

BRUNO SÉRGIO DO AMARAL

Síntese quimioenzimática do levetiracetam e análogos

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre

Araraquara
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

A485s	<p>Amaral, Bruno Sérgio do Síntese quimioenzimática do levetiracetam e análogos / Bruno Sérgio do Amaral. – Araraquara : [s.n], 2015 212 f. : il.</p>
	<p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Cintia Duarte de Freitas Milagre</p>
	<p>1. Biocatálise. 2. Síntese assimétrica. 3. Metaloenzimas. 4. Enantiômeros. 5. Líquidos iônicos. I. Título</p>

BRUNO SÉRGIO DO AMARAL

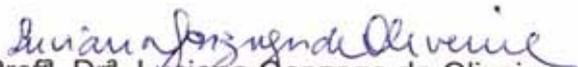
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 23 de fevereiro de 2015.

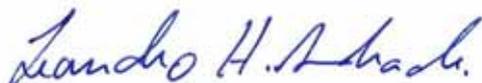
BANCA EXAMINADORA



Prof^ª. Dr^ª. Cíntia Duarte de Freitas Milagre - (Orientadora)
Instituto de Química /UNESP/ Araraquara - SP



Prof^ª. Dr^ª. Luciana Gonzaga de Oliveira
Instituto de Química /UNICAMP/ Campinas - SP



Prof. Dr. Leandro Helgueira Andrade
Instituto de Química /USP/ São Paulo – SP

Dados Pessoais

Nome: Bruno Sérgio do Amaral

Filiação: Sérgio Benedito do Amaral

Sandra Cristina Rosa do Amaral

Data de nascimento: 28 de março de 1990

Naturalidade: Catanduva/SP

Nacionalidade: Brasileiro

Estado civil: Solteiro

Endereço residencial: Av. Alberto Toloi, 185 Apartamento: 41 do Bloco: 2 – Bairro: Quitandinha – Araraquara/SP

Formação Acadêmica

- Ensino Fundamental

Colégio Nossa Senhora da Ressurreição no período de 1997-1999.

E.E. Octacílio de Oliveira Ramos em 2000.

E.E. Paulo de Lima Corrêa no período de 2001-2004.

- Ensino Médio

Etec Elias Nechar no período de 2005-2007.

- Ensino Superior

Graduado no curso de Bacharel em Química Tecnológica pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”/SP no período de 2008 a 2012.

- Curso de pós-graduação modalidade Mestrado em química, área de concentração: Química Orgânica, Título: “*Síntese quimioenzimática do levetiracetam e análogos*” sob a orientação da Profa. Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre, no Instituto de Química, UNESP, Araraquara, no período de 2013 a 2015 com bolsa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Estágios e Bolsas auxílio

- PET (Programa de Educação Tutorial), no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” no período de 2008 a 2010.

- Estágio de Iniciação Científica “Fitoestrógenos de soja em alimentos industrializados: otimização, validação e aplicação de métodos analíticos” sob a orientação da Prof. Dr. Mary Rosa Rodrigues de Marchi no Departamento de Analítica no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, no período de 2010 a 2012 com bolsa financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

- Bolsa de Mestrado, no período de março a outubro de 2013, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

- Bolsa de Mestrado, no período de novembro de 2013 a fevereiro de 2015, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Apresentação de Trabalhos em Congressos

AMARAL, B. S.; MILAGRE, C. D. F. Investigations on the substrate specificity of nitrile hidratases, no VII Workshop on Biocatalysis and Biotransformations e 1º Simpósio Latino-americano de Biocatalysis y Biotransformaciones, realizado em Búzios/RJ, de 23 a 26 de setembro de 2014.

MILAGRE, C. D. F.; **AMARAL, B. S.**; OLIVEIRA, K. O. “Synthesis of alkyl and aryl α -substituted amides catalyzed by nitrile hidratases”, no BIOTRANS 2013, realizado em Manchester/Inglaterra, de 21 a 25 de julho de 2013.

AMARAL, B. S.; BEZERRA, D. S. S.; MARCHI, M. R. R. “Isoflavonas em leite bovino: otimização, validação e aplicação de métodos analíticos” na 36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, realizado em Águas de Lindóia, de 25 a 28 de maio de 2013.

AMARAL, B. S.; BEZERRA, D. S. S.; MARCHI, M. R. R. Apresentação oral do trabalho “Fitoestrógenos de soja em alimentos industrializados: optimización, validación y aplicación de métodos analíticos”, no 5º Congresso Ibero-americano de Química Analítica, realizado em Montevideu/Uruguai, de 07 a 10 de outubro de 2012.

AMARAL, B. S.; FRANCO, S.; MARCHI, M. R. R. “Otimização e validação de método para determinação de isoflavonas em leite de soja por HPLC/UV” na 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, realizado em Florianópolis/SC, de 23 a 26 de maio de 2011.

AMARAL, B. S.; RUIZ, M.; ACORINTHE, G. C.; SAITO, G. P. “Avaliação das abordagens ilustrativa e motivadora como estratégias para o desenvolvimento de atividades didáticas experimentais”. Congresso de Iniciação Científica (CIC) da UNESP, realizado no IBILCE/UNESP São José do Rio Preto/SP, de 03 a 04 de novembro de 2009.

REGO, T. S.; AUGUSTO, A. E. C.; **AMARAL, B. S.**; MANOCCHIO, C. V. A.; ACORINTHE, G. C.; SAITO, G. P.; SCHIAVON, J. V.; COSTA, L. M. A.; CHRISTOVAM, L. M.; LUIZETE, M. F.; SANTOS, M. V.; MORELI, N. M.; PIAZZA, R. D.; BARBOSA, T. I. S.; ALENCAR JR., L. J.; RODRIGUES, M. F.; MELO, C. O.; SANTOS, F. C.; RUIZ, M. “Diferentes abordagens para o desenvolvimento de atividades experimentais no ensino de Química”. 17º Encontro SBQ – Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti realizado em Araraquara de 18 a 20 de outubro de 2009.

Participação em Eventos

VII Workshop on Biocatalysis and Biotransformations e 1º Simpósio Latino-americano de Biocatalysis y Biotransformaciones. Investigations on the substrate specificity of nitrile hidratases, 2014.

Entrepreneurship for Graduate in Chemistry: A Glance for Brazilian Competitiveness, Innovation & Development, 2014.

36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2013.

São Paulo Advanced School on Bioorganic Chemistry, 2013.

5º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2012.

34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011.

XV Encontro das Empresas Juniores da UNESP - "Planejamento e Gestão da EJ: oportunidade de aprimoramento profissional", 2011.

XIII Encontro das Empresas Juniores da UNESP - Inteligência Organizacional: A Gestão de Conhecimento Integrada à Gerência de Projetos, 2010.

XIV Encontro das Empresas Juniores da UNESP - Inovação e Competências para o Sucesso Empresarial, 2010.

X Sudeste PET, 2010. (Encontro).

XV ENAPET "Organização e Qualidade na Educação Tutorial", 2010.

XVI Encontro Paulista de Empresas Juniores - Sustentabilidade Institucional: A Estratégia da Organização Pioneira, 2010.

I Fórum USP/UNESP de Educação Tutorial, 2010.

XXI Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2009.

XII Encontro das Empresas Juniores da UNESP - Multidisciplinaridade: difusão de conhecimento, 2009.

XIV ENAPET "Amazônia, Sociobiodiversidade, Biotecnologia e Estatuinte", 2009.

Physics and Chemistry of Climate Change and Entrepreneurship, 2009.

XXXIX Semana da Química, 2009.

X Encontro das Empresas Juniores da UNESP - Direito e Diplomacia Empresariais conhecimentos estratégicos para Empresários Juniores, 2008.

Estágio no Exterior

- Estágio e Pesquisa na Universidad de la República, Montevideo, Uruguai, 2014 para a realização do projeto "Desenvolvimento de cepas de *E. coli* recombinantes que expressem nitrila hidratase de *K. oxytoca* e de *R. erythropolis*".

- Estágio na Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Espanha, 2011-2012, para a realização de disciplinas junto a Facultad de Química.

Dedico este trabalho à minha mãe Sandra, ao meu pai Sérgio, à minha irmã Natália e à minha avó Hilda que foram essenciais, a cada segundo, para que eu alcançasse essa conquista. Ao Everton. Obrigado por acreditarem em mim e me darem todo o suporte para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje.

Agradecimentos

A Deus, por estar ao meu lado em todos os momentos, permitindo que eu tirasse conhecimento de todas as situações vividas. Obrigado por não me desamparar e me dar a força necessária.

Aos meus pais, por toda infraestrutura necessária, por me amarem tanto e por compreenderem os momentos em que eu me fazia presente somente em corpo devido ao excesso de atividade. A minha irmã por ser a minha mais completa amiga. A minha avó Hilda por sempre me estimular a ir além e se mostrar sempre forte em auxiliar nas minhas ausências físicas. Aos demais membros da minha família por me ensinarem o verdadeiro significado desta palavra.

À Profa. Dra. Cintia Duarte de Freitas Milagre, pela ótima orientação exercida, motivação, compreensão, paciência, aprendizado e amizade. Obrigado pelas oportunidades concedidas e por ter me ensinado tanto; teoria e prática, sempre respeitando meu ritmo e estilo.

Ao Prof. Dr. Humberto M. S. Milagre, pela colaboração neste trabalho e para a minha formação.

Aos amigos do Milagre Research Group, pelas constantes discussões, cafés, aprendizado e experiências compartilhadas. Tenho certeza que o trabalho fluiu muito melhor em um ambiente tão agradável como o aqui vivido. Agradeço em especial a Luna e a Karina pelos ensinamentos e o companheirismo (em qualquer horário).

Ao Heverton, pelo companheirismo, cumplicidade, conselhos, paciência (sobretudo quando o assunto era só sobre química) e a eterna amizade.

Às minhas grandes amigas de Araraquara, sem os quais não imagino como seria essa minha jornada: Mariana, Taís, Karina, Luna, Milena e Verônica.

Em especial, a Mariana que sempre colaborou para que eu iniciasse os meus dias com bom humor e a esperança renovada. Obrigado por me escutar e me aconselhar, seja sobre química ou sobre a vida. Meus cafés da manhã nunca mais serão o mesmo sem sua companhia. Amizade não define, vai muito além.

