



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Departamento de Química Fundamental
Programa de Pós-Graduação em Química

JENNY ESMERALDA PADILLA SORTO

**Estudos da Preparação Quimioenzimática de Enamidas
Piperidínicas 4-Substituídas. Resolução Cinética Enzimática da (+/-
)-1-(4-metil-3,4-diidropiridin-1(2H)-il)etanona Promovida pela
Lipase *Candida Antarctica* B (CAL-B) em Meio Aquoso**

Recife

2019

JENNY ESMERALDA PADILLA SORTO

**Estudos da Preparação Quimioenzimática de Enamidas
Piperidínicas 4-Substituídas. Resolução Cinética Enzimática da (+/-)
)-1-(4-metil-3,4-diidropiridin-1(2H)-il)etanona Promovida pela
Lipase *Candida Antarctica* B (CAL-B) em Meio Aquoso**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Pernambuco como
requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Luiz Princival

Recife

2019

Catálogo na fonte
Bibliotecária Mariana de Souza Alves CRB4-2106

S714e Sorto, Jenny Esmeralda Padilla
Estudos da Preparação Quimioenzimática de Enamidas
Piperidínicas 4-Substituídas. Resolução Cinética Enzimática da
(+/-)-1-(4-metil-3,4-diidropiridin-1(2H)-il)etanona Promovida pela
Lipase Candida Antarctica B (CAL-B) em Meio Aquoso – 2019.
152 f.: il., fig., tab.

Orientador: Jefferson Luiz Princival
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCEN. Química. Recife, 2019.
Inclui referências e apêndices.

1. Química Orgânica. 2. Enamida. 3. Imina. 4. Piperidina. I.
Princival, Jefferson Luiz (orientador). II. Título.

547 CDD (22. ed.) UFPE-FQ 2019-74

JENNY ESMERALDA PADILLA SORTO

***ESTUDOS DA PREPARAÇÃO QUIMIOENZIMÁTICA DE ENAMIDAS
PIPERIDÍNICAS 4-SUBSTITUÍDAS. RESOLUÇÃO CINÉTICA
ENZIMÁTICA DA (+/-)-1-(4-METIL-3,4-DIHIDROPIRIDIN-1(2H)-
IL)ETANONA PROMOVIDA PELA LIPASE CANDIDA ANTARCTICA
(CAL-B) EM MEIO AQUOSO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em: 28/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Jefferson Luiz Princival (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Química Fundamental

Prof. Jorge Luiz Neves

Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Química Fundamental

Prof. Rafael Soldi

Faculdade Osman Lins

*Dedico este trabalho aos meus
pais: Manuel Antonio Padilla
Guerra e Iris Esmeralda Sorto.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me conceder saúde e ser meu apoio durante a minha vida inteira.

Aos meus pais, que até hoje são meu suporte em todos aspectos. Obrigada por ter formado a pessoa que eu sou e por ter me ensinado com o seu exemplo o trabalho árduo e o respeito a Deus e ao próximo. Obrigada também por ter me influenciado e apoiado em minha decisão de me dedicar ao desenvolvimento da ciência.

Às minhas irmãs: Maria Elena, Andrea e Ingrid, por serem as minhas melhores amigas nesse mundo e ter me ajudado com bons conselhos para me adaptar a uma nova cultura.

A todos os meus amigos, familiares de Honduras e à Mario Rivera, que de alguma maneira me forneceram seu apoio sincero e me ajudaram a empreender uma nova etapa na minha vida.

Ao Professor Jefferson por ser um orientador amigo e por depositar sua confiança em mim desde o primeiro dia. Você não faz ideia como isso me ajudou a desenvolver esse trabalho! A todos os colegas do nosso grupo LCO (Laboratório de Catálise Orgânica): Jeisyane, que foi meu suporte no início desta jornada, no aspecto acadêmico e pessoal. À Emmanuel pela sua disposição sempre para me ajudar e pelos seus conselhos. À Dartagnan por sua ajuda e companheirismo, aos colegas Stephanie, Alana, Thiago que também me ajudaram muito no meu aprendizado na área de síntese orgânica. A todos, meu mais grande obrigada e por essas horas de café, almoços ou cerveja tão agradáveis!

Ao Departamento de Química Fundamental (DQF – UFPE) pela oportunidade de desenvolver este trabalho e a todos os seus funcionários, especialmente ao senhor Ademias e Celso, que sempre tiveram uma boa disposição para me ajudar no que eu precisasse.

Aos colegas e amigos, que me auxiliaram em diversas ocasiões com reagentes, equipamentos, conselhos ou mais, especialmente à Arturo Gamonal, Cláudia Laís, Ivonne Valenzuela, Stefferson da Silva, Rogério, Jonh Anderson, Edson, Andrey, Yeny Pilco, Indira, Heliana. Aos alunos do Professor Marcelo Navarro, especialmente a Sergio e Jadielson. Aos

alunos da professora Ana Paula e Claudette, especialmente à Fernando, Felipe e Mário.

À Patrícia Santa Rosa pela sua excelente atenção sempre e disposição para ajudar aos estudantes.

À Júlio Cesar Aguiar e Kildare, pelo seu auxílio cada vez que eu precisei da sua ajuda.

Aos professores do DQF que contribuíram para enriquecer meu conhecimento na química.

A todos os membros da Central Analítica, especialmente à Ihasmyn Nunes, Eliete de Barros e Pablo Rodrigues, pois eles foram uma peça chave no desenvolvimento desse trabalho.

Ao programa PAEC-OEA-GCUB e à PROPESQ, pelo apoio financeiro e a bolsa concedida. Meu agradecimento especial à Paulo de Tarso pelas suas gestões acertadas e boas atenções.

A todos que de alguma forma contribuíram com o andamento deste trabalho,

Muito obrigada!

“L`univers est dissymétrique”

- Louis Pasteur, ca. 1860¹

RESUMO

Estudos visando o desenvolvimento de uma abordagem quimioenzimática para a preparação de enamidas piperidínicas 4-substituídas opticamente ativas foram realizados. Para isso, um estudo inédito da utilização de lipases para a hidrólise enantiosseletiva desta classe de compostos foi efetuado. A etapa chave da metodologia consistiu na Resolução Cinética Enzimática (RCE) da 1-(4-metil-3,4-diidropiridin-1(2H)-il) etanona, substrato empregado como modelo, em ensaios nos quais cinco tipos diferentes de lipases foram testadas na tentativa de que reações de hidrólise enantiosseletiva fossem observadas. Os estudos incluem a triagem experimental de várias condições da reação de resolução. Com isto, pretendeu-se criar uma plataforma robusta e eficiente que permitisse a obtenção de enamidas piperidínicas 4-substituídas com um alto excesso enantiomérico. Dessa forma, atingiu-se uma resolução satisfatória do substrato modelo em meio aquoso e também em hexano sob a ação da CAL-B. Diante dos resultados obtidos com o substrato padrão, tornou-se interessante a tentativa de se preparar análogos estruturais mais funcionalizados. Dessa forma, oito cloraminas heterocíclicas, que são precursores de enamidas, foram preparadas usando água sanitária em sistema bifásico. Somado a isso, outros estudos visando à funcionalização da 1-(3,4-diidropiridin-1(2H)-il) etanona foram realizados. Deles, esforços foram envidados na preparação de alguns exemplos de estruturas piperidínicas halogenadas. Um exemplo foi o composto 1-(5-bromo-3,4-diidropiridin-1(2H)-il)etanona, preparado em apenas duas etapas reacionais.

Palavras-chave: Enamida. Imina. Piperidina. Lipase. Quiral. Resolução.

ABSTRACT

Studies towards the development of a new chemoenzymatic approach for the preparation of optically active 4-substituted piperidine enamides were conducted. In order to achieve that, a novel study using lipases for enantioselective hydrolysis of this kind of compounds was made. The key step of the methodology relied on the Enzymatic Kinetic Resolution (EKR) of the racemic 1-(4-methyl-3,4-dihydropyridin-1(2H)-yl)ethanone (**4b**), used as a model substrate in assays where different kind of lipases were tested aiming to find the best one for promoting an enantioselective hydrolysis. The studies comprised the experimental screening of several resolution reaction conditions. As a result of these investigations, we pretended to devise a solid and efficient platform that provides us with piperidine 4-substituted enamides with high enantiomeric excess. In this context, a good resolution of the model substrate in aqueous media and in hexane was achieved, under the catalytic action of CAL-B. The outcome from the studies described previously, turned our attention towards the preparation of more functionalized structural analogs. Thereupon, eight heterocyclic chloramines, which are enamide precursors, were prepared using bleach within a biphasic system. In addition, other studies aiming at the functionalization of 1-(3,4-dihydropyridin-1(2H)-yl)ethanone (**4a**), were carried out. From them, efforts were made to synthesize some examples of halogenated piperidine structures. one of these was the compound 1-(5-bromo-3,4-dihydropyridin-1(2H)-yl) ethanone (**5a**), obtained after only two reaction steps.

Keywords: Enamide. Imine. Piperidine. Lipase. Chiral. Resolution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 —	Comparação das estabilidades de enolatos e equivalentes de enolatos.....	22
Figura 2 —	Estrutura geral de alguns derivados insaturados das aminas e amidas.....	23
Figura 3 —	Formas ressonantes de uma enamina.....	23
Figura 4 —	Posições reativas das enaminas e derivados (enamidas e enecarbamatos).....	24
Figura 5 —	Alguns medicamentos comerciais, derivados da piperidina.....	25
Figura 6 —	Produtos bioativos (naturais e sintéticos) derivados de piperidinas funcionalizadas com centros estereogênicos definidos no anel.....	27
Figura 7 —	Estrutura do ADEP4.	28
Figura 8 —	Estruturas da (+)-Anabasina e (+)-Coniína.	35
Figura 9 —	Curva de saturação de uma reação enzimática, para um substrato.	44
Figura 10 —	Definição matemática de excesso enantiomérico (e.e.) ⁸⁶	45
Figura 11 —	Expressão matemática da rotação específica.	46
Figura 12 —	Estrutura da CAL-B e informações gerais (código PDB : 1TCA).....	47
Figura 13 —	Tríada catalítica da CAL-B.	47
Figura 14 —	Representação molecular de superfície da cavidade do sítio ativo da CAL-B.	48
Figura 15 —	Enamidas preparadas e caracterizadas neste trabalho.	51
Figura 16 —	Espectro de RMN ¹ H para 4a, e ampliação dos sinais. CDCl ₃ , 300 MHz.	53
Figura 17 —	Determinação da proporção das concentrações dos rotâmeros para 4a e 4b.	55
Figura 18 —	Espectro de ¹³ C RMN para 4a. CDCl ₃ , 75 MHz.....	56
Figura 19 —	Espectro de RMN ¹ H para 4b, e ampliação dos sinais. CDCl ₃ , 300 MHz.	58
Figura 20 —	Espectro de RMN ¹³ C para 4b. CDCl ₃ , 75 MHz.....	59
Figura 21 —	Cromatograma de GC-MS para o produto reacional, 4c..	60
Figura 22 —	Espectro de GC-MS para o produto 4c.	61
Figura 23 —	Alguns fragmentos esperados do composto 4c, e suas respectivas massas.....	61
Figura 24 —	Provável estrutura para o subproduto da reação de formação da enamida 4a.	63
Figura 25 —	Comparação dos tempos de retenção (por GC-FID) da enamida 4a e seu subproduto isolado, com provável estrutura de 5a.....	63
Figura 26 —	Ensaio de quimiosseletividade para a CAL-B respeito à enamida 4b..	68
Figura 27 —	Dependência do e.e. com a concentração de 4b.	73

Figura 28 —	Excesso enantiomérico de 4b versus a razão substrato/enzima (4b/CALB) em massa.	74
Figura 29 —	Dependência da seletividade da reação de hidrólise de 4b mediada pela enzima CAL-B, com a temperatura de reação, após 4 dias de resolução.	75
Figura 30 —	Determinação do excesso enantiomérico (ee = 88.54%) do substrato 4b depois de 4 dias de resolução cinética enzimática, nas condições otimizadas.....	79
Figura 31 —	Cromatogramas de GC-FID para os testes de RCE de 4b com diferentes lipases, nas condições otimizadas.	79
Figura 32 —	Acompanhamento da resolução via GC-FID	80
Figura 33 —	Deteção do produto de resolução.....	81
Figura 34 —	Monitoramento da imina nas condições otimizadas de resolução, sem e com enzima..	82
Figura 35 —	Para a tabela 6	85
Figura 36 —	Para a tabela 8. Acompanhamento da reação para a formação do produto 7a.	89
Figura 37 —	Observação do produto 7a para quatro das reações da Tabela 8.....	90
Figura 38 —	Acompanhamento da reação para a formação do composto 7b (esperado)	91
Figura 39 —	Testes de bromação do cicloexeno da tabela 9.....	93
Figura 40 —	Espectro de GC-MS para o composto 7a.	96
Figura 41 —	Espectro de GC-MS para o composto 8a..	96

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 —	Tautomerismo imina-enamina.	24
Esquema 2 —	Hidrogenação catalítica de piperidinas de Daeniker e Grob.	30
Esquema 3 —	Síntese de Comins para (+/-)-Indolizidina 209B mostrando a preparação de uma diidropiperidona a partir de um anel piridínico.	30
Esquema 4 —	Duas estratégias comuns para a preparação de piperidinas mediante ciclização por substituição nucleofílica intramolecular.	31
Esquema 5 —	Síntese de piperidinas através de ciclização assistida por $TiCl_4$	31
Esquema 6 —	Síntese de tetraidropiridinas via ciclização de íon imínio de Taddei et al.	32
Esquema 7 —	Ciclização intramolecular de Mannich de N-sulfinil β -amino cetonas para a síntese assimétrica de piperidonas funcionalizadas.	33
Esquema 8 —	Síntese de tetraidropiridinas de Shi et al., mediante uma reação de Aza-Diels-Alder.	34
Esquema 9 —	Síntese de um derivado do ácido pipecólico através de Aza-Diels-Alder, por Maison e Adiuidjaja.	35
Esquema 10 —	Síntese de (+/-)-Sedridina de Yamamoto.	36
Esquema 11 —	Abordagem de Diels-Alder de Fowler e Grierson para a preparação de piperidinas.	36
Esquema 12 —	Síntese de (+/-)-Anabasina de Scully e Davis.....	37
Esquema 13 —	Síntese de Cossy e Belotti de um derivado do ácido pipecólico utilizado para a preparação de Argatroban®.....	37
Esquema 14 —	Oxidação alílica de enamidas catalisada por TBHP e $Rh_2(cap)_4$ de Doyle et. al....	38
Esquema 15 —	Oxidação alílica de enecarbamatos por Occhiato et al.	39
Esquema 16 —	Hidroxilação benzílica promovida por <i>Rhodococcus equi</i> ZMU-LK19 de Chen et al.	39
Esquema 17 —	RCE de aminas primárias mediada por CAL-B, de Guerrero et al.	42
Esquema 18 —	RCE de (+/-)-metil piperidina-2 carboxilato promovida por CAL-A de Liljeblad.	42
Esquema 19 —	RCE da metil indolina 2-carboxilato de Gotor et. al.	42
Esquema 20 —	Acetilação enantiosseletiva de 4-hidroxi-5,6-diidropiridina-1,2(4H)-dicarboxilato de Occhiato et al.	43

Esquema 21 —	Processo de diferenciação enantiomérica na RCE.	45
Esquema 22 —	Mecanismo catalítico da CAL-B, mostrando um éster genérico como substrato.	49
Esquema 23 —	Metodologia utilizada para a síntese das enamidas 4a-4c.	52
Esquema 24 —	Imina 3a em equilíbrio com seu trímero 3ai e subsequente isomerização do trímero para a sua forma mais estável, 3aii. ⁹⁶	64
Esquema 25 —	Resolução cinética enzimática de (+/-)-4b promovida por CAL-B.	68
Esquema 26 —	Mecanismo catalítico proposto para a reação de hidrólise enzimática da enamida 4b mediada pela CAL-B.	83
Esquema 27—	Síntese do brometo vinílico 1-(5-bromo-4-metil-3,4-diidropiridin-1(2H)-il) etanona(estrutura não confirmada).....	91
Esquema 28 —	Hidrólise básica do brometo alílico 9c	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1—	Preparação e identificação de algumas N-cloraminas cíclicas	65
Tabela 2 —	Otimização de condições da resolução cinética enzimática de 4b mediada por CAL-B: estudo da influência do solvente, pH, tempo de resolução e proporção de enzima/substrato no excesso enantiomérico do substrato.....	70
Tabela 3 —	Estimação da dependência do excesso enantiomérico de 4b respeito às quantidades de substrato e enzima após 4 dias de resolução enzimática mediada por CAL-B em Pi 8 e em diferentes temperaturas.	72
Tabela 4 —	Escalas utilizadas nos testes para a triagem de temperaturas.	75
Tabela 5 —	Comparação da ação da CAL-B com outras lipases nas melhores condições encontradas para a reação, após 1 e 4 dias de resolução.	77
Tabela 6 —	Testes de acetilação para 3b, com CAL-B, nas condições otimizadas com 4b	84
Tabela 7 —	Testes de oxidação para gerar enaminonas e enaminóis piperidínicos a partir de 4b	87
Tabela 8 —	Testes de bromação para 4a	88
Tabela 9 —	Testes de bromação com NBS para cicloexeno	92
Tabela 10 —	Testes de hidroxilação de 7a	94

LISTA DE ABREVIATURAS

[α]D	Rotação específica
AIBN	Azobisisobutironitrila
CAL-A	<i>Candida antarctica</i> Lipase A
CAL-B	<i>Candida antarctica</i> lipase-B
CCD	Cromatografia em camada delgada
<i>d</i>	Dupleto
DCM	Diclorometano
<i>dd</i>	Duplo dupleto
<i>ddt</i>	Duplo duplo tripleto
<i>e.e.</i>	Excesso enantiomérico
GC-FID	Comatografia Gasosa com Detector de Ionização de Flama (do inglês: <i>Gas Chromatography with Flame Ionization Detection</i>)
GC-MS	Cromatografia Gasosa com Detector de Espectrometria de Massas (do inglês: <i>Gas Chromatography with Mass Spectrometry Detection</i>)
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multipleto
mL	mililitros
NBS	N-bromosuccinimida
PCC	Clorocromato de piridínio
Pi	Solução tampão de fosfato
ppm	Parte por milhão
<i>qt</i>	Quadrupleto
<i>quint.</i>	Quintupleto

RCE	Resolução cinética enzimática
R_f	Fator de retenção em cromatografia de capa fina (CCD)
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1
s	Simpleto
sext.	Sextupleto
t	Tripleto
TBHP	Tert-butil hidro peróxido
TBME	Tert butil metil éter
THF	Tetraidrofurano
δ	Deslocamento químico em ppm

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	<i>A QUÍMICA DAS ENAMIDAS E SEUS PRECURSORES NITROGENADOS INSATURADOS.....</i>	<i>21</i>
1.1.1	Enaminas	22
1.1.1.1	Acidez e basicidade das enaminas	24
1.2	<i>PIPERIDINAS: IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA E APLICAÇÃO</i>	<i>25</i>
1.2.1	Piperidinas funcionalizadas com estereoquímica definida	26
1.3	<i>SÍNTESE QUÍMICA DE PIPERIDINAS MONOCÍCLICAS SUBSTITUÍDAS .</i>	<i>28</i>
1.3.1	Redução de piridinas e derivados	29
1.3.1.1	Hidrogenação catalítica de piridinas	29
1.3.2	Formação do anel de piperidina via ciclização de haloaminas	30
1.3.2.1	Reações de ciclização por substituição nucleofílica intramolecular	30
1.3.2.2	Ciclizações do íon imínio	31
1.3.3	Reações de cicloadição	33
1.3.3.1	Reações de Imino-Diels-Alder (Aza-Diels-Alder)	33
1.3.3.2	Reações de Diels-Alder de Azadienos.....	35
1.4	<i>FUNCIONALIZAÇÃO DE PIPERIDINAS.....</i>	<i>36</i>
1.5	<i>RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA (RCE) DE COMPOSTOS NITROGENADOS E O USO DA CAL-B COMO BIOCATALISADOR.</i>	<i>40</i>
1.5.1	Considerações gerais das reações mediadas por enzimas, RCE e o papel da CAL-B como biocatalisador.	43
2	OBJETIVOS	50
2.1	OBJETIVO GERAL	50
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51

3.1	PREPARAÇÃO DAS ENAMIDAS RACÊMICAS	51
3.1.1	Identificação de um subproduto da reação de formação de 4a	61
3.2	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS IMINAS CÍCLICAS 2,3,4,5-TETRAHIDROPIRIDINA (3A) E 4-METIL-2,3,4,5-TETRAHIDROPIRIDINA (3B).	64
3.3	SÍNTESE E CARATERIZAÇÃO DE N-CLORAMINAS CÍCLICAS	65
3.4	RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA	67
3.4.1	Resolução cinética enzimática de (+/-)-1-(4-metil-3,4-diidropiridin-1(2H)-il)ethanona, 4b.	67
3.4.1.1	Estudo das concentrações	71
3.4.1.2	Triagem de temperaturas	74
3.4.1.3	Comparação da atividade de outras lipases com a CAL-B.....	77
3.4.1.4	Detecção do produto de resolução.....	80
3.4.2	Testes de resolução cinética enzimática para 4-metil-2,3,4,5-tetrahidropiridina (3b) sob as condições otimizadas com 4b.....	83
3.5	TESTES DE OXIDAÇÃO	86
3.5.1	Testes de bromação para 4a e 4b.....	87
3.5.1.1	Testes de bromação com cicloexeno para comparação	91
3.5.2	Teste de hidroxilação com cicloexeno	93
3.5.3	Testes de hidroxilação para o brometo vinílico 7a.....	94
4	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	97
5	PARTE EXPERIMENTAL	98
5.1	INFORMAÇÕES GERAIS	98
5.1.1	Purificação de reagentes e solventes.....	98
5.1.2	Informações técnicas.....	99
5.2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	101
5.2.1	Procedimento geral de síntese das iminas da piperidina (3a e 3b)	102
5.2.1.1	(3a): Tripiperideína ou tetradecaidro-1H-triprido[1,2-a:1',2'-c:1'',2''-e][1,3,5]triazina	103

5.2.1.2	(3b): 3,8,13-trimetiltetradecaidro-1H-tripirido[1,2-a:1',2'-c:1'',2''-e][1,3,5]triazina	103
5.2.2	Procedimento geral de síntese de enamidas da piperidina (4a-4b):	103
5.2.2.1	(4a): 1-(3,4-diidropiridin-1(2H)-il)etanona	104
5.2.2.2	(4b): 1-(4-metil-3,4-diidropyridin-1(2H)-il)etanona.....	104
5.2.3	Síntese de (4c): 1-acetil-1,2,3,4-tetraidropiridin-4-il acetato	105
5.2.4	Síntese das cloraminas da piperidina (2a-2h).....	106
5.2.5	Síntese dos brometos vinílicos (7a e 7b)	108
5.2.5.1	(7a): 1-(5-bromo-3,4-diidropiridin-1(2H)-il) etanona	108
5.2.5.2	(7b): 1-(5-bromo-4-metil-3,4-diidropiridin-1(2H)-il) etanona	108
5.2.6	Síntese de (8a): 1-(3-bromo-2-hiroxipiperidin-1-il) etanona.....	109
5.2.7	Síntese de (9a): cicloexeno	109
5.2.8	Síntese de (9b): 2-bromo cicloexeno	110
5.2.9	Síntese de (9a): 3-hidroxicicloexeno	110
	REFERÊNCIAS	112
	APÊNDICE A — CCD DOS COMPOSTOS 4a E 4b	124
	APÊNDICE B — IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS 3a e 3ai	125
	APÊNDICE C — ESPECTROS DE 3a E SEUS ISÔMEROS	126
	APÊNDICE D — IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E IMAGENS DO COMPOSTO 3b	127
	APÊNDICE E — ANÁLISES DAS CLORAMINAS 2a-2h (ESPECTROS DE GC-MS E GC- FID, E RMN).....	129
	APÊNDICE F — CROMATOGRAMA DE GC-FID PARA A FORMAÇÃO DO COMPOSTO 2h	136
	APÊNDICE G — IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO 7a	137
	APÊNDICE H — IDENTIFICAÇÃO DO CICLOEXENO, (9a).....	138

APÊNDICE I — ESPECTROS DO COMPOSTO 8a.....	139
APÊNDICE J— IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO 5a	141
APÊNDICE K — IMAGENS	142

1 INTRODUÇÃO

1.1 A QUÍMICA DAS ENAMIDAS E SEUS PRECURSORES NITROGENADOS INSATURADOS

As enamidas são os derivados mais estáveis das enaminas: uma classe de compostos orgânicos com grande utilidade sintética, e que tem sido explorada durante os últimos 64 anos.² Além do mais, pode se dizer que as enamidas possuem, em boa parte, caráter de enamina.³

O grupo funcional enamida – também denominado ene-amida ou N-vinilamida ⁴ - possui uma grande versatilidade sintética. Como exemplo, pode-se citar sua utilização como nucleófilo em reações estereosseletivas que levam à formação de novas ligações C-C e C-N.⁵ Além disso, esses compostos podem ser empregados como formas equivalentes de enolatos de silício, ou como substratos em reações de hidrogenação assimétricas catalisadas por metais de transição como o Rh(I).⁵ Esses, também podem sofrer reações pericíclicas ou fotoquímicas.

Como resultado, as enamidas oferecem múltiplas opções para controlar a introdução de funções nitrogenadas em sistemas complexos, assim como para a preparação alternativa de inúmeras moléculas. Sob as linhas anteriores, destaca-se que o recente interesse por estes compostos se deve à sua versatilidade, já que podem receber crédito por duas características que são capazes de fornecer de forma seleta: reatividade e estabilidade químicas.⁶

Apesar do conhecimento da sua reatividade desde 1884,⁷ foi Stork, do *The Rockefeller Institute for Chemical Research*, que em 1954 publicou pela primeira vez o uso das enaminas (vinilaminas) como intermediários eficazes em síntese orgânica; no caso em questão, para a alquilação e acilação de cetonas.³ Embora os éteres de enol-silício sejam nucleófilos mais estáveis que as enaminas, essas só tornaram-se a segunda classe mais utilizada de equivalentes a partir do surgimento dos equivalentes de enolato de silício no início da década de 1970.⁷ Atualmente, a química das enaminas continua a ser uma eficiente alternativa para muitas transformações de moléculas orgânicas no ramo da química sintética e medicinal.^{8,9}

A seguir (figura 1) está esquematizada a comparação da estabilidade das enaminas com outras espécies nucleofílicas similares.



Eteres enol-silício	Estabilidade superior
Enaminas	Condições neutras diminuem reações secundárias de auto-condensação
Enolatos	Geração fácil e rápida; regioseletividade previsível
Metaloenaminas (aza enolatos)*	Alta reatividade

*As bases conjugadas de iminas e hidrazonas são conhecidas como Aza enolatos. Quando ligadas a um metal, são chamadas de metaloenaminas (ligação N-Metal)

Figura 1 — Comparação das estabilidades de enolatos e equivalentes de enolatos*.

Para demonstrar as características e diferenças estruturais das enaminas e seus derivados, a seguir serão discutidas as estruturas destes grupos.

1.1.1 Enaminas

A função enamina abrange todos os compostos orgânicos que apresentam ligações $C=C-N$, incluindo a família das enamidas, enercarbamatos, pirróis, piridinas e anilinas e seus derivados. Todos esses compostos são considerados “ene-aminas”. No entanto, essa designação tem certas exceções, como no caso dos indóis e alguns pirróis, devido ao comportamento químico apreciavelmente diferente daquele das “enaminas”.¹⁰ Isso, provavelmente se deve à sua maior capacidade de ressonância devido ao grau de insaturação. É por isso que então o nome propriamente dito geralmente refere-se às amins α , β -insaturadas.¹¹

Na figura 2, estão representadas as estruturas gerais de enaminas e alguns derivados.

* Adaptado de ⁷

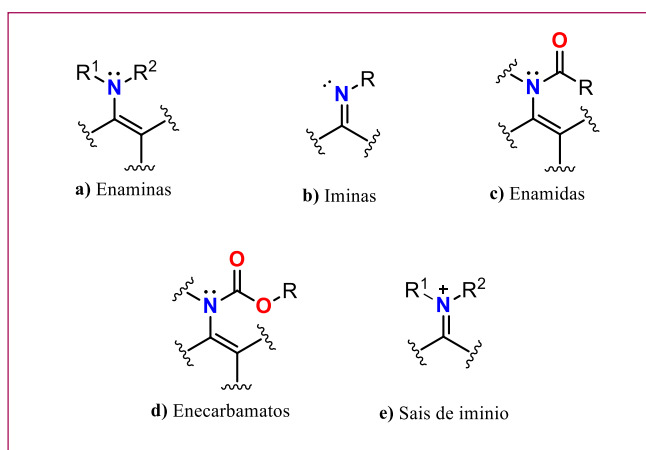


Figura 2 — Estrutura geral de alguns derivados insaturados das aminas e amidas.

Duas formas ressonantes podem representar estes compostos (figura 3). O par de elétrons livres do nitrogênio tem a capacidade de se conjugar com os elétrons π da dupla ligação na posição α , β , levando à formação de uma zona com maior densidade eletrônica na ligação dupla ($C=N$), consequência, confere-lhes uma alta capacidade nucleofílica também no carbono β .^{10,12} Por esse motivo as enaminas são conhecidas como os análogos nitrogenados dos enóis (aza-enóis).

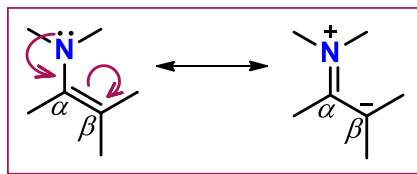


Figura 3 — Formas ressonantes de uma enamina.

Além disso, a versatilidade destas espécies insaturadas é notável ao observar que não apenas podem agir como nucleófilos mediante as duas regiões ricas em elétrons, mas também possuem centros eletrofílicos que permitem ampliar a gama de reações químicas onde participam (figura 4).

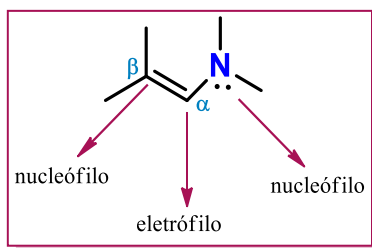
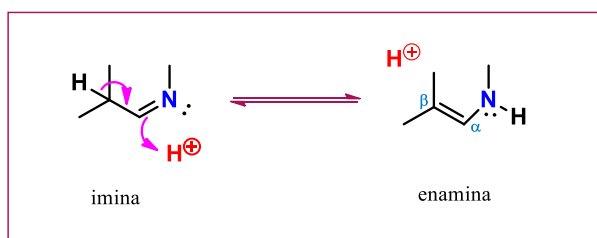


Figura 4 — Posições reativas das enaminas e derivados (enamidas e enecarbamatos)

As enaminas que tiverem quanto menos um H no N também apresentam tautomerismo através de troca de próton, levando a um equilíbrio com a imina correspondente. Esse tautomerismo é análogo aos observados nos compostos carbonílicos (esquema 1).



Esquema 1 — Tautomerismo imina-enamina.

1.1.1.1 Acidez e basicidade das enaminas

O movimento dos elétrons, mostrado na figura 3 permite-nos visualizar essas moléculas como alquenos ricos em elétrons, devido à presença de um grupo doador amino. Isso faz com que o seu caráter básico diminua, respeito às aminas. Desta forma, as enaminas são ligeiramente básicas, e se conhecem como bases de Schiff.

Entretanto, diferenças de basicidade importantes são observadas dentro desta família química, as quais dependem da variedade dos substituintes em sua estrutura principal.

As enaminas com um átomo de nitrogênio terciário são geralmente mais básicas que as aminas e enaminas primárias e secundárias. A presença de substituintes α -alquila incrementa a basicidade, enquanto que os substituintes β -alquila causam um decréscimo nela. Stamhuis et al. observaram que as enaminas da morfolina, piperidina e pirrolidina com isobutiraldeído, em solução aquosa, são 200-1000

vezes menos básicas do que as aminas secundárias de partida e 30-200 vezes menos básicas do que as aminas terciárias saturadas correspondentes.¹³

1.2 PIPERIDINAS: IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA E APLICAÇÃO

Embora a piperidina, por si só, não represente uma estrutura com valor farmacológico relevante, ela compõe a parte central de uma ampla variedade de moléculas biologicamente ativas. Exemplos são os alcaloides isolados de produtos naturais, e sintéticos. Os diferentes níveis de substituição no anel, assim como a estrutura e funcionalidades dos grupos em determinadas posições do heterocíclo, fornecem uma gama de estruturas com variadas aplicações. Como resultado, as piperidinas funcionalizadas são a base de muitos medicamentos comerciais utilizados na atualidade, verificando assim sua importância em química medicinal (figura 5).

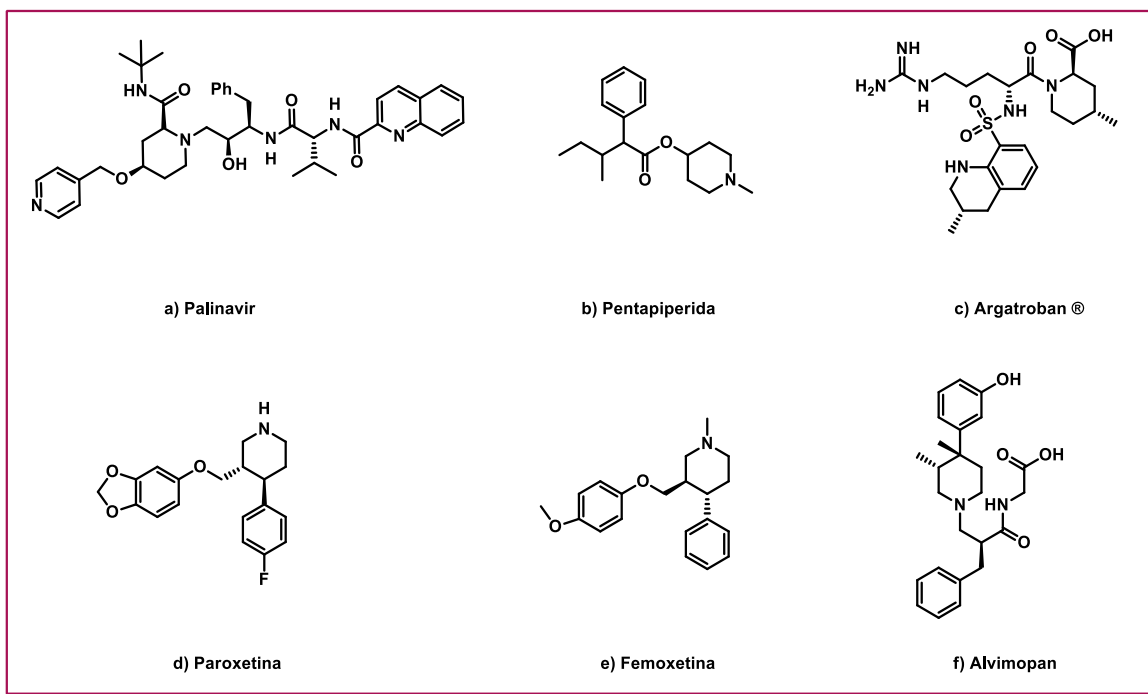


Figura 5 — Alguns medicamentos comerciais, derivados da piperidina.

Alguns exemplos desses medicamentos são de extrema importância, como o Palinavir, um potente inibidor do vírus do HIV.¹⁴ A pentapiperida é um anticolinérgico com atividade anti-secretora e anti-motil no trato intestinal superior para terapia adjunta no alívio dos sintomas da úlcera péptica.¹⁵ O

Argatroban é empregado como anticoagulante pela sua função como inibidor seletivo da trombina, uma enzima chave no processo de coagulação sanguínea.¹⁶ A Paroxetina, pertencente à uma classe de medicamentos chamados de inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), é utilizada como agente antidepressivo, entre outras aplicações farmacológicas.¹⁵ O Alvimopan (Entereg) é um analgésico que funciona como antagonista periférico e seletivo do receptor μ -opioide y não exerce atividade no sistema nervoso central.¹⁵

As aplicações das estruturas derivadas da piperidina são amplamente conhecidas na literatura. Taylor e colaboradores identificaram em 2014 o anel da piperidina como a terceira unidade estrutural mais frequentemente encontrada em drogas pequenas (lista do *FDA Orange Book*), em um estudo analítico-estatístico desenvolvido com a finalidade de aprofundar na compreensão dos sistemas de anéis presentes em fármacos.¹⁷

Vardanyan, em seu livro *Piperidine-based drug Discovery*, identificou as diferentes classes de fármacos que contêm a estrutura, segundo a frequência da sua aparição nelas. Nele, o autor menciona várias aplicações destas moléculas segundo a sua ação terapêutica, em forma decrescente de ocorrência: analgésicos, antipsicóticos, antihistaminicos, drogas anticolinérgicas, anestésicos locais, antitrombóticos, antiarrítmicos, drogas antihipertensivas, drogas para tratar doenças respiratórias, antidepressivos, drogas antiparkinson, antihiperlipidêmicos, hipolipidêmicos, adrenérgicos, estimulantes do sistema nervoso central, moduladores dos receptores seletivos do estrógeno, drogas antialgínicas, drogas para tratar infecções protozoárias, drogas antimigraña, drogas nootrópicas e neuroprotetoras, antieméticos, drogas antidiarreia e prokinéticas, drogas para o controle de segregação de fluxos gástricos, medicamentos para o controle da hipoglicemia, drogas usadas no tratamento da artrite reumatoide, drogas colinomiméticas nicotínicas e imunossupressores.¹⁵

Em adição, estudos recentes têm mostrado evidências da atividade anticâncer de várias estruturas piperidínicas.^{18,19}

1.2.1 Piperidinas funcionalizadas com estereoquímica definida

Muitos produtos naturais e sintéticos que exibem atividade biológica apresentam em sua estrutura unidades de piperidina funcionalizadas com centros estereogênicos definidos (figura 6). Outros exemplos desse tipo de estruturas foram mostrados na figura 5.

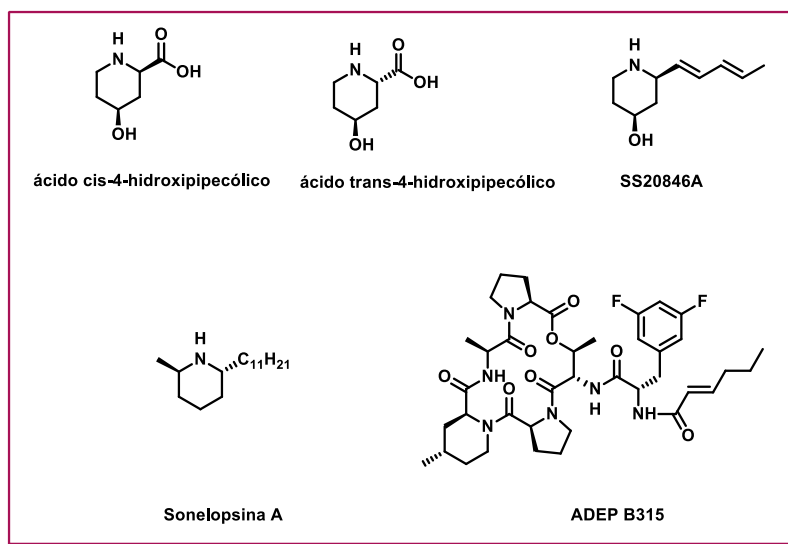


Figura 6 — Produtos bioativos (naturais e sintéticos) derivados de piperidinas funcionalizadas com centros estereogênicos definidos no anel.

Os ácidos *cis* e *trans* 4-hidroxipecólicos (figura 6) são compostos de ocorrência natural nas plantas da espécie *Acacia*.²⁰ O alcaloide SS20846a e análogos têm sido isolados de *Streptomyces luteogriseus*. Esse alcaloide já foi isolado também de *Streptomyces sp.* S20846, e se encontrou que têm a capacidade de inibir a mobilidade intestinal em ratos.²¹ A Solenopsina A exibe atividade hemolítica, inseticida e antibiótica.²²

Além disso, recentemente está se dirigindo à atenção para acildepsipeptídeos cíclicos (ADEPs). Estes são uma nova classe de agentes antibacterianos, alguns dos quais, como exemplo ADEP4 (figura 7), têm mostrado ser altamente ativos contra bactérias Gram-positivas. Isso têm levado a fazer modificações na estrutura desses ADEPs com a finalidade de melhorar a sua eficiência. Assim, ADEP B315 (figura 6) é um produto sintético que mostrou possuir a atividade *in vitro* mais potente recentemente reportada.²³

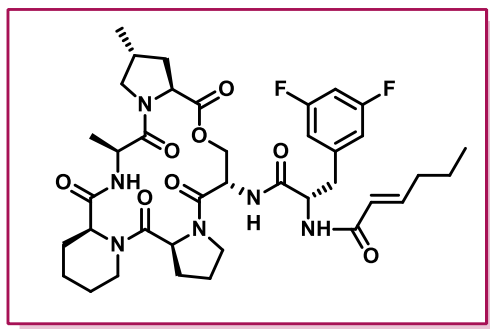


Figura 7 — Estrutura do ADEP4.

Diante do exposto, se torna desejável, e em alguns casos necessário, o desenvolvimento de metodologias estereosseletivas ou outros procedimentos que permitam a obtenção de moléculas possuindo estereocentros definidos. Isto se deve ao fato que na maioria dos casos, a atividade biológica referente a cada componente de pares de enantiômeros e/ou diastereoisômeros acaba apresentando diferenças importantes. As diferentes alternativas para preparar centros quirais definidos incluem a) uso de matérias de partida quirais (*the quiral pool strategy*) extraídos de fontes naturais como aminoácidos ou açúcares; b) síntese assimétrica (síntese diastereosseletiva) que se apoia no favorecimento energético da formação preferencial de um dos diastereoisômeros; c) uso de auxiliares quirais que se ligam ao material de partida provocando uma reação diastereosseletiva, e subsequente remoção; d) emprego de reagentes e catalisadores quirais; e) resolução, particularmente RCE (resolução cinética enzimática). Essas são apenas algumas estratégias disponíveis que têm sido utilizadas na síntese assimétrica de moléculas quirais. Entretanto, devido às vantagens fornecidas pela técnica da resolução cinética enzimática, a qual é discutida mais detalhadamente na seção 1.5, resulta interessante fazer uma revisão da literatura sobre alguns dos métodos mais comuns para a preparação de piperidinas e derivados relevantes para este trabalho, mesmo tratando-se de abordagens não assimétricas.

1.3 SÍNTESE QUÍMICA DE PIPERIDINAS MONOCÍCLICAS SUBSTITUÍDAS

A notável atividade biológica que os alcaloides e muitos derivados da piperidina possuem tem motivado os químicos sintéticos a dedicar esforços que permitam a sua preparação no laboratório. Atualmente, existe uma grande variedade de métodos para preparar intermediários piperidínicos monocíclicos substituídos. Além da sua capacidade de participar nas rotas metabólicas das células dos organismos vivos, muitos deles são utilizados como blocos de construção e/ou intermediários sintéticos

para a preparação de fármacos e produtos naturais de estrutura mais complexa. Para fins específicos deste trabalho, as metodologias apresentadas serão classificadas em três grupos principais: a) redução de piridinas e derivados, b) formação do anel piperidínico, c) funcionalização do anel piperidínico. Nesta seção serão abordados os primeiros dois pontos, e na seguinte, serão discutidas diferentes formas conhecidas para a obtenção de piperidinas funcionalizadas.

Das sínteses até agora reportadas por diversos pesquisadores, particularmente, a síntese assimétrica de piperidinas funcionalizadas é um dos focos principais da química dos heterocíclicos nitrogenados.

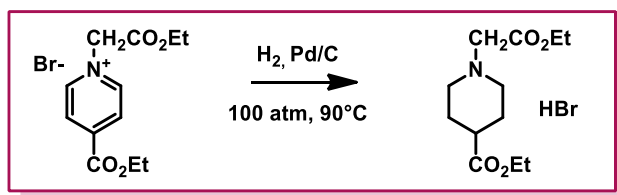
As reações de cicloadição se incluem provavelmente dentro das estratégias mais utilizadas para preparar piperidinas. Dentro delas, destacam-se as reações de Hetero-Diels-Alder. No entanto, a síntese de piperidinas pode ser conduzida aplicando outros métodos como redução de piridinas, reações de fechamento de anel via ataque nucleofílico intramolecular; ciclizações: as mediadas pela formação *in situ* de um íon imínio como a ciclização intramolecular de Mannich, as catalisadas por metais pesados como Hg, as resultantes das reações entre aminas e bistosilatos, acetatos ou mesilatos (ou entre aminas com álcoois); a abertura de epóxidos e subsequente ciclização para a formação de 3-hidroxi-piperidinas, reações de oximercuriação, reações de expansão do anel de pirrolidina e rearranjos radiculares intramoleculares. As abordagens eletroquímicas não serão discutidas aqui.

1.3.1 Redução de piridinas e derivados

1.3.1.1 Hidrogenação catalítica de piridinas

Diferentes catalisadores metálicos como Ni (170-200 °C),²⁴ Pd/C, PtO₂ ou Rh/C podem ser utilizados para reduzir piridinas às piperidinas correspondentes. Inclusive misturas de catalisadores metálicos têm sido testadas, gerando bons resultados quanto à diastereosseletividade da reação.²⁵ Outros agentes redutores utilizados incluem sódio em etanol ou estanho em ácido clorídrico.²⁴ Quando são utilizadas piridinas substituídas, geralmente é obtida uma mistura de diastereoisômeros, dependendo das condições.

