatro centros de

pesquisas e desenvolvimento (P&D) localizados na região parisiense, o grupo *Solabia* também possui uma filial em Maringá-PR, Brasil.

Figura 1 - Centro de pesquisas onde foi realizado o Doutorado Sanduíche, Anet-França.



Este trabalho foi realizado sob a supervisão de Dr. Florent Yvergnaux, Diretor do *Bioeurope Solabia Groupe* e Vice-diretor de um grande pólo empresarial, o “*Cosmetic Valley*”, que reúne profissionais envolvidos na pesquisa, desenvolvimento e comercialização de produtos de marcas como *L’oreal*, *Dior*, *Paco Rabanne*, *Chanel*, *Unilever* e *Yves Saint-Laurent*. As pesquisas também foram supervisionadas pelo Doutor Mario Gonçalves, chefe de equipe de pesquisas químicas da *Solabia*, envolvendo a síntese de amidas graxas, amidas fenólicas e moléculas anfifílicas voltadas para aplicação cutânea.

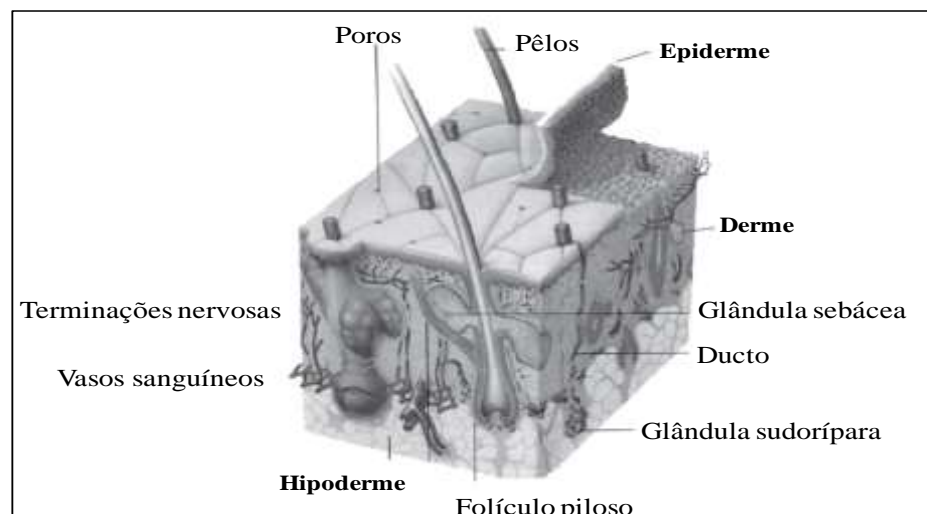


1 INTRODUÇÃO

1.1 A pele, um órgão multifuncional

A pele é o órgão mais extenso do corpo humano, correspondendo a aproximadamente 15% do peso corporal e 1,80 m² em um adulto de porte médio (SIMON 2013). Este órgão reveste o organismo, protegendo-o do meio exterior e participando de forma interativa do sistema como um todo. Com atuação dinâmica, a pele mantém a homeostasia do organismo através de mecanismos como: termorregulação, controle hemodinâmico, síntese e excreção de metabólitos (AZULAY & AZULAY 2011). Estruturalmente, a pele é composta por três tecidos principais: a *hipoderme*, a *derme* subjacente e a *epiderme*, camada superficial (Figura 2) (ANISSIMOV *et al.* 2013).

Figura 2 - Constituintes fisiológicos da pele (ANISSIMOV *et al.* 2013).



A *hipoderme* é a camada mais profunda da pele. É representada por um tecido adiposo que une a derme aos órgãos profundos. É constituída de células adiposas, as quais apresentam uma grande quantidade de lipídios. Desta forma, esta camada pode ser considerada um depósito de energia, responsável pela conservação da temperatura corporal e amortecimento mecânico (ANISSIMOV *et al.* 2013).

A *derme* é representada por um tecido conjuntivo, composto por estruturas fibrosas, onde se encontram os folículos pilosos, terminações nervosas² e glândulas sudoríparas³. Este tecido possui vasos sanguíneos e linfáticos, responsáveis pela hemorregulação e transporte de fármacos para a circulação sistêmica (AZULAY & AZULAY 2011). Em seu sistema metabólico são sintetizados hormônios, vitaminas, melanina (um fotoprotetor natural) e o colágeno, uma proteína amplamente distribuída pelos tecidos conjuntivos que provê resistência e elasticidade ao tecido (VAN ZUIJLEN *et al.* 2003). Sua interação com a epiderme é fundamental, pois representa a principal fonte de nutrição e hidratação para a camada subjacente (AZULAY & AZULAY 2011).

A *epiderme* é um tecido epitelial não irrigado por vasos sanguíneos e suas células são mantidas por difusão de água e nutrientes provenientes da derme. Como estes tecidos apresentam uma relação de simbiose, a epiderme assegura as funções das camadas subjacentes, exercendo sua principal função: proteger o meio interno contra agressões externas e impedir a perda de substâncias endógenas (SIMON 2013, HAFTEK 2003).

A epiderme é um tecido de defesa, responsável por produzir a camada córnea. A camada córnea representa o limite entre o organismo e o meio exterior, exercendo uma função de barreira de proteção (DA SILVA *et al.* 2007). No entanto, esta barreira não é completamente impermeável, pois é o local de ação de produtos benéficos como hidratantes protetores solares, repelentes e o canal para o transporte de fármacos para as camadas mais profundas, como os antialérgicos para a derme e os anti-inflamatórios para a hipoderme (ANISSIMOV *et al.* 2013). A permeabilidade destes produtos é possível desde que apresentem compatibilidade com a estrutura única da epiderme, o que torna seu conhecimento necessário para a projeção de novas moléculas ativas (COUTURIER & YVERGNAUX 2009).

1.2 Epiderme

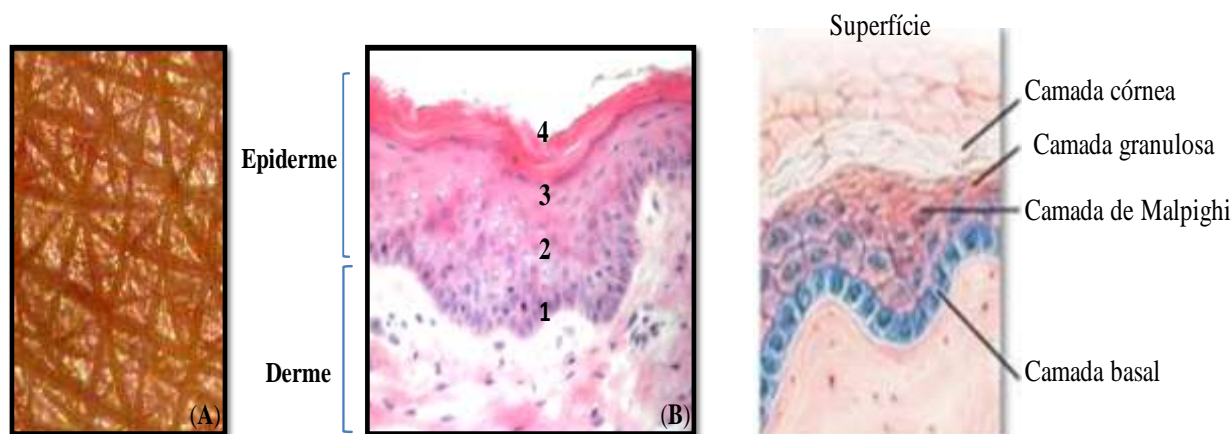
A epiderme tem uma espessura média de 1,00 a 4,00 mm, sendo maior em áreas mais expostas como as palmas das mãos e mais fina nas pálpebras (DRÉNO 2008). Superficialmente, apresenta depressões que se entrecruzam em formas poliédricas, as quais

²Terminações nervosas atuam no reconhecimento sensorial (tato, dor, frio, calor), sendo mecanismos de defesa.

³ Glândulas sudoríparas controlam a temperatura, elevando a sudorese quando a perda de calor se faz necessária (AZULAY & AZULAY 2011).

variam em função de fatores cronológicos⁴, ambientais e estilo de vida (Figura 3A) (GUIMBERTEAU *et al.* 2010).

Figura 3 - Estrutura superficial (A) e interna (B) da epiderme (GUIMBERTEAU *et al.* 2009).



Internamente, a epiderme é dividida em quatro camadas: Basal (1), de Malpighi (2), Granulosa (3) e Córnea (4) (Figura 3B). A *composição celular* da epiderme é essencialmente feita de queratinócitos (cerca de 80%) em constante transformação, além de uma pequena fração de melanócitos (responsáveis pelo pigmento), células de Langerhans (imunológicas) e células de Merkel (sistema nervoso) (DUBERTRET & RIVIER 2000). Os queratinócitos são produzidos com alto índice de multiplicação celular (mitose) na camada basal (1). À medida que estas células migram para as camadas superiores, passam por um *processo de diferenciação*, que levam a produção de *moléculas essenciais* para a formação da *camada córnea* (4), a mais superficial da pele que compõem a barreira de proteção cutânea (COUTURIER & YVERGNAUX 2009).

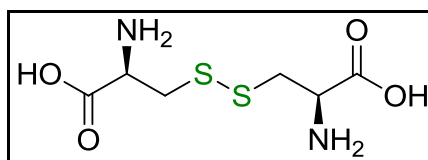
1.2.1 Moléculas produzidas durante a diferenciação dos queratinócitos

Queratina: São proteínas fibrosas, responsáveis por conferir elasticidade e força mecânica à camada córnea, sem as quais ocorreria ruptura ou morte celular (GU & COULOMBE 2006). Possuem aminoácidos do tipo cistina, que apresentam átomos de

⁴As rugas e marcas de expressão podem apresentar profundidade de 100 μm e muitos mm de comprimento.

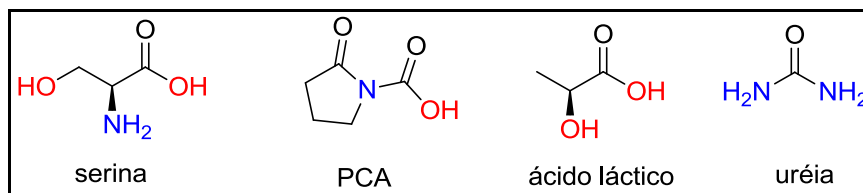
enxofre ligados por pontes dissulfeto, as quais estabilizam fortemente a estrutura protéica (Figura 4) (LEHNINGER 2000).

Figura 4 - Estrutura molecular da cistina.



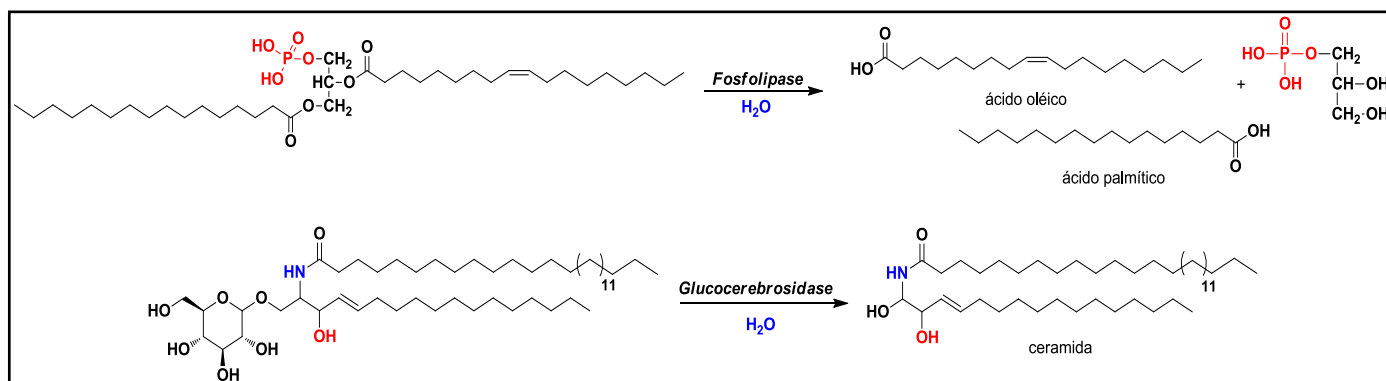
Moléculas hidrofílicas: São principalmente aminoácidos livres, ácido pirrolidônico carboxílico (PCA), ácido láctico e uréia (Figura 5). As moléculas hidrofílicas são conhecidas na indústria cosmética como NMFs (*Natural Moisture Factors*), sendo fundamentais para hidratação devido suas características higroscópicas e hidrossolúveis (COHEN-LETESSIER 2009). Os NMFs também regulam o pH cutâneo ao intervir na manutenção da acidez, conferindo ação tamponante frente à adição de substâncias (Figura 5). Esta ação é importante para evitar o crescimento bacteriano e a proliferação de fungos oportunistas (MORGANTI *et al.* 2001, MASSON 2010).

Figura 5 - Moléculas hidrofílicas ou NMFs.



Lipídios: Os queratinócitos produzem quantidades crescentes de lipídios, que, até a camada granulosa, são constituídos por fosfolipídios, glicosilceramidas, ácidos graxos e colesterol (HAFTEK 2003). Na camada granulosa estes lipídios são mantidos em pequenos grânulos lamelares e na interface com a camada córnea, estas moléculas são extruídas para o meio celular, onde passam por transformações enzimáticas. Enzimas fosfolipases (hidrolases) do meio provocam a degradação de fosfolipídios em ácidos graxos livres, assim como glucocerebrosidades levam a formação de ceramidas através de desglicolização (Esquema 1) (HAFTEK 2003, WERTZ 1996).

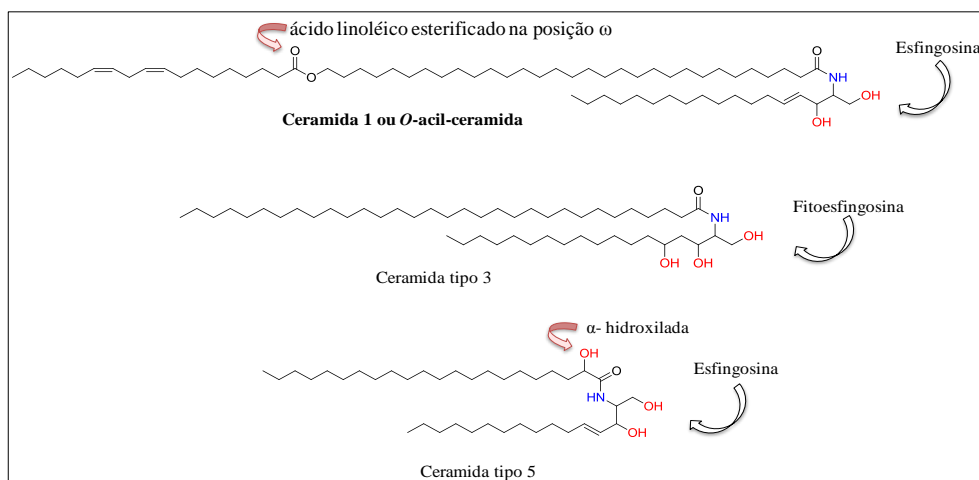
Esquema 1 - Produção de ácidos graxos livres e ceramidas através de hidrólise enzimática.



Assim, o conteúdo lipídico que chega à camada córnea é constituído por ceramidas (50%), colesterol (25-30%) e ácidos graxos (10-15%), além de uma pequena porção de sulfato de colesterol (UCHIDA & HOLLERAN 2008). As ceramidas representam a classe dominante, sendo subdivididas em doze espécies devido à heterogeneidade molecular (BASSE *et al.* 2013).

Estas moléculas diferem entre si pela estrutura polar (esfingosina ou fitoesfingosina) em uma de suas extremidades (*head group*) e pelo comprimento de sua cadeia carbônica (Figura 6) (UCHIDA & HOLLERAN 2008) Em comum, todas apresentam uma função amida ligada a ácidos graxos, que podem se apresentar como o ácido linoléico esterificado na posição ômega⁵, não-hidroxilados ou α -hidroxilados (COUTURIER & YVERGNAUX 2009).

Figura 6 - Estrutura das ceramidas do tipo 1, 3 e 5.



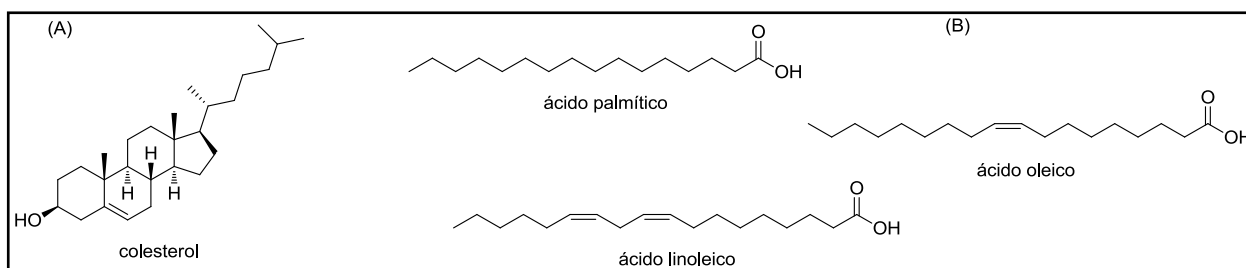
⁵Posição final de uma cadeia carbônica.

As ceramidas têm um papel essencial na estruturação e manutenção da função de barreira de permeabilidade da pele formando estruturas ordenadas de longa periodicidade em conjunto com os outros lipídios do estrato córneo (MACHELEIDT *et al.* 2002).

A molécula de colesterol (25-30% da constituição) apresenta quatro anéis rígidos de carbono (Figura 7A), os quais são fortemente ligados uns aos outros, tornando as membranas da camada córnea menos flexíveis (MORGANTI *et al.* 2001). Estes lipídios geralmente não se acomodam bem nas bicamadas lipídicas, sendo importantes para aumentar a espessura e diminuir a permeabilidade das membranas (WERTZ 1996).

Os ácidos graxos (10-15%) são ácidos carboxílicos com cadeias hidrocarbônicas de 4 a 36 átomos. Em alguns ácidos graxos esta cadeia é totalmente saturada, como o ácido palmítico, enquanto os ácidos graxos monoinsaturados (ácido oleico) ou poli-insaturados (ácido linoleico) contêm uma ou mais ligações duplas (Figura 7B) (LEHNINGER 2000). Devido sua relevância para este trabalho, os ácidos graxos serão descritos com maiores detalhes posteriormente.

Figura 7 - (A) Molécula de colesterol, (B) Ácidos graxos saturados e insaturados.



Reunidos, estes lipídios representam importantes componentes estruturais para as membranas, pois estão envolvidos em processos de crescimento e diferenciação celular, na transdução de sinais, regulação de expressão gênica, atuando ainda como fonte de energia para o metabolismo (KIM *et al.* 2010).

1.2.2 Processo de queratinização da camada córnea

A produção de todas as moléculas citadas (queratina, moléculas hidrofílicas e lipídios) encerra o processo de diferenciação dos queratinócitos, que ao chegarem à superfície epidérmica sofrem apoptose transformando-se em células anucleadas, denominadas *corneócitos* (DRÉNO 2008).

Os corneócitos distribuem-se em várias camadas, que progressivamente sofrem descamação para o meio exterior, correspondendo às “células mortas” da pele. No entanto, em uma pele saudável, à medida que são “perdidos”, novos queratinócitos são produzidos na camada basal, os quais passam por diferenciações e produzem continuamente moléculas essenciais para a formação da camada córnea. Este processo é conhecido como *queratinização* (mitose, diferenciação e apoptose dos queratinócitos), que ocorre em média, a cada 28 dias (PAPPINEN *et al.* 2008).

O processo de queratinização é também conhecido como “*turnover*” celular, sendo o responsável pela renovação constante da epiderme. Esta renovação é possível graças à organização dos lipídios e corneócitos na camada córnea (UCHIYAMA *et al.* 2000, HAFTEK 2003).

1.2.3 A organização molecular na camada córnea

A camada córnea corresponde a uma barreira de 15-20 μm , constituída por diversas camadas de corneócitos embebidos em uma matriz lipídica intercelular (NOVOTNÝ *et al.* 2010, ANDREWS *et al.* 2011). Os corneócitos são constituídos em seu interior por filamentos densos de queratina (razão de sua rigidez) e em seu exterior são envolvidos por um *envelope lipoproteico* (PAPPINEN *et al.* 2008).

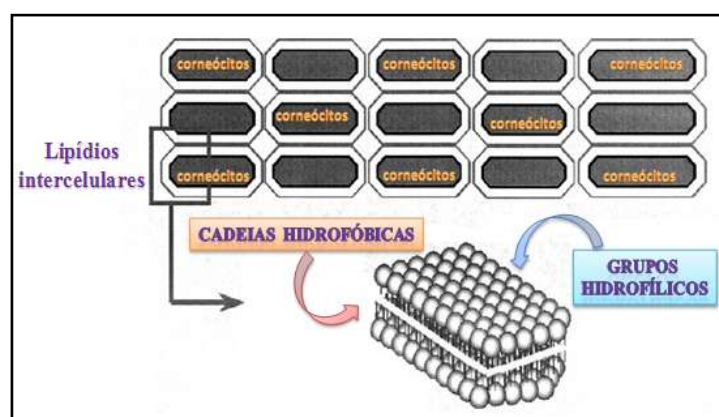
Os lipídios permanecem preenchendo o espaço intercelular, onde se organizam em bicamadas, mantendo suas cadeias hidrofóbicas voltadas para o interior e os grupos hidrofílicos direcionados para o exterior (VEKMAN 2005). Estes lipídios dispõem-se ainda, em duas fases lamelares cristalinas com espaçamentos de aproximadamente 13 nm e 6 nm, referidos como fase de longa periodicidade (FLP) e fase de periodicidade curta (FPC), respectivamente (BIKMAN & SUMMERS 2011). Esta organização proporciona uma verdadeira barreira contra a invasão de organismos patogênicos, da mesma forma que protege a pele contra traumatismos mecânicos (BARONI *et al.* 2012). Sua principal função é estabelecer uma barreira oclusiva, contra a perda de água e entrada de xenobóticos (MASSON 2010).

A camada córnea é responsável por regular o fluxo hídrico impedindo a evaporação desregular⁶ de água e de moléculas hidrofílicas (NMFs). A retenção de água (proveniente da derme) é essencial tanto para manter sua hidratação e flexibilidade quanto para proporcionar o

⁶ Estima-se uma perda de 100-150 mL de água/dia em uma pele saudável (DA SILVA *et al.* 2007).

melhor ambiente para as enzimas, que envolvidas em vias metabólicas, formam os lipídios intercelulares da camada córnea (NANAYAKKARA *et al.* 2005). As diversas camadas de corneócitos fornecem uma estrutura rígida e resistente para o conteúdo lipídico, que por sua vez é fundamental para coesão entre os corneócitos (MADSON 2003). Por esta razão, a camada córnea é frequentemente descrita como uma “parede”, onde os corneócitos representam os tijolos, e o conteúdo lipídico, a única região contínua da camada córnea, se assimila ao cimento (Figura 8) (MOLINA 2008, MASSON 2010, ELIAS 2012).

Figura 8 - Modelo “tijolos e cimento” da camada córnea.



1.3 Modificações no conteúdo lipídico e sua relação com doenças e envelhecimento precoce

Qualquer modificação na composição lipídica da camada córnea pode resultar em distúrbios na barreira de proteção (JENSEN & PROKSCH 2009). Se as condições da barreira não forem adequadas, a água move-se rapidamente através da epiderme, produzindo um fenômeno conhecido como *perda de água transepidérmica* (SIMON 2013). Esta situação gera alteração no metabolismo dos queratinócitos e ressecamento da pele, sendo o evento central de doenças como dermatite atópica, ictiose e psoríase.

Estudos indicam que portadores de dermatite atópica apresentam mudanças no conteúdo lipídico, como diminuições nas concentrações de ceramidas tipo 1 e ácidos graxos poli-insaturados (BITO & NISHIGORI 2012). Em um estudo comparativo com peles saudáveis, peles que apresentam dermatite atópica demonstram uma diminuição de 50% da concentração lipídica presente na camada córnea (MACHELEIDT *et al.* 2002). Este quadro aumenta a permeabilidade de substâncias alérgicas e microrganismos, os quais causam ou

agravam inflamações, gerando um ciclo vicioso na degradação da barreira de proteção (COUTURIER & YVERGNAUX 2009).

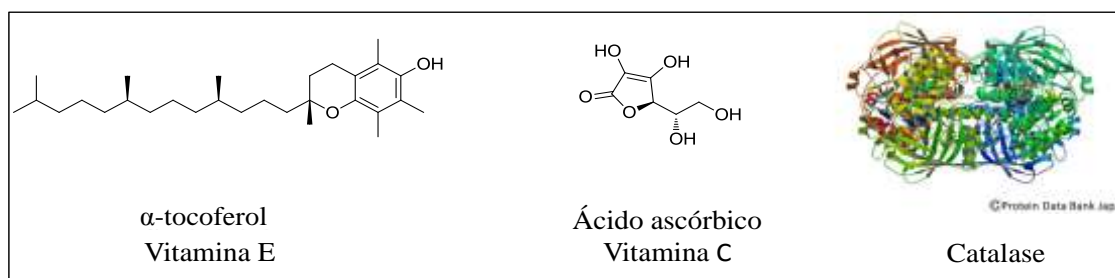
Teorias indicam que o envelhecimento cutâneo também está relacionado a modificações no conteúdo lipídico. O envelhecimento cronológico envolve a deterioração progressiva de funções fisiológicas, como a função de barreira protetora da pele, as quais prejudicam a habilidade do organismo em manter sua homeostase (HARMAN 2001). No entanto, este processo pode ser acelerado quando os lipídios intercelulares são danificados, como ocorre em processos oxidativos.

A oxidação de lipídios produz peróxidos lipídicos que podem reduzir a fluidez das membranas, inativar proteínas ligadas à membrana e favorecer a expressão de enzimas que degradam ou diminuem a síntese de colágeno na derme, induzindo a formação de marcas de expressão (MARTIN & GROTEWIEL 2006, KIM *et al.* 2010). A oxidação de lipídios pode ser ocasionada por fatores cronológicos e estimulada por fatores exógenos, como poluição, estresse, fumo, bebidas alcoólicas e especialmente, pela incidência de radiação ultravioleta, que induzem a produção de espécies reativas de oxigênio, como os radicais livres (HIRATA *et al.* 2004, PINNELL 2003).

1.4 Os radicais livres e o estresse oxidativo

Um radical livre é qualquer espécie química que apresente um ou mais elétrons desemparelhados ocupando um orbital atômico ou molecular. A presença deste elétron implica em alta instabilidade e induz a troca de elétrons com moléculas adjacentes (PRYOR 1984, HALLIWELL & GUTTERIDGE 2007). As *Espécies Reativas* centradas no átomo de Oxigênio (EROs) são os radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$), superóxido ($\cdot\text{O}_2$) e peroxila ($\cdot\text{OOH}$) juntamente com espécies que embora não apresentem elétrons desemparelhados, são capazes de iniciar reações oxidativas e gerar novos radicais livres, tal como o oxigênio molecular (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (PINNELL 2003).

No organismo os radicais livres são gerados naturalmente através de processos respiratórios e em concentrações adequadas, são funcionais como moléculas de defesa e sinalização (CATALÁ 2010). Muito embora sejam agentes oxidantes, os tecidos cutâneos dispõem de um sistema integrado que protege alvos biológicos da oxidação, composto por antioxidantes lipossolúveis, como o α -tocoferol (vitamina E), hidrossolúveis, como o ácido ascórbico (vitamina C) e enzimáticos (catalase, superóxido dismutase) (Figura 9) (MASAKI 2010, MCLEAN *et al.* 2005).

Figura 9 - Antioxidantes naturais da pele: vitamina E, vitamina C e catalase.

No entanto, a incidência de radiação ultravioleta (UVA e UVB⁷) proveniente da luz solar associada a um estilo de vida não saudável estimulam a formação de espécies reativas de oxigênio, gerando um desequilíbrio entre os sistemas oxidantes e antioxidantes do organismo (BALOGH *et al.* 2011).

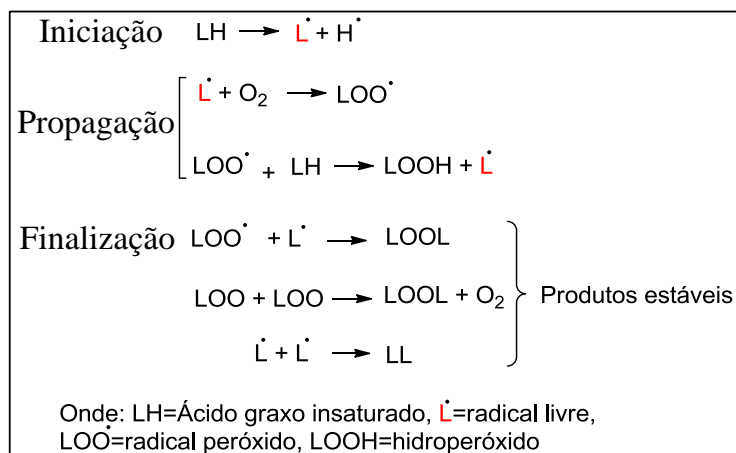
Este desequilíbrio é conhecido como *estresse oxidativo*, que induz a degeneração de biomoléculas como fosfolipídios, glicosilceramidas, ceramidas, ácidos graxos poli-insaturados e colesterol (ZIMNIAK 2011). Este processo gera inibição do metabolismo e compromete o processo de queratinização, uma vez que não apenas os lipídios da camada córnea são degenerados, mas seus precursores nas camadas subjacentes. A maior consequência do estresse oxidativo é a peroxidação lipídica, onde particularmente os ácidos graxos são susceptíveis à degeneração (ANDREASSI & ANDREASSI 2002, LASCH *et al.* 1997). Os ácidos graxos poli-insaturados são as estruturas mais suscetíveis ao processo oxidativo, havendo uma dependência direta entre o grau de insaturação e a susceptibilidade à oxidação (SOARES 2002).

1.5 Peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados

A reação entre as espécies reativas de oxigênio e os ácidos graxos poli-insaturados (*Poly Unsaturated Fatty Acids*: PUFAs) presentes nas membranas celulares inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou liperoxidação (LIMA & ABDALLA 2001). O processo de peroxidação é caracterizado por três etapas: iniciação, propagação e finalização (Esquema 2) (PINNEL 2003).

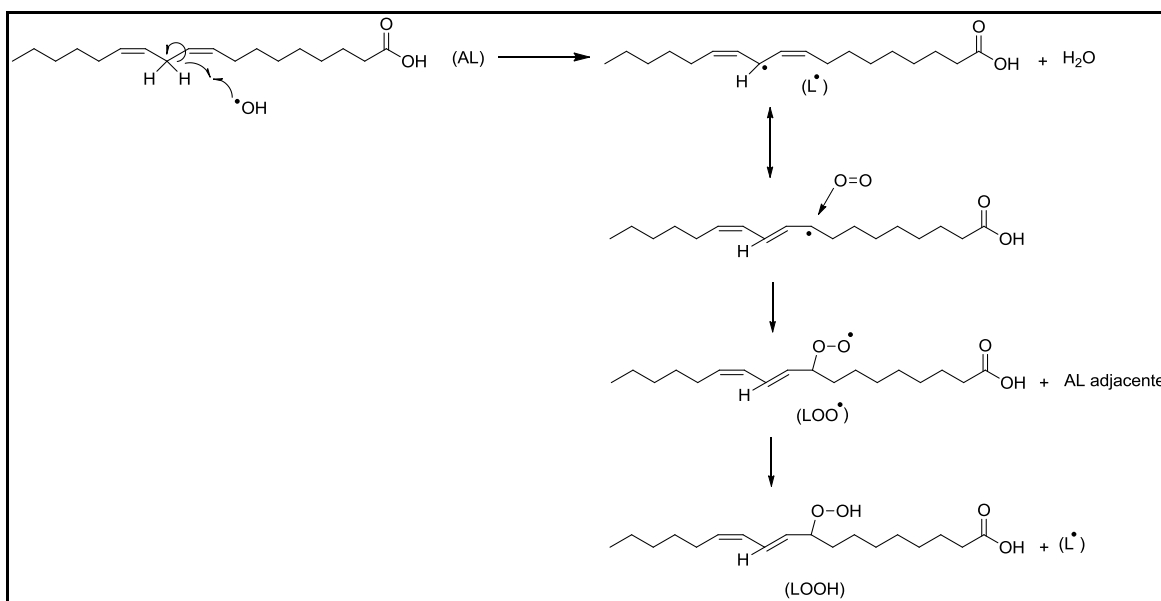
⁷Associam-se à radiação UVA (λ 400- 320 nm) os efeitos do envelhecimento precoce da pele e a radiação UVB (λ 320-280 nm) inflamações e carcinogênese (Balogh *et al.* 2011).

Esquema 2 - Esquema geral da peroxidação lipídica.



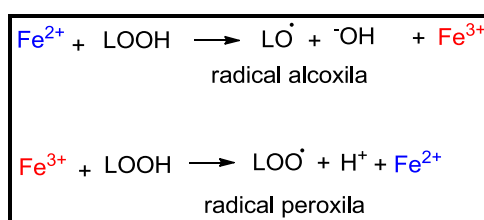
Tipicamente, o radical hidroxila ($\cdot OH$) é o *iniciador*, via abstração de um átomo de hidrogênio ou por adição às ligações duplas de *PUFAs*, tal como o ácido linoleico (PRYOR 1984). A abstração do hidrogênio gera um radical lipídico ($L\cdot$), que por sua vez, reage com oxigênio molecular para formar o radical peroxila ($LOO\cdot$) (CATALÁ 2010). Os *radicais peroxilas* são subprodutos eletrofílicos que geram reações em cadeia com moléculas adjacentes, as quais se propagam sem a entrada de novas espécies de oxigênio (ZIMNIAK 2011). Esses radicais *propagam* a peroxidação, pois podem abstrair um átomo de hidrogênio de um ácido graxo adjacente, gerando hidroperóxido ($LOOH$) e um novo radical lipídico ($L\cdot$) (Esquema 3) (HALIWELL 2011).

Esquema 3 - Mecanismo de peroxidação lipídica.



Consecutivamente, o radical lipídico (L^{\bullet}) pode iniciar um novo ciclo de reações e o hidroperóxido de lipídio (LOOH) pode reagir com metais de transição presentes em grupos prostéticos de enzimas do sistema celular, como por exemplo, o Ferro e o Cobre, gerando novos radicais alcoxila (LO^{\bullet}) e peroxila (LOO^{\bullet}), os quais continuam a oxidar as ligações insaturadas enquanto houver ácidos graxos e oxigênio molecular disponíveis (Esquema 4) (CATALÁ 2010, GUARANTINI *et al.* 2002).

Esquema 4 - Formação de radicais alcoxila e peroxila.



A *finalização* das reações ocorre quando dois radicais se recombinaem formando um dímero não-radicalar estável, ou quando espécies antioxidantes capturam radicais livres para neutralizá-los (PRYOR 1984). Este é papel de antioxidantes do organismo, porém, como estas espécies são comprometidas pelo *estresse oxidativo*, uma maneira eficaz de proteger o sistema de proteção endógeno se encontra na aplicação tópica de antioxidantes (SALIOU *et al.* 1999).

1.6 Os antioxidantes

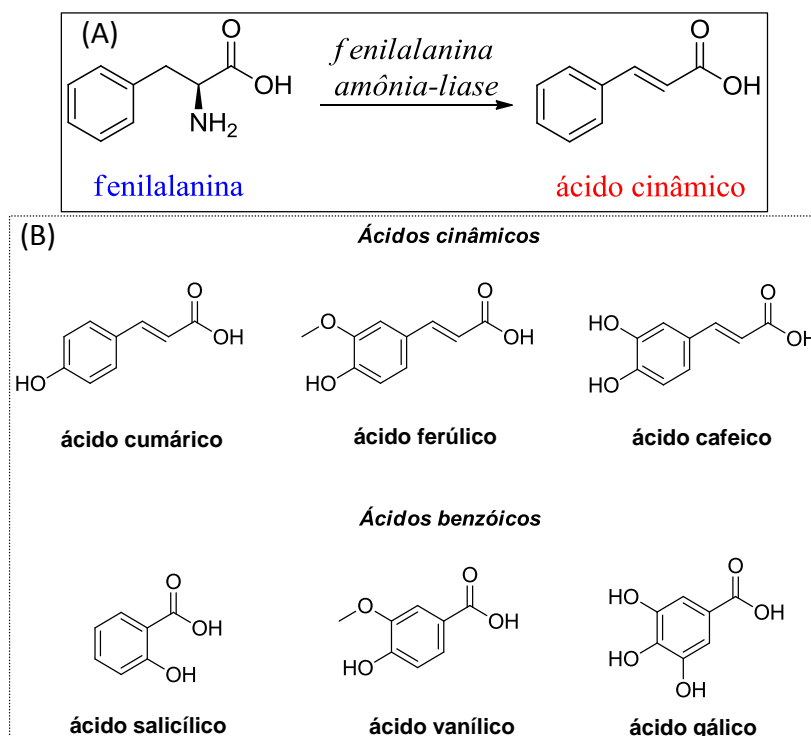
“*Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada a do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo*”. Os antioxidantes são substâncias que previnem ou retardam a oxidação de lipídios, ao inibirem a iniciação ou a propagação de reações de oxidação em cadeia (HALLIWELL & GUTTERIDGE 2007). Estes compostos também são capazes de reparar danos ocasionados às células pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) (HALLIWELL 2011). Entre os compostos que se destacam pela atividade antioxidante, encontrados tanto na natureza quanto na forma sintética, encontram-se os *ácidos fenólicos* (KOOLEN *et al.* 2013).

1.6.1 Ácidos fenólicos

A aplicação tópica de ácidos fenólicos é uma estratégia bem sucedida para suprir deficiências antioxidantes do organismo e proteger a pele contra danos mediados pela radiação ultravioleta (SAIJA *et al.* 2000). Os ácidos fenólicos são divididos entre ácidos cinâmicos (C₆-C₃) e ácidos benzóicos (C₆-C₁), caracterizados por apresentar um grupo carboxílico e um anel benzênico substituído com um ou mais grupos hidroxilas ou metoxilas (Halliwell *et al.* 1995).

Os ácidos fenólicos são produtos do metabolismo de um amplo número de plantas, derivados da fenilalanina (DICKERSON *et al.* 1984). Este aminoácido é convertido pela enzima *fenilalanina amônia-liase* em ácido cinâmico, que passa posteriormente por uma série de transformações gerando uma diversidade de ácidos fenólicos naturais (Figura 10) (DICKERSON *et al.* 1984, CHEN *et al.* 2006).

Figura 10 - (A) Ácido cinâmico obtido a partir da amônia-liase, (B) Ácidos fenólicos.



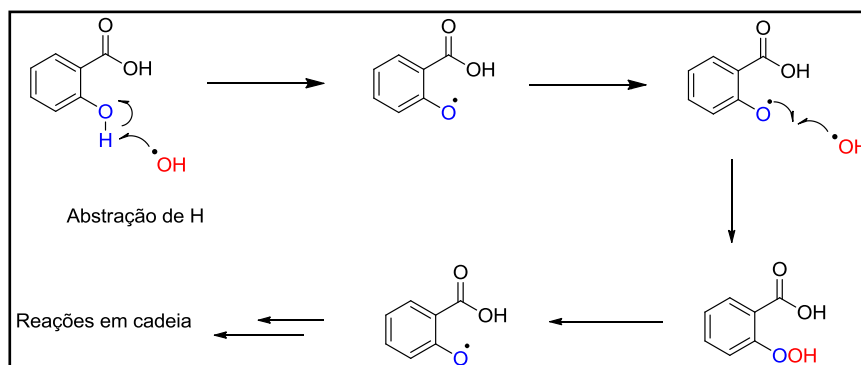
Existe uma correlação entre a atividade antioxidante de substâncias polares e sua capacidade de retardar o envelhecimento das células (BARREIROS & DAVI 2006). Grupos hidroxilas associados aos compostos fenólicos são os mais comuns e efetivos “sequestradores

de radicais livres”, pois estes doam um elétron ou um átomo de hidrogênio para interceptar e converter radicais livres em compostos estáveis (Figuerola-Espinoza & Villeneuve 2005).

Neste contexto, a presença de uma ou mais hidroxilas ligadas ao anel benzênico caracteriza os ácidos fenólicos como nucleófilos, que podem doar elétrons aos radicais livres eletrofílicos (deficientes em elétrons), caracterizando-os como hábeis antioxidantes (AL-AZZAWIE & MOHAMED-SAIEL 2006).

Em substratos biológicos, os ácidos fenólicos podem inativar as reações radicalares agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (BITO & NISHIGORI 2012). No Esquema 5 é mostrada a atuação do ácido salicílico contra a ação de um radical hidroxila. Este antioxidante é capaz de inativar o radical na fase de iniciação e prevenir a abstração de átomos de hidrogênio dos ácidos graxos. Neste tipo de reação são formados radicais fenólicos intermediários estáveis devido a estrutura de ressonância do anel aromático (Esquema 5) (SOLOMONS 2005, YAMAMOTO 2001).

Esquema 5 - Reação entre o ácido salicílico e o radical hidroxila.



Além de doar átomos de hidrogênio aos radicais livres, os antioxidantes podem atuar como quelantes de íons metálicos envolvidos na produção de EROs, que levam à formação de peróxidos (KOOLEN *et al.* 2013). Outro interesse ligado aos antioxidantes é a sua aplicação na indústria, os quais prolongam o prazo de validade de cosméticos, fármacos e alimentos, prevenindo sua decomposição oxidativa pela ação da luz, temperatura e umidade (BARREIROS & DAVI 2006). Devido ao potencial antioxidante e suas interessantes propriedades, o *ácido salicílico* foi selecionado para este trabalho para produção de amidas graxas.