Ao Instituto de Química e à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pela oportunidade e infraestrutura fundamental à realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Mary Rosa R. de Marchi por ter acreditado em mim, lá na iniciação científica, pelo apoio, conselhos, incentivo e amizade. Agradeço, também, pelas análises de GC-MS.

Ao Prof. Dr. André L. M. Porto, pelas análises de GC-MS.

Ao Prof. Dr. Leandro Martins, pela autoclave para as reações com rutênio.

À Profa. Dra. Lourdes C. dos Santos e Profa. Dra. Lucia Maria X. Lopes pelas análises de HPLC-PDA-CD. Também à Dra. Juliana Rodrigues, ao Doni e ao Felipe pelo auxílio com o equipamento.

Ao Prof. Dr. Marcelo Nalin e à Danúbia C. Gava, pelas análises de DSC.

Ao Prof. Dr. Humberto M. S. Milagre e ao João Luiz Bronzel Junior, pelas análises de MALDI-TOF.

À Profa. Dra. Sonia Rodrigues e ao Cesar Iglesias, por terem me acolhido em Montevideo, pelo constante acompanhamento no laboratório e discussões que vieram a somar, e muito, em minha formação. Agradeço, também, a todos do grupo de pesquisa, por terem me recebi de braços abertos. ¡Muchas gracias por todo!

À PROPG e a Universidad de la República, pela ajuda de custo para o estágio no Uruguai.

Ao Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira, pelas análises de RMN de ¹⁹F.

À FAPESP pela bolsa concedida (Processo 2013/16636-1) e pelo apoio financeiro durante a execução deste trabalho.

E a todas as pessoas que contribuíram na execução desse trabalho, direta ou indiretamente.

“Para conquistar coisas importantes,
devemos não apenas agir mas também sonhar,
não apenas planejar mas também acreditar.”

Anatole France

RESUMO

Os biocatalisadores (enzimas e/ou micro-organismos) são amplamente utilizados na síntese de moléculas bioativas, em especial os fármacos, para gerar ou resolver centros quirais. O levetiracetam, comercialmente conhecido como Keppra[®], é um composto quiral com propriedades anticonvulsivantes cuja atividade farmacológica está relacionada ao enantiômero (*S*). O aumento da opção pelo uso do levetiracetam em detrimento a outros fármacos anticonvulsivantes está intimamente associado à baixa ocorrência de efeitos colaterais provocados por este. Diversas rotas quimiossintéticas para sua produção são relatadas na literatura. A maioria delas envolve um elevado número de etapas, alto consumo energético, uso de catalisadores metálicos e baixos rendimentos globais. Em contrapartida, este projeto teve por objetivo empregar uma rota quimioenzimática, com menor número de etapas, condições mais brandas e ambientalmente amigáveis de reação para a síntese do levetiracetam e análogos (série alifática). A respectiva série aromática também foi sintetizada, uma vez que trata-se de blocos construtores quirais para a síntese de compostos com reconhecida atividade anti-malária. A primeira etapa consistiu na síntese das cianidrinhas racêmicas seguida da substituição da hidroxila destas por heterociclos nitrogenados. Uma coleção de enzimas do tipo nitrila hidratases (E.C. 4.2.1.84) foi empregada para catalisar a conversão das nitrilas α -substituídas por *N*-heterociclos nas respectivas amidas quirais. As enzimas foram utilizadas tanto na forma isolada (obtidas comercialmente) quanto em células íntegras de bactérias e leveduras da Coleção de Micro-organismos do Laboratório de Biocatálise do IQ-UNESP Araraquara. As reações enzimáticas foram conduzidas em meio aquoso tamponado e em sistemas binários líquido iônico : solução tampão (10, 20, 40 e 80%) a fim de avaliar a influência do solvente na enantiosseletividade e rendimento destas reações. Os líquidos iônicos sintetizados e utilizados neste trabalho foram o tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio, bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-n-butil-3-metilimidazólio e hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio. Os melhores resultados (rendimento e enantiosseletividade) foram obtidos para as reações conduzidas em meio aquoso tamponado. As diferentes nitrila hidratases avaliadas neste estudo apresentaram elevada especificidade de substrato. Paralelamente iniciou-se a expressão de nitrila hidratases de *Klebsiella oxytoca* e *Rhodococcus erythropolis* em cepas de *E. coli* recombinantes.

Palavras-chave: Síntese assimétrica, Biocatálise, Levetiracetam, Nitrila hidratases, Líquidos iônicos.

ABSTRACT

Biocatalysts (enzymes and/or microorganisms) are widely used in the synthesis of bioactive molecules, in particular pharmaceuticals, to generate or resolve chiral centers. Levetiracetam, commercially known as Keppra[®], is a chiral compound with anticonvulsant properties whose pharmacological activity is related to the (*S*)-enantiomer. The increase in option for the use of levetiracetam over the others anticonvulsant drugs is closely associated with low incidence of side effects caused by this. Several chemosynthetic routes for its production are reported in the literature. Most of them involve numerous synthetic steps, high energy consumption, use of metal catalysts and low overall yields. On the other hand, this project aims to develop a chemoenzymatic route, with fewer steps, milder conditions and environmentally friendly reaction for the synthesis of levetiracetam and analogues (aliphatic series). The respective aromatic series was also synthesized, since it is chiral building blocks for the synthesis of compounds with known antimalarial activity. The first step was the synthesis of racemic cyanohydrin followed by substitution of the hydroxyl group by nitrogen heterocycles. Collections of nitrile hydratase enzymes type (EC 4.2.1.84) were used to catalyze the conversion of *N*-heterocycles α -substituted nitriles in the respective chiral amides. The enzymes were used both in isolated form (obtained commercially) as in whole cells bacteria and yeast Collection of Microorganisms of Biocatalysis Laboratory of IQ-UNESP Araraquara. The enzymatic reactions were performed in buffered aqueous medium and ionic liquid : buffer (10, 20, 40 and 80%) binary systems in order to evaluate the influence of the solvent on the enantioselectivity and yield of these reactions. The ionic liquids synthesized and used in this work were 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate, 1-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethyl sulfonyl)imide and 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate. The best results (yield and enantioselectivity) were obtained for reactions carried out in aqueous buffered medium. Different nitrile hydratases evaluated in this study showed high substrate specificity. At the same time began the expression of nitrile hydratase from *Rhodococcus erythropolis* and *Klebsiella oxytoca* in recombinant *E. coli* strains.

Keywords: Asymmetric synthesis, Biocatalysis, Levetiracetam, Nitrile hydratase, Ionic liquids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – A interdependência das três principais áreas de aplicação da catálise enzimática.	23
Figura 2 – As classes de enzimas mais relevantes para a produção de produtos de interesse humano.	26
Figura 3 – Tipos de fármacos aprovados pelo FDA no período de 1992 a 2008.	27
Figura 4 – Fórmula estrutural do piracetam e levetiracetam.	28
Figura 5 – Estrutura molecular de três antiepiléticos clássicos.	29
Figura 6 – Cronologia dos fármacos antiepiléticos.	29
Figura 7 – Lucro líquido da UCB Pharma com as vendas do Keppra [®] desde seu lançamento no mercado.	31
Figura 8 – Nitrilas presentes naturalmente em plantas.	33
Figura 9 – Catabolismo de nitrilas em micro-organismos.	35
Figura 10 – Representação tridimensional de uma NHase de <i>Rhodococcus erythropolis</i> . Em verde e vermelho estão representados as subunidade α e β , respectivamente. A esfera azul representa o cofator Fe^{3+} e em amarelo um substrato no sítio ativo (isobutironitrila).	36
Figura 11 – Líquidos iônicos comumente utilizados em biocatálise.	41
Figura 12 – Modificações estruturais a partir do esqueleto do LEV.	49
Figura 13 – Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do produto da reação de cianossililação.	51
Figura 14 – Curva analítica do consumo de <i>n</i> -butanonitrila monitorada por GC-FID.	65
Figura 15 – Substratos sintetizados neste trabalho e empregados nas reações de catálise enzimática.	67
Figura 16 – Cromatogramas (HPLC-PDA-CD) obtidos para as misturas racêmicas de (a) 5a , (b) 5b , (c) 5'a e (d) 5'b .	71
Figura 17 – Espectros de RMN de ^1H (300,19 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) dos LIs BMIM.Cl, BMIM.BF ₄ , BMIM.PF ₆ e BMIM.NTf ₂ .	75
Figura 18 – Fórmula estrutural do polietileno glicol, com a unidade de repetição entre parênteses.	79
Figura 19 – Conversão de 4a em 5a por NHase PRO-015 em diferentes proporções de PEG.	81