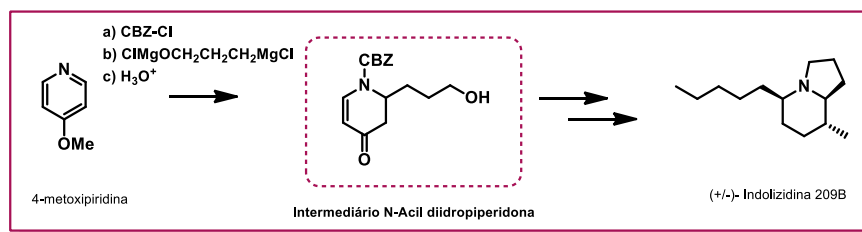
Daeniker e Grob (1964) utilizaram uma metodologia de síntese para a formação de 3-Quinuclidona HCl, cujo segundo passo consiste na conversão do sal N-alquilpiridínio para uma N-alquimpiperidina como resultado da hidrogenação catalítica do reagente com Pd/C²⁶ (esquema 2).



Esquema 2 — Hidrogenação catalítica de piperidinas de Daeniker e Grob.

Outras reduções de piridinas são empregadas. Comins e colaboradores têm trabalhado com a adição nucleofílica seletiva de piridinas 4-substituídas para a síntese de alcaloides derivados da piperidina como a (+/-)-Septicina e a (+/-)-Lucidulina.²²

Em 1991, Comins e Zeller reportaram a síntese total da (+/-)-Indolizidina 209B, um alcaloide secretado pela pele da rã venenosa neotropical pertencente à família Dendrobatidae (em inglês: *poison-dart frog*). A síntese consiste em 7 passos partindo da 4-metoxipiridina via o intermediário N-acil diidropiridona²⁷ (esquema 3).



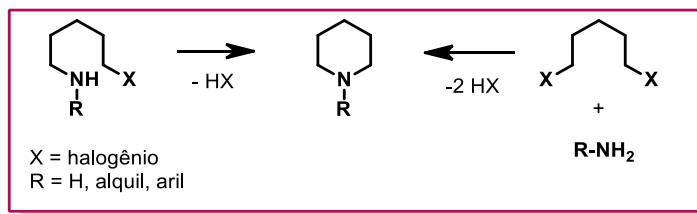
Esquema 3 — Síntese de Comins para (+/-)-Indolizidina 209B mostrando a preparação de uma diidropiridona a partir de um anel piridínico.

1.3.2 Formação do anel de piperidina via ciclização de haloaminas

1.3.2.1 Reações de ciclização por substituição nucleofílica intramolecular

Muitas piperidinas podem ser preparadas através de reações de substituição nucleofílica intramolecular, gerando assim anéis a partir de moléculas de cadeia aberta. 1-amino-5-haloalcanos e 1,5-dihaloalcanos são materiais de partida comuns neste tipo de estratégia. O uso de uma base forte é necessário para a formação do anel (esquema 4).^{28, 29}

1,5-Dicloropentanos podem ser ciclizados à piperidinas mediante o tratamento com aminas primárias. 1,5-diaminopentanos, compostos delta-amino carbonílicos e 5-aminoalcanóis são também fontes de piperidinas.²⁴



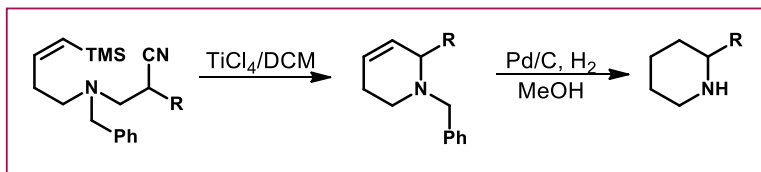
Esquema 4 — Duas estratégias comuns para a preparação de piperidinas mediante ciclização por substituição nucleofílica intramolecular.

Bases como hidreto de sódio e *t*-BuOK têm sido utilizadas para esse tipo de transformações. Uma das principais dificuldades deste tipo de reações é a escolha da concentração dos reagentes devido a que existe competição entre a SN intra e intermolecular. Baixas concentrações favorecem a reação intramolecular, mas se a mistura reacional estiver muito diluída, a reação poderia ser muito lenta e existe sempre possibilidade de polimerização devido à interação de duas moléculas de reagente.²⁵

1.3.2.2 Ciclizações do íon imínio

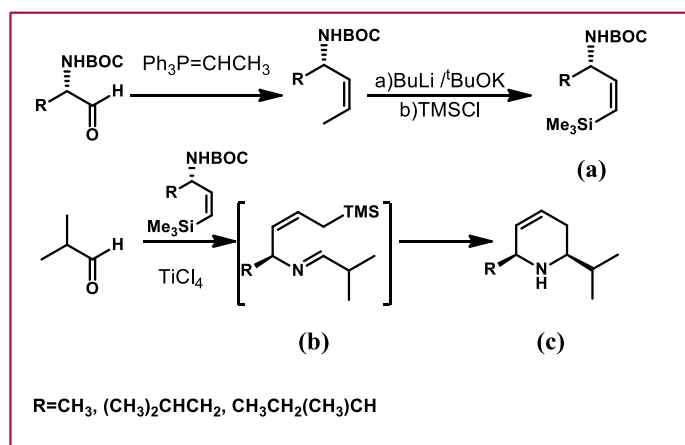
A adição nucleofílica à íons imínio e acil-imínio é um dos métodos mais utilizados para a preparação de piperidinas.²²

A ciclização de íons imínio que contém a função vinil silanos em sua estrutura foi reportada inicialmente por Overman et al (1983),³⁰ onde as condições foram induzidas mediante a catálise empregando ácidos de Lewis como o TiCl_4 . A adição reversa da alfa-aminonitrila ao TiCl_4 em DCM é chave para garantir uma ciclização adequada (esquema 5).



Esquema 5 — Síntese de piperidinas através de ciclização assistida por TiCl_4

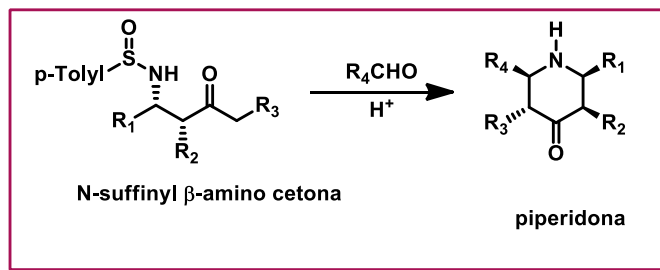
Taddei e colaboradores reportaram a síntese de 2-iso-propilpiperidinas a partir de aminoaldeídos através da ciclização do íon imínio alil silano. A formação do íon imínio foi promovida pelo tratamento de (a) (esquema 6) com TiCl_4 e 2-metilpropanal, o que permitiu a remoção do grupo protetor t-butiloxicarbonila. A condensação da amina (a) com o aldeído levou à formação do íon imínio (b), cuja ciclização promovida pelo grupo alilsilano gerou a tetraidropiperidina (c) na forma de apenas um diastereoissômero. A estereosseletividade é provavelmente regida pela preferência da conformação equatorial no estado de transição.²²



Esquema 6 — Síntese de tetraidropiridinas via ciclização de íon imínio de Taddei et al.

De maneira similar, Yang e seu grupo reportaram em 1994 a ciclização estereosseletiva de alfa-cianoaminas vinílicas induzida por TiCl_4 em DCM para produzir cis e trans 2,6-dialquilpiperidinas.³¹

1.3.2.2.1 Ciclização de Mannich Intramolecular



Esquema 7 — Ciclização intramolecular de Mannich de N-sulfinil β -amino cetonas para a síntese assimétrica de piperidonas funcionalizadas.

A reação de ciclização intramolecular de Mannich catalisada por ácidos entre uma *N*-sulfinil β -amino cetona e um aldeído, é também um método importante para a síntese assimétrica de piperidinas substituídas.³²

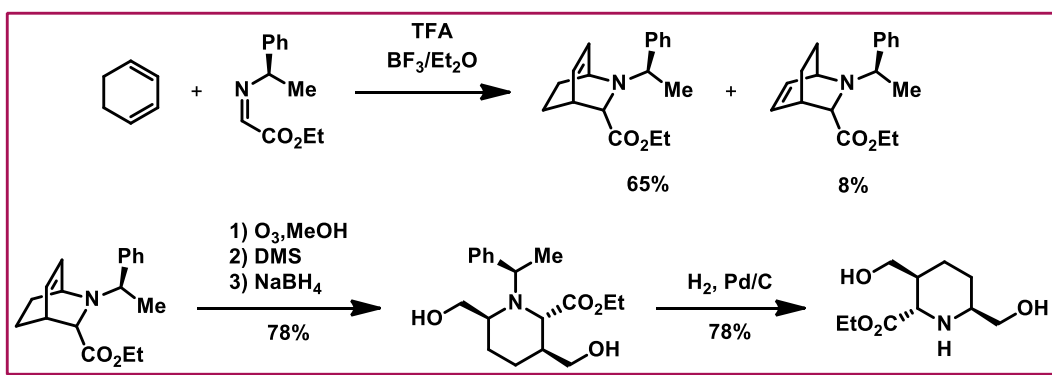
Os ésteres beta-ceto *N*-sulfinil delta-amino são blocos de construção quirais polifuncionalizados que têm sido utilizados para a síntese assimétrica de piperidinas substituídas. Esses já foram utilizados, com alta eficiência, nas sínteses dos quatro estereoisômeros do ácido 4-hidroxi pipecólico, a (*R*)-(+)-2-fenil piperidina, (-)-SS20846A e o alcaloide da quinolizidina lasubina II.³³

1.3.3 Reações de cicloadição

Uma das vantagens dessa abordagem é a alta estereoespecificidade das reações de cicloadição. As cicloadições como as 1,3-dipolares ou as reações de Hetero-Diels-Alder são exemplos de estratégias para a construção do anel piperidínico. Dentre elas, a reação de Diels-Alder é uma das mais importantes para a formação de anéis de seis membros. Assim, na síntese de piperidinas, as metodologias que têm base em reações de Aza-Diels-Alder são alvos de atenção.

1.3.3.1 Reações de Imino-Diels-Alder (Aza-Diels-Alder)

As reações de cicloadição do tipo [4+2] ou reações de Aza-Diels-Alder. Essas são reações de Diels-Alder especiais porque uma das espécies reativas (dieno ou dienófilo) possui um átomo de nitrogênio como parte da estrutura. As reações de Aza-Diels-Alder inter e intra moleculares envolvem



Esquema 9 — Síntese de um derivado do ácido pipecólico através de Aza-Diels-Alder, por Maison e Adiuidjaja.

Muitos outros produtos naturais têm sido obtidos utilizando reações de Aza-Diels-Alder. As sínteses totais de R -(+)-Anabasina³⁷, S -(+)-coniina³⁸, foram conduzidas por Kobayashi e colaboradores através de reações altamente enantiosseletivas (figura 8).

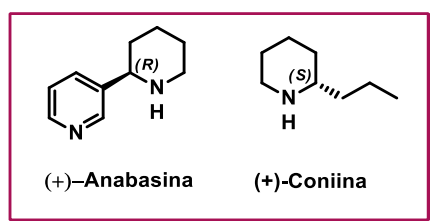
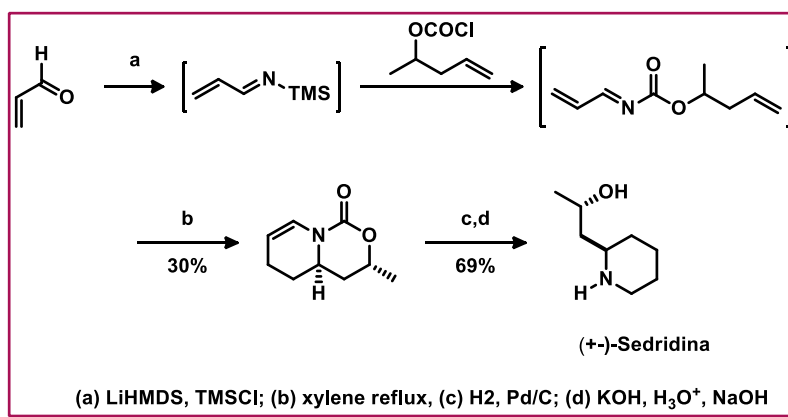


Figura 8 — Estruturas da (+)-Anabasina e (+)-Coniína.

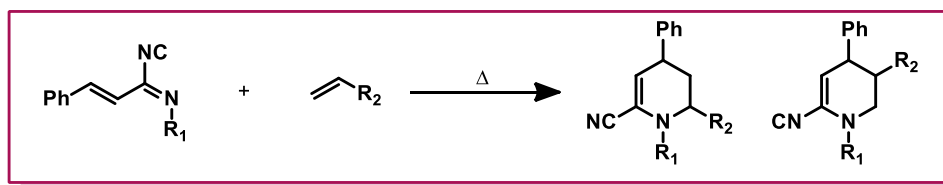
1.3.3.2 Reações de Diels-Alder de Azadienos

As reações de Diels-Alder intramoleculares de N -acil derivados de 1-aza-1,3-butadieno são base de um método comumente utilizado para a preparação de heterocíclis contendo nitrogênio. Yamamoto e Uyeara reportaram em 1991 a síntese total do alcaloide da piperidina (+/-)-Sedridina como resultado de uma reação de Diels-Alder intramolecular de N -alcoxycarbonil-1-aza-1,3-butadienos (esquema 10).³⁹



Esquema 10 — Síntese de (+/-)-Sedridina de Yamamoto.

Porém, essas reações vêm sendo utilizadas com pouca frequência, pois os azadienos sofrem de baixa conversão, adição competitiva de imina e tautomerização. No entanto, a reação pode ser facilitada com um grupo retirador de elétrons no nitrogênio do azadieno, como *N*-SO₂C₆H₅ ou *N*-P(O)(C₆H₅)₂. O produto endo é altamente favorecido (>95%) tanto na reação térmica quanto na reação promovida por pressão, a que é mais comum. Este tipo de reação é importante para a síntese de piperidinas 2,3,4-trissubstituídas.²⁵ Em 1993, Fowler e Grierson publicaram um estudo da reação para 2-ciano-1-azadienos onde detalham a síntese de 2-ciano tetraidropiridinas, que podem facilmente ser transformadas em uma grande variedade de piperidinas funcionalizadas. Do estudo, eles identificaram uma dependência da regioespecificidade da reação com a natureza eletrônica do dienófilo⁴⁰ (esquema 11).

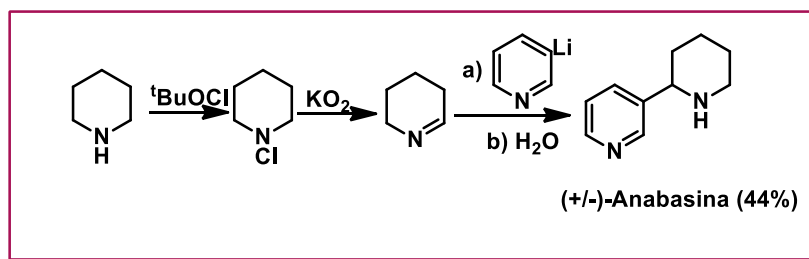


Esquema 11 — Abordagem de Diels-Alder de Fowler e Grierson para a preparação de piperidinas.

1.4 FUNCIONALIZAÇÃO DE PIPERIDINAS

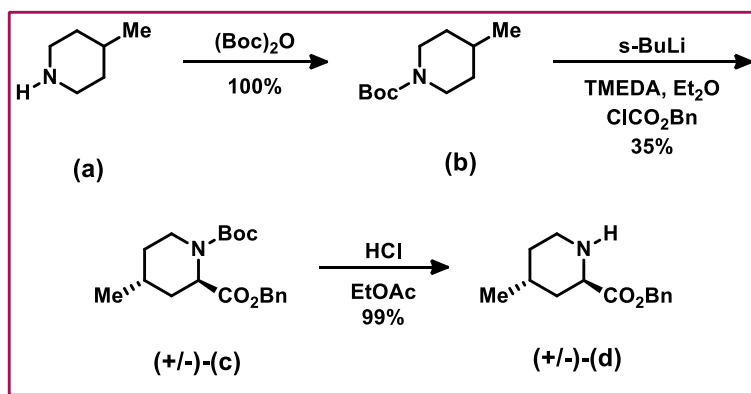
Uma das formas mais comuns de funcionalizar piperidinas, pode ser via derivados *N*-clorados. Estes são conhecidos por gerar iminas em meio básico. Embora tenha pouco controle regioquímico durante a reação, ela fornece uma rota simples para a obtenção de Δ^1 -piperideínas.^{41,42}

A síntese de um dos alcaloides presentes no tabaco, (+/-)-Anabasina, de Scully e Davis,⁴³ publicada em 1977 mostra esta metodologia (esquema 12).



Esquema 12 — Síntese de (+/-)-Anabasina de Scully e Davis.

Em 2001, Cossy e Belotti sintetizaram um derivado do ácido pipecólico através da funcionalização da 4-metil piperidina. A preparação da molécula foi realizada em 3 etapas: i) transformação da amina em um derivado *N*-Boc, ii) litiação-alcoxicarbonilação com cloroformato de benzila, iii) deproteção do grupo *N*-Boc. O éster benzílico do ácido 4-metilpipecólico preparado, que é um dos fragmentos utilizados para a preparação de Argatroban®, foi obtido com um rendimento global de 34% (esquema 13).¹⁶

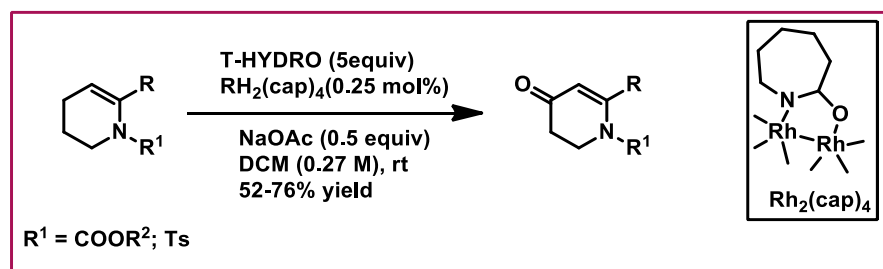


Esquema 13 — Síntese de Cossy e Belotti de um derivado do ácido pipecólico utilizado para a preparação de Argatroban®.

Outras funcionalizações importantes das piperidinas são aquelas baseadas em reações de oxidação. As oxidações alílicas de enaminas e derivados, particularmente de estruturas piperidínicas, são de especial interesse porque levam à preparação de enaminóis e enaminonas (β -acil enaminas). Embora

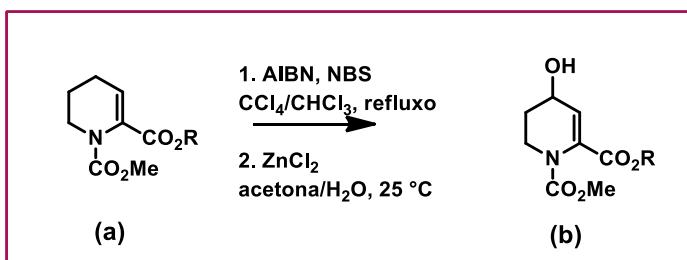
seja amplamente conhecida a oxidação alílica de estruturas olefínicas mediante diversos métodos,⁴⁴ as abordagens recentemente reportadas na literatura sobre oxidação alílica de enaminas cíclicas de seis membros é escassa. As enamionas são utilizadas como intermediários sintéticos altamente versáteis para a construção de estruturas piperidínicas.⁴⁵ Similar ao caso das enamidas, a química das enamionas é relevante para o químico sintético por causa da sua estabilidade e reatividade, que as posiciona entre as amidas (pouco reativas e estáveis) e as enaminas (reativas e instáveis). Por exemplo, em contraste com enaminas simples, as enamionas não sofrem decomposição através de rotas oxidativas ou hidrolíticas.⁴⁶ Essa propriedade faz delas compostos fáceis de isolar. Além do mais, esses compostos são de interesse no setor farmacêutico sendo utilizados como anticonvulsionantes e moduladores de Pgp (Poliglicoproteínas).^{47,48}

Doyle e colaboradores reportaram em 2017 uma nova estratégia para a funcionalização de enamidas cíclicas via oxidação alílica promovida por TBHP em presença de um catalisador de ródio (diródioacprolactamato, esquema 14).⁴⁹ Outros catalisadores metálicos foram utilizados na oxidação de enamidas para comparação. Dentre eles, $\text{Rh}_2(\text{oct})_4$, $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$, $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{K}_2\text{CO}_3$, $\text{Co}(\text{AcO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, iodano tert-butil peróxido e CuI . No entanto, o melhor rendimento alcançado foi utilizando o $\text{Rh}_2(\text{cap})_4$.



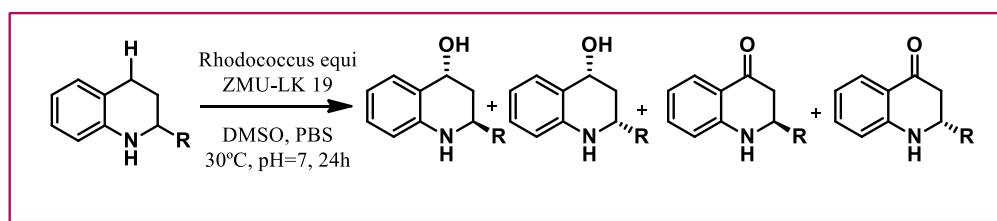
Esquema 14 — Oxidação alílica de enamidas catalisada por TBHP e $\text{Rh}_2(\text{cap})_4$ de Doyle et. al.

Os derivados halogenados de tetraidropiridinas podem ser utilizados como precursores de produtos naturais bioativos, por exemplo os seus brometos vinílicos e alílicos.⁵⁰ Em 2010, Occhiato e colaboradores preparam álcoois derivados de (a) e (b) através de uma sequência de uma bromação alílica catalítica com AIBN e NBS seguida de uma hidrólise assistida por ZnCl_2 em acetona aquosa⁵¹ (esquema 15).



Esquema 15 — Oxidação alílica de enecarbamatos por Occhiato et al.

As metodologias de síntese envolvendo funcionalização de piperidinas são variadas, e incluem tanto abordagens assimétricas quanto não assimétricas, além de precisar, em numerosas ocasiões, do uso de catalisadores para atingirem bons rendimentos de reação. Além do mais, abordagens quimio enzimáticas assimétricas também foram recentemente publicadas para a oxidação alílica de piperidinas fusionadas com anéis aromáticos. Chen e colaboradores (2017) desenvolveram um sistema biocatalítico tipo cascata que envolve reações de hidroxilação assimétrica e oxidações diastereosseletivas a partir de (+/-)-tetraidroquinolinas 2-substituídas. As biotransformações foram promovidas por *Rhodococcus equi* ZMU-LK19 (esquema 16).⁵² O autor também reportou em 2014 uma outra metodologia régio e enantiosseletiva de hidroxilação benzílica empregando *Pseudomonas Pleccoglossicidas*. Com isso, o grupo sintetizou tetraidroquinolin-4-ol e tetraidro-1H-benzo[b]azepin-5-ol quirais.⁵³



Esquema 16 — Hidroxilação benzílica promovida por *Rhodococcus equi* ZMU-LK19 de Chen et al.

Embora exista uma grande diversidade de métodos para a síntese assimétrica de piperidinas substituídas necessárias para a preparação e desenvolvimento de estruturas bioativas, a maior parte desses envolvem o uso de catalisadores metálicos, solventes tóxicos, múltiplas etapas reacionais trabalhosas, reagentes com pouca disponibilidade ou de alto custo. Somado a isso, muitos deles frequentemente

requerem purificações prévias de reagentes e solventes, condições de baixa (inclusive nula) umidade ou uso de atmosfera inerte dentro do sistema reacional. Tudo isso dificulta o processo de preparação desses compostos e como consequência, gera um impacto negativo no custo do produto desejado.

Nesse contexto, existe um crescente interesse pela utilização de metodologias limpas, que possam ser seguidas em condições brandas, com alta eficiência e gerando a menor quantidade possível de subprodutos tóxicos. Com isso, a utilização de sistemas bioquímicos vem se destacando em síntese orgânica, especialmente no uso e desenvolvimento de estratégias quimio enzimáticas, com a utilização de enzimas ou micro-organismos que sejam capazes de substituir alguns reagentes químicos usuais de toxicidade maior.

A biocatálise é uma ferramenta biotecnológica poderosa usada para promover a transformação de compostos orgânicos em aproveitamento da alta seletividade das enzimas. Elas são catalisadores biodegradáveis que podem ser isolados de fontes renováveis (bactérias, fungos, plantas, leveduras). Seu uso adequado faz da biocatálise uma estratégia sintética verde.⁵⁴⁻⁵⁶

1.5 RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA (RCE) DE COMPOSTOS NITROGENADOS E O USO DA CAL-B COMO BIOCATALISADOR.

Em termos gerais, dentro do ramo da química orgânica, a palavra resolução refere-se ao uso de compostos enantiopuros que permitem a separação dos componentes de um racemato em seus dois enantiômeros. A ideia chave do processo de resolução é a união de dois centros estereogênicos de maneira que eles possam interagir entre si, e assim, gerar diastereoisômeros separáveis a partir dessa interação entre a molécula racêmica a ser resolvida e a molécula quiral utilizada como agente de resolução. O procedimento pode ser realizado empregando sais diastereoisoméricas, via cromatografia em coluna contendo uma fase estacionária quiral, ou através da utilização de outras moléculas quirais em sua forma enantiopura como as enzimas.²⁸ Dessa forma, quando um substrato racêmico é submetido à hidrólise enzimática, acontece uma discriminação quiral dos diferentes enantiômeros resultado da quiralidade no sítio ativo da enzima.⁵⁷ As enzimas são capazes de selecionar um dos enantiômeros independentemente do tipo de quiralidade do substrato (pode ser central, axial ou inclusive planar).⁵⁸

A Resolução Cinética Enzimática (RCE) é um método baseado nesse fato, e as lipases (ester hidrolases de glicerol EC 3.1.1.3) vêm sendo os biocatalisadores prediletos para as sínteses que o utilizam. Segundo Wikteliuss, elas são as enzimas mais utilizadas para a síntese assimétrica em química

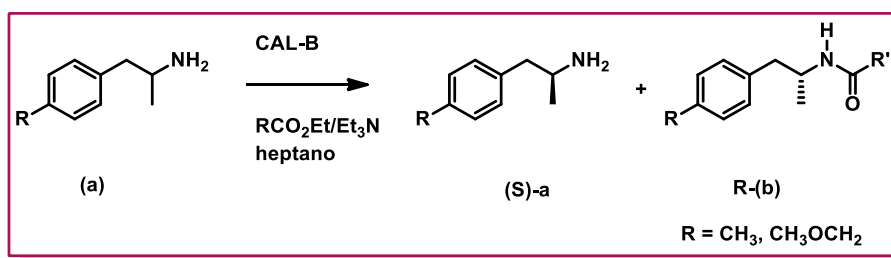
orgânica.⁵⁹ Essa preferência de que são meritórias pode ser justificada por diversos motivos. Dentre eles cabe mencionar sua disponibilidade, custo razoável na maior parte dos casos, alta estabilidade e versatilidade de ação.^{60,61} Fazendo parte dessa classe de enzimas, a Candida Antarctica Lipase B (CAL-B), uma lipase proveniente de fungos da espécie *Candida antarctica*,⁵⁹ têm sido a promotora de muitas biotransformações no ramo da biocatálise. Kazlauskas, (2005) afirmou que, dentre as lipases testadas, essa é o biocatalisador que têm mostrado a mais pronunciada promiscuidade.⁶² Principalmente, tem agido como mediadora em resoluções de álcoois secundários,^{63,64} aminas,^{65,66} dióis⁶⁷ e ésteres.⁶⁸ Em 2013 Huang e Tsai relataram a resolução de (R,S)- β -butirolactona mediante uma reação de metanólisis com CAL-B,⁶⁹ e no mesmo ano, Ostaszewski e colaboradores descreveram a primeira reação de Ugi catalisada por CAL-B.⁷⁰

Na maioria das resoluções de álcoois, aminas e derivados, a enzima resolve o substrato racêmico através da acilação seletiva de um dos enantiômeros. Um doador de acila, geralmente adicionado em quantidades equimolares, é utilizado nestes casos. O grupo acila é transferido até o substrato com intervenção da enzima. Devido a que este processo de transesterificação é totalmente reversível, ésteres ou ésteres enólicos altamente ativados são usualmente utilizados como doadores de acila para deslocar a reação à formação do substrato acilado.^{71,72}

A principal diferença entre a acilação enzimática de álcoois e aminas em solventes orgânicos é que os doadores de acila ativados normalmente usados para os primeiros (ésteres metílicos e etílicos halogenados, ésteres de oxima e especialmente ésteres vinílicos) normalmente reagem inclusive na ausência do biocatalisador.⁷³

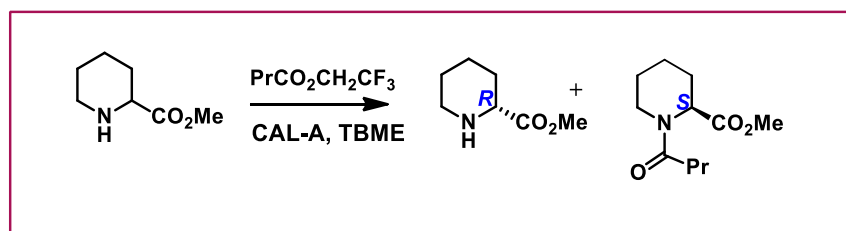
A hidrólise, que é a reação natural das lipases, é também bastante empregada para a resolução de misturas racêmicas ou a desimetriação de compostos pro-quirais.⁷⁴ Adicionalmente, nos últimos anos, vários artigos de revisão têm sido publicados mostrando a utilidade de lipases em reações de amonólisis e aminólisis para a síntese de compostos nitrogenados.⁷⁵⁻⁷⁷ Apesar disso, não são descritas resoluções através de hidrólise de amidas ou enamidas heterocíclicas.⁵⁸ Nesse contexto, é preciso salientar que, até hoje, não existe evidência na literatura, de RCE para heterocíclonitrogenados insturados (por exemplo enamidas), mediada por CAL-B e envolvendo a ligação N-C.

Um trabalho recente de resolução de aminas primárias é a acilação enantiosseletiva de feniletilaminas, análogos das anfetaminas, promovida por CAL-B, em heptano. Esse foi publicado em 2011 por Guerrero e colaboradores⁶⁶ (esquema 17).



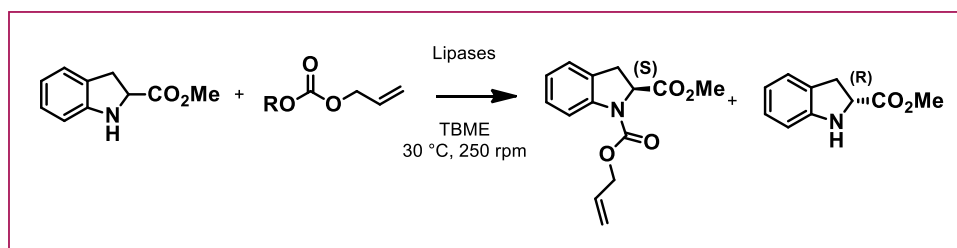
Esquema 17 — RCE de aminas primárias mediada por CAL-B, de Guerrero et al.

Contudo, um outro exemplo de um trabalho que resulta conveniente destacar nesse ponto, é o realizado por Liljeblad e colaboradores em 2010.⁷⁸ O grupo publicou a RCE do (+/-)-metil piperidina-2 carboxilato, catalisada por CAL-A, através de N-acilação (esquema 18). Além disso, reportaram outras hidrólises enzimáticas da ligação amida para alguns α -acil-N-aminoácidos.



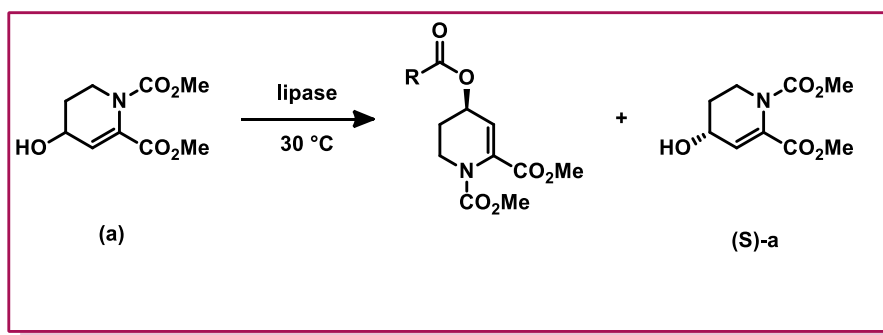
Esquema 18 — RCE de (+/-)-metil piperidina-2 carboxilato promovida por CAL-A de Liljeblad.

Em 2008, Cativiela, Gotor e colaboradores também aplicaram RCE mediada por lipases para atingir a resolução da metil indolina-2-carboxilato via N-acilação em TBME⁷⁹ (esquema 19).



Esquema 19 — RCE da metil indolina 2-carboxilato de Gotor et. al.

No entanto, as informações disponíveis na literatura mostram que a maior parte dos procedimentos de RCE efetuados em compostos nitrogenados dependem de grupos ester ou álcool formando parte da estrutura do substrato. Como exemplo pode ser mencionada a acetilação enantiosseletiva da dimetil 4-hidroxi-5,6-diidropiridina-1,2(4H)-dicarboxilato realizada por Occhiato e colaboradores em 2010.⁵¹ CAL-B e PS Amano “IM” geraram resultados satisfatórios para essa biotransformação em solventes orgânicos (esquema 20). Essa é uma das poucas RCE aplicadas à derivados de enaminas cíclicas de seis membros.



Esquema 20 — Acetilação enantiosseletiva de 4-hidroxi-5,6-diidropiridina-1,2(4H)-dicarboxilato de Occhiato et al.

Outros exemplos usando lipases incluem a esterificação do álcool em (R,S)-N-(tertbutoxicarbonil)-3-hidroximetilpiperidina em tolueno (2001)⁸⁰ e diversas resoluções em água ou solventes orgânicos aplicadas em moléculas precursoras da Paroxetina, publicadas por Guisan, Fernandez-LaFuente e colaboradores durante os primeiros anos da década de 2000. Essas últimas resoluções ocorrem de igual maneira como resultado de esterificações no grupo álcool das estruturas de partida.^{81–}

84

1.5.1 Considerações gerais das reações mediadas por enzimas, RCE e o papel da CAL-B como biocatalisador.

Em uma reação enzimática de primeira ordem, onde o substrato liga-se ao sítio ativo da enzima, a velocidade da reação, como uma função da concentração do substrato [S] está descrita por uma hipérbola rectangular. Para valores altos de [S], a velocidade de reação, v , é igual à velocidade máxima (V_{max}), ou seja, que v está apenas limitada pelas condições reacionais (pH, temperatura, força iônica),

e pela quantidade de enzima presente. Em outras palavras, v se torna independente de $[S]$, o que descreve a cinética da reação como de ordem zero. Nessas condições, a velocidade da reação depende diretamente da concentração da enzima. Esse fenômeno é chamado de efeito de saturação.

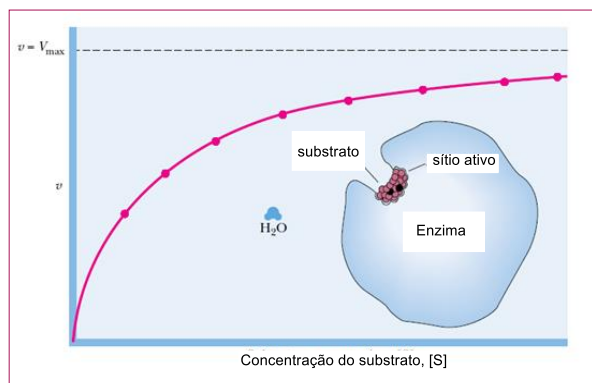


Figura 9 — Curva de saturação de uma reação enzimática, para um substrato. Adaptado de ⁸⁵.

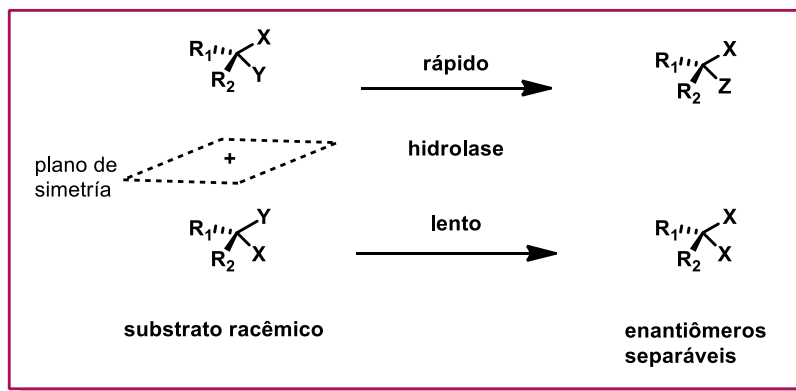
A cinética das reações enzimáticas foi inicialmente explicada pela teoria geral de ação enzimática, proposta por Lenore Michaelis e Maud Menten em 1913.⁸⁶ A teoria é baseada no fato de que a enzima, E, e o substrato, S, se associam reversivelmente para formar um complexo enzima-substrato, ES. A equação de Michaelis-Menten expressa que a velocidade instantânea, v , de uma reação catalisada por uma enzima, é determinada por duas constantes, K_m (a constante de Michaelis-Menten), e $V_{m\acute{a}x}$, e pela concentração do substrato nesse instante.⁵⁸

$$v = \frac{V_m [S]}{K_M + [S]}$$

Equação 1 — Equação de Michaelis-Menten.

A RCE é um processo baseado em velocidades de reação diferentes para dois enantiômeros na presença de um catalisador quiral. Essa diferença de velocidades se deve ao favorecimento de um dos enantiômeros respeito ao outro, em sua condição de substratos para a determinada enzima. A quiralidade dos aminoácidos que compõem a estrutura desses biocatalisadores é a razão desse fenômeno ser possível de acontecer. Apesar do método ser possuidor de numerosas vantagens, a sua principal desvantagem é o

rendimento limitado que pode ser atingido com seu uso. Pela natureza do processo, cada enantiômero pode ser obtido com um rendimento máximo de 50 %. Com a finalidade de superar essa limitante, metodologias modificadas como a resolução cinética dinâmica quimio enzimática (*DKR*) têm sido desenvolvidas e a sua aplicação continua em assenso.⁶⁴



Esquema 21 — Processo de diferenciação enantiomérica na RCE.

As reações hidrolíticas em soluções aquosas podem ser consideradas completamente irreversíveis devido à alta presença de “concentração” de água presente (55.5 mol/L). Assumindo inibição enzimática desprezível, ambos enantiômeros do substrato estão competindo livremente pelo sítio ativo da enzima. Considerando isso, se diz que a cinética de Michaelis-Menten poderia, em efeito, descrever a reação nessas condições.⁵⁸

A pureza óptica de cada composto do produto bruto da resolução (substrato e produto de reação) pode ser descrita fazendo referência ao excesso enantiomérico (e.e.). Esse é definido como o excesso de um enantiômero respeito ao outro, expressado como percentagem total. Um excesso enantiomérico de 88% significa um 94% do enantiômero “correto” e um 6% do “errado”.

$$\%e.e. = \frac{(R-S)}{(R+S)} * 100, \text{ para } R > S$$

Figura 10 — Definição matemática de excesso enantiomérico (e.e.)⁸⁷

A rotação óptica é o ângulo ao qual o plano de polarização é rotado enquanto a luz polarizada passa através de uma amostra contendo moléculas opticamente ativas. Para uma solução da amostra opticamente ativa, é utilizada a bastante conhecida expressão matemática de Biot:

$$[\alpha]^{T\lambda} = \frac{100 \alpha}{l c}$$

Figura 11 — Expressão matemática da rotação específica.

Na figura 11,

$[\alpha]^{T\lambda}$ = rotação específica a uma dada temperatura e comprimento de onda

α = rotação óptica em graus (o ângulo de rotação observado).

T = temperatura em °C

λ = comprimento de onda (lâmpada de sódio, 589 nm)

l = caminho da célula, em decímetros

c = concentração em gramas por 100 mL de solução à temperatura T.⁸⁷

CAL-B

A estrutura tridimensional da CAL-B (Candida antártica lipase, fração B, figura 12) é conhecida desde 1994, quando foi elucidada por cristalografia de raios X.⁸⁸ Isso permitiu uma melhor compreensão dos mecanismos de catálise onde ela participa. A enzima pertence à classe de serina hidrolases, e o mecanismo catalítico para essa classe de enzimas têm sido o foco de diversos estudos, pelo que hoje é bastante compreendido.⁸⁹ Um desses estudos se realizou para as reações com álcoois secundários, onde se confirma que esta lipase realiza uma acilação preferencial em um dos enantiômeros através de uma tríade catalítica constituída por resíduos de três aminoácidos: Aspartato (Asp₁₈₇), Histidina (Hist₂₂₄) e Serina (Ser₁₀₅)⁹⁰, estabilizados mediante pontes de

hidrogênio (figura 13). Inclusive a sua atividade nativa (hidrólise de lipídeos) é mediada por essa tríada catalítica, e o intermediário acil-enzima é estabilizado pela formação da “cavidade de oxiânion”.⁹¹ A figura 14 mostra a interação do sítio ativo da CAL-B com o álcool secundário 3-metil-2-butil octanoato, resultado de um estudo dinâmico molecular da estrutura da enantiosseletividade da enzima realizado por Hult e colaboradores (2000).⁹⁰



Figura 12 — Estrutura da CAL-B e informações gerais (código PDB : 1TCA).

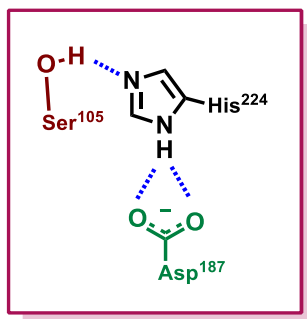


Figura 13 — Tríada catalítica da CAL-B.

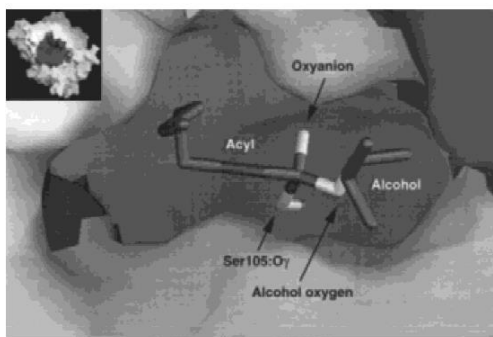
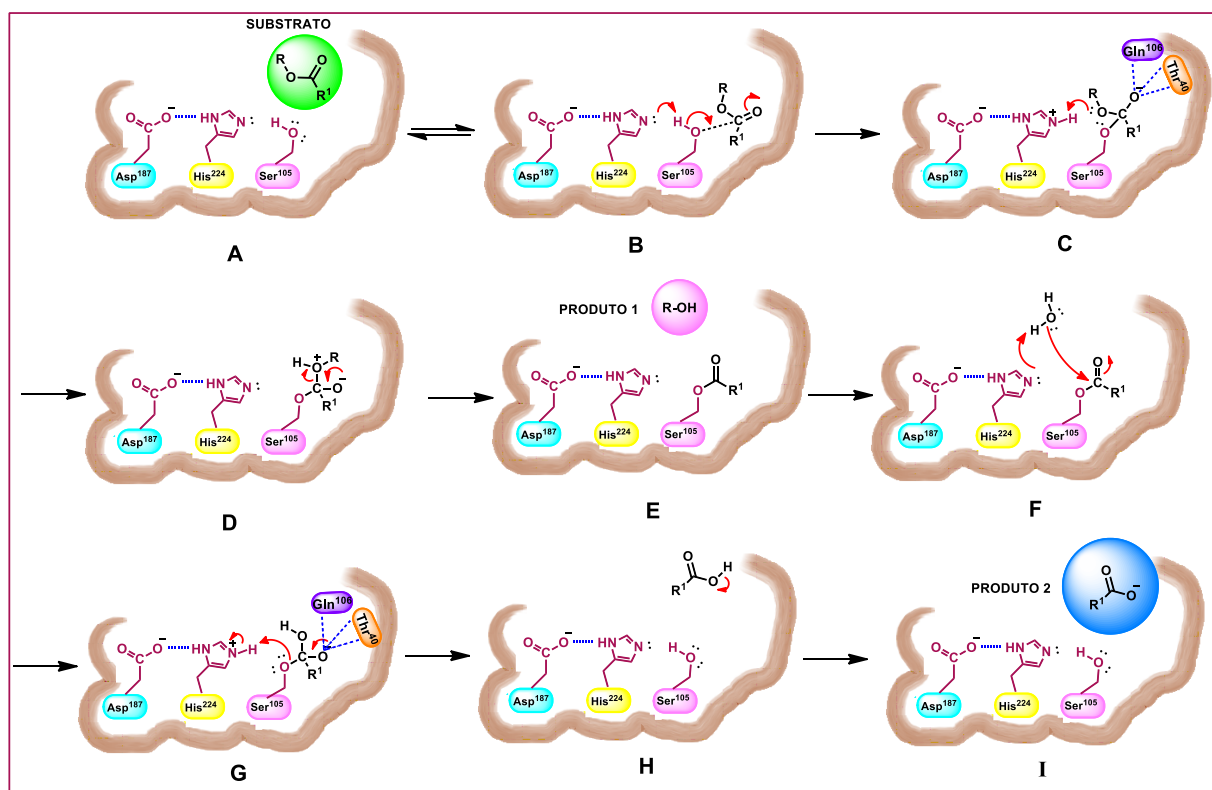


Figura 14 — Representação molecular de superfície da cavidade do sítio ativo da CAL-B[†].