1.6.2 Ácido salicílico

O ácido salicílico é conhecido por apresentar propriedades queratolítica (esfoliante), antimicrobiana e anti-inflamatória. Este ácido é tipicamente utilizado no tratamento de acne, dermatite seborreica (caspa), hiperqueratose⁸ e doenças caracterizadas por intenso ressecamento e descamação da pele, como psoríase e ictiose (SINTOV *et al.* 2002).

Além da finalidade terapêutica, o ácido salicílico representa um ingrediente chave em formulações cosméticas, recebendo um enorme interesse nos setores industriais cosméticos e farmacêuticos. A ação do ácido salicílico ocorre principalmente através da esfoliação da camada córnea. Segundo estudos, este ácido promove uma descamação ordenada da camada córnea, ao aumentar o espaçamento entre os corneócitos (MERINVILLE *et al.* 2008). O ácido salicílico representa um dos ingredientes mais utilizados em formulações de protetores solares, os quais são capazes de absorver a radiação UV e proteger a pele humana da exposição direta dos comprimentos de onda nocivos da luz solar (YAN *et al.* 2011). Este composto é um β -hidroxiácido, também reconhecido por reduzir a aparência de linhas finas, rugas e manchas encontradas em peles danificadas pela radiação solar (Figura 11) (YAN *et al.* 2011).

Figura 11 - Ácido salicílico e sua participação na formulação de cosméticos.



⁸ Produção excessiva de queratina que acarreta endurecimento da pele.

Embora apresente um leque de propriedades benéficas, devido a sua natureza hidrofílica a aplicação tópica do ácido salicílico pode ser limitada em sistemas de constituição lipídica, como cremes e emulsões (GIRALDO *et al.* 2007). Muitos dos ácidos fenólicos exibem baixa solubilidade e baixa estabilidade em vários sistemas de solventes (STAMATIS *et al.* 2001). Uma forma de expandir sua aplicação é modificar suas propriedades hidrofílicas e aumentar sua hidrofobicidade. A grande maioria dos trabalhos que visam a lipofilização de moléculas polares em processos industriais envolve modificações na estrutura de ácidos fenólicos via esterificação com álcoois alifáticos, através de síntese química conduzida com catalisadores ácidos ou básicos sobre refluxo (STAMATIS *et al.* 2001).

Este processo, além de oferecer pouca seletividade na formação dos produtos, gera água como subproduto, a qual requer tratamento com agentes secantes ou passar por processos de destilação, um inconveniente ao considerar produções em larga escala (Esquema 6). O Esquema 6 demonstra a lipofilização do ácido cafeico através de catalisadores químicos e na Tabela 1 alguns exemplos de processos realizados com ácidos fenólicos.

Esquema 6 - Reação de lipofilização (esterificação) do ácido cafeico.

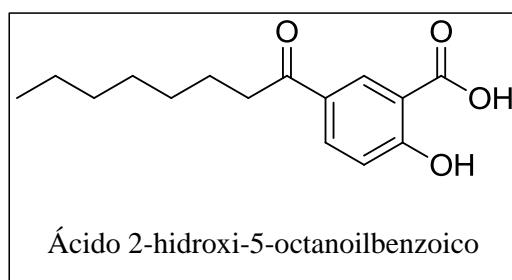


Tabela 1 - Lipofilização de ácidos fenólicos.

Antioxidantes	Compostos hidrofóbicos	Condições	Rend. (%)
Ácido clorogênico	Octanol	Livre de solventes, 60°C, 30 dias.	60
	Dodecanol		40
	Hexadecanol		40
Ácido ferúlico	Octanol	2-Metil-2-propanol 60 °C, sob nitrogênio, 30 dias.	14
Ferulato de etila	Tributirina	Tolueno, 54°C, 5,5 dias.	81
Ácido <i>p</i> -cumárico	Propanol	Hexano/propanol, 30°C, 9 dias.	13
Ácido ascórbico	Ácido oleico	Líquidos iônicos, 60°C, 24 h.	85

Com este objetivo, derivados lipofílicos do ácido salicílico também têm sido desenvolvidos surtindo efeitos similares à molécula progenitora, como é o caso do ácido 2-hidroxi-5-octanoilbenzoico, um lipo-hidroxiácido que demonstrou manter os benefícios contra o envelhecimento cutâneo induzido pela radiação UV (Figura 12) (RESKO *et al.* 2009).

Figura 12 - Derivado lipofílico do ácido salicílico.



Em vista disso, uma alternativa para elevar a permeabilidade do ácido salicílico na camada epidérmica está em sua utilização na forma esterificada. É documentado que esterases cutâneas podem hidrolisar rapidamente o salicilato de etila em ácido salicílico (SINTOV *et al.* 2002). Ésteres de ácido salicílico podem ser aplicados topicamente, submetendo-se à reações de hidrólise com enzimas lipases presentes na pele, transformando-se em metabólitos ativos (MERINVILLE *et al.* 2010).

Estudos clínicos comprovam que a aplicação tópica do salicilato de sódio pode restaurar o empacotamento regular dos lipídios da epiderme, impedindo a entrada de microrganismos e normalizando o “turnover” celular (KORNHAUSER *et al.* 2009). Adicionalmente, ésteres de ácido salicílico podem ser transformados em moléculas menos polares através da ligação com substâncias que elevam a permeabilidade em sistemas lipídicos, tal como os ácidos graxos poli-insaturados. A ligação entre ácidos graxos e ácidos fenólicos pode resultar em lipídios fenólicos estruturados, novas moléculas que podem oferecer numerosos benefícios combinados, como atividade antioxidante, antimicrobiana, anticarcinogênica e antimutagênica (SOROUR *et al.* 2008). O interesse no desenvolvimento deste tipo de produto também está relacionado ao fato de que moléculas anfifílicas (hidrofílicas e hidrofóbicas) podem difundir-se através da estrutura heterogênea dos lipídios da camada córnea (FANG *et al.* 2003).

A entrega tópica de cosméticos e agentes terapêuticos é complexa e envolve superar a barreira de proteção cutânea, em especial, a exercida pela camada córnea. Ao alternar fases

hidrofílicas e hidrofóbicas dentro das bicamadas lipídicas intercelulares, permite-se a difusão de determinados compostos anfílicos, desde que estes apresentem massa molecular, solubilidade e lipofilicidade adequados. Assim, se estas moléculas apresentarem estes requisitos, podem ser candidatas a ingredientes ativos em formulações cosméticas e farmacêuticas para aplicação tópica.

Um exemplo do grande interesse no desenvolvimento deste tipo de molécula pode ser demonstrado pela produção da molécula identificada como [LR 2412], já introduzida no creme *Visionnaire*, comercializado pela renomada marca francesa LANCÔME. Esta molécula é capaz de se propagar por todas as áreas da pele, estabelecendo uma série de micro transformações nos tecidos devido a sua afinidade com os dois tipos de estruturas presentes na pele: aquosas e lipídicas (Figura 13) (LANCÔME, 2013).

Figura 13 - Creme *Visionnaire* produzido com molécula anfílica [LR 2412] pela LANCÔME.



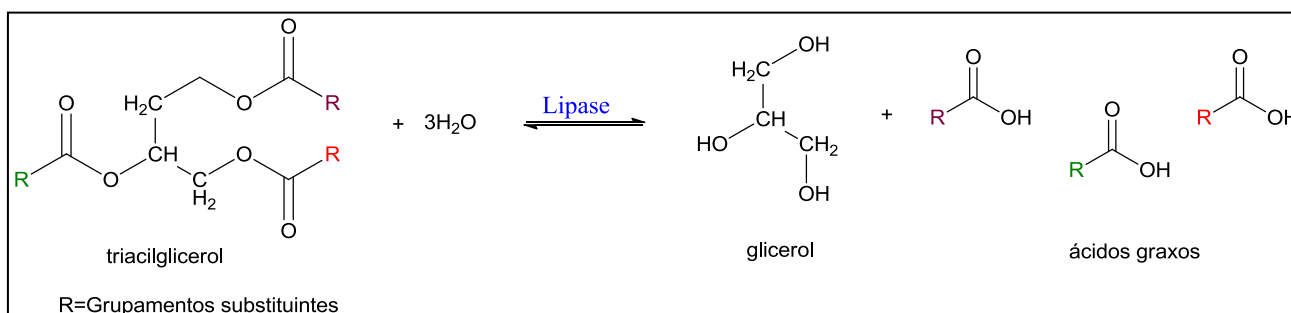
Produtos químicos com massa molecular média de 500 g/mol e adequada solubilidade lipídica são conhecidos por penetrar bem sob a pele (BYUN *et al.* 2012). Esta é a massa média dos produtos que foram projetados para este trabalho, que, como alternativa aos processos químicos convencionais, foram desenvolvidos aplicando-se os princípios de Biocatálise. Neste contexto, as enzimas lipases constituem o grupo mais importante de biocatalisadores para aplicações biotecnológicas (HASAN *et al.* 2006).

1.7 Lipases e sua aplicação no setor cosmético e farmacêutico

As lipases (triacilglicerol éster hidrolases EC 3.1.1.3.) representam as enzimas mais utilizadas em síntese orgânica, sendo considerados os catalisadores mais versáteis no campo de biotecnologia lipídica (KAPOOR & GUPTA 2012). Atuam em uma variedade de aplicações industriais, envolvendo os setores alimentícios, cosmético, farmacêutico, de couro, papel e celulose e detergentes (MATSUDA *et al.* 2009). Estas enzimas provenientes de plantas, animais ou microbianas são comercialmente disponíveis através de fornecedores como Novozymes, Amano, Meito Sangyo ou Biocatalysts Ltda (SCHORKEN & KEMPER 2009).

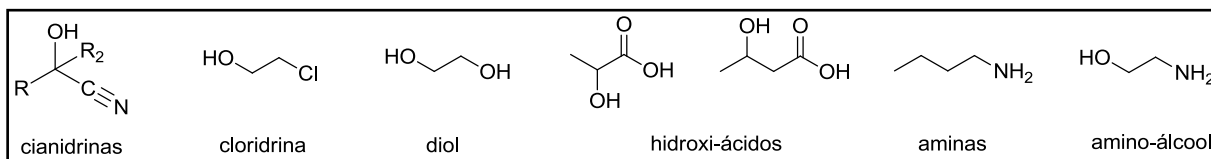
Pertencentes a classe das hidrolases, as lipases catalisam a hidrólise de grupamentos ésteres de triacilgliceróis aos correspondentes ácidos graxos e glicerol, envolvendo o consumo de moléculas de água como nucleófilos do meio natural (Esquema 7) (SAID & PIETRO 2004).

Esquema 7 - Exemplo de reação de hidrólise de triacilglicerídeos.

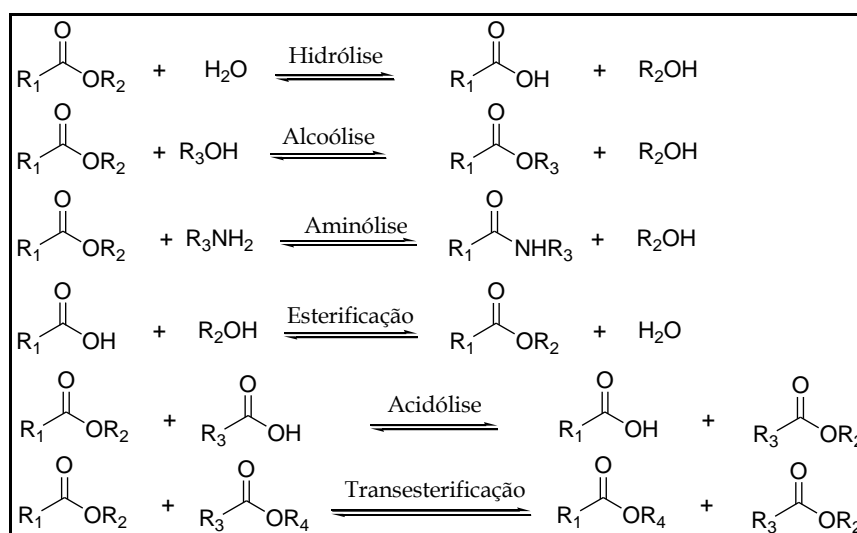


Embora sejam conceitualmente hidrolíticas, as lipases exibem promiscuidade⁹ em relação aos substratos, uma vez que são capazes de catalisar diferentes tipos de reações em adição as que são fisiologicamente especializadas (KAPOOR & GUPTA 2012, ILLANES 2012). Os grupos funcionais sobre os quais as lipases atuam variam grandemente: cianidinas, cloridinas, dióis, α e β -hidroxi-ácidos, aminas e aminoálcoois (Figura 14) (BUSTO *et al.* 2010).

⁹ Segundo KAPOOR & GUPTA 2012, a promiscuidade enzimática é a habilidade das enzimas em catalisar reações alternativas que diferem das realizadas em seu ambiente natural.

Figura 14 - Grupos funcionais sob os quais as lipases atuam.

Em meio orgânico, as lipases catalisam a transferência de grupos acila de compostos doadores para uma ampla variedade de compostos aceptores diferentes da água. Dependendo do tipo de doador acila e do aceptor (nucleófilo), as reações catalisadas por lipases podem ser de alcoólise, aminólise, esterificação, acidólise, transesterificação (HASAN *et al.* 2006). Na Figura 15, têm-se os principais tipos de reações catalisadas por lipases.

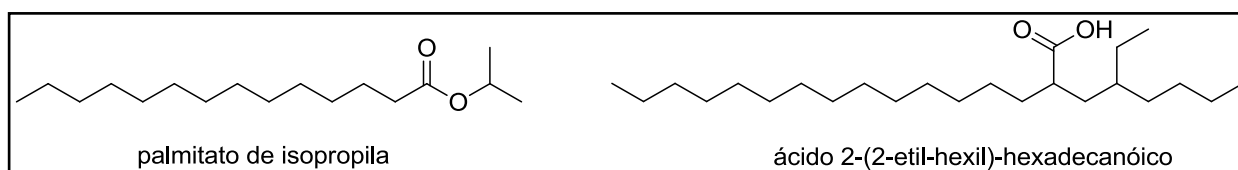
Figura 15 - Principais reações catalisadas por lipases.

As lipases atuam sob condições reacionais brandas de temperatura e pressão, o que se traduz na redução de reações laterais (isomerização, racemização, rearranjos) e de custos com o tratamento de resíduos químicos (ILLANES *et al.* 2012). Embora sejam conhecidas pela atuação em condições reacionais brandas, estes biocatalisadores apresentam elevada estabilidade térmica, pois permanecem ativas em temperaturas próximas a 70°C por longos períodos. Quando imobilizadas, as lipases são robustas, não necessitam de cofatores e apresentam habilidade em catalisar reações sob condições não naturais, como meio anidro e pH extremos. Constituídas por *L*-aminoácidos, são catalisadores quirais, o que lhes confere elevada quimio-, regio- e enantiosseletividade (FABER 2004). Esta é uma característica

fundamental para sua aplicação na síntese de substâncias enantiomericamente puras e uma das justificativas para o fato da biocatálise ser uma poderosa ferramenta de biotecnologia¹⁰ (NAKAMURA 2009). Ainda, quando utilizadas na forma imobilizada podem ser reutilizadas; um conjunto de vantagens atrativo para a implantação em diversos processos em setores industriais, como o cosmético (VILLENEUVE *et al.* 2000).

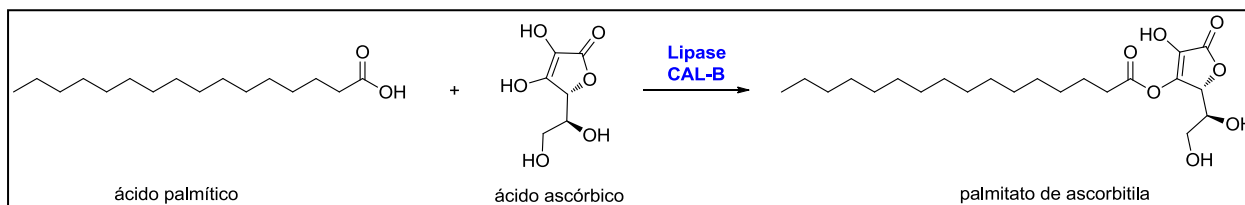
O setor cosmético busca promover processos que envolvam sustentabilidade e matérias-primas renováveis. Com a preocupação sobre custos e a conscientização sobre questões ambientais, a aplicação de lipases apresenta inúmeras vantagens em relação às tecnologias convencionais. A empresa espanhola *Unichem International* lançou a produção do palmitato de isopropila e do ácido 2-(2-etil-hexil)-hexadecanoico, utilizados como emolientes em produtos como bronzeadores solares e óleos de banho. Em todas as sínteses, a enzima lipase Lypozyme de *Rhizomucor miehei* foi utilizada como biocatalisador. A empresa afirma que a substituição de catalisadores químicos pela enzima gerou produtos de qualidade muito superior requerendo mínima purificação (Figura 16) (HASAN *et al.* 2006).

Figura 16 - Palmitato de isopropila e ácido 2-(2-etil-hexil)-hexadecanoico.

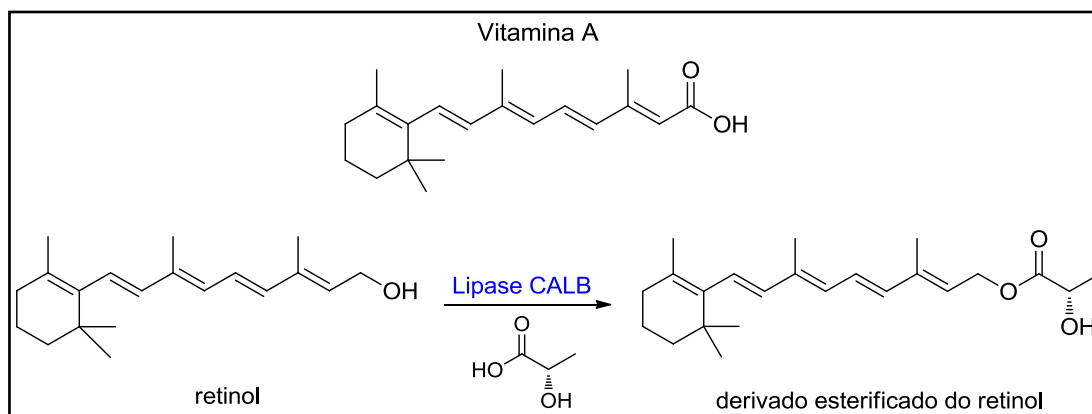


Ésteres de ácidos graxos têm semelhante aplicação em produtos de cuidado pessoal e vêm sendo fabricados pela multinacional inglesa *Croda Universal Ltda.* A empresa utiliza a lipase de *Candida cylindracea* em um reator de lote e embora o custo global da produção seja ligeiramente superior ao método convencional, a qualidade do produto final justifica todo processo. Em geral, sua produção envolve estudos sintéticos que envolvem a hidrofobização de componentes hidrofílicos, como é o caso como na produção do éster antioxidante palmitato de arcorbitila a partir do ácido ascórbico empregando a lipase B de *Candida antarctica* (Esquema 8) (HASAN *et al.* 2006).

¹⁰Estima-se que a biocatálise, também denominada “*White biotechnology*” será responsável pela produção global de 20% de todas as substâncias químicas não-naturais até 2020 (ANTHONSEN 2009).

Esquema 8 - Síntese industrial do palmitato de ascorbitila via CALB.

Os retinóides, derivados do ácido retinóico ou vitamina A, são de grande interesse comercial devido sua aplicação em produtos cosméticos e farmacêuticos para pele. Um trabalho reportou a síntese de derivados do retinol através de hidrólise reversa, alcoólise, acidólise e interesterificação empregando uma variedade de enzimas e solventes; entre estas, as lipases de *Candida antarctica* (Novozym 435) e de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM) foram identificadas como os catalisadores mais efetivos para a acilação do retinol. Embora a lipase de *Rhizomucor miehei* tenha demonstrado a melhor atividade em solventes apolares, tal como o hexano, a lipase B de *Candida antarctica* apresentou a melhor atividade em todos os solventes utilizados (Esquema 9) (MAUGARD 2003).

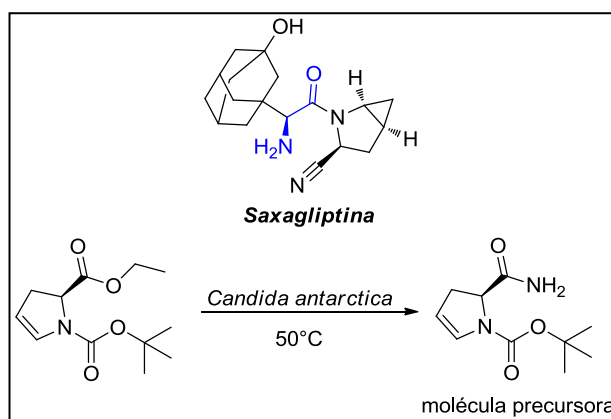
Esquema 9 - Acilação do retinol por lipase CALB.

A lipase imobilizada de *Candida antarctica* também é um catalisador muito eficaz para a produção de amidas usando diferentes procedimentos enzimáticos (SCHÖRKEN & KEMPERS 2009). Estas enzimas são capazes de modificar não apenas ligações ésteres de lipídios, mas catalisar reações como a transformação de compostos amínicos e amídicos (DE ZOETE 1994).

Através de seu mecanismo catalítico, as lipases compõem catalisadores ideais para a síntese de compostos azotados (GOTOR-FERNÁNDEZ *et al.* 2006). Estes compostos podem ser utilizados como intermediários na síntese de produtos de química fina, como por exemplo,

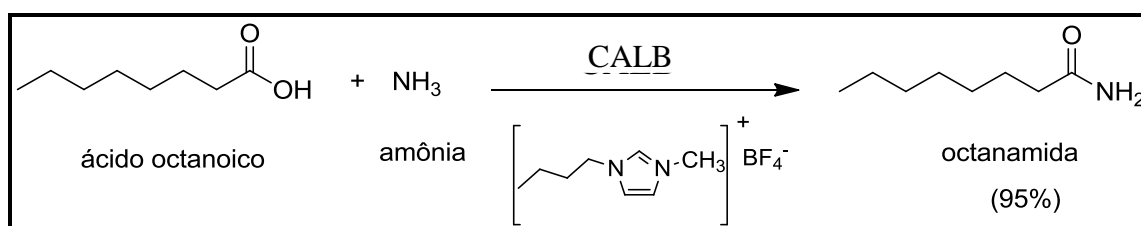
o composto carboxilato de (*S*)-*tert*-butil-2-carbamoil-2,3-di-hidro-1H-pirrolila, um precursor do fármaco *Saxagliptina*, utilizado no tratamento de diabetes. Este precursor foi produzido via reação de aminólise com lipase de *Candida antarctica*, pela companhia farmacêutica *Bristol-Myers* (Esquema 10) (PATEL 2008).

Esquema 10 - Reação de aminólise via lipase de *Candida antarctica*.



A CALB foi utilizada na reação de aminólise do ácido octanoico na presença de amônia, produzindo a octanamida com 95% de rendimento. Esta reação foi promovida utilizando líquido iônico 1-alkil-3-metilimidazol como solvente. Estas substâncias são vantajosas pelo fato de serem líquidas à temperatura ambiente, apresentarem estabilidade térmica e boa solubilidade, sendo considerados “solventes verdes” (Esquema 11) (REETZ 2002).

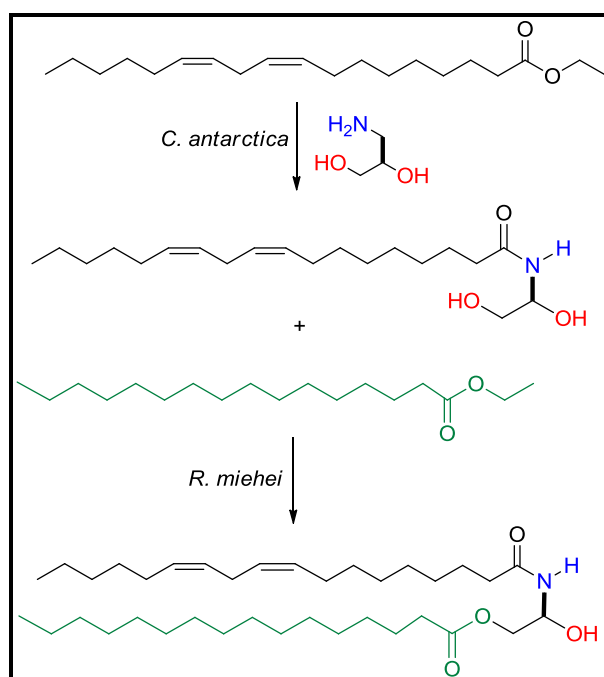
Esquema 11 - Síntese da octanamida via reação de aminólise.



A perspectiva de evitar a utilização ou substituição de solventes orgânicos voláteis e tóxicos é de grande interesse. Com o conhecimento do potencial de lipases em reações de aminólise, pesquisadores da empresa *BioEurope Solabia Groupe* promoveram a síntese de moléculas análogas as ceramidas da pele, em um processo livre de solventes orgânicos.

Estas moléculas bioativas foram produzidas em duas etapas: inicialmente, as reações foram biocatalisadas pela lipase de *Candida antarctica* entre o linoleato de etila (éster derivado do ácido linoléico) e aminoálcoois. Posteriormente, a molécula intermediária foi transesterificada com oleato de etila através da lipase de *Rhizomus miehei* (Esquema 12) (COUTURIER *et al.* 2009).

Esquema 12 - Síntese de molécula análoga à ceramidas.

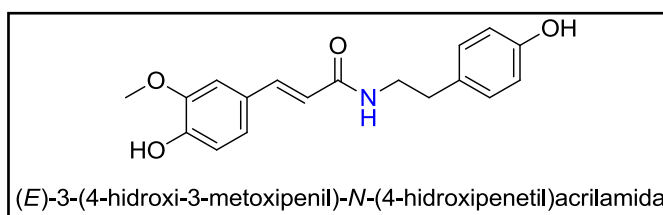


A praticidade desta síntese partindo-se de matérias-primas vegetais, sem utilização de solventes ou etapas de purificação, tornou as lipases os biocatalisadores de escolha para a produção de moléculas análogas as ceramidas (COUTURIER & YVERGNAUX 2009).

Pesquisas também demonstram que ésteres carboxílicos podem ser convertidos em respectivas amidas carboxílicas, como amidas fenólicas (COUTURIER *et al.* 2009). As amidas fenólicas podem apresentar elevado potencial antioxidante, como demonstrado em ensaios biológicos em que estas substâncias apresentaram atividade superior aos antioxidantes naturais α -tocoferol e ácido ascórbico (Figura 17) (LEY 2001).

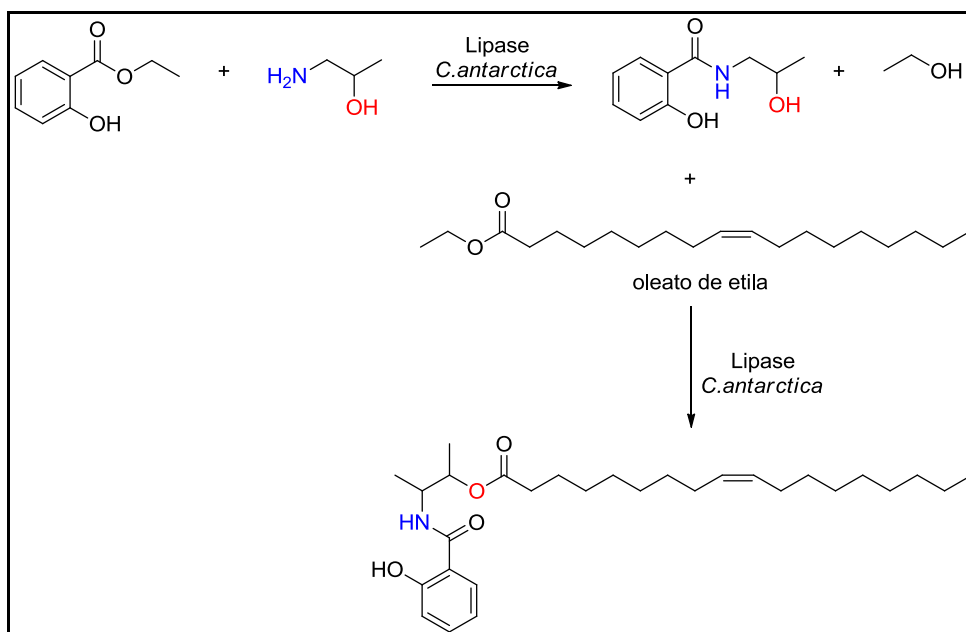
Pesquisas também demonstram que ésteres carboxílicos podem ser convertidos em respectivas amidas carboxílicas, como amidas fenólicas (COUTURIER *et al.* 2009). As amidas fenólicas podem apresentar elevado potencial antioxidante

Figura 17 - Estrutura química de amida fenólica com propriedades antioxidantes.



Em vista destes fatos, amidas derivadas do ácido salicílico podem ser introduzidas em formulações cosméticas ou farmacêuticas, sendo sintetizadas via reações de aminólise catalisadas por lipase de *Candida antarctica*. Devido à pronunciada nucleofilicidade de uma amina, as reações de aminólise podem ser consideradas quase irreversíveis, favorecendo a estabilidade das amidas fenólicas frente a radicais livres (FABER 2004). Adicionalmente, se o reagente for um aminoálcool, duas condições tornam-se favorecidas: a permeabilidade e o acesso para a ligação de novas moléculas.

Os aminoálcoois são susceptíveis a acilação tanto no grupo amino quanto hidroxila, razão pela qual são muito empregados como blocos de construção quirais (COUTURIER *et al.* 2009). O ácido mefenâmico (Ponstan) é um fármaco anti-inflamatório muito utilizado atualmente, porém, uma vez administrado via oral pode causar distúrbios gastrointestinais. A aplicação tópica através de cremes e pomadas pode ser indicada nestes casos, onde estudos comprovam que aminoálcoois são responsáveis por elevar a permeabilidade do composto sobre a pele (FANG *et al.* 2003). Como a nucleofilicidade de um grupo amina é significativamente superior que a de um álcool, uma amida fenólica pode ser inicialmente produzida e posteriormente reações de transesterificação podem ser realizadas, empregando-se ácidos graxos insaturados semelhantes aos presentes na epiderme (Esquema 13).

Esquema 13 - Exemplo de produção de amidas fenólicas graxas por biocatálise.

1.8 Ácidos graxos

Os ácidos graxos são ácidos monocarboxílicos alifáticos que atuam como blocos de construção de lipídios (RUIZ-RODRIGUEZ 2010). Na Tabela 2 são mostrados alguns ácidos graxos saturados, monoinsaturados ou poli-insaturados, identificados pelo número de carbono e insaturações separados por dois pontos.

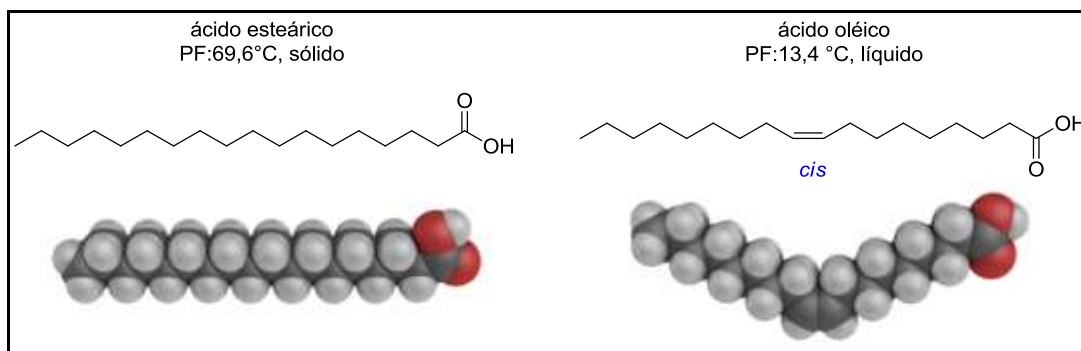
Tabela 2 - Nome químico e descrição de alguns ácidos graxos naturais com propriedades biológicas.

Nome comum	Nome oficial (IUPAC)	n° de carbonos: insaturações	Estrutura	Ponto de fusão (°C)
Ácido láurico	ácido-dodecanoico	12:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	44,2
Ácido mirístico	ácido-tetradecanoico	14:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	53,9
Ácido palmítico	ácido-hexadecanoico	16:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	63,1
Ácido esteárico	ácido-octadecanoico	18:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	69,6
Ácido araquídico	ácido eicosanoico	20:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	76,5
Ácido oléico	ácido 9-octadecenoico	18:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	13,4
Ácido linoléico	ácido 9,12-octadecadienoico	18:2	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	-5,0
Ácido araquidônico	ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico	20:4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	-49,4

As propriedades dos ácidos graxos adequam-se ao comprimento de suas cadeias carbônicas e ao seu estado de saturação. Os ácidos graxos de cadeia longa são de grande importância para a manutenção de uma pele saudável. Neste caso, longas cadeias apolares (hidrofóbica) são responsáveis pela baixa solubilidade destes compostos em meio aquoso, constituindo uma verdadeira barreira contra a evaporação de água, ou seja, contra a desidratação cutânea (NOVOTNY *et al.* 2010). O estado de saturação também influencia a barreira de proteção cutânea, pois ácidos graxos saturados podem formar áreas cristalinas sólidas junto às membranas, enquanto ácidos mono- e/ou poli-insaturados são conhecidos por formar áreas cristalinas líquidas, elevando a permeabilidade endógena dos lipídios (Nanayakkara *et al.* 2005).

A formação de áreas cristalinas sólidas está relacionada com o fato de que à temperatura ambiente (25°C), ácidos graxos saturados encontram-se como moléculas fortemente empacotadas. Neste quadro, são capazes de compor um estado altamente ordenado, pois apresentam livre rotação ao redor de cada ligação carbono-carbono, formando ceras sólidas. Em contrapartida, ácidos graxos poli-insaturados apresentam ligações duplas, que em geral, ocorrem na configuração *cis* (LENHINGER 2000).

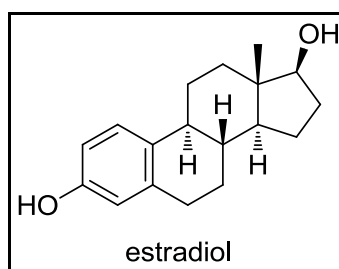
Uma ligação dupla *cis* força uma curvatura na cadeia carbônica que impede o agrupamento dos ácidos graxos de forma estreita, enfraquecendo assim suas interações, conferindo-lhes consistência oleosa (ALONSO *et al.* 1995). Como o consumo de energia térmica para desfazer estes arranjos fracamente ligados é menor, o ponto de fusão de ácidos graxos poli-insaturados, como do ácido linoléico (PF: -5,0°C) é menor do que ácidos que apresentam apenas uma insaturação (como o ácido oléico, PF: 13,4°C) (LENHINGER 2000). A diferença é ainda maior quando comparada ao ponto de fusão de ácidos saturados de cadeia carbônica correspondente, caso do ácido esteárico (PF: 69,6°C) (Figura 18).

Figura 18 - Estrutura e empacotamentos dos ácidos esteárico e oléico.

1.8.1 Aplicação tópica de ácidos graxos insaturados

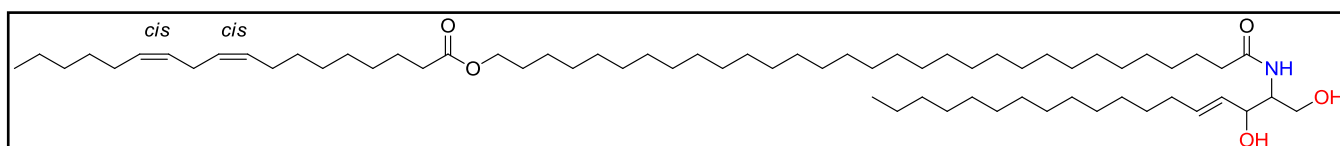
Considerando a aplicação tópica de ácidos graxos, moléculas insaturadas e poli-insaturadas, particularmente as que apresentam configuração *cis* e cadeias com 18 carbonos, são efetivas em elevar a permeabilidade de produtos bioativos (NANAYAKKARA *et al.* 2005). Substâncias que interagem com os componentes estruturais da pele e promovem a penetração de outras moléculas são conhecidos como potencializadores de permeabilidade. Na indústria cosmética, os ácidos graxos insaturados mais utilizados são os ácidos oleico (ácido *cis*-9-octadecanoico) e o ácido linoleico (ácido *cis*-9,12-octadecadienoico) (ELLIS & LUGER 2003).

O ácido oleico (*ômega* 3), que compõe grande parte da literatura de patentes referentes aos potencializadores de permeabilidade, é listado pelo *Foods and Drugs Administration* (FDA) como substância aceitável para potencializar a permeabilidade de fármacos, tal como o Vivelle ®, responsável pela entrega transdermal do hormônio feminino estradiol via fita adesiva (Figura 19) (Nanayakkara *et al.* 2005).

Figura 19 - Estrutura do estradiol.

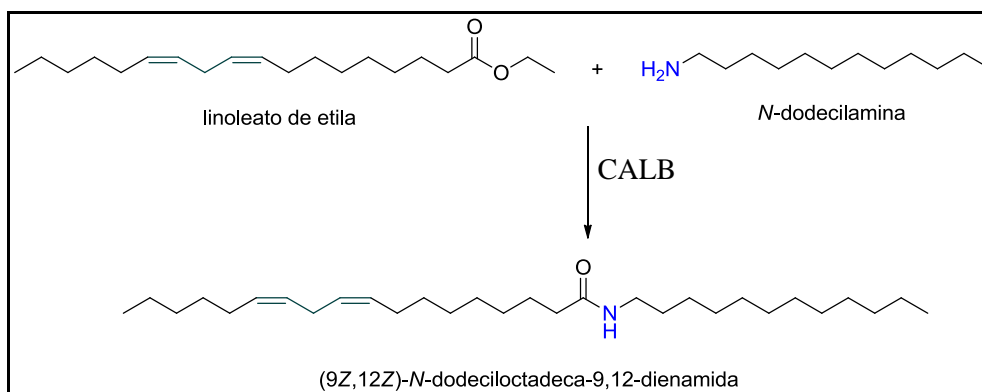
Entre os ácidos graxos poli-insaturados, o ácido linoleico possui 18 átomos de carbono e duas insaturações de configuração *cis*, compondo a família *ômega*-6. O ácido linoleico é reconhecido por participar de forma vital da criação e modulação do ponto de fusão da ceramida tipo 1 ou *ômega*-*o*-*acil*-ceramidas (Figura 20) (NOVOTNÝ *et al.* 2010, MOLINA 2008). A substituição do ácido linoleico por outros ácidos graxos em *ômega*-*o*-*acil*-ceramidas está relacionada com disfunções na barreira epidérmica como dermatite atópica e psoríase (UCHIDA & HOLLERAN 2008).

Figura 20 - Estrutura molecular da *ômega*-*o*-*acil*ceramida ou ceramida tipo 1.



Hidratantes formulados com o ácido linoleico apresentam absorção superior sob a pele, os quais afetam positivamente as respostas sob a radiação ultravioleta (BYUN *et al.* 2012). Um estudo demonstrou que o ácido linoleico foi capaz de elevar a permeabilidade de analgésicos narcóticos, como morfina, oximorfona e hidromorfona (MAHJOUR *et al.* 1989). Ainda, estudos demonstraram que formulações contendo o ácido linoleico apresentam efeito clareador da pele, em casos de hiperpigmentação como o melasma (SHIGETA *et al.* 2004).

Embora os ácidos graxos insaturados sejam indicados para aumentar a permeabilidade de produtos que devem difundir-se sobre a pele, os mesmos também podem ser introduzidos em formulações para promover o efeito oposto: permanecer sobre a camada córnea com mínima absorção. Este efeito é possível ao ligar os ácidos graxos com moléculas hidrofóbicas de longa cadeia carbônica, tal como a *N*-dodecilamina. Este grupo pode ser introduzido através de uma reação de aminólise, catalisada pela lipase de *Candida antarctica*, formando as amidas graxas (Esquema 14).

Esquema 14 - Reação de aminólise para produção de amida graxa.

Amidas graxas representam excelentes componentes para formulação de filtros solares, os quais são projetados para permanecer sobre a camada mais superior da pele. As amidas graxas são também de grande interesse devido sua aplicação na produção de lubrificantes, surfactantes, detergentes e xampus. Os processos de produção atuais são baseados em reações de ácidos graxos com amônia anidra sob condições como temperatura a 200°C e pressão entre 340-700 KPa, sendo ainda necessárias etapas de purificação. A síntese enzimática oferece uma alternativa em potencial para superar estas desvantagens, onde as lipases têm sido utilizadas com sucesso na síntese de amidas graxas (KHARE *et al.* 2008). Assim, junto ao desenvolvimento de amidas fenólicas, foram desenvolvidas neste trabalho reações de aminólise para produção de amidas graxas com propriedades biológicas.



2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho consistiu no emprego da lipase de *Candida antarctica* (CALB) em reações de aminólise e transesterificação. Através destas reações buscou-se produzir moléculas bioativas, as quais podem ser introduzidas em formulações cosméticas para aplicação cutânea.