- Figura 20** – Eletroforese em agarose das amostras de DNA genômico de (a) *Klebsiella oxytoca* e (b) *Rhodococcus erythropolis*. MM: marcador de massa molecular, com a indicação das bandas mais importantes. 83
- Figura 21** – Representação esquemática da estratégia de *Restriction free cloning*. Primers híbridos são desenhados para se ligarem ao gene (verde) e ao plasmídeo (azul). A primeira PCR leva ao megaprimer que possui em suas extremidades sequências que se flanqueiam ao plasmídeo. Na segunda PCR, o megaprimer replica o plasmídeo de interesse (rosa). Uma vez que todo plasmídeo é replicado, é realizado uma digestão com DpnI, para degradar seletivamente o DNA parental metilado. Os produtos não metilados não sofrem degradação e são utilizados na transformação de células competentes. 84
- Figura 22** – Eletroforese em agarose das ampliações de (a) NHase de *Klebsiella oxytoca* e (b) NHase de *Rhodococcus erythropolis* em 1 e 2 e do gene ativador em 4 e 5. Os controles negativos estão em 3 e 6. MM: marcador de massa molecular, com a indicação das bandas mais importantes. 86
- Figura 23** – Mapas dos vetores utilizados (a) pACYCDuet-1 e (b) pKK223-3. 87
- Figura 24** – Eletroforese em agarose dos clones de *K. oxytoca*, acima, e *R. erythropolis*, abaixo, utilizando (a) e (c) Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase e (b) e (d) KAPA2G Robust DNA Polymerase. Os controles positivos estão em 1 e os negativos em 2. MM: marcador de massa molecular, com a indicação das bandas mais importantes. 89
- Figura 25** – Representação do ciclo de PCR utilizado para as ampliações. A temperatura de desnaturação inicial e cíclica foi de 98°C, o anelamento ocorreu em 64°C seguido pela extensão, cíclica e final, a 72 °C. 114
- Figura 26** – Representação do ciclo de PCR utilizado para as ampliações com KAPA2G Robust DNA Polymerase (KappaBiosystems). A temperatura de desnaturação inicial e cíclica foi de 95°C, o anelamento ocorreu em 64°C seguido pela extensão, cíclica e final, a 72 °C. 118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Característica de algumas NHases microbianas.	38
Tabela 2 – Dados de RMN de ^1H de 2 e 2 cianosililado (6).	51
Tabela 3 – Síntese do composto 2 a partir de 1 com TMSCN.	53
Tabela 4 – Substituição do átomo de cloro de 3' por heterociclos nucleofílicos.	59
Tabela 5 – Substituição nucleofílica em 2 e 3 por c e d .	60
Tabela 6 – Substituição da hidroxila do composto 3' pelos heterociclos nucleofílicos c e d .	61
Tabela 7 – Substituição da hidroxila de 2 e 2' por a e b .	61
Tabela 8 – Substituição da hidroxila de 2 e 2' por a e b , na presença de rutênio.	62
Tabela 9 – Reação de hidratação das nitrilas por via química.	63
Tabela 10 – Dados para a construção da curva analítica para determinação da atividade das NHases.	65
Tabela 11 – Cálculo da unidade de atividade enzimática de NHases frente à <i>n</i> -butanonitrila.	66
Tabela 12 – Conversão dos substratos 4a-b e 4'a-b e excessos enantioméricos (<i>ee</i>) para as respectivas amidas 5a-b e 5'a-b por NHases.	69
Tabela 13 – Conversão dos substratos 4a-b e 4'a-b para as respectivas amidas 5a-b e 5'a-b por NHase PRO-015 a 15 °C.	72
Tabela 14 – Atribuições dos espectros de RMN de ^{19}F dos LIs deste trabalho, comparados à literatura.	75
Tabela 15 – Temperatura de transição vítrea e de fusão dos LIs, obtidas por DSC e comparadas à literatura.	76
Tabela 16 – Conversão dos substratos 4a , 4d e 4'd as respectivas amidas 5a , 5d e 5'd por NHases PRO-015 em meio aquoso tamponado contendo PEG 400.	80
Tabela 17 – <i>Primers</i> desenhados para a amplificação dos genes que codificam NHase (entrada 1 a 4) e o gene ativador (entrada 5 e 6). Em vermelho, estão representadas as caudas que ficarão livres para se ligar ao vetor na segunda PCR. Os códons grifados representam start e stop.	85
Tabela 18 – Reagentes e quantidades utilizadas nas reações de amplificações dos genes de NHase de <i>K. oxytoca</i> e <i>R. erythropolis</i> e o gene ativador de <i>R. erythropolis</i> , de acordo com as especificações no manual da Phusion High Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs).	114

Tabela 19 – Reagentes e quantidades utilizadas nas reações de ampliações linear com os vetores. 115

Tabela 20 – Reagentes e quantidades utilizadas nas reações de ampliações dos genes dos clones de NHase de *K. oxytoca* e *R. erythropolis*, de acordo com as especificações no manual da KAPA2G Robust DNA Polymerase (KappaBiosystems). 118

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Formação da (<i>R</i>)-mandelonitrila a partir do benzaldeído na presença de hidroxinitrila liase.	24
Esquema 2 – Síntese do LEV com resolução por cristalização, utilizando o ácido L-tartárico.	31
Esquema 3 – Síntese química do LEV a partir do éter (<i>R</i>)-benzil-glicídico, com rendimento global de 15,5% e ee >99%.	32
Esquema 4 – Síntese quimioenzimática do LEV via processo UCB Pharma.	32
Esquema 5 – Metabolismo de nitrilas em micro-organismos.	34
Esquema 6 – Diversidade estrutural acessível através da manipulação de nitrilas. R e R' representam quaisquer grupos alquil ou aril.	35
Esquema 7 – Possíveis mecanismos de hidratação de nitrilas por NHases (a) Mecanismo de esfera interna, (b) Mecanismo de esfera externa e (c) Outro Mecanismo de esfera externa.	39
Esquema 8 – Acetilação regioseletiva de β-D-glicose catalisada por lipase em acetona e MOEMIM.BF ₄ .	42
Esquema 9 – Proposta retrossintética para obtenção do levetiracetam 5a .	45
Esquema 10 – Rota quimioenzimática proposta para a síntese do levetiracetam e análogos.	46
Esquema 11 – Cianosilação de aldeídos.	50
Esquema 12 – Mecanismo proposto por Yequian et al. ⁷⁷ para reação de cianosilação de aldeídos.	52
Esquema 13 – Cianação de 1 com NaCN para a síntese do composto 2 .	53
Esquema 14 – Mecanismo de formação do composto 2 através da cianação por NaCN.	54
Esquema 15 – Conversão das cianidrinhas 2 e 2' para as α-halonitrilas correspondentes.	54
Esquema 16 – Mecanismo de formação do éster de clorosulfito.	55
Esquema 17 – Mecanismo de formação do haleto de alquila.	55
Esquema 18 – Mecanismo S _N i, com retenção da configuração inicial.	55
Esquema 19 – Síntese da 2-cloro-2-fenilacetoneitrila 3' a partir de 2' .	56
Esquema 20 – Tentativas de cloração do composto 2 com SOCl ₂ .	57
Esquema 21 – Mecanismo de formação do composto 3 .	57
Esquema 22 – Síntese da 2-bromobutanoneitrila 3 .	58
Esquema 23 – Mecanismo de substituição do cloro 3' de via S _N 2.	60

Esquema 24 – Mecanismo de hidratação das nitrilas para amidas com catálise ácida.	64
Esquema 25 – Mecanismo retro-Strecker de degradação de α -aminonitrilas em meio aquoso.	68
Esquema 26 – Reações de catálise enzimática por NHases com os substratos 4a , 4b , 4'a e 4'b .	68
Esquema 27 – Síntese do LI precursor BMIM.Cl.	73
Esquema 28 – Síntese do LI (a) BMIM.BF ₄ , (b) BMIM.PF ₆ e (c) BMIM.NTf ₂ pela metátese do Cl ⁻ do BMIM.Cl.	74
Esquema 29 – Rota quimioenzimática, proposta neste trabalho, para síntese de 5a .	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CCD Cromatografia em camada delgada

CD Dicroísmo circular

DEPT 135 Distortionless Enhancement by Polarization Transfer - Angle 135°

DNA Ácido desoxirribonucleico

DSC Cromatografia em sílica seca (*dry silicon chromatography*)

FDA *Food and Drug Administration*

GC-FID Cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização em chama

HPLC Cromatografia líquida de alta eficiência

IV Infravermelho

LEV Levetiracetam

LIs Líquidos iônicos

m/z coeficiente entre massa e carga

MS Espectrometria de massas

NHase Nitrila hidratase

NHase-Co Nitrila hidratase dependente de cobalto

NHase-Fe Nitrila hidratase dependente de ferro

PCR Reação em cadeia da polimerase

PDA Detector de arranjo de fotodiodos (photodiode array detector)

PF Ponto de fusão

ppm Partes por milhão

RMN de ^{13}C Ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN de ^{19}F Ressonância magnética nuclear de flúor

RMN de ^1H Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

ta Temperatura ambiente

TMS Tetrametilsilano

TMSCN Cianeto de trimetilsilila

TPM Topiramato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1 Transformações em reações mediadas por micro-organismos	23
1.2 Processos biocatalíticos	25
1.3 A Biocatálise e a indústria farmacêutica	26
1.4 Nitrila hidratases	33
1.5 Meios reacionais	40
2. OBJETIVOS	45
2.1 Objetivo geral	45
2.2 Objetivos específicos	46
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
3.1 Planejamento sintético	48
3.2 Obtenção das cianidrinas 2 e 2'	49
3.2.1 Síntese da 2-hidroxiutanonitrila (2)	50
3.3 Síntese das α-halonitrilas 3 e 3'	54
3.4 Síntese dos derivados heterocíclicos	58
3.5 Síntese das amidas racêmicas	63
3.6 Medida da atividade enzimática das nitrila hidratases, EC 4.2.1.84 NHases	64
3.7 Reações de biocatálise utilizando nitrila hidratases em meio aquoso tamponado	67
3.8 Síntese dos líquidos iônicos	72
3.8.1 Síntese do cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (BMIM.Cl)	73
3.8.2 Síntese do BMIM.BF ₄ , BMIM.PF ₆ e BMIM.NTf ₂	73
3.8.3 Caracterização dos LIs sintetizados	74
3.9 Reações de biocatálise em meios não convencionais	76
3.9.1. Reações de catálise enzimática utilizando NHase (PRO-001 e PRO-015) em líquidos iônicos	76
3.9.2 Reações de catálise enzimática utilizando NHase PRO-015 em polietileno glicol	79

3.10 Clonagem de NHase e expressão em <i>E. coli</i>	81
3.10.1 Triagem de NHases	82
3.10.2 Extração e purificação do DNA genômico	82
3.10.3 Clonagem dos genes de interesse	83
3.10.4 Expressão em <i>E. coli</i> TOP10	87
3.10.5 Verificação dos clones obtidos	88
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
5. PARTE EXPERIMENTAL	94
5.2 Procedimento Experimental e Dados Espectroscópicos dos Compostos Sintetizados	97
5.2.1 Síntese do composto 2	97
5.2.2 Síntese do composto 3	98
5.2.3 Síntese do composto 3'	99
5.2.4 Síntese dos compostos 4a, 4'a, 4b, e 4'b	99
5.2.5 Síntese dos compostos 4c, 4'c, 4d e 4'd	101
5.2.6 Síntese dos compostos 5a, 5b, 5d, 5'a, 5'b e 5'd	103
5.2.7 Solução tampão fosfato pH 7,00 (0,1 mol L ⁻¹)	106
5.2.8 Determinação da atividade enzimática	106
5.2.9 Reações de Biocatálise com 4a-d e 4'a-d em meio aquoso tamponado	106
5.2.10 Síntese do cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio	107
5.2.11 Síntese do tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio	107
5.2.12 Síntese do hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio	108
5.2.13 Síntese do bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-butil-3-metilimidazólio	109
5.2.14 Reações de Biocatálise com 4a-d e 4'a-d em líquidos iônicos	110
5.2.15 Reações de Biocatálise com 4a, 4d e 4'd em PEG 400	110
5.2.16 Meios de cultura	111
5.2.17 Ensaio de triagem enzimática para NHase	111
5.2.18 Extração de DNA genômico	112