A cavidade de oxiânion da CAL-B está formada pelos prótons do esqueleto principal dos resíduos Thr40 e Gln106, e a cadeia lateral de Thr40.⁹² No ciclo catalítico, (esquema 22) o primeiro substrato é reversivelmente complexado à enzima livre, formando o complexo de Michaelis-Menten, ES (etapa A no esquema). Logo do correto posicionamento do substrato, um ataque nucleofílico da Ser105 no grupo carbonila do substrato toma lugar (etapa B) e um primeiro intermediário tetraédrico é formado. Neste intermediário, a carga negativa no oxigênio do substrato inicial é estabilizada por três pontes de hidrogênio com a cavidade de oxiânion, enquanto que a carga positiva em His224 é estabilizada por sua interação com Asp187 (etapa C). Subsequentemente a forma protonada de His224 é transferida ao oxigênio alquil do substrato (etapa D) e o grupo álcool (Produto 1) do resíduo é liberado da enzima (etapa E). Como resultado disso, se forma uma ligação covalente no intermediário acil-enzima (E*) ao termo da etapa de acilação. Seguidamente, o intermediário acil-enzima é deacilado por um novo substrato nucleofílico, que geralmente é água, um álcool ou uma amina (etapa F). Um segundo intermediário tetraédrico é então formado pelo ataque nucleofílico ao grupo carbonila do complexo acil-enzima. Durante este processo, o próton é transferido desde o nucleófilo até His224, e as cargas positivas e negativas são novamente estabilizadas. Logo disso, o próton é transferido desde His224 até o alquil oxigênio da Ser105 enquanto que ele recupera a ligação do grupo carbonila do substrato ligado. Como resultado, um complexo ES com ligação fraca é formado, e a enzima livre (E) é regenerada depois de ter liberado o produto, fechando-se assim o ciclo (etapas G,H e I).⁹³

[†]Fonte: (Hult, Fransson e Raza, 2001)⁹⁰



Esquema 22 — Mecanismo catalítico da CAL-B, mostrando um éster genérico como substrato.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de uma nova metodologia quimo enzimática para a preparação de piperidinas enantioméricamente puras.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) A preparação das enamidas heterocíclicas 1-(3,4-diidropiridin-1(2H)-il)etanona e 1-(4-metil-3,4-diidropiridin-1(2H)-yl)etanona na sua forma racêmica, e a suas iminas correspondentes, as quais serão utilizadas como substratos nos testes de oxidação e/ou resolução cinética enzimática.

b) A aplicação das técnicas de resolução cinética enzimática nos substratos preparados (enamidas e iminas) e otimização de condições reacionais, com o fim da obtenção de blocos de construção enantioenriquecidos.

c) Realização de estudos de oxidação das enamidas obtidas visando à geração de intermediários sintéticos e blocos de construção funcionalizados no anel piperidínico.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PREPARAÇÃO DAS ENAMIDAS RACÊMICAS

Os esforços iniciais foram direcionados à preparação das enamidas **4a**: 1-(3,4-diidropiridin-1(2H)-il)etanona e **4b**: 1-(4-metil-3,4-diidropiridin-1(2H)-il)etanona (figura 15) na sua forma racêmica.

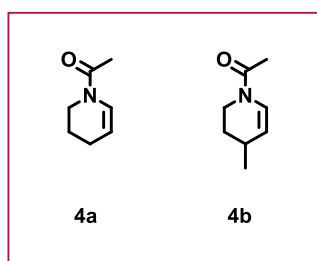
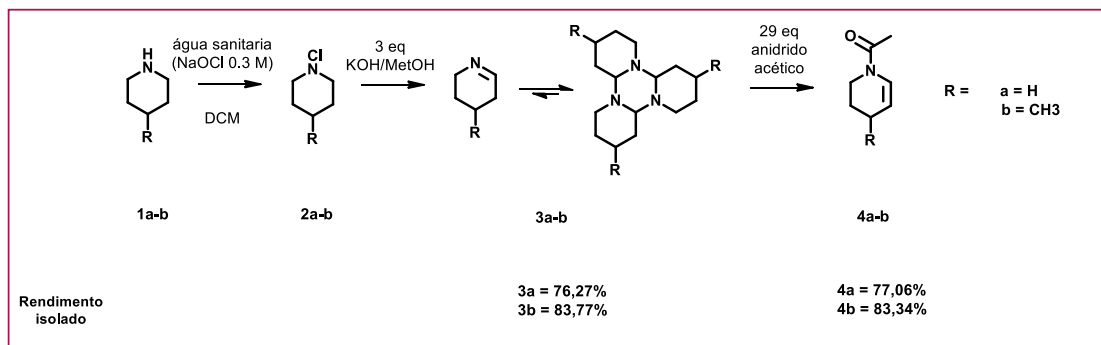


Figura 15 — Enamidas preparadas e caracterizadas neste trabalho.

Para isso, foram utilizadas metodologias já descritas na literatura,^{50,94} com algumas modificações, testadas anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa e outras para fins específicos deste trabalho. A síntese das enamidas consistiu na conversão das piperidinas correspondentes em *N*-cloraminas através da sua oxidação com uma solução aquosa de hipoclorito de sódio 0.3 M (água sanitária), em um sistema bifásico com diclorometano como solvente da fase orgânica (esquema 23, i). O precursor *N*-clorado assim formado, foi em seguida submetido a uma desidrohalogenação na presença de metóxido de potássio, gerado a partir dissolução de hidróxido de potássio em metanol (ii). Dessa forma, a imina gerada foi posteriormente acetilada com anidrido acético, levando à formação da enamida cíclica correspondente (iii) (esquema 23).



Esquema 23 — Metodologia utilizada para a síntese das enamidas 4a-4c.

As reações de formação dos compostos **4a** e **4b** foram acompanhadas por CCD, GC-FID e GC-MS. As placas de CCD foram reveladas com vapores de iodo e queimadas em vanilina. Os compostos isolados após purificação em coluna de sílica foram caracterizados por RMN ^1H , e ^{13}C . Os espectros obtidos serão discutidos a seguir.

Nas figuras 16 e 18 encontram-se, respectivamente, os espectros de RMN ^1H e ^{13}C da enamida **4a**, cuja síntese teve como principal objetivo servir como modelo e precursor para a preparação de outras enamidas.

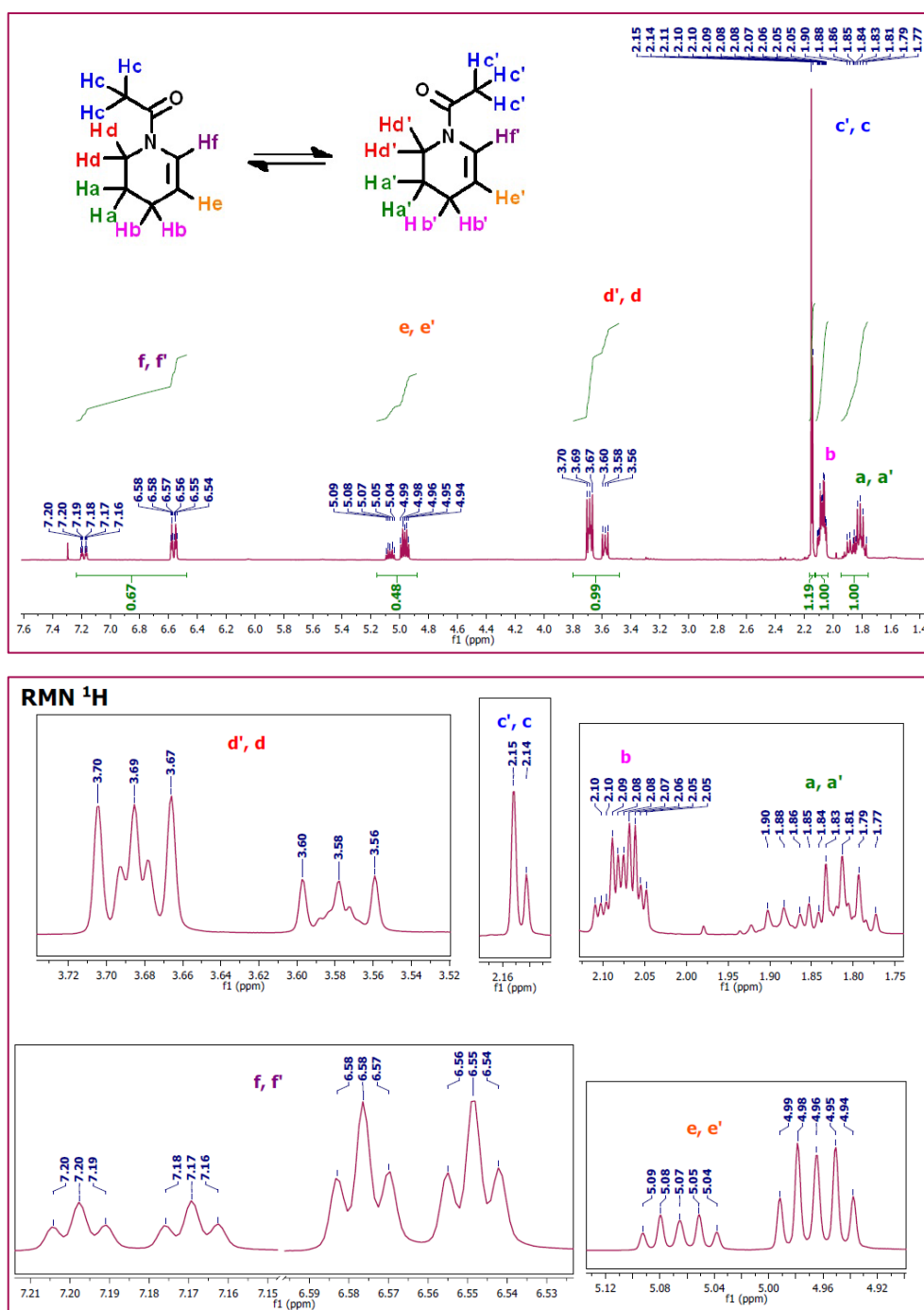


Figura 16 — Espectro de RMN ^1H para 4a, e ampliação dos sinais. CDCl_3 , 300 MHz.

Para ambos espectros, tanto o de hidrogênio quanto o de carbono, é possível observar duplicação de alguns sinais. Isso se deve ao fato da existência de rotâmeros em solução, para essa molécula. Isto é resultado da rotação restrita em torno da ligação N-C provocada pelo seu

caráter de dupla ligação parcial. Assim, no espectro de RMN ^1H para **4a**, (sinais c e c', figura 16) se observam dois simpletos de diferentes intensidades com um deslocamento químico de 2.14 e 2.15 ppm, correspondentes aos prótons ligados ao carbono alfa do grupo acetila. Cada um desses sinais representa um rotâmetro. De maneira similar, em 3.58 e 3.69 ppm têm dois sinais gerados pelos prótons d' e d, sendo diferenciados os rotâmetros pelo uso do apóstrofo na letra que designa o próton em questão. Para cada rotâmetro, os prótons "d" acoplam de forma vicinal com os dois prótons "a", pelo que se esperaria a observação de um tripleto se os hidrogênios fossem quimicamente equivalentes. Porém, o desdobramento do sinal aparece com um grau maior de complexidade por causa dos prótons serem enantiotópicos. Logo, a situação dos prótons "a" e "b" pode ser explicada sob a utilização do mesmo princípio, já que eles também são enantiotópicos. Para os prótons "a" (1.67-1.90 ppm) o padrão é um multipeto produto dos vários acoplamentos com os diferentes prótons "d", "b" e ainda o acoplamento geminal entre eles. O sinal dos prótons "b" (2.05-2.11 ppm) também aparece desdobrado na forma de um multipeto devido aos acoplamentos vicinais com os prótons "a", o próton "e", o acoplamento geminal e ainda o acoplamento alílico com H^f . Esses prótons "b" estão mais desblindados que os prótons "a" devido à proximidade com os elétrons pi da ligação dupla. Além do mais, é possível observar os sinais dos diferentes rotâmetros parcialmente superpostos nestes últimos casos.

Finalmente, os prótons "e" e "f" geram sinais diferentes provenientes do seu ambiente eletrônico diferenciado. É possível observar que H^e acopla vicinalmente com três hidrogênios diferentes. No entanto, como resultado da provável proximidade entre os valores das constantes de acoplamento entre H^e e os H^b , dá para apreciar a aparição de um dubleto de tripletos, parcialmente sobrepostos, para cada rotâmetro (4.94-4.99 e 5.04-5.09 ppm). Por outra parte, o sinal do próton "f" reflete o acoplamento forte com H^e , para o que se espera um tripleto. Embora possa ser esperado um tripleto um pouco mais complexo pela possibilidade de acoplamentos alílicos, o sinal aparece como um tripleto simples, provando que esse não é forte o suficiente neste caso específico.

Do RMN ^1H também se determinou a razão dos rotâmetros em equilíbrio como 2.4:1 e 2.3 :1 para **4a** e **4b** respectivamente (figura 17).

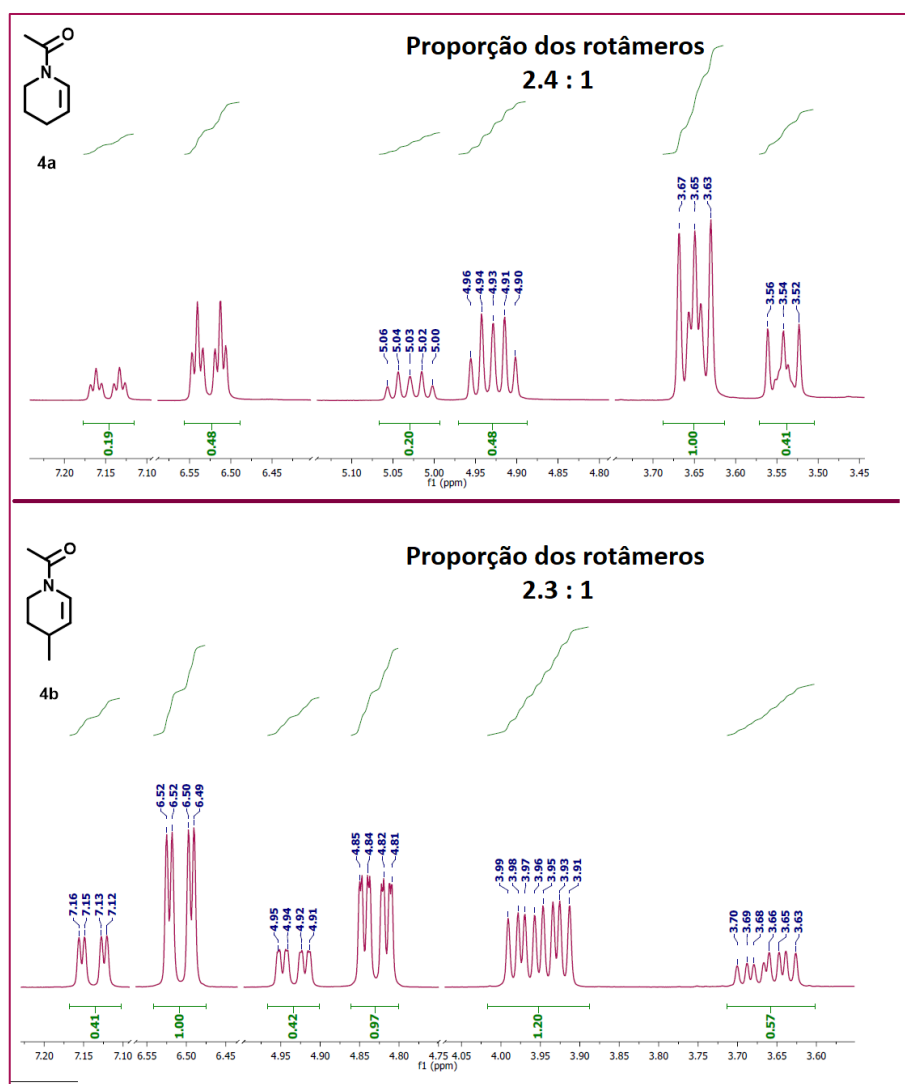


Figura 17 — Determinação da proporção das concentrações dos rotâmeros para 4a e 4b.

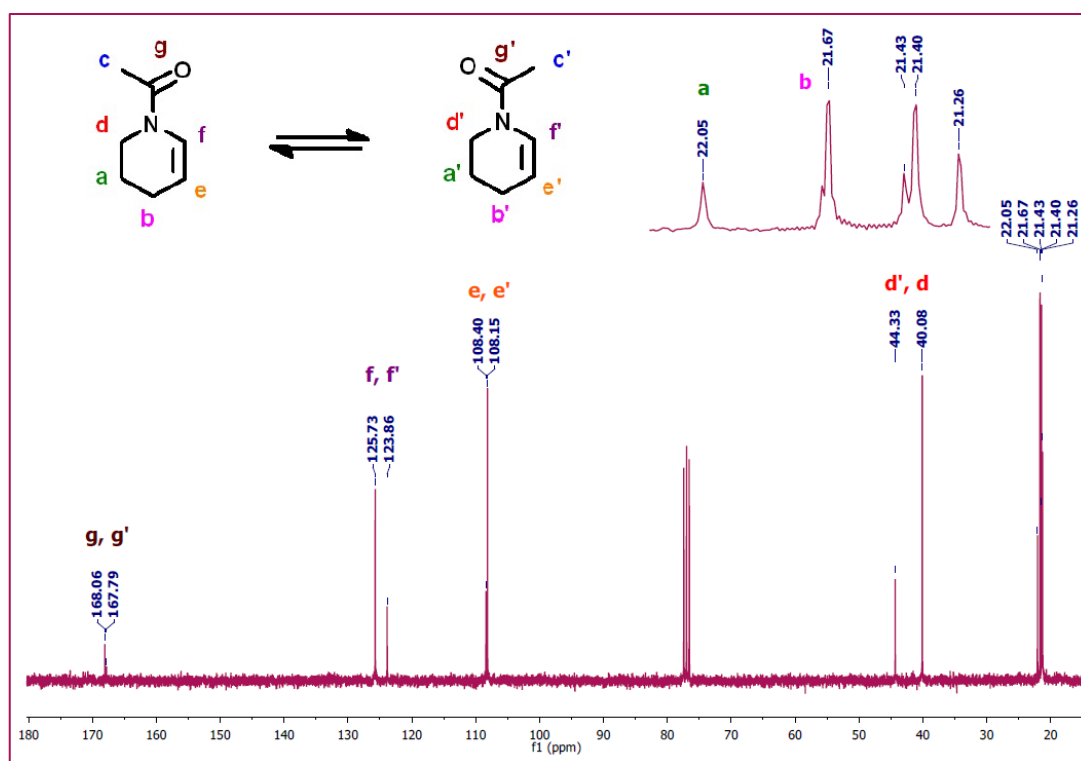


Figura 18 — Espectro de ^{13}C RMN para **4a**. CDCl_3 , 75 MHz.

Do espectro de RMN ^{13}C para **4a** (figura 18) identificou-se o grupo carbonila de cada conformero através dos sinais dos carbonos “g”. A baixa intensidade desses é característica de carbonos terciários e o seu deslocamento químico na região típica de $\text{C}=\text{O}$ (167.7 e 168.0 ppm) confirma que se trata desse grupo funcional, que ademais é o carbono mais desblindado da molécula por causa do efeito indutivo causado pelo oxigênio eletronegativo. Os carbonos “f” e “e” ressoam na região esperada para carbonos com hibridização sp^2 (123.8 /125.7 ppm e 108.1/108.4 ppm).

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C para a enamida **4b** apresentam-se nas figuras 19 e 20, respectivamente.

É importante ressaltar do espectro do próton da figura 19, as diferenças que surgem por causa da aparição do grupo metila no carbono 4. Em δ 1.03 ppm se observa um sinal que deve corresponder a dois dupletos sobrepostos. Os prótons acoplam vicinalmente apenas com H^b , pelo que a multiplicidade do sinal esperado é um duplete. Contudo, a existência dos rotâmeros

em solução produz duplicação do sinal, embora a nuvem eletrônica que rodeia os prótons seja tão pouco afetada pela rotação do grupo acetila que provoque que os deslocamentos químicos sejam quase idênticos. A atribuição dos prótons “a” e “b” foi feita levando em consideração as integrações dos sinais. A quantidade de prótons do sinal para H^b (1.37-1.57 ppm), de acordo com as integrações calculadas, deve ser a mesma que para cada um dos sinais dos prótons “a” (1.87-2.01/2.28-2.36). Isso indica que esses últimos devem ser o dobro dos primeiros, o que de fato acontece pois temos quatro hidrogênios “a” (dois para cada rotâmero) e apenas dois do tipo “b” (um para cada rotâmero).

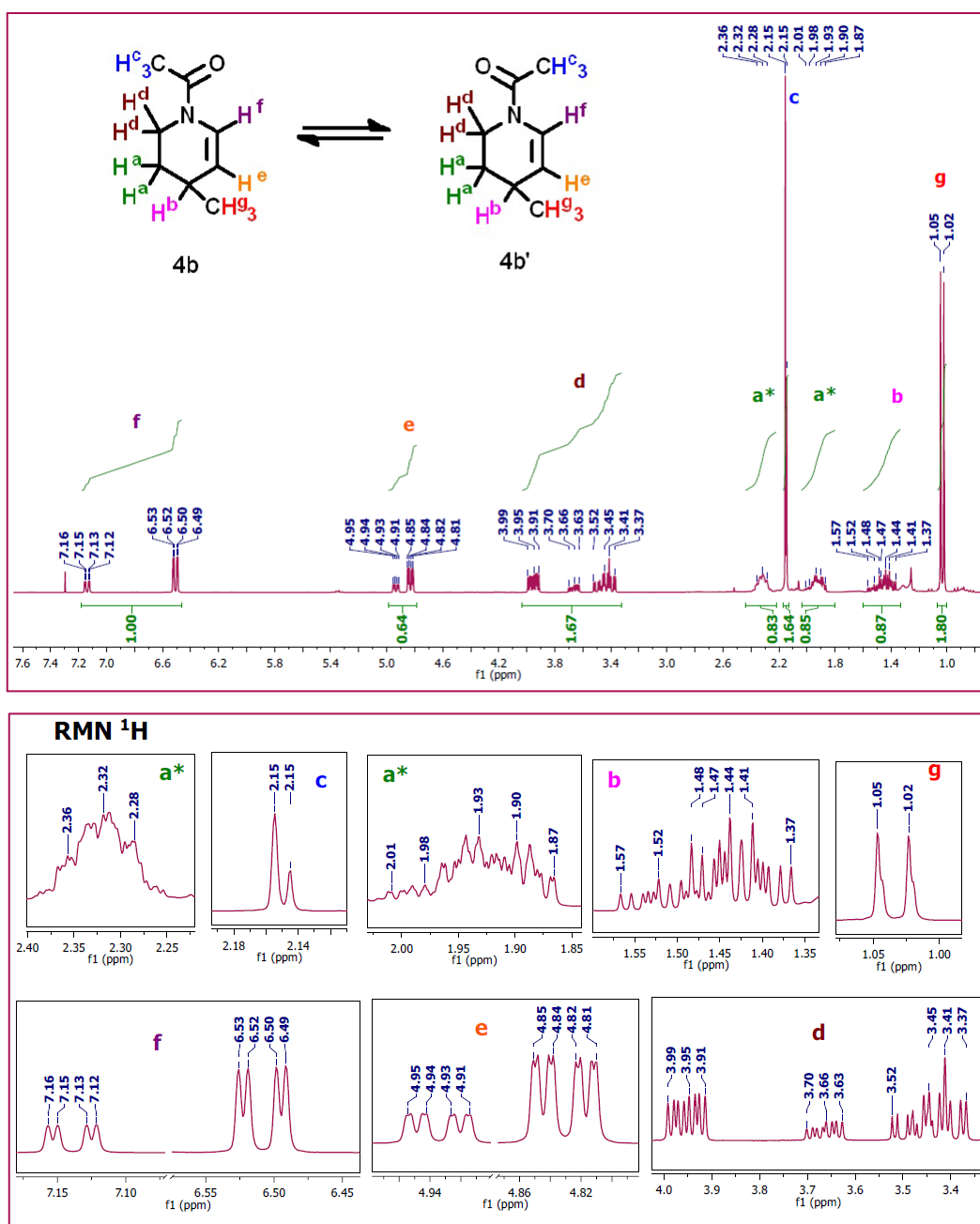


Figura 19 — Espectro de RMN 1H para 4b, e ampliação dos sinais. $CDCl_3$, 300 MHz.

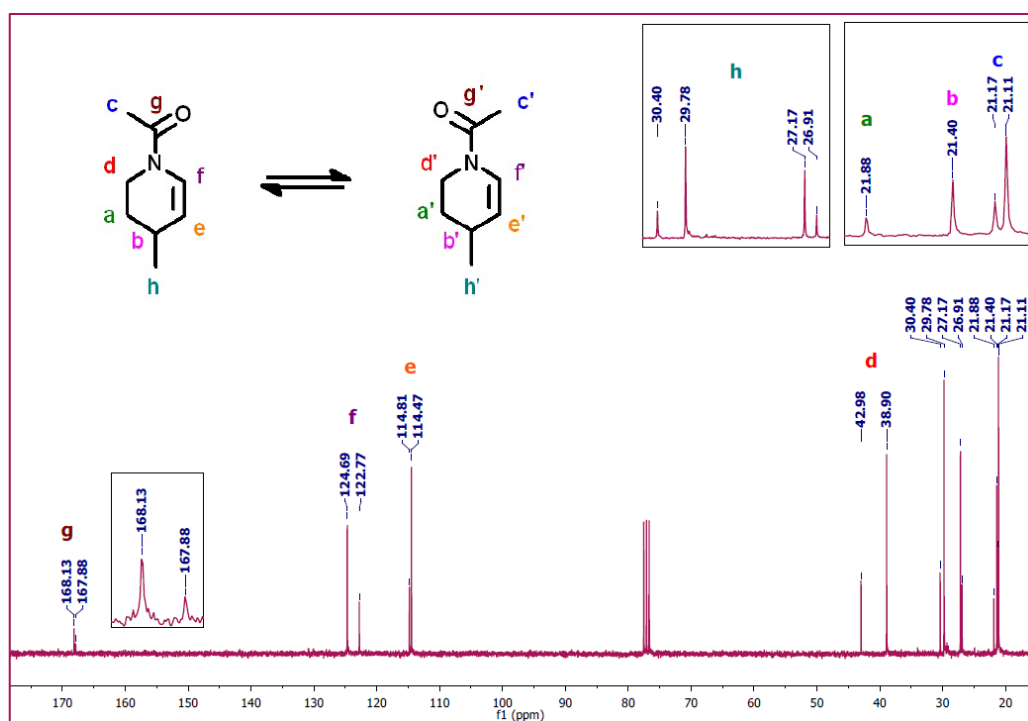


Figura 20 — Espectro de RMN ^{13}C para **4b**. CDCl_3 , 75 MHz.

Seguindo as mesmas condições, tentou-se sintetizar uma nova enamida, até então não reportada na literatura, partindo da 4-hidroxi piperidina. Devido à quantidade limitada desse reagente, e apesar dos testes terem sido efetuados em uma escala menor que a usual, foi possível obter suficiente produto para verificar sua estrutura apenas via GC-MS. O espectro gerado do GC-MS é um indicativo de que o produto 1-acetil-1,2,3,4-tetrahidropiridin-4-il acetato (**4c**), pôde ter sido formado (figura 21).

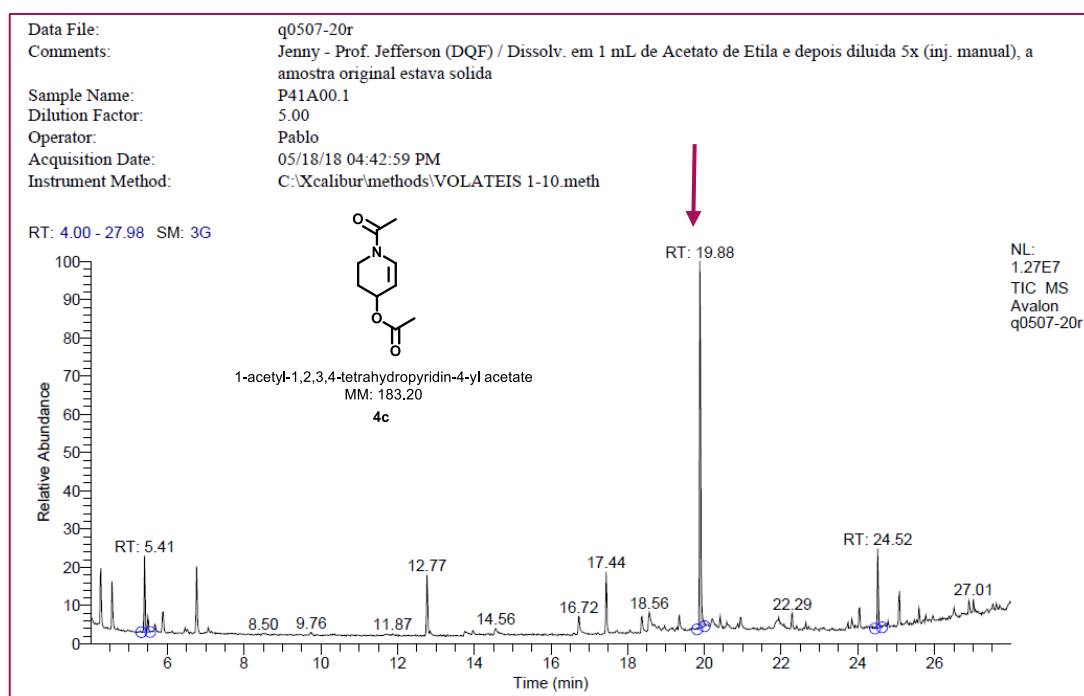


Figura 21 — Cromatograma de GC-MS para o produto reacional, 4c. Método VOLÁTEIS (pág. 149).

O sinal referente ao composto **4c** pôde ser observado via GC-MS, com o aparecimento do pico em 19.88 minutos. A fragmentação referente ao composto de interesse está ampliada na figura 22. O pico em $m/z = 140.21$ proviria da segmentação alpha da ligação O-C do grupo éster (figura 23a), e poderiam se esperar fragmentos produto da quebra da ligação N-C de fragmentos residuais (figura 23b).

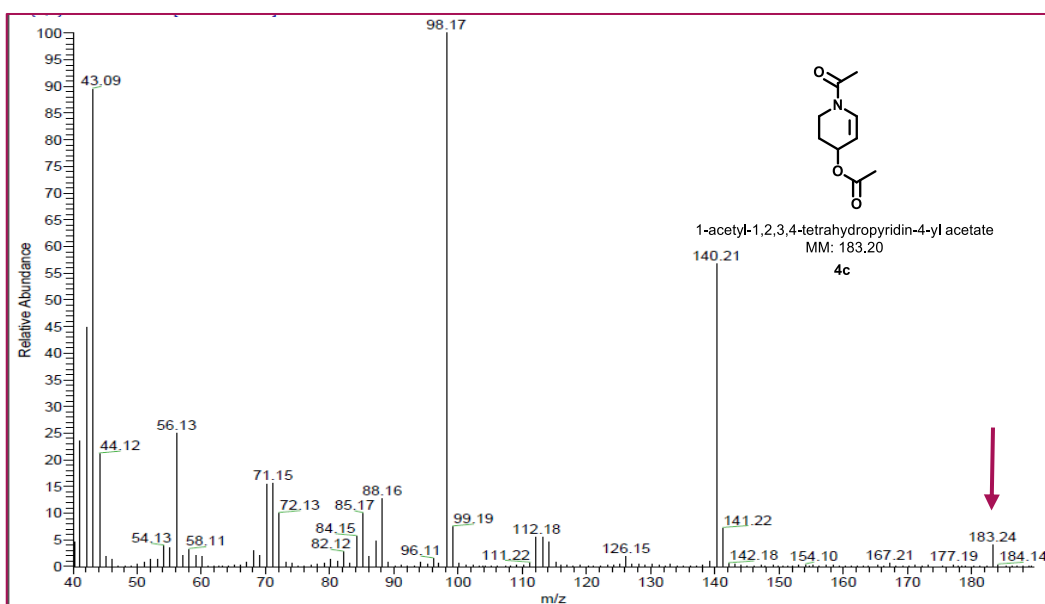


Figura 22 — Espectro de GC-MS para o produto 4c.

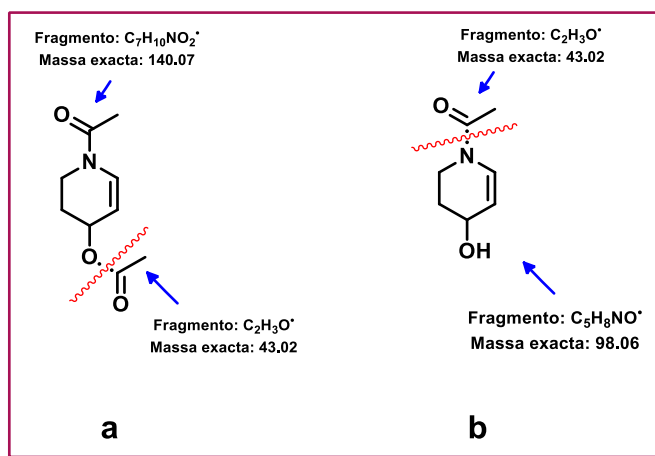


Figura 23 — Alguns fragmentos esperados do composto 4c, e suas respectivas massas.

3.1.1 Identificação de um subproduto da reação de formação de 4a

Embora esta rota sintética relativamente simples para a geração de iminas e enamidas cíclicas tenha sido reportada, existem muitas variações da mesma, e poucas piperidinas têm sido utilizadas como substratos. Além disso, pouco se conhece acerca dos aspectos experimentais dessa sequência de reações e a influência das condições para formação do

produto desejado, o rendimento isolado da enamida e/ou dos subprodutos de reação. Foi então que surgiu a necessidade de estudá-la um pouco mais detalhadamente, devido em parte, à impossibilidade de reproduzir as condições já conhecidas com exatidão e também à obtenção de resultados inesperados durante a modificação de certas condições, os quais consideramos uma boa oportunidade para o surgimento de novas descobertas.

Durante as primeiras tentativas para sintetizar **4a**, quando a etapa de desidrohalogenação em DCM foi conduzida durante uma hora em 25°C e num sistema semi aberto à atmosfera, se observou que a reação não ocorreu de maneira completa. Assim, o produto dessa reação continuava com presença de espécies cloradas, o que foi visto através de CCD. No entanto, ignorando isso, se prosseguiu com a etapa de acetilação do produto formado sem prévia extração. Para isso se adicionou anidrido acético seguido por trietilamina numa proporção molar de 1:2 e a reação deixou-se acontecer em DCM durante uma hora, em 25 °C. Ao acompanhar a reação através de CCD, se observou a formação de um produto diferente da enamida esperada. Através de uma análise de GC-MS do produto bruto, foi possível detectar a presença de duas espécies maioritárias: a cloramina (**2a**), e o novo composto (**5a**). Além disso a enamida **4a** estava presente em baixa concentração. A cloramina foi separada da mistura através de cristalização espontânea de cloridrato de piperidina. Assim, foi isolado através de coluna de sílica durante a purificação de **4a**, embora desconhecido. A sua detecção foi realizada mediante o cálculo do seu valor de R_f e seus dados de GC-MS. Uma nova análise através de GC-FID (figura 25) dos dois produtos obtidos em dias diferentes confirmou que se tratava do mesmo composto. O espectro de massas para **5a** mostra algumas fragmentações características de **4a** mas sugere a perda de uma molécula de água. Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C e GC-MS (págs. 141 e 146) indicam a ausência de dupla ligação no anel e sustentam a possível presença de um grupo OH na estrutura da molécula. Considerando estas informações, espera-se que a estrutura de **5a** seja a que se mostra na figura 24.

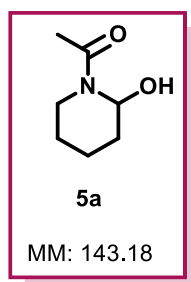


Figura 24 — Provável estrutura para o subproduto da reação de formação da enamida 4a.

É importante salientar, que **5a**, após ser filtrado em coluna de sílica gel para tentar purificá-lo e tentar obter um espectro de RMN mais limpo dele, transformou-se na enamida **4a**. Esse resultado pode se referir à desidratação ácida da molécula **5a** por ação da sílica.

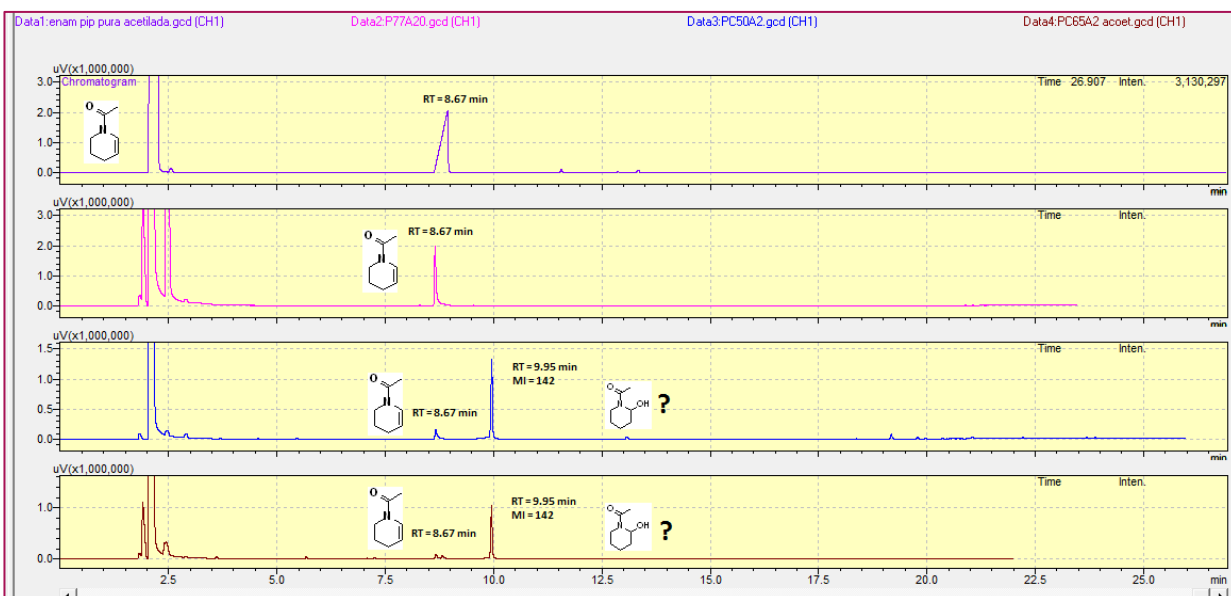


Figura 25 — Comparação dos tempos de retenção (por GC-FID) da enamida 4a e seu subproduto isolado, com provável estrutura de 5a. *Coluna de fase estacionária não quiral. Método C (pág. 152).

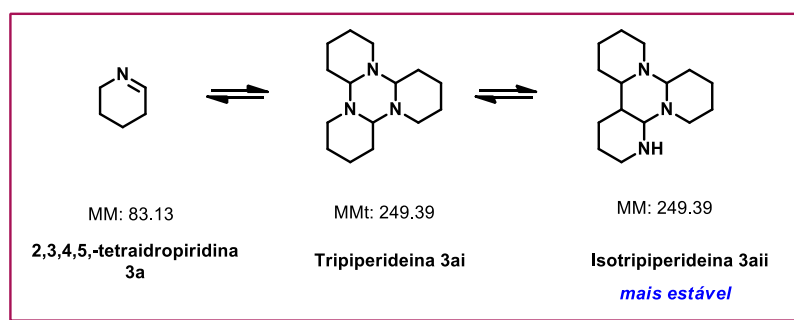
3.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS IMINAS CÍCLICAS 2,3,4,5-TETRAHIDROPIRIDINA (3A) E 4-METIL-2,3,4,5-TETRAHIDROPIRIDINA (3B).

As iminas **3a** e **3b** foram preparadas como mostrado no esquema 23 e isoladas em forma de trímeros, induzindo a sua cristalização em DCM. Em ambos os casos, sólidos amarelos com aparência cerosa, que posteriormente formam cristais longos de aparente baixo ponto de fusão foram obtidos.

A formação dos produtos **3a** e **3b** foi detectada por CCD, GC-FID e GC-MS, e a caracterização das iminas foi feita através de RMN (^1H , ^{13}C , págs. 125-128).

O trímero simétrico de **3ai**, que cristaliza na forma de α -tripiperideína⁹⁵⁻⁹⁷ pôde ser identificado através da comparação dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C com dados da literatura.^{50,97} (pág. 125)

Quando o trímero **3ai** foi recrystalizado em acetona, em uma tentativa de obtê-lo com uma pureza maior, os espectros de ^1H e ^{13}C do sólido cristalino e amorfo, de cor amarelo pálido revelaram a formação do trímero assimétrico, o seu regioisômero **3aii**, já identificado antes por outros grupos de pesquisa,^{97,98} e denominado isotripiperideína, que possui uma maior estabilidade (esquema 24). A parte solúvel em acetona (a qual compôs a maior parte) foi separada do solvente sob pressão reduzida e o óleo amarelo escuro e viscoso resultante correspondeu também à estrutura da isotripiperideína, **3aii**. (pág. 126).



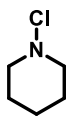
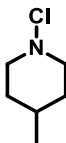
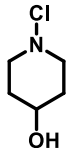
Esquema 24 — Imina **3a** em equilíbrio com seu trímero **3ai** e subsequente isomerização do trímero para a sua forma mais estável, **3aii**.⁹⁷

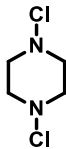
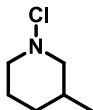
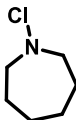
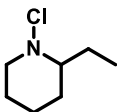
O trímero de **3bi** foi obtido de uma maneira similar ao seu homólogo **3ai**, mostrando propriedades físicas parecidas: cristais amarelos e opacos, com baixo ponto de fusão, e cuja caracterização foi conduzida RMN (^1H e ^{13}C , págs. 127-128). A reação de formação dessa imina também foi acompanhada utilizando as técnicas de CCD, GC-FID e GC-MS.

3.3 SÍNTESE E CARATERIZAÇÃO DE N-CLORAMINAS CÍCLICAS

Como já foi mencionado em parágrafos anteriores, as cloraminas **2a** e **2b** foram utilizadas como intermediários de reação das enamidas **4a** e **4b**. No entanto, visando à preparação de novas vinilamidas para trabalhos futuros, decidiu-se testar a mesma metodologia para a preparação de *N*-cloraminas a partir de outras amins cíclicas disponíveis no nosso laboratório. Os resultados são apresentados na seguinte tabela.

Tabela 1— Preparação e identificação de algumas N-cloraminas cíclicas.

#	Código	Estrutura/Massa molecular (g/mol)	Rendimento isolado(%) ^a	Observações
1	2a	 1-cloropiperidina MM: 119.59	14.42 ^b	Óleo amarelo que formou cristais grandes e incolores quando exposto à atmosfera do laboratório durante mais de 24 horas.
2	2b	 1-cloro-4-metilpiperidina MM: 133.62	37.12 ^b	Cristais amarelos de baixo ponto de fusão.
3	2c	 1-cloropiperidin-4-ol MM: 135.59	30.25	Óleo amarelo que se tornou marrom depois de alguns dias armazenado em - 15 °C.

4	2d	 1,4-dicloropiperazina MM: 155.03	74.46	Sólido fino, amarelo claro, opaco, pouco solúvel em DCM e totalmente solúvel em água.
5	2e	 1-chloro-3-metilpiperidina MM: 133.62	10.72	Cristais amarelados e translúcidos de baixo ponto de fusão, com aspecto de gel.
6	2f	 1-cloropirrolidina MM: 105.57	25.7	Óleo amarelo que se tornou marrom depois de alguns dias armazenado em - 15 C.
7	2g	 1-cloroazepane MM: 133.62	80.02	Líquido amarelo com partes sólidas.
8	2h	 1-chloro-2-etilpiperidina MM: 147.65	74.94	Cristais amarelos de baixo ponto de fusão e odor característico da amina de partida. GC-FID na pág. 136.

*Espectros de GC-MS nas págs. 129-135.

^aRefere-se à evaporação completa do solvente deixando o resíduo cru.

^bOs rendimentos isolados dessas cloraminas não refletem o alto rendimento da reação. Ver rendimentos dos seus produtos de desidrocloração **3a** e **3b** no esquema 23.

Cabe destacar, a observação de que as N-cloraminas **2a**, **2c** e **2f** degradam com facilidade quando armazenadas sem solvente. O composto **2a**, quando mantido em contato com

a atmosfera do laboratório durante 4 dias formou lentamente grandes cristais de piperidina cloridrato, **2ai** (págs. 130-131), que foram isolados facilmente do óleo (que se tornou marrom) por intermédio de uma lavagem com acetona à temperatura ambiente. Os compostos **2c** e **2f** mudam paulatinamente a sua cor até se tornar um óleo marrom de alta viscosidade e com menor solubilidade em solventes orgânicos. Os produtos de degradação destas duas últimas cloraminas não foram identificados.