2.1 Objetivos específicos

- Emprego da lipase de *Candida antarctica* em reações de aminólise e transesterificação.
- Avaliar o efeito da proporção da enzima no rendimento reacional.
- Avaliar o efeito da proporção dos reagentes sob no rendimento reacional.
- Avaliação da quimio- e regioseletividade da CALB frente à aminoálcoois.
- Síntese enzimática de moléculas derivadas de ácidos graxos e de ácidos fenólicos que podem ser introduzidas em formulações cosméticas.

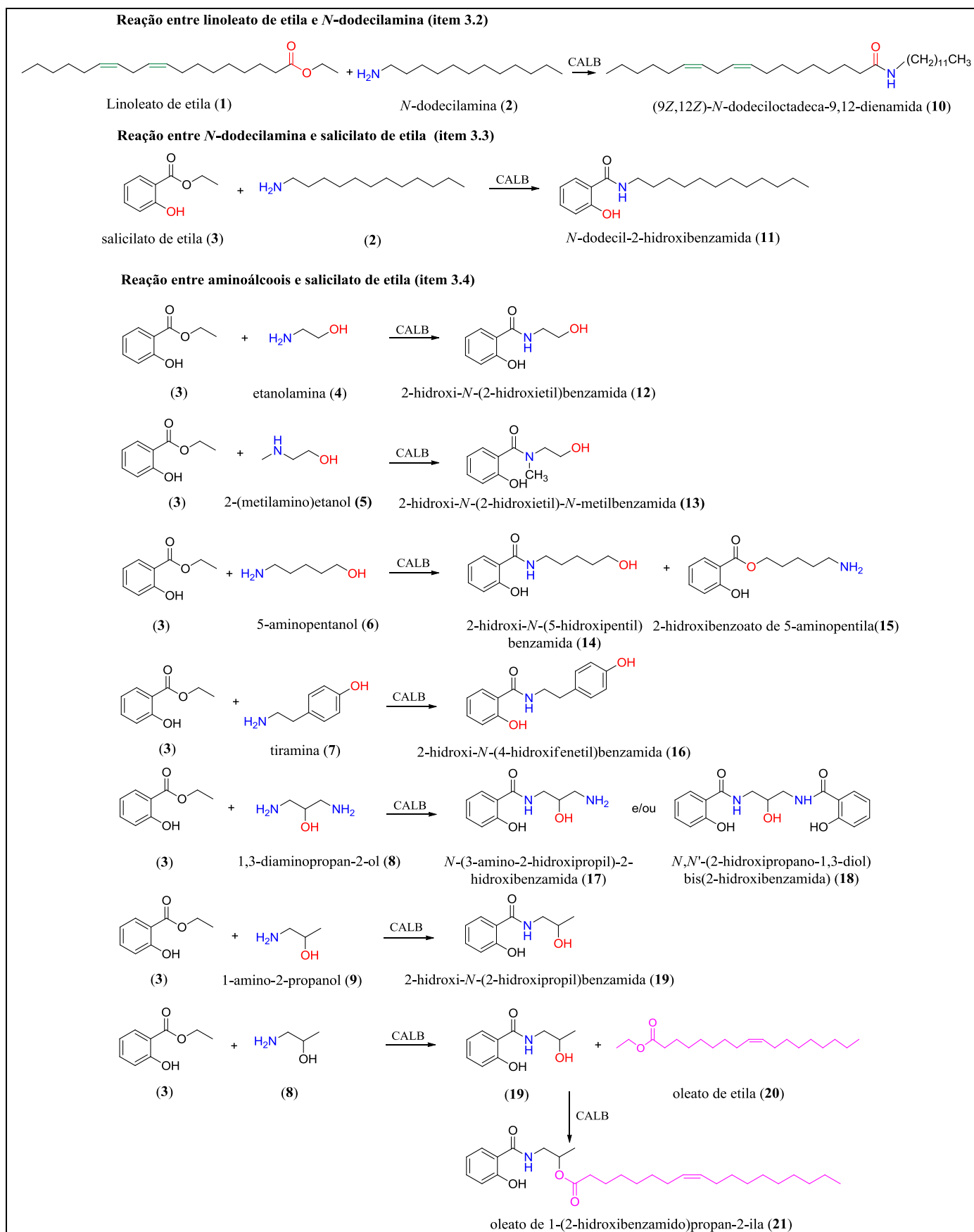


3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e solventes

A lipase B de *Candida antarctica* foi obtida comercialmente de Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca. Os reagentes linoleato de etila e o oleato de etila foram adquiridos por Stearinerie Dubois (Ciron, França). O salicilato de etila, os aminoálcoois etanolamina; 2-(metilamino)etanol; 5-aminopentanol; tiramina; 1-amino-2-propanol; 1,3-diaminopropan-2-ol e a *N*-dodecilamina foram obtidos pela Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, EUA) (Esquema 15).

Esquema 15 – Reagentes utilizados e produtos obtidos através das reações com CALB.



3.2 Reações entre linoleato de etila (1) e *N*-dodecilamina (2) catalisadas por lipase CALB

3.2.1 Estudo da proporção molar dos reagentes sob o rendimento reacional

Foram realizados dois estudos preliminares para a padronização das condições reacionais para a síntese da (9*Z*,12*Z*)-*N*-dodeciloctadeca-9,12-dienamida (**10**). Primeiramente foi avaliado o efeito da proporção molar dos reagentes linoleato de etila (**1**) e *N*-dodecilamina (**2**) (Tabela 3). Os reagentes **1** e **2** foram adicionados em diferentes proporções molares em balões de 50 mL. Após 5 minutos sob vácuo (50 mbar) para remoção de gases do sistema, 5 g de lipase de *Candida antarctica*/mol linoleato de etila foi adicionada às misturas reacionais.

As reações foram conduzidas por 20 horas sob agitação orbital (300 rpm, 65°C). Para que a formação dos produtos ocorresse de forma *ambientalmente favorável*, as reações foram realizadas nas seguintes condições:

Reações conduzidas sob vácuo: Sob vácuo (50mbar), o equilíbrio no sentido da formação do produto é favorecido, pois o subproduto formado (etanol) pode ser removido, dificultando a reação reversa e minimizando gastos com tratamento de solventes¹¹.

Processo livre de solventes: Em um processo que visa à aplicação de biocatálise (Química Verde), busca-se, sempre que possível reduzir a utilização de solventes orgânicos. Portanto, as reações foram conduzidas na ausência de solventes orgânicos, o que torna-se benéfico do ponto de vista ambiental e econômico.

Temperatura: As reações foram conduzidas a 65°C. Sob esta temperatura, limita-se a degradação dos ésteres de ácidos graxos oxidáveis (COUTURIER *et al.* 2009).

A formação do produto foi avaliada por métodos cromatográficos (cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência). O produto foi purificado por cromatografia *flash* (aparelho *puriFlash*® 430) e caracterizado por métodos espectroscópicos (RMN ¹H e ¹³C, IV, EMAR).

¹¹ Esta é uma das vantagens na realização de reações de aminólise em relação às reações de esterificação, que geram água como subproduto, requerendo etapas de destilação ou adição de agentes secantes.

Tabela 3 - Estudo do efeito das proporções molares de linoleato de etila (**1**) e *N*-dodecilamina (**2**) na síntese da (9*Z*,12*Z*)-*N*-dodeciloctadeca-9,12-dienamida (**10**).

Experimento	Linoleato de etila: <i>N</i> -dodecilamina (moles)	CALB (g)	Linoleato de etila (g)	<i>N</i> -dodecilamina (g)
1	0,8:1,0	0,026	1,6	1,1
2	1,0:0,8	0,032	2,0	0,88
3	1,0:1,0	0,032	2,0	1,1
4	1,0:2,0	0,032	2,0	2,2
5	2,0:1,0	0,065	4,0	1,1

Linoleato de etila: MM=308,27 g/mol, *N*-dodecilamina: MM=185,21 g/mol, [Lipase CALB] =5 g de CALB/mol de linoleato de etila.

3.2.2 Estudo do efeito da proporção enzimática sob o rendimento reacional

Estabelecida a condição experimental 2 como melhor metodologia para as proporções molares dos reagentes (Vide Resultados e Discussões 4.1), foi avaliado o efeito da quantidade de lipase de *Candida antarctica* no meio reacional. Foram adicionados 2,0 g de linoleato de etila (**1**) e 1,1 g de *N*-dodecilamina (**2**) em balões de 50 mL (Tabela 4). Após 5 minutos sob vácuo (50 mbar) para remoção de gases do sistema, as diferentes quantidades de lipase de *Candida antarctica* foram adicionadas às misturas reacionais. As reações foram conduzidas por 20 horas sob agitação orbital (300 rpm, 65°C).

A formação do produto foi avaliada por métodos cromatográficos (cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência). O produto foi purificado por cromatografia *flash* (aparelho *puriFlash*[®] 430) e caracterizado por métodos espectroscópicos (RMN ¹H e ¹³C, IV, EMAR).

Tabela 4 - Estudo do efeito da proporção enzimática na síntese de (9Z,12Z)-*N*-dodeciloctadeca-9,12-dienamida (**10**).

Experimento	Linoleato de etila: <i>N</i> -dodecilamina (moles)	Linoleato de etila: <i>N</i> - dodecilamina (g)	Relação CALB/linoleato (g/mol)	CALB (g)
1	1:1	2,0:1,1	0,6	0,0039
2	1:1	2,0:1,1	1,2	0,0078
3	1:1	2,0:1,1	2,5	0,0162
4	1:1	2,0:1,1	5,0	0,0325
5	1:1	2,0:1,1	7,5	0,0487
6	1:1	2,0:1,1	10	0,0650

Linoleato de etila: MM=308,27 g/mol, *N*-dodecilamina: MM=185,21 g/mol, Relação enzima/linoleato = g de lipase CALB/mol de linoleato de etila.

3.3 Reações entre *N*-dodecilamina (**2**) e salicilato de etila (**3**) catalisadas por CALB

Para a síntese da *N*-dodecil-2-hidroxibenzamida (**11**) através da reação entre *N*-dodecilamina (**2**) e salicilato de etila (**3**) foram aplicados os melhores resultados obtidos através do estudo para a reação entre linoleato de etila e *N*-dodecilamina (Vide item 3.2) em proporções molares de reagente (1:1) e proporção enzimática (5 g de lipase CALB/mol de reagentes).

Foram adicionados 1,0 g de salicilato etila (**3**) e 1,85 g de *N*-dodecilamina em balões de 50 mL (Tabela 5). Após 5 minutos sob vácuo (50 mbar) para remoção de gases do sistema, as diferentes quantidades de lipase de *Candida antarctica* foram adicionadas às misturas reacionais. As reações foram conduzidas seguindo os mesmos procedimentos dos itens 3.2.1.

Tabela 5 - Concentrações enzimáticas estudadas para padronização da síntese de *N*-dodecil-2-hidroxibenzamida (**11**).

Experimento	Salicilato de etila: <i>N</i> -dodecilamina moles	Salicilato de etila: <i>N</i> - dodecilamina (g)	CALB g/mol	CALB (g)
1	1:1	1,0/1,85	0,6	0,0036
2	1:1	1,0/1,85	1,2	0,0072
3	1:1	1,0/1,85	2,5	0,015
4	1:1	1,0/1,85	5,0	0,030
5	1:1	1,0/1,85	7,5	0,045
6	1:1	1,0/1,85	10	0,060

Salicilato de etila: MM=166,06 g/mol, *N*-dodecilamina: MM=185,21 g/mol, CALB= g/mol em relação aos substratos

3.3.1 Reação de hidrólise para separação do salicilato de etila

Após a síntese da *N*-dodecil-2-hidroxibenzamida (**11**) foi observado um forte odor referente à presença de resíduos de salicilato de etila, portanto, foi realizada uma reação de hidrólise para separação deste reagente remanescente no produto. A reação de hidrólise foi realizada adicionando-se 10 g de hidróxido de sódio (NaOH) em 50 ml de água em um balão de 250 mL. A reação foi conduzida sob refluxo e aquecimento (reação exotérmica). A reação foi controlada por cromatografia em camada delgada, sendo interrompida após a verificação do término da reação. A esta reação, foi adicionada uma solução de ácido sulfúrico em concentração 3,0 M em quantidades fracionadas até que o pH atingisse a faixa 3,0-3,5. Posteriormente, a solução foi estocada em refrigerador por 24 horas e após este período foi filtrada e extraída com solvente heptano (3x20 mL).

3.4 Reações com os aminoálcoois (4-9) e salicilato de etila (3) catalisadas por CALB

Diferentes aminoálcoois (**4-9**) foram selecionados para a reação com salicilato de etila (**3**). Nestas sínteses foram aplicados os melhores resultados obtidos através do estudo para a reação entre linoleato de etila (**1**) e *N*-dodecilamina (**2**) (Vide item 3.2) em proporções molares de reagente (1:1) e proporção de enzima (5 g de lipase CALB/mol de reagentes). As reações foram conduzidas seguindo os mesmos procedimentos dos itens 3.2.1.

3.5 Métodos analíticos, identificação e caracterização dos compostos

3.5.1 Métodos cromatográficos

3.5.1.1 Cromatografia de absorção

As cromatografias de absorção foram realizadas em colunas de sílica gel *flash* 60 (0,035-0,075 da Across Organics). Para cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 F₂₅₄ da Sorbent Technologies, com espessura de 0,20 mm contendo indicador de fluorescência.

Os eluentes utilizados foram: hexano, acetato de etila puros ou combinados para produzir soluções com diferentes polaridades. A revelação das cromatofolhas foi realizada através da exposição desta à luz ultravioleta em dois comprimentos de onda (254 e 356 nm). Compostos também foram purificados por Cromatografia Flash, utilizando-se o equipamento *PuriFlash*TM 430 *evo*-Interchim, com Detector UV-200-600 nm; fluxo 200 mL/min, pressão: 30 bar, utilizando bombas contendo hexano e acetato de etila em diferentes polaridades.

3.5.1.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As reações foram monitoradas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em um sistema (Alliance-Waters) composto por uma coluna X-Terra MS C18, 5,0 μ M, 150 mm x 2.1 mm), forno CTO-20 A, temperatura: 40°C, autoinjeter, equipado com detector de arranjo de diodos (PDA), UV/VIS (λ =210 nm). Os compostos foram eluídos por gradiente em sistema contendo metanol (A) e água (B), como mistura de eluentes, contendo 0,1% de ácido trifluoracético, fluxo de 0,27 mL/min. As condições de análise encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 - Condições de análise por cromatografia líquida de alta eficiência.

Produto	Tempo (min)	Taxa (mL/min)	(A)% MeOH	(B)% H ₂ O	t _r (reagente)	t _r (produto amida)	t _r (produto éster)
11	40	0,27	80	20	15,5	22,2	-
12	30	0,27	50	50	9,2	21,3	-
12	30	0,27	5	95	22,5	13,2	-
14	30	0,27	5	95	22,5	9,0	-
15	30	0,27	5	95	22,5	17,8	24,5
16	30	0,27	5	95	22,5	19,6	-
17	30	0,27	60	40	16,0	3,7	
18	30	0,27	5	95	22,5	7,5-20,3	
19	40	0,27	60	40	16,0	3,4	
21	40	0,27	60	40	16,0	3,4	28,1

t_r = tempo de retenção.

3.5.2 Espectroscopia na região de absorção do Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do Infravermelho foram obtidos em um espectrômetro com transformada de Fourier Bomem/MB-102 e calibração interna. As análises foram realizadas na CAQI-IQSC, com as amostras foram preparadas na forma de filme e as bandas de absorção expressas em cm⁻¹.

3.5.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de próton e carbono (RMN ¹H e RMN ¹³C) foram obtidos em espectrômetros do tipo Bruker AM 400 na Universidade de Rennes-Rennes, França e na central analítica do Instituto de Química de São Carlos (CAQI-IQSC) operando na frequência de 500 (RMN ¹H) e 125 MHz (RMN ¹³C). Os solventes utilizados foram Clorofórmio e Metanol deuterado (CDCl₃ e MeOD₄). Os deslocamentos químicos foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados para RMN ¹H e RMN ¹³C pelos sinais do hidrogênio pertencente à molécula do TMS e pelos solventes deuterados utilizados.

3.5.4 Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR)

As análises foram realizadas no espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo/tempo voo, operando no modo MS (positivo e/ou negativo) no aparelho modelo: MicroTOF-QII, com detector Bruker Daltonis (Bremen Alemanha). Nestas análises, as amostras foram ionizadas no modo positivo utilizando ionização química a pressão atmosférica (APCI). As análises foram realizadas no Instituto de Química de São Carlos, no laboratório de Cromatografia (Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças).

3.6 Evaporadores rotativos

Para remoção dos solventes foram utilizados rotaevaporadores das marcas Fisaton e Tecnal T-210, equipados com bomba de vácuo TE-058 e refrigeração Tecnal modelo TE-2005.

3.7 Outros equipamentos

Agitador IKA RW 16 Basic, balança analítica modelo AY-220 marca Shimadzu, 8010 da marca Qualxtron e UV modelo TE-540 da Tecnal.



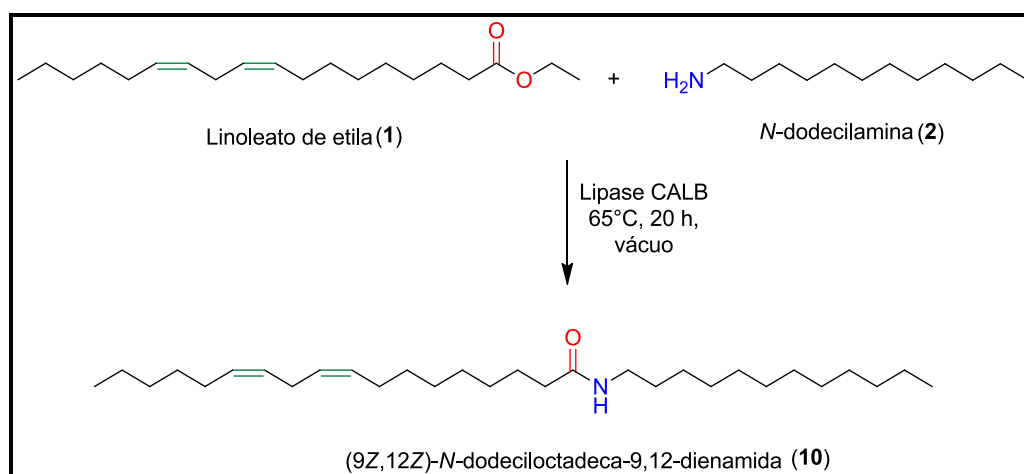
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Reações entre linoleato de etila (1) e a *N*-dodecilamina (2) catalisadas por CALB

4.1.1 Estudo da proporção molar dos reagentes sob o rendimento reacional

Em busca do desenvolvimento de um produto que possa ser introduzido em formulações de cremes e filtros solares para a pele, foram realizadas reações de aminólise entre o linoleato de etila (1) e a *N*-dodecilamina (2). A ligação entre estes reagentes através da lipase de *Candida antarctica* pode produzir um composto caracteristicamente hidrofóbico que apresente elevada afinidade pela camada mais superficial da epiderme, tal como o (9*Z*,12*Z*)-*N*-dodeciloctadeca-9,12-dienamida (10) (Esquema 16).

Esquema 16 - Reação de aminólise entre o linoleato de etila (1) e a *N*-dodecilamina (2).



Inicialmente foi realizado um estudo visando avaliar o efeito da proporção molar dos reagentes linoleato de etila (1) e *N*-dodecilamina (2) sob o rendimento da reação catalisada pela lipase de *Candida antarctica*. É conhecido que um dos principais fatores que afetam as reações catalisadas por enzimas está relacionado a concentração do substrato e que em muitas reações, duas ou mais moléculas de substratos ligam-se à enzima para a formação do produto (LENHINGER 2000).

Neste estudo, as reações foram conduzidas entre os substratos linoleato de etila (1), o qual apresenta um grupo doador acila e a *N*-dodecilamina (2) que atua como nucleófilo no meio reacional. As concentrações selecionadas e as massas dos reagentes e da enzima foram apresentados na Tabela 3 (Materiais e Métodos 3.2.1).

Os resultados obtidos foram analisados inicialmente por cromatografia em camada delgada e posteriormente por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando metanol e água como mistura de eluentes (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultados de reações entre o linoleato de etila (**1**) e a *N*-dodecilamina (**2**) em diferentes proporções molares catalisada por CALB.

Experimento	Linoleato de etila: <i>N</i> -dodecilamina (Moles)	Produto Amida graxa (%)	Linoleato de etila remanescente ^a (%)
1	0,8:1,0	73,0	27,0
2	1,0:0,8	65,0	35,0
3	1,0:1,0	97,0	3,00
4	1,0:2,0	97,0	3,0
5	2,0:1,0	46,0	54,0

Condições reacionais: 65°C, vácuo (50 mbar), Lipase: 5,0 g/mol de reagente linoleato de etila, t: 20 horas.

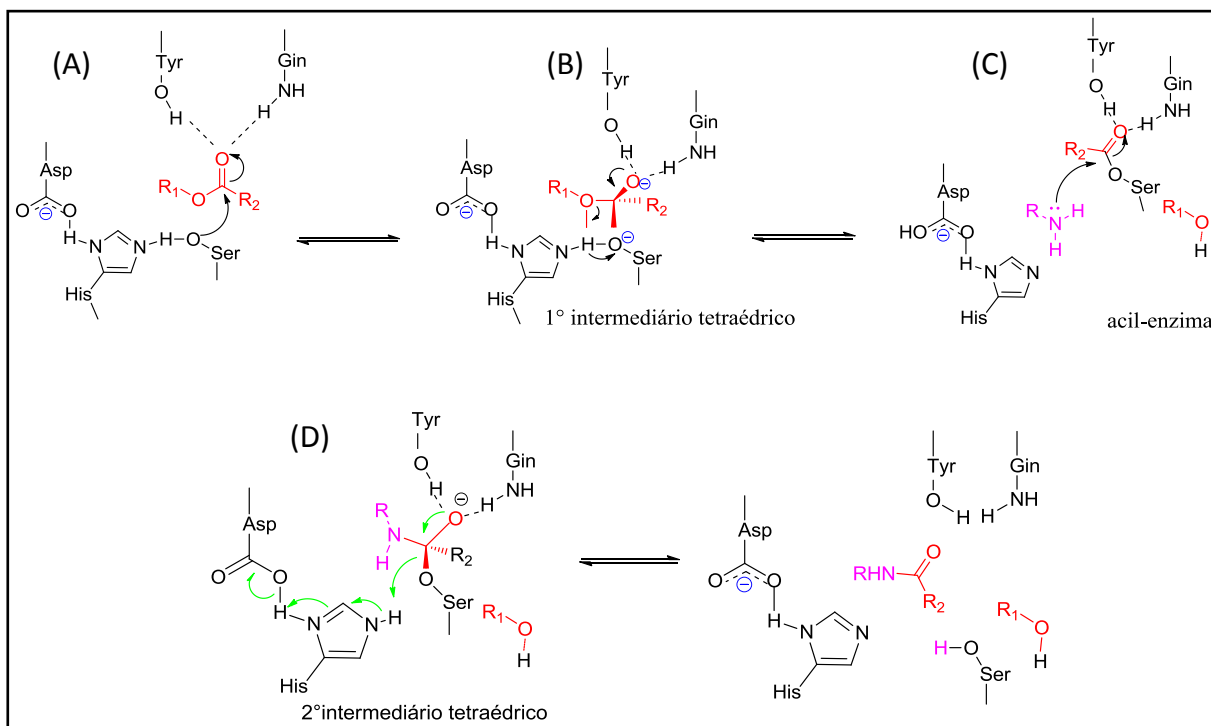
^a Rendimentos calculados por HPLC.

O estudo demonstrou que ao adicionar os reagentes linoleato de etila (**1**) e *N*-dodecilamina (**2**) e em proporções equimolares, obteve-se um excelente rendimento (98%) para a formação do produto (9*Z*,12*Z*) -*N*-dodeciloctadeca-9,12-dienamida (**10**). Rendimentos reacionais elevados também foram observados ao empregar o reagente *N*-dodecilamina (**2**) em maior concentração molar em relação ao éster, como nos casos das concentrações 0,8:1,0 e 1,0:2,0, onde foram obtidos os rendimentos equivalentes a 78 e 97%, respectivamente. No entanto, ao reduzir a concentração da amina em uma pequena fração molar, 1,0 (éster): 0,8 (amina), observou-se uma redução concomitante no rendimento reacional, para o valor de 65%. Estes resultados indicam que entre os dois reagentes, a *N*-dodecilamina (**2**) tem papel determinante para a obtenção de rendimentos elevados. O papel dos reagentes pode ser observado ao considerar o mecanismo catalítico das lipases em reações de aminólise.

No caso da produção de amidas, o mecanismo da reação envolve a tríade catalítica das lipases, constituída de um resíduo de aminoácido serina (grupo nucleofílico e ativado por *ligação hidrogênio*) em conjunto com os aminoácidos histidina, aspartato ou glutamato (Ser-His-Asp/Glu) (AL-ZUHAIR *et al.* 2007). Este mecanismo catalítico consiste nas seguintes etapas:

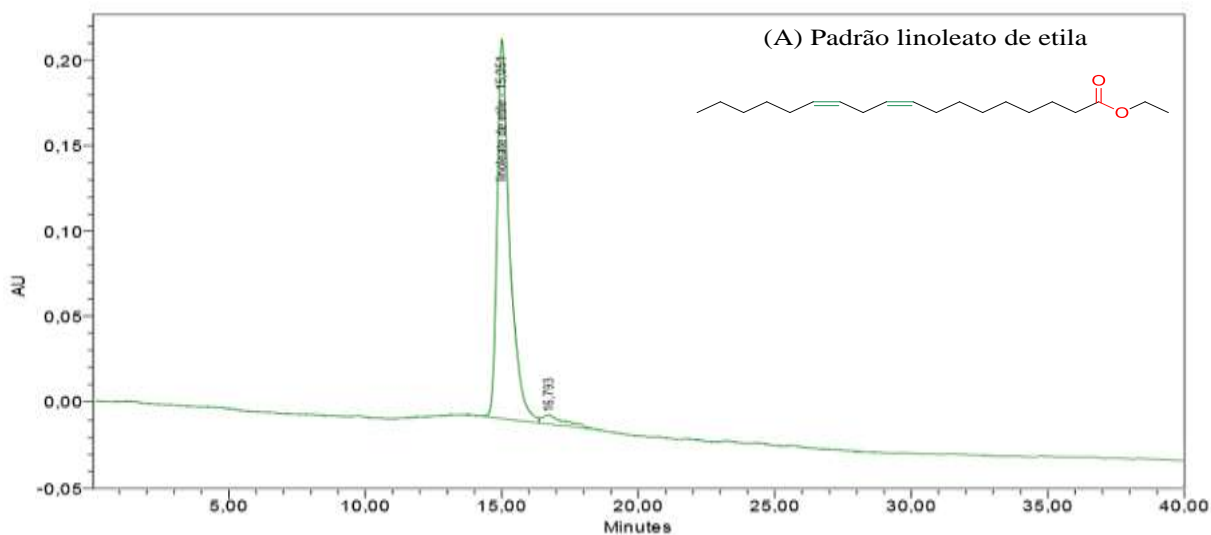
- A. *Ligação ao substrato éster*: nesta etapa, o substrato (éster) aproxima-se do sítio catalítico da lipase, ocorrendo uma complexação entre resíduos de aminoácidos enzimáticos e o átomo de oxigênio da carboxila do éster. Esta aproximação ativa o átomo de oxigênio, deixando-o mais susceptível ao ataque nucleofílico. Neste ambiente, um outro resíduo de aminoácido, tal como a serina, promove o ataque ao carbono ativado da carboxila do éster.
- B. *Formação do primeiro intermediário tetraédrico por ataque da serina*: Após o ataque da serina ao carbono da carboxila do éster, forma-se o primeiro intermediário tetraédrico, conhecido como intermediário enzima-substrato. Este intermediário é reorganizado levando à obtenção do éster acil enzima.
- C. *Formação do intermediário acil enzima*: a amina promove o ataque à carboxila do intermediário acil enzima, formando o complexo acilado amina-enzima.
- D. *Aminólise do intermediário acil-enzima*: nesta etapa, a ligação C-O do complexo formado rompe-se com a transferência de próton do ácido conjugado da amina, resultando em uma molécula de amida (Figura 21).

Figura 21 - Mecanismo catalítico da CALB em reações de aminólise.



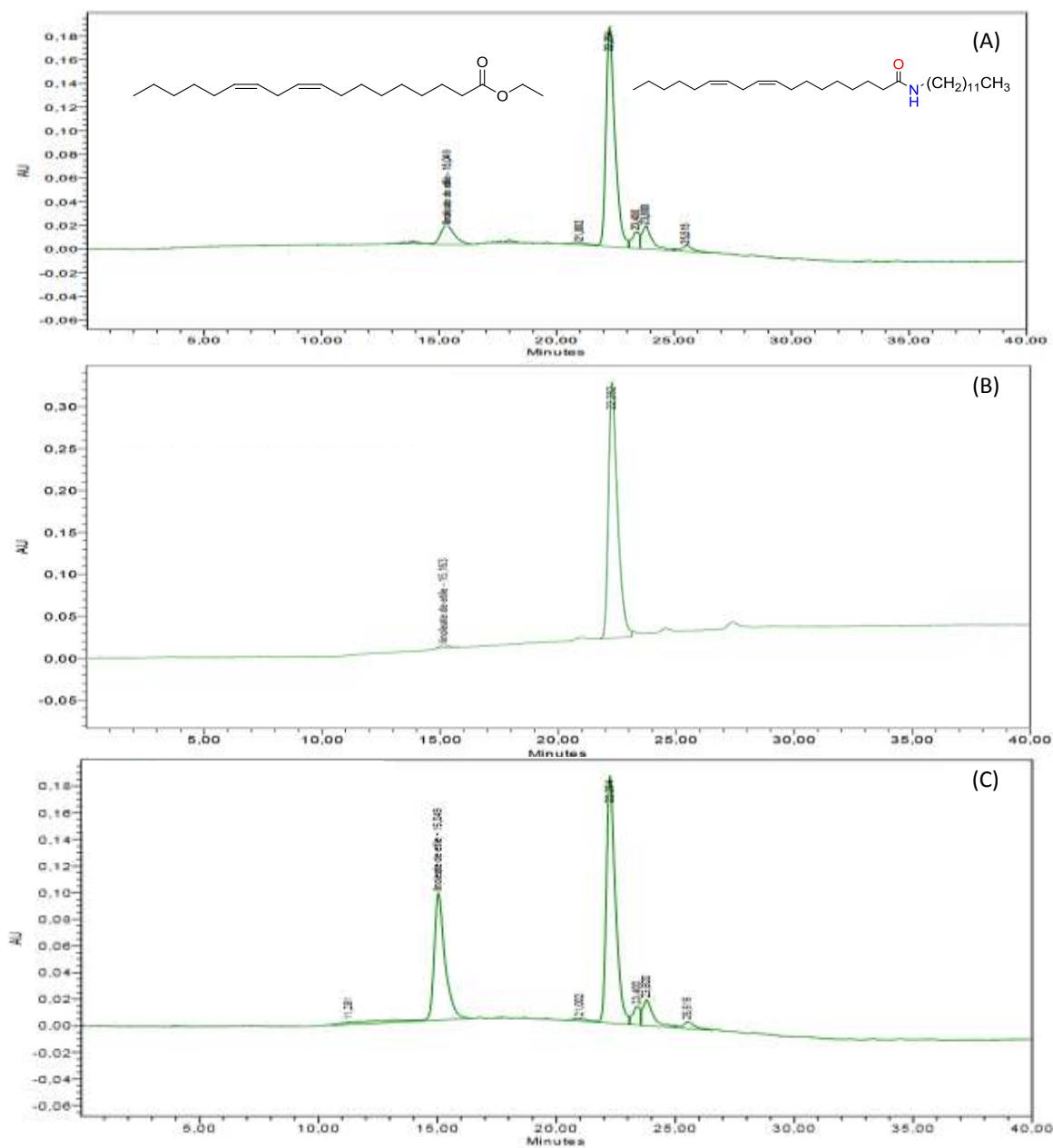
É interessante ressaltar que as *proporções equimolares* dos reagentes e o *excesso da amina* foram necessários para a formação do complexo acil enzima e a formação do produto **10** com elevados rendimentos. Os cromatogramas obtidos por CLAE do padrão linoleato de etila (**1**) e das reações de aminólise estão nas Figuras 22 e 23.

Figura 22 - Cromatograma obtido por CLAE do padrão de linoleato de etila (**1**).



Condições de análise CLAE: MeOH/H₂O (80:20); fluxo 0,27 mL/min; 210 nm; $t_c = 40$ min, Coluna C18X- Terra MS (150 mm x 2,1 mm x 5,0 μ m).

Figura 23 - Cromatogramas obtidos por CLAE das análises da reação de aminólise entre o linoleato de etila (**1**) e a *N*-dodecilamina (**2**) catalisada por (A) CALB na proporção 0,8:1 dos reagentes (B) CALB na proporção 1:1 dos reagentes (C) CALB na proporção 1:1 dos reagentes.



Condições de análise CLAE: MeOH/H₂O (80:20); fluxo 0,27 mL/min; 210 nm; t_c = 40 min, Coluna C18X- Terra MS (150 mm x 2,1 mm x 5,0 μm).

4.1.2 Estudo do efeito da proporção de CALB sob o rendimento reacional

De acordo com estudo realizado previamente, o produto (9Z,12Z) -*N*-dodeciloctadeca-9,12-dienamida (**10**) foi obtido com rendimento elevado (97%) através da reação entre o linoleato de etila (**1**) e *N*-dodecilamina (**2**) em *proporções equimolares* adicionando-se de 5g de lipase/mol de substratos ao meio reacional. A partir deste resultado satisfatório, as *proporções equimolares* dos reagentes foram padronizadas.

Embora a adição de 5 g de lipase de *Candida antarctica* produziu um excelente rendimento, deve-se considerar que seu custo é um fator crucial para a implantação de processos em larga escala. Desta forma, iniciou-se uma série de reações variando-se a proporção de CALB no meio reacional, visando obter rendimentos elevados com menores proporções enzimáticas e avaliar seu comportamento em maiores proporções. Este estudo foi realizado com os valores descritos na Tabela 4 (Materiais e Métodos 3.2.2).

As reações foram preparadas seguindo os procedimentos experimentais descritos e após 20 h, alíquotas foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, usando-se um sistema de eluentes metanol e água. Os resultados estão sumarizados na Tabela 8.

Tabela 8 - Rendimentos das reações entre linoleato de etila (**1**) e *N*-dodecilamina (**2**) promovidas com diferentes proporções enzimáticas.

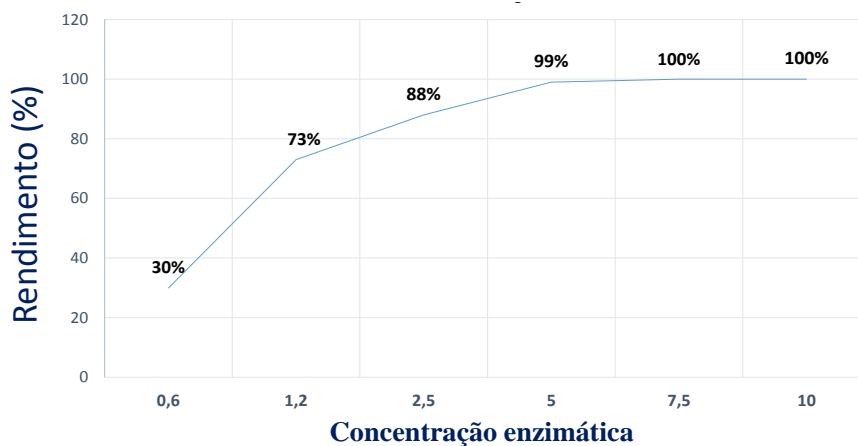
Experimento	CALB (g/mol reagentes)	Linoleato de etila remanescente ^a %	(9Z,12Z) - <i>N</i> - dodeciloctadeca-9,12- dienamida %
1	0,6	70	30
2	1,2	27	73
3	2,5	12	88
4	5,0	1	99
5	7,5	1	99
6	10,0	0	100

Condições reacionais: 65°C, vácuo, CALB: proporção calculada em g/mol de substratos, reagentes:1:1(*equimolar*), tempo: 20 horas. ^a: Rendimentos calculados por CLAE.

Como pode ser observado, a atividade enzimática foi proporcional à sua concentração no meio reacional. A enzima apresentou atividade a partir da menor proporção adicionada (0,6 g/mol) fornecendo um rendimento de 30%. O rendimento reacional foi elevado ao duplicar-se a proporção enzimática (1,2 g/mol, Rendimento: 73%). Este comportamento ocorreu de forma crescente até a concentração enzimática de 5,0 g/mol, onde foi atingido o excelente rendimento de 99 %, o qual pode ser considerado total. A partir desta concentração,

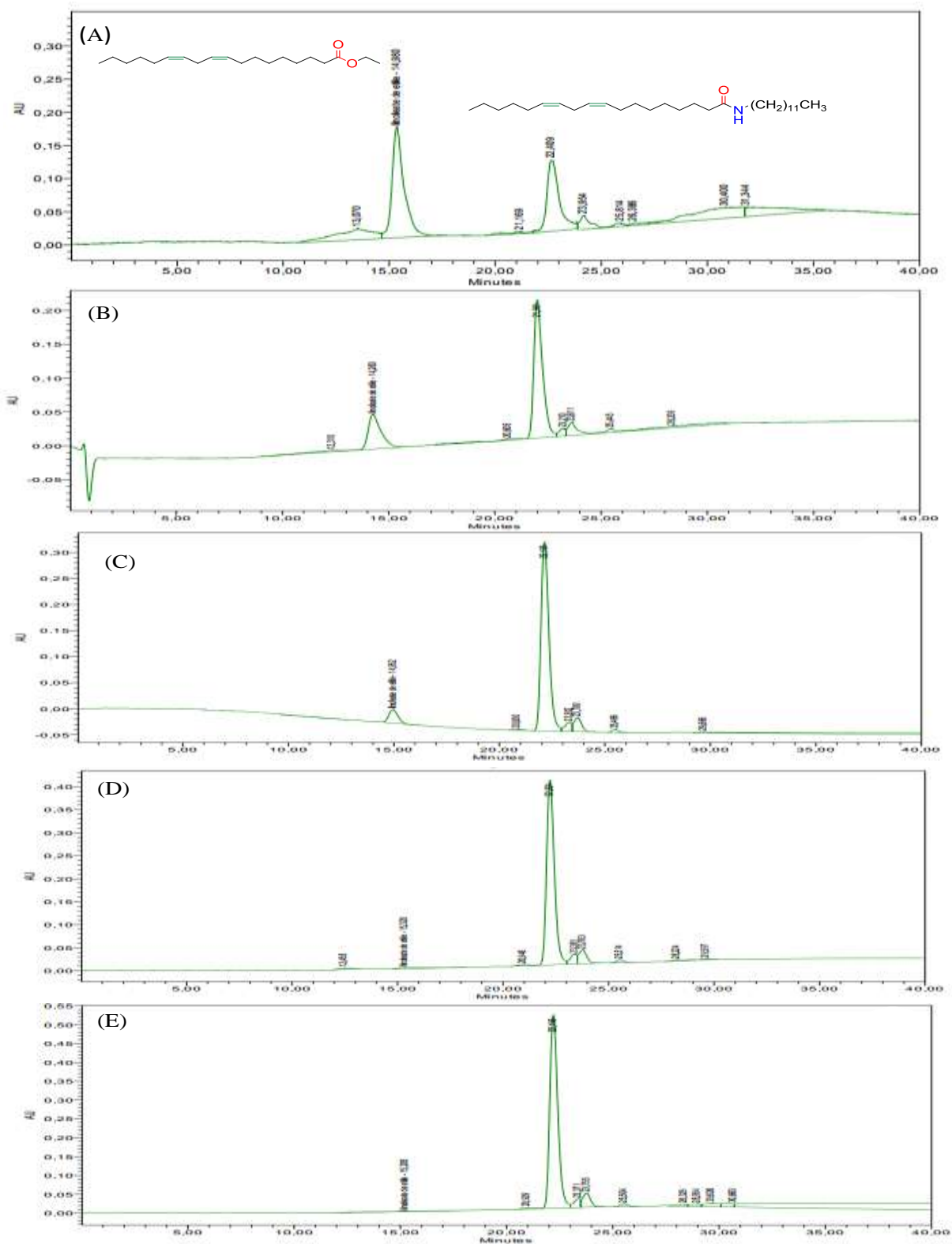
observou-se que o rendimento da reação enzimática atingiu seu máximo, sendo estabilizado (Figura 24).

Figura 24 - Efeito da concentração enzimática sob o rendimento reacional.



Na Figura 25 estão apresentados os cromatogramas obtidos por CLAE do produto **10** obtido pela reação de aminólise entre **1** e **2**, nas concentrações enzimáticas de 0,6 g/mol, 1,2 g/mol, 2,5 g/mol, 5g/mol e 10g/mol.