5.2.19 Eletroforese em gel de agarose	113
5.2.20 Amplificação dos genes	113
5.2.21 Amplificação linear	114
5.2.22 Preparação de Escherichia coli TOP10 competentes	116
5.2.23 Transformação de Escherichia coli TOP10 competentes	116
5.2.24 Análise das transformantes de Escherichia coli TOP10	117
6. REFERÊNCIAS	120
7. ANEXOS	130
7.1 Lista de espectros	130

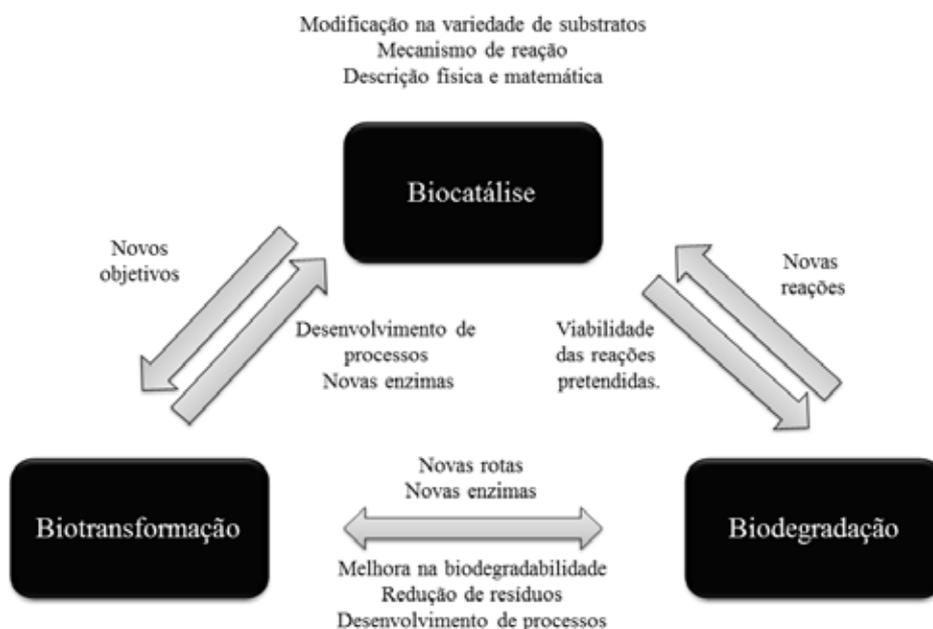
Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Transformações em reações mediadas por micro-organismos

Os micro-organismos são capazes de transformar compostos químicos gerando produtos de interesse econômico e/ou ambiental. O termo utilizado para designar tal transformação será dependente do interesse do estudo. Para alguns cientistas a Biocatálise é o processo de conversão química de um substrato em um produto de interesse através de uma enzima livre ou imobilizada enquanto a Biotransformação se relaciona com a conversão química de um substrato através de células inteiras contendo a(s) enzima(s) de interesse;¹ embora, muitas vezes, ambos os termos sejam utilizados como sinônimo.² Ainda com a utilização dos micro-organismos, há a degradação de poluentes ambientais, chamada de Biodegradação. Em diversas situações, esses processos podem sobrepor-se (Figura 1).²

Figura 1 – A interdependência das três principais áreas de aplicação da catálise enzimática.



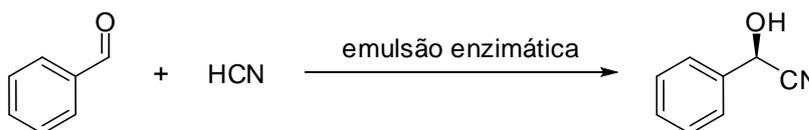
Fonte: Adaptado de Parales et al.²

Os seres humanos têm utilizado enzimas há milhares de anos em fermentações para produzir ou conservar alimentos, tais como queijo, vinho, vinagre e cerveja. Muitos anos depois, em 1858, Louis Pasteur observou que ao tratar uma solução aquosa de ácido tartárico

racêmico com uma cultura de *Penicillium glaucum*, houve um consumo do (+)-ácido tartárico com um conseqüente enriquecimento do (-)-enantiômero. Este é considerado o primeiro caso de resolução cinética enzimática.³

Na metade do Século XX, a academia e a indústria aprenderam a utilizar células inteiras, extratos celulares ou enzimas parcialmente purificadas em vários processos biocatalíticos. Desta maneira, as enzimas começaram a ganhar importância na síntese orgânica como catalisadores.³ Tal fato ficou marcado, em 1913, pela descrição da preparação da (*R*)-mandelonitrila, por Ludwig Rosenthaler, a partir do tratamento do benzaldeído e ácido cianídrico (Esquema 1) na presença de emulsão de extrato celular; uma mistura enzimática contendo hidroxinitrila liase, obtida de amêndoas amargas⁴ (*Amygdalus communis* L. var. *amara* Ludwig ex. DC). Assim, dava-se início ao chamado início da catálise assimétrica moderna mediada por enzima.³

Esquema 1 – Formação da (*R*)-mandelonitrila a partir do benzaldeído na presença de hidroxinitrila liase.



Fonte: Adaptado de Reetz³.

Este período é conhecido como a primeira onda da biocatálise, onde os cientistas reconheceram que componentes presentes em células são capazes de realizar transformações químicas de interesse, em contraste aos processos fermentativos.⁵ No entanto, os processos biocatalíticos sofriam de duas grandes limitações. A primeira residia na acessibilidade de enzimas em quantidade suficiente para aplicações práticas. A segunda limitação era a pequena gama de substratos aplicáveis, baixa estereo- e/ou regioseletividade, além da instabilidade das enzimas sob as condições operacionais.³ O desenvolvimento de metodologias de imobilização de enzimas ajudou a superar, em parte, a instabilidade e facilitou a reutilização das mesmas.⁵

Durante a segunda onda da biocatálise, na década de 80, com a introdução da tecnologia de DNA recombinante, houve uma facilitação na produção, isolamento e caracterização de enzimas a partir de várias fontes.⁶ Deste modo, a gama de substratos enzimáticos foi ampliada, o que permitiu a síntese de diversos compostos e intermediários, tais como fármacos, herbicidas, cosméticos e polímeros.⁵

Foi em meados dos anos 90, com o desenvolvimento da engenharia de proteínas e estratégias de evolução dirigida, que ocorreu o aperfeiçoamento dos biocatalisadores.⁶ Estas técnicas possibilitaram uma melhora nas propriedades catalíticas, perfil de substratos, aumento da resistência a solventes, enantiosseletividade, aumento da estabilidade em processos, alterações de pH e temperatura de trabalho.^{6,7} Assim, deste período até os dias atuais, vivemos a terceira onda da biocatálise,⁵ onde o crescente impacto é claramente visto nas várias centenas de processos biocatalíticos que vêm sendo adotados em escala industrial, sobretudo, na síntese de intermediários farmacêuticos e de química fina.⁷

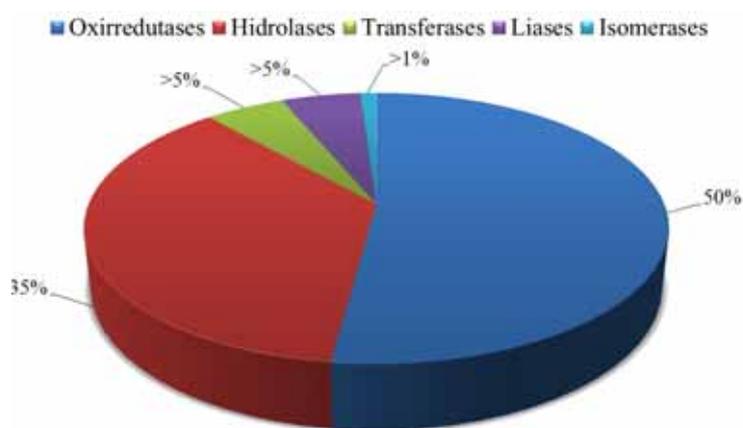
1.2 Processos biocatalíticos

A demanda pela síntese de compostos opticamente puros é cada vez mais frequente na indústria farmacêutica, de química fina e alimentícia, onde a importância da quiralidade relacionada à atividade e/ou propriedade destes compostos já está bem estabelecida. Entretanto, apesar dos constantes progressos em síntese assimétrica, a preparação de compostos enantiomericamente puros ainda é um desafio para a química orgânica e a indústria.^{8; 9} Além disso, o aumento dos requisitos de segurança, qualidade e a minimização dos impactos ambientais nos processos sintéticos industriais, apontam a necessidade de um desenvolvimento mais sustentável e economicamente atraente para a síntese de compostos quirais.⁹

Os biocatalisadores, em geral, são regio-, quimio- e enantiosseletivos, dispensando o emprego de etapas de ativação ou proteção de grupos funcionais, são biodegradáveis e não deixam resíduos de metais pesados. As reações biocatalíticas são ambientalmente amigáveis, pois podem ocorrer em condições brandas (temperatura < 100 °C, pressão ambiente e pH próximo a neutralidade) requerendo baixas quantidades de energia; o que minimiza a emissão de gases estufas, inúmeras reações ocorrem em água ou meios passíveis de recuperação para reutilização e, finalmente, as reações podem ser realizadas em reatores multipropósito em batelada; não necessitando de investimentos extras.¹⁰⁻¹² A não utilização de condições drásticas de reação evita problemas de isomerização, racemização e epimerização.¹³ As enzimas podem ser imobilizadas e reutilizadas por muitos ciclos, superexpressadas para tornar os processos economicamente mais eficientes, ou, ainda, modificadas para o aperfeiçoamento de sua atividade.¹³

A disponibilização de enzimas no mercado cresceu exponencialmente de 1960 a 2000 e, em 2006, estudos apontaram que cerca de 150 processos de bioconversão eram realizados em escala industrial (produção superior a 100 kg/ano)¹¹ com produções que superavam 10⁶ t/ano.¹⁴ Os segmentos industriais que mais utilizam a biotecnologia, em termos de valor agregado são, em ordem decrescente, a farmacêutica, alimentícia, agroquímica, cosméticos e polímeros,¹⁵ onde as classes de enzimas mais utilizadas estão apresentadas na Figura 2. Dos 40 fármacos com estrutura molecular pequena e produzidos via biocatálise, 7 são *blockbusters*, ou seja, aqueles fármacos campeões de venda. O mercado dos *blockbusters* representa mais de US\$ 30 bilhões, com uma tendência progressiva.¹⁵

Figura 2 – As classes de enzimas mais relevantes para a produção de produtos de interesse humano.