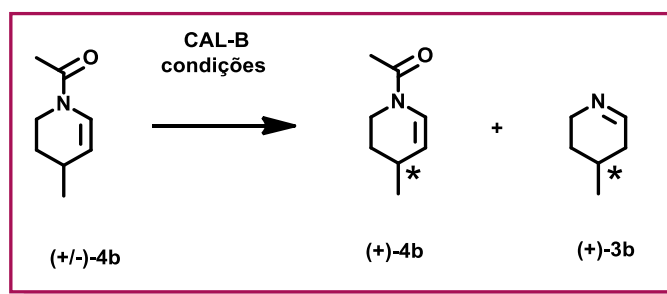
Como consequência da instabilidade de algumas cloraminas e sua elevada volatilidade, tornou-se um desafio conhecer o rendimento real dos compostos clorados. Como exemplo, pode ser feita uma comparação das entradas 1 e 4 da tabela 1. As notáveis diferenças entre os rendimentos isolados das cloraminas (**2a** = 14.42% e **2d** = 74.46%) podem ser explicadas considerando as diferenças entre os pontos de ebulição entre elas. O composto **2d** é um sólido a temperatura ambiente, enquanto que **2a** se apresenta como um líquido de alta volatilidade, o que pôde ter levado à perda significativa de produto quando evaporado à vácuo. Os rendimentos isolados totais das iminas **3a** (76.27%) e **3b** (83.77%) são um claro indicativo de que a conversão da piperidina de partida deve ser quase completa, o que também foi possível confirmar através de CCD, e que deve então existir uma perda significativa de produto durante a vaporização do solvente, especialmente quando se trabalha com pequenas quantidades (< 5 mmol).

3.4 RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA

3.4.1 Resolução cinética enzimática de (+/-)-1-(4-metil-3,4-diidropiridin-1(2H)-il)etanona, **4b**.

A enamida (+/-)-1-(4-metil-3,4-diidropiridin-1(2H)-il)etanona, (+/-)-**4b**, foi empregada como substrato em estudos de hidrólise enzimática visando à preparação da imina 4-metil-2,3,4,5-tetraidropiridina, **3b**, em sua forma enantioenriquecida.[‡]

[‡] Ensaio de rotação óptica em Anexos, seção 0



Esquema 25 — Resolução cinética enzimática de (+/-)-4b promovida por CAL-B.

Para isso, inicialmente testou-se a quimiosseletividade da enzima utilizando uma mistura de (+/-)-1-(4-metil-3,4-diidropiridin-1(2H)-il)etanona, (+/-)-**4b**, e o seu análogo, a amida 1-(4-metilpiperidin-1-il)etanona, como substratos. O resultado foi que a CAL-B não mostrou nenhum tipo de enantiosseletividade frente à amida, mas sim frente à enamida. Isso nos confirma a quimiosseletividade da reação nas condições testadas e nos leva a pensar que a dupla ligação cumpre uma função essencial na atividade catalítica da CAL-B (figura 26).

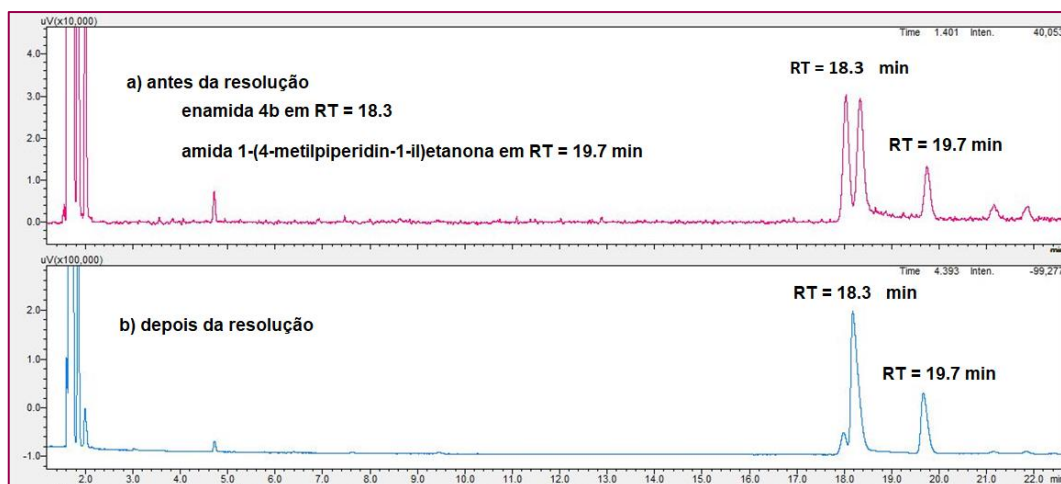


Figura 26 — Ensaio de quimiosseletividade para a CAL-B respeito à enamida 4b. Condições: solvente Pi 8, 35 °C, 4 dias de resolução, RPM 150. Escala 10 mg de mistura, 5 mg de CAL-B, 1 mL de solvente. Enzima CAL-B Novozym® 435.

Outro teste inicial foi feito com a finalidade de confirmar a participação da CAL-B sobre a transformação química mostrada no esquema 25. Para isto, colocou-se o substrato nas mesmas

condições iniciais do experimento de quimiosseletividade, mas na ausência da enzima e em condições alcalinas (Pi 9) para descartar hidrólise básica do substrato. Não observou-se consumo do substrato nestas condições, o que nos indica que a ação da enzima é necessária para a reação de hidrólise tomar lugar nessas condições.

Tendo realizado os experimentos iniciais, ensaios de otimização das condições para a reação enzimática foram realizados. Os estudos envolveram a análise da influência de diversos fatores sobre a seletividade da enzima, como triagem de solvente, pH, co-solventes, tempo reacional, concentração do substrato, proporção enzima/substrato, temperatura e tipos de lipases.

Os resultados da otimização de algumas condições são mostrados na tabela 2 a seguir.

Tabela 2 — Otimização de condições da resolução cinética enzimática de 4b mediada por CAL-B: estudo da influência do solvente, pH, tempo de resolução e proporção de enzima/substrato no excesso enantiomérico do substrato.

#	Solvente/Sistema de solventes	Excesso enantiomérico de 4b (%)				
		1 dia	2 dias	3 dias	4 dias	5 dias
1	Água destilada	09.47 ^a	08.67 ^a	5.23 ^a	8.18 ^a	-
2	Hexano	19.40 ^b	56.67 ^b	-	-	-
3	THF	04.85 ^b	-	-	19.68 ^b	-
4	Acetonitrila	06.94 ^b	-	-	03.80 ^b	-
5	Etanol/Pi 7- 1:1 v/v	07.11 ^a	-	-	-	-
6	Metanol/Pi 7- 1:1 v/v	02.92 ^a	-	-	-	-
7	DCM/Pi 7 -1:14 v/v	10.50 ^d	-	-	-	-
8	Etanol/Pi 7- 1:14 v/v	10.05 ^d	-	-	-	-
9	Glicerol/Pi 7 - 1:1 v/v	19.50 ^c	-	-	-	-
10	THF/Pi 7 - 1:14 v/v	12.62 ^d	-	-	-	-
11	Pi 7.0	17.8 ^a	13.2 ^a	17.8 ^a	13.79 ^a	-
12	Pi 8.0	42.66 ^b	-	-	88.54 ^b	-
13	Pi 8.0	-	-	-	86.00 ^e	-
14	Pi 4.0	04.79 ^c	-	-	-	-
15	Pi 5.0	26.80 ^c	-	48.96 ^c	-	-
16	Pi 6.0	38.19 ^d	-	56.93 ^c	-	-
17	Pi 6.5	47.12 ^d	53.64 ^d	60.82 ^c	63.86 ^c	45.23 ^d
18	Pi 7.0	52.79 ^c	65.02 ^c	66.48 ^c	67.99 ^c	55.23 ^d
19	Pi 7.5	42.21 ^c	65.48 ^c	64.95 ^c	69.13 ^c	-
20	Pi 8.0	50.60 ^d	52.88 ^d	68.05 ^c	71.15 ^c	73.02 ^d
21	Pi 8.5	15.75 ^c	-	40.56 ^c	-	-
22	Pi 9.0	19.71 ^c	-	-	-	-

*Dias = tempo de reação

*O substrato é (+/-)-**4b** e a enzima utilizada em todas as reações foi CAL-B (Novozym® 435)

*Todas as reações foram efetuadas em 35 °C, com rpm em torno de 150 no agitador elétrico.

^a Escala 9 mg de **4b**, 30 mg de CAL-B, 1 mL de solvente (E:S = 3:1)

^b Escala 200 mg de **4b**, 100 mg de CAL-B, 20 mL de solvente (E:S = 1:2)

^c Escala 10 mg de **4b**, 10 mg de CAL-B, 1 mL de solvente (E:S = 1:1)

^d Escala 7 mg de **4b**, 7 mg de CAL-B, 1 mL de solvente (E:S = 1:1)

^e Escala 20 mg de **4b**, 10 mg de CAL-B, 2 mL de solvente (E:S = 1:2)

Da tabela 2, as condições que foram escolhidas para se manter durante o seguimento dos estudos de otimização são:

Solvente: tampão Pi 8

Tempo de reação: 4 dias

3.4.1.1 Estudo das concentrações

Para continuar, decidiu-se fazer um estudo das quantidades relativas e concentrações do substrato e a enzima na reação, e assim, determinar a melhor proporção enzima/substrato (E:S) e concentração do substrato a utilizar para continuar a otimização. A única temperatura até então testada nos experimentos fora 35 °C, e, embora os excessos enantioméricos resultaram satisfatórios mantendo o sistema nessas condições, considerou-se necessário determinar até que ponto mudanças pequenas de temperatura poderiam influenciar a seletividade da CAL-B, quando as concentrações do substrato e enzima também são variáveis. Assim, os novos testes foram conduzidos em duas temperaturas: 35 °C e 30 °C.

Nenhum dos excessos enantioméricos observados foi considerado aceitável quando a proporção enzima/substrato foi de 3:1. Por outro lado, a utilização da mesma concentração para **4b** e CAL-B forneceu resultados satisfatórios, relativos à seletividade da reação (tabela 1). Esses resultados nos deram indícios para hipotetizar que melhores resultados poderiam ser obtidos se o substrato estivesse em uma concentração maior que a da enzima. Sendo assim, foram testadas diferentes concentrações de **4b** para uma E:S determinada, que permitissem a escolha da melhor concentração de enzima e substrato a utilizar (tabela 3).

Tabela 3 — Estimação da dependência do excesso enantiomérico de **4b respeito às quantidades de substrato e enzima após 4 dias de resolução enzimática mediada por CAL-B em Pi 8 e em diferentes temperaturas.**

#	Concentração do substrato (mg/mL)	Excesso enantiomérico / E:S	
		30 °C	35 °C
1	2	-	46.19 / 1:2
2	3.33	-	60.28 / 1:2
3	5	70.2 / 1:1	75.24 / 1:2
4	7.5	60.80 / 1:3	-
5	10	82.64 / 1:2 70.50 / 1:3	86.00 / 1:2 82.82 / 1:3
6	15	79.33 / 1:3	-
7	20	81.61 / 1:4	-
8	25	78.47 / 1:5	-
9	30	78.91 / 1:3	-

Para determinar se existe uma relação entre as concentrações iniciais do substrato, a temperatura e a proporção E:S, com a seletividade da reação, alguns dados da tabela 3 foram traçados em gráficos (figuras 27 e 28). Na figura 27 se apresenta a dependência do *e.e.* de **4b** e com a sua concentração inicial, para duas temperaturas (30 °C e 35 °C), e diferentes proporções E:S. Se olhar o padrão das curvas, é possível identificar como, até certo limite, a seletividade da reação (*e.e.* de **4b**) incrementa com o aumento na concentração inicial do substrato, **4b**. Esse limite de concentração parece ser de 15 mg/mL para 30 °C, E:S 3:1. Daqui, pode ser inferido que para a combinação de condições (35 °C, E:S=1:2) existe um limite de concentração a partir do qual a seletividade não melhoraria. No gráfico é possível identificar que é este ponto que representa a melhor combinação de temperatura e proporção E:S para otimizar a seletividade da reação. Embora as proporções E:S utilizadas nos experimentos não fossem correspondentes, é possível observar que quando os testes são realizados em 35°C e com uma proporção E:S de 1:2, a seletividade da reação é favorecida, e o comportamento da curva sugere que é possível

chegar num maior valor máximo de *e.e.* para **4b**, se comparado com as outras condições testadas (30° e E:S = 1:3). Com base nesses dados, espera-se um maior valor de *e.e.* utilizando valores de concentrações iniciais, para **4b**, dentro da faixa de 10-20 mg/mL, nessas melhores condições. Com todos esses dados disponíveis, é possível inferir que a proporção E:S, a concentração inicial de **4b** e a temperatura são fatores que influenciam a seletividade da reação. Isto concorda com o comportamento de uma reação enzimática que segue a cinética de Michaelis-Menten. Em este tipo de reações, na etapa inicial, reação é de ordem zero, pois a velocidade de reação, *V*, é linearmente proporcional à concentração do substrato, [S]. Na medida que a reação avança, quando se chega ao chamado *ponto de saturação* da enzima, a reação começa a se mostrar de primeira ordem. Isto é, *V* não é mais dependente de [S]. É exatamente isso que observamos na figura 27. A comparação torna-se interessante porque isso pode ser um indicativo do tipo de ligação entre nosso substrato, **4b**, e a enzima CAL-B, além da cinética de nossa reação.

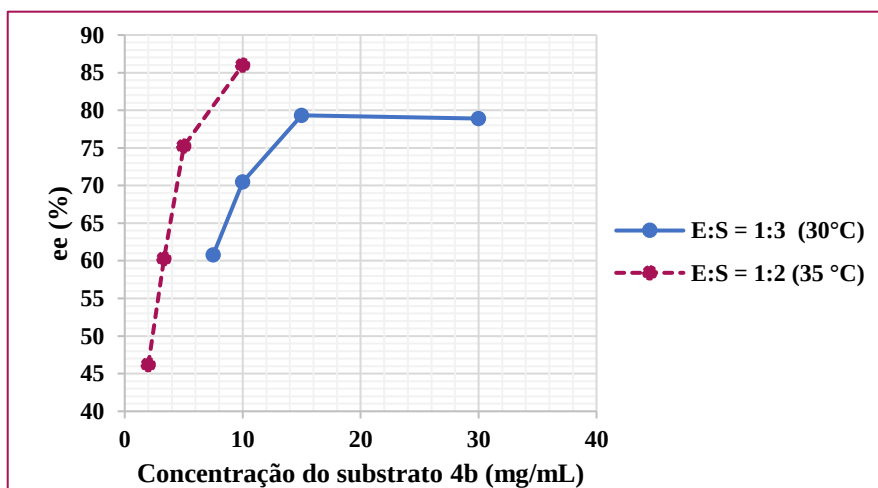


Figura 27 — Dependência do e.e. com a concentração de **4b**.

Para indagar mais um pouco no assunto, torna-se interessante a análise da dependência da proporção E:S e a temperatura com o *e.e.* de **4b**. Na figura 28 pode se apreciar que existe uma proporção E:S ótima de 1:2 para ambas temperaturas. Ademais, se observa novamente o favorecimento do *e.e.* de **4b** na maior temperatura (35 °C). Embora as concentrações iniciais de **4b** utilizadas nesses experimentos variaram, é interessante salientar que o comportamento das curvas é similar para ambas temperaturas.

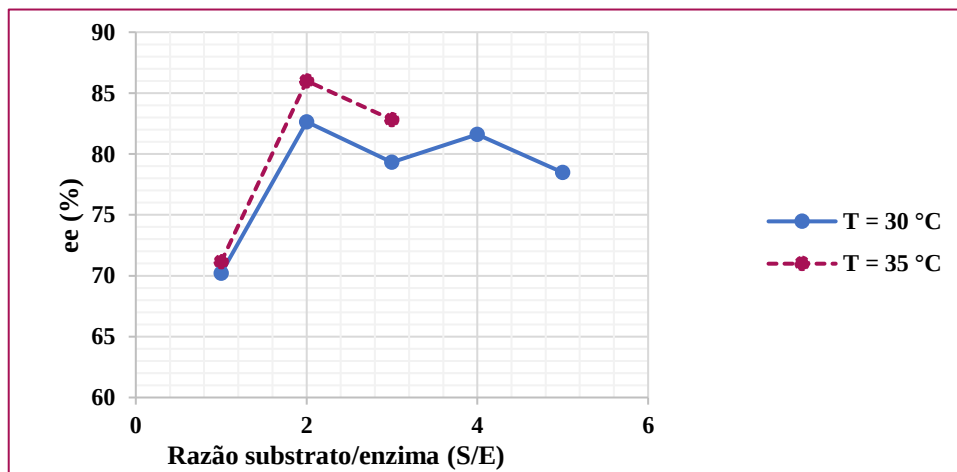


Figura 28 — Excesso enantiomérico de 4b versus a razão substrato/enzima (4b/CALB) em massa.

Desses experimentos decidiu-se continuar com os testes de otimização de condições utilizando uma proporção E:S de 1:2, em escala de 10 mg/mL de substrato **4b** e 5 mg/mL de enzima CAL-B (o mínimo necessário para otimizar o custo-benefício do estudo). A temperatura de 35 °C continuou a ser a escolhida para a realização dos testes.

3.4.1.2 *Triagem de temperaturas*

Como resultado dos estudos de concentrações, foi possível identificar 10 mg/mL para **4b** e 5 mg/mL para CAL-B como as concentrações mais adequadas para otimizar a temperatura da reação. As condições de solvente (Pi 8) e tempo de resolução de 4 dias foram mantidas. A agitação também foi mantida constante durante todos os experimentos e a enzima utilizada continuou a ser CAL-B imobilizada (Novozym® 435). Dessa forma, foi feita uma triagem de temperaturas para as melhores condições até então testadas para a reação em questão. Devido a que os resultados mostraram que a escala não afeta significativamente a seletividade da reação, alguns testes conduzidos em diferentes escalas foram levados em consideração, mantendo as concentrações do substrato de enzima constantes e iguais à 10 e 5 mg/mL respectivamente. Os

resultados são mostrados na figura 28 e as especificações das escalas utilizadas são apresentadas na tabela 4. Para cada temperatura, os valores de *e.e.* foram determinados apenas em um experimento só. Os resultados não correspondem a médias de diversas repetições.

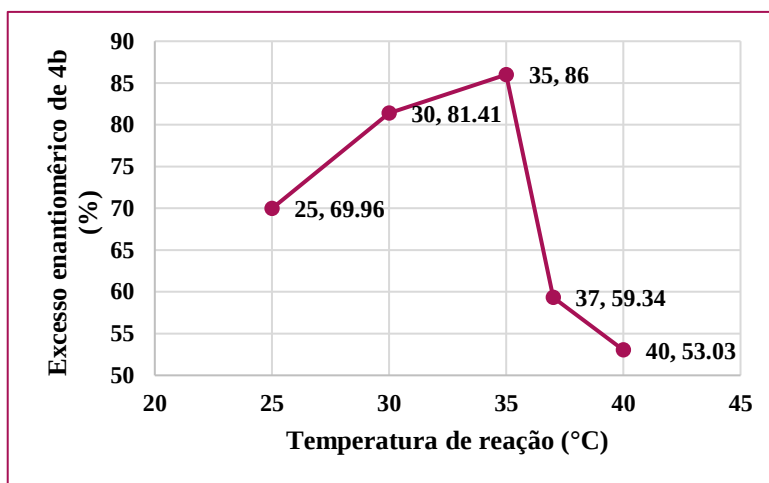


Figura 29 — Dependência da seletividade da reação de hidrólise de 4b mediada pela enzima CAL-B, com a temperatura de reação, após 4 dias de resolução.

Tabela 4 — Escalas utilizadas nos testes para a triagem de temperaturas.

#	Temperatura	%ee	Escala utilizada: mg de 4b / mg de CAL-B / mL de Pi 8
1	25	69.96	10.00 / 5.00 / 1.00
2	30	81.41	40.00 / 20.00 / 4.00
3	35	86.00	20.00 / 10.00 / 2.00
4	37	59.34	10.00 / 5.00 / 1.00
5	40	53.03	10.00 / 5.00 / 1.00

*Condições: solvente: Pi 8, tempo de reação = 4 dias, RPM em torno de 150, substrato (+/-)-**4b**, enzima CAL-B (Novozym® 435).

Da equação de Arrhenius (equação 2) sabemos que a temperatura influi na constante de velocidade de uma reação (*k*).⁹⁹ Daí, se espera que ao aumentar a temperatura da reação *T*,

exista um aumento exponencial do valor da constante de velocidade da reação, e por tanto da velocidade da mesma. Se a cinética de cada um dos enantiômeros é diferenciada, e se considerarmos a possibilidade de que as constantes de velocidade de cada um deles se comporte de maneira diferente com as mudanças de temperatura, então poderia se esperar que pequenos aumentos de temperatura dentro de uma faixa restrita (menor a 37 °C) possam aumentar a velocidade de reação para um enantiômero em detrimento do outro. Isso então poderia ser uma causa do aumento do valor do *e.e.* com o incremento da temperatura na faixa 25-35 °C da figura 29. No entanto, a explicação desse fenômeno poderia ser um pouco mais complexa do que isso.

$$k = A(e^{-E_a/RT})$$

Equação 2 — Equação de Arrhenius; onde k =constante de velocidade da reação; A = frequência das colisões moleculares; E_a = energia de ativação requerida (J/mol); R = constante dos gases (8,314 J/mol K), T = temperatura em K.

A dependencia da enantiosseletividade de reações enzimáticas com a temperatura já foi demonstrada pela primeira vez em 1989.¹⁰⁰ Existem varios estudos que tentam determinar a influencia da temperatura na enantiosseletividade de reações enzimáticas,¹⁰¹ e especificamente na resolução de misturas racêmicas. Como resultado desses estudos, em geral, baixas temperaturas tendem a aumentar a enantiosseletividade, por considerações termodinâmicas.¹⁰² No entanto, nem todos os resultados são coerentes com essa tendencia. Têm se observado diminuições, aumentos e não dependencia da enantiosseletividade com a temperatura da reação.¹⁰² Isso é resultado da relação do valor da razão enantiomérica (*E*) com a diferença na energia livre de ativação ($\Delta\Delta G^\ddagger$), e por sua vez, a dependência desta última com as diferenças de entalpia e entropia de ativação, e a temperatura,¹⁰³ como mostrado na equação 3. É bem sabido também que outros fatores como o solvente e o pH influenciam na enantiosseletividade enzimática, e que, também podem afectar os efeitos da temperatura no sistema.¹⁰⁴

$$\Delta\Delta G^\ddagger = -RT\ln E = \Delta\Delta H^\ddagger - T\Delta\Delta S^\ddagger$$

Equação 3 — Correlação entre a diferença de energia livre de ativação, as diferenças de entalpia e entropia de ativação, a temperatura e a razão enantiomérica.

É possível que existam outros fatores que interferem com a enantiosseletividade, e por tanto, causam uma diminuição nos valores de *e.e.* do substrato residual **4b** (figura 29). Alguns destes fatores poderiam incluir a estabilidade térmica da CAL-B, que em meio aquoso já tem apresentado diminuição da atividade por causa de denaturização da estrutura proteínica em temperaturas iguais ou maiores à 40 °C.^{105,106} Com isso, resulta interessante comparar esses dados com os resultados dos experimentos apresentados neste trabalho, onde foi determinada uma temperatura ótima de 35 °C para garantir a máxima enantiosseletividade da reação, e que também poderia se encontrar relacionada com a velocidade da reação enzimática, como foi visto na figura 27, que segue um padrão que lembra da cinética de Michaelis-Menten. Sob as condições utilizadas nos experimentos, e para temperaturas maiores a 37 °C, a CAL-B provavelmente começa a sofrer mudanças conformacionais que causam uma diminuição da atividade, o que está evidenciado pela diminuição drástica do valor do *e.e.* de **4b** na figura 29.

3.4.1.3 Comparação da atividade de outras lipases com a CAL-B.

Com a finalidade de acrescentar os estudos de condições da RCE de **4b**, foi feita uma triagem de lipases nas condições otimizadas. Os resultados dos excessos enantioméricos de **4b** são apresentados na tabela 5. Destes estudos pôde-se confirmar a seletividade diferenciada da CAL-B na reação de hidrólise (figura 30), se comparada com as outras lipases testadas. Dos resultados, nenhuma das lipases (dentre elas, duas imobilizadas), mostrou melhor seletividade para a reação do que CAL-B. Além disso, nenhuma delas pareceu ter consumido o substrato em algum grau (figura 31).

Tabela 5 — Comparação da ação da CAL-B com outras lipases nas melhores condições encontradas para a reação, após 1 e 4 dias de resolução.

#	Lipase	%ee de 4b	
		1 dia	4 dias

1	CAL-B ^a	42.66 ^b	88.54 ^b
2	Amano lipase g from <i>Penicillium camemberti</i>	05.64 ^b	07.62 ^b
3	<i>Alcaligenes</i> spp lipase (Alphamerix A2 AE 011 preparation)	08.89 ^c	07.22 ^c
4	<i>Pseudomonas</i> lipase TL ^a	06.70 ^c	06.24 ^c
5	Novozyme nm-im ^a	06.10 ^c	07.26 ^c
6	<i>Candida rugosa</i> lipase (CRL)	06.74 ^c	10.71 ^c

*Condições: solvente: Pi 8, tempos de reação = 1 dia e 4 dias, RPM em torno de 150, substrato (+/-)-**4b**, temperatura 35 °C

^aEnzima imobilizada.

^bEscala 200 mg de substrato, 100 mg de enzima, 20 mL de solvente.

^cEscala 100 mg de substrato, 50 mg de enzima, 10 mL de solvente

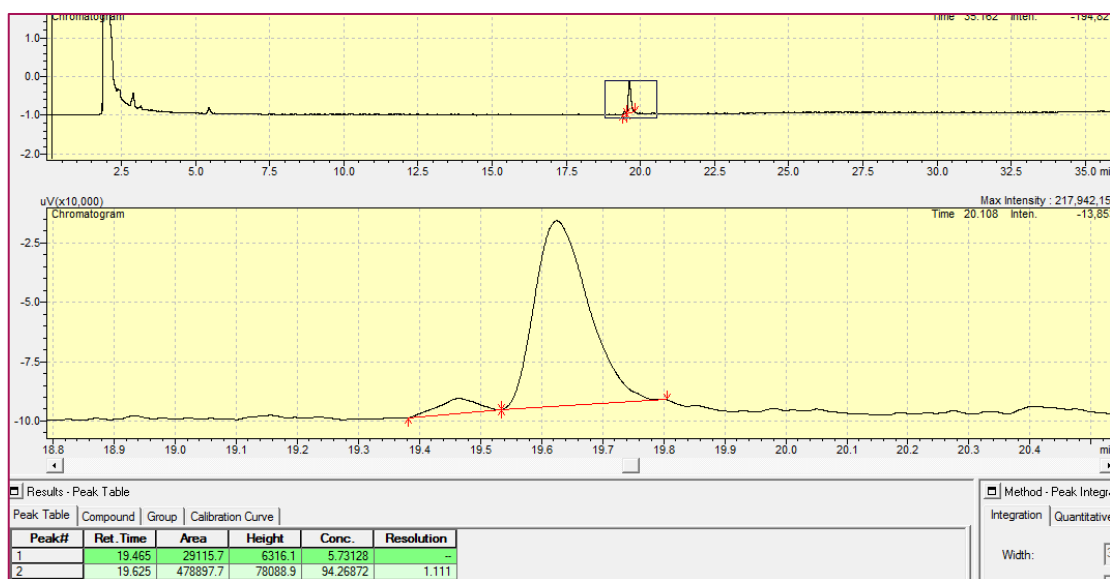


Figura 30 — Determinação do excesso enantiomérico ($ee = 88.54\%$) do substrato 4b depois de 4 dias de resolução cinética enzimática, nas condições otimizadas: 200 mg de 4b, 100 mg de CAL-B, 20 mL de Pi 8, 35 °C e RPM = 150. *Coluna de fase estacionária quiral, Método A (pág. 150).

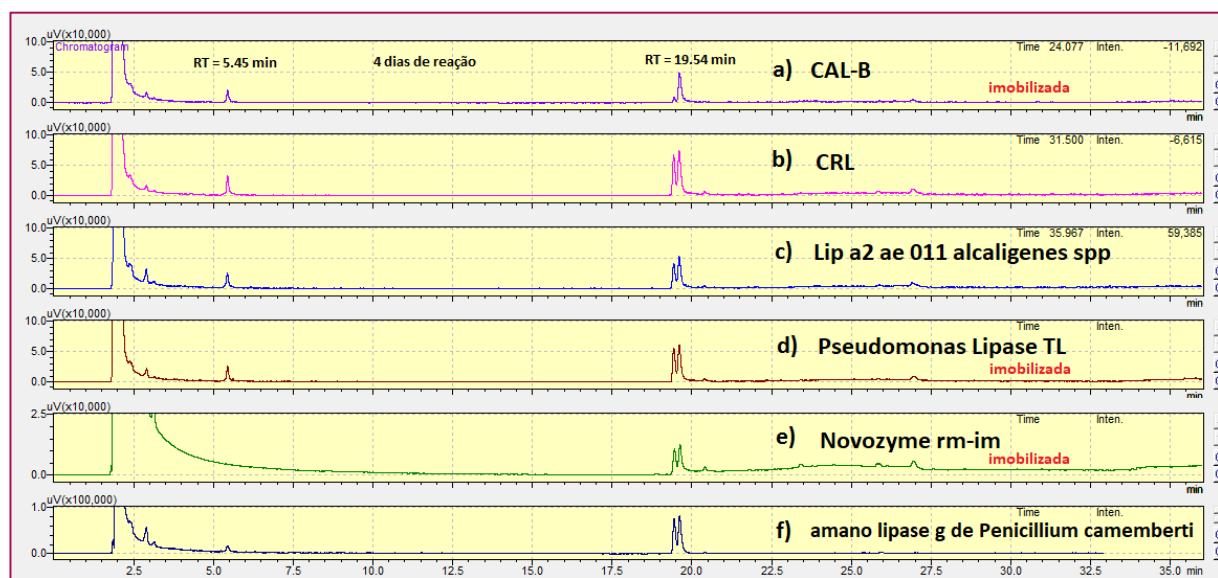


Figura 31 — Cromatogramas de GC-FID para os testes de RCE de 4b com diferentes lipases, nas condições otimizadas. *Coluna quiral, Método A (pág. 150).

3.4.1.4 Detecção do produto de resolução

Devido à dificuldade para identificar o produto da resolução através de GC-FID (figura 32) e GC-MS, foi preciso procurar outras técnicas que permitissem confirmar a formação da imina **3b**.

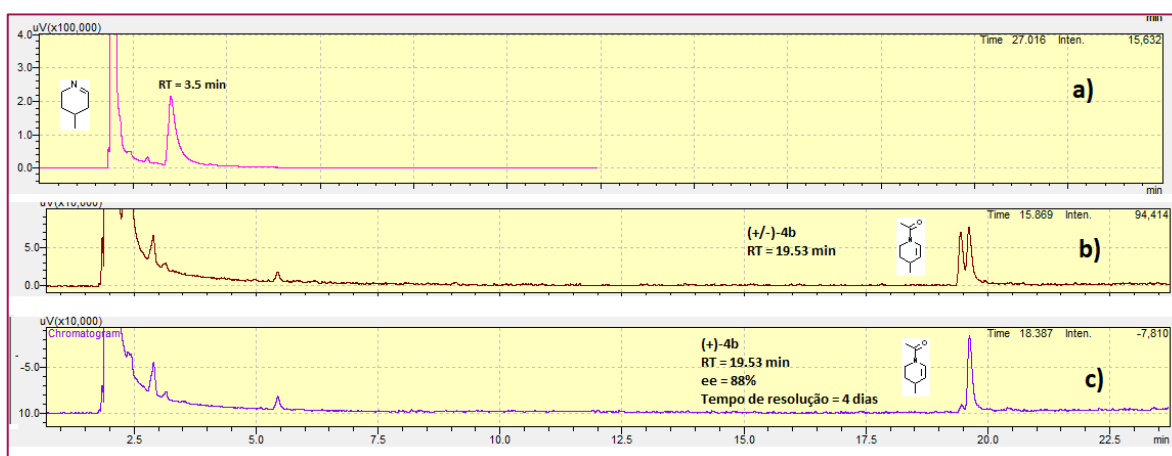


Figura 32 — Acompanhamento da resolução via GC-FID: a) padrão de 3b; b) padrão racêmico de 4b; c) produto da resolução extraído com DCM/acetato de etila aos 4 dias de reação, nas condições otimizadas. *Coluna quiral, Método A (pág. 150).

Aproveitando a luminescência das iminas **3a** e **3b**, foi possível realizar um acompanhamento da formação de **3b** depois da resolução cinética enzimática da enamida **4b** por meio da comparação visual da luminescência de **4b**, baixo luz UV (não detectável ao olho nu), **3b** (ativo) e o produto de resolução (ativo) (figura 33). Aqui, foi possível inferir a formação da imina como produto da hidrólise enzimática.

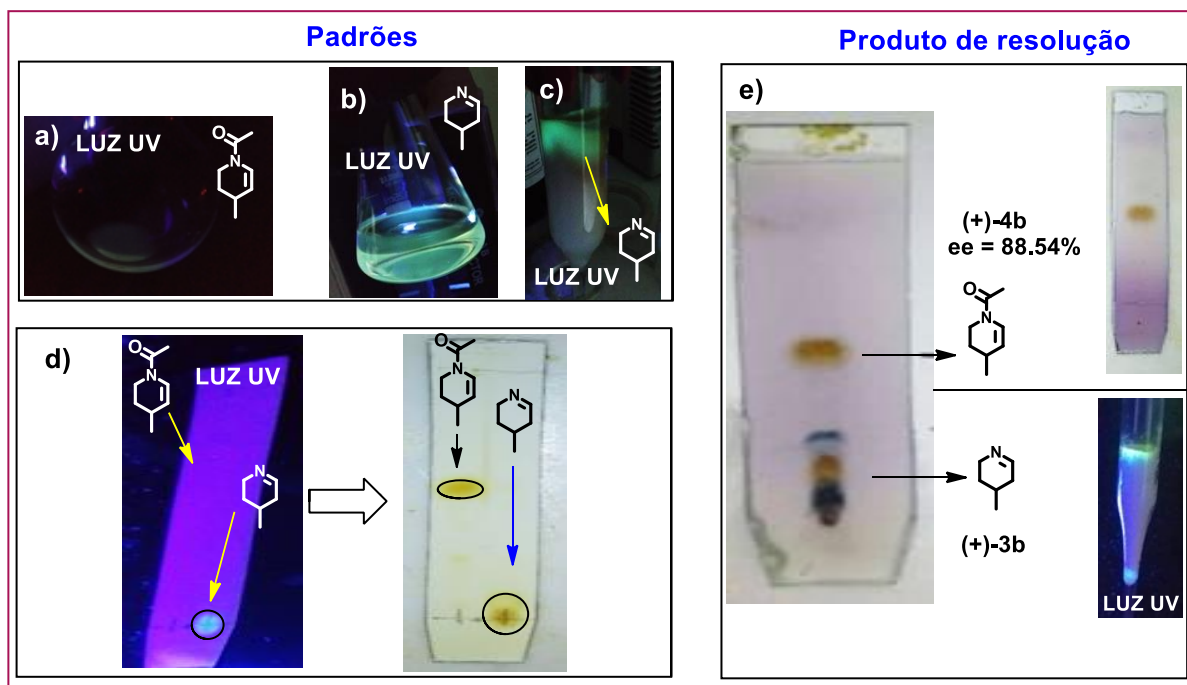


Figura 33 — Detecção do produto de resolução: a) 4b baixo luz UV (inativa); b) 3b baixo luz UV (ativa), c) separação por coluna de uma mistura de 3b e 4b baixo luz UV. A imina luminescente 3b é retida na sílica mais fortemente; d) CCD de 4b e 3b, respectivamente, baixo luz UV (esquerda) e logo com revelador de iodo (direita). A enamida é invisível ao olho nu baixo a irradiação da luz UV; d) CCD do produto de resolução revelado com vapores de iodo e vanilina antes e após a separação e identificação dos componentes majoritários. *CCD com placa de sílica e fase móvel Hexano/Acetato de etila 1:1.

Para tentar melhorar a compreensão do fato da imina não poder ser observada como produto de resolução através de GC, foi efetuado um experimento com o padrão racêmico de **3b**, que consistiu em colocá-lo nas as mesmas condições otimizadas para a resolução de **4b**, e observar se ele era consumido durante a reação. Como pode ser observado na figura 34, a alíquota que foi tomada após 24 horas mostra o pico esperado com o tempo de retenção do padrão da figura 32 (a) (3.5 min), e inclusive gerando um pico largo como é caraterístico dos compostos com capacidade de formar pontes de hidrogênio, dentro dos quais se encontram as iminas. Após 4 dias de reação, parece ter sido consumida, embora não completamente, e sem formação aparente de nenhum outro composto. Este fato pode servir como fundamento numa tentativa de explicar a ausência do pico da imina **3b** no produto de resolução. É provável que a imina esteja sofrendo

hidrólise lenta nas condições da reação para formar o aminoaldeído correspondente. Devido ao baixo ponto de ebulição desse, não poderia ser observado com essa rampa de temperaturas. Em adição, já foi percebido que o fator resposta de **3b** é menor do que para a enamida **4b**, o substrato da resolução. Os testes na ausência e presença de CAL-B da figura 34 sugerem que a enzima não é capaz de hidrolisar a imina nas condições usadas.

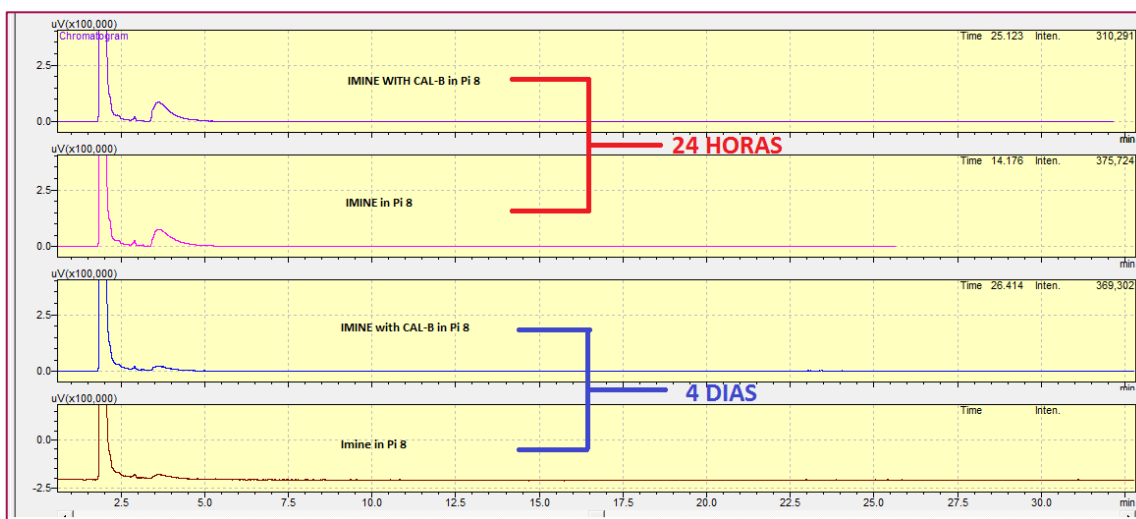
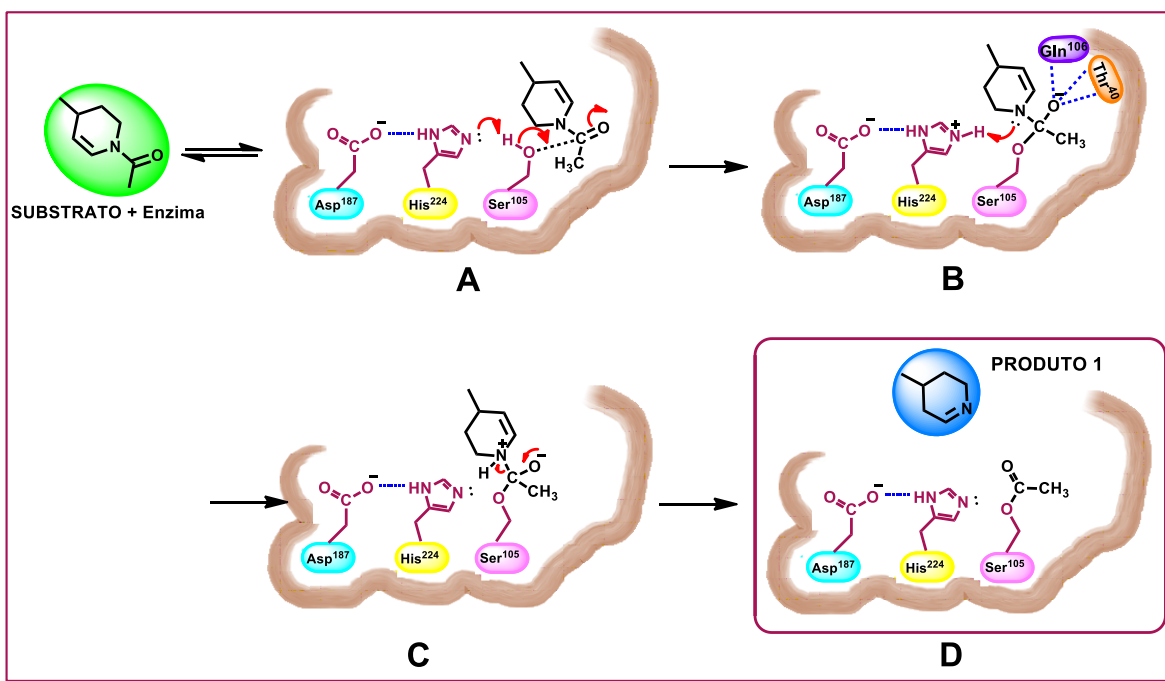


Figura 34 — Monitoramento da imina nas condições otimizadas de resolução, sem e com enzima. *Coluna fase estacionária quiral, Método A (pág. 150).

O mecanismo catalítico proposto para a reação de hidrólise da enamida **4b** catalisado pela CAL-B é mostrado no esquema 26. Após a formação do complexo enzima-substrato, E-S, se espera um ataque nucleofílico ao grupo carbonila da enamida **4b**, por parte do resíduo de aminoácido Ser105. Este ataque é facilitado pela ação como base geral de Bronsted-Lowry da His224 ao aceitar o próton do grupo OH da Ser105 (etapa A). Na seguinte etapa (etapa B), se espera a formação do intermediário tetraédrico estabilizado pela cavidade de oxiânion como resultado da etapa anterior. Este intermediário pode colapsar por causa da captação do próton da His224 pelo par de elétrons desemparelhados do nitrogênio no intermediário tetraédrico (etapa C), liberando assim o produto de hidrólise (a imina **3b**, produto 1, etapa D), e, depois de subsequentes ataques nucleofílicos (por moléculas de água, álcoois ou aminas) no grupo carbonila do complexo acil-enzima, a provável liberação de outros produtos secundários.



Esquema 26 — Mecanismo catalítico proposto para a reação de hidrólise enzimática da enamida 4b mediada pela CAL-B.

3.4.2 Testes de resolução cinética enzimática para 4-metil-2,3,4,5-tetrahidropiridina (3b) sob as condições otimizadas com 4b.

A imina 4-metil-2,3,4,5-tetrahidropiridina, **3b**, foi utilizada como substrato para tentar realizar uma RCE através da sua acetilação enantiosseletiva. Para estes experimentos o substrato foi utilizado na sua forma de trímico (sólido) e dissolvido diretamente no solvente. Logo, o doador de acila foi adicionado e seguido da enzima, nas quantidades descritas na tabela 6, onde são descritas as observações feitas pois foi possível observar mudanças relativamente rápidas depois de misturar os reagentes.

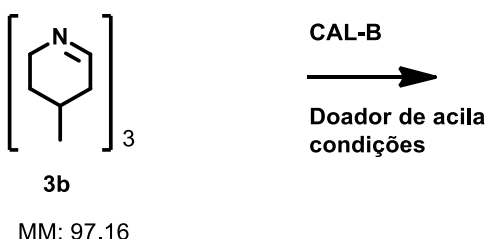


Tabela 6 — Testes de acetilação para 3b, com CAL-B, nas condições otimizadas com 4b

#	Solvente	Doador de acila	Observações
1	Acetato de etila/Pi 7 4:1	Acetato de etila	Após 24 horas, a cor amarela se tornou um pouco mais intensa e escura.
2	Acetato de etila	Acetato de vinila	Depois de uma hora a cor mudou de amarelo claro para amarelo laranja cada vez mais intenso. Às 24 horas a cor se tornou marrom avermelhado.
3	Acetonitrila	Acetato de vinila	Depois de uma hora a cor começou se tornar vermelho escuro. Às 24 horas de reação virou marrom escuro com formação de precipitado da mesma cor.
4	Hexano	Acetato de vinila	Depois de aproximadamente 10 minutos a cor amarela se intensificou. Às 24 horas de reação se formou uma segunda fase com aparência de óleo marrom. A fase do hexano permaneceu marrom clara.

Condições: 200 mg de **3b** (pesado em forma de trímero), 300 mg de CAL-B, 35 °C, rpm = 150, 1.2 eq de doador de acila (exceto para acetato de etila que esteve em excesso), 20 mL de solvente.

Na figura 35 se apresentam alguns cromatogramas de GC-FID para algumas entradas da tabela 6. Ao acompanhar as reações, para nenhuma delas foi observada a formação da

enamida, **4b**. No entanto, em todos os casos, o reagente de partida, **3b**, foi consumida completamente para dar surgimento a um novo composto. Comparando rapidamente os tempos de retenção e considerando propriedades físicas observadas, esse composto parece ser o mesmo para todos os casos excetuando a acetilação sem acetato de vinila efetuada em acetato de etila (entrada 1 da tabela 6). Nenhum dos produtos das reações pôde ser identificado ainda, mas espera-se que sejam produtos de adição ao carbono de C=N e um produto de acetilação, respectivamente.

Apesar de ter se usado uma coluna de fase estacionária quiral para a resolução, não se observou separação enantiomérica para nenhum dos casos o que pode indicar que a reação não é enantiosseletiva. Porém, das informações coletadas, é possível sugerir que a reação é catalisada por CAL-B nessas condições, pois a imina **3b** sempre se observou estável em acetato de etila à temperatura ambiente. Estudos associados estão sendo realizados atualmente no nosso grupo de pesquisa.