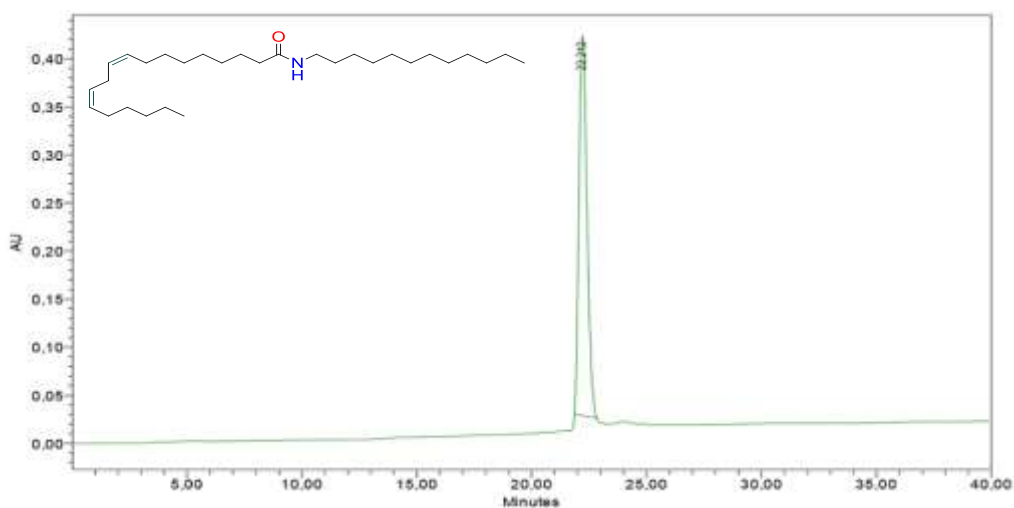
Figura 25 - Cromatogramas obtidos por CLAE das análises das reações de aminólise entre **1** e **2** com (A) 0,6 g de enzima/mol substratos (B) 1,2 g de enzima/mol substratos (C) 2,5 g de enzima/mol substratos (D) 5,0 g de enzima/mol substratos (E) 10 g de enzima/mol substratos.



Condições de análise CLAE: MeOH/H₂O (80:20); fluxo 0,27 mL/min; 210 nm; $t_c = 40$ min, Coluna C18 X-Terra MS (150 mm x 2,1 mm x 5,0 μ m).

Neste estudo observou-se que através da adição de 2,5 gramas de CALB por mol de substratos ao meio reacional, o produto (9Z,12Z)-*N*-dodeciloctadeca-9,12-dienamida (**10**) foi obtido com rendimento de 88%. Embora represente um rendimento elevado, este valor não é interessante para a implantação de um processo em escala industrial. Desta forma, as condições para a produção do composto **10** foram padronizadas, fixando-se a adição dos reagentes em *concentrações equimolares* e 5g/mol de CALB em relação aos substratos. Nestas condições, o produto foi purificado por cromatografia *Flash* e analisado por CLAE. (Figura 26).

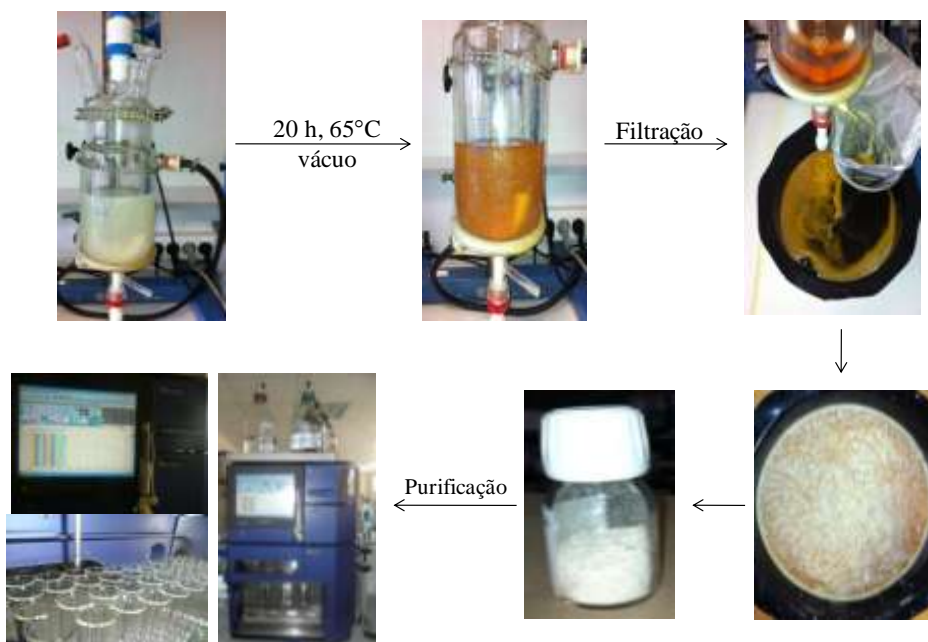
Figura 26 - Cromatograma obtido por CLAE do produto **10** após purificação.



Condições de análise CLAE: MeOH/H₂O (80:20); fluxo 0,27 mL/min; 210 nm; t_c = 40 min, Coluna C18 X-Terra MS (150 mm x 2,1 mm x 5,0 μm).

Posteriormente, o procedimento experimental foi reproduzido em larga escala (reatores de 1L) para estocagem e estudos envolvendo atividades biológicas do produto **10**, os quais demonstraram ação benéfica para a pele¹² (Figura 27).

Figura 27 - Preparação do produto *N*-dodecilnonadeca-9,12-dienamida (**10**) em reator de 1 L.



Os ésteres e amidas derivados de ácidos graxos são importantes para a manutenção de uma pele saudável, pois suas cadeias hidrofóbicas longas constituem uma barreira contra a evaporação de água e a consequente desidratação cutânea (NOVOTNY *et al.* 2010).

Estudos reportam que amidas graxas auxiliam na manutenção da função barreira de proteção epidérmica devido a afinidade pelos lipídios da camada córnea. Adicionalmente, estes estudos demonstram que a permeabilidade sob a camada córnea está diretamente relacionada a lipofilicidade das moléculas graxas (IM *et al.* 2011).

Considerando a lipofilicidade da amida graxa (9Z,12Z)-*N*-dodeciloctadeca-9,12-dienamida (**10**), este composto poderá atuar como um ingrediente emoliente em formulação de cremes hidratantes. As amidas graxas são mais interessantes em formulações graxas que os correspondentes ésteres devido a sua maior estabilidade, especialmente em relação a reações de hidrólise.

¹² Descrições mantidas em sigilo devido a normas da empresa Solabia.

4.1.3 Caracterização da (9Z,12Z)-N-dodeciloctadeca-9,12-dienamida (10) obtida por CALB

O espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}) apresentou uma banda intensa em 3327 cm^{-1} , originada a partir de vibrações de estiramento da ligação N-H. A presença de apenas uma banda neste comprimento de onda é característica de ligações N-H de amidas secundárias ($3500\text{-}3400\text{cm}^{-1}$) (SILVERSTEIN 2010). Observou-se a presença de uma banda média em 3009 cm^{-1} , correspondente às ligações duplas provenientes da estrutura do linoleato de etila, sendo esta corresponde aos valores encontrados na literatura ($3090\text{-}3010 \text{ cm}^{-1}$). A banda intensa encontrada em 2949 cm^{-1} é decorrente do estiramento das ligações C-H do produto **10**. As amidas mostram uma ou mais bandas de absorção intensa de carbonila (mais conhecida como banda de amida I) que ocorrem entre $1870\text{-}1540 \text{ cm}^{-1}$ (SILVERSTEIN 2010). No caso de amidas secundárias, a absorção deve ocorrer entre $1650\text{-}1615 \text{ cm}^{-1}$; este fato é compatível com a presença de uma banda em 1636 cm^{-1} do produto N-dodeciloctadeca-9-12-dienamida (**10**) (Figura 28).

As análises de RMN ^1H (500 MHz, MeOD_4) demonstraram a presença dos seguintes sinais: multipletos referentes a hidrogênios metílicos δ_{H} 0,87-0,92 (m, 6H), multipletos referentes a hidrogênios alifáticos saturados δ_{H} 1,27-1,31 (m, 33), multipletos referentes a hidrogênios na posição β -amida δ_{H} 1,47-1,51 (m, 2H) e δ_{H} 1,61-1,63 (m, 2H), multipletos referentes a hidrogênios α -carbonílicos δ_{H} 2,03-2,07 (m, 2H), um sinal tripleto referente ao hidrogênio bis alílico δ_{H} 2,78 (t, 2H, $J=13,11 \text{ Hz}$), um quarteto referente ao hidrogênio na posição α -amida δ_{H} 3,23 (q, 2H, $J=20,11 \text{ Hz}$) e multipletos atribuídos a hidrogênios olefínicos δ_{H} 5,33-5,41 (m, 4H) (Figura 29).

As análises de RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD_4) mostraram a presença dos seguintes sinais: duas linhas espectrais referentes a carbonos metílicos (δ 14,0; 14,1), duas linhas espectrais referentes a carbonos secundários adjacentes (δ 22,5; 22,6), dezessete linhas espectrais referentes a carbonos da cadeia alifática (δ 25,6; 25,8; 26,9; 27,2; 29,1; 29,2; 29,2; 29,3; 29,3; 29,5; 29,5; 29,6; 29,6; 29,7; 29,7; 31,5; 31,9), duas linhas espectrais em δ 36,9 e δ 39,5, referentes respectivamente, ao carbono adjacente ao carbono carbonílico e ao carbono ligado ao nitrogênio, quatro linhas referentes a carbonos de ligações duplas (δ 127,9; 128,0; 130,0; 130,2) e uma linha em δ 172,9 característica de carbono carbonílico (Figura 30).

O espectro de massas de alta resolução comprovou a formação do produto (9Z,12Z)-N-dodecilnonadeca-9,12-dienamida (**10**) (m/z 447,44), através do pico M+1 referente ao íon protonado de m/z 448,45 (Figura 31).

Figura 28 - Espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}) para a (9Z,12Z)-N-dodeciloctadeca-9,12-dienamida (**10**).

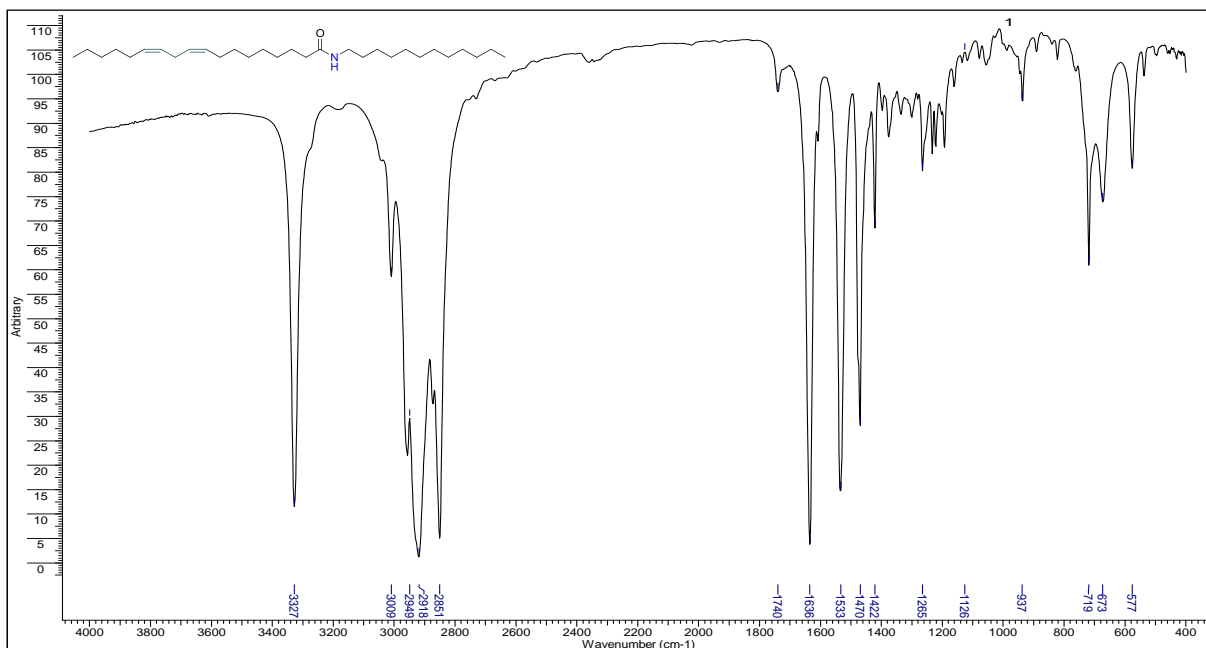


Figura 29 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, MeOD_4) da (9Z,12Z)-N-dodeciloctadeca-9,12-dienamida (**10**) obtida por CALB.

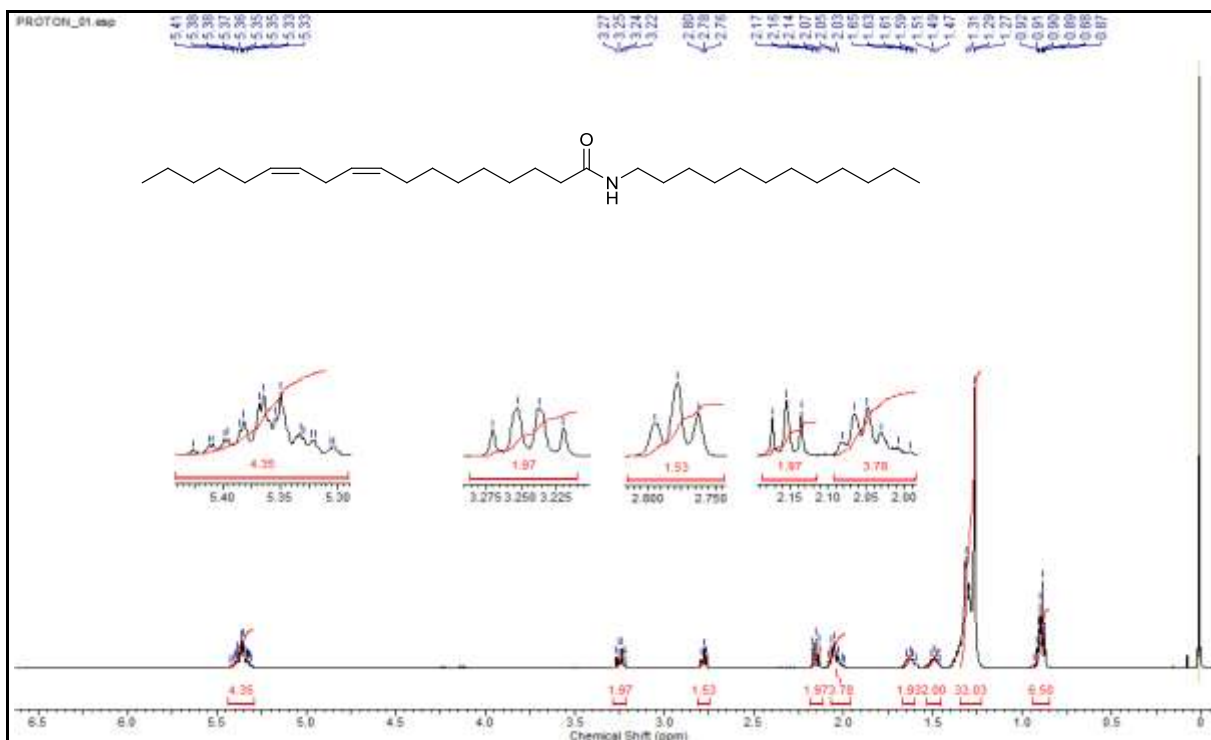


Figura 30 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD_4) da (9Z,12Z)-N-dodeciloctadeca-9,12-dienamida (**10**) obtida por CALB.

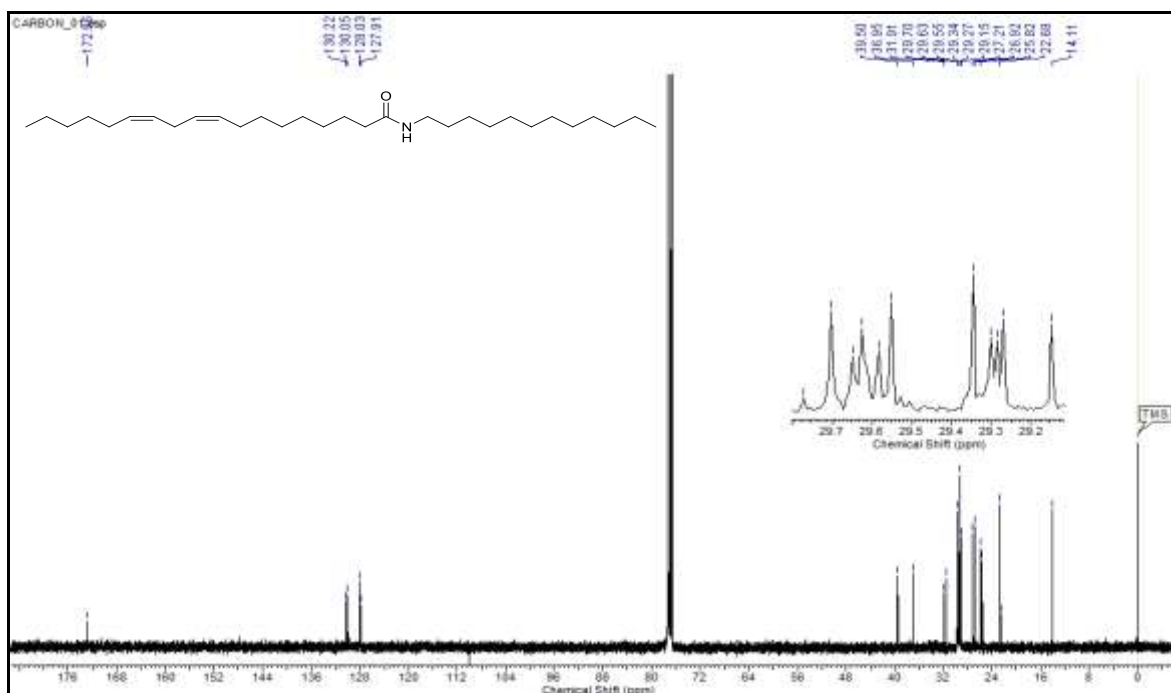
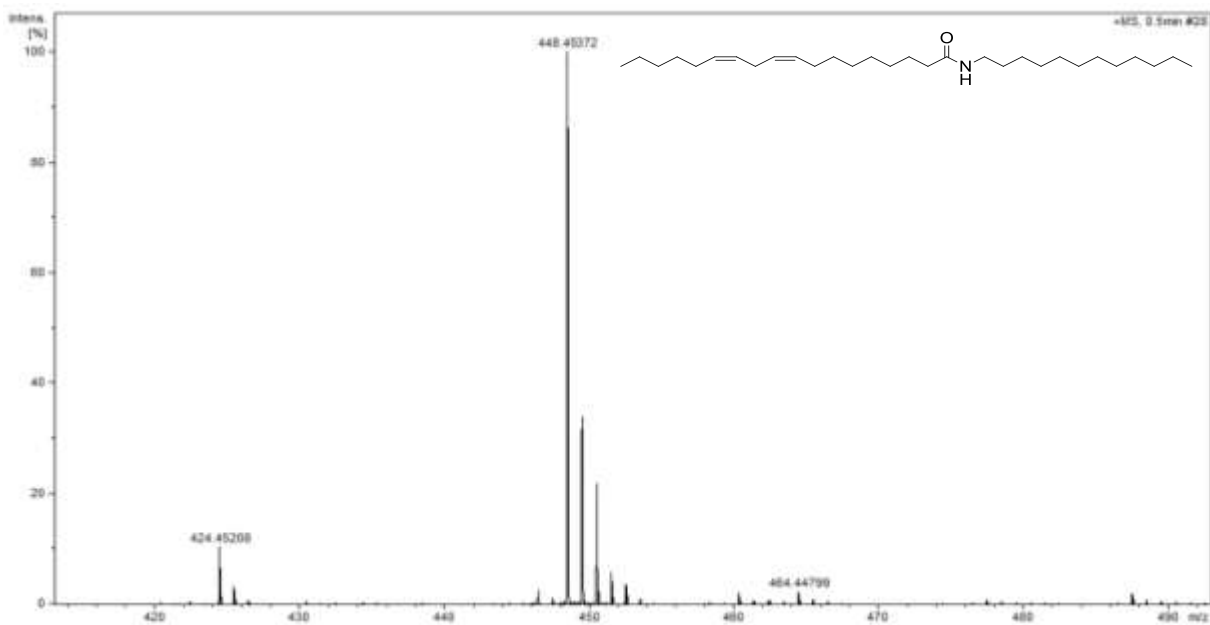


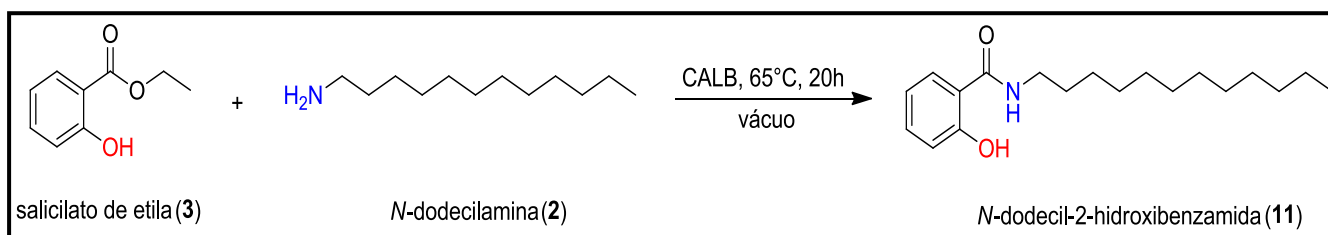
Figura 31 - Espectro de massas de alta resolução da (9Z,12Z)-N-dodecilonadeca-9,12-dienamida (**10**).



4.2 Reações entre a *N*-dodecilamina (2) e o salicilato de etila (3) catalisadas por CALB

Após promover as reações entre o linoleato de etila (1) e a *N*-dodecilamina (2) e o para a produção de uma amida graxa com propriedades emolientes, buscou-se sintetizar um produto entre a *N*-dodecilamina (2) e o éster salicilato de etila (3). As reações foram promovidas visando a síntese do produto *N*-dodecil-2-hidroxibenzamida (11) (Esquema 17).

Esquema 17 - Reação de aminólise entre salicilato de etila (3) e *N*-dodecilamina (2) catalisada por CALB.



De acordo com as condições padronizadas, foram realizadas reações de aminólise adicionando-se *proporções equimolares* dos reagentes salicilato de etila (3) e *N*-dodecilamina (2), variando-se as proporções de lipase de *Candida antarctica*, como descrito no item 3.3. Os resultados das análises obtidas por cromatografia líquida de alta eficiência podem ser observados na Tabela 9.

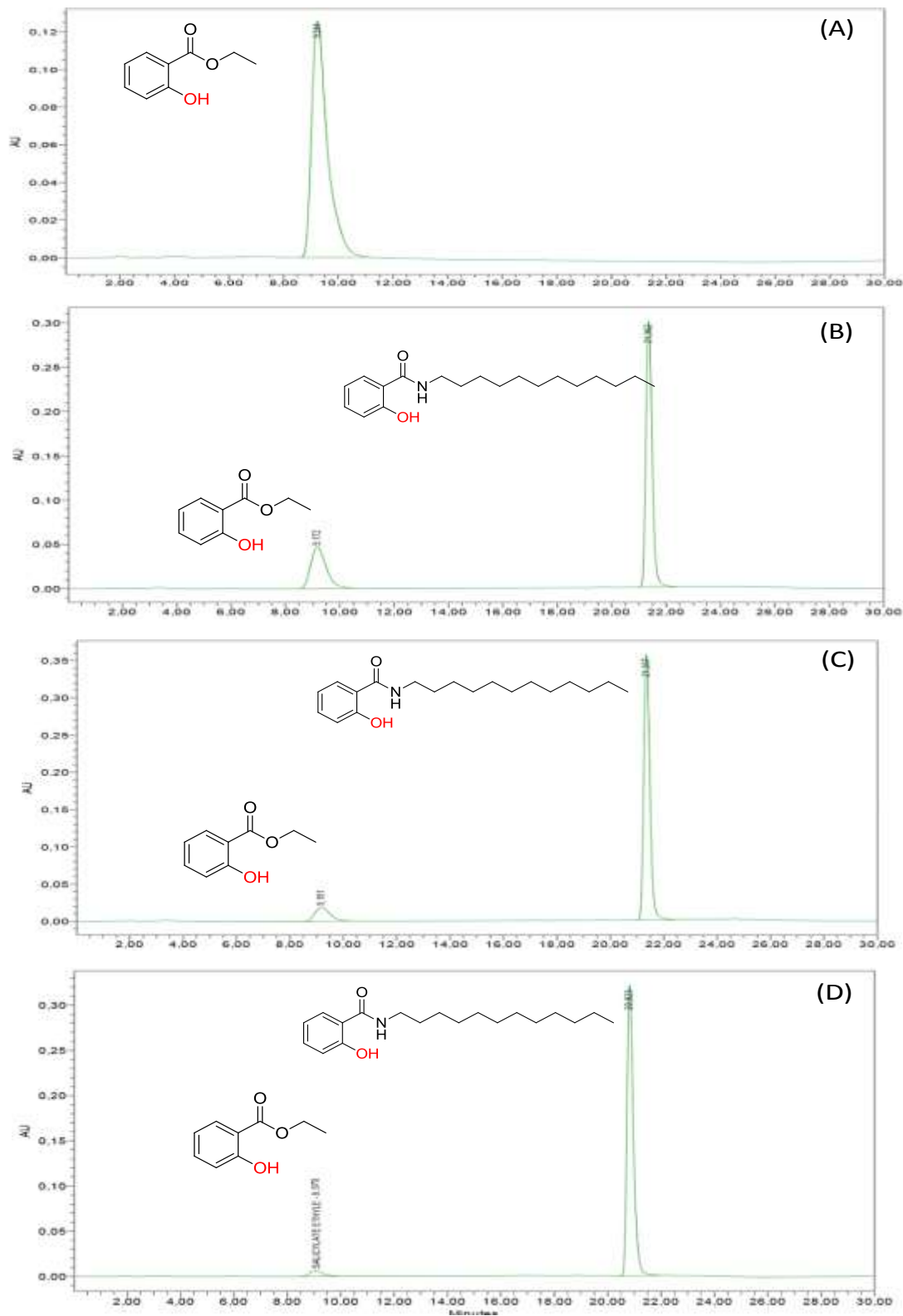
Tabela 9 - Rendimentos das reações entre o salicilato de etila (3) e a *N*-dodecilamida (2) promovidas com diferentes concentrações enzimáticas.

Experimento	CALB (g/mol substrato)	Salicilato de etila remanescente ^a (%)	<i>N</i> -dodecil-2-hidroxibenzamida (%)
1	0,6	75	25
2	1,2	32	68
3	2,5	15	85
4	5,0	5,0	95,0
5	7,5	3,0	98,0
6	10,0	3,0	98,0

Condições reacionais: 65°C, vácuo, lipase: concentração calculada em g/mol em relação ao salicilato de etila, reagentes: concentração equimolar, tempo: 20 horas. ^a: Rendimentos calculados com base em análise de HPLC.

Este estudo mostrou que a enzima apresentou atividade a partir da menor proporção adicionada (0,6 g/mol) fornecendo um rendimento de 25%. O rendimento reacional foi elevado ao duplicar-se a concentração enzimática (1,2 g/mol, 68%). Este comportamento ocorreu de forma crescente até a proporção enzimática de 5,0 g/mol, onde foi atingido o rendimento de 95%. A partir desta proporção, observou-se que a atividade enzimática foi estabilizada e forneceu um rendimento elevado (98%). Os resultados podem ser observados nos cromatogramas obtidos por CLAE na Figura 32.

Figura 32 - Cromatogramas obtidos por CLAE do (A) Padrão do salicilato de etila, Reações com (B) 2,5 g de enzima/ mol de salicilato de etila (C) 5,0 g/mol lipase (D) 10 g/mol lipase.

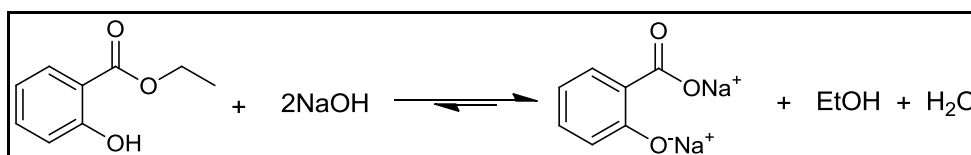


Condições de análise CLAE: MeOH/H₂O (80:20); fluxo 0,27 mL/min; 210 nm; $t_c = 30$ min, Coluna C18 X-Terra MS (150 mm x 2,1 mm x 5,0 μ m).

Embora o produto *N*-dodecil-2-hidroxibenzamida (**11**) foi obtido com rendimentos elevados empregando-se entre 5-10 gramas de enzima/substrato (95-98%), encontrou-se um inconveniente para sua aplicação em formulações cosméticas, pois mesmo após sua purificação, o produto manteve-se com um forte odor característico do salicilato de etila.

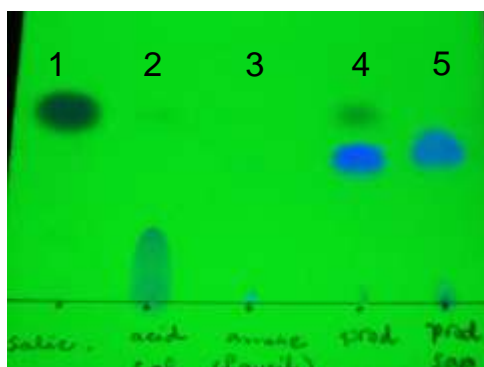
No meio comercial de matérias-primas cosméticas, é desejável que os compostos encontrem-se com odor e coloração neutra, cabendo a empresa responsável pelas vendas ao mercado consumidor a escolha destas características. Desta forma, buscou-se remover o salicilato de etila (**3**) remanescente através de uma reação de saponificação. No curso desta reação, ocorre um equilíbrio químico entre o reagente e seu sal de ácido carboxílico, o qual pode ser removido na fase aquosa através de uma reação ácido-base seguida de filtração e extração com solventes orgânicos (Esquema 18).

Esquema 18 - Reação ácido-base para remoção do salicilato de etila remanescente.



Através deste processo, o salicilato de etila (**1**) foi totalmente eliminado, eliminando-se o odor e obtendo-se um produto neutro. Através de análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foi possível observar o desaparecimento do salicilato de etila (**1**) (Figura 33).

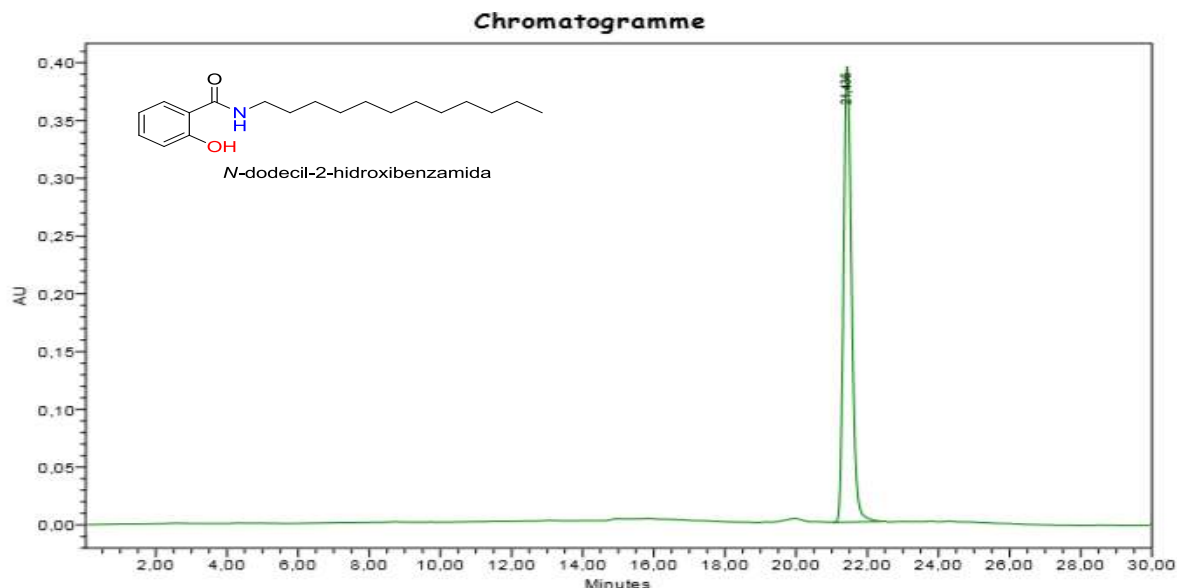
Figura 33 - Placa de CCD contendo spots do salicilato de etila (**3**) e produto *N*-dodecil-2-hidroxibenzamida (**11**) (*spot* 5).



1: Salicilato de etila, 2: Ácido salicílico, 3: *N*-dodecilamina
4: Produto 12, 5: Produto 12 após saponificação.

Este produto foi purificado por cromatografia *flash* e analisado por CLAE. O cromatograma do produto *N*-dodecil-2-hidroxibenzamida purificado (**11**) está apresentado na Figura 34.

Figura 34 - Cromatograma obtido por CLAE da *N*-dodecil-2-hidroxibenzamida (**11**) purificado.



Condições de análise CLAE: MeOH/H₂O (80:20); fluxo 0,27 mL/min; 210 nm; $t_c = 40$ min, Coluna C18X-Terra MS (150 mm x 2,1 mm x 5,0 μ m).

Em estudos encontrados na literatura, ésteres derivados do ácido salicílico foram obtidos a partir de álcoois graxos como octanol, decanol e dodecanol. Os estudos mostraram que a aplicação destes compostos resultou em uma maior eficiência da função barreira da pele graças a sua lipofilicidade, sendo a eficácia proporcional ao comprimento da cadeia carbônica constituinte. Além da manutenção da função barreira de proteção, a presença de um derivado do ácido salicílico representa um atrativo para a formulação de protetores solares contra a radiação ultravioleta (IM *et al.* 2012).

Estudos sobre as propriedades físico-químicas de amidas derivadas do ácido salicílico foram realizados, demonstrando que o composto *N*-dodecil salcilamida exibiu alta afinidade pela camada córnea e que sua aplicação permaceu restrita a camada superficial da pele, local de ação de filtros (YAN 2011). Desta forma, o produto *N*-dodecil-2-hidroxibenzamida (**11**) pode ser introduzido em formulações cosméticas que visam a manutenção dos lipídios da camada córnea e proteção contra a radiação ultravioleta.

4.2.1 Caracterização da *N*-dodecil-2-hidroxibenzamida (**11**) obtida por CALB

No espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}) observou-se uma banda larga e intensa em 3346 cm^{-1} , região referente a vibrações de deformação axial das ligações O-H sobrepostas a ligações N-H. Observou-se duas bandas em 2947 e 2833 cm^{-1} decorrentes de vibrações de deformação axial das ligações C-H de alcanos correspondente a cadeia saturada do produto **11** e bandas em 1653 e 1028 cm^{-1} , atribuídas, respectivamente, a vibrações de deformação angular de ligações de carbonila do grupamento amida e de ligações O-H, respectivamente (Figura 35).

As análises de RMN ^1H (500 MHz, MeOD_4) demonstraram a presença de sinais: multipletos referentes a hidrogênios metílicos em $\delta_{\text{H}} 0,79-0,83$ (m, 3H), multipletos referentes a hidrogênios alifáticos saturados em $\delta_{\text{H}} 1,19-1,24$ (m, 16), multipletos referentes a hidrogênios na posição β -amida em $\delta_{\text{H}} 1,48-1,51$ (m, 2H), multipletos referentes a hidrogênios α -amídicos em $\delta_{\text{H}} 3,21-3,26$ (m, 2H), bem como multipletos referentes a hidrogênios do anel aromático em $\delta_{\text{H}} 6,76$ (m, 2H), $\delta_{\text{H}} 7,35$ (m, 1H) $\delta_{\text{H}} 7,79$ (m, 1H) (Figura 36).

No espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD_4) da *N*-dodecil-2-hidroxibenzamida (**11**) foi observada uma linha espectral característica de carbono aromático ligado ao grupo hidroxila ($\delta 161,3$) e uma linha característica de carbonila de amida ($\delta 169,7$). Foram também observadas cinco linhas espectrais referentes a carbonos sp^2 referentes aos sinais do anel aromático ($\delta 133,8$; $125,7$; $118,5$; $118,3$; $114,7$), uma linha espectral em $\delta 39,7$ atribuído ao carbono α ligado ao nitrogênio, dez linhas espectrais referentes a carbonos metilênicos alifáticos ($\delta 31,9$; $29,7$; $29,6$; $29,5$; $29,5$; $29,4$; $29,3$; $26,9$; $26,2$; $22,6$) e uma linha espectral em $\delta 14,0$ referente ao carbono ao carbono metílico sp^3 (Figura 37).

O espectro de massas de alta de resolução também comprovou a presença do produto *N*-dodecil-2-hidroxibenzamida (**11**) (MM: $305,235 \text{ g/mol}$) através do pico M+1 referente ao íon protonado de $m/z 306,249$ (Figura 38).

Figura 35 - Espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}) da *N*-dodecil-2-hidroxi-benzamida (**11**).

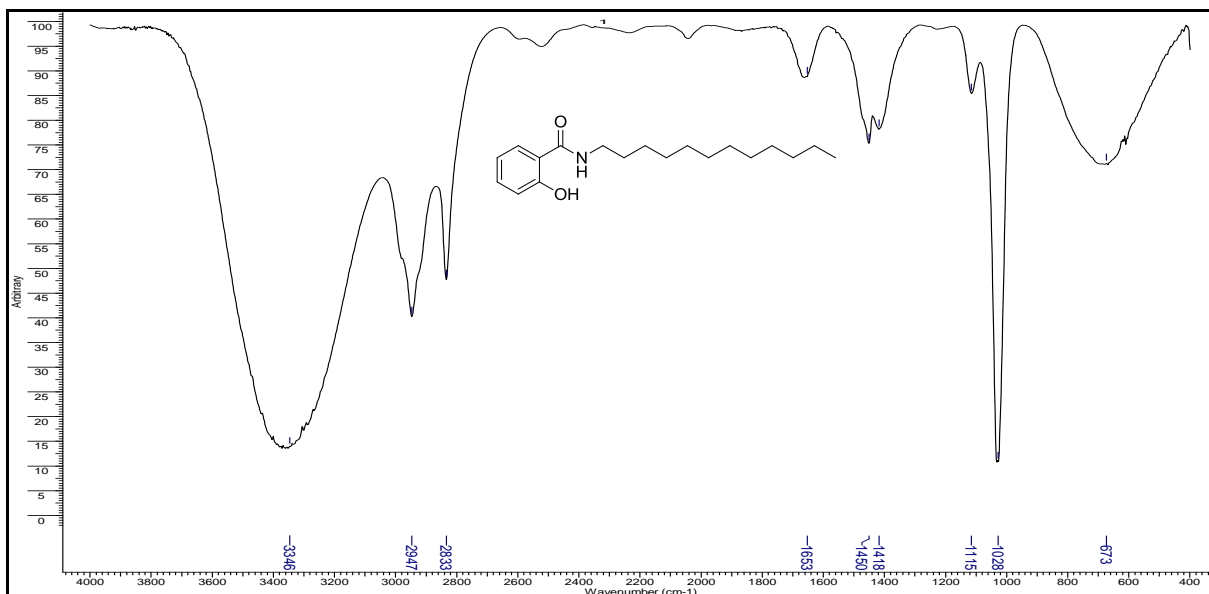


Figura 36 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, MeOD_4) da *N*-dodecil-2-hidroxi-benzamida (**11**) obtida pela reação de aminólise.

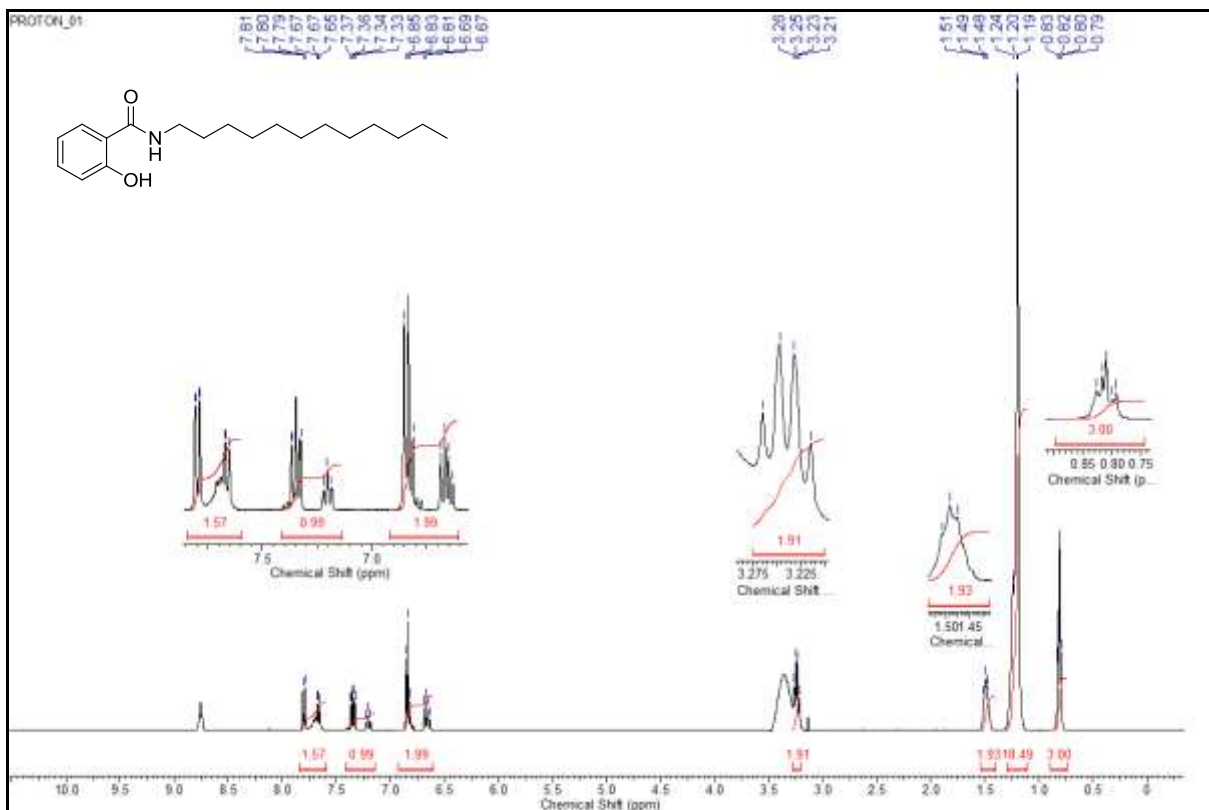


Figura 37 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD_4) da *N*-dodecil-2-hidroxibenzamida (**11**) obtida pela reação de aminólise.