Fonte: Adaptado de Meyer et al.¹⁵

Além das vantagens supracitadas, os processos biocatalíticos são ambientalmente mais amigáveis e menos poluentes, satisfazendo muitos dos 12 princípios da Química Verde.⁹ Para muitos autores, “biocatálise” é sinônimo de “química verde”.¹⁶ No entanto, uma visão qualitativa do processo biocatalítico comparativo aos 12 princípios, não é suficiente para avaliar o impacto ambiental. Uma comparação quantitativa com um processo de referência possibilitará a avaliação de qual processo/reação é mais verde. Contudo, as reações de biocatálise apresentam, em geral, um significativo potencial para ser uma alternativa mais verde, comparativo aos procedimentos químicos convencionais.¹⁶

1.3 A Biocatálise e a indústria farmacêutica

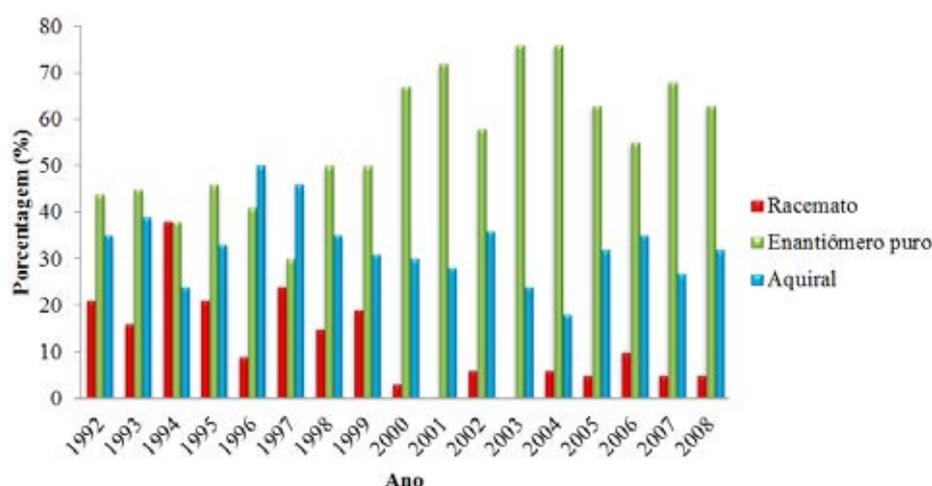
A utilização de biocatalisadores em nível industrial iniciou-se, de maneira mais consistente, no ramo farmacêutico sendo, ainda, o seguimento onde mais se emprega a

biocatálise.¹⁵ A larga utilização dos biocatalisadores na síntese de fármacos ocupa uma posição importante, sobretudo, para resolver ou gerar centros quirais.^{7;17} Isto porque a produção de fármacos enantiomericamente puros, em substituição de misturas racêmicas, é exigência legal das agências reguladoras como o FDA (*Food and Drug Administration*, EUA) em virtude da relação entre estrutura e atividade.

A atenção para a importância da quiralidade de produtos farmacêuticos se deu, primeiramente, na década de 60, quando a administração de talidomida racêmica para grávidas levou à má formação congênita de fetos. Somente depois da comercialização do fármaco racêmico que observaram que o (*R*)-enantiômero do fármaco atua como sedativo, enquanto o (*S*)-enantiômero é um forte agente teratogênico. Atualmente, o FDA dedica grande atenção à pureza enantiomérica dos fármacos quirais. Para ser comercializado, o fármaco deve ser enantiomericamente puro ou, em caso de racematos, os efeitos fisiológicos de ambos os enantiômeros devem ser investigados.¹⁸

Em 2000, 35% dos intermediários empregados na fabricação de fármacos eram quirais;¹⁹ que representou um faturamento de US\$ 133 bilhões.²⁰ Em 2005, a venda de fármacos enantiomericamente puros faturou UU\$ 225 bilhões; uma fatia de 37% do faturamento total das formulações farmacêuticas.¹⁸ Em 2008, dentre os novos fármacos aprovados pela FDA, 63% eram enantiômeros puros, 32% aquiral e somente 5% racêmicos.¹⁸ A diminuição da aprovação de novos fármacos racêmicos no mercado é evidente; passando de 21% em 1992, para 5% em 2008.¹⁸ Nos Estados Unidos, em 2009, dentre os 10 fármacos pequenos mais prescritos, 6 eram enantiômeros puros, 2 aquirais e 2 racêmicos.¹⁸ Essa diminuição de fármacos racêmicos fica clara na Figura 3.

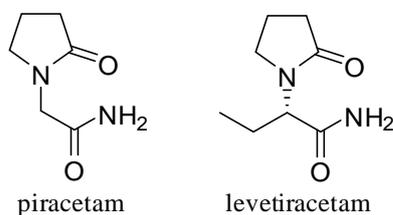
Figura 3 – Tipos de fármacos aprovados pelo FDA no período de 1992 a 2008.



Fonte: Adaptado de Lin et al.¹⁸ e Wu e Vogt²¹.

O levetiracetam [(2*S*)-2-(2-oxipirrolidin-1-il)butanamida, LEV, CAS 102767-28-2] é um fármaco antiepilético comercialmente chamado de Keppra[®] (UCB Pharma). Foi primeiramente sintetizado no início dos anos 80, em estudos de estrutura-atividade de séries homólogas do piracetam [2-(2-oxipirrolidin-1-il)acetamida, CAS 7491-74-9], um fármaco com atividade nootrópica (Figura 4), durante um programa para dar segmento na identificação de novos fármacos nootrópicos de segunda geração.²²⁻²⁴ Seus testes farmacológicos iniciais investigaram a capacidade de facilitar a neurotransmissão colinérgica. Em 1991, foram iniciados estudos clínicos em pacientes com epilepsia como terapia adjuntiva de crises parciais em pacientes refratários.²⁴

Figura 4 – Fórmula estrutural do piracetam e levetiracetam.



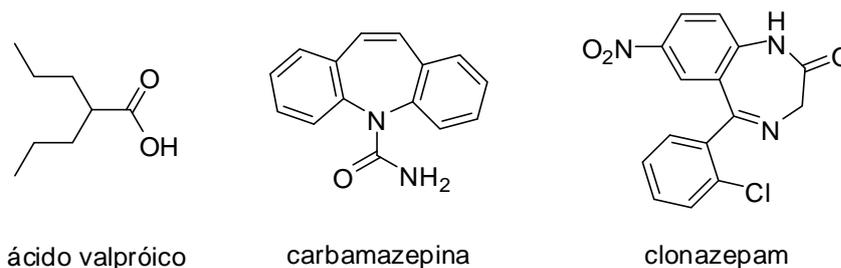
Oito anos após os estudos clínicos iniciais, em 1999, o LEV foi aprovado pelo FDA para comercialização e; em 2000, pela *European Medicines Agency* (EMA), como terapia adjuntiva de crises com ou sem evolução para crises convulsivas. Hoje, também é utilizado para tratamento de crises mioclônicas, crises tônico-clônicas generalizadas e para uso em monoterapia em pacientes a partir de 16 anos com diagnóstico de epilepsia com ou sem evolução para crises convulsivas.²²

O LEV é uma substância quiral, com propriedades anticonvulsivante relacionada ao entantiômero (*S*), estruturalmente não relacionado a nenhum outro fármaco antiepilético comercializado.²⁵ A interação fármaco-receptor é altamente específica com requisitos conformacionais rigorosos.²² Com um mecanismo único de ação, o LEV se liga a proteína SV2A da vesícula sináptica.²⁶ Embora o mecanismo de ação não seja totalmente esclarecido, atribui-se a esta proteína o papel de reguladora das crises epiléticas.²² O mecanismo de ação do LEV também envolve a inibição da liberação de cálcio intramural, inibição seletiva do tipo-N nos canais de cálcio, inibição alostérica do ácido γ -aminobutírico (GABA) e no fluxo de glicina e inibição da atividade excessiva sincronizada dos neurônios.²⁶

O uso de LEV não foi associado a efeitos prejudiciais em teste cognitivo de atenção e memória, enquanto que doses comparáveis de ácido valpróico, clonazepam e carbamazepina (Figura 5) – antiepiléticos clássicos – foram associados ao comprometimento cognitivo.²⁷ Sua