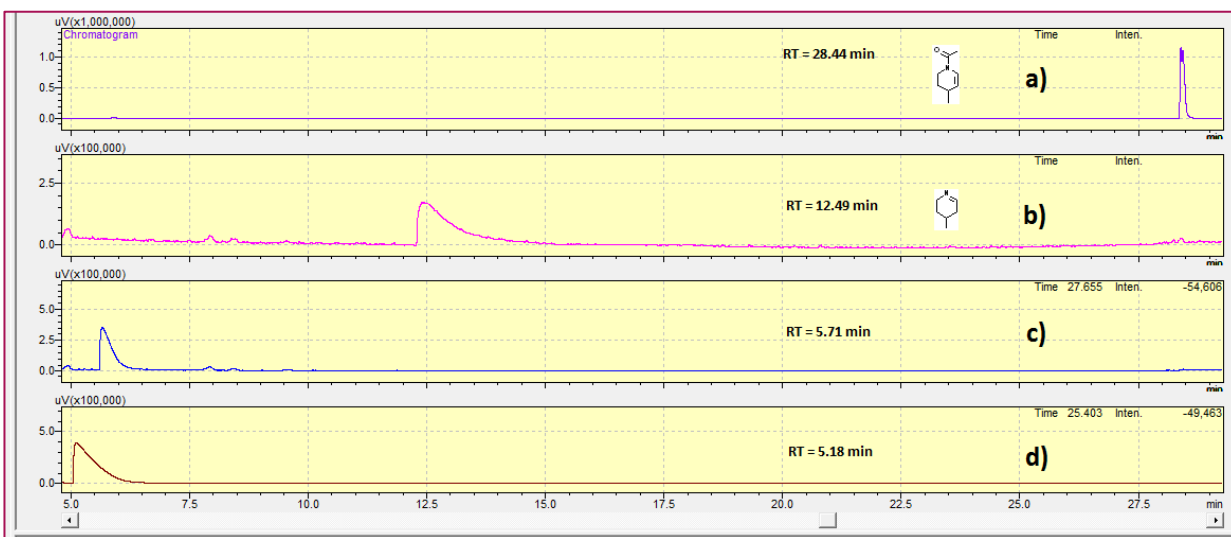
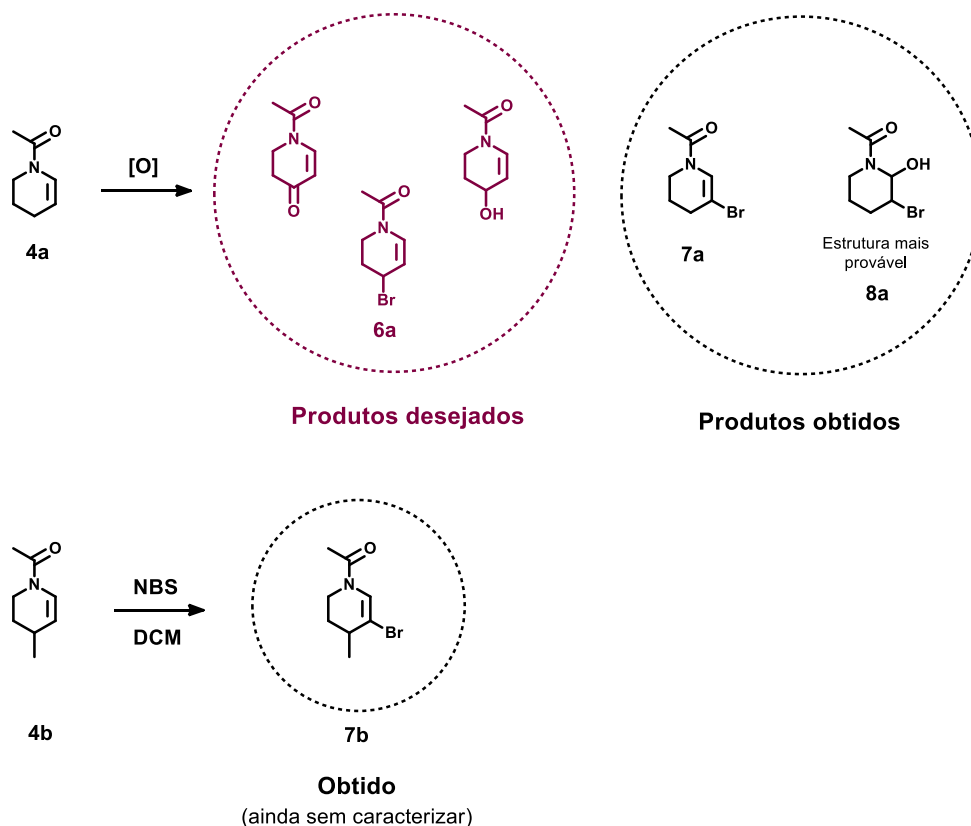


Figura 35 — Para a tabela 6: a) Padrão racêmico de **4b**, b) padrão de **3b**; c) produto de reação Entrada 2; d) produto de reação Entrada 1. *Coluna quiral. Método B (Anexo 0).

3.5 TESTES DE OXIDAÇÃO

Com a finalidade de preparar novas enamidas como substratos para resolução cinética enzimática e, em um início, visando a síntese de enamidas cíclicas 4-substituídas, o composto 1-(3,4-diidropiridin-1(2H)-il)etanona, **4a**, foi sujeito à testes de oxidação em uma tentativa de preparar 4-Bromo e 4-hidroxi vinilamidas e/ou enamionas cíclicas de seis membros.



Foram realizados diversos testes variando o agente oxidante, com base em condições reportadas na literatura para oxidação alílica de uma grande variedade de compostos cíclicos e heterocíclicos.^{44,107–110} As reações foram acompanhadas via GC-MS e os resultados com as condições correspondentes para cada reação se detalham na tabela 7.

Tabela 7 — Testes de oxidação para gerar enaminonas e enaminóis piperidínicos a partir de 4b

#	Reagente inicial	Condições	Resultados GC-MS
1	4a	0.5 eq CuBr 2 eq TBHP Tolueno Calor (50 °C)	A enamida foi consumida. Formação de um novo pico com m/z 105 (não identificado)
2	4a	0.5 eq CuBr 4 eq UHP Benzeno Refluxo	Apenas a enamida foi consumida. Não foi possível identificar a formação de um novo pico.
3	4a	4 eq PCC 4 eq TBHP Tolueno 25 °C	Consumiu todo. Mesmo pico m/z = 105 formado (não identificado)
4	4a	0.23 eq CuBr 2 eq H ₂ O ₂ O ₂ em excesso DCM 25 °C	Não consumiu toda a enamida Novos picos não identificados em RT = 16.30 min; m/z = 141 RT = 17.34 min; m/z = 189
5	4a	DCM + complexo de cobre ^a + O ₂ 25 °C	Consumiu todo. Mesmo pico m/z = 105 formado (não identificado)
6	4a	0.4 eq SeO ₂ 0.4 eq TBHP 25 °C	Novo pico em 11.95 m/z = 129
7	4a	0.4 eq SeO ₂ Dioxano 25 °C → refluxo	Não consumiu toda a enamida. Formou mistura complexa
8	4a	4.3 eq SeO ₂ Dioxano/água	Mistura complexa
	Cicloexeno	refluxo	Mistura complexa

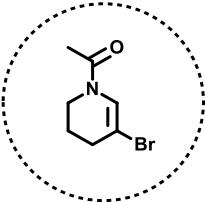
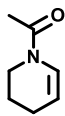
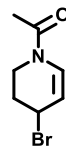
^aComplexo previamente preparado no grupo utilizando N1,N1,N2,N2-tetrametiletano-1,2-diamina e CuCl₂ em DCM.

3.5.1 Testes de bromação para 4a e 4b

Devido aos teste de oxidação direta com oxigênio, da enamida **4a** (tabela 7) não ter levado à formação de um único produto de oxidação, decidiu-se por testes de bromação da

enamida **4a** na posição alílica. As condições usadas foram adaptadas de bromações alílicas já reportadas na literatura.^{51,111} Os resultados são mostrados a seguir, na tabela 8.

Tabela 8 — Testes de bromação para 4a

 7a[*] MM: 204.06 NBS condições ←  4a MM: 125.17 NBS condições →  6a MM: 204.06							
#	Condições	Produto identificado	%Rendimento total ^b	#	Condições ^a	Produto identificado	%Rendimento total ^b
1	AIBN, NBS CCl ₄ /CHCl ₃ 9:1 25 °C 5 h	7a	-	5	AIBN, NBS DCM 25 °C 5 h	7a	44.19
2	AIBN, NBS Acetato de etila 25 °C 5 h	7a + subprodutos	-	6	NBS DCM 25 °C 4 h	7a	56.49
3	AIBN, NBS Acetonitrila 25 °C 5 h	7a	-	7	AIBN, NBS CCl ₄ Radiação UVA/UVC Temperatura ambiente 24 h	7a + outros produtos	24.14
4	AIBN, NBS Benzeno 25 °C 5 h	7a	-	8	AIBN, NBS CCl ₄ Refluxo hv = 589 nm 3 h	7a	56.23

*Caracterização de **7a** por RMN e GC-MS em pag. 137.

Na tabela 8 se observa que nenhum dos testes levou à formação do brometo alílico esperado, **6a**. Em seu lugar, todos geraram o brometo vinílico, **7a**. Apenas as reações em acetato de etila (entrada 2) e a que foi irradiada com luz UV (entrada 7) geraram subprodutos apreciáveis. A reação da entrada 8 na tabela foi a mais limpa, e o produto pôde ser caracterizado após extração e concentração, sem purificação posterior. A figura 35 mostra o acompanhamento das reações das entradas 1-4 via GC-FID e na figura 36 é possível observar a formação de **7a** e o consumo do reagente de partida **4a**, em todos os casos.

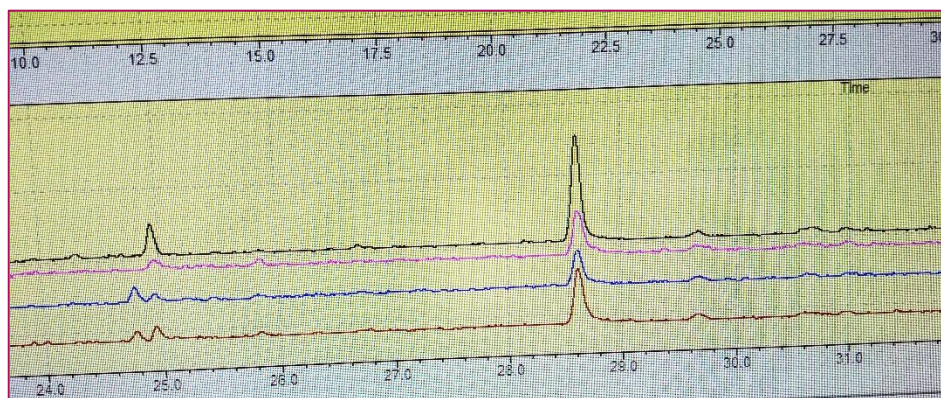


Figura 36 — Para a Error! Reference source not found.. Acompanhamento da reação para a formação do produto **7a** (28.6 min), para quatro solventes, na ordem de cima para baixo: DCM, Acetato de etila, $\text{CCl}_4/\text{CHCl}_3$ 9:1, acetonitrila, benzeno. *Coluna não quiral.

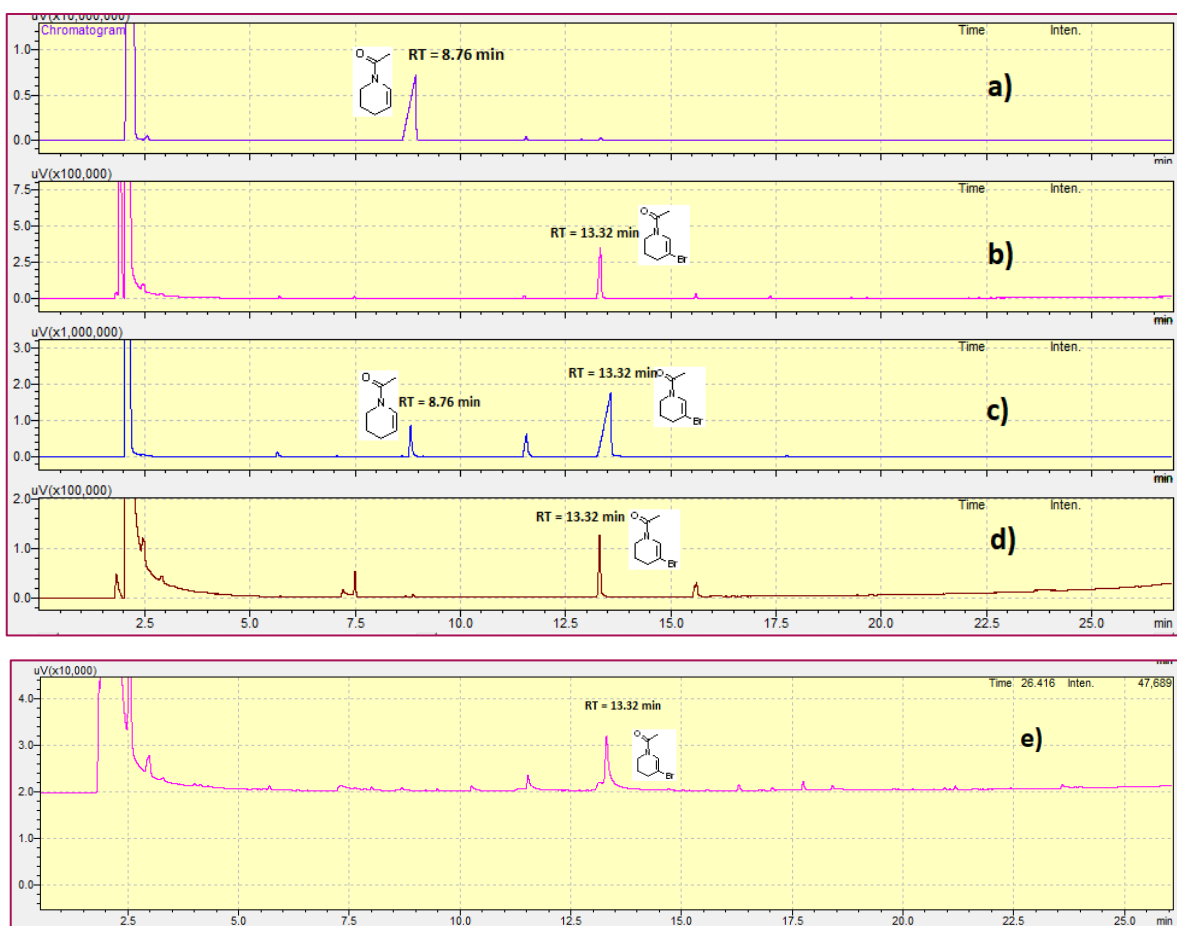
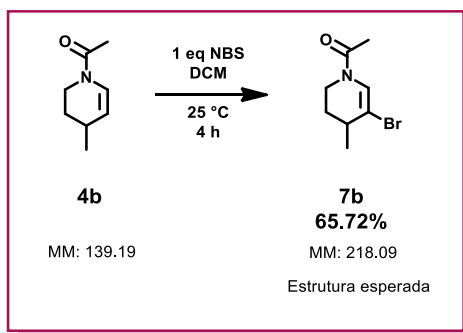


Figura 37 — Observação do produto 7a para quatro das reações da Tabela 8: a) Padrão de 4a; b) Item 8; c) Item 5; d) Item 7; e) Item 6. *Coluna não quiral. Método C.

Esses resultados poderiam indicar que o AIBN não teve participação nessas condições reacionais. Como consequência, se fizeram testes para determinar se **7a** poderia ser preparado apenas com NBS, à 25 °C em DCM. Os testes foram conduzidos com **4a** e **4b**. Porém, apenas foi possível acompanhar a reação da formação de **7b** (esquema 27 e figura 38) pois o primeiro teste para a formação de **7a** não pôde ser analisado nesse momento devido a problemas técnicos.



Esquema 27 — Síntese do brometo vinílico 1-(5-bromo-4-metil-3,4-diidropiridin-1(2H)-il) etanona (estrutura não confirmada).

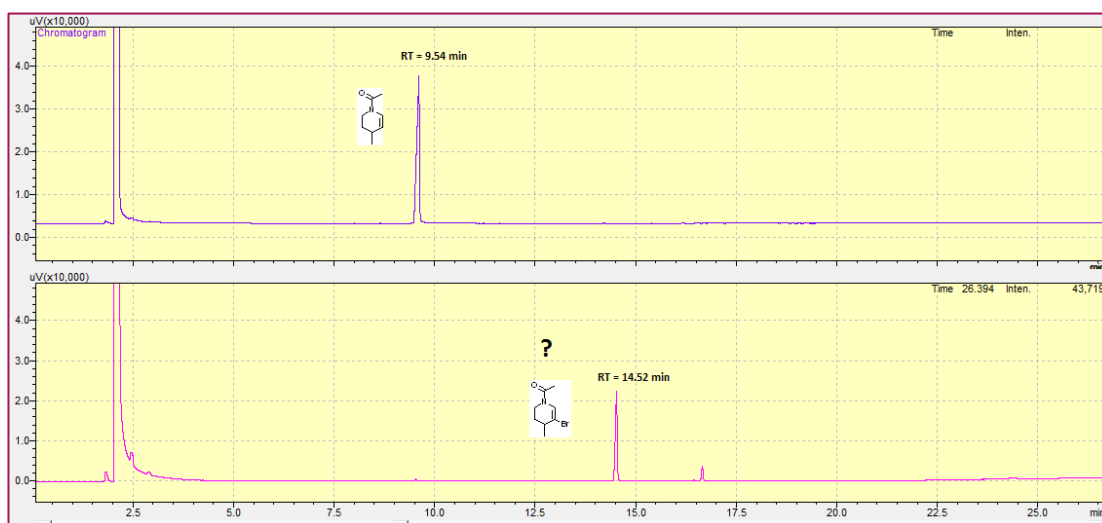


Figura 38 — Acompanhamento da reação para a formação do composto 7b (esperado). No cromatograma de cima se observa o pico correspondente ao padrão de 4b. No cromatograma de baixo é mostrado o pico correspondente ao produto da reação, após extração. *Coluna não quiral, Método C.

3.5.1.1 Testes de bromação com cicloexeno para comparação

Para verificar se as condições reacionais da seção 3.5.1 eram as corretas para uma bromação alílica padrão, se fizeram testes com cicloexeno, cuja bromação alílica já foi reportada por Davies et. al (2008).¹¹¹ Com isso, cicloexeno foi tratado com NBS baixo algumas das condições utilizadas nos testes com **4a** e **4b**.

Tabela 9 — Testes de bromação com NBS para cicloexeno

NBS condições 9a MM: 82.14 9b MM: 161.04 9c MM: 161.04			
#	Condições ^a	Produto identificado	%Rendimento total ^b
1	AIBN, NBS DCM/CCl ₄ 1:1 Refluxo 3 h	9b + subprodutos	43.12
2	AIBN, NBS CCl ₄ Radiação UVA/UVC Temperatura ambiente 24 h	9b + 9c + outros produtos maioritários	15.00
3	AIBN, NBS CCl ₄ Refluxo h ν = 589 nm 3 h	9b + subprodutos	24.84

Como pode ser apreciado na tabela 9 e na figura 39, em efeito, as condições não foram as adequadas para promover uma bromação na posição alílica. Embora nenhum dos testes tenha gerado um produto o suficientemente puro, as análises de GC-FID indicam que o brometo alílico **9c** foi formado apenas baixo a ação de luz UV. Porém, essa reação não foi limpa, e gerou outros produtos em maior proporção, provavelmente como resultado de bromações subsequentes no ciclo. Análises de RMN sugerem que nos casos das entradas 1 e 3 da tabela 9

o produto formado foi o 2-bromocicloexeno, embora a formação de subprodutos impeça a confirmação dessa hipótese.

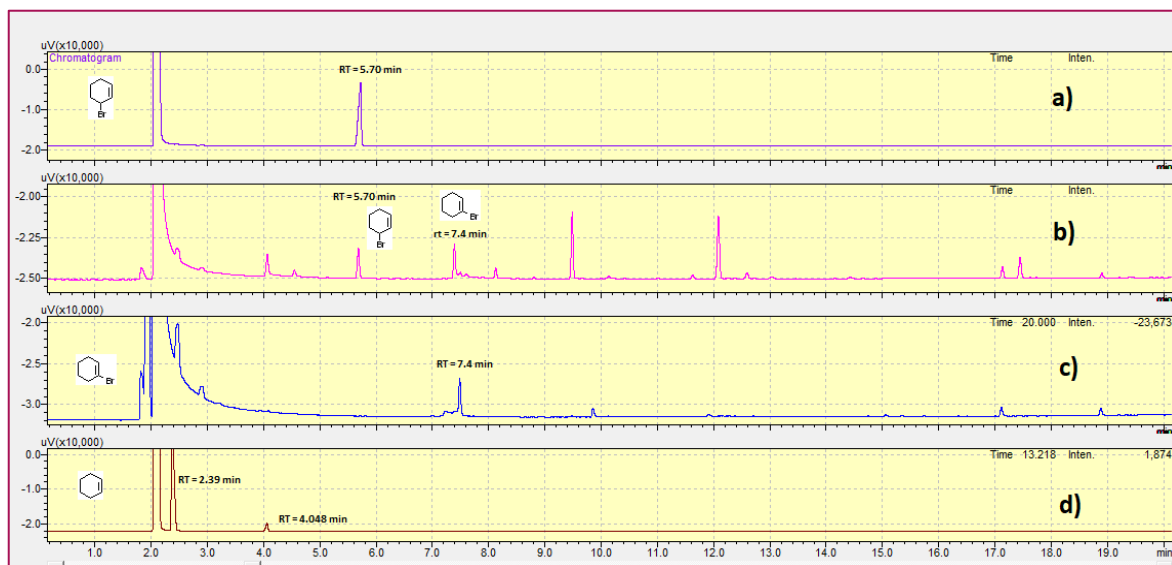
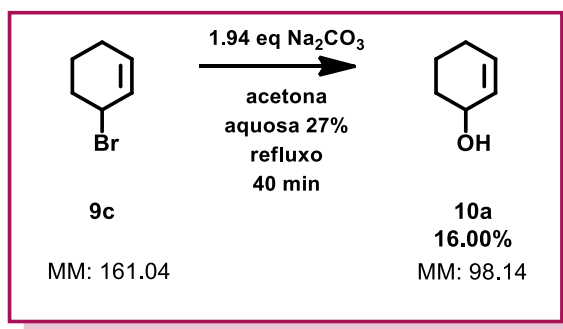


Figura 39 — Testes de bromação do cicloexeno da tabela 9: a) Padrão do 3-bromocicloexeno; b) Item 2 ; c) Item 3; d) Cicloexeno, min 2.39. *Coluna não quiral, método C.

3.5.2 Teste de hidroxilação com cicloexeno

Como reação modelo de hidrólise para obter álcoois alílicos, se tratou 3-bromocicloexeno com Na_2CO_3 em acetona aquosa 27%. O produto obtido foi 3-hidroxicicloexeno, com alta pureza (esquema 28).



Esquema 28 — Hidrólise básica do brometo alílico 9c

3.5.3 Testes de hidroxilação para o brometo vinílico 7a

Considerando os resultados na reação de hidroxilação com cicloexeno, prosseguiu-se com testes para **7a** utilizando acetona aquosa em medio básico. Os resultados apresentam-se na tabela 10.

Tabela 10 — Testes de hidroxilação de 7a

7a 8a MM: 204.06 26.73% MM: 222.08			
#	Condições ^a	Produto identificado	%Rendimento total ^b
1	1.94 eq Na ₂ CO ₃ Acetona aquosa 27% Refluxo 40 min	Não reagiu	-
2	2 eq K ₂ CO ₃ acetona/água 1:1 25 °C 29 h	8a	26.73 ^b
3	2 eq K ₂ CO ₃ THF/água 1:1 25 °C	8a	

	29 h	
4	2 eq Na ₂ CO ₃ acetona/água 1:1 25 °C 29 h	8a
5	2 eq Na ₂ CO ₃ THF/água 1:1 25 °C 29 h	8a

^bRendimento dos produtos combinados, respeito ao total de moles de partida (2.4 mmol).

Na tabela 10 se observou, via GC-MS, que ocorre a formação de um único produto após tratamento do substrato com Na₂CO₃ ou K₂CO₃. Na figura 40, se observa o pico referente ao material de partida dessa reação, cujo espectro GC-MS é diferente do produto obtido (figura 41). A partir de análises de RMN do produto bruto, foi possível considerar a formação de uma estrutura produto da adição do OH à dupla ligação, **8a**.

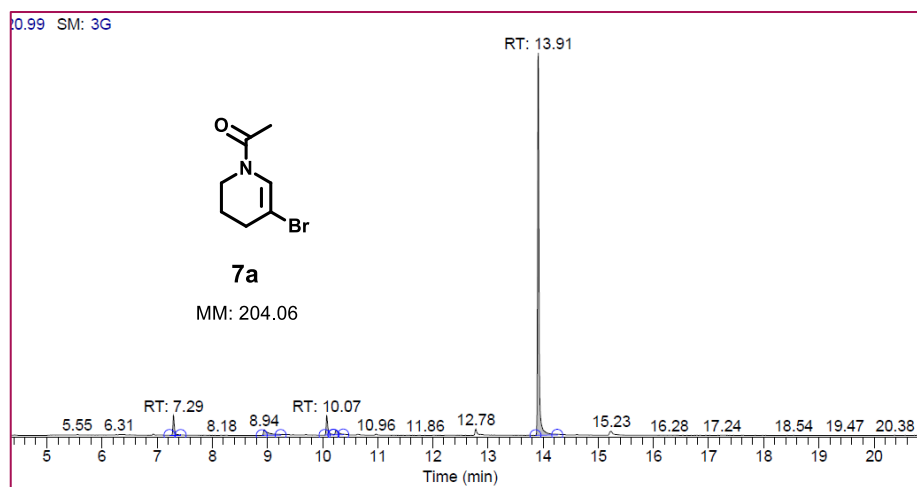


Figura 40 — Espectro de GC-MS para o composto 7a. *Método padrão

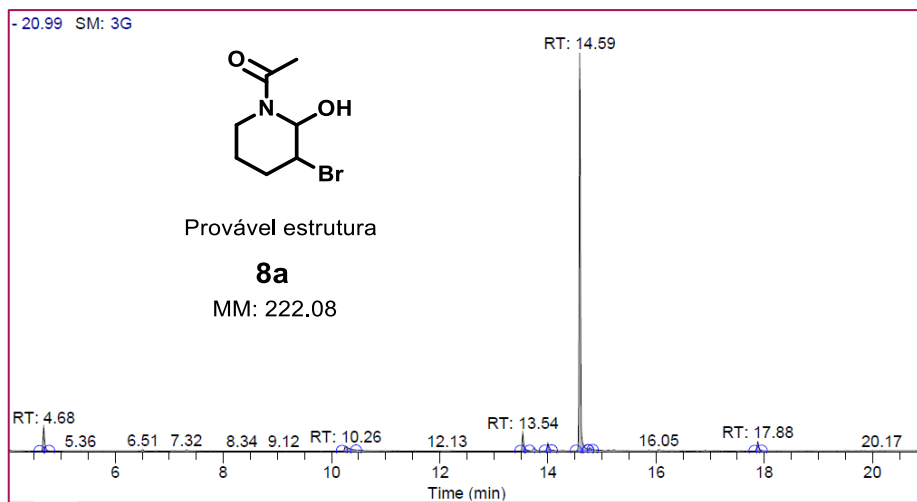


Figura 41 — Espectro de GC-MS para o composto 8a. *Método padrão.

4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O estudo referente ao desenvolvimento de uma rota quimioenzimática para a preparação da 1-(4-metil-3,4-diidropiridin-1(2H)-il) etanona, via hidrólise empregando a lipase CAL-B, mostrou-se eficiente, sendo que o composto foi obtido com boa enantiosseletividade.

Também foi possível de se preparar oito cloraminas heterocíclicas, via metodologia simples, empregando água sanitária em sistema bifásico.

Somado a isso, os estudos visando à funcionalização das piperidinas, levou a formação dos compostos 1-(5-bromo-3,4-diidropiridin-1(2H)-il)etanona e 1-(3-bromo-4-metil-3,4-diidropiridin-1(2H)-il)etanona, em quatro etapas reacionais.

A realização de estudos de oxidação das enamidas deverá ser continuado, a fim de se obter novos blocos de construção funcionalizados contendo o anel piperidínico. Já os estudos de triagem enzimática, devem ser utilizados na resolução de outros derivados, contendo diferentes funções no anel piperidínico.

Por fim, como uma nova metodologia de obtenção de anéis piperidínicos 4-substituídos está sendo desenvolvida pelo grupo, a mesma deve ser utilizada para a preparação de uma biblioteca de compostos, onde estes devem ser submetidos a reações de resolução enzimática, empregando as condições experimentais obtidas neste trabalho.

5 PARTE EXPERIMENTAL

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Catálise Orgânica (LCO) do Departamento de Química Fundamental (DQF) e localizado no Centro de Ciências Naturais e exatas (CCNE) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

5.1 INFORMAÇÕES GERAIS

5.1.1 Purificação de reagentes e solventes

Os solventes foram utilizados na sua forma comercial, com exceção do n-hexano, que foi purificado através de destilação fraccionada usando uma coluna tipo *vigreux*.

O cicloexeno utilizado como reagente modelo nos testes de oxidação foi preparado a partir da desidratação do ciclohexanol em meio ácido (Seção 5.2.7).

As enzimas usadas nas RCE e piperidinas utilizadas como reagentes de partida foram obtidas comercialmente através de Sigma-Aldrich LTDA. A CAL-B foi utilizada na sua forma imobilizada (Novozym® 435).

A água utilizada para preparar soluções, fazer diluições e extrações foi previamente destilada através da destilação simples da água potável disponível nas instalações do laboratório.

As soluções tampão (*buffer*, designadas com o símbolo “Pi” seguido do seu valor de pH) padrão utilizadas para a preparação dos solventes nos testes de RCE foram adquiridas comercialmente da CRQ[§]. Foram utilizadas três soluções tampão (Pi): de pH 7.01, 4.01 e 9.0 (valores correspondentes a uma temperatura de 25 °C). Para a preparação dos tampões de valores de pH diferentes a esses (pH 5.0, 6.0, 6.5, 7.5, 8.0 e 8.5), se empregou um medidor de pH eletrônico (previamente calibrado com soluções tampão padrão diferentes) e com ele, foram feitos ajustes de pH usando quantidades específicas de Pi 4 (para preparar Pi 5) e Pi 7 (para preparar o resto das soluções) com ajuda de soluções aquosas concentradas de HCl e/ou NaOH, até atingir o pH desejado.

[§] Sítio web <http://www.crqquimica.com.br/Inicio.aspx>

A trietilamina foi purificada através de destilação simples.

Todas as reações foram realizadas utilizando vidrarias secas em estufa, à 100 °C.

A *N*-bromo succinimida (NBS) utilizada nos testes de bromação foi purificada através de recristalização em água, e o AIBN, através de recristalização em metanol.

Os solventes dos produtos de reação foram evaporados à pressão reduzida (usando um rota-evaporador) e o solvente remanescente foi retirado utilizando bomba de alto vácuo, a menos que o contrário seja especificado.

A solução de água sanitária utilizada para a *N*-cloração das piperidinas foi 0.3 M (2.12 % m/v) em cloro ativo. A concentração equivalente em hipoclorito de sódio (NaOCl) desta solução é 22.04 g/L (3.38 mmol/mL). A determinação do teor de cloro ativo foi feita mediante titulação utilizando dicromato de potássio como padrão primário e tiosulfato de sódio como padrão secundário. A presença do complexo iodo-amido se usou como indicador do ponto final da titulação.

5.1.2 Informações técnicas

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi feita utilizando-se placas de sílica-gel suportadas em alumínio, da Merck., tipo 60 F₂₅₄, com zona de concentração 20x2.5 cm. Hx270296.

A revelação das placas de CDD foi conduzida utilizando câmara de iodo suportado em sílica gel, baseada num processo de impregnação em uma solução de vanilina sulfúrica e posterior queimado. Esta solução foi preparada com 2 g de vanilina, 20 mL de H₂SO₄, 90 mL de EtOH e 90 mL de H₂O destilada.

As purificações mediante cromatografia em coluna foram feitas utilizando sílica-gel para cromatografia tipo Flash (tamanho de poro 60 Å, tamanho da partícula 40-63 µm, 230-400 mesh). O método foi baseado na descrição de Still e colaboradores.¹¹² Uma exceção foi a purificação de **4b**. Para melhorar o seu rendimento isolado foi utilizada uma mistura de Al₂O₃/sílica 4:1 em peso.

Os espectros de RMN foram adquiridos num espectrômetro baseado na transformada de Fourier, marca Varian® Unity Plus-300 ou VNRMS 400 MHz (Central analítica / DQF - UFPE), à temperatura ambiente. Em todos os espectros foi utilizado clorofórmio deuterado (CDCl_3) a menos que o contrário seja indicado. Os deslocamentos químicos (δ) do CDCl_3 estão expressos em ppm, com relação ao seu pico residual de ^1H (δ 7.26) e ^{13}C δ (77.36 ppm).¹¹³ Os valores das constantes de acoplamento são expressos em Hertz (Hz) quando indicados. Os sinais do RMN ^1H são descritos como: *s* (singletos), *d* (dupletos), *t* (tripletos), *q* (quartetos), *qt* (quintetos), *dd* (duplo duplete), *dq* (duplo quarteto), *m* (multipletos), *sl* (sinal largo). Para a conversão destes FIDS em seus respectivos espectros e o tratamento dos dados, foi utilizado o software MestReNova® versão 6.0.0 de MestreLab Research.

As análises de GC-MS realizadas na Central Analítica/DQF-UFPE foram feitas em um equipamento de GC de modelo TRACE 1300, acoplado à um espectrômetro de massas (como detector) de modelo ISQ Single Quadrupole MS, ambos de marca Thermo Scientific. A energia de ionização de operação foi de 70 eV, e a coluna utilizada foi TGMS-5 (5% - fenil-metilpolisiloxano), com espessura de filme 30 m x 0,25 μm . O gás de arraste usado foi Hélio 5.0 analítico.

Para GC-MS, os métodos utilizados se detalham em anexos, e são indicados no documento como “Método Padrão” (pág. 148) e “Método voláteis” (pág. 149).

Os valores de rotação específica foram adquiridos com um polarímetro P-2000 (Central analítica/DQF-UFPE), usando uma fonte de luz de sódio em comprimento de onda 589 nm. Cinco ciclos foram utilizados em intervalos de 1 segundo para cada medida. As amostras foram analisadas como soluções em concentração de 1 w/v % (em metanol) em uma cubeta de 5 mL.

Os espectros GC-FID foram obtidos em um cromatógrafo a gás GC- 2010 Plus da Shimadzu (LCO – DQF – UFPE) com sistema de detecção baseado na técnica de ionização em chamas (FID). O equipamento se utilizou com duas colunas diferentes, sendo necessária a troca manual de cada dependendo do tipo de reação que devia ser acompanhada. A coluna utilizada para acompanhar as resoluções cinéticas enzimáticas estava revestida por uma fase estacionária quiral Beta Dex™ 120 (β -Ciclodextrina) de dimensões 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm . O resto das reações, principalmente as associadas aos testes de oxidação, foram acompanhadas com a utilização de uma coluna não quiral marca Rtx®-1, de dimensões 30 m

x 0.25 mm (DI) x 0.25 μ m. A fase estacionária dessa coluna foi composta por 100% dimetilpolisiloxano.

As condições comuns das análises de GC-FID se detalham a seguir. Modo de injeção: split. Volume de injeção: 1.0 μ L. Gás de arraste: Nitrogênio. O software GCsolution versão 2.41 foi utilizado para o tratamento e análise de dados dos cromatogramas obtidos. Os excessos enantiomêricos foram determinados através da subtração das concentrações relativas (em %) calculadas a partir das áreas baixo a curva dos picos no cromatograma.

Nos ensaios cromatográficos através de GC-FID foram utilizados diferentes métodos. Os detalhes são mostrados em Anexo, págs 150-152.

Todas as reações enzimáticas foram efetuadas no interior de um agitador elétrico com capacidade para o controle adequado da temperatura e a rotação por minuto (rpm) e sem nenhuma fonte de radiação direta durante o tempo reacional. Os testes feitos em pequena escala foram conduzidos dentro de recipientes plásticos de eppendorf® descartáveis com capacidade de 2 mL (7-10 mg de substrato). Para os testes em escala de 20 mg de substrato foram utilizados frascos âmbar de 25 mL de capacidade e os testes em escalas maiores foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL (100-200 mg de substrato) e 250 mL (950 mg de substrato). Todos os recipientes foram tampados deixando condições para um intercambio da mistura reacional com a atmosfera exterior.

As reações de bromação baixo luz UV foram realizadas dentro de uma caixa escura equipada com uma lâmpada geradora de radiação UVA e UVC.

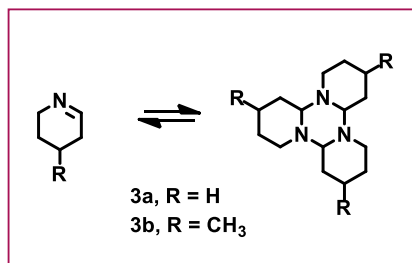
Os testes de bromação baixo a irradiação de luz de comprimento de onda de 589 nm foram realizados com ajuda de uma lâmpada de sódio conectada a uma fonte de voltagem.

Os compostos foram nomeados de acordo com o software ChemDraw Ultra, versão 12.0.

5.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os procedimentos experimentais relatados nesta seção fazem referência aos melhores resultados obtidos.

5.2.1 Procedimento geral de síntese das iminas da piperidina (3a e 3b)



Em um balão de fundo redondo com capacidade para 500 mL, contendo 50 mmol de piperidina (4.26 g) dissolvida em 100 mL de DCM (diclorometano), foram adicionados cuidadosamente e sob agitação constante 170 mL de água sanitária 2.12% (aproximadamente 50 mmol) à 25 °C. Após 20 minutos da adição do agente oxidante, a mistura reacional foi separada em suas duas fases. A fase aquosa foi extraída com DCM (3x 25 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas com Na₂SO₄ e com arroz para absorber o Cl₂ remanescente. O líquido foi filtrado através de sílica gel, com ajuda de DCM para diminuir perda do produto. Uma solução de potassa alcoólica (3 equivalentes) foi preparada (8.42 g, 150 mmol de KOH em 20 mL de metanol) em um segundo balão de 250 mL. A solução em DCM produto da primeira reação foi vertida lentamente sobre a potassa, em duas porções. Depois da adição da primeira porção, os sólidos formados se filtraram à vácuo e o produto remanescente se recuperou lavando com DCM. O filtrado se colocou de novo no balão nas mesmas condições para continuar a reação. O resto da solução clorada se continuou adicionando lentamente sob agitação constante e à 25 °C. O balão se manteve tampado com uma armadilha de sílica para proteger o produto da umidade externa. Após 24 horas, se adicionou água destilada à mistura reacional até a dissolução completa dos sólidos. As duas fases foram separadas em um funil de decantação. A fase aquosa foi extraída com DCM (7 x 20 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas com Na₂SO₄ anidro e o solvente foi parcialmente evaporado à pressão reduzida até ficar uma solução concentrada de cor amarelada. Em seguida, deixou-se evaporando em pressão atmosférica no balão, e tampado com um septo, à temperatura ambiente até ficar um óleo denso que foi formando cristais amarelados lentamente, correspondentes a **(3a)**. O mesmo procedimento foi adotado na preparação de **3b**. porém, a escala foi duplicada.

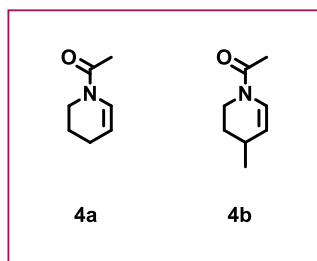
5.2.1.1 (3a): Tripiperideína ou tetradecaidro-1H-tripirido[1,2-a:1',2'-c:1'',2''-e][1,3,5]triazina

Sólido amarelo claro, cristalino, com aparência cerosa. Rendimento 3.17 g (76.27%). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 3.17 – 2.99 (m), 2.75 (dd, $J = 7.1, 2.7$ Hz), 2.66 – 2.38 (m), 1.95 (dt, $J = 29.8, 12.0$ Hz), 1.77 – 1.38 (m), 1.37 – 1.06 (m). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 82.25, 46.68, 29.46, 26.07, 22.60. Os dados espectroscópicos coincidem com os já reportados na literatura.⁹⁷

5.2.1.2 (3b): 3,8,13-trimetiltetradecaidro-1H-tripirido[1,2-a:1',2'-c:1'',2''-e][1,3,5]triazina

Sólido amarelo claro, cristalino, com aparência cerosa. Rendimento 8.14 g (83.77%). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 3.28 – 3.11 (m, 1H), 3.05 – 2.94 (m, 1H), 2.92 – 2.82 (m, 1H), 2.80 – 2.66 (m, 1H), 2.28 (dd, $J = 9.9, 2.5$ Hz, 1H), 2.10 – 1.92 (m, 1H), 1.82 – 1.49 (m, 3H), 1.14 (ddd, $J = 39.7, 22.3, 7.0$ Hz, 2H), 0.90 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H), 0.84 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 85.38, 81.35, 78.53, 49.62, 48.26, 40.97, 39.23, 37.89, 37.12, 35.20, 34.16, 34.14, 31.25, 30.35, 24.76, 22.48, 22.29, 22.13.

5.2.2 Procedimento geral de síntese de enamidas da piperidina (4a-4b):



Em um balão de fundo redondo com capacidade para 50 mL foi adicionada uma quantidade (especificada nas subseções a seguir) de cristais da imina precursora, em forma de trímico. Em seguida se adicionaram 29.09 equivalentes de anidrido acético. A mistura foi aquecida a 50 °C durante as primeiras 10 horas e logo continuou esfriando até chegar e permanecer em 25 °C durante mais 14 horas. Após este período, adicionaram-se 20 mL de DCM e, em um funil de separação, o bruto reacional foi lavado com uma solução de NaOH 1 M (3x 10 mL), saturando também a fase aquosa com NaCl. Em seguida, NaOH sólido e pequenas

quantidades de Na_2CO_3 sólido foram adicionados à fase orgânica, sob agitação, até o pH (estimado com tiras indicadoras de pH) chegar em um valor de 6 ou maior; ou até que as adições de Na_2CO_3 pararam de produzir efervescência. As duas fases resultantes foram separadas em um funil de separação. A fase orgânica foi seca com Na_2CO_3 e Na_2SO_4 anidros e, em seguida, submetida à evaporação parcial do solvente à pressão reduzida. O produto concentrado foi purificado através da filtração em uma coluna de Al_2O_3 / sílica-gel (4:1) usada como fase estacionária, e Hexano/Acetato de etila em proporção 6:1 como eluente. Depois da evaporação total do solvente, obteve-se o produto desejado.

5.2.2.1 (4a): 1-(3,4-diidropiridin-1(2H)-il)etanona

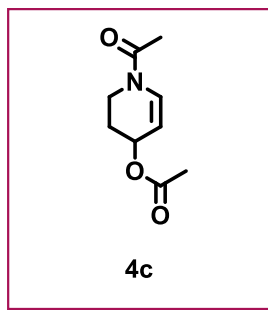
Óleo amarelo claro; quantidade utilizada do reagente de partida, **3a** = 35.71 mmol (2.97 g); rendimento 3.44 g (77.06%).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) Mistura de rotâmeros 70.6:29.40 δ 7.18 (dt, J = 8.5, 2.0 Hz, 1H), 6.56 (dt, J = 8.3, 2.0 Hz, 1H), 5.07 (dt, J = 8.1, 3.9 Hz, 1H), 4.96 (dt, J = 8.1, 3.9 Hz, 1H), 3.75 – 3.61 (m, 1H), 3.63 – 3.51 (m, 1H), 2.15 (s, 1H), 2.14 (s, 1H), 2.08 (dtd, J = 8.2, 4.0, 2.0 Hz, 1H), 1.94 – 1.76 (m, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, cdcl_3) δ 168.06, 167.79, 125.73, 123.86, 108.40, 108.15, 44.33, 40.08, 22.05, 21.67, 21.43, 21.40, 21.26. R_f = 0.57 (Hex/AcOEt 1:1). Os dados espectroscópicos coincidem com os já reportados na literatura.⁵⁰

5.2.2.2 (4b): 1-(4-metil-3,4-diidropyridin-1(2H)-il)etanona

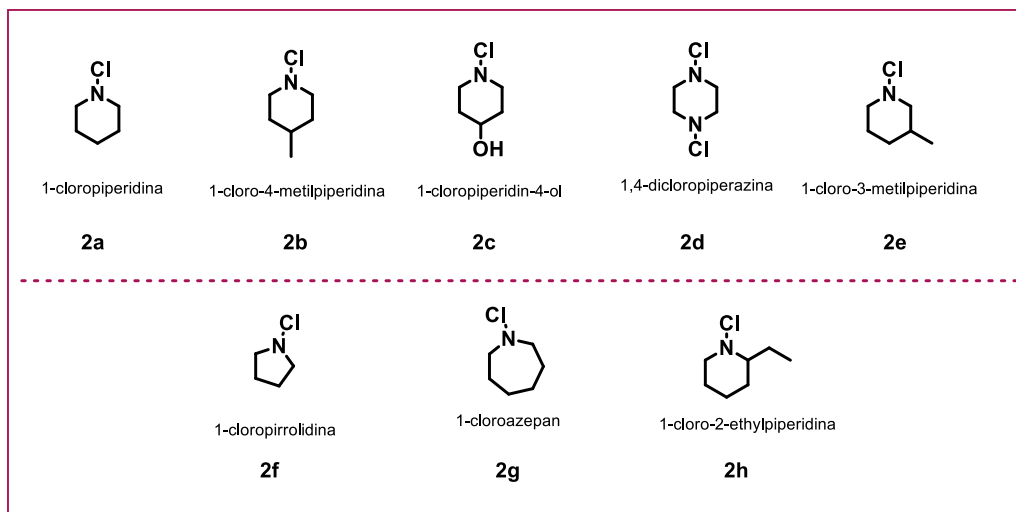
Óleo amarelo escuro; quantidade utilizada do reagente de partida, **3b** = 25 mmol (2.43 g); rendimento 2.9 g (83.34%). Mistura de rotâmeros 70:30 RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7.14 (dd, J = 8.5, 2.1 Hz, 1H), 6.51 (dd, J = 8.3, 2.1 Hz, 1H), 4.93 (dd, J = 8.5, 3.7 Hz, 1H), 4.83 (dd, J = 8.3, 3.8 Hz, 1H), 4.01 – 3.89 (m, 1H), 3.72 – 3.61 (m, 1H), 3.44 (dd, J = 28.1, 18.2 Hz, 1H), 2.32 (t, J = 10.8 Hz, 1H), 2.15 (s, 1H), 2.15 (s, 1H), 2.03 – 1.85 (m, 1H), 1.58 – 1.34 (m, 1H), 1.03 (d, J = 7.0 Hz, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, cdcl_3) δ 168.13, 167.88, 124.69, 122.77, 114.81, 114.47, 42.98, 38.90, 30.40, 29.78, 27.17, 26.91, 21.88, 21.40, 21.17, 21.11. R_f = 0.68 (Hex/AcOEt 1:1).