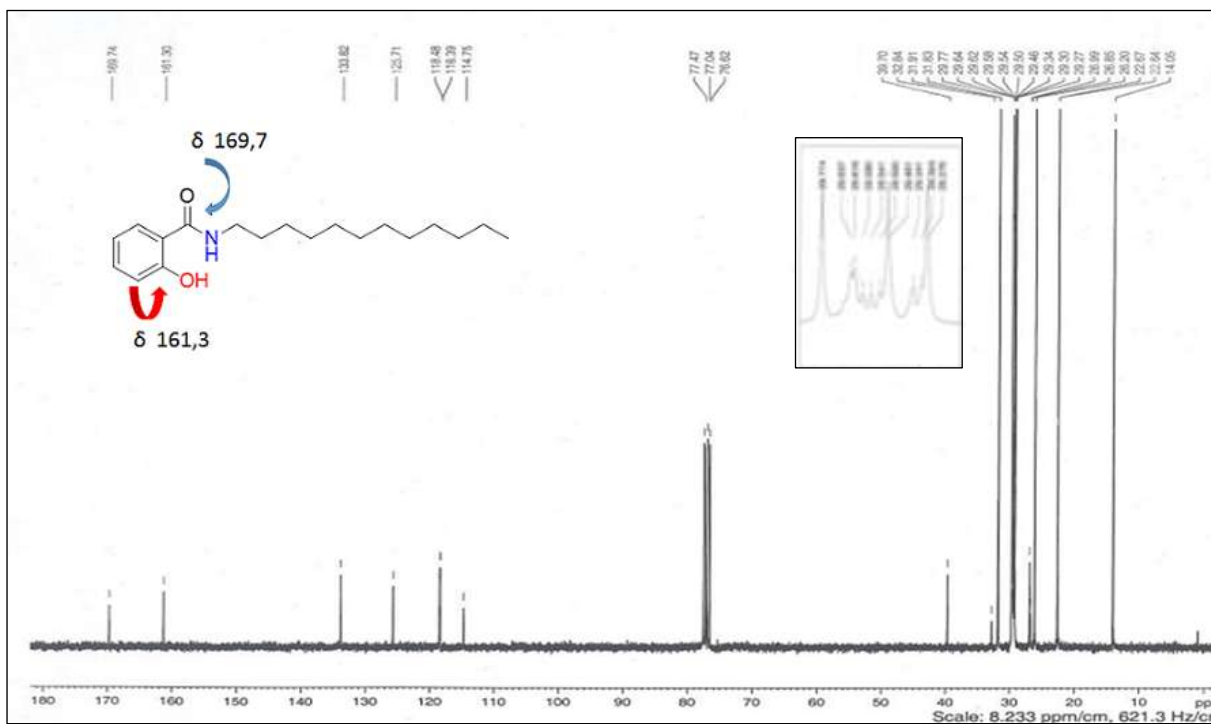
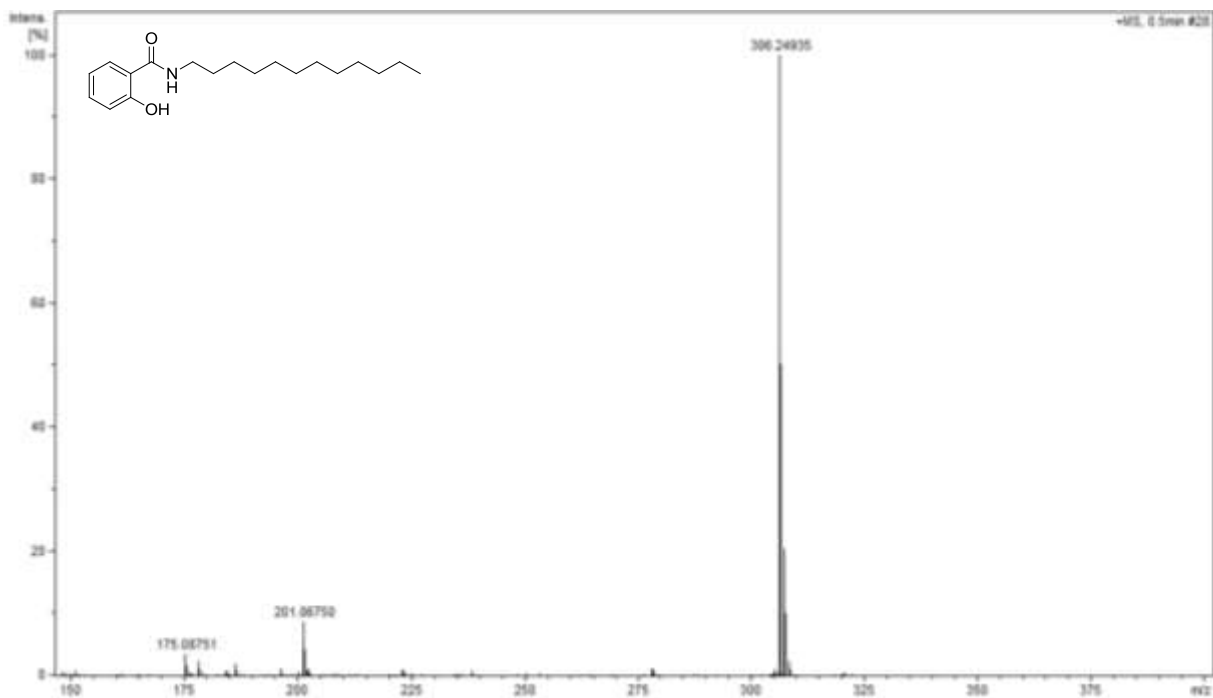


Figura 38 - Espectro de massas de alta resolução da *N*-dodecil-2-hidroxibenzamida (**11**).



4.3 Reações com os aminoálcoois (4-9) e o salicilato de etila (3) catalisadas por CALB

O objetivo deste estudo foi voltado para reações entre o salicilato de etila (3) e aminoálcoois hidrofílicos de cadeia alifática e ramificada (4-9). É conhecido que lipases podem catalisar reações de aminólise e de transesterificação, de acordo com o agente nucleófilico presente no meio reacional. Desta forma, foram selecionados seis aminoálcoois, os quais podem oferecer um grupo amino e/ou uma hidroxila para a produção de amidas ou ésteres com propriedades bioativas.

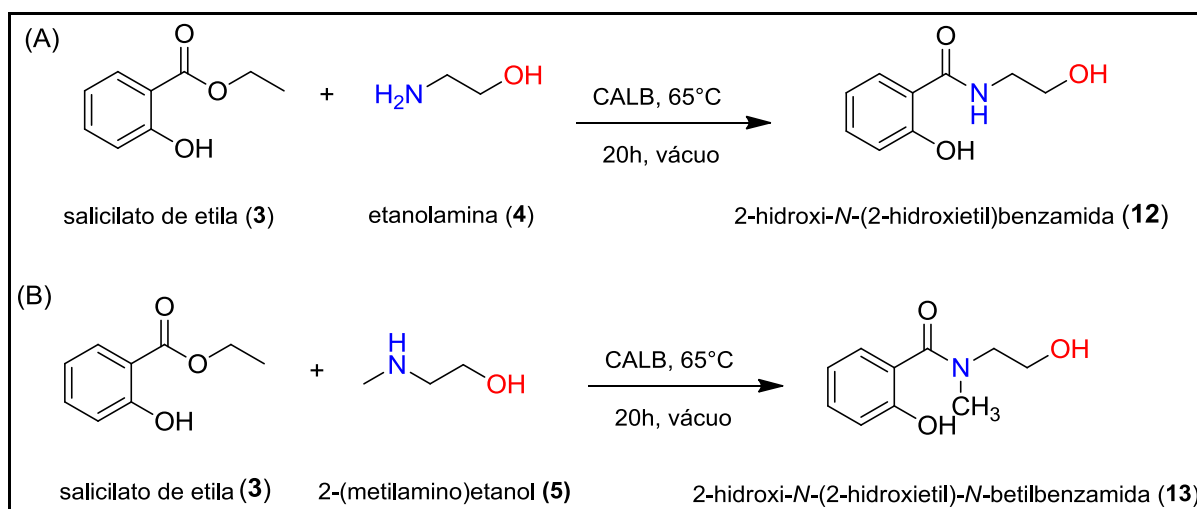
É interessante ressaltar que estes aminoálcoois¹³ foram selecionados de acordo com os reagentes permitidos pelo *Personal Care Products Council* (PCPC), a associação que representa os interesses de mais de 600 companhias mundiais envolvidas no desenvolvimento de cosméticos e produtos de cuidados pessoais, priorizando normas de segurança (<http://www.personalcarecouncil.org/>).

4.3.1. Síntese da 2-hidroxi-N-(2-hidroxi-etil)benzamida (12) e 2-hidroxi-N-(2-hidroxi-etil)-N-metilbenzamida (13) catalisadas por CALB

Aminoálcoois de cadeia alifática curta apresentam uma estrutura interessante para a obtenção de moléculas que podem ser utilizadas em formulações cosméticas, pois podem penetrar com maior facilidade nas camadas mais profundas da pele. Neste sentido, os aminoálcoois etanolamina (4) e 2-(metilamino)etanol (5) foram selecionados para reações com o substrato salicilato de etila. As reações foram promovidas seguindo o procedimento experimental anterior e 20 horas, alíquotas das reações foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência usando-se um sistema de eluentes constituído de metanol e água (Esquema 19).

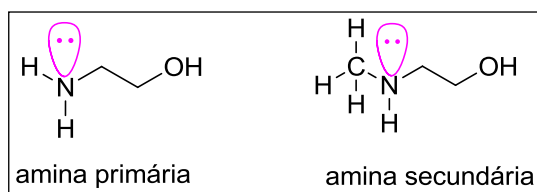
¹³ Exceto o aminoálcool tiramina.

Esquema 19 - Reação de aminólise catalisada por CALB entre salicilato de etila (**3**) e (A) etanolamina (**4**), (B) 2-(metilamino)etanol (**5**).



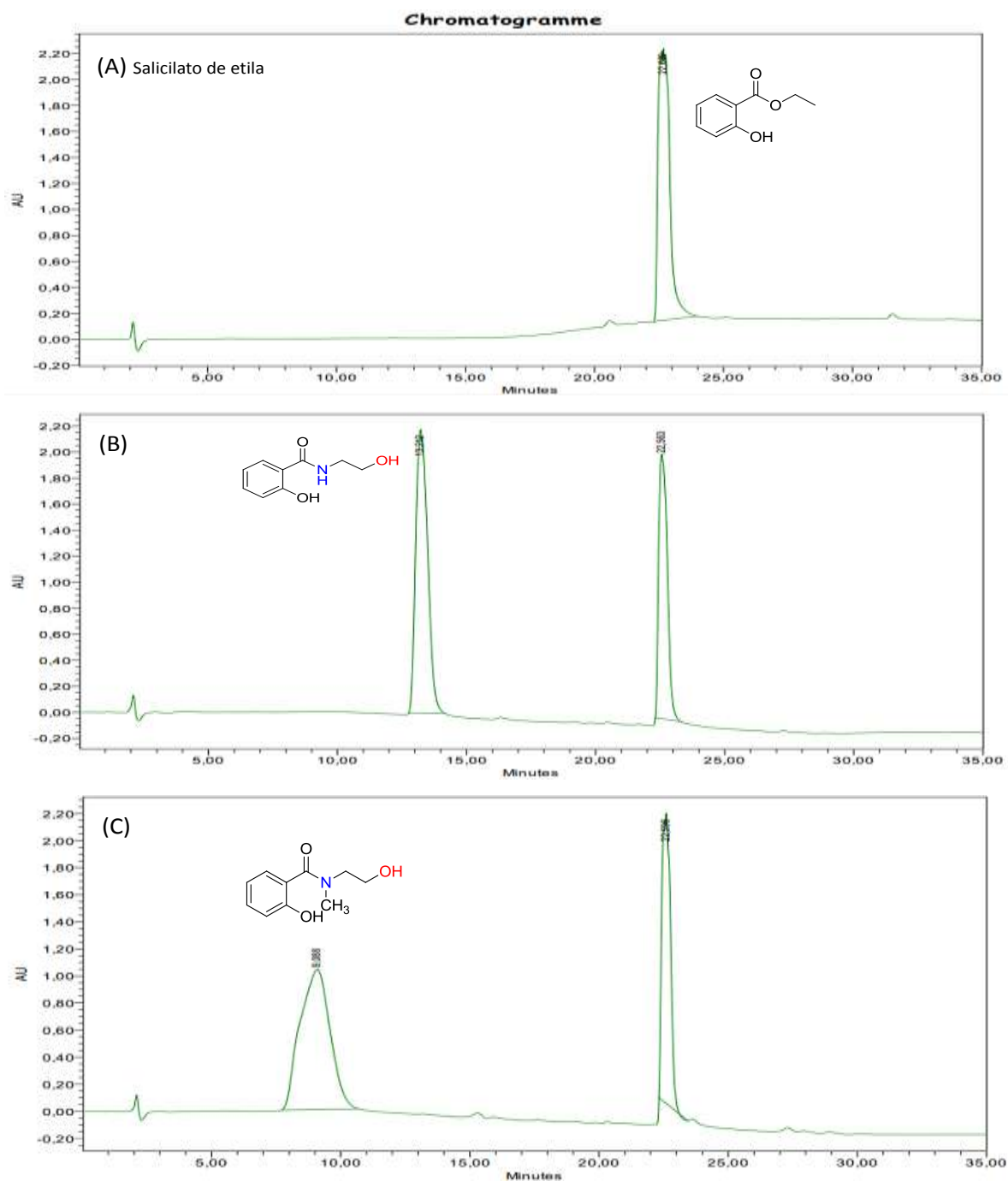
As análises das reações mostraram que as amidas fenólicas **12** e **13** foram obtidas com rendimentos de 60% e 63%, respectivamente. Foi observado que as reações apresentaram rendimentos similares entre aminoálcoois que apresentam uma amina primária (**4**) e uma amina secundária (**5**). Observou-se também que na presença de dois grupos funcionais (amina e álcool) a lipase apresentou quimiosseletividade frente ao grupo amino, catalisando apenas a reação de aminólise.

É conhecido que aminas são compostos básicos doadores de pares de elétrons ou receptoras de prótons. Neste grupo funcional, o átomo de nitrogênio hibridizado sp^3 possui um par de elétrons não-compartilhado relativamente exposto, caracterizando as aminas como bons nucleófilos (SOLOMONS 2005). No caso de aminas primárias, como a etanolamina (**4**), a presença de um grupo alquila pode aumentar a densidade eletrônica no nitrogênio através de efeitos indutivos e eletrônicos, facilitando a captura de prótons presentes no meio reacional ou favorecendo a nucleofilicidade do par de elétrons (SOLOMONS 2005). Em aminas secundárias, como a 2-(metilamino)etanol (**5**) encontram-se dois grupos alquila para elevar a densidade eletrônica ao redor do nitrogênio, um fato que justifica aminas secundárias serem mais básicas do que as primárias (Figura 39). No entanto, este efeito não foi significativo, provavelmente devido as estruturas das aminas alifáticas apresentarem cadeia curta.

Figura 39 – Estrutura da etanolamina (**4**) e 2(metil)aminoetanol (**5**).

A lipase apresentou quimiosseletividade, uma vez que apenas amidas foram obtidas. Provavelmente, a ausência de formação de ésteres bem como o moderado rendimento das amidas pode ser relacionado a protonação da amida pelo fenol e pela polaridade dos substratos utilizados. Os cromatogramas do padrão salicilato de etila e das reações com os aminoálcoois **4** e **5** podem ser observados na figura 40.

Figura 40 - Cromatogramas obtidos por CLAE das reações de aminólise entre salicilato de etila (**3**) e aminoálcoois (**4-5**). (A) Padrão no salicilato de etila, (B) Reação de aminólise com amino-álcool **4**, (C) Reação de aminólise com aminoálcool **5** catalisada por CALB.



Como pode ser observado, os produtos 2-hidroxi-*N*-(2-hidroxi-etil)benzamida (**12**) e 2-hidroxi-*N*-(2-hidroxi-etil)-*N*-metilbenzamida (**13**) foram obtidos com rendimentos de 60 e 63% respectivamente, os quais poderiam ser maximizados com o estudo de novas condições reacionais. No entanto, o objetivo do estudo residiu em encontrar aminoálcoois que, como substratos da lipase de *Candida antarctica*, sejam convertidos em *amida fenólicas* com rendimentos superiores a 90% em reações promovidas nas condições padronizadas (proporções *equimolares* dos reagentes e 5 gramas de CALB/mol dos reagentes).

4.3.1.1 Caracterização da 2-hidroxi-*N*-(2-hidroxi-etil)benzamida (**12**) obtida por CALB

O espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}) apresentou uma banda intensa em 3364 cm^{-1} , originada das sobreposições de vibrações de estiramento de ligações O-H e N-H (SILVERSTEIN, 2010). Observou-se uma banda em 1636 cm^{-1} decorrente da deformação angular de NH da amida secundária, adjacente a uma banda em 1595 cm^{-1} , correspondente à absorção de carbonila de amida. Também foram observadas bandas em 2938 e 2884 cm^{-1} , compatíveis com o estiramento das ligações C-H; em 1493 cm^{-1} decorrentes do estiramento de C=C do anel aromático e uma banda em 754 cm^{-1} para ligações C-H do anel *orto*-substituído (Figura 41).

A análise de RMN ^1H (500 MHz, MeOD_4) da amida **12** apresentou dois sinais tripletos referentes aos hidrogênios metilênicos em δ_{H} 3,42 (2H, t, $J=5,77$ Hz) e 3,61 (2H, t, 5,77 Hz), um singlete referente ao hidrogênio do grupo OH em δ_{H} 4,43 (1H, s), bem como os sinais característicos de hidrogênios de anel em 6,76 (2H, t, $J=16,31$ Hz); 7,24-7,29 (1H, m); 7,67 (1H, d, $J=8,28$ Hz) (Figura 42).

As análises de RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD_4) mostraram a presença de dois sinais referentes ao carbono ligado ao grupo hidroxílico em δ 158,1 e ao carbono da carbonila em δ 163,3. Os demais sinais observados são referentes a carbono do anel aromático (δ 134,7; 129,1; 120,1; 118,3) bem como sinais referentes aos dois carbonos sp^3 metilênicos em δ 61,5 e 43,0 (Figura 43).

O espectro de massas de alta resolução comprovou a presença do produto 2-hidroxi-*N*-(2-hidroxi-etil)benzamida (**12**) através do pico M +1 referente ao íon protonado de m/z 182,0818 com 100% de intensidade (Figura 44).

Figura 41 - Espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}) da 2-hidroxi-*N*-(2-hidroxi-etil)benzamida (**12**).

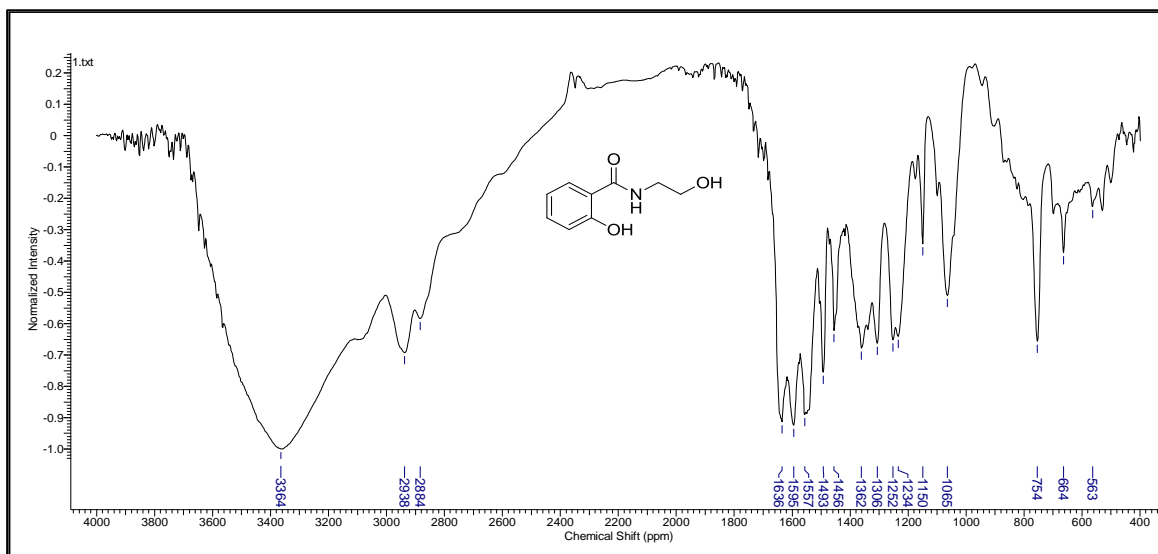


Figura 42 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD_4) da 2-hidroxi-*N*-(2-hidroxi-etil)benzamida (**12**).

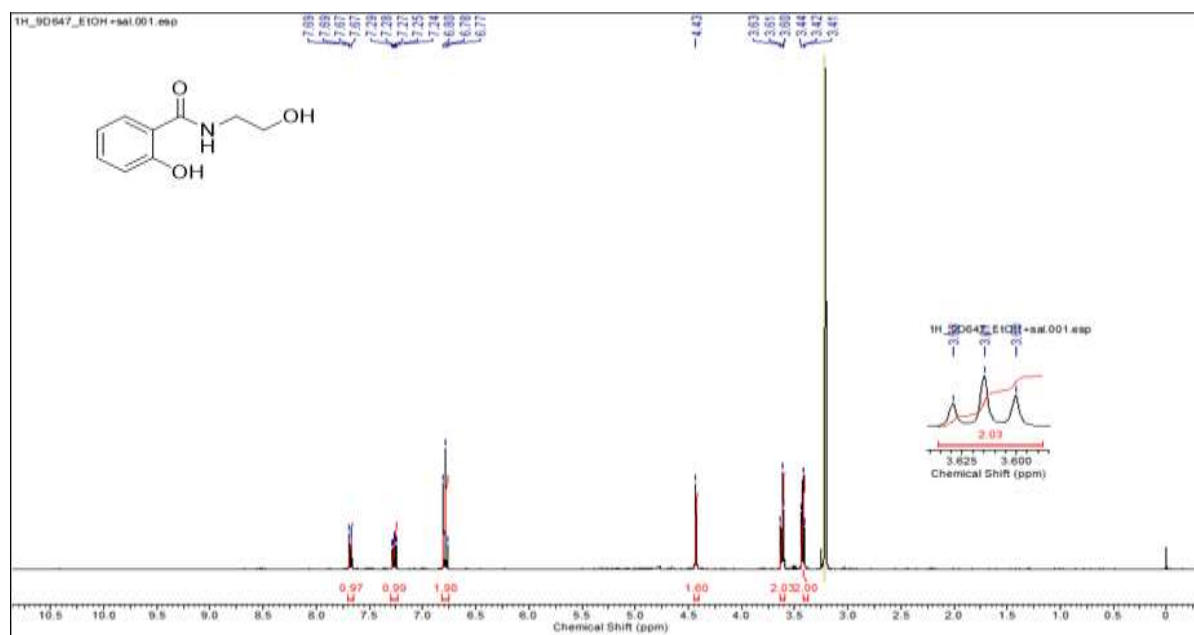
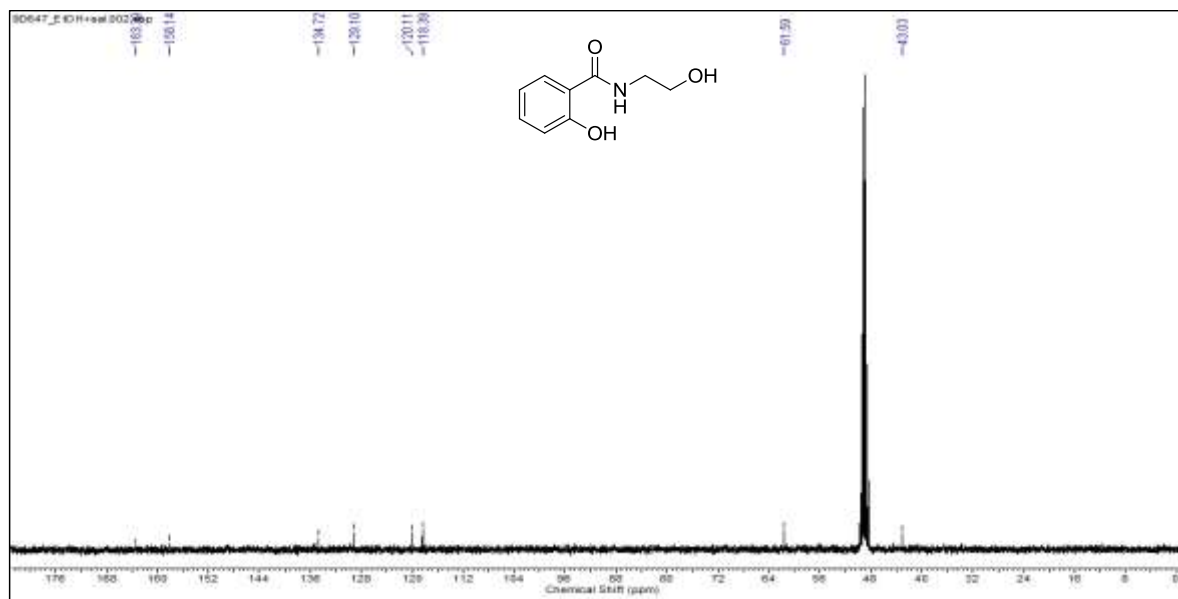
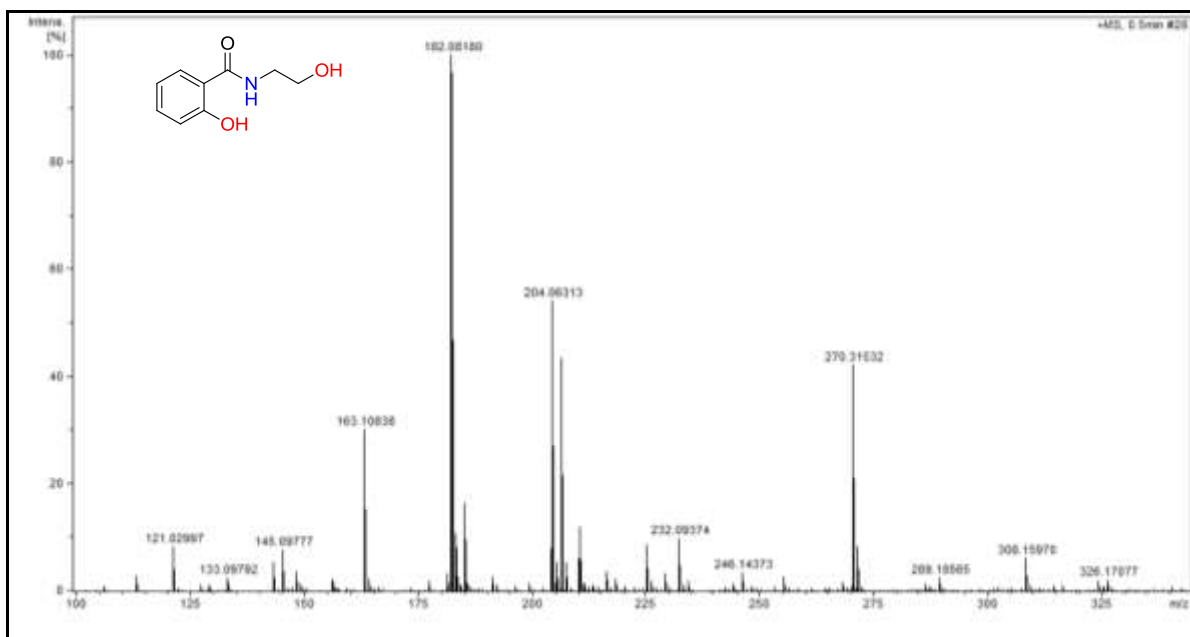


Figura 43 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD_4) da 2-hidroxi-*N*-(2-hidroxi-etil)benzamida (**12**).**Figura 44** - Espectro de massas de alta resolução da 2-hidroxi-*N*-(2-hidroxi-etil)benzamida (**12**).

4.3.1.2 Caracterização da 2-hidroxi-*N*-(2-hidroxi-etil)-*N*-metilbenzamida (**13**) obtida por CALB

O espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}) para o produto **13** apresentou bandas em 2995-2903 cm^{-1} atribuídas ao estiramento de ligações O-H, bandas intensas em 1651-1503 cm^{-1} , correspondentes a absorção da carbonila de amida e uma banda intensa em 716 cm^{-1} decorrente de ligações C-H do anel aromático *orto*-substituído (Figura 45).

As análises de RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD_4) apresentaram um sinal referente ao carbono ligado ao grupo hidroxílico (δ 158,1) e um sinal de carbono da carbonila (δ 163,3); sinais referentes aos carbonos do anel aromático (δ 134,7; 129,1; 120,1; 118,3), dois sinais referentes aos dois carbonos sp^3 (δ 61,5 e δ 58,9), bem como um sinal referente ao carbono metílico em δ 38,6 (Figura 46).

O espectro de massas de alta resolução do produto **13** apresentou o pico do íon molecular de m/z 196,09 com 100% de intensidade e de seu isótopo, com m/z 197,09, comprovando a presença do produto 2-hidroxi-*N*-(2-hidroxi-etil)-*N*-metilbenzamida (**13**) (195,09 g/mol) (Figura 47).

Figura 45 - Espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}) para a 2-hidroxi-*N*-(2-hidroxi-etil)-*N*-metilbenzamida (**13**).

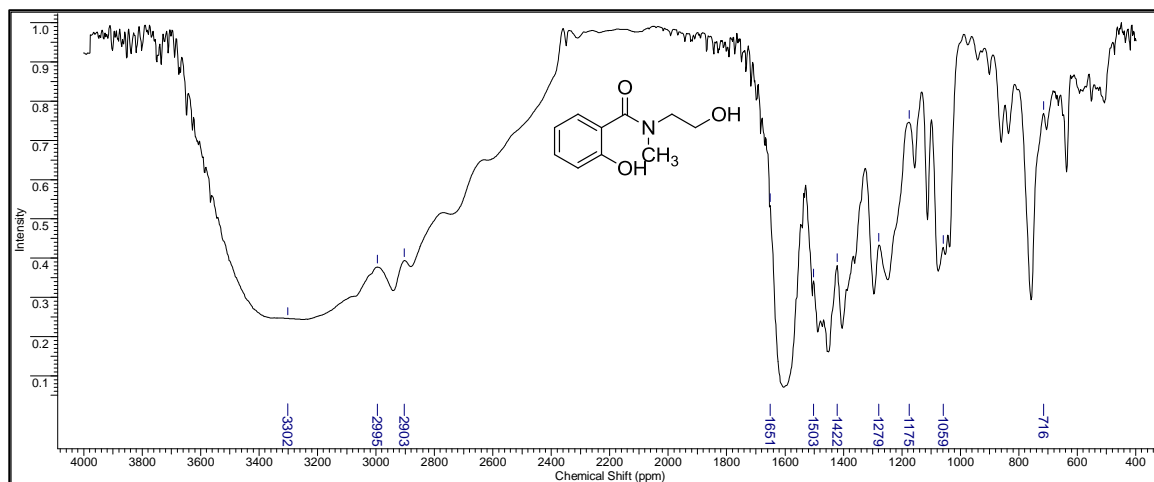


Figura 46 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD_4) da 2-hidroxi-*N*-(2-hidroxi-etil)-*N*-metilbenzamida (**13**).

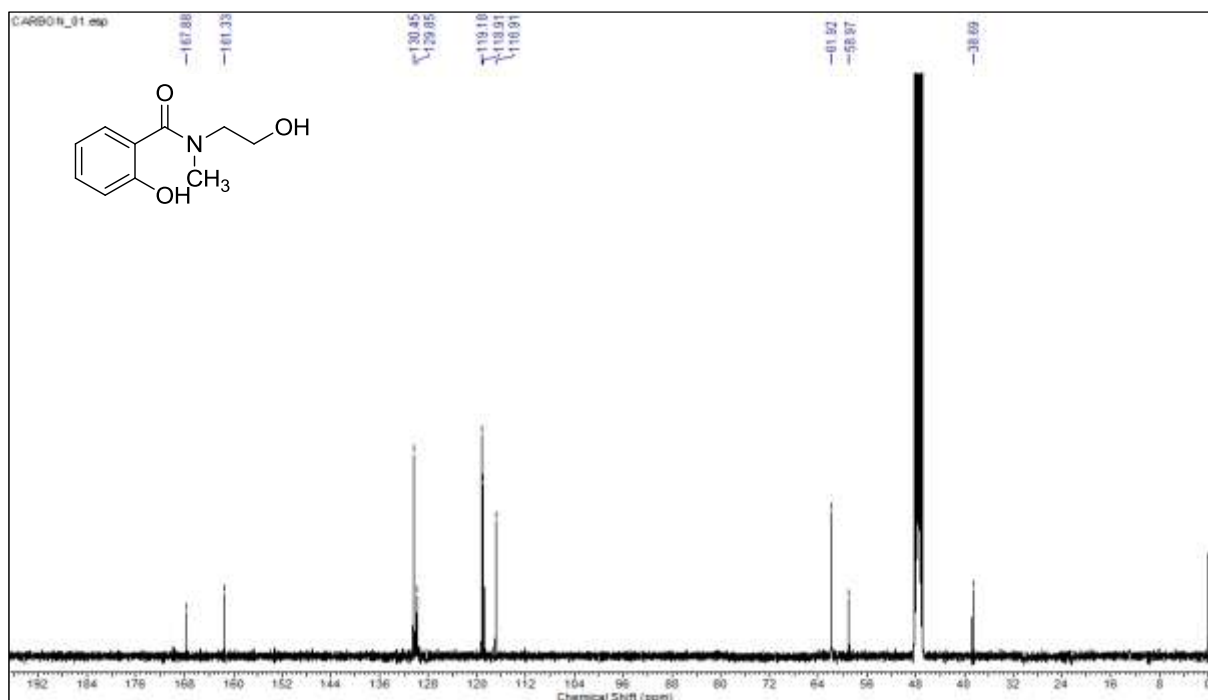
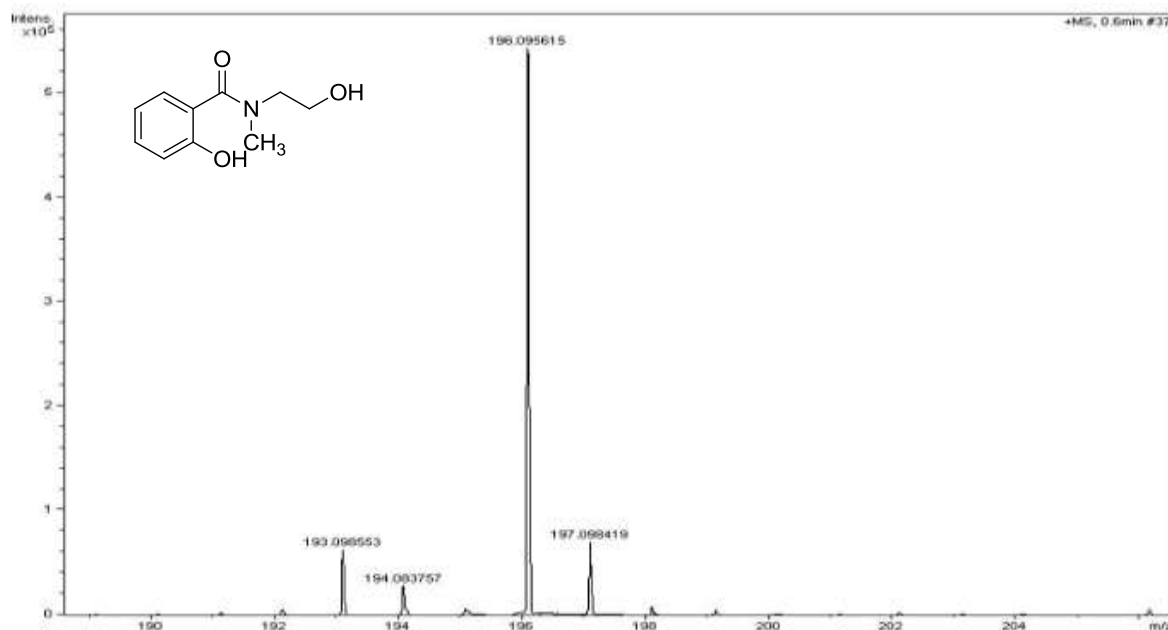


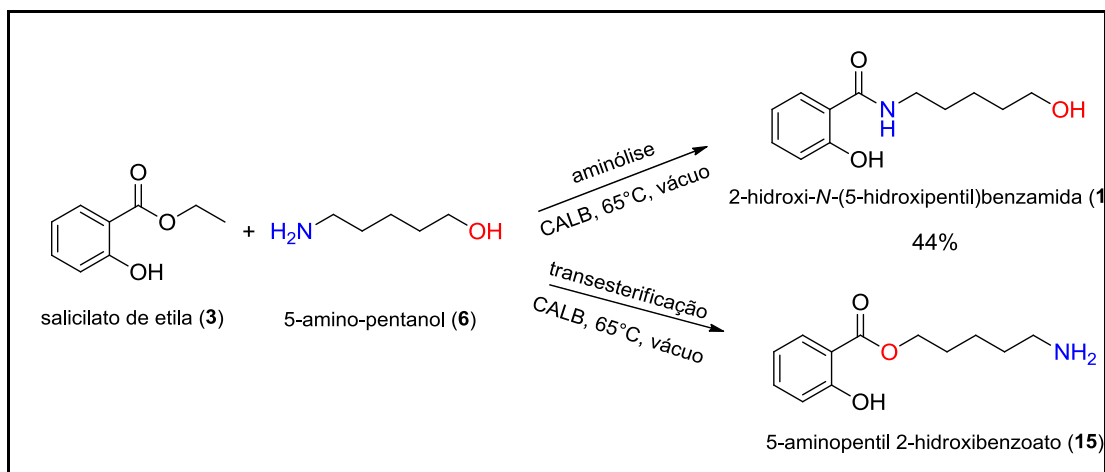
Figura 47 - Espectro de massas de alta resolução da 2-hidroxi-*N*-(2-hidroxi-etil)-*N*-metilbenzamida (13).



4.3.2 Síntese da 2-hidroxi-*N*-(5-hidroxi-pentil)benzamida (14) catalisada por CALB

Um estudo também foi realizado com um aminoálcool que apresenta cadeia alifática contendo cinco grupamentos $-(CH_2)-$ não ramificados, tal como o reagente 5-aminopentanol (6). Este estudo visou a síntese enzimática do produto 2-hidroxi-*N*-(5-hidroxi-pentil)benzamida (14), o qual apresenta caráter anfifílico, dado o tamanho de sua cadeia carbônica (Esquema 20).

Esquema 20 - Reações entre salicilato de etila (3) e 5-amino-pentanol (6).



De forma interessante, as análises mostraram que ambas as reações, aminólise e transesterificação, ocorreram através da lipase de *Candida antarctica*. Neste estudo foram observados picos cromatográficos referentes a dois produtos e ao salicilato de etila (**3**) remanescente. Em relação aos produtos, observou-se um pico em tempo de retenção maior ($t_r=24,5$ min) do que o referente ao salicilato de etila ($t_r=22,5$ min). O pico em 24,5 minutos demonstra a formação de um produto mais apolar, o qual correspondeu ao composto 5-aminopentil-2-hidroxibenzoato (**15**). Também foi observado um pico em menor tempo de retenção ($t_r=17,8$ min), atribuído a amida fenólica 2-hidroxi-*N*-(5-hidroxipentil)benzamida (**14**).