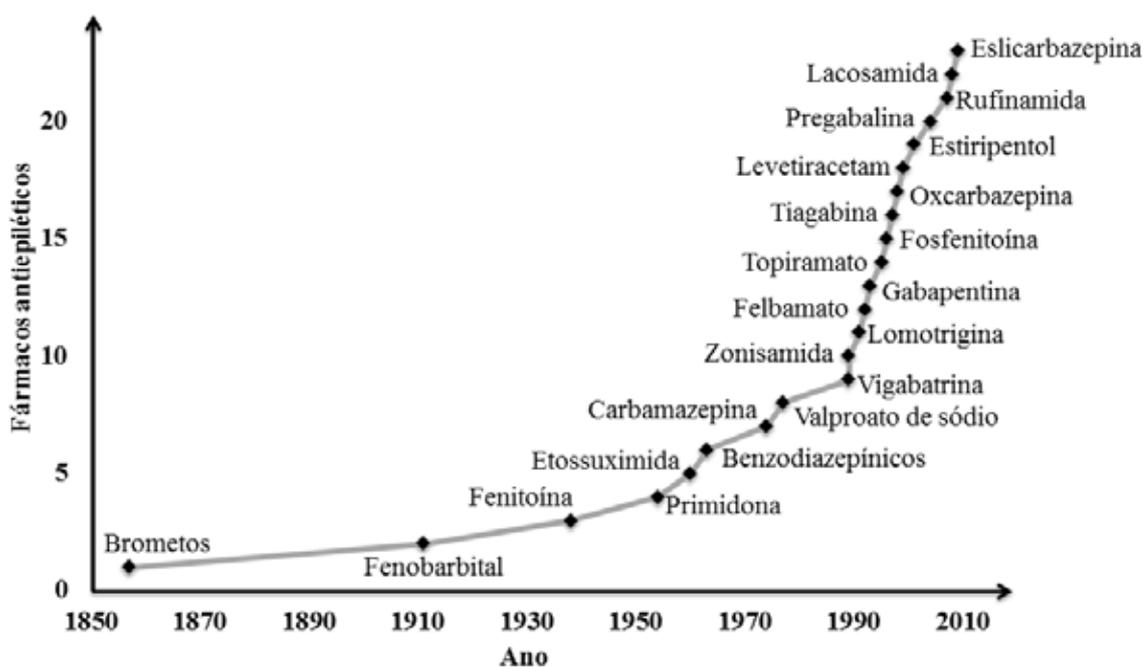
administração durante a gravidez, frente os dados disponíveis, sugere um perfil de segurança fetal favorável relacionado ao LEV em monoterapia e em combinação com outros fármacos antiepiléticos.²⁸ Estudos farmacocinéticos do LEV mostraram biodisponibilidade completa após uma dose oral, nenhuma ligação às proteínas do plasma, nenhum metabolismo hepático, com um terço do fármaco metabolizado e dois terços excretado inalterado na urina.²⁸

Figura 5 – Estrutura molecular de três antiepiléticos clássicos.



Em testes com vários agentes antiepiléticos em modelos experimentais de crise aguda, LEV diferenciou-se de outros fármacos. Sua eficácia é bastante evidente em pacientes. Estudos apontam que sua ação é mais específica que de outros antiepiléticos sobre a atividade epileptiforme.^{22;27} A Figura 6 mostra a cronologia do uso de fármacos antiepiléticos.

Figura 6 – Cronologia dos fármacos antiepiléticos.



Fonte: Adaptado de Brodie²⁹.

Na Europa, LEV e o topiramato [sulfamato 2,3:4,5-bis-O-(1-metiletilideno)- β -D-flutopiranos, CAS 97240-79-4] são os fármacos mais prescritos como agente antiepilético.³⁰ O topiramato (TPM) é comercializado no Brasil e, inclusive, distribuído pelo SUS.

Em um extenso estudo avaliativo do desempenho em longo prazo do TPM e LEV, realizado na Holanda, foi observado uma eficácia semelhante no tratamento de convulsões. Porém, a pesquisa também apontou que a eficácia não pode ser observada de maneira isolada. Os efeitos adversos relacionados ao tratamento com antiepiléticos é um dos fatores determinantes da descontinuação de fármacos e substituição do mesmo. Assim, em conclusão, o estudo revelou que uma quantidade significativa de pacientes tratados com TPM descontinuam o tratamento devido aos efeitos colaterais, neurocognitivos e interferência no humor.³⁰ Em suma, o uso do LEV está cada vez mais consolidado devido a sua eficácia no tratamento de crises epiléticas observada nos pacientes tratados com este medicamento.

Lima²² avaliou o perfil farmacocinético do LEV em trinta pacientes brasileiros epiléticos, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/SP, administrando 1000 mg de Keppra[®] aos pacientes, em dose única, e seguindo os procedimentos clínicos necessários para a pesquisa. Com os resultados, Lima²² concluiu que:

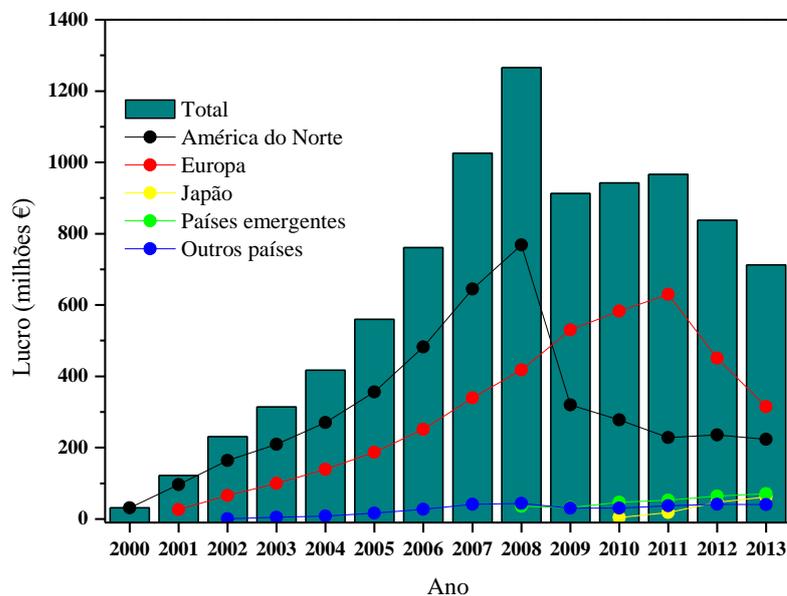
A utilização do LEV tende a aumentar cada vez mais na prática clínica, haja vista que seus benefícios em termos de eficácia e tolerabilidade são comprovados. (...) O perfil farmacológico do LEV o classifica, indubitavelmente, como uma droga antiepilética com claras vantagens clínicas em termos de tolerabilidade, eficácia e segurança.

O Keppra[®] é comercializado como comprimidos revestidos, solução oral e formulação para administração intravenosa. Um problema do tratamento utilizando este fármaco é seu elevado custo. A dose diária definida (DDD) pela *WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology*; colaboradora da Organização Mundial da Saúde, para o LEV é de 1500 mg/dia,³¹ equivalente a 82 €/mês.³² Entretanto, a dose diária prescrita (DDP) pode chegar até 5000 mg/dia;^{33;34} mais que o triplo da DDD, que equivaleria a mais de 272 €/mês³² e, pelo menos um terço dos pacientes epiléticos, utilizam mais que três fármacos no tratamento.²²

Em 2008, a UCB Pharma lucrou 1266 milhões de euros com as vendas de Keppra[®] no mundo todo. Deste ano em diante, os lucros com a venda do antiepilético diminuiram a nível mundial, mas cresceu na Europa até 2011 e no Japão continuam em expansão. O perfil dos lucros obtidos, apresentado na Figura 7, acompanham as quebras de patente. Nos EUA a

patente expirou em novembro de 2008, na Europa; em setembro de 2010 e, no Japão, expirará apenas em 2018.³⁵

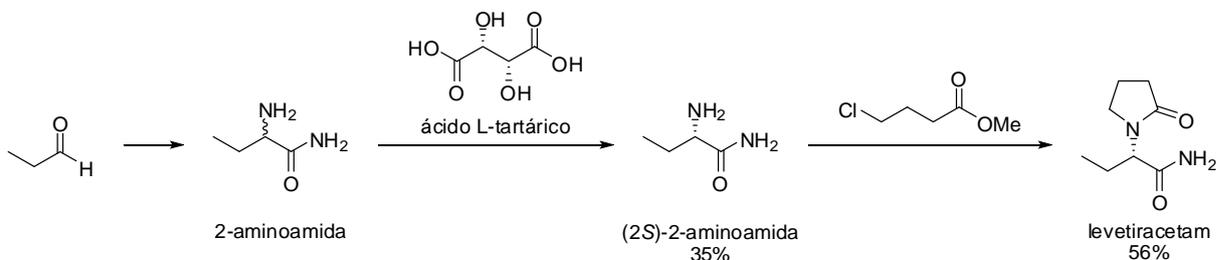
Figura 7 – Lucro líquido da UCB Pharma com as vendas do Keppra[®] desde seu lançamento no mercado.



Fonte: Adaptado de UCB³⁵.

Tendo em vista a relevância deste composto, estudos de síntese química clássica foram iniciados, sendo que as primeiras rotas envolviam resolução diastereoisomérica para obtenção do enantiômero desejado. Como exemplo, a 2-aminobutanamida pode ser resolvida com ácido L-tartárico (Esquema 2), obtendo-se a (S)-2-aminobutanamida que reage subsequentemente com o 4-clorobutanoato de metila, formando o LEV.³⁶ Tal resolução tem um rendimento de apenas 20% e é difícil de reciclar o enantiômero (*R*).

Esquema 2 – Síntese do LEV com resolução por cristalização, utilizando o ácido L-tartárico.

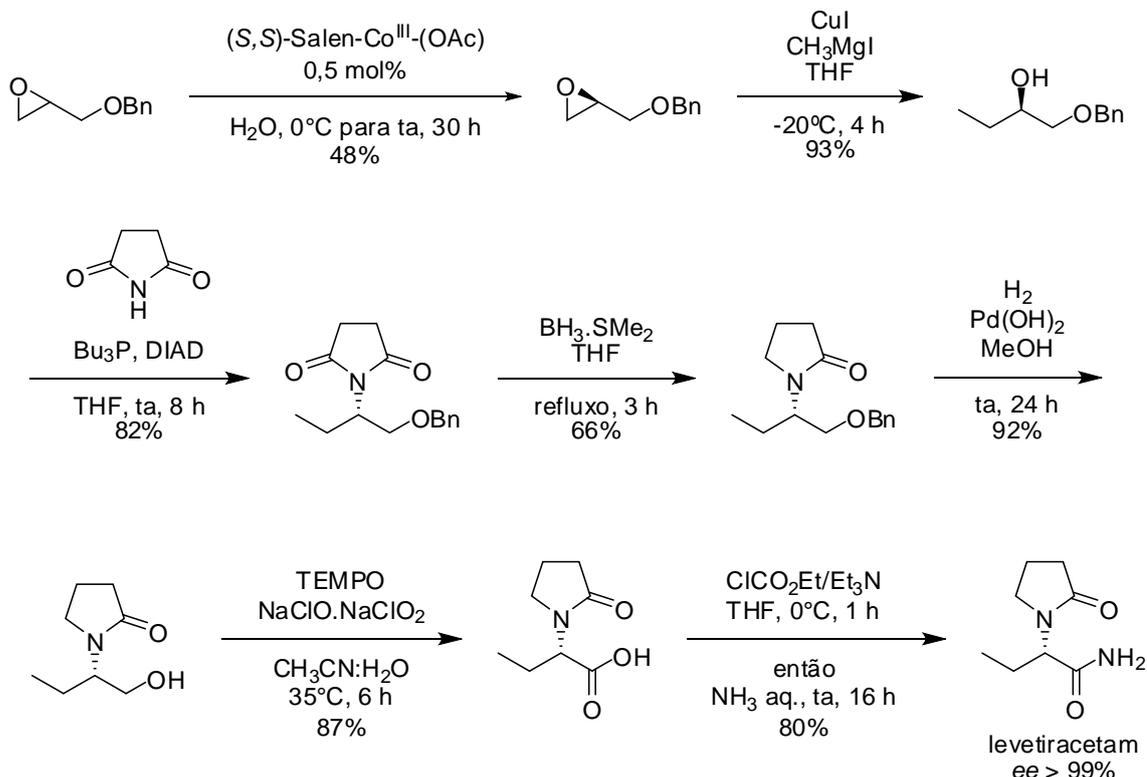


Fonte: Adaptado de Tao e Xu³⁶.