5.2.3 Síntese de (4c): 1-acetil-1,2,3,4-tetraidropiridin-4-il acetato



Em um balão de fundo redondo de 25 mL foram pesados 0.11 g (1 mmol) de cristais de 4-hidroxi piperidina. Adicionaram-se 10 mL de DCM e, enquanto a mistura era agitada, se verteram lentamente 7 mL de água sanitária 2.12%. A reação ocorreu a temperatura ambiente durante uma hora. O acompanhamento se realizou via CCD (placa de sílica, Acetato de Etila 100%). Quando a reação foi completada, a mistura reacional foi separada em suas duas fases. A fase aquosa foi extraída mais uma vez com duas porções de 20 mL de DCM. As fases orgânicas foram combinadas, secas com Na_2SO_4 e com arroz para absorber o Cl_2 remanescente. Em um outro balão de 25 mL foi preparada uma solução de potassa alcoólica (0.12 g, 2 mmol de KOH em 5 mL de metanol). O produto da primeira reação foi vertido sobre a potassa alcoólica, à 25 °C e sob agitação constante. Ao termino de 24 horas, se adicionou água destilada à reação até a dissolução completa dos sólidos. Após filtração, a reação foi extraída mais uma vez com 10 mL de uma solução saturada com NaCl. As fases orgânicas foram coletadas e secas com Na_2SO_4 anidro. Sobre produto seco dessa reação, em DCM, adicionaram-se 2 equivalentes de anidrido acético (2 mmol, 200 μL) e 4 equivalentes de trietilamina (4 mmol, 557 μL) em 25 °C e agitando constantemente com uma barra magnética. Depois de 20 horas de reação, a mistura foi extraída uma vez com de 20 mL de uma solução de NaHCO_3 e mais duas vezes com porções de 10 mL de salmoura (NaCl saturado). A fase orgânica foi submetida a evaporação total do solvente à pressão reduzida. O resíduo foi um óleo amarelo que solidifica parcialmente em -15 °C.

5.2.4 Síntese das cloraminas da piperidina (2a-2h)

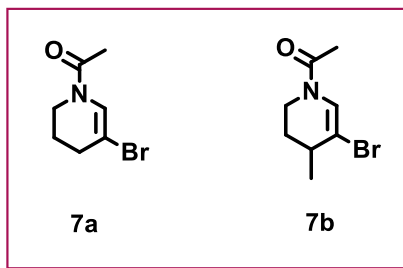


Em um balão de fundo redondo de tamanho adequado foram colocadas quantidades específicas das aminas de partida 1a – 1h (esquema 23). Em seguida, sob agitação constante, se verteu uma quantidade específica de DCM (aproximadamente para atingir uma proporção de DCM/água 1:1). Quando a amina solubilizou completamente, um determinado volume de uma solução de água sanitária 2.12% , contendo 1 equivalente de NaOCl, foi adicionada lentamente (gota por gota) dentro do balão durante aproximadamente 10 minutos. A reação se deixou completar por mais 20 minutos a 25 °C. Quando a reação foi completada, a mistura reacional se separou em suas duas fases. A fase aquosa foi extraída mais uma vez com duas porções de 20 mL de DCM. As fases orgânicas foram combinadas, secas com Na₂SO₄ e com arroz para absorber o Cl₂ remanescente. O líquido foi filtrado através de sílica gel usando DCM para lavagem. As soluções em DCM foram concentradas sob pressão reduzida e depois se deixaram secar à temperatura ambiente. A seguir são apresentados os detalhes específicos para a preparação de cada cloramina.

#	Amina de partida	Produto de reação	Quantidade da amina de partida (mmol)	Volume de água sanitária (mL)	Tamanho do balão de reação (mL)	Volume de DCM usado (mL)	Dados de GC-MS m/z (intensidade relativa)
1	1a Piperidina	2a	10	35	150	30	118.1 (100), 119.12 (47.41), 42.11 (38.78), 120.11 (32.71), 84.14 (30.44), 55.11 (29.10), 78.07 (15.92), 121.11 (M ⁺ ,16.13)

2	1b 4-metilpiperidina	2b	10	35	150	30	42.11(100), 132.13(66.12), 133.15(50.53), 98.18(37.15), 55.11(27.08), 82.12(24.18), 134.15(23.67), 69.00(9.68), 96.15(9.15), 63.00(7.09), 90.10(6.72), 78.07(5.31),135.14(M ⁺ , 15.90)
3	1c 4- hidroxipiperidina	2c	0.5	2.0	10	3.0	42.11(100), 55.12(94.86),82.12(26.78), 56.14(23.34), 100.15(22.48), 71.12(11.25), 90.07(8.98), 116.10(3.55), 135.13(M ⁺ , 14.46).
4	1d Piperazina	2d	10	35	150	30	56.10(100), 119.04(58.27), 121.03(18.87), 83.10(11.41), 57.12(7.97), 63.04(3.80), 153.98(M ⁺ ,12.46),
5	1e 3-metilpiperidina	2e	4.0	14	50	15	98.13(100), 42.11(66.89), 133.09(62.01), 41.11(47.99), 44.11(24.62), 69.12(28.38), 55.10(23.71), 78.07(19.75), 56.11(14.15), 134.09(11.91),70.12(11.83), 135.09(M ⁺ , 18.78).
6	1f Pirrolidina	2f	10	35	150	30	42.13(100), 104.07(87.41), 105.09(65.54), 41.14(45.80), 106.07(33.48), 68.11(21.96), 43.14(21.21), 77.04(13.67), 69.11(10.98), 108.07(M ⁺ , 20.92)
7	1g Azepan	2g	10	35	150	30	42.12(100), 44.12(72.51), 98.15(72.07), 41.12(66.79), 69.14(43.04), 55.11(33.64), 68.13(27.70), 82.12(25.78), 133.10(23.00), 56.11(22.78), 70.14(20.09), 97.14(14.41), 96.13(14.14), 78.08(11.71), 104.06(10.66), 81.13(9.19), 134.12(4.63), 135.11(M ⁺ , 7.31)
8	1h 2-etilpiperidina	2h	10	35	150	30	Sem espectro de GC-MS

5.2.5 Síntese dos brometos vinílicos (7a e 7b)



5.2.5.1 (7a): 1-(5-bromo-3,4-diidropiridin-1(2H)-il) etanona

Em um tubo de ensaio Pyrex® foram colocados 0.125 g (1 mmol) de (**4a**) e dissolvidos em 10 mL de CCl₄. Logo foi adicionada uma quantidade catalítica de AIBN seguido de 1 equivalente (0.18 g) de NBS. A agitação foi constante e feita com barra magnética durante toda a reação. O sistema se deixou parcialmente fechado mas protegido da umidade externa mediante o uso de uma armadilha de sílica gel adaptada ao septo e em seguida foi aquecido em contato com água em ebulição entanto que foi irradiado com a fonte de luz de uma lâmpada de sódio (589 nm) durante 3 horas. O bruto reacional se filtrou através de uma pequena quantidade de sílica-gel e lavando com misturas de CCl₄ e acetato de etila. Depois, uma extração com salmoura (10 mL) foi feita, seguida de secagem com Na₂SO₄ e evaporação do solvente sob pressão reduzida.

Óleo amarelo escuro com partes sólidas. Rendimento 0.1147 g (56.23%). Mistura de rotâmeros 64.8:35.2 RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.55 (t, J = 1.6 Hz, 1H), 6.91 (t, J = 1.6 Hz, 1H), 3.66 (m, 1H), 3.55 (m, 1H), 2.47 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 2.16 (s, 1H), 2.13 (s, 1H), 2.05 – 1.85 (m, 1H). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 167.84, 167.47, 126.99, 125.27, 105.96, 104.39, 43.56, 39.27, 32.03, 31.80, 23.70, 22.93. Os dados coincidem com os já reportados na literatura.⁵⁰

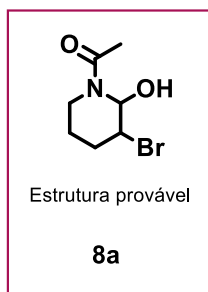
5.2.5.2 (7b): 1-(5-bromo-4-metil-3,4-diidropiridin-1(2H)-il) etanona

Em um balão de fundo redondo de 25 mL se pesaram 1.65 mmol (0.23 g) de (**4b**) e foram dissolvidos com 20 mL de DCM. Em seguida se adicionou 1 equivalente (0.30 g) de NBS sob agitação constante com ajuda de um agitador magnético e à temperatura ambiente. A mistura se deixou agitando durante 4 horas até o total consumo do reagente de partida (acompanhado por CCD). O produto bruto foi concentrado sob pressão reduzida e redissolvido em acetato de etila.

Logo, se fez uma extração da fase orgânica com salmoura (2 x 10 mL) e essa foi seca com Na₂SO₄ anidro antes de ser filtrada através de uma pequena quantidade de sílica gel, lavando com DCM. O solvente se deixou evaporando à aproximadamente 35 °C a pressão atmosférica durante um dia. Durante esse tempo a amostra foi protegida da luz.

Óleo marrom. Rendimento 0.24 g (65.72%).

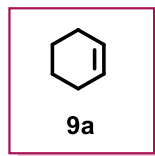
5.2.6 Síntese de (8a): 1-(3-bromo-2-hiroxipiperidin-1-il) etanona



0.7 mmol de **7a** foram colocados em um balão de fundo redondo de 25 mL e dissolvidos em 10 mL de uma mistura de acetona-água 1:1. O sistema foi submetido à agitação constante com um agitador magnético e adicionado de 2 equivalentes de Na₂CO₃ (1.5 mmol, 0.16 g). O processo se realizou à 25 °C e a reação foi monitorada por GC-FID. A extração foi feita com salmoura (3x 5mL). A fase aquosa se extraiu com acetato de etila e as fases orgânicas foram combinadas e secas com Na₂SO₄ anidro. O solvente se evaporou sob pressão reduzida gerando um óleo amarelo.

Óleo amarelo. Redimento 0.19 g (27.14%).

5.2.7 Síntese de (9a): cicloexeno

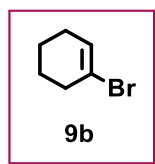


50 mL de cicloexanol foram vertidos em um balão de 125 mL. Em seguida, 15 mL de ácido fosfórico 85% foram adicionados gota por gota sob agitação constante durante

aproximadamente uma hora, em temperatura ambiente. A mistura resultante se destilou em um aparelho de destilação simples (faixa de temperatura 75-80 °C). O destilado incolor formou duas fases (água embaixo, e cicloexeno na fase de cima). As fases foram separadas em um funil de separação e a fase orgânica se secou duas vezes com Na₂SO₄ anidro. O líquido incolor resultante, de cheiro intenso, foi armazenado a -15 °C em um frasco âmbar.

Líquido incolor. Rendimento 20 mL (40%). RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 5.67 (t, 2H), 1.99 (m, 4H), 1.71 – 1.55 (m, 4H). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 127.45, 25.44, 22.94.

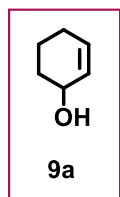
5.2.8 Síntese de (9b): 2-bromo cicloexeno



Em um tubo de ensaio Pyrex® foram colocados 0.5 mL (5 mmol) de cicloexeno (**9a**) e dissolvidos em 10 mL de CCl₄. Logo foi adicionada uma quantidade catalítica de AIBN seguido de 1 equivalente (0.9 g) de NBS. A agitação foi constante e feita com barra magnética durante toda a reação. O sistema se deixou parcialmente fechado mas protegido da umidade externa mediante o uso de uma armadilha de sílica gel adaptada ao septo e em seguida foi aquecido em contato com água em ebulição enquanto que foi irradiado com a fonte de luz de uma lâmpada de sódio (589 nm) durante 3 horas. O bruto reacional foi levado até 0 °C, filtrado através de uma pequena quantidade de sílica-gel e lavando com hexano. O filtrado foi colocado sob pressão reduzida para causar a evaporação total do solvente, gerando um óleo amarelo.

Óleo amarelo. Rendimento 0.20 g (24.84%).

5.2.9 Síntese de (9a): 3-hidroxicicloexeno



1.94 mmol (0.21 g) de Na_2CO_3 foram adicionados a uma solução de 1 mmol (130 μL) de 3-bromocicloexeno (comercial) em acetona aquosa 27% (5 mL) contidos em um balão de fundo redondo de 10 mL de capacidade. A suspensão resultante foi aquecida em refluxo durante 1 hora. A mistura reacional foi esfriada até chegar em 25 °C e concentrada à vácuo. Seguidamente essa foi extraída com DCM (2x10 mL) e os extratos orgânicos foram lavados com salmoura, secos com Na_2SO_4 anidro e concentrados sob pressão reduzida, gerando **9a** como um óleo amarelo que foi usado sem purificação posterior.

Óleo amarelo. Rendimento 0.02 g (20.5%). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 5.78 (dd, J = 27.7, 10.1 Hz, 1H), 4.19 (s, 1H), 2.13 – 1.43 (m, 1H). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 130.92, 130.17, 65.84, 32.35, 25.39, 19.26.

REFERÊNCIAS

- 1 Pasteur, Louis (1874) *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* Vol. 1., Works.
- 2 Courant, Thibaut, Dagousset, Guillaume and Masson, Géraldine (2015) 'Enamide Derivatives: Versatile Building Blocks for Total Synthesis'. *Synthesis (Germany)*, 47(13), pp. 1799–1826.
- 3 Stork, Gilbert; Terrel, Ross; Szmuszkowicz, Jacob (1954) 'A new synthesis of 2-alkyl and 2-acyl ketones'. *Journal of the American Chemical Society*, 76, pp. 2029–2030.
- 4 Csizmadia, V. M., Koshy, K. M., Lau, K. C.M., McClelland, R. A., et al. (1979) 'Acid-Catalyzed Hydrolysis of N-Vinylacetamides (Enamides). Substituent Effects of the Acetamido and Amino Groups and Linear Free Energy Correlations of Cyclohexene Reactivities'. *Journal of the American Chemical Society*, 101(4), pp. 974–979.
- 5 Kobayashi, R. and Matsubara, S (2008) 'Enamides and Enecarbamates as Nucleophiles in'. *Accounts of chemical research*, 41(2), pp. 292–301.
- 6 Carbery, David R. (2008) 'Enamides: Valuable organic substrates'. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 6(19), pp. 3455–3460.
- 7 Dtsch, Ber, Ges, Chem and Lockner, Jonathan (2007) *Stoichiometric Enamine Chemistry*,
- 8 Cheng, Ying, Huang, Zhi-Tang and Wang, Mei-Xiang (2005) 'Heterocyclic Enamines: The Versatile Intermediates in the Synthesis of Heterocyclic Compounds and Natural Products'. *Current Organic Chemistry*, 8(4), pp. 325–351.
- 9 Jie, Xiaoming, Shang, Yaping, Chen, Zhe Ning, Zhang, Xiaofeng, et al. (2018) 'Differentiation between enamines and tautomerizable imines in the oxidation reaction with TEMPO'. *Nature Communications*, 9(1), pp. 1–10. [online] Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-07534-x>
- 10 West, Joseph A. (1963) 'The chemistry of enamines'. *Journal of Chemical Education*, 40(4), p. 194. [online] Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed040p194>
- 11 Bruckner, Reinhard, Harmata, Michael and Wender, Paul A. (2010) 'Organic mechanisms:

- Reactions, stereochemistry and synthesis', in *Organic Mechanisms: Reactions, Stereochemistry and Synthesis*, pp. 1–855.
- 12 Rappoport, Zvi (ed.) (1994) *The Chemistry of Enamines*, John Wiley & Sons.
 - 13 Stamhuis, EJ, Maas, W and Wynber, Hans (1965) 'Mechanism of Enamine Reactions III. The Basicity of Tertiary Enamines'. , 30.
 - 14 Vink, Mandy K S;, Schortinghuis, Christien A;, Luten, Jordy;, Maarseveen, Jan H Van;, et al. (2002) 'A Stereodivergent Approach to Substituted 4-Hydroxypiperidines'. *J. Org. Chem*, 67, pp. 7869–7871.
 - 15 Vardanyan, Ruben (2017) 'Chapter 10. Classes of Piperidine-Based Drugs', in *Piperidine-Based Drug Discovery*, pp. 299–332. [online] Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128051573000107>
 - 16 Cossy, Janine and Belotti, Damien (2001) 'A short synthesis of argatroban'. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11, pp. 1989–1992. [online] Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X01003511>
 - 17 Taylor, Richard D., Maccoss, Malcolm and Lawson, Alastair D.G. (2014) 'Rings in drugs'. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(14), pp. 5845–5859.
 - 18 Tawani, Arpita, Amanullah, Ayeman, Mishra, Amit and Kumar, Amit (2016) 'Evidences for Piperine inhibiting cancer by targeting human G-quadruplex DNA sequences'. *Scientific Reports*, 6(November), pp. 1–12. [online] Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep39239>
 - 19 Goel, Pallavi, Alam, Ozair, Naim, Mohd Javed, Nawaz, Farah, et al. (2018) 'Recent advancement of piperidine moiety in treatment of cancer- A review'. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 157, pp. 480–502. [online] Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.08.017>
 - 20 Clark Lewis J.W., Mortimer, P.I. (1959) 'Occurrence of 4-hydroxypipericolic acid in Acacia Species'. *Nature*, 184, pp. 1234–1235.
 - 21 Pelletier, S.W. (ed.) (1996) *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*,

- 22 Atta-ur-Rahman (1995) *Studies in Natural Products Chemistry: Stereoselective synthesis (Part J)*,
- 23 Arvanitis, Marios, Li, Gang, Li, De Dong, Cotnoir, Daniel, et al. (2016) 'A conformationally constrained cyclic acyldepsipeptide is highly effective in mice infected with methicillin-susceptible and -resistant staphylococcus aureus'. *PLoS ONE*, 11(4), pp. 1–10.
- 24 Banks, Harold D (1992) *Piperidine synthesis*,
- 25 Stefani, Helio A (2009) *Ciências Farmacêuticas. Introdução A Química De Compostos Heterociclicos*, Guanabara Koogan.
- 26 Daeniker, H U and Grob, C A (1964) '3-quinuclidinone hydrochloride'. *ORSYAT*, (44), p. 86.
- 27 Comins, Daniel L. and Zeller, Emmanuel (1991) 'N-acyldihydropyridones as synthetic intermediates. A short synthesis of (±)-indolizidine 209B.' *Tetrahedron Letters*, 32(42), p. 1135.
- 28 Clayden, Jonathan, Greeves, Nick, Warren, Stuart and Wothers, Peter (2001) *Organic Chemistry*, OXFORD.
- 29 Eicher, Theofil, Hauptmann, Siegfried and Andreas, Speicher (2004) *The Chemistry of Heterocycles: Structure, Reactions, Syntheses, and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- 30 Overman, Larry E and Malone, Thomas C (1983) 'Iminium ion and acyl iminium ion initiated cyclizations of vinylsilanes. Regiocontrolled construction of unsaturated azacyclics'. *J. Am. Chem. Soc.*, 105(23), pp. 6993–6994.
- 31 Yang, Teng Kuei, Teng, Tsung Fan, Lin, Jyh Hwa and Lay, Yen Yuan (1994) 'Stereoselective synthesis of 26-disubstituted piperidine alkaloids via TiCl₄ induced iminium ion cyclization of α -cyanoamines'. *Tetrahedron Letters*, 35(21), pp. 3581–3582.
- 32 Davis, Franklin A, Theddu, Naresh and Gaspari, Paul M (2009) 'Asymmetric Synthesis of Substituted Tropinones Using the Intramolecular Mannich Cyclization Reaction and

- Acyclic N-Sulfinyl α -Amino Ketone Ketals'. *Organic Letters*, 11(7), pp. 1647–1650.
- 33 Davis, Franklin A., Chao, Bin and Rao, Ashwin (2001) 'Intramolecular Mannich reaction in the asymmetric synthesis of polysubstituted piperidines: Concise synthesis of the dendrobate alkaloid (+)-241D and its C-4 epimer'. *Organic Letters*, 3(20), pp. 3169–3171.
 - 34 Cao, Min Hui, Green, Nicholas J. and Xu, Sheng Zhen (2017) 'Application of the aza-Diels-Alder reaction in the synthesis of natural products'. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 15(15), pp. 3105–3129.
 - 35 Shi, ZD, Yang, BH, WU, YL, Pan, YJ, et al. (2002) 'First example of an antibody-catalyzed aza Diels-Alder reaction.' *Bioorg Med Chem Lett.*, 12(17), pp. 2321–4.
 - 36 Kadouri-Puchot, C. and Comesse, S. (2005) 'Recent advances in asymmetric synthesis of pipecolic acid and derivatives'. *Amino Acids*, 29(2), p. 124.
 - 37 Kobayashi, S, Jurcik, V, Arai, K and Salter, MM (2008) 'Niobium-catalyzed Highly Enantioselective Aza Diels-Alder Reactions'. *Advanced Synthesis & Catalysis*, (350), p. 647.
 - 38 Kobayashi, S, Yamashita, Y and Mizuki, Y (2005) 'Catalytic Asymmetric Aza Diels-Alder Reactions of Hydrazones Using a Chiral Zirconium Catalyst'. *Tetrahedron Letters*, 46, pp. 1803–1806.
 - 39 Uyehara, Tadao, Chiba, Naoki, Suzuki, Ichiro and Yamamoto, Yoshinori (1991) 'Diastereoselective intramolecular diels-alder reaction of N-alkoxycarbonyl -1-aza-1,3-butadienes and a total synthesis of the piperidine alkaloid, ($\pm$)-sedridine.' *Tetrahedron Letters*, 32(34), pp. 4371–4374.
 - 40 Trione, Celine, Toledo, Leticia M., Kuduk, Scott D., Fowler, Frank W. and Grierson, David S. (1993) 'Diels-Alder Reaction of 2-Cyano-1-aza Dienes. The Effect of Nitrogen Substituents'. *Journal of Organic Chemistry*, 58(8), pp. 2075–2080.
 - 41 De Kimpe, Norbert and Stevens, Christian (1993) 'A Convenient Synthesis of 6-Acetyl-1,2,3,4-tetrahydropyridine, the Principle Bread Flavor Component'. *Journal of Organic Chemistry*, 58(10), pp. 2904–2906.

- 42 Fowler, F. W. (2009) 'Pyridines and their Benzo Derivatives: (iv) Reactivity of Non-aromatics'. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, 2–7(iv), pp. 365–394.
- 43 Scully, Frank E (1980) 'Regioselective 2-Alkylation and 2-Arylation of Piperidine and Pyrrolidine via Organolithiation of Cyclic Imines'. *J. Org. Chem.*, 45(8), pp. 1515–1520.
- 44 Nakamura, Akihiko and Nakada, Masahisa (2013) *Allylic oxidations in natural product synthesis*,
- 45 Niphakis, Micah J., Turunen, Brandon J. and Georg, Gunda I. (2010) 'Synthesis of 6- and 7-membered cyclic enaminones: Scope and mechanism'. *Journal of Organic Chemistry*, 75(20), pp. 6793–6805.
- 46 Michael, J. P., de Koning, C. B., Gravestock, D., Hosken, G. D., et al. (1999) 'Enaminones: versatile intermediates for natural product synthesis'. *Pure and Applied Chemistry*, 71(6), pp. 979–988. [online] Available from: <https://www.degruyter.com/view/j/pac.1999.71.issue-6/pac199971060979/pac199971060979.xml>
- 47 Elassar, Abdel Zaher A. and El-Khair, Adel A. (2003) 'Recent developments in the chemistry of enaminones'. *Tetrahedron*, 59(43), pp. 8463–8480.
- 48 Edafiogho, Ivan O., Kombian, Samuel B., Ananthalakshmi, Kethireddy V.V., Salama, Noha N., et al. (2007) 'Enaminones: Exploring Additional Therapeutic Activities'. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96(10), pp. 2509–2529.
- 49 Doyle, Michael P, Alleyn, James R, Humeidi, Ranad and Yang, Yu (2017) 'Catalytic Allylic Oxidation of Cyclic Enamides and 3,4-Dihydro-2H-Pyrans by TBHP'. *The Journal of Organic Chemistry*.
- 50 Barker, Graeme, Mcgrath, Julia L, Klapars, Artis, Stead, Darren, et al. (2011) 'Enantioselective , Palladium-Catalyzed r -Arylation of N -Boc Pyrrolidine : In Situ React IR Spectroscopic Monitoring , Scope , and Synthetic Applications'. , pp. 5936–5953.
- 51 Bartali, Laura, Casini, Andrea, Guarna, Antonio, Occhiato, Ernesto G. and Scarpi, Dina (2010) 'Enantiodivergent chemoenzymatic synthesis of 4-hydroxypiperidine alkaloids'.

European Journal of Organic Chemistry, (30), pp. 5831–5840.

- 52 Li, Ke, Wang, Juxiang, Wu, Kailin, Zheng, Daijun, et al. (2017) 'Enantioselective synthesis of 1,2,3,4-tetrahydroquinoline-4-ols and 2,3-dihydroquinolin-4(1H)-ones via a sequential asymmetric hydroxylation/diastereoselective oxidation process using *Rhodococcus equi* ZMU-LK19'. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 15(17), pp. 3580–3584.
- 53 Zheng, Daijun, Yang, Min, Zhuo, Junrui, Li, Ke, et al. (2014) 'Regio- and stereoselective benzylic hydroxylation to synthesize chiral tetrahydroquinolin-4-ol and tetrahydro-1H-benzo[b]azepin-5-ol with *Pseudomonas plecoglossicidas*'. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 110, pp. 87–91.
- 54 Itoh, Toshiyuki and Hanefeld, Ulf (2017) 'Enzyme catalysis in organic synthesis'. *Green Chemistry*, 19(2), pp. 331–332.
- 55 Ciriminna, R and Pagliaro, M (2013) 'Green chemistry in the fine chemicals and pharmaceutical industries.' *Organic Process Research & Development*, 17, pp. 1479–1484.
- 56 Watson, W J W (2012) 'How do the fine chemical, pharmaceutical, and related industries approach green chemistry and sustainability?' *Green Chemistry*, 14, pp. 251–259.
- 57 Sih, CJ and Wu, SH (1989) 'Resolution of enantiomers via biocatalysis'. *Topics in Stereochemistry*, 19, pp. 63–125.
- 58 Faber, Kurt (2011) *Biotransformations in Organic Chemistry* 6th ed., London, Springer.
- 59 Wikteliu, D (2005) 'Lipases - Enzymes for biocatalytic asymmetric synthesis.' *Synlett*, pp. 2111–2114.
- 60 Rasor, J. Peter and Voss, Edgar (2001) 'Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry'. *Applied Catalysis A: General*, 221(1–2), pp. 145–158.
- 61 Theil, Fritz (1995) 'Lipase-Supported Synthesis of Biologically Active Compounds'. *Chemical Reviews*, 95(6), pp. 2203–2227.
- 62 Kazlauskas, R (2005) 'Enhancing catalytic promiscuity for biocatalysis'. *Current Opinion*

in *Chemical Biology*, 9, pp. 195–201.

- 63 Patel, Ramesh N., Banerjee, Amit, Nanduri, Venkata, Goswami, Animesh and Comezoglu, F. T. (2000) 'Enzymatic resolution of racemic secondary alcohols by lipase B from *Candida antarctica*'. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(10), pp. 1015–1019.
- 64 Verho, Oscar and Bäckvall, Jan E. (2015) 'Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution: A powerful tool for the preparation of enantiomerically pure alcohols and amines'. *Journal of the American Chemical Society*, 137(12), pp. 3996–4009.
- 65 Simon, Sabine, Oßwald, Steffen, Roos, Jürgen and Gröger, Harald (2012) 'Efficient enzymatic amine resolution at high substrate input using diethyl malonate as an acyl donor of low hazard potential'. *Zeitschrift für Naturforschung - Section B Journal of Chemical Sciences*, 67(10), pp. 1123–1126.
- 66 Muñoz, Lourdes, Rodriguez, Anna M., Rosell, Gloria, Bosch, M. Pilar and Guerrero, Angel (2011) 'Enzymatic enantiomeric resolution of phenylethylamines structurally related to amphetamine'. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 9(23), pp. 8171–8177.
- 67 Princival, Jefferson L., Ferreira, Jeily G., Princival, Cleverson R., Oliveira, Dyego M. and Nascimento, Renata X. (2015) 'Enzymatic kinetic resolution of internal propargylic diols. Part I: A new approach for the synthesis of (S)-pent-2-yn-1,4-diol, a natural product from *Clitocybe catinus*'. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 13(23), pp. 6458–6462.
- 68 de Zoete, M C, Dalen, Kock-van, van Rantwijk, F and Sheldon, R A (1993) 'Ester ammoniolysis: A new enzymatic reaction'. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, pp. 1831–1832.
- 69 Huang, Yen Kai and Tsai, Shau Wei (2014) 'Kinetic and thermodynamic analysis of *Candida antarctica* lipase B-catalyzed alcoholytic resolution of (R,S)- β -butyrolactone in organic solvents'. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(2), pp. 621–628.
- 70 Ostaszewski, Ryszard, Kłossowski, Szymon, Wiraszka, Barbara and Berłozecki, Stanisław (2013) 'Model studies on the first enzyme-catalyzed Ugi reaction'. *Organic Letters*, 15(3), pp. 566–569.

- 71 Wang, Y F, Lalonde, J J, Momongan, M, Bergbreiter, D E and Wong, C H (1988) 'Lipase-catalyzed irreversible transesterifications using enol esters as acylating reagents; preparative enantio- and regioselective syntheses of alcohol glycerol derivatives sugars and organometalics'. *Journal of American Chemical Society*, 110, pp. 7200–7205.
- 72 Wang, Y F and Wong, CH (1988) 'Lipase-catalyzed irreversible transesterification for preparative synthesis of chiral glycerol derivatives'. *The Journal of Organic Chemistry*, 53, pp. 3127–3129.
- 73 Gotor-Fernández, Vicente and Vicente, Gotor (2007) 'Use of lipases in organic synthesis', in *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*, p. 302.
- 74 Gotor, Vicente (2002) 'Biocatalysis applied to the preparation of pharmaceuticals'. *Organic Process Research and Development*, 6(4), pp. 420–426.
- 75 Gotor, V (1999) 'Non-Conventional Hydrolase Chemistry: Amide and Carbamate Bond Formation Catalyzed by Lipases.' *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 7, pp. 2189–2197.
- 76 González-Sabín, J, Gotor, V and Rebolledo, F (2002) 'CAL-B-catalyzed resolution of some pharmacologically interesting α -substituted isopropylamines.' *Tetrahedron: Asymmetry*, 13, pp. 1315–1320.
- 77 González-Sabin, J, Gotor, V and F. Rebolledo, F (2004) 'Chemoenzymatic preparation of optically active α -aminocyclohexanols and their application in the enantioselective addition of diethylzinc to benzaldehyde'. *Tetrahedron: Asymmetry*, 15, pp. 1335–1341.
- 78 Liljeblad, Arto, Kallio, Pauli, Vainio, Marita, Niemi, Jarmo and Kanerva, Liisa T. (2010) 'Formation and hydrolysis of amide bonds by lipase A from *Candida antarctica*; Exceptional features'. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 8(4), pp. 886–895.
- 79 Alatorre-Santamaría, Sergio, Rodriguez-Mata, María, Gotor-Fernández, Vicente, de Mattos, Marcos Carlos, et al. (2008) 'Efficient access to enantiomerically pure cyclic α -amino esters through a lipase-catalyzed kinetic resolution'. *Tetrahedron Asymmetry*, 19(14), pp. 1714–1719.
- 80 Goswami, Animesh, Howell, Jeffrey M., Hua, Edward Y., Mirfakhrae, K. David, et al.

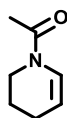
- (2001) 'Chemical and enzymatic resolution of (R,S)-N-(tert-Butoxycarbonyl)-3-hydroxymethylpiperidine'. *Organic Process Research and Development*, 5(4), pp. 415–420.
- 81 Fernández-Lorente, Gloria, Palomo, José M., Mateo, Cesar, Guisan, José M. and Fernandez-Lafuente, Roberto (2004) 'Resolution of paroxetine precursor using different lipases: Influence of the reaction conditions on the enantioselectivity of lipases'. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(3–4), pp. 264–269.
 - 82 Gonzalo, Gonzalo De, Brieva, Rosario and Sa, M (2001) 'Enzymatic Resolution of Intermediates in the Synthesis of (-)-Paroxetine'. *Journal of Organic Chemistry*, 66(7), pp. 8947–8953.
 - 83 Palomo, Jose M., Fernández-Lorente, Gloria, Mateo, Cesar, Fuentes, Manuel, et al. (2002) 'Enzymatic production of (3S,4R)-(-)-4-(4'-fluorophenyl)-6-oxo-piperidin-3-carboxylic acid using a commercial preparation of lipase A from *Candida antarctica*: The role of a contaminant esterase'. *Tetrahedron Asymmetry*, 13(24), pp. 2653–2659.
 - 84 Palomo, Jose M., Fernández-Lorente, Gloria, Mateo, Cesar, Fernández-Lafuente, Roberto and Guisan, José M. (2002) 'Enzymatic resolution of (±)-trans-4-(4'-fluorophenyl)-6-oxo-piperidin-3-ethyl carboxylate, an intermediate in the synthesis of (-)-Paroxetine'. *Tetrahedron Asymmetry*, 13(21), pp. 2375–2381.
 - 85 Garret, R H (2010) *Biochemistry* 2nd ed., Belmont, CA: Brooks/Cole, Cengage Learning.
 - 86 Johnson, Kenneth A. and Goody, Roger S. (2011) 'The original Michaelis constant: Translation of the 1913 Michaelis-Menten Paper'. *Biochemistry*, 50(39), pp. 8264–8269.
 - 87 P, Schreier, Bernreuther, A and Huffer, M (1996) *Analysis of chiral Organic Molecules: Methodology and Applications* Gruyter, W. de (ed.),
 - 88 Uppenberg, J, Hansen, T, Patkar, S and Jones, T A (1994) 'The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica* Structure.' , 2, p. 293.
 - 89 Hu, C H, Brinck, T and Hult, K (1998) 'Ab initio and density functional theory studies of

- the catalytic mechanism for ester hydrolysis in serine hydrolases'. *Int. J. Quantum Chem.*, 69, pp. 89–103.
- 90 Hult, K; Fransson, L; Raza, S (2001) 'Enantioselectivity in *Candida antarctica* lipase B: A molecular dynamics study'. *Protein Science*, 10(2), pp. 329–338. [online] Available from: <http://doi.wiley.com/10.1110/ps.33901>
 - 91 Khersonsky, Olga and Tawfik, Dan S (2010) 'Enzyme promiscuity: a mechanistic and evolutionary perspective.' *Annual review of biochemistry*, 79, pp. 471–505. [online] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20235827>
 - 92 Kazlauskas, R J, Mugford, P F, Wagner, U G, Jiang, Y and Faber, K (2008) 'Enantiocomplementary enzymes: Classification, molecular basis for their enantiopreference, and prospects for mirror-image biotransformations'. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47(46), pp. 8782–8793.
 - 93 Veld, Martijn Arnoldus Johannes (2010) *Candida antarctica Lipase B catalysis in organic, polymer and supramolecular chemistry*,
 - 94 Carney, Daniel W., Schmitz, Karl R., Truong, Jonathan V., Sauer, Robert T. and Sello, Jason K. (2014) 'Restriction of the conformational dynamics of the cyclic acyldepsipeptide antibiotics improves their antibacterial activity'. *Journal of the American Chemical Society*, 136(5), pp. 1922–1929.
 - 95 Wiberg, Kenneth B, Nakaji, David Y and Morgan, Kathleen M (1993) 'Heat of Hydrogenation of a Cis Imine. An Experimental and Theoretical Study'. , 115(7), pp. 3527–3532.
 - 96 Perrey, Ralf; Wink Michael (1988) 'On the Role of 1-Piperidine and Tripeperideine in the Biosynthesis of Quinolizidine Alkaloids'. , pp. 363–369.
 - 97 Gomm, Authors Andrew, Lewis, William, Green, Anthony P, Reilly, Elaine O, et al. (n.d.) 'A new generation of smart amine donors for transaminase- mediated biotransformations'. *Chem. Eur. J.*
 - 98 Fandrick, Daniel R, Hart, Christine A, Okafor, Ifeanyi S, Mercadante, Michael A, et al.

- (2016) ‘Copper-Catalyzed Asymmetric Propargylation of Cyclic Aldimines’. , pp. 18–21.
- 99 Razavi, Bahar S., Blagodatskaya, Evgenia and Kuzyakov, Yakov (2015) ‘Nonlinear temperature sensitivity of enzyme kinetics explains canceling effect-A case study on loamy haplic Luvisol’. *Frontiers in Microbiology*, 6(OCT), pp. 1–13.
 - 100 Van Pham, V., Phillips, Robert S. and Ljungdahl, Lars G. (1989) ‘Temperature-Dependent Enantiospecificity of Secondary Alcohol Dehydrogenase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*’. *Journal of the American Chemical Society*, 111(5), pp. 1935–1936.
 - 101 Sakai, Takashi (2007) *Temperature control of the enantioselectivity in the lipase-catalyzed resolutions*, Elsevier B.V. [online] Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-53059-2.50002-9>
 - 102 Holmberg, Erland and Hult, Karl (1991) ‘Temperature as an enantioselective parameter in enzymatic resolutions of racemic mixtures’. *Biotechnology Letters*, 13(5), pp. 323–326.
 - 103 Ottosson, Jenny, Rotticci-Mulder, Johanna C., Rotticci, Didier and Hult, Karl (2002) ‘Rational design of enantioselective enzymes requires considerations of entropy’. *Protein Science*, 10(9), pp. 1769–1774.
 - 104 Fitzpatrick, Paul A. and Klibanov, Alexander M. (1991) ‘How Can the Solvent Affect Enzyme Enantioselectivity?’ *Journal of the American Chemical Society*, 113(8), pp. 3166–3171.
 - 105 Zhang, N., Suen, W.-C., Windsor, W., Xiao, L., et al. (2003) ‘Improving tolerance of *Candida antarctica* lipase B towards irreversible thermal inactivation through directed evolution’. *Protein Engineering Design and Selection*, 16(8), pp. 599–605.
 - 106 Homann, Michael J., Vail, Robert, Morgan, Brian, Sabesan, Vijay, et al. (2001) ‘Enzymatic Hydrolysis of a Prochiral 3-Substituted Glutarate Ester, an Intermediate in the Synthesis of an NK 1 /NK 2 Dual Antagonist’. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 343(6–7), pp. 744–749.
 - 107 Tatsuta, Kuniaki, Suzuki, Yasuaki, Furuyama, Akiho and Ikegami, Hiroshi (2006) ‘The first total synthesis of a tetracyclic antibiotic, (-)-tetrodecamycin’. *Tetrahedron Letters*,

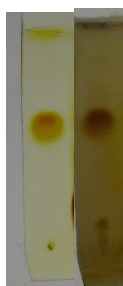
- 47(21), pp. 3595–3598.
- 108 Stephenson, L. M. and Speth, D. R. (1979) ‘Mechanism of Allylic Hydroxylation by Selenium Dioxide’. *Journal of Organic Chemistry*, 44(25), pp. 4683–4689.
- 109 Kozak, Jennifer A. and Dake, Gregory R. (2008) ‘Total synthesis of (+)-fawcettidine’. *Angewandte Chemie - International Edition*, 47(22), pp. 4221–4223.
- 110 Zhang, Xuqing, Jiang, Weiqin and Sui, Zhihua (2003) ‘Concise enantioselective syntheses of quinolactacins A and B through alternative winterfeldt oxidation’. *Journal of Organic Chemistry*, 68(11), pp. 4523–4526.
- 111 Aciro, Caroline, Claridge, Timothy D.W., Davies, Stephen G., Roberts, Paul M., et al. (2008) ‘Ammonium-directed dihydroxylation of 3-aminocyclohex-1-enes: Development of a metal-free dihydroxylation protocol’. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 6(20), pp. 3751–3761.
- 112 Still, W. Clark, Kahn, Michael and Mitra, Abhijit (1978) ‘Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution’. *Journal of Organic Chemistry*, 43(14), pp. 2923–2925.
- 113 Gottlieb, Hugo E, Kotlyar, Vadim and Nudelman, Abraham (1997) ‘NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities’. *The Journal of Organic Chemistry*, 62(21), pp. 7512–7515. [online] Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jo971176v>

APÊNDICE A — CCD DOS COMPOSTOS 4a E 4b

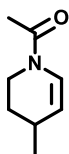


MM: 125.17

4a

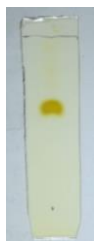


Fase estacionária	Placa de sílica
Fase móvel	Acetato de etila/ Hexano 1:1
Revelador	Vapores de Iodo → vanilina + calor
Rf	$(2.00 / 3.5) = \mathbf{0.57}$



MM: 139.19

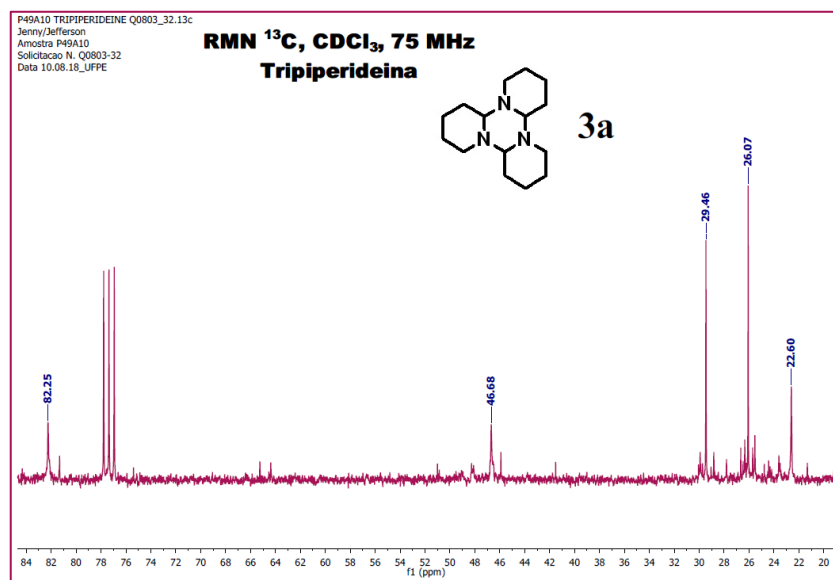
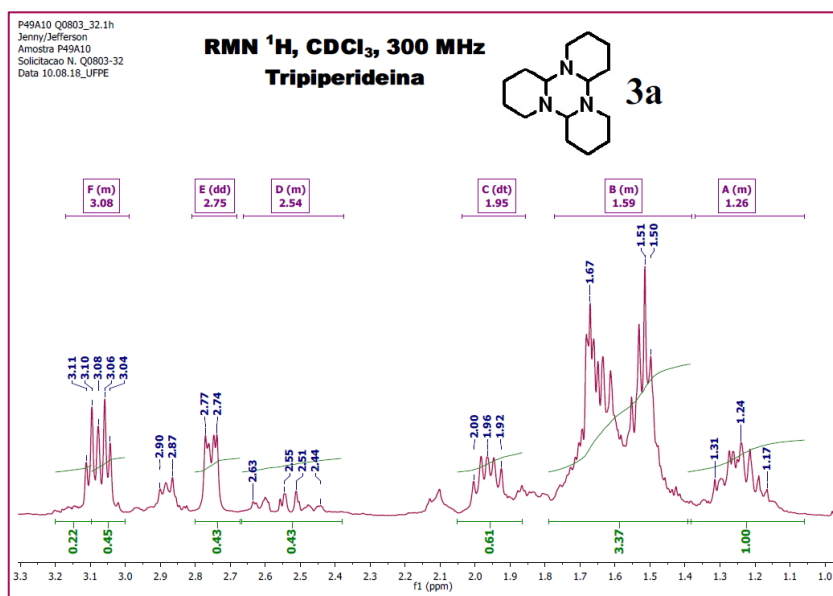
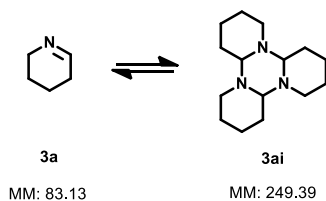
4b