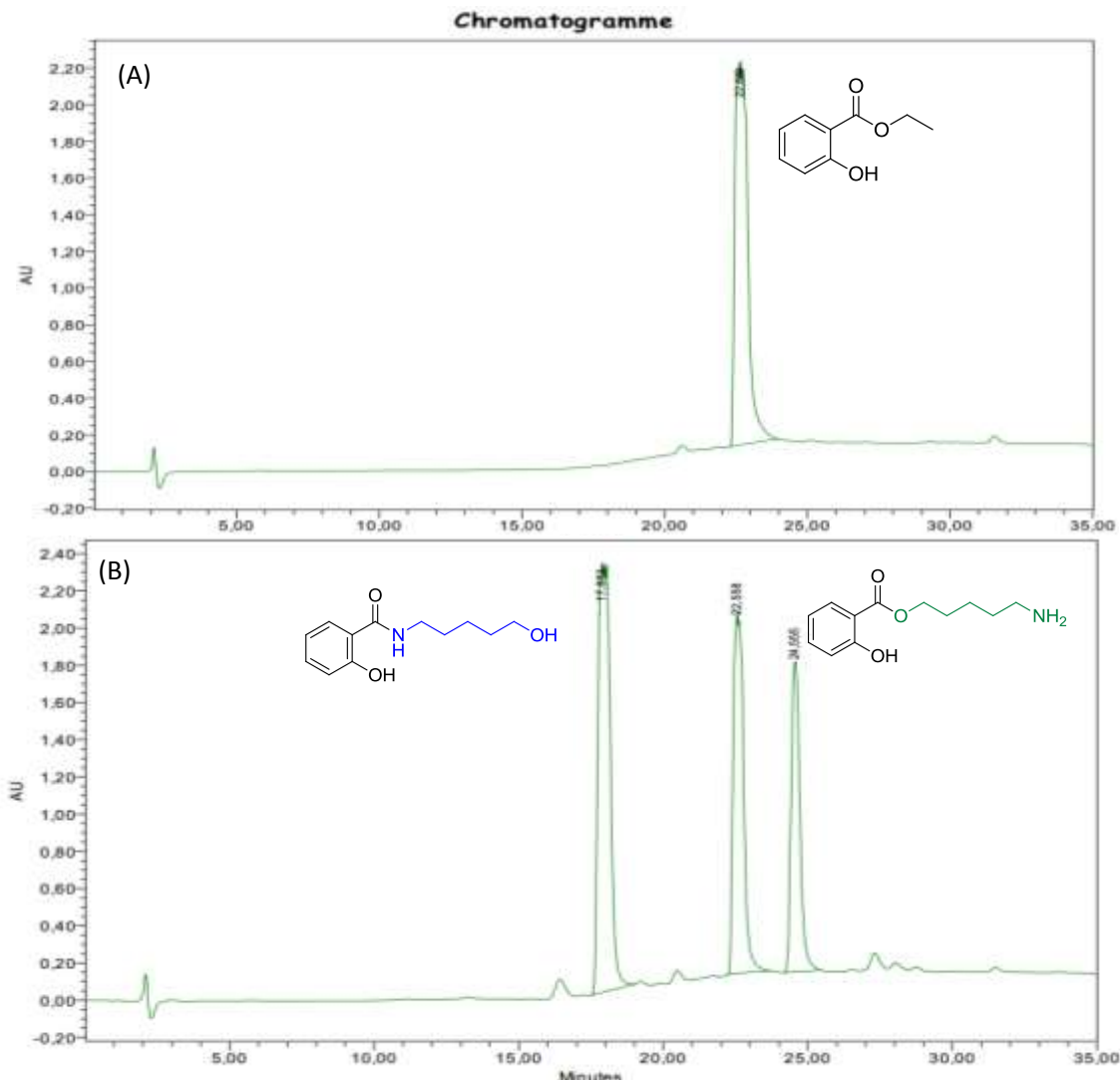
As reações de aminólise e transesterificação produziram os compostos **14** e **15** com conversões moderadas de 44 e 33%, respectivamente. Embora ambos os produtos tenham sido obtidos, um valor remanescente significativo do salicilato de etila (**3**) foi observado (33%).

Nesta reação, foi observado um decréscimo na quimiosseletividade da CALB demonstrando sua *promiscuidade* com grupos funcionais distintos. É interessante considerar que esta reação foi realizada com um substrato de cadeia alifática *hidrofóbica*. Estudos reportam que a promiscuidade das lipases pode depender da *hidrofobicidade* do substrato e que estas enzimas podem tolerar diferentes substituintes alifáticos (GRUNWALD 2009).

Estudos de cristalografia de raio-X elucidaram as estruturas de diversas lipases, tais como, *Rhizomucor miehei*, *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacea* e a lipase B de *Candida antarctica*. Estes estudos mostraram a presença de um fragmento de α -hélice denominado *Lid* e considerado como uma “tampa hidrofóbica” que recobre o sítio ativo enzimático (KAPOOR & GUPTA 2012). Paralelamente, trabalhos científicos reportam um fenômeno denominado *ativação interfacial*, que resulta da interação entre as “tampas hidrofóbicas” ou *Lids* das lipases à outras moléculas hidrofóbicas. Quando este fenômeno ocorre, pode haver uma mudança conformacional do *Lid*, expondo seu sítio ativo para diferentes grupos funcionais. Estes estudos mostraram ainda que a lipase B de *Candida antactica* possui um *Lid* pequeno e simples que não isola completamente seu sítio ativo (COSTA & AMORIM 1999). A possível ocorrência deste fenômeno pode ter reduzido a quimiosseletividade da CALB, levando a produção dos compostos **14** e **15**.

Os cromatogramas obtidos por CLAE do padrão salicilato de etila (**3**) e da reação com o substrato 5-amino-pentanol (**6**) podem ser observados na Figura 48.

Figura 48 - Cromatogramas obtidos por CLAE das análises de (A) Padrão do salicilato de etila, (B) Reação de aminólise com o 5-aminopentanol (**6**) catalisada por CALB.



4.3.2.1 Caracterização da 2-hidroxi-N-(5-hidroxi-pentil)benzamida (**14**) obtida por CALB

No espectro de absorção do infravermelho (cm^{-1}) foi observada uma banda de absorção intensa entre $3600\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$, devido as sobreposições do estiramento das ligações O-H e N-H do composto **14**. O espectro também apresentou bandas em $2940\text{-}2864\text{ cm}^{-1}$ atribuídas ao estiramento das ligações C-H da cadeia carbônica, bem como bandas em $1670\text{-}1636\text{ cm}^{-1}$ atribuídas a deformação angular da ligação C=O da amida (SILVERSTEIN). Entre $1595\text{-}1489\text{ cm}^{-1}$ encontram-se bandas associadas às vibrações das ligações C=C do anel aromático. Também foram observadas uma banda intensa em 756 cm^{-1} devido a deformação

angular das ligações (CH₂)_n, da cadeia alifática e uma banda em 702 cm⁻¹ decorrente de ligações C-H do anel aromático *orto*-substituído (Figura 49).

A análise de ressonância magnética de próton (500 MHz, MeOD₄) do produto **14** apresentou sinais de multipletos referentes a hidrogênios metilênicos [δ_{H} 1,24-1,33 (m, 2H) e 1,44-1,60 (m, 4H)], multipletos referentes a hidrogênios α em relação à amida [δ_{H} 3,25-3,30 (m, 2H)], um sinal tripleto referente aos hidrogênios α -hidroxílicos [δ_{H} 3,45 (2H, t, J=13,06 Hz)] e sinais referentes aos hidrogênios aromáticos [δ_{H} 6,72-6,76 (2H, m); 7,20-7,24 (1H, m); 7,61-7,64 (1H, m)] (Figura 50).

O espectro de RMN ¹³C (125 MHz, MeOD₄) do composto **14** apresentou 12 linhas espectrais, sendo duas linhas características de carbono α -hidroxílicos (δ 161,0) e de carbono de carbonilas de amidas (δ 170,7). Também foram observadas cinco linhas espectrais referentes a carbonos *sp*² presentes no anel aromático (δ 134,7; 128,5; 119,8; 118,3; 116,8), uma linha espectral em δ 62,7 atribuído ao carbono carbinólico, uma linha espectral em δ 40,2 atribuído ao carbono ligado ao nitrogênio, assim como três linhas referentes a carbonos metilênicos (δ 30,0; 29,1; 24,2) da cadeia alifática (Figura 51).

Através da análise de espectrometria de massas de alta resolução do produto **15**, observou-se a presença do íon molecular *m/z* 224,11 com 100% de intensidade e de seu isótopo, com *m/z* 225,11 em menor intensidade. Considerando que as análises foram realizadas no modo de ionização positivo, este valor está de acordo com a massa molecular da 2-hidroxi-*N*-(5-hidroxi-pentil)benzamida (**14**) (223,12 g/mol) (Figura 52).

Figura 49 - Espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}) da 2-hidroxi-*N*-(5-hidroxipentil)benzamida (**14**).

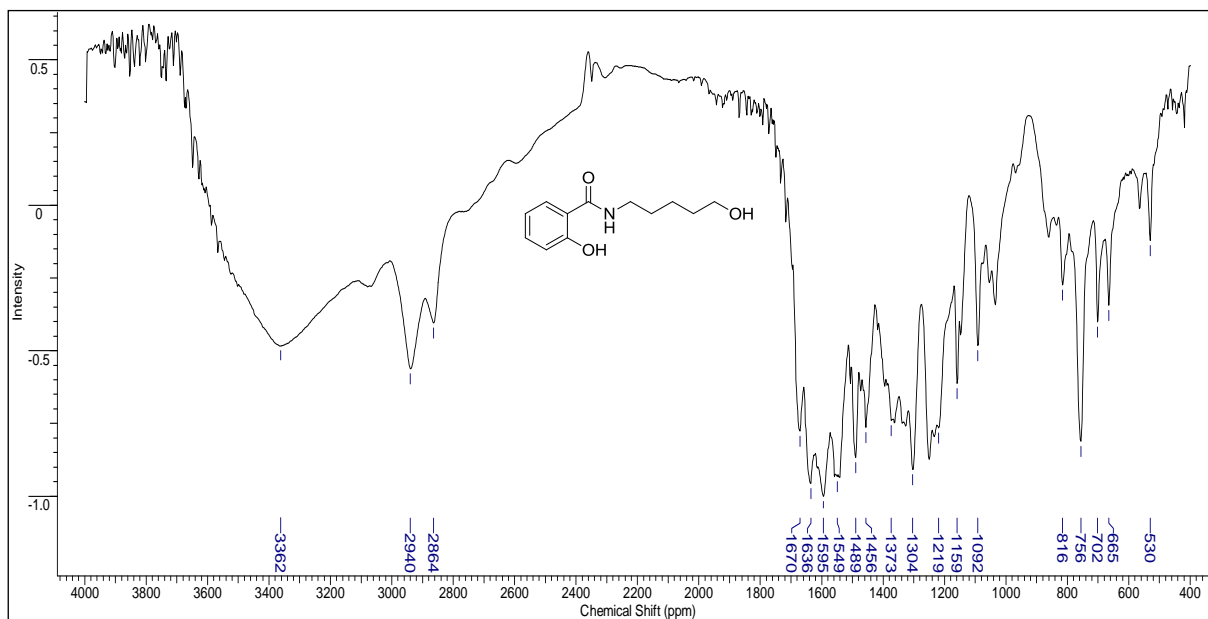


Figura 50 - Espectro de RMH ^1H (500 MHz, MeOD_4) da 2-hidroxi-*N*-(5-hidroxipentil)benzamida (**14**).

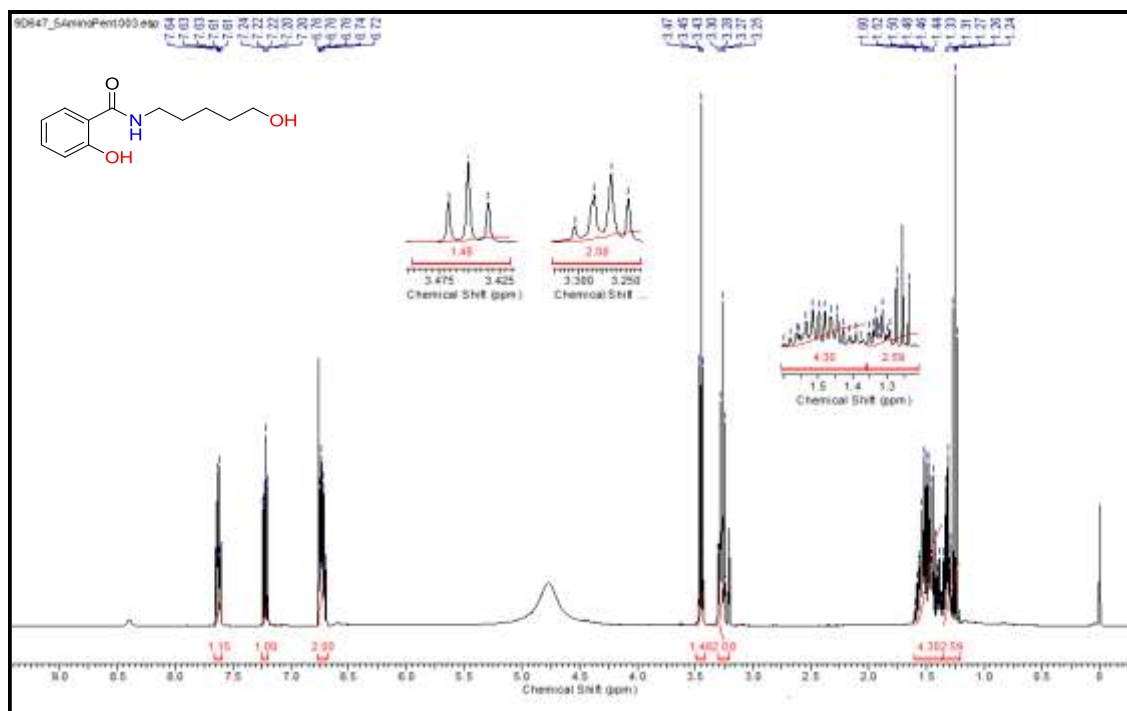


Figura 51 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD_4) da 2-hidroxi-*N*-(5-hidroxipentil)benzamida (14).

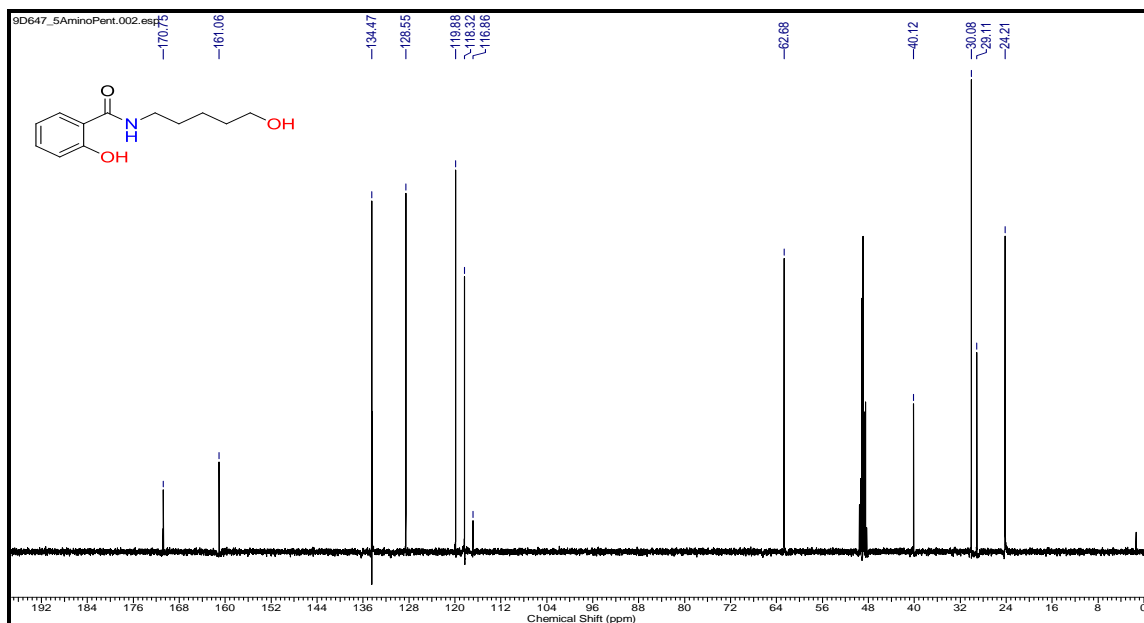
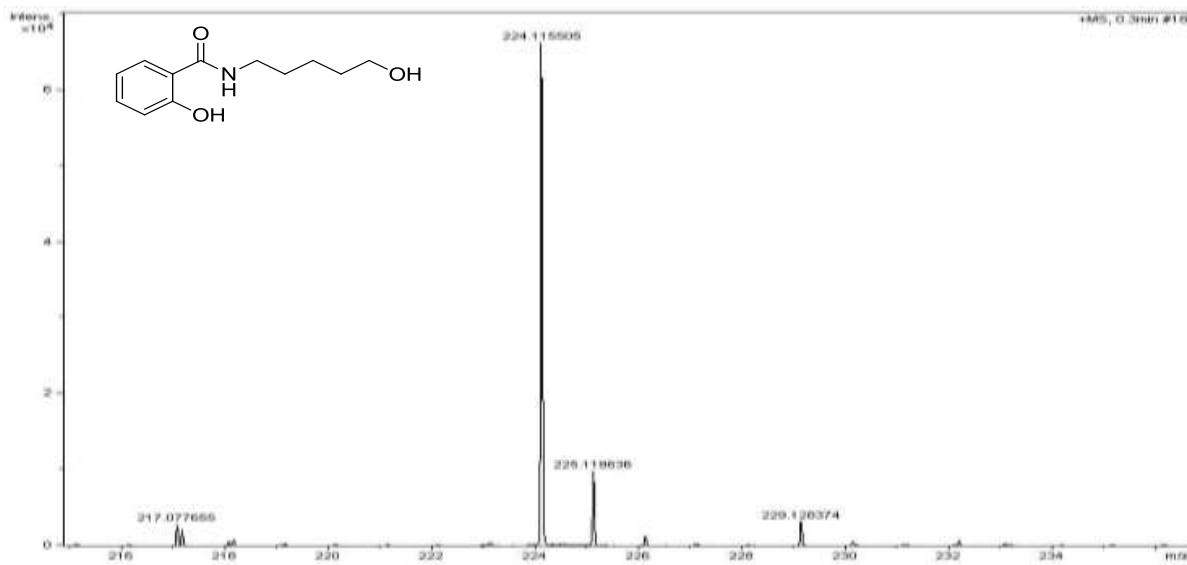


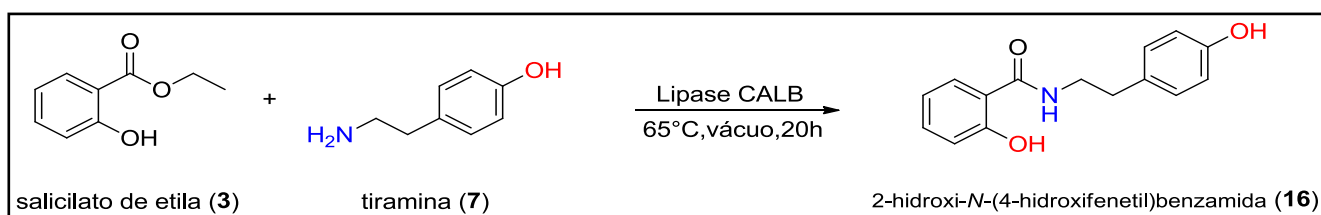
Figura 52 - Espectro de massas de alta resolução da 2-hidroxi-*N*-(5-hidroxipentil) benzamida.



4.3.3 Síntese de 2-hidroxi-*N*-(4-hidroxifenetil)benzamida (**16**) catalisada por CALB

Este estudo visou avaliar a atividade da CALB frente ao aminoálcool tiramina (**7**), o qual apresenta um grupamento fenólico em sua estrutura. As reações foram promovidas adicionando-se os reagentes salicilato de etila (**3**) e tiramina (**7**) em proporções equimolares, como descrito no item 3.4 (Esquema 21).

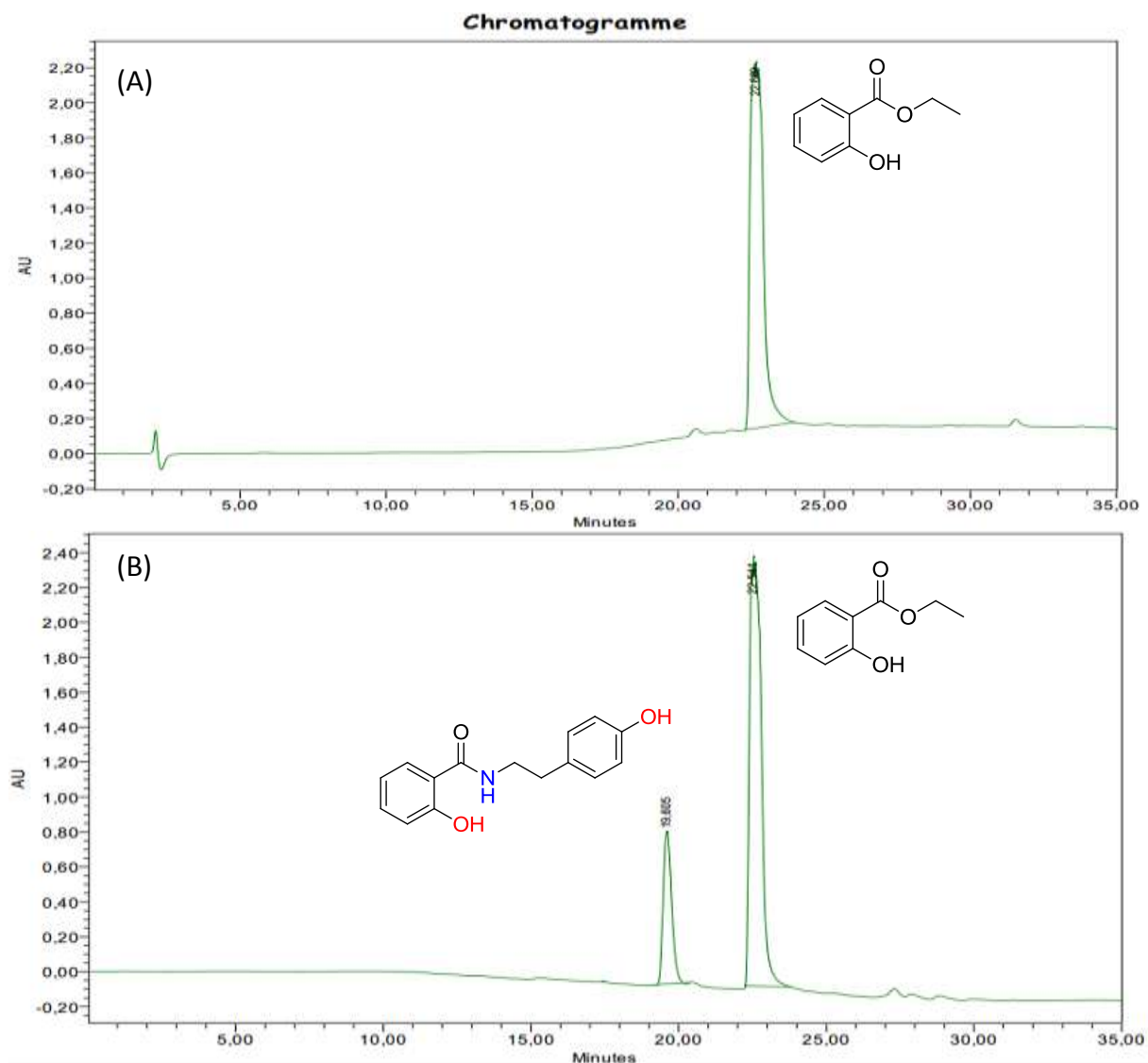
Esquema 21 - Reação de aminólise entre salicilato de etila (**3**) e tiramina (**7**).



As análises por CLAE mostraram um rendimento de 23% na produção da 2-hidroxi-*N*-(4-hidroxifenetil)benzamida (**16**). Os cromatogramas do padrão salicilato de etila (**3**) e da reação com o aminoálcool **7** estão apresentados na Figura 53.

Este resultado mostrou um baixo desempenho da reação enzimática, uma vez que foi obtido um rendimento modesto do produto **16** (23%). Este resultado de certa forma não foi surpreendente, uma vez que o grupamento aromático pode ter dificultado a reação de aminólise, através de uma repulsão estérica com o salicilato de etila (**3**). Possivelmente, o distanciamento da cadeia por dois grupamentos metilênicos do aminoálcool deve favorecer o produto da aminólise. Outro fato que pode ter induzido o baixo rendimento é, também, o caráter ácido do grupo fenólico presente na tiramina (**7**). Diferente dos aminoálcoois anteriores, o estudo com a tiramina foi realizado visando avaliar o comportamento da lipase de *Candida antarctica*, pois este substrato não é registrado pelo *Personal Care Products Council* (PCPC).

Figura 53 - Cromatogramas obtidos por CLAE das análises de (A) Padrão do salicilato de etila, (B) Reação de aminólise entre salicilato de etila e tiramina catalisada por CALB.



4.3.3.1 Caracterização da 2-hidroxi-N-(4-hidroxifenetil)benzamida (16) obtida por CALB

No espectro de absorção de infravermelho (cm⁻¹) foram observadas bandas de absorção discretas entre 3184-3073 cm⁻¹, devido ao estiramento das ligações do grupo hidroxila O-H e N-H. O espectro também apresentou bandas em 1676-1614 cm⁻¹ que foram atribuídas a deformação angular da ligação C=O da amida (SILVERSTEIN 2010). Ainda, foram observadas bandas intensas nas regiões entre 1373-1092 cm⁻¹, devido a deformação

angular de ligações C-O de álcool e fenol e N-H da amida. Na região entre 758-702 cm^{-1} , foram observadas bandas de deformação angular de hidrogênios do anel aromático (Figura 54).

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD_4) apresentou um sinal tripleto referente a hidrogênios metilênicos [δ_{H} 2,79 (t, 2H, $J=14,81$ Hz)], um sinal tripleto referente ao hidrogênio α -amídico [δ_{H} 3,53 (2H, t, $J=13,41$ Hz)], bem como sinais de ambos anéis aromáticos [6,73 (2H, d, $J=8,53$ Hz); 7,07 (3H, m); 7,31 (1H, t, $J=14,04$ Hz); 7,69 (1H, d, $J=6,27$ Hz)] No entanto, não foi observado o sinal referente ao hidrogênio ligado ao fenol (Figura 55).

O espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD_4) apresentou duas linhas espectrais, referentes a carbonos metilênicos sp^3 em δ 31,08 e 42,81, dez linhas espectrais referentes a carbono sp^2 dos anéis aromáticos (δ 114,0; 116,6; 118,6; 118,7; 120,3; 120,5; 129,1; 131,0; 131,2; 134,9; 136,9), duas linhas espectrais sobrepostas características de carbono fenólico (δ 163,1) e uma de carbono de carbonila de amida (δ 171,7) (Figura 56).

Através da análise por espectrometria de massas de alta resolução do produto **16** observou-se o pico do íon m/z 258,11 com 100% de intensidade e de seu isótopo, de m/z 259,11. Considerando que as análises foram realizadas no modo de ionização positivo, este valor está de acordo com a massa molecular da 2-hidroxi-*N*-(5-hidroxipentil) benzamida (**16**) (257,10 g/mol) (Figura 57).

Figura 54 - Espectro de absorção na região do infravermelho da 2-hidroxi-*N*-(4-hidroxifenetil)benzamida (**16**).

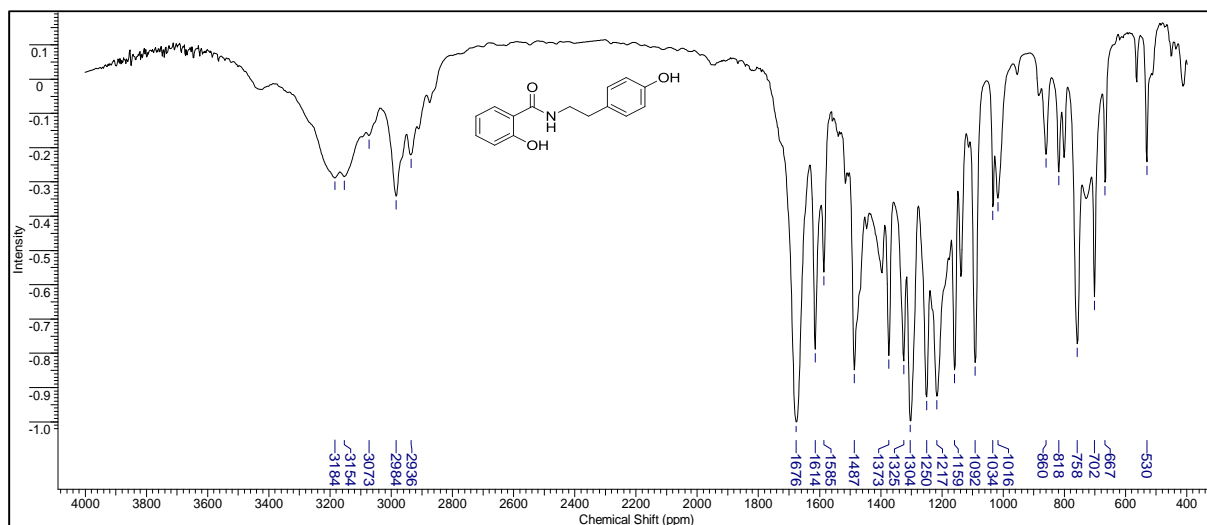


Figura 55 - Espectro de RMH ^1H (500 MHz, MeOD_4) da 2-hidroxi-*N*-(4-hidroxifenetil)benzamida (16).

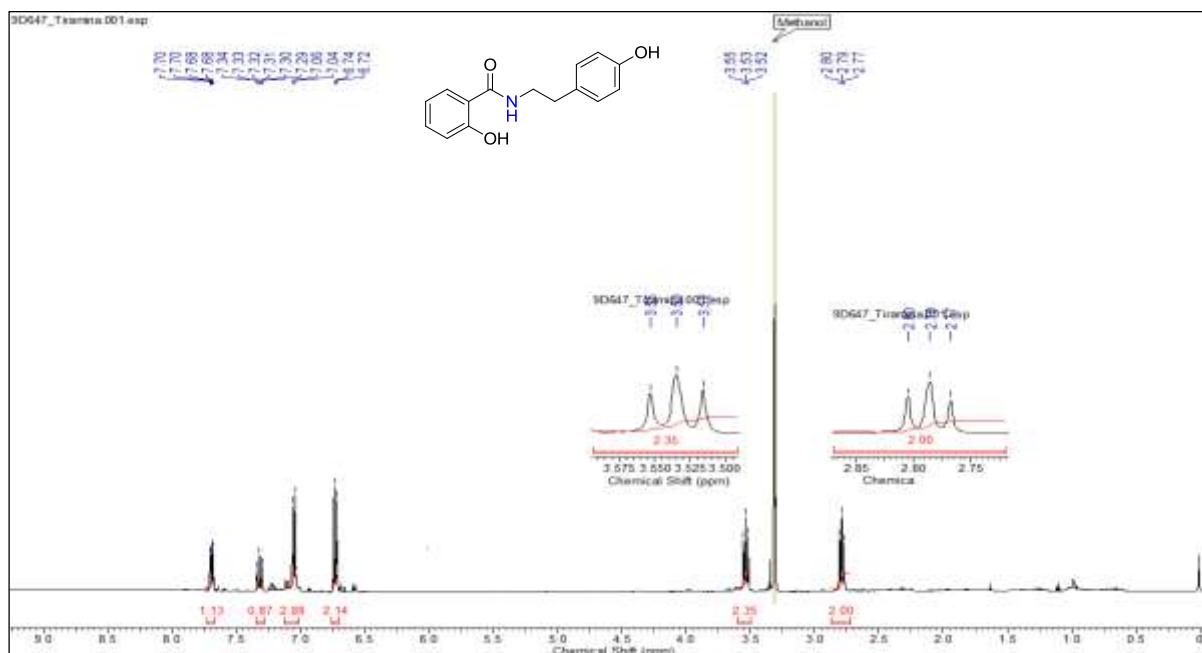


Figura 56 - Espectro de RMH ^{13}C (125 MHz, MeOD_4) da 2-hidroxi-*N*-(4-hidroxifenetil)benzamida (16).

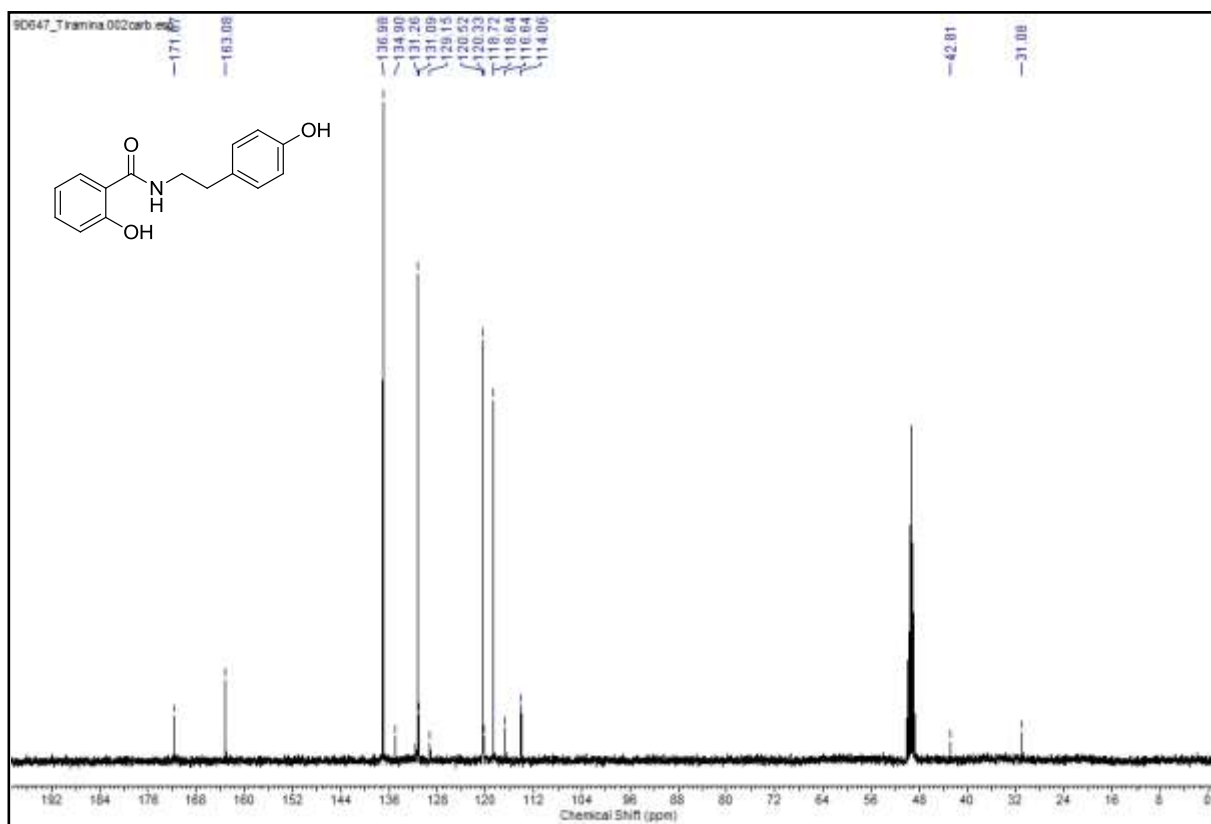
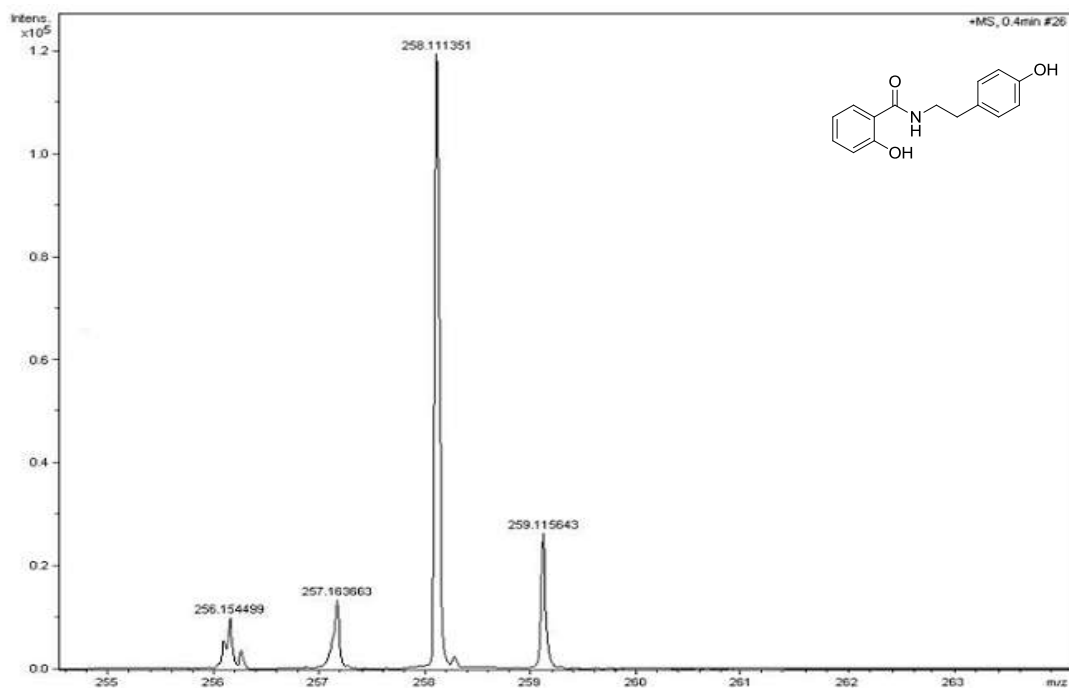


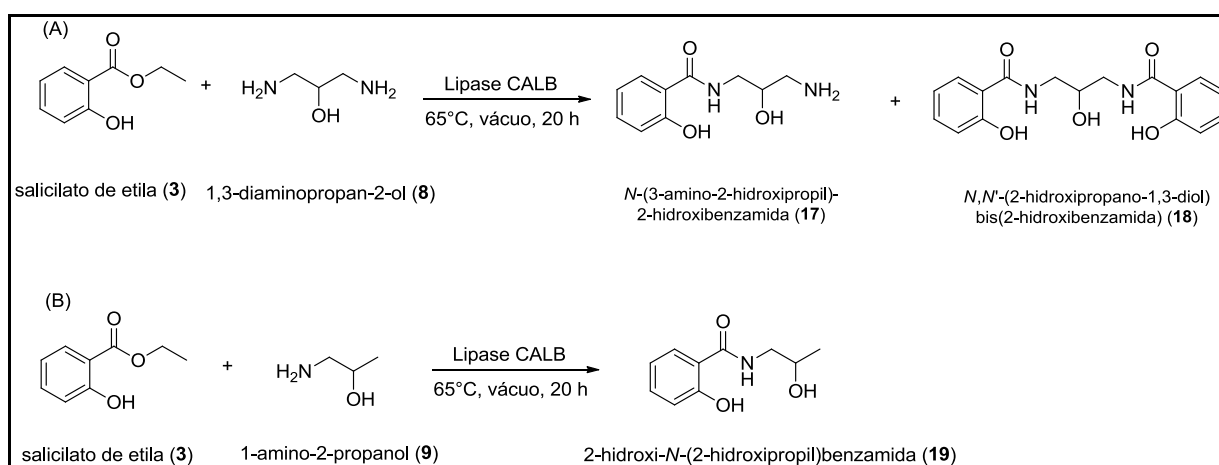
Figura 57 - Espectro de massas de alta resolução da 2-hidroxi-*N*-(4-hidroxifenetil)benzamida (16).



4.3.4 Sínteses da *N*-(3-amino-2-hidroxipropil)-2-hidroxi-benzamida (**17**) e 2-hidroxi-*N*-(2-hidroxi-propil)benzamida (**19**) catalisadas por CALB

Visando a obtenção de precursores para síntese de amidas fenólicas graxas, as quais podem conferir propriedades antioxidantes e de emoliência à pele, um estudo foi realizado com os aminoálcoois 1,3-diaminopropan-2-ol (**8**) e 1-amino-2-propanol (**9**) (Esquema 22).

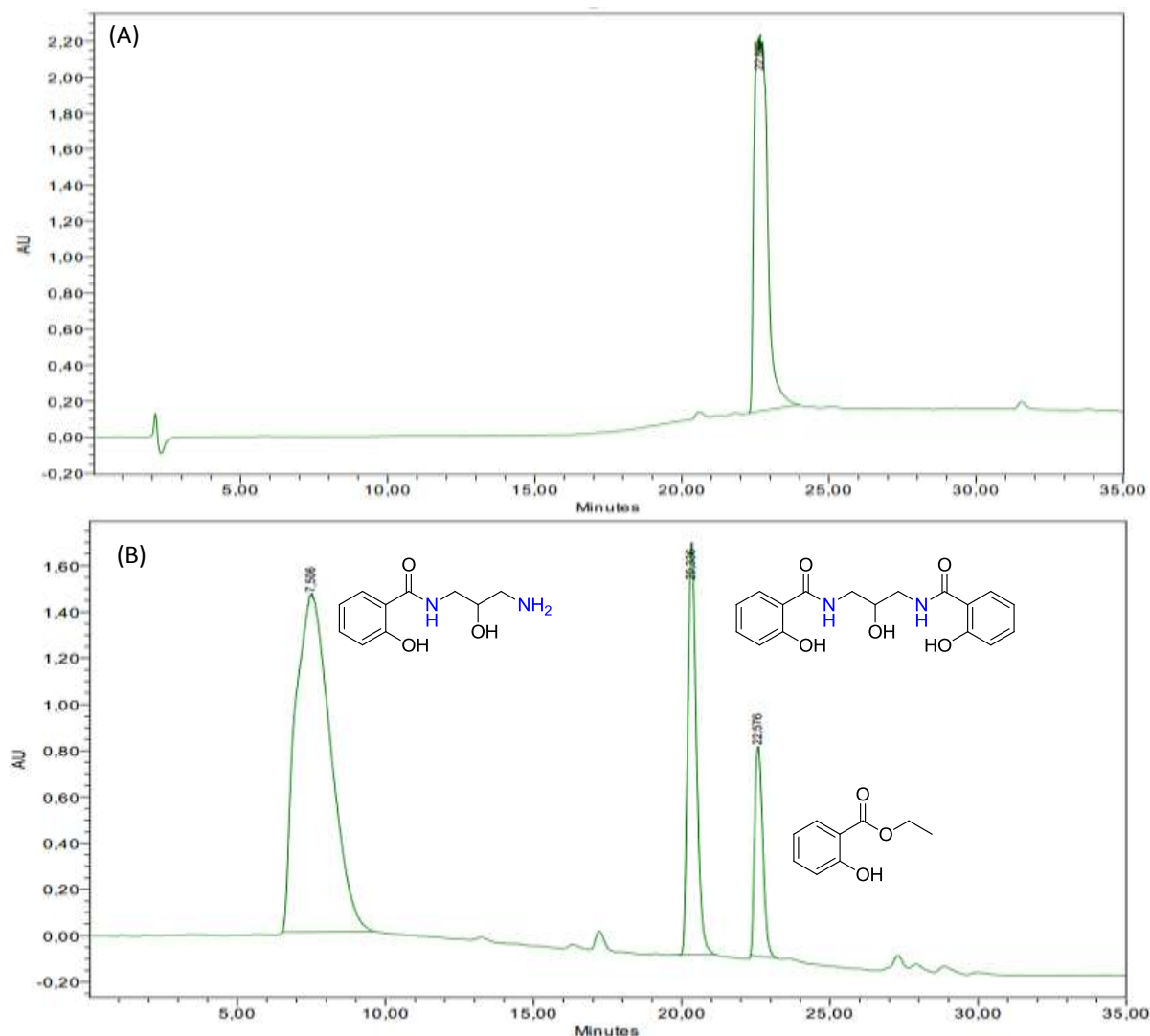
Esquema 22 - (A) Reação de aminólise entre salicilato de etila e 1,3-diaminopropan-2-ol (**8**) catalisada por CALB, (B) Reação entre salicilato de etila e 1-amino-2-propanol (**9**) catalisada por CALB.