Alternativamente, outras rotas quimiossintéticas foram desenvolvidas.³⁷⁻⁴⁵ Muitas destas são extensas; tal como apresentado na Esquema 3, necessitam de temperaturas

extremas (desde $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ até $200\text{ }^{\circ}\text{C}$), utilizam reagentes de alta pureza enantiomérica ou de elevado custo, etapas de proteção/desproteção, além de catalisadores metálicos. Embora seja conseguido $ee \geq 99\%$, os rendimentos são baixo, variando de 5,5 a 56%.

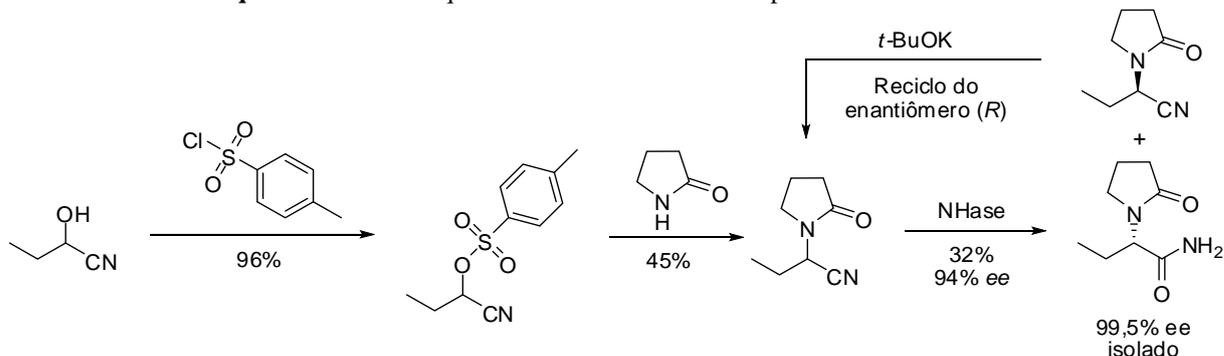
Esquema 3 – Síntese química do LEV a partir do éter (R)-benzil-glicídico, com rendimento global de 15,5% e $ee > 99\%$.



Fonte: Adaptado de Mujahid et al.⁴²

O Keppra[®] possui rota quimioenzimática, onde o intermediário 2-(2-oxipirrolidín-1-il)butanonitrila é convertido a LEV por nitrila hidratase (NHase, EC 4.2.1.84), em um processo com rendimento global de 14% e $ee > 99,5\%$ (Esquema 4).

Esquema 4 – Síntese quimioenzimática do LEV via processo UCB Pharma.



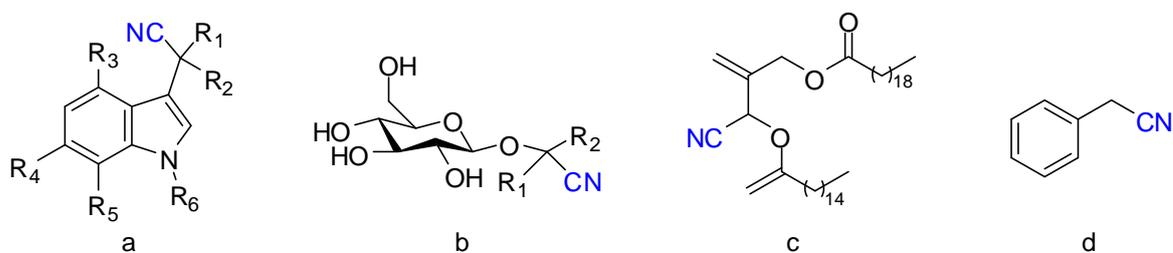
Fonte: Adaptado de Tucker et al.⁴⁶

1.4 Nitrila hidratases

Compostos contendo grupo $-C\equiv N$ são essenciais para o metabolismo de plantas superiores e micro-organismos de solo. Também estão presentes em insetos, esponjas e algas. Os cianetos são abundantes em plantas, estando presentes em mais de 2000 espécies, onde ocorrem como nitrilas inorgânicas (HCN) ou nitrilas orgânicas (R-CN).⁴⁷ Suas funções são abrangentes:

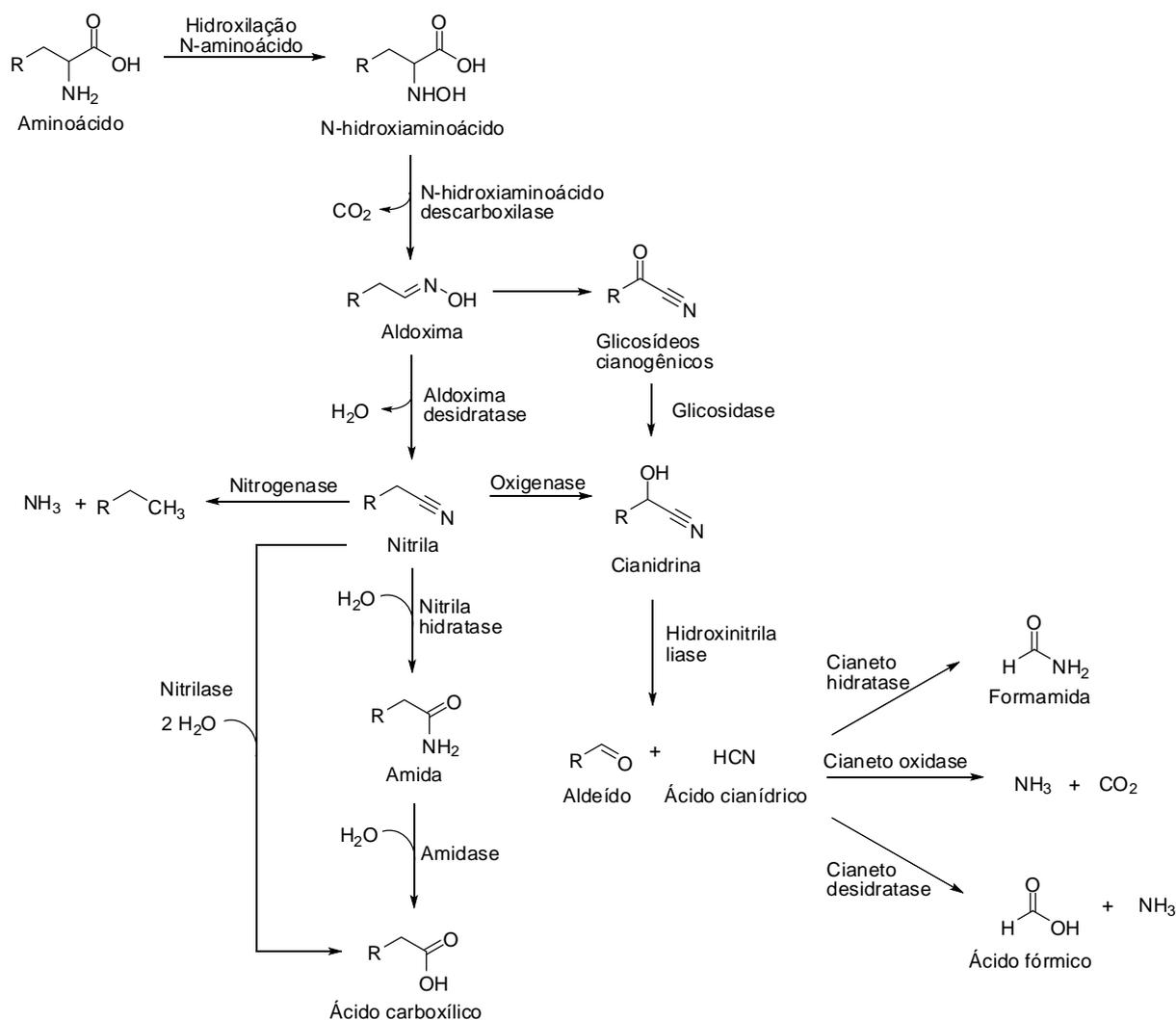
- Hormônios de crescimento durante a germinação da planta; sobretudo pela ação da 3-indolacetonitrila e derivados (Figura 8a);^{47;48}
- Componentes de um sistema de defesa química, como forma de proteção de herbívoros, tais como ricina e glicosídeos cianogênicos (Figura 8b) que é hidrolisada para liberação de HCN;⁴⁷⁻⁴⁹
- Produtos naturais de metabólitos de plantas, como cianoalcaloides e cianolipídeos (Figura 8c);^{47;48}
- Outras nitrilas de baixa massa molecular (Figura 8d), das quais várias ainda possuem funções até então desconhecidas.^{48;49}

Figura 8 – Nitrilas presentes naturalmente em plantas.



A maioria das plantas liberam nitrilas orgânicas como parte dos seus exsudatos radiculares. Tal processo levou à evolução de micro-organismos que assimilam nitrilas da rizosfera como fonte única de carbono e nitrogênio. Para tanto, a maioria destes micro-organismos utilizam enzimas hidrolíticas para obtenção de ácidos carboxílicos e amônia que, finalmente, são utilizados como metabólitos para os elementos essenciais de sua biomassa (constituintes do DNA, RNA e proteínas).⁴⁸ O metabolismo completo de nitrilas nos micro-organismos está apresentado no Esquema 5.