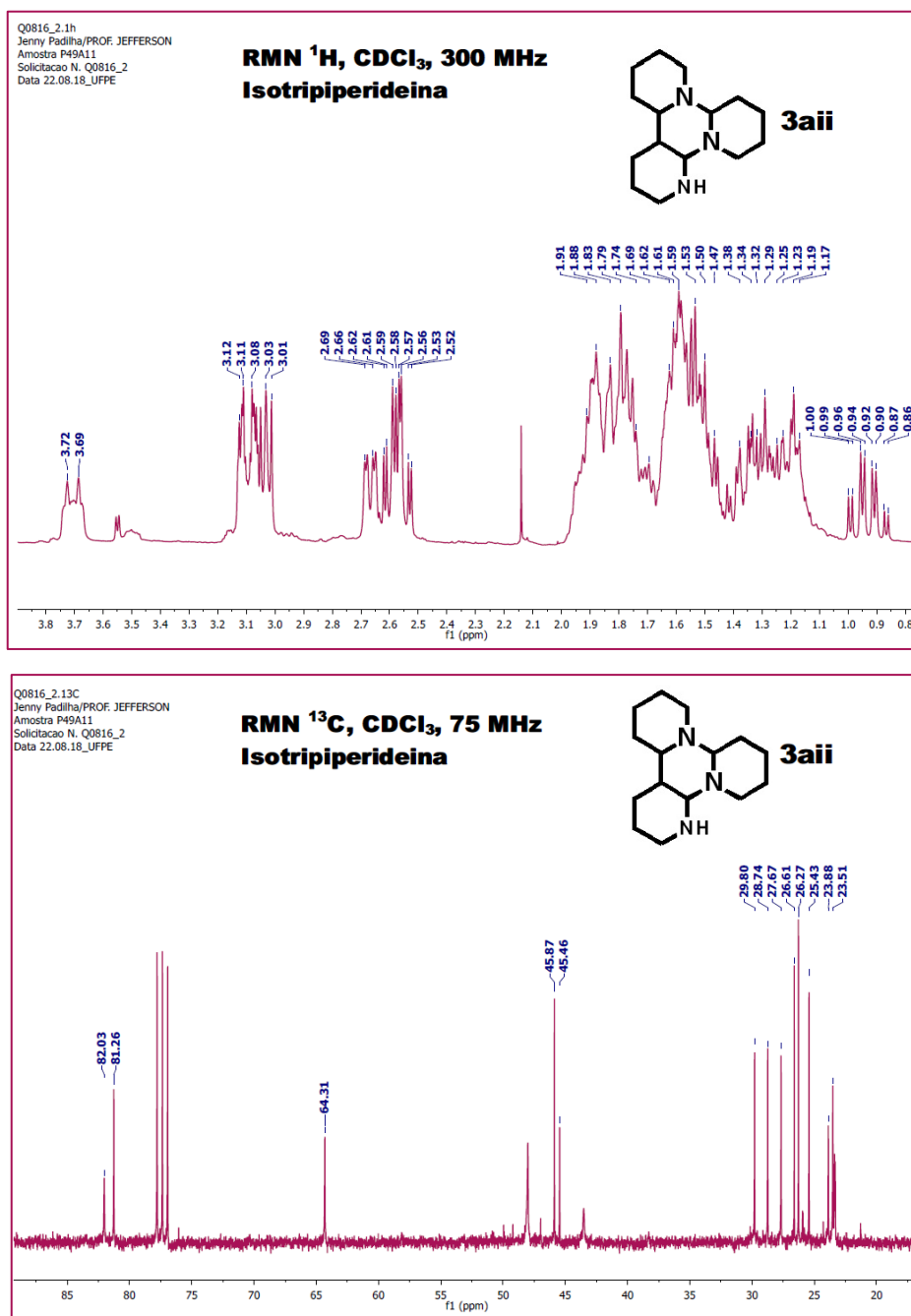
Fase estacionária	Placa de sílica
Fase móvel	Acetato de etila/ Hexano 1:1
Revelador	Vapores de Iodo → vanilina + calor
Rf	$(2.6 / 3.8) = \mathbf{0.68}$

APÊNDICE B — IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS 3a e

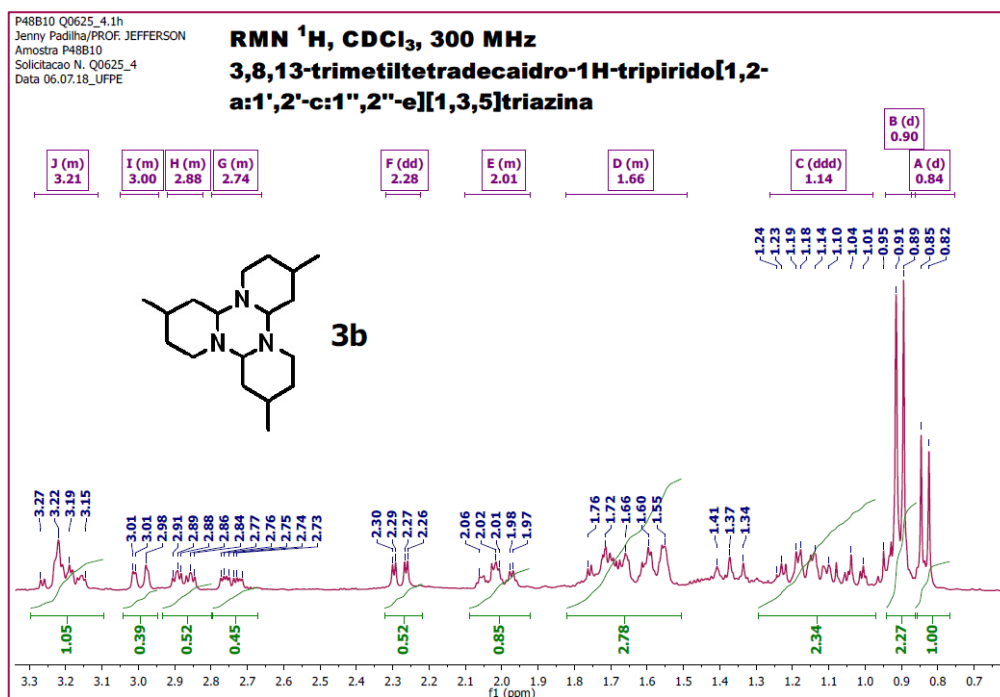
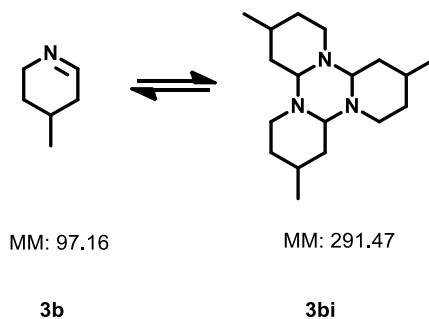
3ai

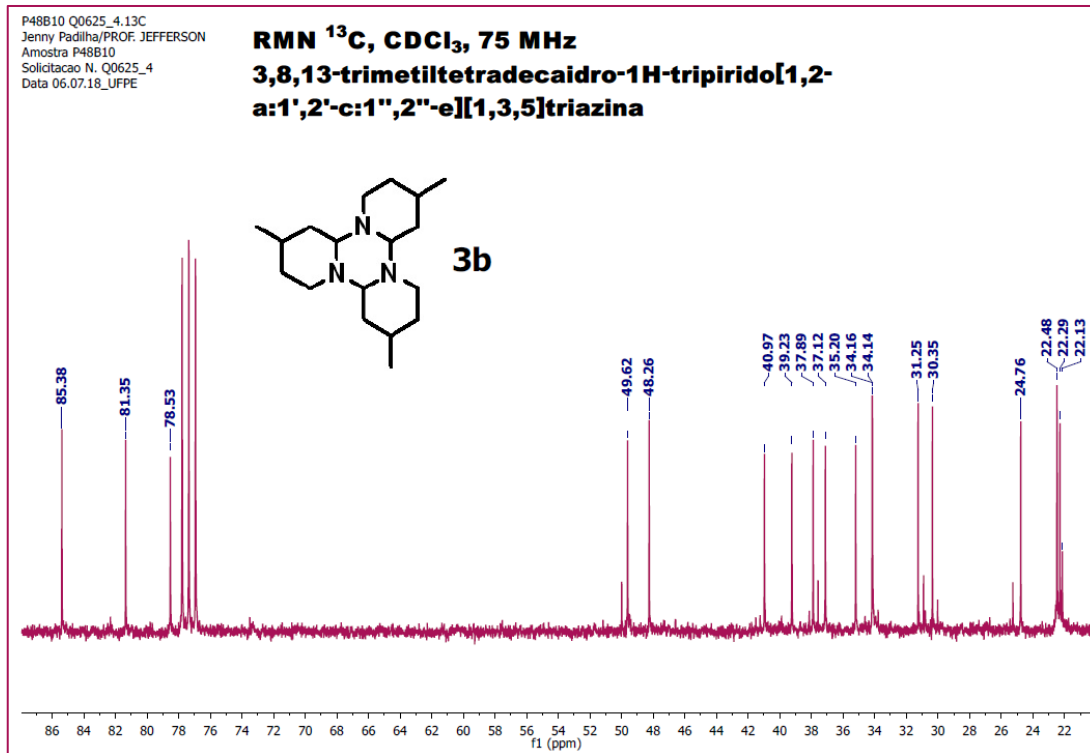


APÊNDICE C — ESPECTROS DE 3a E SEUS ISÔMEROS

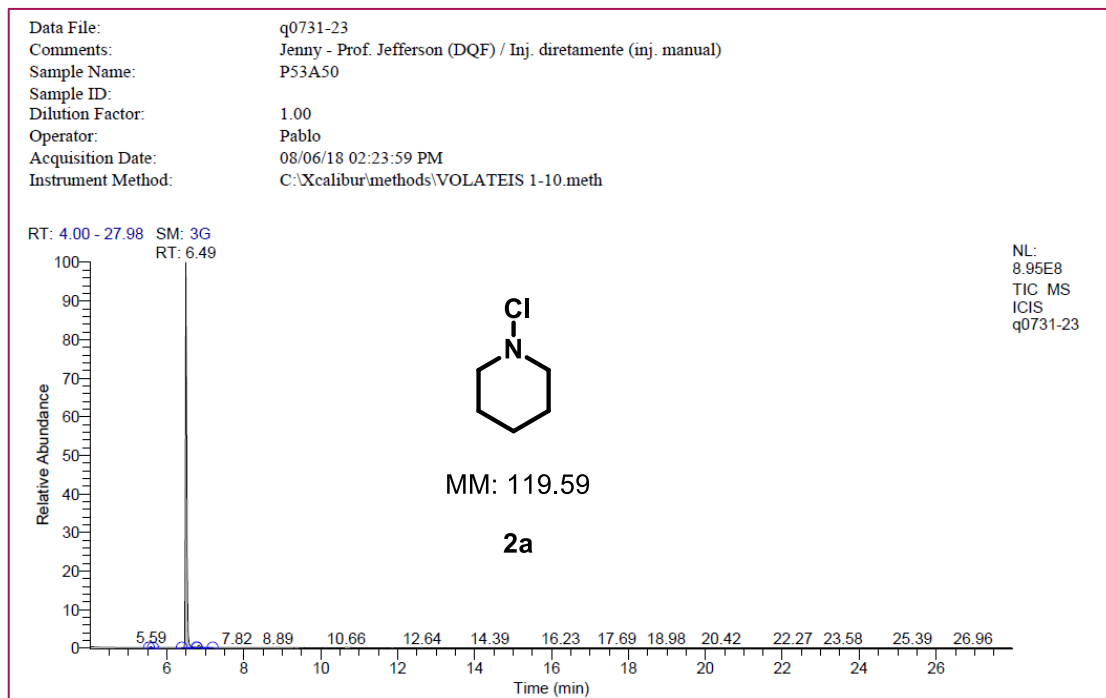


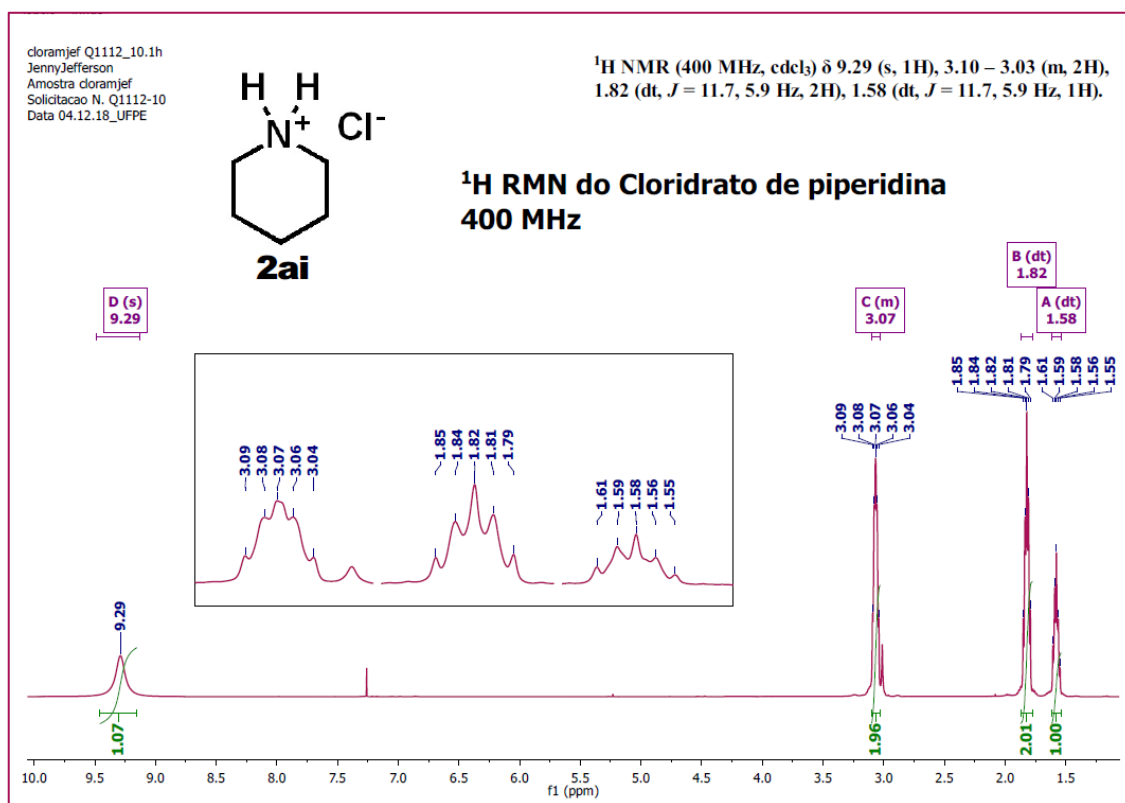
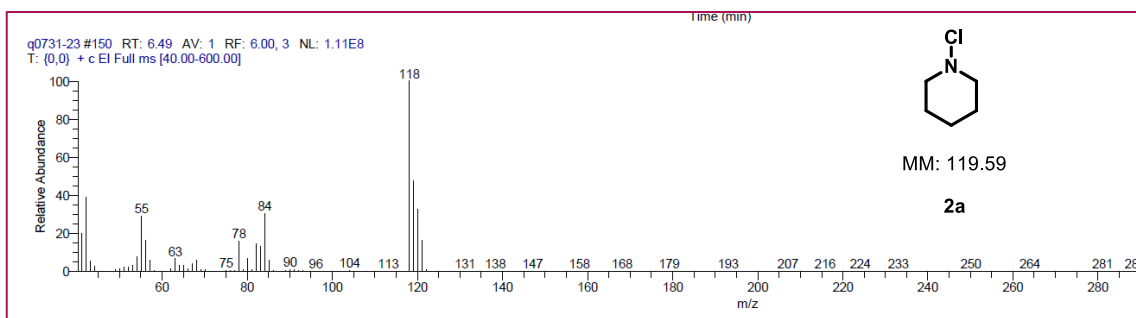
APÊNDICE D — IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E IMAGENS DO COMPOSTO 3b

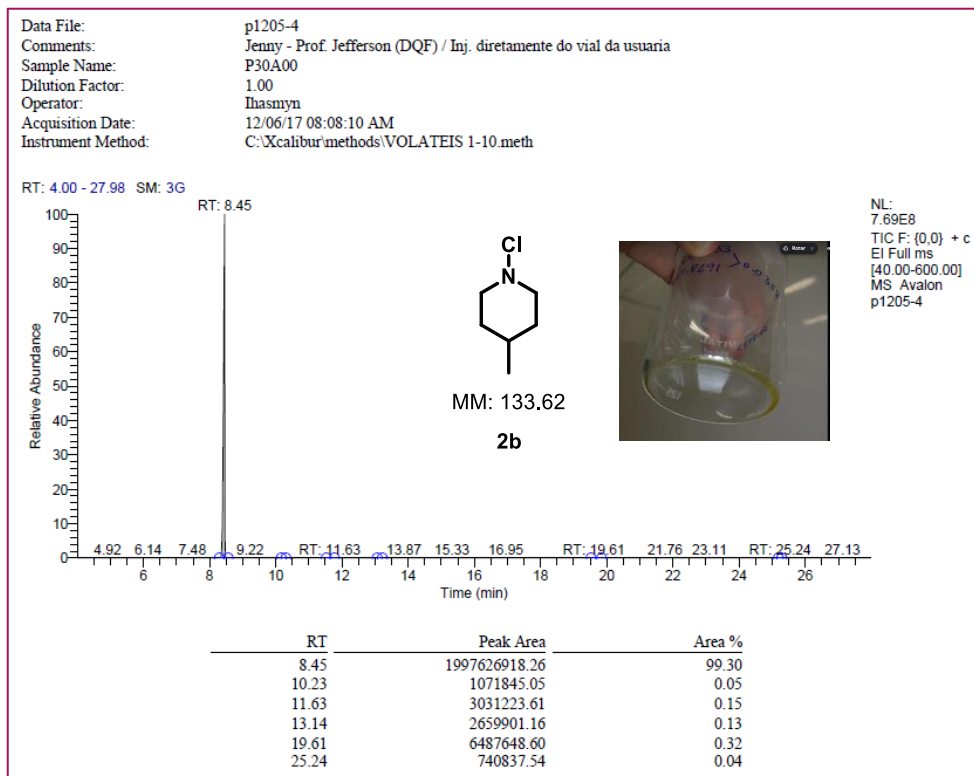
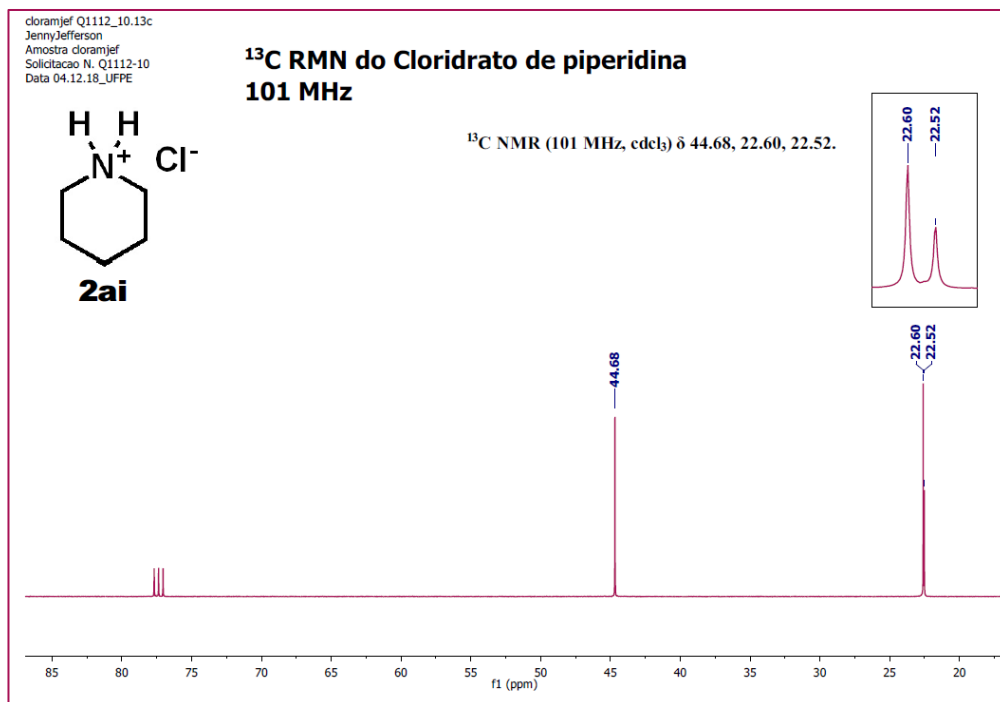


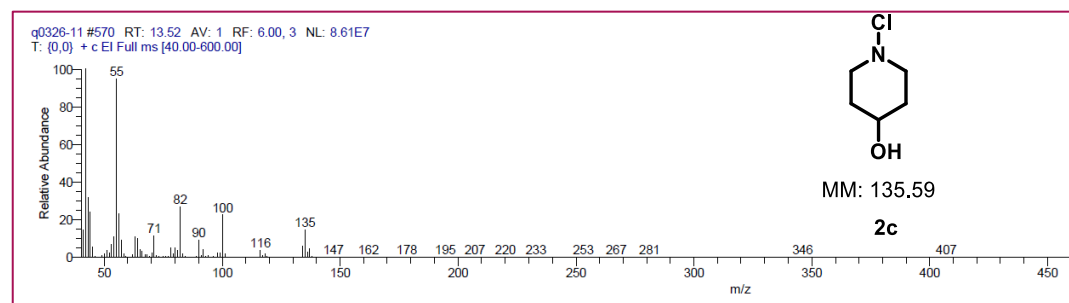
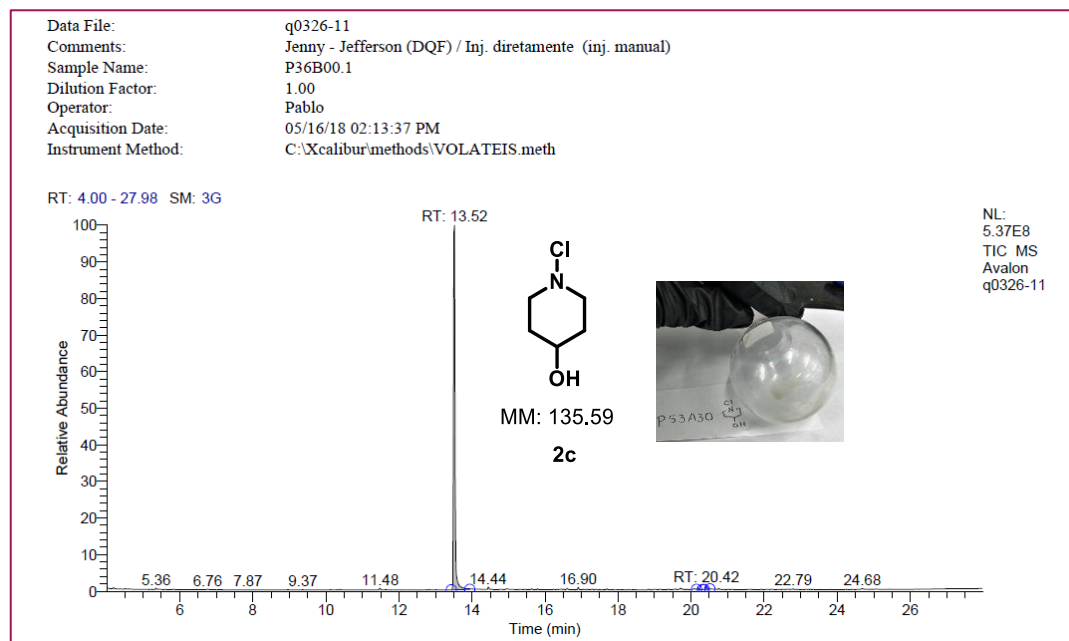
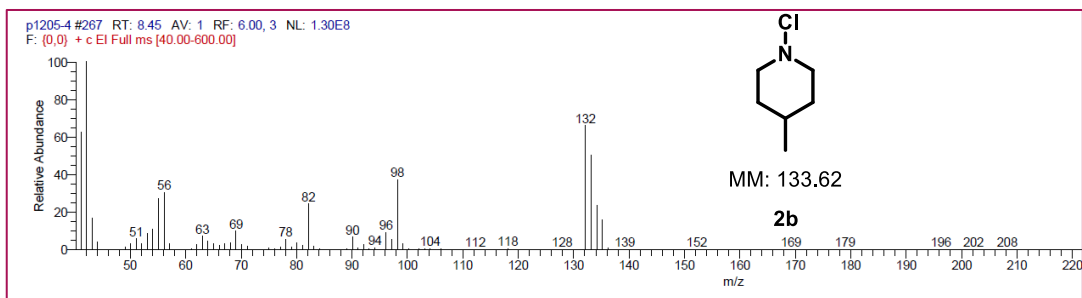


**APÊNDICE E — ANÁLISES DAS CLORAMINAS 2a-2h (ESPECTROS DE GC-MS E
GC-FID, E RMN)**



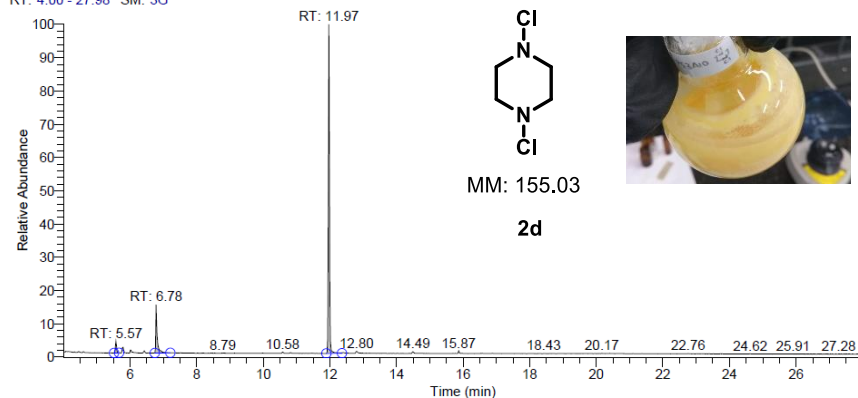






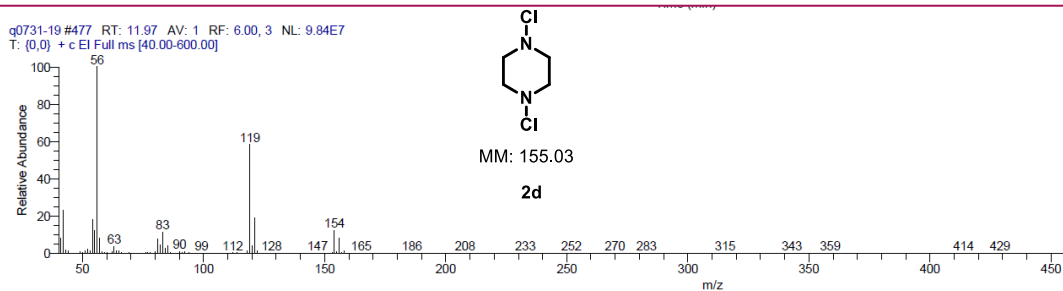
Data File: q0731-19
 Comments: Jenny - Prof. Jefferson (DQF) / Inj. diretamente (inj. manual)
 Sample Name: P53A10
 Sample ID:
 Dilution Factor: 1.00
 Operator: Pablo
 Acquisition Date: 08/06/18 10:54:30 AM
 Instrument Method: C:\Xcalibur\methods\VOLATEIS 1-10.meth

RT: 4.00 - 27.98 SM: 3G



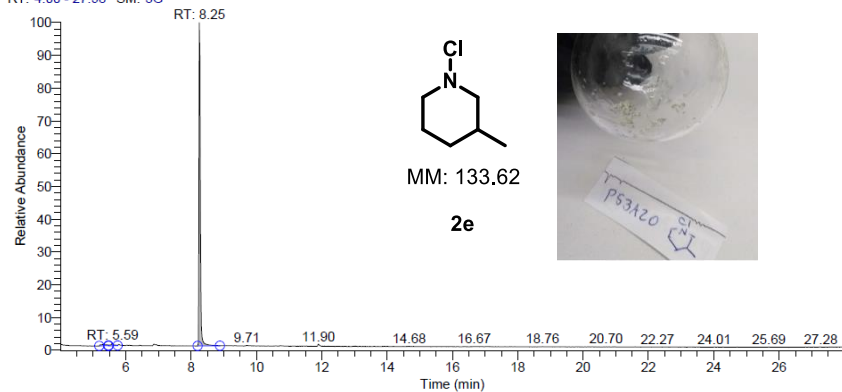
NL:
7.30E8
TIC MS
ICIS
q0731-19

q0731-19 #477 RT: 11.97 AV: 1 RF: 6.00, 3 NL: 9.84E7
 T: (0,0) + c EI Full ms [40.00-600.00]

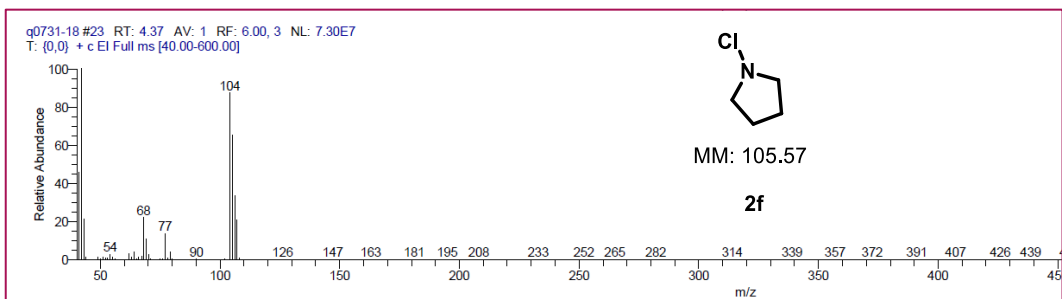
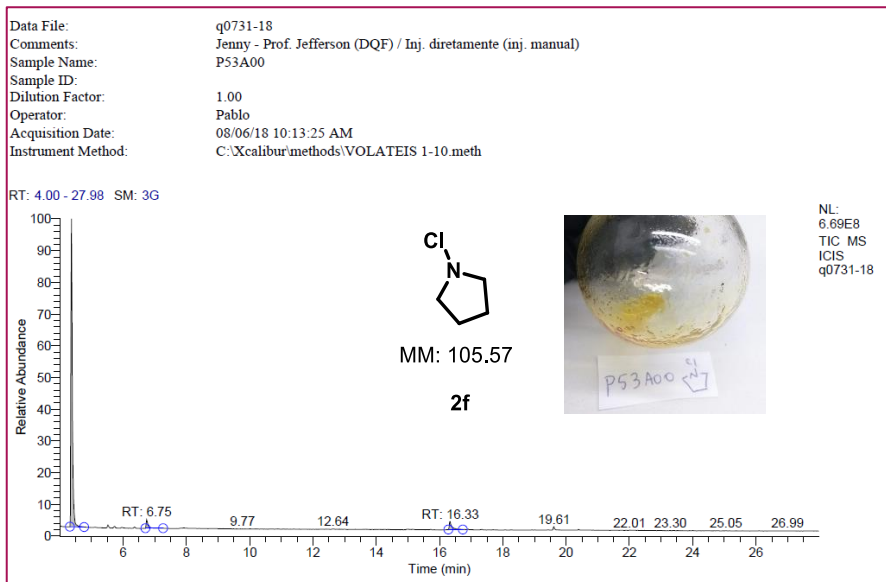
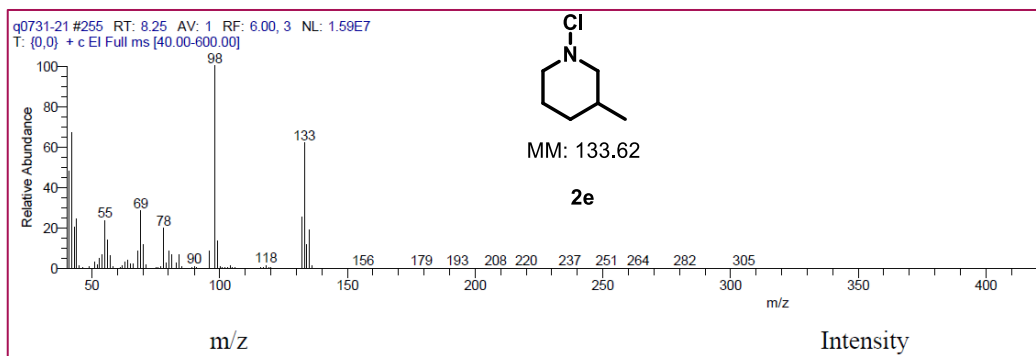


Data File: q0731-21
 Comments: Jenny - Prof. Jefferson (DQF) / Inj. diretamente (inj. manual)
 Sample Name: P53A30
 Sample ID:
 Dilution Factor: 1.00
 Operator: Pablo
 Acquisition Date: 08/06/18 12:14:39 PM
 Instrument Method: C:\Xcalibur\methods\VOLATEIS 1-10.meth

RT: 4.00 - 27.98 SM: 3G

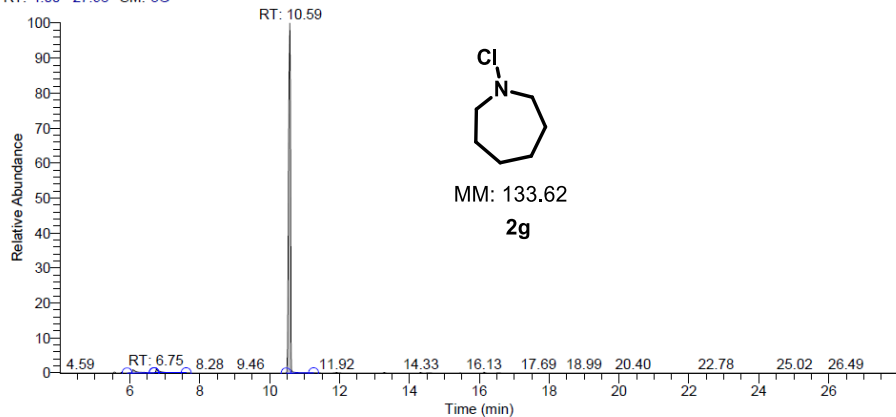


NL:
2.78E8
TIC MS
ICIS
q0731-21

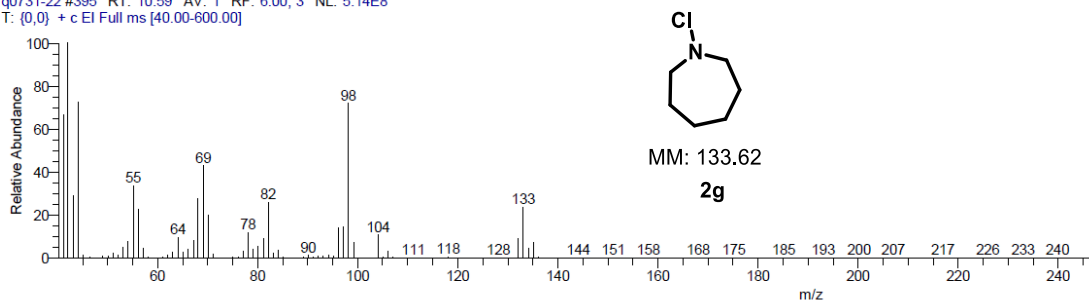


Data File: q0731-22
Comments: Jenny - Prof. Jefferson (DQF) / Inj. diretamente (inj. manual)
Sample Name: P53A30
Sample ID:
Dilution Factor: 1.00
Operator: Pablo
Acquisition Date: 08/06/18 01:49:51 PM
Instrument Method: C:\Xcalibur\methods\VOLATEIS 1-10.meth

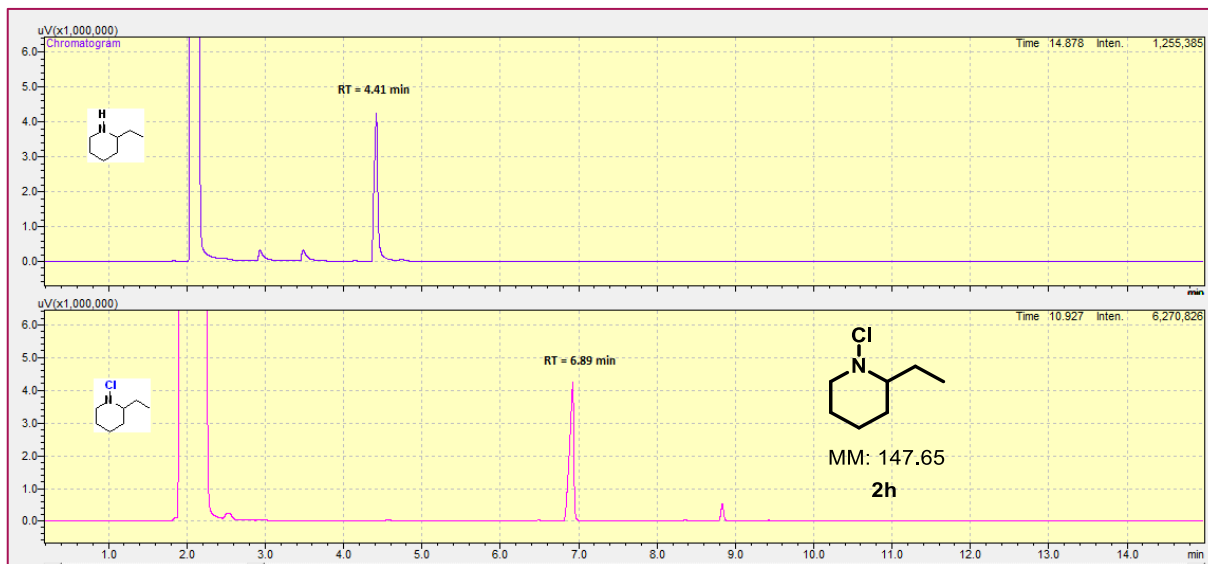
RT: 4.00 - 27.98 SM: 3G



q0731-22 #395 RT: 10.59 AV: 1 RF: 6.00, 3 NL: 5.14E8
T: (0,0) + c EI Full ms [40.00-600.00]

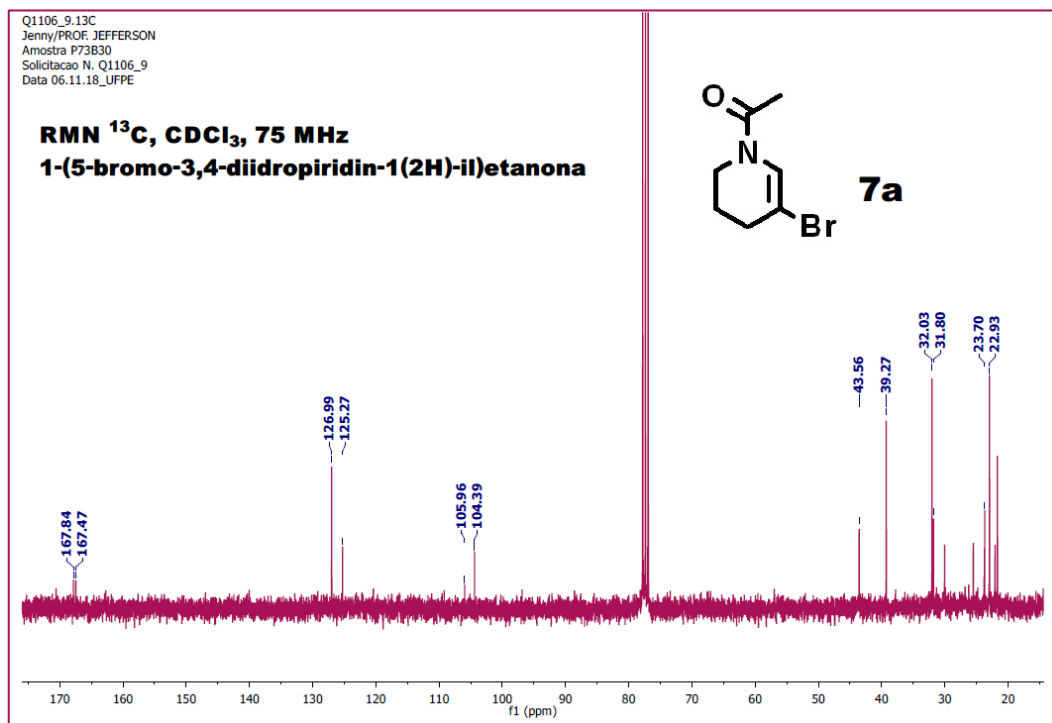
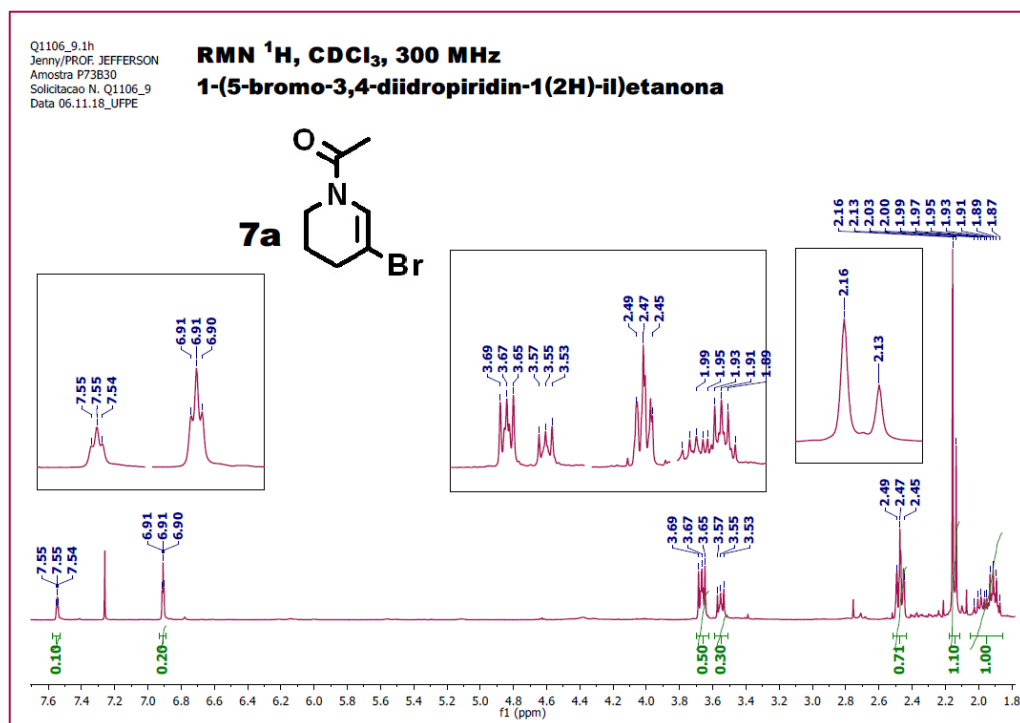


APÊNDICE F — CROMATOGRAMA DE GC-FID PARA A FORMAÇÃO DO
COMPOSTO 2h

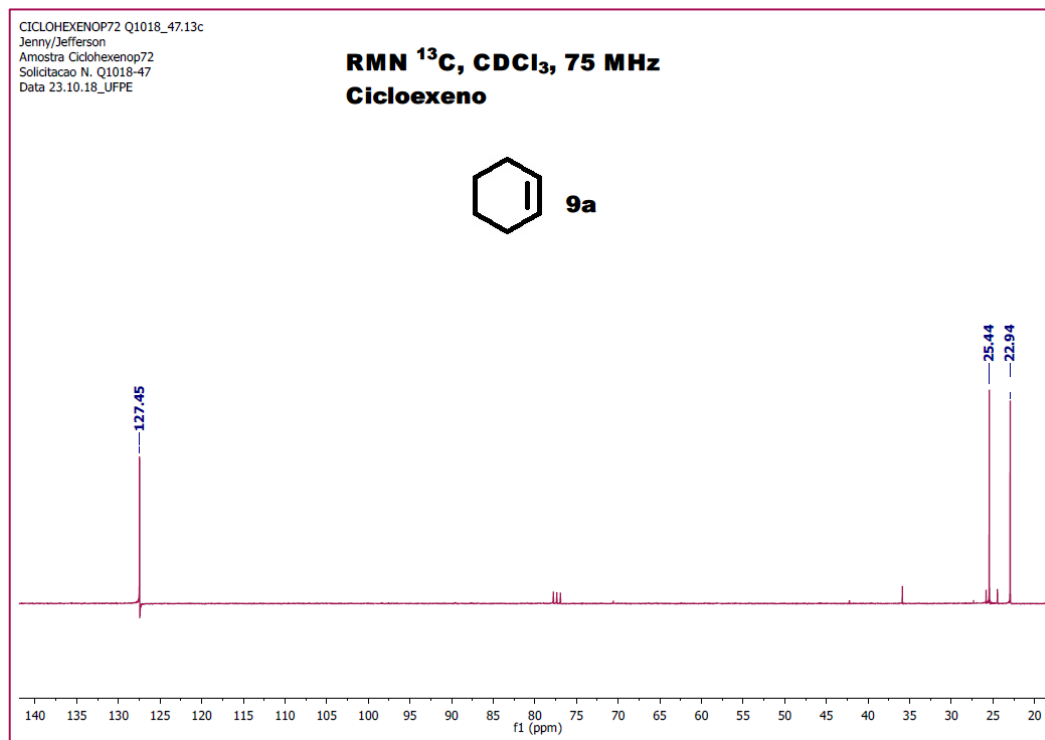
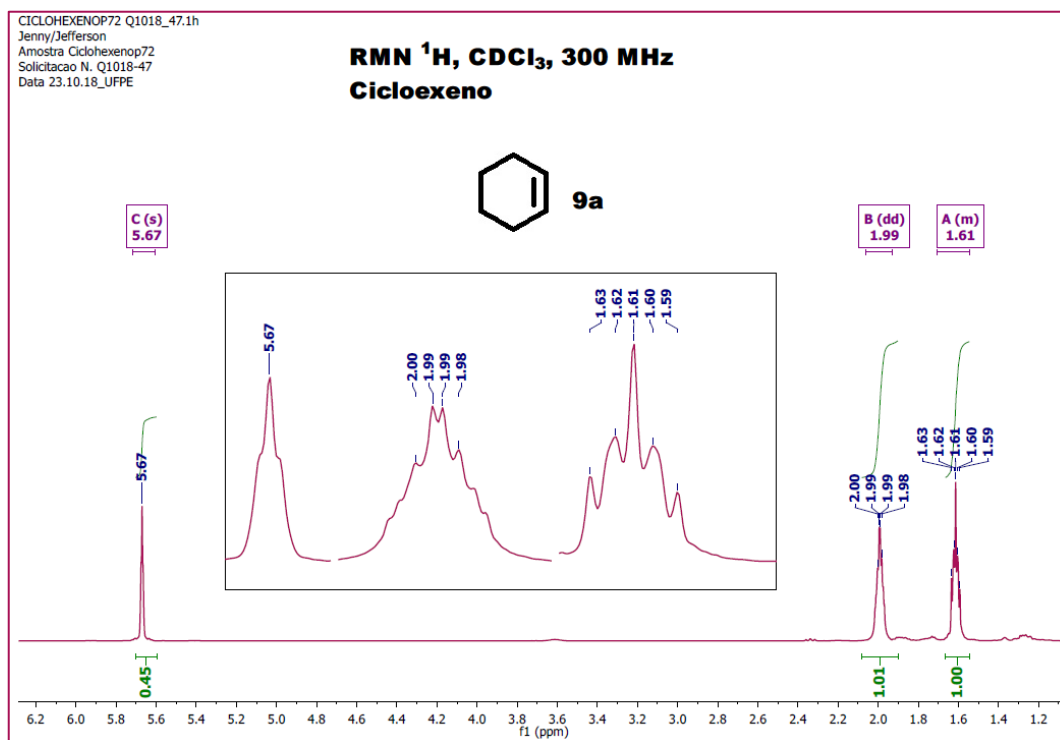


GC-FID de 2h. Coluna não quirai, Método C.