Em relação ao aminoálcool **8**, as análises através de cromatografia líquida mostraram a formação majoritária do produto **17**. No entanto, também foi possível observar a ocorrência de reação lateral devido à presença de um novo pico cromatográfico.

Este fato pode ser observado pela aparição de um sinal em um tempo de retenção menor ($t_r=20,3$ min) do que o referente ao salicilato de etila (**3**) (22,57 min), indicando a presença de uma molécula mais polar que o salicilato de etila (**3**). As análises mostraram que a formação do produto esperado **17** ocorreu com 68% de rendimento. Em termos de conversão calculada pela área relativa a cada pico, foram encontrados 70% do produto **17** (o qual seria o esperado), 21% de um possível novo produto **18** (obtido através de uma reação de aminólise com o grupamento amina livre) e 9% do salicilato de etila (**3**) remanescente. Como nos experimentos anteriores, a formação da amida fenólica foi favorecida em relação ao éster devido a quimiosseletividade da CALB e maior basicidade do grupo amino. As análises obtidas através de cromatografia líquida podem ser observadas na Figura 58.

Figura 58 - Cromatogramas obtidos por CLAE das análises de (A) Padrão do salicilato de etila, (B) Reação de aminólise entre salicilato de etila (**3**) e 1,3-diaminopropan-2-ol (**8**) catalisada por CALB..



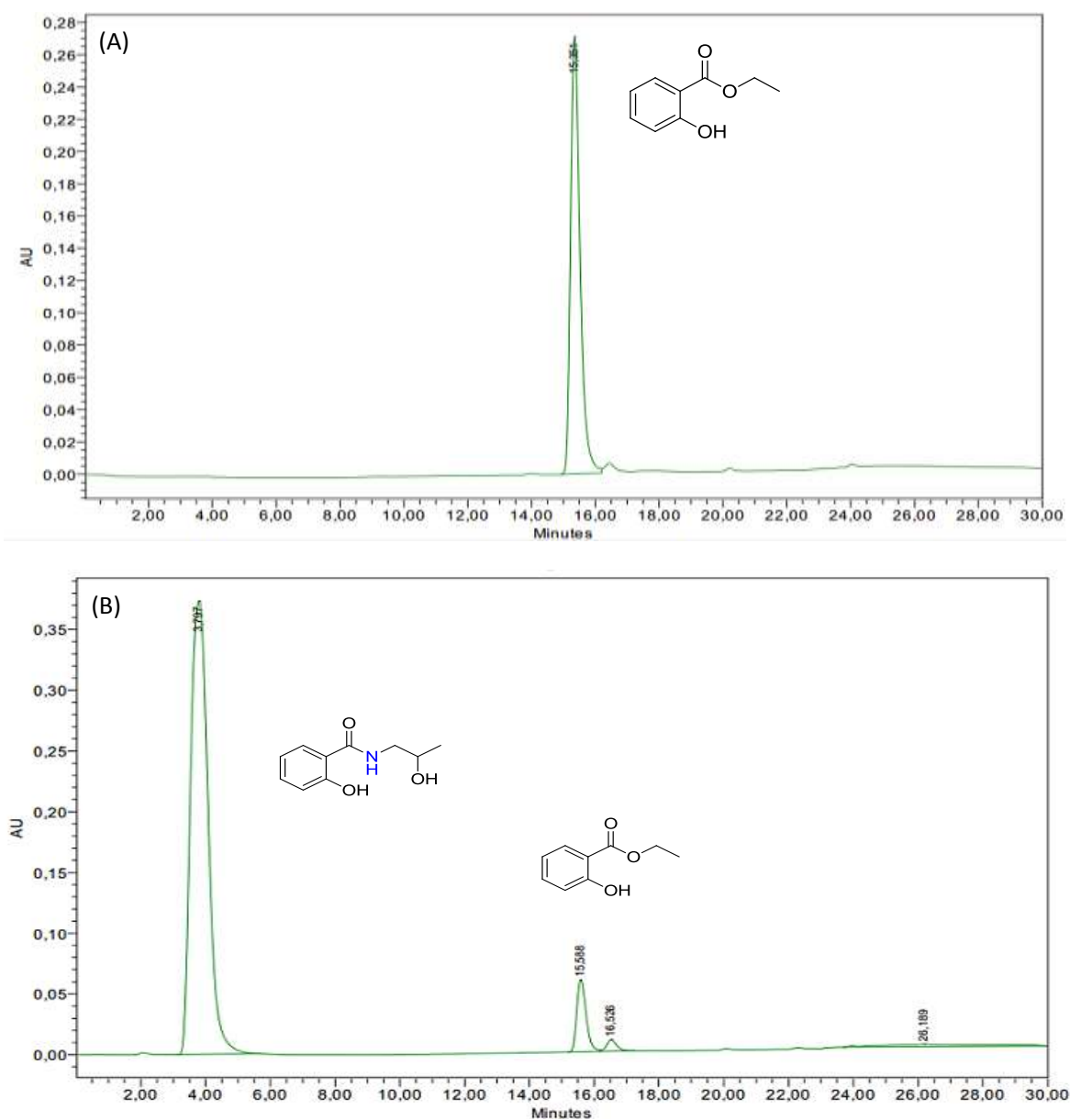
Condições de análise CLAE: MeOH/H₂O (5:95); fluxo 0,27 mL/min; 210 nm; $t_c = 30$ min, Coluna C18 X-Terra MS (150 mm x 2,1 mm x 5,0 μ m).

A partir da caracterização da amida fenólica *N*-(3-amino-2-hidroxipropil)-2-hidroxibenzamida (**17**) ($t_r=7,5$ min) foi possível observar a formação do produto (**18**) ($t_r=20,3$ min) obtido através de uma nova reação de aminólise com o grupo amina livre proveniente do aminoálcool **8**.

Embora as condições reacionais pudessem ser otimizadas para a obtenção de rendimentos elevados dos produtos **17** e **18**, cabe ressaltar que o objetivo do trabalho foi encontrar substratos sob *condições padronizadas* para produção de amidas fenólicas em escala industrial com rendimentos superiores a 90%. Este objetivo foi atingido através da reação entre o salicilato de etila (**3**) e 1-amino-2-propanol (**9**). Neste caso, reação de aminólise

ocorreu apresentando um rendimento equivalente a 93% da 2-hidroxi-*N*-(2-hidroxiopropil)benzamida (**19**). Os cromatogramas do padrão salicilato de etila (**3**) e da reação com o amino-álcool **8** estão apresentados na Figura 59.

Figura 59 - Cromatogramas obtidos por CLAE das análises de (A) Padrão do salicilato de etila, (B) Reação entre salicilato de etila (**3**) e 1-amino-2-propanol (**9**) catalisada por CALB.



Condições de análise CLAE: MeOH/H₂O (5:95); fluxo 0,27 mL/min; 210 nm; t_c = 30 min, Coluna C18 X-Terra MS (150 mm x 2,1 mm x 5,0 μm).

A amida fenólica **19** pode ser introduzida em formulações cosméticas voltadas para hidratação cutânea, pois sua estrutura hidrofílica deve apresentar afinidade pelas moléculas responsáveis pelo fator natural de hidratação (NMFs). A presença do ácido salicílico em sua estrutura é atrativa para a formulação de produtos antioxidantes que agreguem as propriedades, tais como, esfoliante, antiacne e contra radiação ultravioleta.

Adicionalmente, a amida fenólica **19** é constituída por um aminoálcool que representa um bloco de construção. Este fato possibilita uma segunda etapa reacional, visando a produção de uma molécula com estrutura anfifílica, tal como a presente em lipídios fenólicos que apresentam afinidades por moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas presentes na epiderme. Este assunto será tratado com maiores detalhes no item 4.4.

4.3.4.1 Caracterização da *N*-(3-amino-2-hidroxiopropil)-2-hidroxibenzamida (**17**) obtida por CALB

As caracterizações dos compostos **17** e **18** foram realizadas em mistura. Desta forma o espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD_4) apresentou sinais de ambos produtos, tais como: sinais de duplos dubletos em δ_{H} 2,64 referentes a hidrogênios α -amínicos do produto **17** [(dd, $J=13,2$ Hz, $J=6,7$ Hz, 1H) (dd, $J=13,1$ Hz, $J=4,9$ Hz, 1H)], sinais de multipletos em δ_{H} 3,34-3,55 referentes a hidrogênios α -amídicos dos produtos **17** e **18** (m, 6H), sinais multipletos referentes a hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos em δ_{H} 3,74-3,8 (m, 1H) e em δ_{H} 3,87-4,01 (m, 1H), bem como sinais multipletos referentes a hidrogênios dos anéis aromáticos em δ_{H} 6,62-6,79 (m, 6H), δ_{H} 7,19-7,26 (m, 3H), δ_{H} 7,68-7,72 (m, 3H) (Figura 60).

O espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD_4) apresentou 3 linhas espectrais referentes a carbonos da função amida (δ 171,5; 171,6; 171,9), duas linhas referentes a carbonos carbinólicos (δ 70,6 e 70,8), três linhas espectrais referentes a carbonos metilênicos (δ 44,2; 44,3; 45,3), assim como linhas espectrais referentes a carbonos de anéis aromáticos (δ 117,8; 118,2; 118,9; 119,2; 119,9; 120,0; 129,7; 129,9; 134,9; 135,0; 135,1) (Figura 61).

Figura 60 - Espectro de RMN ¹H (500 MHz, MeOD₄) dos produtos 17 e 18.

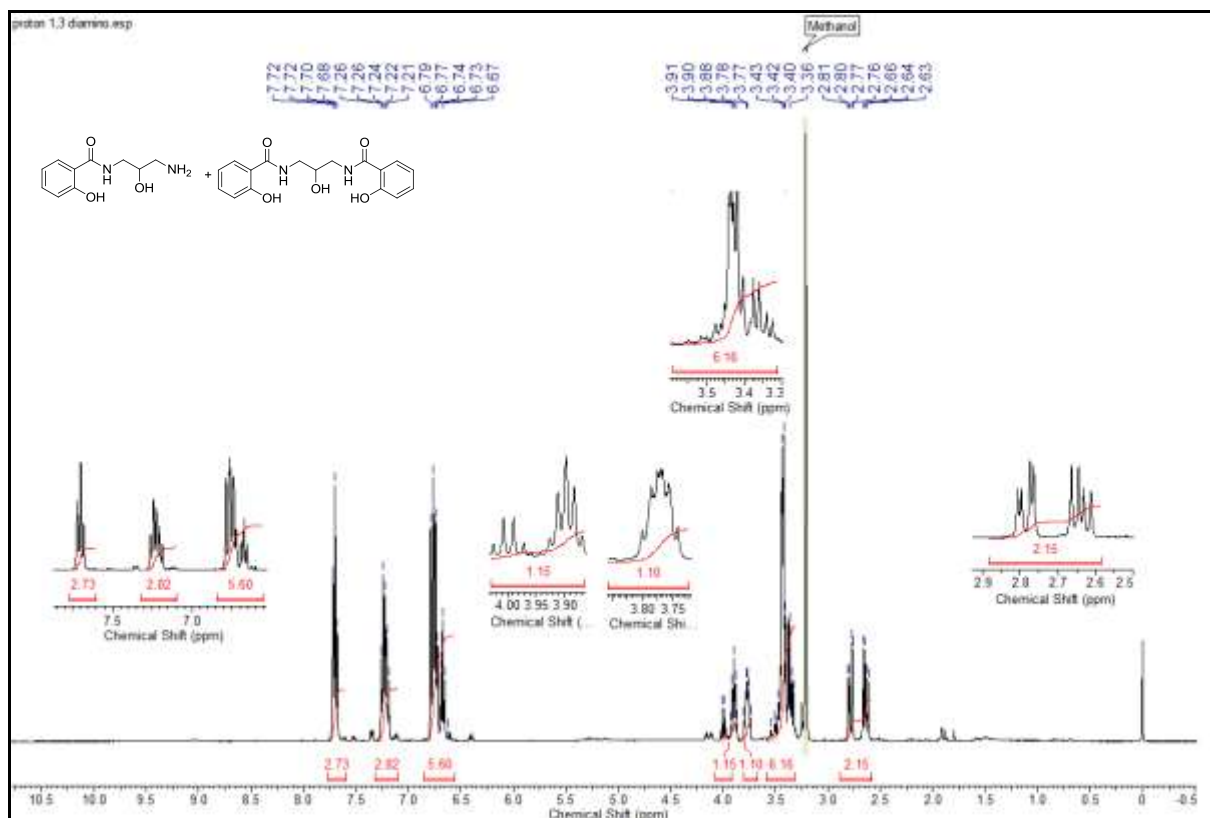
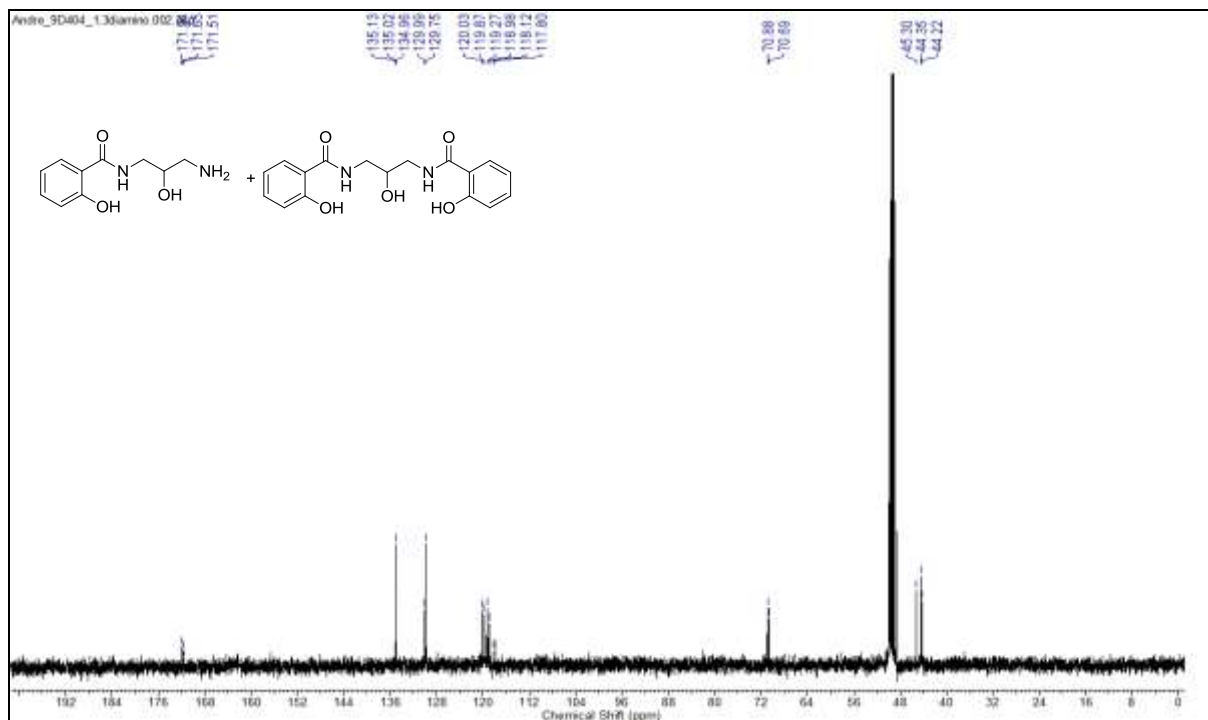


Figura 61 - Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, MeOD₄) dos produtos 17 e 18.



4.3.4.2 Caracterização da 2-hidroxi-*N*-(2-hidroxipropil)benzamida (**19**) obtida por CALB

O espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}) apresentou bandas largas de grupamentos hidroxílicos em 3362 cm^{-1} , devido ao estiramento das ligações O-H, as quais estão sobrepostas com ligações N-H. Bandas em $1670\text{-}1636 \text{ cm}^{-1}$ foram atribuídas a deformação angular de ligações C=O de amida. Observou-se também, uma banda intensa em 756 cm^{-1} devido à deformação angular de hidrogênios do anel aromático (Figura 62).

O espectro de RMN ^1H apresentou um sinal de dubleto em $\delta_{\text{H}} 1,22$ referente a hidrogênios metílicos (3H, d, $J=6,11 \text{ Hz}$), um sinal de duplo dubleto em $\delta_{\text{H}} 3,48$ referente a hidrogênios α -amídicos (d, $J=13,4 \text{ Hz}$, 2H), sinais de multipletos em $\delta_{\text{H}} 3,98$ (1H, m) referente ao hidrogênio carbinólico, bem como os sinais multipletos em $\delta_{\text{H}} 6,90$ e $\delta_{\text{H}} 7,36$ [(m, 2H) (m, 1H) e duplos dubletos em $\delta_{\text{H}} 7,81$ (dd, $J=7,8 \text{ Hz}$ $J=1,2\text{Hz}$, 1H) referentes a hidrogênios do anel aromático (Figura 63).

O espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD_4) apresentou dez linhas espectrais, sendo uma referente ao carbono metílico ($\delta 19,64$), duas referentes a carbonos metilênicos sp^3 em $\delta 46,3$ e $65,9$; cinco linhas espectrais atribuídas a carbonos do anel aromático ($\delta 115,9$; $116,9$; $118,7$; $127,8$; $133,5$), duas linhas espectrais características de carbono carbonílico ($\delta 159,3$) e de carbono de amidas ($\delta 169,4$) (Figura 64).

Através da análise de espectrometria de massas de alta resolução foi comprovada a formação do produto **19**, onde se obteve o pico do íon molecular $m/z 196,09$ com 100% de intensidade e de seu isótopo, de $m/z 197,09$ em menor intensidade. Considerando que as análises foram realizadas no modo de ionização positivo, este resultado está de acordo com a massa molecular da 2-hidroxi-*N*-(2-hidroxipropil)benzamida (**19**) ($195,09 \text{ g/mol}$) (Figura 65).

Figura 62 - Espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}) da 2-hidroxi-N-(2-hidroxiopropil)benzamida (**19**).

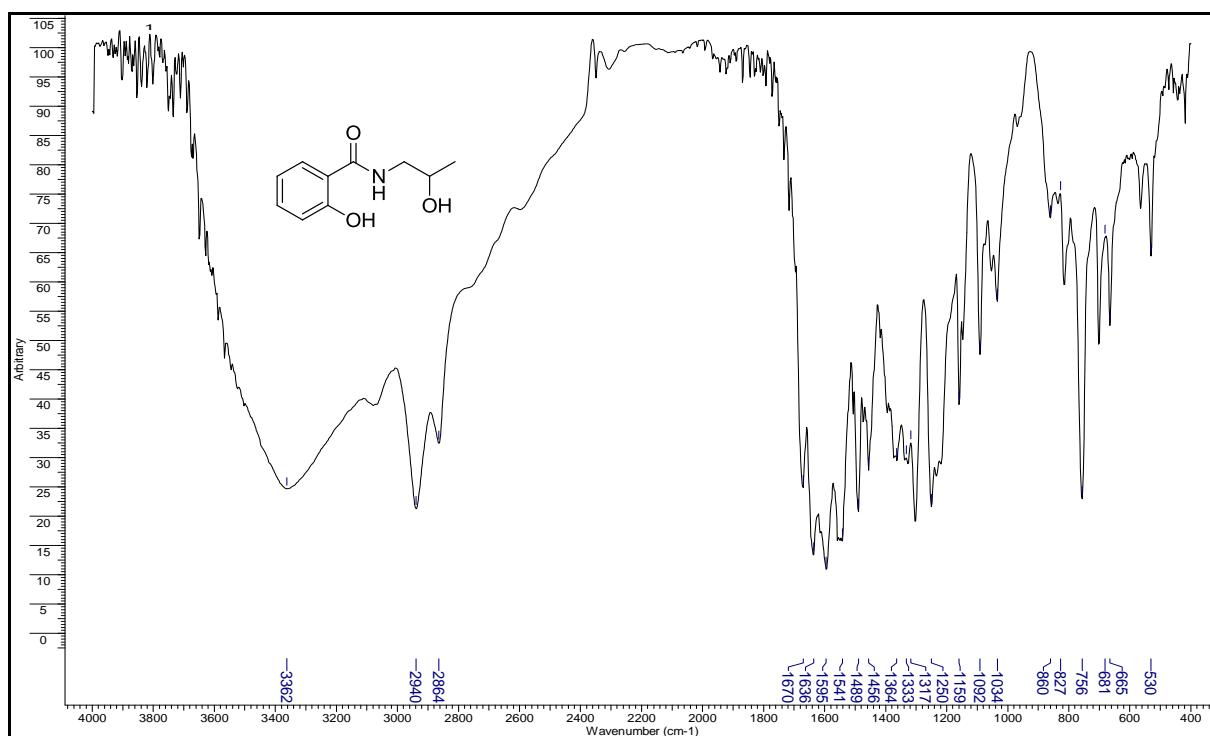


Figura 63 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD_4) da 2-hidroxi-N-(2-hidroxiopropil)benzamida (**19**).

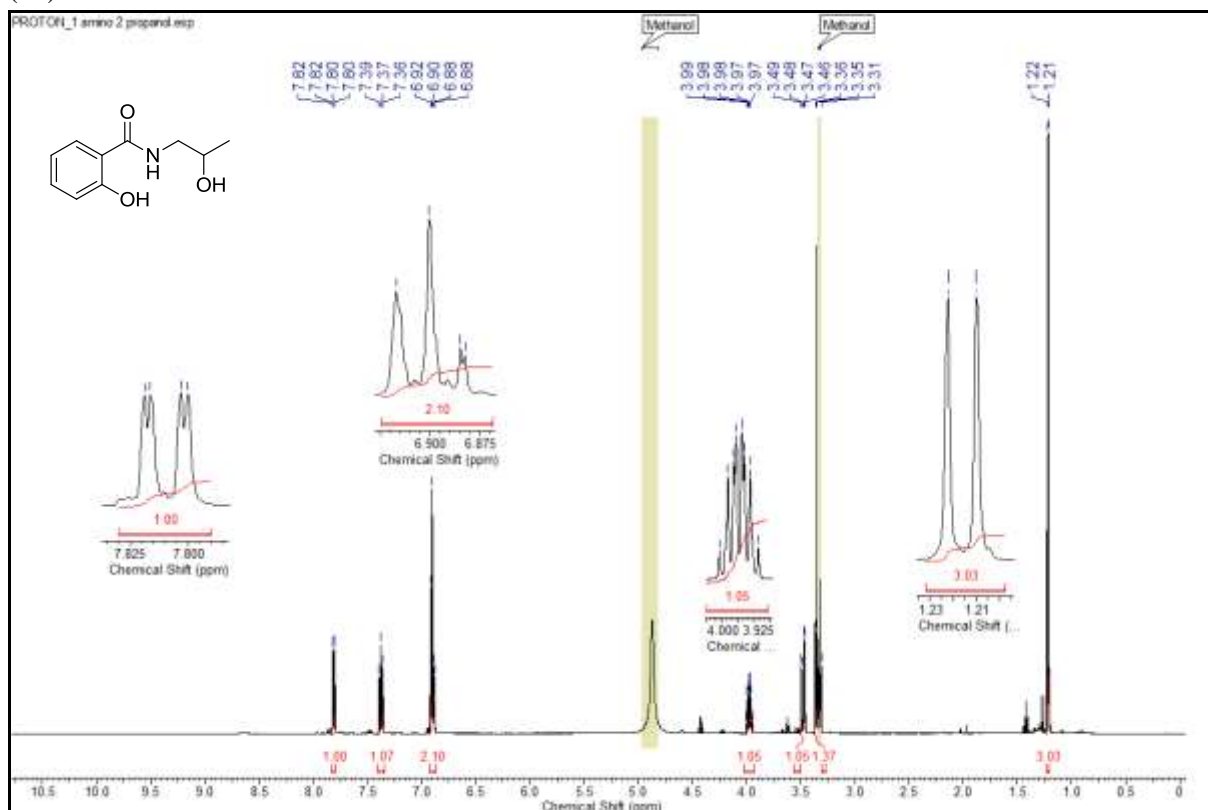


Figura 64 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, MeOD_4) da 2-hidroxi-*N*-(2- hidroxipropil)benzamida (**19**).

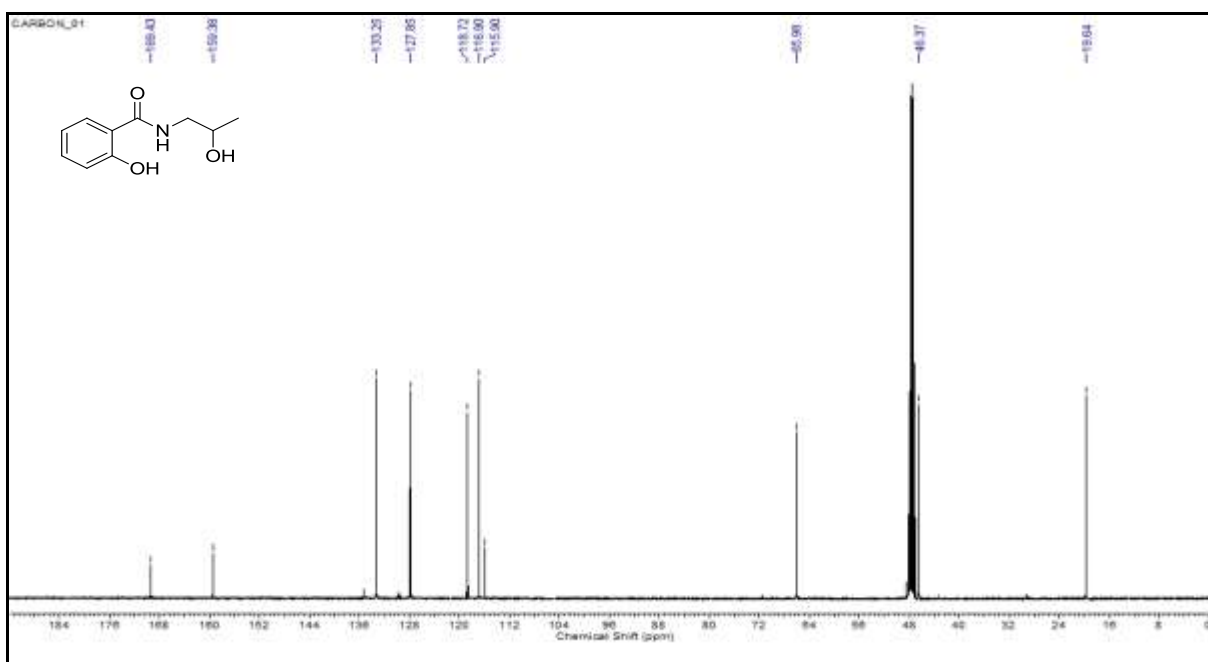
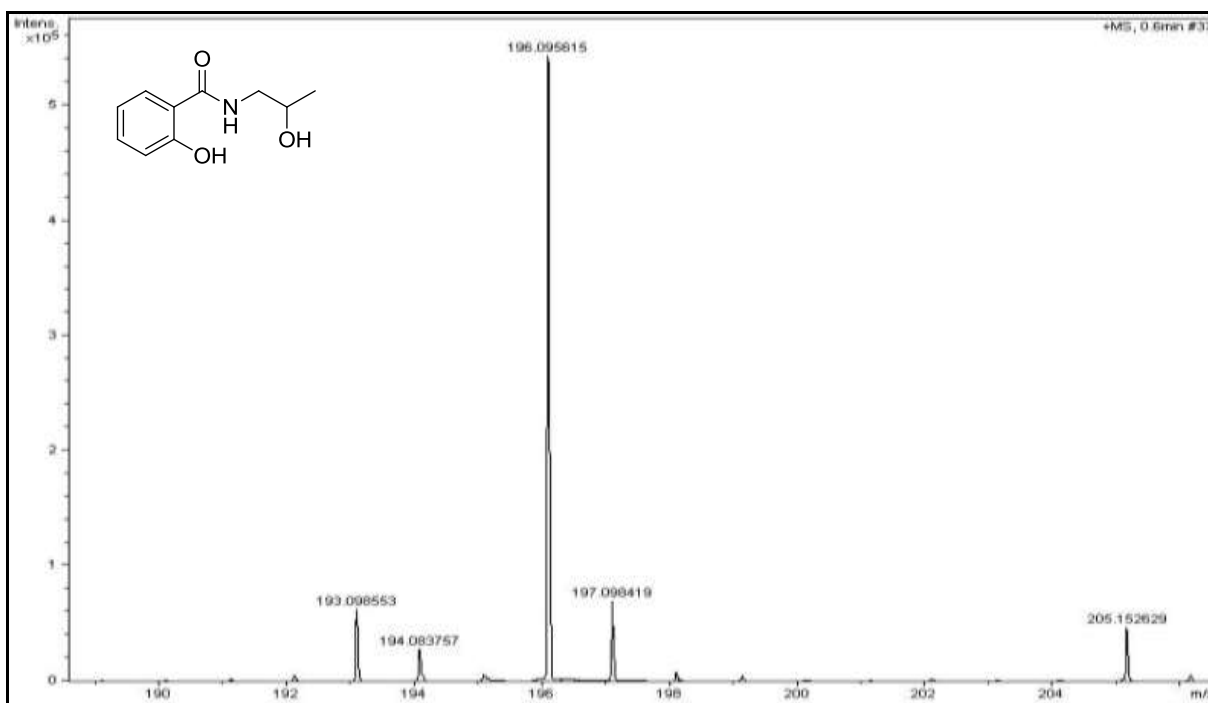


Figura 65 - Espectro de massas de alta resolução da 2-hidroxi-*N*-(2- hidroxipropil)benzamida (**19**).



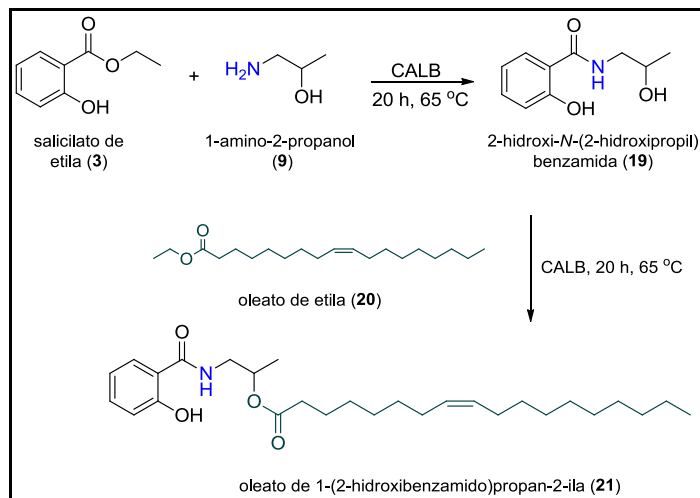
4.4 Reação da 2-hidroxi-*N*-(2-hidroxipropil)-benzamida (**19**) e o oleato de etila (**20**) catalisadas por CALB

É conhecido que lipases podem atuar tanto em reações de aminólise quanto de transesterificação, produzindo respectivamente, amidas e ésteres. Este fato pode ser mostrado no item 4.3.2, onde a CALB promoveu a aminólise e a transesterificação do aminoálcool 5-aminopentanol (**6**). De forma similar e previamente à realização deste trabalho, pesquisas realizadas no centro de pesquisas da empresa Solabia levaram à produção de moléculas análogas as ceramidas da pele através de reações de aminólise e transesterificação (COUTURIER *et al.* 2009).

Em vista disso, a CALB foi empregada como biocatalisador em uma reação entre o produto 2-hidroxi-*N*-(2-hidroxipropil)benzamida (**19**), obtido a partir do 1-amino-2-propanol (**9**) e o reagente oleato de etila (**20**), derivado do ácido oleico. A reação foi promovida seguindo procedimentos não descritos¹⁴. O objetivo principal deste estudo foi promover a ligação entre o oleato de etila (**20**) e o produto intermediário **19**, através de uma reação de transesterificação entre o grupo hidroxila (proveniente do aminoálcool) e do grupo éster do oleato de etila (Esquema 23).

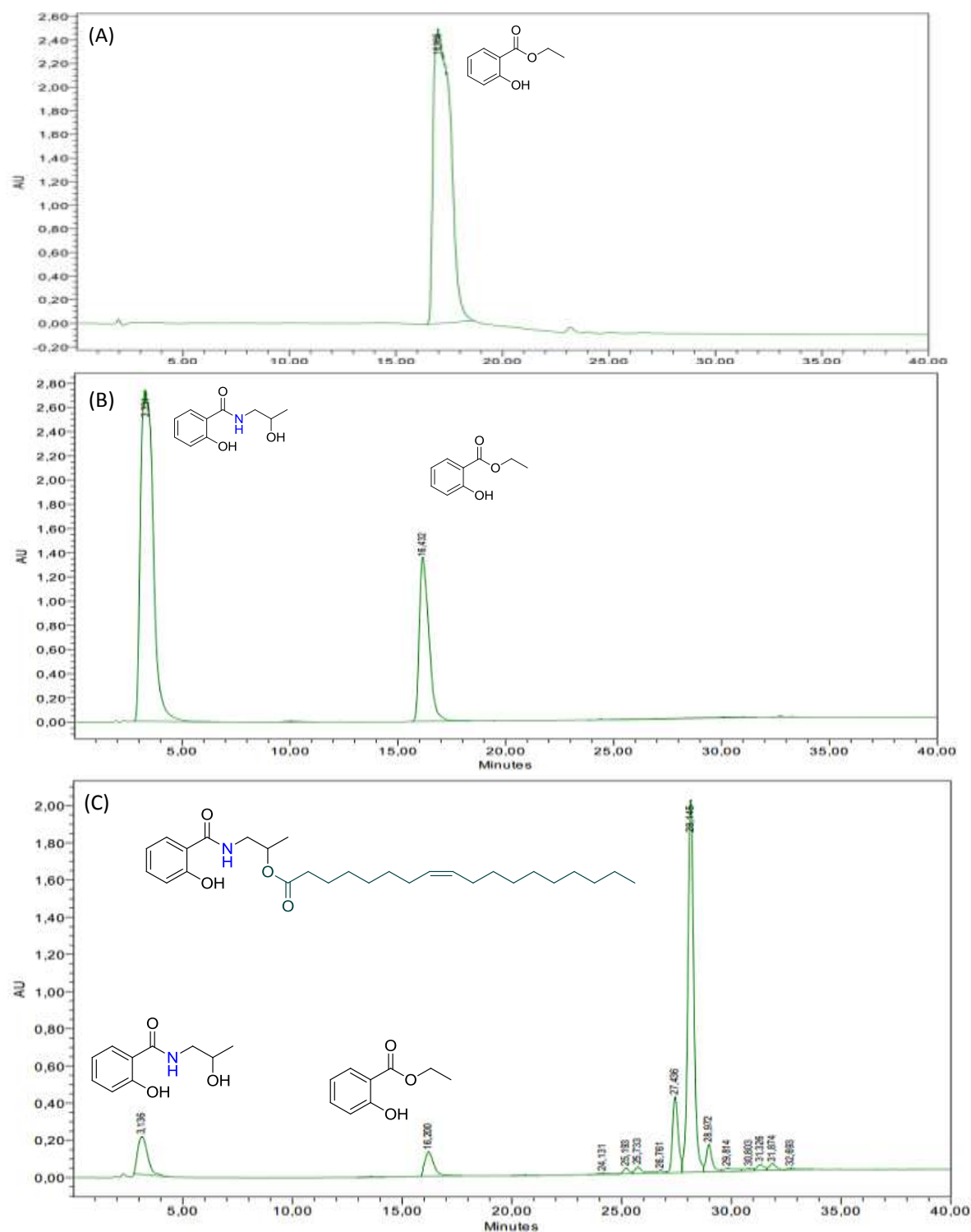
¹⁴ Esta metodologia passa por processo de patenteamento.

Esquema 23 - Síntese do composto bioativo oleato de oleato de 1-(2-hidroxibenzamido)propan-2-ila (**21**) em duas etapas.



A reação foi promovida empregando-se o composto **19** e o oleato de etila (**20**) como reagentes, em concentrações equimolares. As análises levaram a um rendimento de 75% do produto **21**. Os cromatogramas do padrão salicilato de etila (**3**), da amida **19** e da reação final com o oleato de etila (**20**) são apresentados na Figura 66.

Figura 66 - Cromatogramas obtidos por CLAE das análises de (A) Padrão do salicilato de etila, (B) Reação com o 1-amino-2-propanol (**9**) catalisada por CALB, (C) Reação de formação do produto **21** com CALB.



Condições de análise CLAE: MeOH/H₂O (80:20); fluxo 0,27 mL/min; 210 nm; t_c = 40 min, Coluna C18 X-Terra MS (150 mm x 2,1 mm x 5,0 μm).

Através do cromatograma da Figura 66, observou-se um decréscimo no pico referente ao composto **19** e a formação de um produto de caráter hidrofóbico em um tempo de retenção superior ($t_r=28,1$ min). Ao analisar o produto através de ressonância magnética e espectrometria massas de alta resolução, foi comprovada a formação da oleato de 1-(2-hidroxibenzamido)propano-2-ila (**21**), através de uma reação de transesterificação catalisada pela enzima lipase de *Candida antarctica*.

O produto **21** pode representar um excelente ingrediente para a formulação de cosméticos hidratantes que agregam proteção contra a radiação ultra-violeta. Este fato é possível devido sua estrutura apresentar um derivado do ácido salílico, um antioxidante frequentemente utilizado na formulação de filtros solares junto com uma molécula lipídica como derivada do ácido oleico, o qual pode conferir emoliência e proteção à camada córnea, devido suas interações com os lipídios cutâneos.

Este produto passa atualmente por estudos sobre sua atividade biológica, os quais tem apresentado a eficácia esperada. Adicionalmente ao produto **21**, outros produtos sintetizados passam por estudos biológicos (os quais são mantidos sob confidencialidade empresarial) (Figura 67).

Figura 67 - Produtos selecionados para estudo de atividade biológica.



4.4.1. Caracterização do oleato de 1-(2-hidroxibenzamido)propano-2-ila (**21**) obtida por CALB

No espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}) foi apresentada uma banda larga e intensa em 3346 cm^{-1} devido à vibração de deformação axial da ligação O-H sobrepondo-se a ligação N-H; bandas também foram observadas em $2947\text{-}2833 \text{ cm}^{-1}$ devido a deformações de vibrações axial de ligações C-H de cadeia alifática, junto a uma banda intensa em 1028 cm^{-1} decorrente da deformação angular de ligações C-O de ésteres e fenóis (Figura 68).

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD_4) apresentou sinais característicos de hidrogênios metílicos em δ_{H} 0,86 (3H, t, $J=6,5 \text{ Hz}$), multipletos em δ_{H} 1,24-1,30 referentes a hidrogênios alifáticos saturados (m, 22H), multipletos referentes a hidrogênios alílicos em δ_{H} 2,16 (m, 2H), multipletos referentes a hidrogênios α -amídicos em δ_{H} 3,42 (m, 2H), bem como hidrogênios do anel aromático [δ_{H} 6,83-6,98 (2H, m); 7,37-7,50 (1H, m); 7,84 (1H, d, $J=9,35 \text{ Hz}$)] (Figura 69).

O espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD_4) apresentou sinais espectrais referentes a carbonos metílicos (δ 13,7 e δ 17,5), sinais referentes carbonos metilênicos (δ 22,3; 24,6; 26,8; 28,7; 28,7; 28,9; 29,1; 29,3; 29,4; 31,5), um sinal espectral em δ 34,1 referente ao carbono alifático α -carbonílico, um sinal em δ 44,3 referente ao carbono α -amídico, um sinal em δ 69,2 referente ao carbono ligado ao oxigênio do grupamento éster, sinais referentes a carbonos do anel aromático (δ 118,0; 118,4; 125,2; 129,3; 129,3; 133,8), sinais referentes a carbonos alilílicos (δ 129,6; 129,6), um sinal espectral em δ 159,9 referente ao carbono do anel aromático ligado ao grupamento hidroxila, bem como sinais em δ 173,5 e δ 174,2 referentes aos carbonos carbonílicos (Figura 70).

Através da análise por espectrometria de massas de alta resolução do oleato de 1-(2-hidroxibenzamido)propano-2-ila (**21**) foi apresentado o pico do íon molecular de m/z 460,342 com 100% de intensidade. Considerando que as análises foram realizadas no modo de ionização positivo, este resultado está de acordo com a massa molecular do produto **21** (459,331g/mol) (Figura 71).

Figura 68 - Espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}) de 1-(2-hidroxibenzamido)propano-2-ila (**21**).

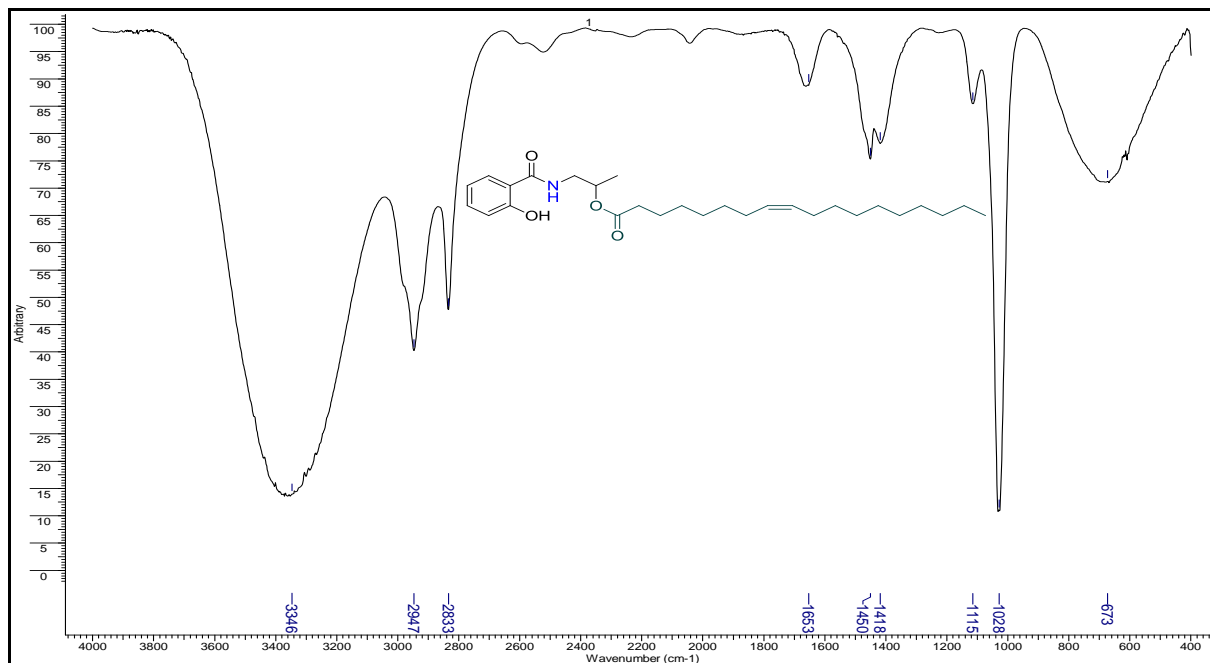


Figura 69 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD_4) de oleato de 1-(2-hidroxibenzamido)propano-2-ila (**21**).

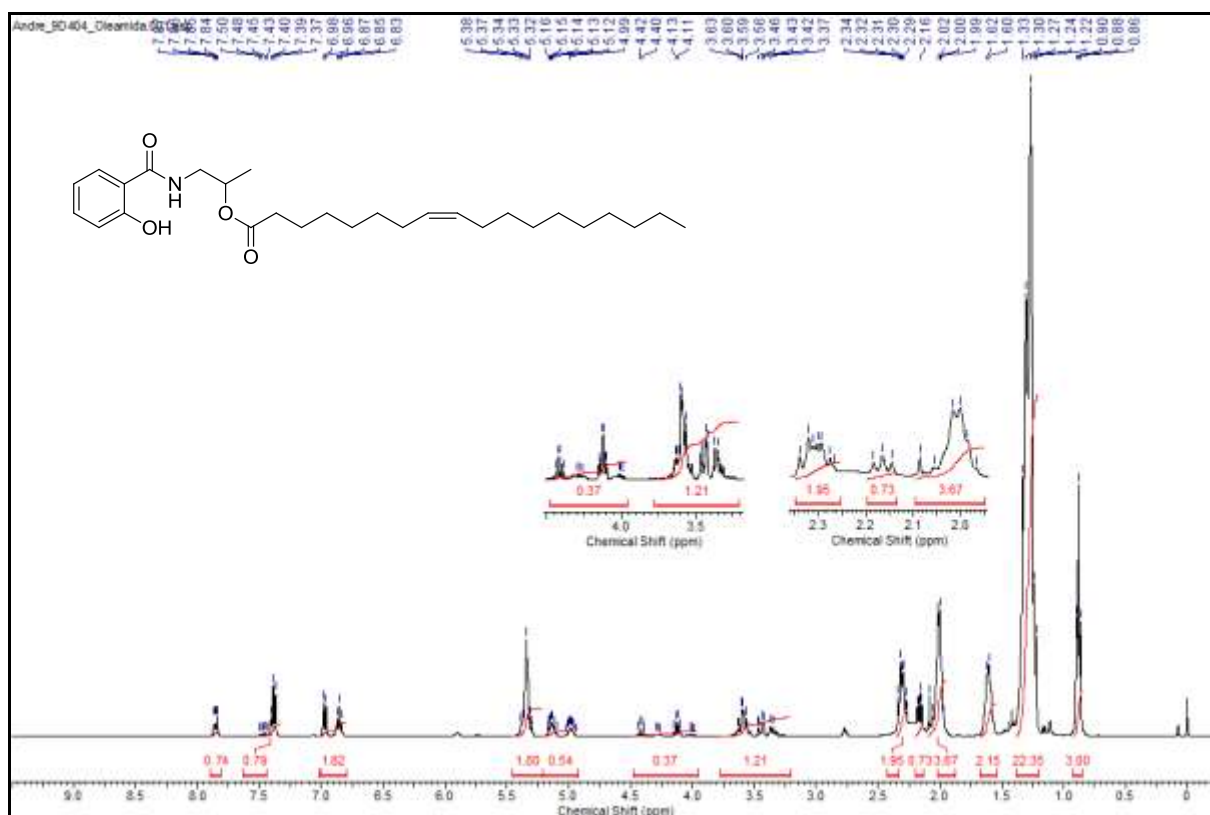


Figura 70 - Espectro de RMN ¹C (125 MHz, MeOD₄) de oleato de 1-(2-hidroxibenzamido)propano-2-ila (21).

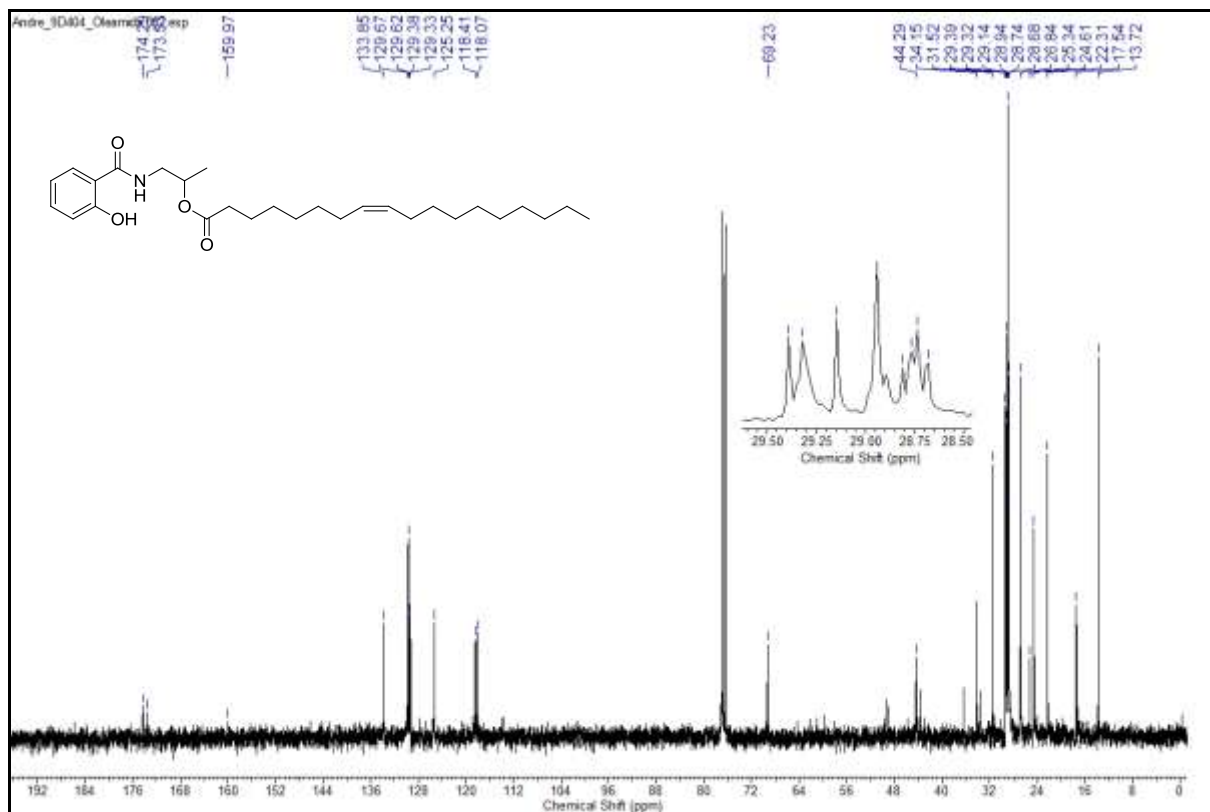
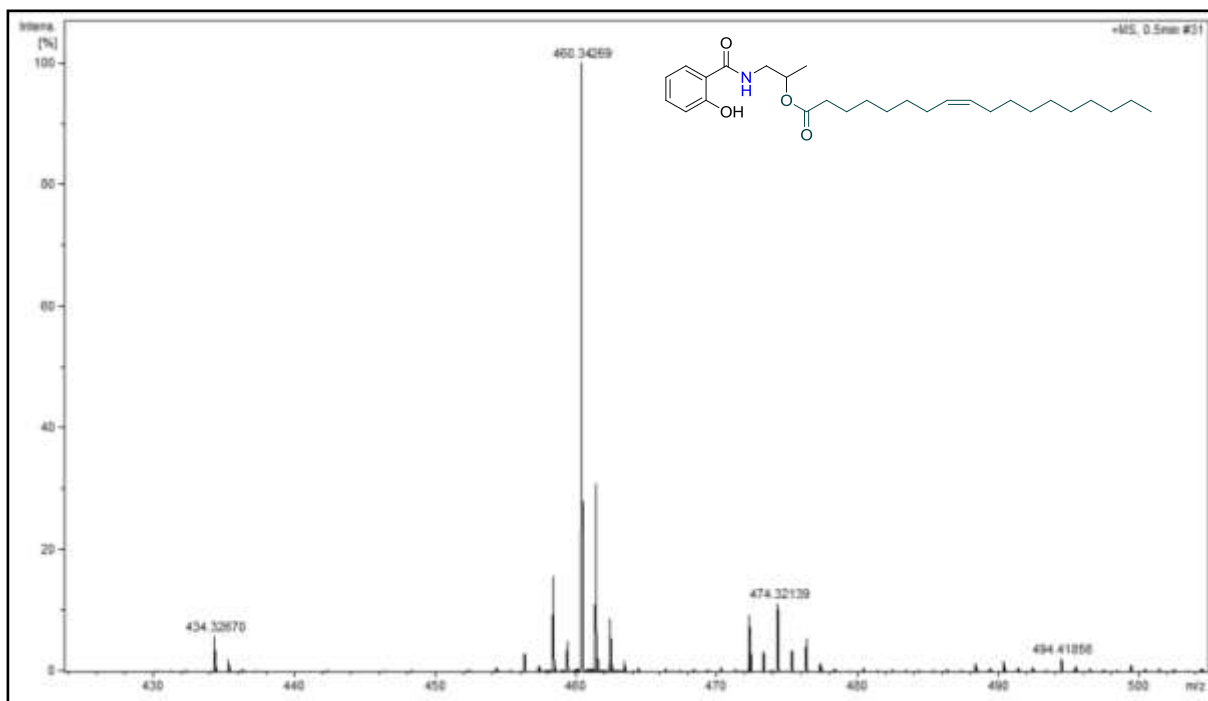


Figura 71 - Espectro de massas de alta resolução de oleato de 1-(2-hidroxibenzamido)propano-2-ila (21).





5. CONCLUSÃO

Este trabalho visou a produção de moléculas derivadas do ácido linoleico e ácido salicílico através de reações de aminólise catalisadas pela lipase de *Candida antarctica* (CALB). Inicialmente, foram realizadas reações de aminólise catalisadas por CALB entre o linoleato de etila (**1**) e a *N*-dodecilamina (**2**), através das quais foi produzida a amida graxa (9Z,12Z) -*N*-dodeciloctadeca-9,12-dienamida (**10**). Esta amida graxa apresenta propriedades interessantes para formulação de emolientes, já que sua estrutura hidrofóbica deve mostrar afinidade por lipídios presentes na camada córnea. O produto **10** foi obtido com excelente rendimento (97%) nas reações em que os reagentes foram adicionados em *proporções equimolares* e a CALB adicionada em 5g/mol de reagentes.

Após a produção da amida graxa (**10**) a partir do linoleato de etila (**1**) e da *N*-dodecilamina (**2**), o reagente **1** foi selecionado para reações de aminólise com o salicilato de etila (**3**). As reações foram promovidas com diferentes concentrações de CALB (0,6; 1,2; 2,5; 5,0; 7,5 e 10g/mol de substratos) onde a enzima apresentou atividade a partir das menores proporções enzimáticas para produção da *N*-dodecil-2-hidroxibenzamida (**11**). No entanto, o melhor rendimento (98%) do produto **11** foi obtido nas mesmas condições reacionais prévias (*proporção equimolar* dos reagentes, 5g CALB/mol substrato). Como este trabalho foi desenvolvido visando produções em escalas industriais, estas condições foram *padronizadas* para todas as reações seguintes.

Um estudo foi realizado com o salicilato de etila (**3**) e os aminoálcoois (**4-9**), os quais foram selecionados de acordo com o *Personal Care Products Council* (PCPC), a associação que prioriza normas de segurança envolvidas no desenvolvimento de cosméticos. Os aminoálcoois são interessantes no setor cosmético por atuarem como blocos de construção que possibilitam novas etapas reacionais. Adicionalmente, aminoálcoois podem ser transformados em amidas e/ou ésteres através da CALB.

Em reações com os aminoálcoois etanolamina (**4**) e 2-(metilamino)etanol (**5**), a CALB produziu as amidas fenólicas amidas 2-hidroxi-*N*-(2-hidroxietil)benzamida (**12**) e 2-hidroxi-*N*-(2-hidroxietil)-*N*-metilbenzamida (**13**) com rendimentos de 60 e 63%, respectivamente. Um estudo também foi realizado com um aminoálcool que apresenta cadeia alifática contendo grupamentos $-(CH_2)-$ não ramificados, tal como o reagente 5-aminopentanol (**6**). Este estudo visou a síntese enzimática da 2-hidroxi-*N*-(5-hidroxipentil)benzamida (**14**), o qual apresenta caráter anfifílico, dado ao tipo de sua cadeia carbônica. De forma interessante, as análises mostraram que ambas as reações, aminólise e transesterificação, ocorreram através da lipase

de *Candida antarctica*. No entanto, as reações de aminólise e transesterificação produziram os compostos **14** e **15** com conversões moderadas de 44 e 33%, respectivamente.

Um estudo também foi promovido com a CALB frente ao aminoálcool tiramina (**7**), o qual apresenta um grupamento fenólico em sua estrutura. As reações foram promovidas com o salicilato de etila (**3**) e as análises mostraram um rendimento de 23% na produção da 2-hidroxi-*N*-(4-hidroxifenil)benzamida (**16**). O baixo rendimento pode estar relacionado a presença de um grupamento fenólico, o qual pode ter dificultado a reação através da repulsão estérica com o salicilato de etila. Este estudo foi realizado apenas visando avaliar a atividade da CALB, pois o aminoálcool **7** não tem inclusão entre os compostos permitidos pelo *Personal Care Products Council* (PCPC).

Visando a obtenção de precursores para síntese de amidas fenólicas graxas, um estudo foi realizado com os aminoálcoois de cadeia funcionalizada 1,3-diaminopropan-2-ol (**8**) e 1-amino-2-propanol (**9**). Neste estudo, observou-se que a reação de aminólise catalisada por CALB com o aminoálcool **8** produziu tanto a *N*-(3-amino-2-hidroxipropil)-2-hidroxi-benzamida (**17**) quanto a 2-hidroxi-*N*-(2-hidroxi-propil)benzamida (**19**).

Embora houvesse a possibilidade de otimizar condições reacionais neste e nos casos anteriores, o interesse principal residiu em encontrar reagentes que sejam transformados em amidas fenólicas através de reações padronizadas e que ofereçam rendimentos superiores a 90%. Este objetivo foi atingido através da reação entre o salicilato de etila (**3**) e 1-amino-2-propanol (**8**). Neste caso, a reação de aminólise ocorreu apresentando um rendimento equivalente a 93% da 2-hidroxi-*N*-(2-hidroxi-propil)benzamida (**19**). A amida fenólica **19** pode ser introduzida em formulações cosméticas voltadas para hidratação cutânea, pois sua estrutura hidrofílica deve apresentar afinidade por moléculas responsáveis pelo fator natural de hidratação (NMFs). Adicionalmente, a amida fenólica **19** é constituída por um aminoálcool que representa um bloco de construção. Este fato possibilitou uma segunda etapa reacional, visando a produção de uma molécula anfifílica, tal como o produto **21**.

Em vista da capacidade da lipase de *Candida antarctica* em realizar tanto reações de aminólise quanto de esterificação, a CALB foi empregada como biocatalisador entre a 2-hidroxi-*N*-(2-hidroxi-propil)benzamida (**19**) e o oleato de etila (**20**) produzindo a molécula anfifílica oleato de 1-(2-hidroxi-benzamido)propano-2-ila (**21**) com 75% de rendimento. O produto **21** pode representar um excelente ingrediente para a formulação de cosméticos hidratantes que agreguem proteção contra a radiação ultra-violeta, um fato possível devido à sua estrutura agregar um antioxidante muito utilizado na formulação de filtros solares, como o

salicilato de etila e uma molécula lipídica como o oleato de etila, que pode conferir emoliência e proteção a camada córnea, devido suas interações com os lipídios cutâneos.

Em todos os casos, a presença do ácido salicílico nas estruturas moleculares é atrativa para a formulação de produtos antioxidantes que agreguem algumas propriedades, tais como, esfoliantes, anti-acne e ação contra radiação ultravioleta.

Neste processo biotecnológico, todas as reações foram promovidas na ausência de solventes orgânicos e sob vácuo, eliminando custos e gastos energéticos com o tratamento de solventes, seguindo os princípios de química verde. Este trabalho possibilitou o intercâmbio de conhecimentos entre a área acadêmica e o setor industrial, aplicando a lipase de *Candida antarctica* como biocatalisador e produzindo compostos que passam atualmente por estudos sobre sua atividade biológica.

6. REFERÊNCIAS

- ALU'DATT, M.; RABABAH, T.; EREIFEJ, K.; ALLI, I. Distribution, antioxidant and characterization of phenolic compounds in soybeans, flaxseed and olives. **Food Chemistry**, v. 139, p. 93-99, 2013.
- ANDREASSI, M.; ANDREASSI, L. Antioxidants in dermocosmetology: from the laboratory to clinical application. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 2, p.153-160, 2002.
- ANDREWS, S.N.; ZARNITSYN, V.; BONDY, B.; PRAUSNITZ, M.R. Optimization of microdermabrasion for controlled removal of stratum corneum. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 407, p. 95-104, 2011.
- ANISSIMOV, Y. G.; OWEN G. JEPPE, O. G.; YURI DANCİK, Y.; ROBERTS, M.S. Mathematical and pharmacokinetic modelling of epidermal and dermal transport processes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 169-190, 2013.
- AZULAY, D.R.; AZULAY R.D. **Dermatologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara. Koogan, 2011. 419 p.
- BALOGH, T. S.; VELASCO, M. V. R.; PEDRIALI, C. A.; KANEKO, T. M.; ROLIM, A. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, p. 732-742, 2011.
- BARBOSA-PEREIRA, L.; ANGULO, I.; PASEIRO-LOSADA, P. CRUZ, J.M. Phenolic profile and antioxidant properties of a crude extract obtained from a brewery waste stream. **Food Research International**, v. 5, p. 663-669, 2013.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.
- BARONI, A.; BUOMMINO, E. ; DE GREGORIO, V.; RUOCCO, E.; RUOCCO, V.; WOLF, R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clinics in Dermatology**, v.30, p.257-262, 2012.
- BITO, T.; NISHIGORI, C. Impact of reactive oxygen species on keratinocyte signaling pathways. **Journal of Dermatological Science**, v. 68, p. 3-8, 2012.
- BIKMAN, B.T.; SUMMERS, S.A. Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism. **Journal of Clinical Investigations**, v.121, p.4222-4230, 2011.
- BUSTO, E.; GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; GOTOR, V. Hydrolases: catalytically promiscuous enzymes for non-conventional reactions in organic synthesis. **Chemical Society Reviews**, v.39, p. 4504-4523, 2010.

BYUN, H.J.; CHO, K.H.; EUN, H.C.; LEE, M.J.; LEE, Y.; LEE, S.; CHUNG, J.H. Lipid ingredients in moisturizers can modulate skin responses to UV in barrier-disrupted human skin in vivo. **Journal of Dermatological Science**, v. 65, p. 110-117, 2012.

CAI, Y.Z.; MEI SUN, B.; XING, C.; LUO, D.; H, CORKE, H. Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. **Life Sciences**, v.78, p. 2872-2888, 2006.

CATALÁ, A. A synopsis of the process of lipid peroxidation since the discovery of the essential fatty acids. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 399, p. 318–323, 2010.

CHEN J.Y.; WEN, P.F.; KONG, W.F.; PAN, Q.H.; ZHAN, J.C.; LI, J.M.;WAN, S.B.; HUANG, W.D. Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. **Postharvest Biology and Technology**, v. 40, p. 64-72, 2006.

COHEN-LETESSIER, A. Actualités cosmétiques dans le vieillissement cutané. **Annales de Dermatologie**, v.136, p. 367-371, 2009.

COUTURIER, L.; TAUPIN, D.; YVERGNAUX, F. Lipase-catalysed chemoselective aminolysis of various aminoalcohols with fatty acids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, p. 29-33, 2009.

COUTURIER, L.; YVERGNAUX, F. Combined structural and biological activities for new polyunsaturated fatty derivatives obtained by biotechnological process. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 31, p. 209-234, 2009.

DA SILVA, C.L.; TOPGAARD, D.; KOCHERBITOV, V.; SOUSA, J.J.S. A.; PAIS, A.A.C.C. Stratum corneum hydration: Phase transformations and mobility in stratum corneum, extracted lipids and isolated corneocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, p. 2647-2659, 2007.

DE ZOETE, M.C.; RANTWIJK, F. V.; SHELDON, R. A. Lipase-catalyzed transformations with unnatural acyl acceptors. **Catalysis Today**, v. 22, p. 563-590, 1994.

DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolic antioxidants. **Trends in Food Science and Technology**. v.17, p. 505-512, 2006.

DRÉNO, B. Anatomie, immunologie de la peau et de ses annexes. **Annales de Dermatologie Venereologique**, v. 135, p. 149-152, 2008.

DICKERSON, D.P.; PASCHOLATI, S.F.; HAGERMAN, A.; BUTLER, L.G. Phenylalanine ammonia-lyase and hydroxycinnamate: CoA ligase in maize mesocotyls inoculated with *Helminthosporium maydis* or *Helminthosporium carbonum*. **Physiological Plant Pathology**, v.25, p.111-123, 1984.

DUBERTRET, B.; RIVIER, N. Geometrical models of the renewal of the epidermis. **Life science**, v.323, p. 49-56, 2000.

ELIAS, M.P. Structure and Function of the Stratum Corneum Extracellular Matrix. **Journal of Investigative Dermatology**, v.132, p. 2131-2133, 2012.

ELLIS, C.; LUGER, T. International Consensus Conference on Atopic Dermatitis II: Clinical update and current treatment strategies. **British Journal of Dermatology**, v. 63, p. 3-10, 2003.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**, 5.ed. Berlin: Springer-Verlag, 2004. p. 454.

FANG, L.; NUMAJIRI, S.; KOBAYASHI, D.; MORIMOTO, Y. The use of complexation with alkanolamines to facilitate skin permeation of mefenamic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v.262, p.13-22, 2003.

GIRALDO, L. J. L.; LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; FIGUEROA-ESPINOZA, M.; BAROUH, N.; BAREA, B.;VILLENEUVE, P. Lipase-catalyzed synthesis of chlorogenate fatty esters in solvent-free medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p.721-726, 2007.

GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; BUSTO, E.; GOTOR, V. *Candida antarctica* Lipase B: An ideal biocatalyst for the preparation of nitrogenated organic compounds. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v.348, p. 797-812, 2006.

GUARANTINI, T.; MEDEREIROS, M.H.; COLEPICOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, v.30, p.206-213, 2007.

GUIMBERTEAU, J.C.; DELAGE, J.C.; WONG, J. Faire peau neuve. **Annales de Chirurgie Plastique Esthétique**, v. 55, p. 255-266, 2010.

GU, L.H.; COULOMBE, P.A. Keratin function in skin epithelia: a broadening palette with surprising shades. **Current Opinion in Cell Biology**, v.19, p.13-23, 2007.

HAFTEK, M. Données structurales et ultrastructurales sur les lipides cutanés humains. **Pathologie Biologie**, v. 51, p. 264-266, 2003.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – quo vadis? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, p. 125-131, 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 4.ed, Oxford, Great Britain: Clarendon Press, 2007.

HARMAN, D. Aging: overview. **Annals of the New York Academy of Science**. v. 928, p. 1-21, 2001.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.

HIRATA, L.L.; SATO, M.E.; SANTOS, C.A.M. Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.23, p.418-424, 2004.

ILLANES, A.; CAUERHFF, A.; WILSON, L.; CASTRO, G.R. Recent trends in biocatalysis engineering. **Bioresource Technology**, v. 115, p.48-57, 2012.

JENSEN, J.M.; PROKSCH, E. The skin's barrier. **Giornale Italiano Di Dermatologia e Venereologia**, v.144, p.689-700, 2009

JIANG, Y.J.; KIM,P.; UCHIDA, Y.;ELIAS, P.M.; BIKLE, D.D.; GRUNFELD, C.; FEINGOLD, K.R. Ceramides stimulate caspase-14 expression in human keratinocytes. **Experimental Dermatology**, v.22, p.113-118, 2013.

KHARE, S. K.; KUMAR, A.; KUO, T.M. Lipase-catalyzed production of a bioactive fatty amide derivative of 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1482-1485, 2009.

KAKHONEN, M.; HOPIA, A.; VUORELA, H.J.; PEKKARAUHA, J.; KUJALA, T.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p. 3954-3962, 1999.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 555-569, 2012.

KIM, E.J.;JIN, X.; KIM, Y. K.; IN KYUNG OH, I.K.; J, KIM, J.; CHI-HYUN PARK, C.; CHUNG, J. H. UV decreases the synthesis of free fatty acids and triglycerides in the epidermis of human skin in vivo, contributing to development of skin photoaging. **Journal of Dermatological Science**, v. 57, p. 19-26, 2010.

KOOLEN, H.H.F.; SILVA, F.M.A.; GOZZO, F.C.; SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa L. f.*) by UPLC–ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 51, p. 467-473, 2013.

KORNHAUSER, A.; WEI, R.; YAMAGUCHI, Y.; COELHO, S.; KAYS KAIDBEY, K.; BARTON, C.; KAORUKO, T.; MILLER, S.; J. HEARING, V.J. The effects of topically applied glycolic acid and salicylic acid on ultraviolet radiation-induced erythema, DNA damage and sunburn cell formation in human skin. **Journal of Dermatological Science**, v. 55, p.10-17, 2009.

LANCÔME. Disponível em: <[http://www.lancome.com.br/tratamento/por-necessidade/pele-sem-imperfeicoes/visionnaire-\[lr-2412-4\]](http://www.lancome.com.br/tratamento/por-necessidade/pele-sem-imperfeicoes/visionnaire-[lr-2412-4])>Acesso em: 15 ago 2013.

LASCH, J.; SCHONFELDER, U.; WALKE, M.; ZELLMER, S.; BECKERT, D. Oxidative damage of human skin lipids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1349, p.171-181-1997.

LEHNINGER, P.; DAVID, L.N.; MICHAEL, M.C. **Principles of biochemistry**. 4. ed. New York: Worth Publishers, 2000.123 p.

- LEY, J. P. Phenolic acid amides of phenolic benzylamines against UVA-induced oxidative stress in skin. **International Journal of Cosmetic Science**. v. 23, p.35-48, 2001.
- LIMA, E. S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, p. 293-303, 2001.
- LILJEBLAD, A.; KANERVA, L.T. Biocatalysis as a profound tool in the preparation of highly enantiopure amino acids. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.62, p.711-715, 2006.
- MADISON, KC. Barrier function of the skin: "La raison d'être" of the epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, v.121, p.231-241, 2003.
- MANHEZII, A.; BACHIONI, M.M.; PEREIRA, A.L. Utilização de ácidos graxos essenciais no tratamento de feridas. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v.61, p.620-629, 2008.
- MAHJOUR, M.; MAUSER, B.E.; FAWZI, M.B. Skin permeation enhancement effects of linoleic acid and Azone on narcotic analgesics. **International Journal of Pharmaceutics**, v.56, p.1-11, 1989.
- MAUGARD, T. Application of hydrolases to the enzymatic synthesis of cosmetic Ingredients. **Scientific Study & Research**, v. 4, p. 39-50, 2003.
- MARTIN, I.; GROTEWIEL, M.S. Oxidative damage and age-related functional declines. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.127, p. 411-423, 2006.
- MASAKI, H. Role of antioxidants in the skin: Anti-aging effects. **Journal of Dermatological**, v.58, P.85-90, 2010.
- MASSON, F. Acide hyaluronique et hydratation cutanée. **Annales de Dermatologie**, v.137, p. 23-25, 2010.
- MATSUDA, T.; YAMANAKA, R.; NAKAMURA, K. Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. **Tetrahedron: Assymetry**, v. 20, p. 513-557, 2009.
- McLEAN, J. A.; KARADAS, F.; SURAI, P.; McDEVITTI, R.; SPEAKE, B. Lipid-soluble and water-soluble antioxidant activities of the avian intestinal mucosa at different sites along the intestinal tract. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 141, p. 366- 372, 2005.
- MACHELEIDT, O.; KAISER, H.W.; KONRAD SANDHOFF. K. Deficiency of epidermal protein-bound w-hydroxyceramides in atopic dermatitis. **Journal of Investigative Dermatology**. v.119, p.166-174, 2002.
- MERINVILLE, E.M.S.; BYRNE, A.; RAWLINGS, P.; MUGGLETON, B.; LALOEUF, A. Three clinical studies showing the anti-aging benefits of sodium salicylate in human skin. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.9, p. 174-184, 2010.

- MOLINA, J.F. Omega ceramide technology: An active molecule stabilization and transportation system to preserve and strengthen the integrity of the skin. **Household and Personal Care Today**. v. 2, p. 12-15, 2008.
- MOLINARI, F; ROMANO, D; GANDOLFI, R; GUALANDRIS, R.;FERRARA, N. Biocatalysis for use in pharmaceutical manufacturing. **Journal of Biotechnology**, v.131, p.98-121, 2007.
- MONIRUZZAMAN, M.; KAMIYA, N.; NAKASHIMA, K.; GOTO, M. Formation of Reverse Micelles in a Room-Temperature Ionic Liquid. **ChemPhysChem**, v.9, p. 689-692, 2008.
- MORGANTI, P.; RUOCCO, E.; WOLF, R.; RUOCCO, V. Percutaneous Absorption and Delivery Systems. **Clinics in Dermatology**, v.19, p. 489-501, 200.
- MURRAY, J.C.; JAMES, M.D; BURCH, A.; STREILEIN, R.D.; IANNACCHIONE, M.A.; HALL, R.P.; PINNELL, R.S. A topical antioxidant solution containing vitamins C and E stabilized by ferulic acid provides protection for human skin against damage caused by ultraviolet irradiation. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 59, p. 418-426, 2008.
- NAGMOTI, D. M.; KHATRI, D.K.; JUVEKAR,R.P.; JUVEKAR, A.R. Antioxidant activity and free radical-scavenging potential of *Pithecellobium dulce* Benth seed extracts. **Free Radicals and Antioxidants**.v.2, p.37-43, 2012.
- NANAYAKKARA, G. R.; BEN, F.; MARRIOTT. A.B.; WHITFIELD, P.J.; BROWN, M. B. The effect of unsaturated fatty acids in benzyl alcohol on the percutaneous permeation of three model penetrants. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 301, p.129-139, 2005.
- NAKAMURA, K.; YAMANAKA, R.; MATSUDA, T.; HARADA, T. Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.14, p. 2659-2681, 2009.
- NOVOTNÝ, J.; HRABÁLEK, A.; VÁVROVÁ, J.; Synthesis and Structure-activity relationships of skin ceramides. **Current Medicinal Chemistry**, v.17, p.2301-2342, 2010.
- PAPPINEN, S.; HERMANSSON, M.; KUNTSCHKE, J.; SOMERHARJU, P.; WERTZ, P.; URTTI, A.; SUHONEN, M. Comparison of rat epidermal keratinocyte organotypic culture (ROC) with intact human skin: Lipid composition and thermal phase behavior of the stratum corneum. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1778, p. 824-834, 2008.
- PATEL, R.N. Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 252, p.659-701, 2008.
- PERSSON, M. Effects of solvent, water activity and temperature on lipase and hydroxynitrile lyase enantioselectivity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 916-923, 2002.

PINNEL, S.R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.48, p.1-22, 2003.

PRIYADARSINI, K. I.; MAITY, D.K. ; NAIK, G. H.; KUMAR, M.; NIKRISHNAN, M. K.; SATAV, J.G.; MOHAN, H. Role of phenolic OH and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, p 475-484, 2003.

REETZ, M. T.; WIESENHÖFER, W.; FRANCIÒ, G.; LEITNER, W. Biocatalysis in ionic liquids: batchwise and continuous flow processes using supercritical carbon dioxide as the mobile phase. **Chemical Communications**, v.9, p. 992-993, 2002.

PRYOR, W.A. **Free radicals in Biology**. London:Academic Press, 1984. 437 p.

SAID, S.; PIETRO, C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. 412 p.

SALIOU, J.K.; KITAZAWA.M.; MCLAUGHLIN, L.; YANG, J.; LODGE, J.K.; OKAMOTO, T.; PACKER, L. Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation-induced NF-Kappa-B activation in a human keratinocyte cell line. **Free Radicals and Biological Medicine**, v. 26, p.174-183, 1999.

SCHORKEN, U., KEMPERS, P. Lipid biotechnology: Industrially relevant production process. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.111, p. 627-645, 2009.

SHIGETA, Y.; IMANAKA,H.; YONEZAWA, S.; OKU, N.; BABA, N.; MAKINO, T. Suppressed permeation of linoleic acid in a liposomal formulation through reconstructed skin tissue. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.27, p.879-882, 2004.

SIMON, M. La dermatite atopique, est-elle toujours associée à une altération de la barrière épidermique? **Revue Française d'Allergologie**, v.53, p.125-128, 2013.

SILVERMAN, R. **The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action**. 2. Ed. Amsterdam: Elsevier, 2004, 595 p.

SINTOV, A.; BEHAR-CANETTI, C.; FRIEDMAN, Y.; TAMARKIN, D. Percutaneous penetration and skin metabolism of ethylsalicylate-containing agent, TU-2100: in-vitro and in-vivo evaluation in guinea pigs. **Journal of Controlled Release**, v. 79, p.113-122, 2002.

SOARES, S.E. Compostos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v.15, p.71-81, 2002.

SOLOMONS, T.W.; FRYHLE, C.B. **Química Orgânica**.8.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. v.1.

SOROUR, N.; KARBOUE, S.; SAINT-LOUIS, R.; KERMASHA, S. Lipase-catalyzed synthesis of structured phenolic lipids in solvent-free system using flaxseed oil and selected phenolic acids as substrates. **Journal of Biotechnology**, v.158, p.128-136, 2012.

STAMATIS, H.; SERETI, V.; KOLISIS, F.N. Enzymatic synthesis of hydrophilic and hydrophobic derivatives of natural phenolic acids in organic media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.11, p. 323-328, 2001.

UCHIDA, Y.; HOLLERAN, W.M. Omega-O-acylceramide, a lipid essential for mammalian survival. **Journal of Dermatological Science**, v.51, p. 77-87, 2008.

UCHIYAMA, N.; YAMAMOTO, A.; KAMEDA, K.; YAMAGUCHI, H.; ITO, M. The activity of fatty acid synthase of epidermal keratinocytes is regulated in the lower stratum spinosum and the stratum basale by local inflammation rather than by circulating hormones. **Journal of Dermatological Science**, v. 24, p. 134-141, 2000.

VAN ZUIJLEN, P.P.; RUURDA, J.J.; VEEN, H.A.; VAN MARLE, J.; VAN TRIER, A.J.; GROENEVELT, F.; KREIS R.W.; MIDDELKOOP, E. Collagen morphology in human skin and scar tissue: no adaptations in response to mechanical loading at joints. **Burns**, v. 29, p. 423-431, 2003.

VEKMAM, A.S. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. **Journal of Cell Science**, v. 118, p. 3225-32, 2005.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 113-148, 2000.

WERTZ, P.W. The nature of the epidermal barrier: biochemical aspects. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.18, p. 283-294, 1996.

YAMAMOTO, Y. Role of active oxygen species and antioxidants in photoaging. **Journal of Dermatological Sciences**, v. 27, p.1-4, 2001.

YAN, Y.; SUNG, J.; LEE, D.W.; KIM, J.S.; JEON, C.S.; CHOI, H.G. Evaluation of physicochemical properties, skin permeation and accumulation profiles of salicylic acid amide prodrugs as sunscreen agent. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 419, p. 154-160, 2011.

ZIMNIAK, P. Relationship of electrophilic stress to aging. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, p. 1087-1105, 2011.

Letter about Ana Maria MOUAD' s work in our lab.

To whom it may concern:

Anet, France, March 29th 2013

Dear Sir or Madam,

Ana Maria Mouad came from December 2011 to august 2012 as a full time graduate student in our R & D department in chemistry and biocatalysis, Bioeurope, Anet, France.

Ana Maria Mouad was a student of mine and I can say with confidence that she was a very good student.

She works to the development of new fatty amide or new fatty derivatives with biotechnological processes for skin applications. Her skills and hard work gave very good results.

The results she obtained were very interesting and at the present time we continue to work on it with biological tests on the skin to see the opportunity to use these compounds for skin applications.

Another very good point for Ana Maria Mouad was in the fact that at the end of her work in France she spoke also a currently French. She has excellent interpersonal skills and is an effective team member with great spirit. We were very happy with the results that Ana Maria Mouad obtained and also with the excellent state of mind which she showed us.

If you need more information, please do not hesitate to contact me.

Best regards,

Florent Yvergnaux PhD.,

Director of Bioeurope, R& D Director of Solabia Group.

florent.yvergnaux@solabia.fr



Sujet de stage de Mademoiselle Ana Maria MOUAD:

Les lipases constituent une classe d'enzymes particulièrement intéressante pour le développement de molécules pour des applications cutanées. Ceci est lié au fait qu'elles sont facilement manipulables et ne nécessitent pas de cofacteurs (1). Ces biocatalyseurs présentent aussi très souvent une régiosélectivité qui les rend très attractive pour la synthèse de nouvelles molécules.

Récemment nous avons développé une nouvelle classe de molécules qui sont des analogues de céramide mettant en œuvre ces lipases (2). Ces composés possèdent de nombreuses propriétés au niveau cutané en fonction des acides gras qui sont intégrés dans la structure moléculaire (3). En association avec des molécules de type phytostérols et des dérivés de l'acide pyrrolidone carboxylique, ces analogues de céramide ont montré également un grand intérêt dans le maintien en parfait état du ciment lipidique du stratum corneum (4).

Le but du travail dans le cadre de ce stage consistera à employer ces lipases pour le développement de nouvelles molécules pour des applications cutanées. Ces nouvelles molécules pourront être dans le domaine des analogues de céramide ou bien dans la synthèse de composés dérivés de polyphénols. Ces 2 familles de molécules constituent des composés à forte potentialité pour des applications au niveau de la peau.

Références bibliographiques:

1 – Journal of molecular catalysis. B, Enzymatic A., 2010, 64, 1. Enzyme and microbial technology, 2006, 39, 235. Applied biochemistry and biotechnology A., 2004, 118, 155. Trends in biotechnology (regular ed.), 1998, 16, 396. Journal of the American oil chemists' society, 1997, 74, 621.

2 – Journal of molecular catalysis. B, enzymatic A., 2009, 56, 29.

3 – International journal of cosmetic science, 2009, 31, 209.

4 – Biochimie, 2011, accepté pour publications