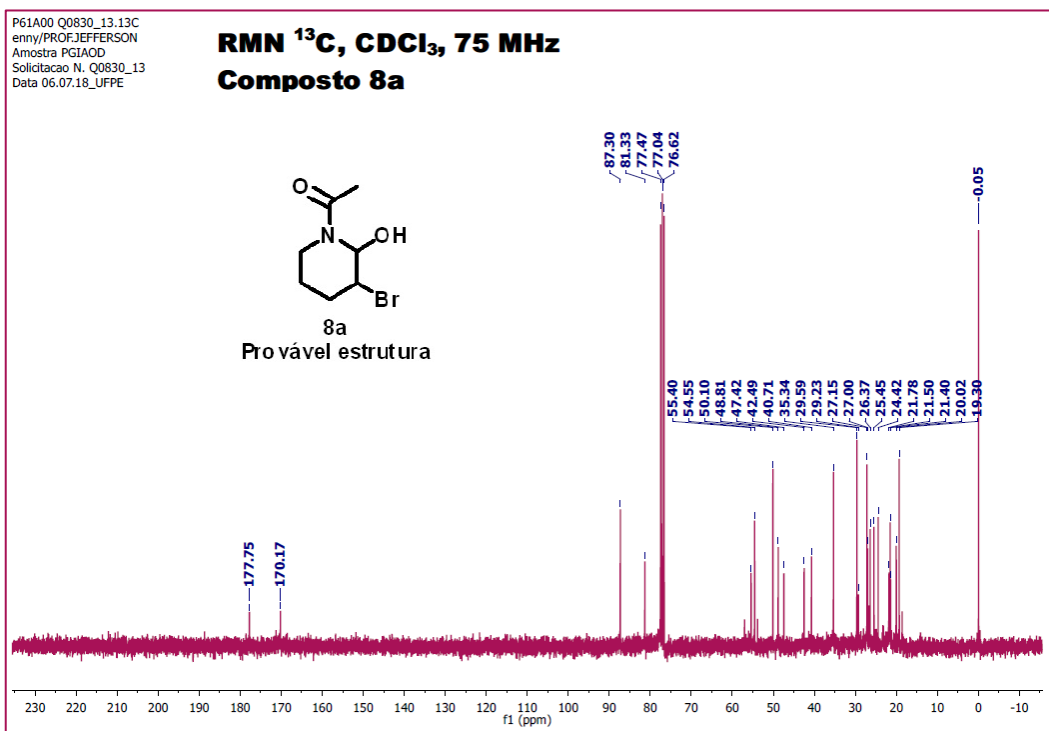
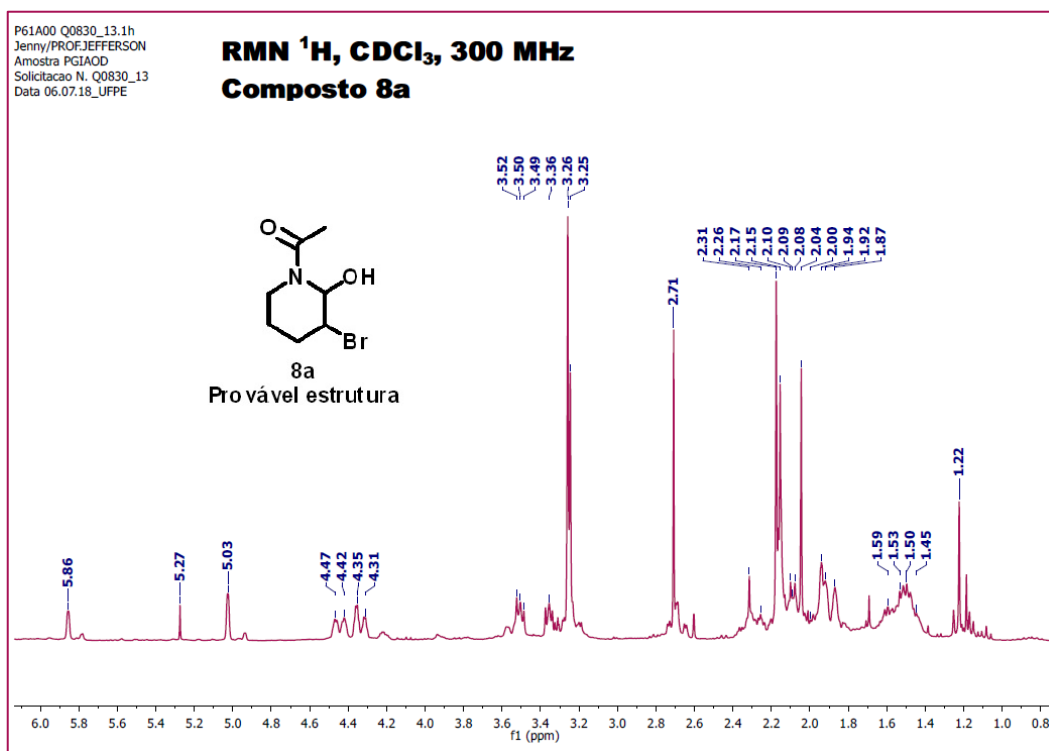
APÊNDICE G — IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO 7a

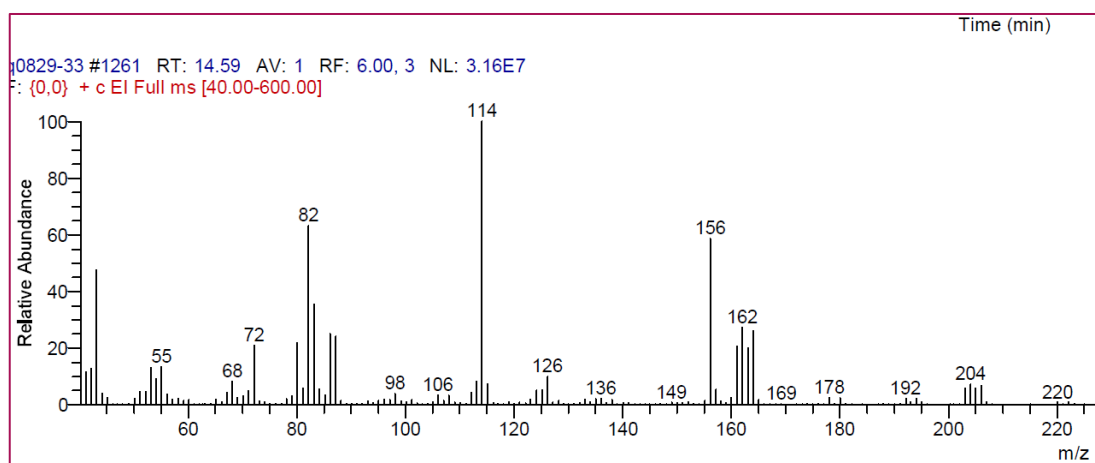


APÊNDICE H — IDENTIFICAÇÃO DO CICLOEXENO, (9a)



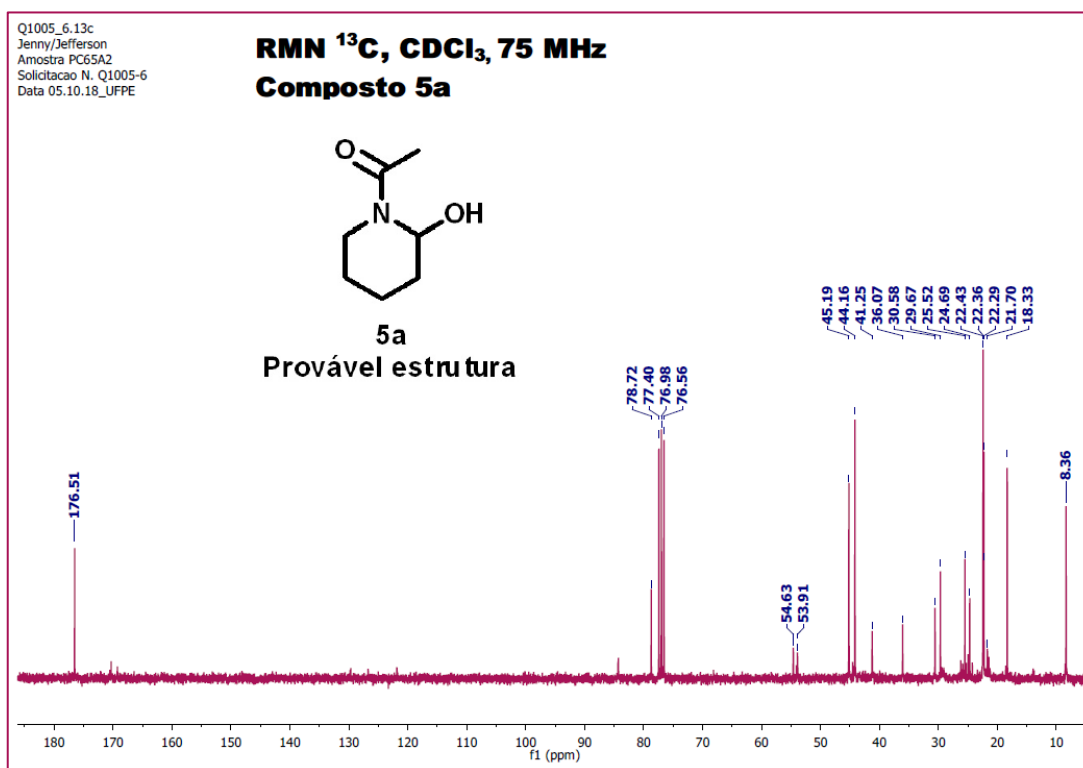
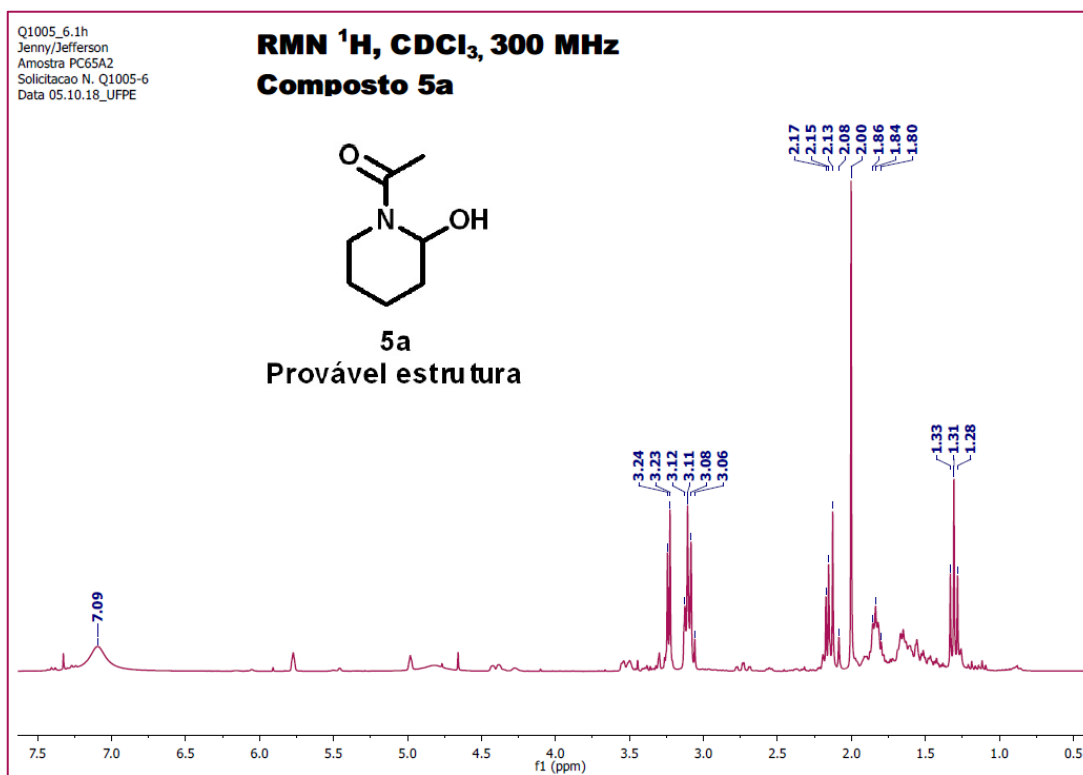
APÊNDICE I — ESPECTROS DO COMPOSTO 8a





Espectro de GC-MS do o composto 8a.

APÊNDICE J— IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO 5a

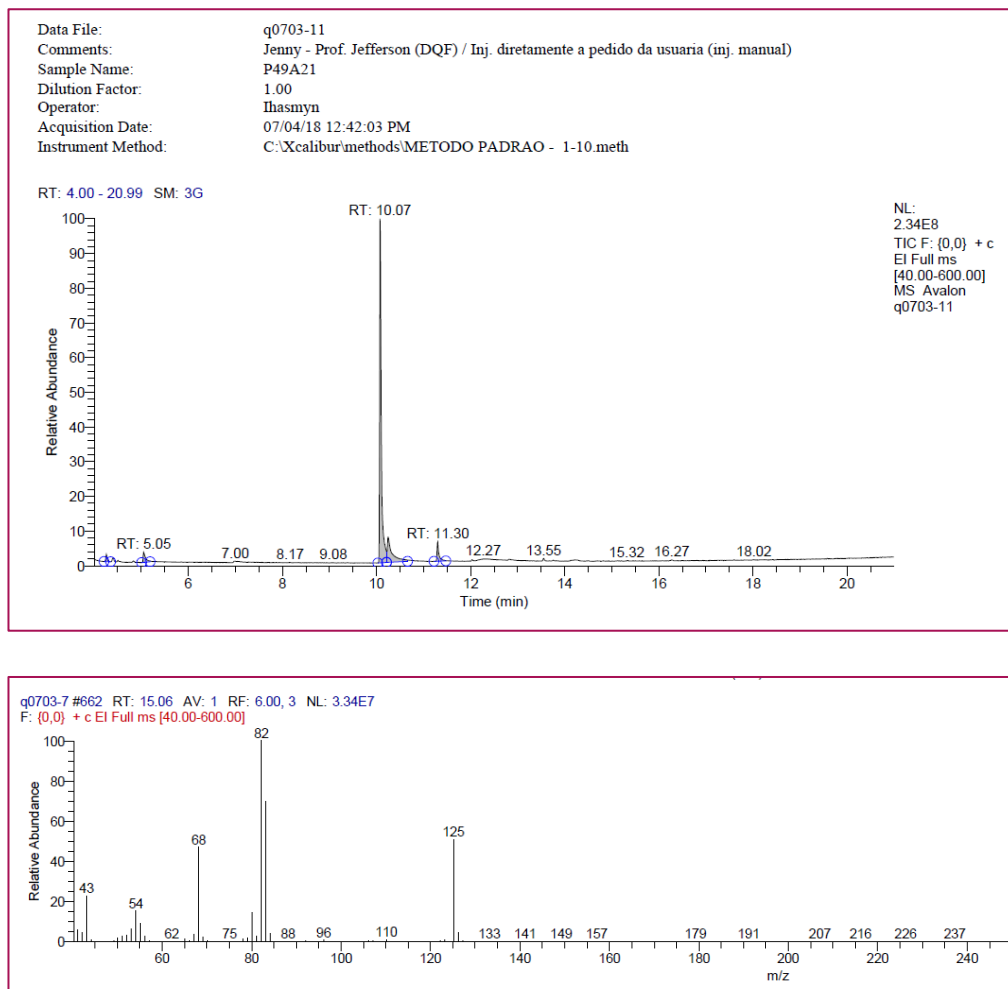


APÊNDICE K — IMAGENS

Composto **3a** como trímeroComposto **4b**Composto **3b** em forma de trímero

ANEXOS

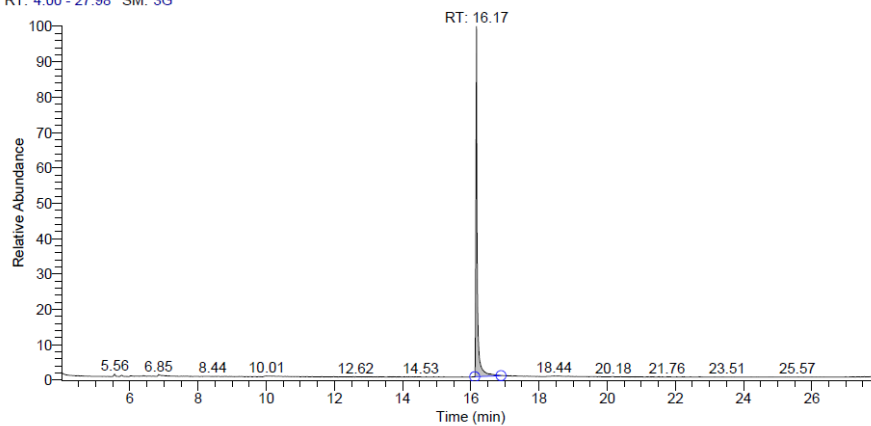
ANEXO A: GC-MS do composto 4a



ANEXO B: GC-MS do composto 4b

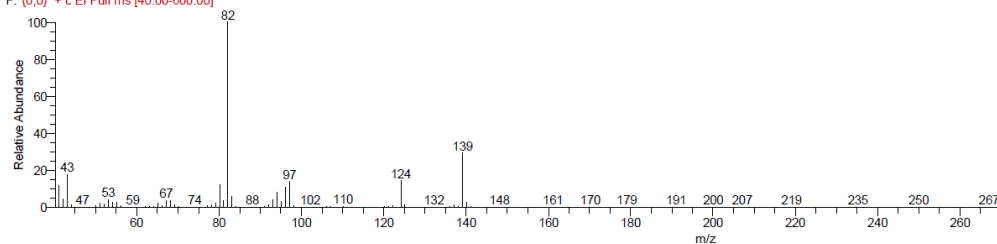
Data File: q0803-26
Comments: Jenny - Prof. Jefferson (DQF) / Inj. diretamente (inj. manual)
Sample Name: P33B10
Sample ID:
Dilution Factor: 1.00
Operator: Pablo
Acquisition Date: 08/06/18 04:12:03 PM
Instrument Method: C:\Xcalibur\methods\VOLATEIS 1-10.meth

RT: 4.00 - 27.98 SM: 3G

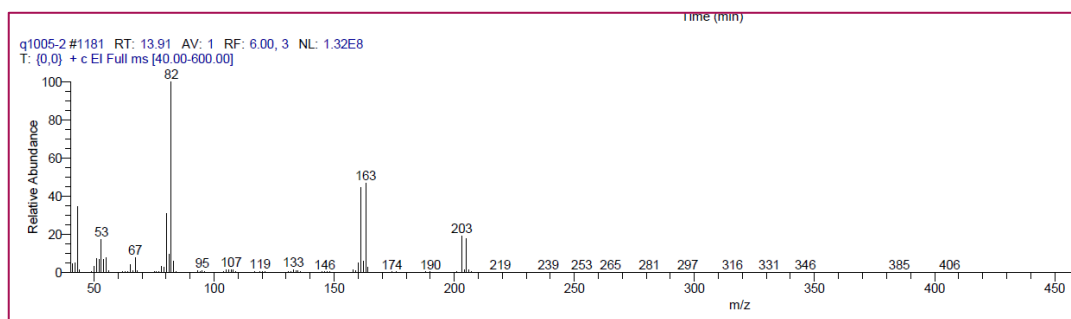
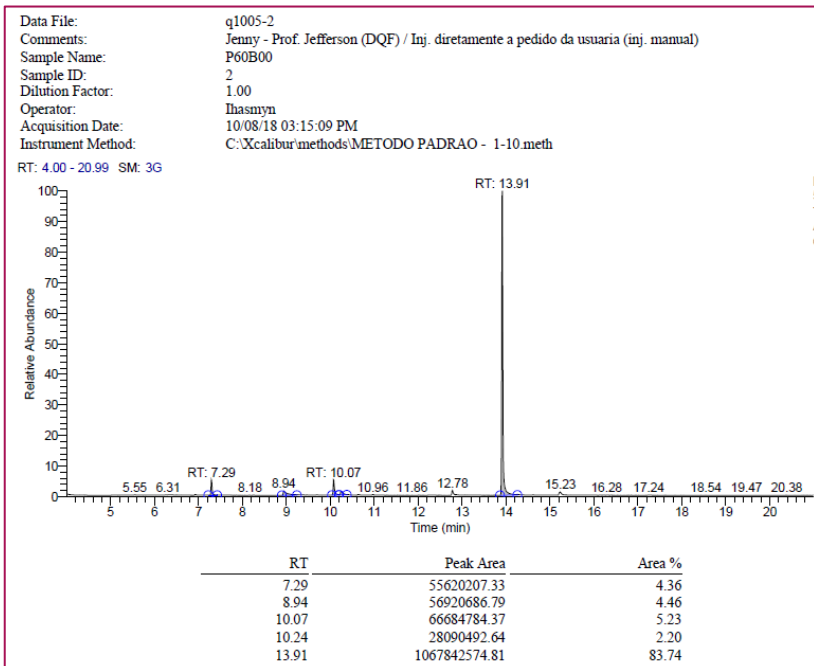


NL: 1.03E8
TIC F: {0,0} + c
EI Full ms [40.00-600.00]
MS ICIS
q0803-26

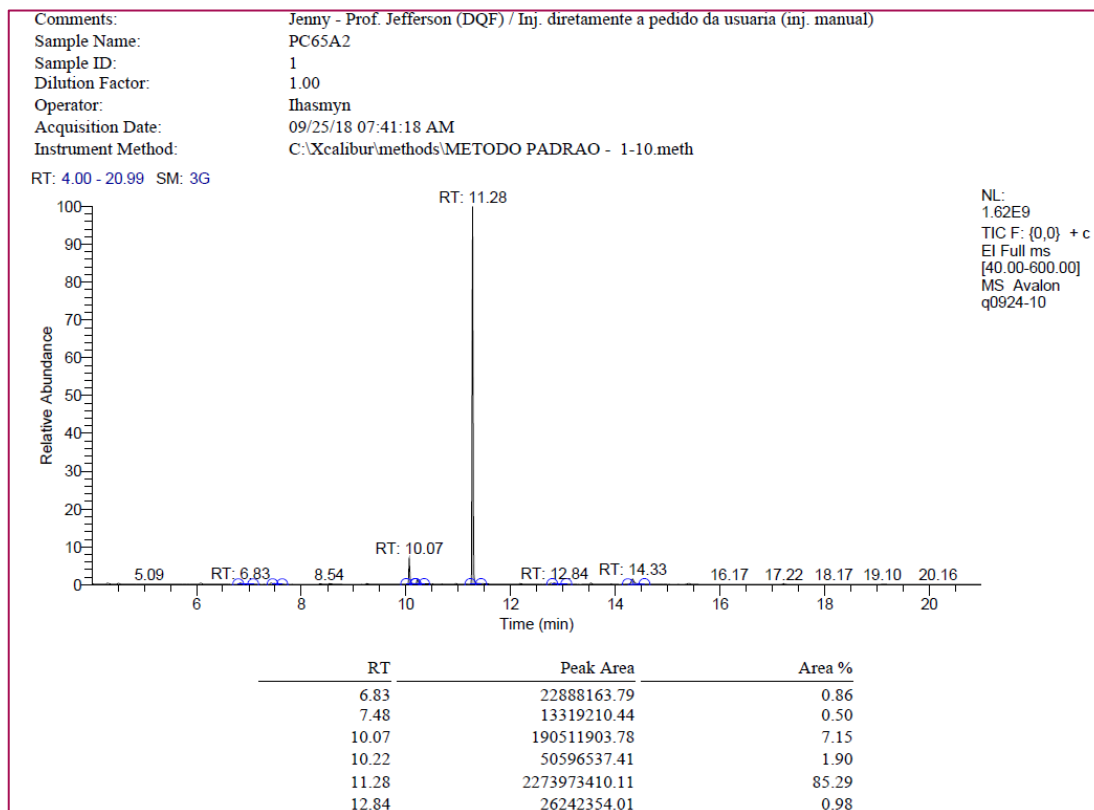
q0803-26 #728 RT: 16.17 AV: 1 RF: 6.00, 3 NL: 2.61E7
F: {0,0} + c EI Full ms [40.00-600.00]



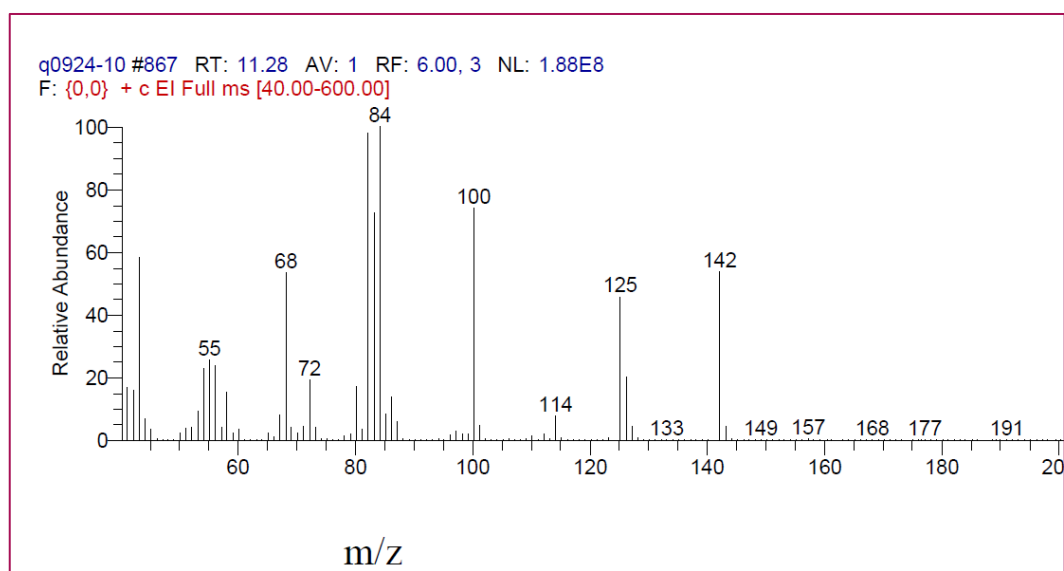
ANEXO C: GC-MS do composto 7a



ANEXO D: GC-MS do composto 5a



Cromatograma de GC-MS para 5a (RT = 11.28 min). O tempo de retenção em 10.07 min corresponde à enamida 4a.



Espectro de massas de 5a

ANEXO E: Ensaio de rotação óptica para os produtos de resolução (+)-4b e (+)-3b

POL-Q1214-1 e Q1214-2

[Data Information]

Creation Date 14/12/2018 11:22

[Measurement Information]

Instrument Name P-2000
Model Name P-2000
Serial No. A060761232
Polarizer Dichrom
Faraday Cell Flint Glass

Accessory RSC-200
Accessory S/N B043061260
Path Length 100 mm

Light Source Na
Monitor wavelength 589 nm
D.I.T. 5 sec
No. of cycle 5
Cycle interval 5 sec
Temp. Monitor Cell
Temp. Corr. Factor 0 at 20 C
Aperture(S) 3.0mm
Aperture(L) Auto
Mode Specific O.R.
Path Length 100 mm
Concentration 1 w/v%
Water content of sample 0 %
Factor 1

[Comment]

Sample name
Comment
User
Division
Company UFPE

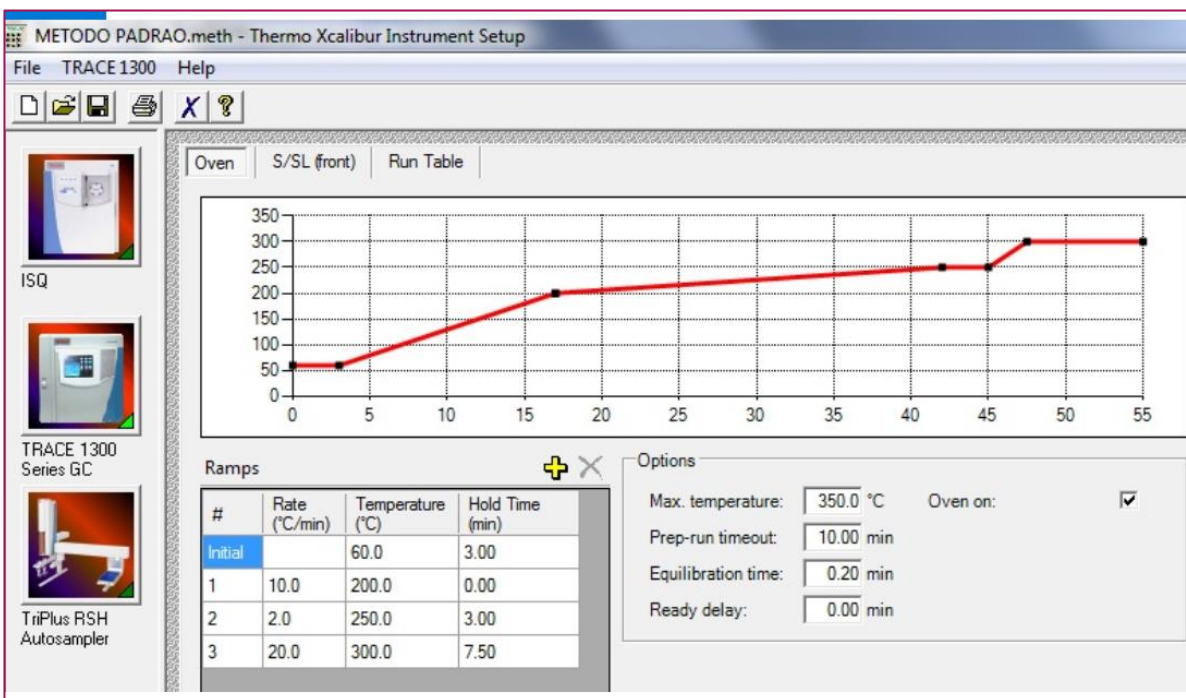
[Statistical Data]

Avg. 29.7610
S.D 40.8241
C.V 137.1732

		No.	Sample No.	Monitor(deg)	Temperature(C)	Blank	Comment
1	*	1	RE82B12-1	-0.0146	25.70	+0.0156	POL-Q1214-2-JENNY-JEFFERSON-DQF
2	*	2	RE82B12-2	+0.0059	25.71	+0.0156	POL-Q1214-2-JENNY-JEFFERSON-DQF
3	*	3	RE82B12-3	+0.0125	25.71	+0.0156	POL-Q1214-2-JENNY-JEFFERSON-DQF
4	*	4	RE82B12-4	+0.0537	25.72	+0.0156	POL-Q1214-2-JENNY-JEFFERSON-DQF
5	*	5	RE82B12-5	+0.0651	25.73	+0.0156	POL-Q1214-2-JENNY-JEFFERSON-DQF
6	*	6	Avg.				
7		7	S.D				
8		8	C.V				
9	*	9	RE82B11-1	+0.6342	25.85	+0.0156	POL-Q1214-1-JENNY-JEFFERSON-DQF
10	*	10	RE82B11-2	+0.5619	25.86	+0.0156	POL-Q1214-1-JENNY-JEFFERSON-DQF
11	*	11	RE82B11-3	+0.5609	25.86	+0.0156	POL-Q1214-1-JENNY-JEFFERSON-DQF
12	*	12	RE82B11-4	+0.6093	25.86	+0.0156	POL-Q1214-1-JENNY-JEFFERSON-DQF
13	*	13	RE82B11-5	+0.6430	25.87	+0.0156	POL-Q1214-1-JENNY-JEFFERSON-DQF
14	*	14	Avg.				
15		15	S.D				
16		16	C.V				

Ensaio de rotação específica $[\alpha]_D$ para os produtos da RCE de 4b, em metanol. RE82B12 = (+)-3b; e RE82B11 = (+)-4b

ANEXO F: Método PADRÃO utilizado nas análises de GC-MS. Especificações



Method Setup

Method type: Acquisition Use acquisition methods to acquire data.

MS transfer line temp.: 280 °C Ionization mode: EI

Ion source temp.: 250 °C CI gas type: None

Acquisition threshold: 1000 CI gas flow: 0.00 mL/min

Run completion

☐ GC run time ☐ Probe run time

☒ Stop after: 21.0 min

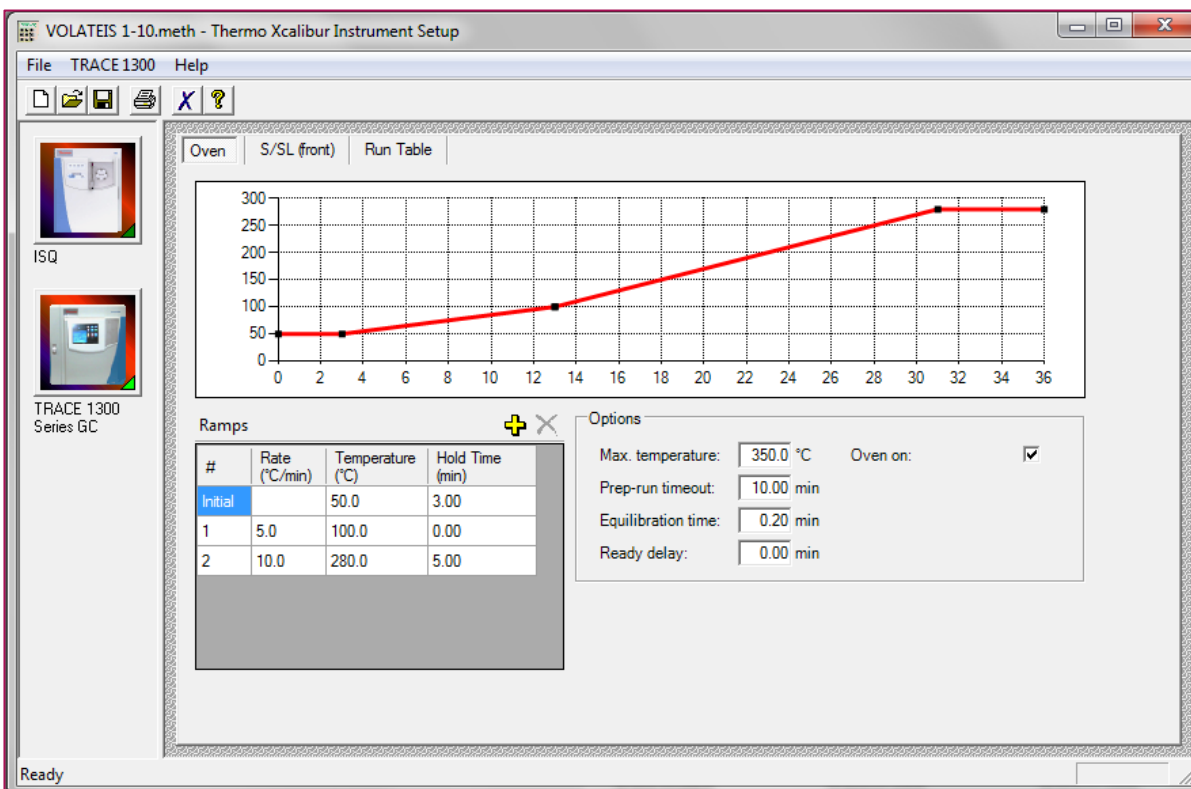
Scans

Time (min)	Mass List or Range (amu)	Dwell or Scan Times (sec)	Tune File Name
4.00	40-600	0.5	(Last Saved)
			(Last Saved)

Groups

Time (min)	Total Scan Time (sec)
4.00	0.504

ANEXO G: Método VOLÁTEIS utilizado nas análises de GC-MS. Especificações



Method Setup

Method type: Acquisition Use acquisition methods to acquire data.

MS transfer line temp.: 280 °C Ionization mode: EI

Ion source temp.: 250 °C CI gas type: None

☐ Acquisition threshold: 1000 CI gas flow: 0.00 mL/min

Run completion

☐ GC run time ☐ Probe run time

☒ Stop after: 28.0 min

Scans

	Time (min)	Mass List or Range (amu)	Dwell or Scan Times (sec)	Tune File Name
▶	4.00	40-600	1	(Last Saved)
*				

Groups

Time (min)	Total Scan Time (sec)
4.00	1.004

ANEXO H: Método A (Coluna quiral), GC-FID. Especificações

Analysis Time : 36.00 min

NormalAdvanced

AOC-20iSPL1ColumnFID1General

Injection Volume : 1.0 uL (10.0 uL syringe)

of Rinses with Solvent(Pre-run) : 2

of Rinses with Solvent(Post-run) : 1

of Rinses with Sample : 1

Plunger Speed(Suction) : HighMiddleLow

Viscosity Comp. Time : 0.2 sec

Plunger Speed(Injection) : HighMiddleLow

Syringe Insertion Speed : HighLow

Injection Mode : Normal

Set...

Analysis Time : 36.00 min

NormalAdvanced

AOC-20iSPL1ColumnFID1General

Temperature : 120.0 C

Injection Mode : Split

Sampling Time : 1.00 min

Carrier Gas : He

Flow Control Mode : Pressure

Pressure : 110.0 kPa

Total Flow : 20.0 mL/min

Column Flow : 1.04 mL/min

Linear Velocity : 29.0 cm/sec

Purge Flow : 3.0 mL/min

INJ Program

Pressure

Redraw

Rate	Pressure	Hold Time
0	110.0	0.00
1	0.0	0.00
2	0.0	0.00

Analysis Time : 36.00 min

NormalAdvanced

AOC-20iSPL1ColumnFID1General

Temperature : 120.0 C

Equilibration Time : 3.0 min

Column Information (Beta_Dex 120)

Serial Number :

Installation Date : 18/12/07

Column Max. Temp : 230 C

Length : 30.0 m

Inner Diameter : 0.25 mm ID

Film Thickness : 0.25 um

Description :

Column Oven Temperature Program

Redraw

Rate	Temperature	Hold Time
0	120.0	17.00
1	180.0	10.00
2	200.0	2.00

Analysis Time : 36.00 min

NormalAdvanced

AOC-20iSPL1ColumnFID1General

Temperature : 200.0 C

☒ Signal Acquire

Sampling Rate : 40 msec

Stop Time : 36.00 min

(Link to Oven Program)

Delay Time : 0.00 min

Subtract Detector : None

Flow Program

Makeup

Redraw

Rate	Flow	Hold Time
0	30.0	0.00
1	0.0	0.00
2	0.0	0.00

Total Program Time : 0.00 min

Makeup Gas : N2

Makeup Flow : 30.0 mL/min

H2 Flow : 40.0 mL/min

Air Flow : 400.0 mL/min

Método A

ANEXO I: Método B (coluna Quiral), GC-FID. Especificações

Analysis Time : 33.00 min

Normal Advanced

AOC-20 SPL1 Column FID1 General

Injection Volume : 1.0 uL (10.0 uL syringe)
of Rinses with Solvent(Pre-run) : 2
of Rinses with Solvent(Post-run) : 1
of Rinses with Sample : 1
Plunger Speed(Suction) : ☒ High ☐ Middle ☐ Low
Viscosity Comp. Time : 0.2 sec
Plunger Speed(Injection) : ☒ High ☐ Middle ☐ Low
Syringe Insertion Speed : ☒ High ☐ Low
Injection Mode : Normal Set...

Analysis Time : 33.00 min

Normal Advanced

AOC-20 SPL1 Column FID1 General

Temperature : 100.0 C
Injection Mode : Split
Sampling Time : 1.00 min
Carrier Gas : He
Flow Control Mode : Pressure
Pressure : 100.0 kPa
Total Flow : 27.0 mL/min
Column Flow : 1.14 mL/min
Linear Velocity : 29.0 cm/sec
Purge Flow : 3.0 mL/min

INJ. Program Pressure Redraw

Rate	Pressure	Hold Time
0	100.0	0.00
1	0.0	0.00
2	0.0	0.00

Analysis Time : 33.00 min

Normal Advanced

AOC-20 SPL1 Column FID1 General

Temperature : 70.0 C
Equilibration Time : 3.0 min
Column Information (Beta_Dex 120)
Serial Number :
Installation Date : 18/12/07
Column Max. Temp : 230 C
Length : 30.0 m
Inner Diameter : 0.25 mm ID
Film Thickness : 0.25 um
Description :

Column Oven Temperature Program Redraw

Rate	Temperature	Hold Time
0	70.0	10.00
1	10.00	100.0
2	20.00	200.0

Analysis Time : 33.00 min

Normal Advanced

AOC-20 SPL1 Column FID1 General

☒ Signal Acquire
Sampling Rate : 40 msec
Stop Time : 33.00 min
(Link to Oven Program)
Delay Time : 0.00 min
Subtract Detector : None

Flow Program Makeup Redraw

Rate	Flow	Hold Time
0	30.0	0.00
1	0.0	0.00
2	0.0	0.00

Total Program Time : 0.00 min

Makeup Gas : N2
Makeup Flow : 30.0 mL/min

H2 Flow : 40.0 mL/min
Air Flow : 400.0 mL/min

Método B

ANEXO J: Método C (Coluna não quiral), GC-FID. Especificações

Analysis Time : 30.00 min

Normal Advanced

AOC-20

SPL1

Column

FID1

General

Injection Volume :

1.0

uL (10.0 uL syringe)

of Rinses with Solvent(Pre-run) :

2

of Rinses with Solvent(Post-run) :

1

of Rinses with Sample :

1

Plunger Speed(Suction) :

☒ High
 ☐ Middle
 ☐ Low

Viscosity Comp. Time :

0.2

sec

Plunger Speed(Injection) :

☒ High
 ☐ Middle
 ☐ Low

Syringe Insertion Speed :

☒ High
 ☐ Low

Injection Mode :

Normal

Set...

Advanced...

Analysis Time : 30.00 min

Normal Advanced

AOC-20

SPL1

Column

FID1

General

Temperature :

100.0

C

Injection Mode :

Split

Sampling Time :

1.00

min

Carrier Gas : He

Flow Control Mode : Pressure

Pressure :

100.0

kPa

Total Flow :

27.0

mL/min

Column Flow :

1.14

mL/min

Linear Velocity :

29.0

cm/sec

Purge Flow :

3.0

mL/min

Split Ratio :

20.0

INJ Program

Pressure

Redraw

Rate	Pressure	Hold Time
0	100.0	0.00
1	0.0	0.00
2	0.0	0.00

Total Program Time : 0.00 min

Advanced...

Column Information (RTX-1)

Length : 30.0 m

Film Thickness : 0.25 um

Analysis Time : 30.00 min

Normal Advanced

AOC-20

SPL1

Column

FID1

General

Temperature :

70.0

C

Equilibration Time :

3.0

min

Column Information (RTX-1)

Serial Number :

18/11/28

Column Max. Temp : 330 C

Length : 30.0 m

Inner Diameter : 0.25 mm ID

Film Thickness : 0.25 um

Description :

Set...

Column Oven Temperature Program

Redraw

Rate	Temperature	Hold Time
0	70.0	2.00
1	150.0	3.00
2	300.0	2.00

Total Program Time : 30.00 min

Analysis Time : 30.00 min

Normal Advanced

AOC-20

SPL1

Column

FID1

General

Temperature :

300.0

C

Signal Acquire

Sampling Rate :

40

msec

Stop Time :

30.00

min

(Link to Oven Program)

Delay Time :

0.00

min

Subtract Detector :

None

Flow Program

Makeup

Redraw

Rate	Flow	Hold Time
0	30.0	0.00
1	0.0	0.00
2	0.0	0.00

Total Program Time : 0.00 min

Makeup Gas : N2

Makeup Flow : 30.0 mL/min

H2 Flow : 40.0 mL/min

Air Flow : 400.0 mL/min

Método C