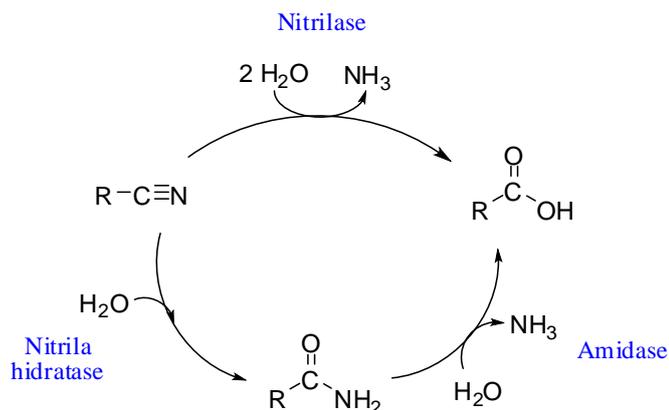
Esquema 5 – Metabolismo de nitrilas em micro-organismos.



Fonte: Adaptado de Prasad e Bhalla.⁵⁰

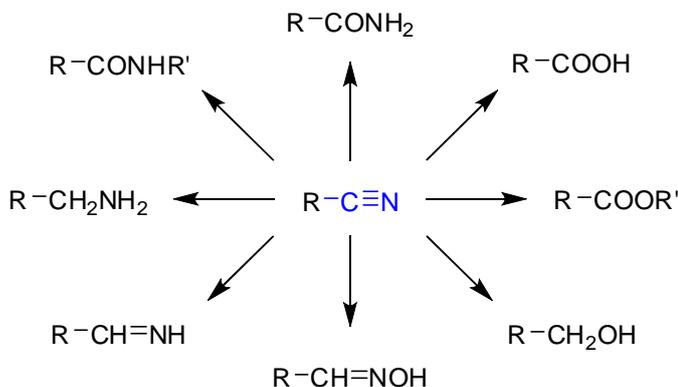
O catabolismo de nitrilas em micro-organismos pode seguir duas rotas distintas, apresentadas na Figura 9, para produção de ácido carboxílico, onde três enzimas são essenciais para o processo.⁵⁰ Na primeira rota, a nitrilase (EC 3.5.5.1) converte diretamente a nitrila em ácido carboxílico e NH_3 . Na segunda rota, uma nitrila hidratase (NHase, EC 4.2.1.84) catalisa a formação de uma amida que, por sua vez, é hidrolisada para o ácido carboxílico correspondente e NH_3 por ação de uma amidase (EC 3.5.1.4).⁴⁹

Em geral, os micro-organismos apresentam uma nitrilase ou o sistema NHase-amidase. Mas, em diversos micro-organismos foi verificada a presença das três enzimas. Entretanto, as NHases são mais comumente encontradas em bactérias, como as pertencentes aos filos proteobactéria, actionobactérias, cianobactérias, firmicutes dentre outros.⁵⁰

Figura 9 – Catabolismo de nitrilas em micro-organismos.

Ainda que nitrilas orgânicas e inorgânicas sejam derivadas de sais de cianeto, a maioria não é tão tóxica quanto os sais. Mais de 30 produtos farmacêuticos contendo nitrila são comercializados para os mais diversos tratamentos, bem com mais de 20 compostos estão em estudos de desenvolvimento clínico.⁵¹ O grupo ciano é relativamente inerte e, por vezes, não é metabolizado no organismo humano e passa através do corpo inalterado. Sua presença aumenta a solubilidade em água e diminui a susceptibilidade ao metabolismo oxidativo no fígado.⁵¹

As nitrilas são compostos versáteis, podendo ser convertidas em amidas, aminas, iminas, oximas, ácidos carboxílicos, ésteres e álcoois que correspondem a um grupo economicamente importante em processos preparativos (Esquema 6).⁵² São amplamente utilizadas como materiais de partida e intermediários em síntese orgânica, sobretudo, devido à hidratação de nitrilas para a amida correspondente.¹⁶

Esquema 6 – Diversidade estrutural acessível através da manipulação de nitrilas. R e R' representam quaisquer grupos alquil ou aril.

Fonte: Adaptado de Kobayashi e Shimizu⁵².

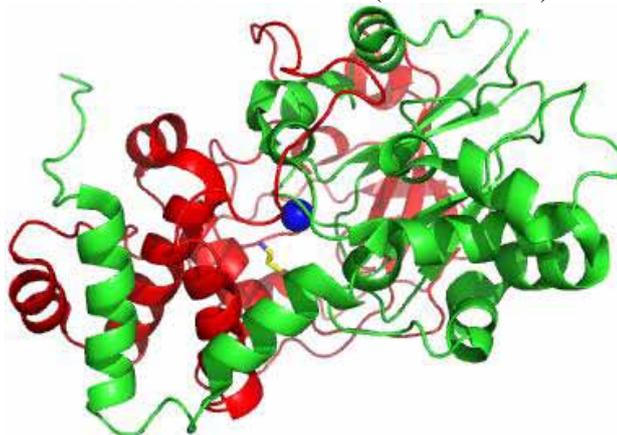
Existem duas abordagens para a hidratação das nitrilas – via química ou enzimática; por NHase. Porém, a hidratação química de nitrilas é restrita a nitrilas estruturalmente simples devido às drásticas condições reacionais como uso de ácidos ou bases fortes em temperaturas e pressões elevadas que resultam em processos pouco seletivos gerando subprodutos e consequentes baixos rendimentos.⁵⁰

A hidratação de nitrilas por via enzimática foi primeiramente relatada em 1980 por Asano, Tani e Yamada⁵³, onde verificaram a formação de acetamida em culturas de bactérias *Arthrobacter* sp. J-1 crescidas em meio contendo acetonitrila. Dois anos depois, Asano et al.⁵⁴ publicaram uma caracterização completa da então nova enzima, NHase.

Ainda em 1982, Asano et al.⁵⁵ relataram à conversão de acrilonitrila a acrilamida, por NHase de *Pseudomonas chlororaphis*, em um processo com rendimento próximo a 100%. Este fato teve grande impacto na academia e na indústria devido à nova rota de síntese, com produção em grande escala, que superava duas rotas clássicas; a utilização de ácido sulfúrico e a catalisada por sais de cobre, em rendimento e formação de subprodutos.^{50;55} Atualmente, este é o maior processo biocatalítico utilizado pela indústria química, produzindo mais de 30 mil toneladas/ano de acrilamida pela Mitsubishi Rayon.¹⁶

NHases são metaloproteínas que podem conter Fe^{3+} ou Co^{3+} em seu sítio ativo, ou Zn^{2+} no caso da enzima de *Myrothecium verrucaria*. A enzima consiste de subunidades α e β , existindo como heterodímeros α,β ou tetrâmeros $\alpha_2\beta_2$ de, aproximadamente, 46 kDa e 92 kDa, respectivamente.⁴⁷ O cofator metálico está localizado na subunidade α , no sítio ativo da enzima e, embora a catálise esteja associada a esta subunidade, a fragmentação em subunidades individuais não apresenta atividade catalítica (Figura 10).^{47;56}

Figura 10 – Representação tridimensional de uma NHase de *Rhodococcus erythropolis*. Em verde e vermelho estão representados as subunidade α e β , respectivamente. A esfera azul representa o cofator Fe^{3+} e em amarelo um substrato no sítio ativo (isobutironitrila).



Fonte: Adaptado do PDB (2QDY) utilizando o software PyMol.

As NHases dependentes de ferro (NHases-Fe) apresentam fotorreatividade regulada por óxido nítrico (NO), enquanto as dependentes de cobalto (NHases-Co) não. Supostamente, os micro-organismos que possuem NHase-Fe produzem NO endogenamente. O NO permanece ligado ao Fe^{3+} no sítio ativo até receber irradiação pela luz, quando é substituído por uma molécula de água ou OH, sendo esta a forma reativa da enzima.⁴⁷

Os complexos do sítio ativo de ambos os metais são semelhantes em alguns aspectos: são de baixo spin, apresentam baixo potencial redox e compartilham de um conjunto de ligantes comum, ou seja, três cisteínas. Dessas três, duas apresentam oxidação pós-traducional, uma para ácido cisteína sulfínico e outro para ácido cisteína sulfênico. Os resíduos de cisteína modificados são essenciais para a atividade catalítica.⁵⁶ O alinhamento da sequência de aminoácidos das subunidades α e β revelou que uma região da subunidade α é altamente conservada. Nessa região, as NHases-Co possuem uma treonina e tirosina no sítio ativo, enquanto as dependentes de ferro possuem uma serina e treonina na sequência –V–C–(T/S)–L–C–S–C–(S/Y)–. Assim, a diferença dos cofatores metálicos pode ser atribuída aos diferentes resíduos de aminoácido nesta posição.^{47; 48; 50; 51}

Os mecanismos de modificação pós-traducional da cisteína ainda são desconhecidos. A importância da subunidade β para a atividade catalítica é sugerida pelo fato de que todas as NHases conhecidas possuem subunidade β ou subunidades homólogas que estão envolvidas com o complexo do sítio ativo. Uma rede de ligação de hidrogênio altamente conservada liga as duas subunidades, inclusive ligações entre os resíduos de cisteína pós-traducional da subunidade α e dois resíduos de arginina β que, quando mutados, reduz drasticamente a atividade ou a suprime completamente.⁵⁶

Em alguns micro-organismos, as NHases são constitutivas enquanto em outros são exclusivamente indutivas; reguladas pelos seus substratos ou produtos (ou seus análogos). Em geral, apenas um tipo de NHase é produzida por um organismo,^{50;57} como sumarizado na Tabela 1, sendo que as NHase-Co apresentam especificidade de substrato mais ampla.⁴⁸ Alguns autores relacionam a afinidade preferencial de substratos de NHases-Fe por nitrilas alifáticas pequenas, enquanto NHases-Co exibe afinidade por nitrilas aromáticas.⁵⁸

Tabela 1 – Características de algumas NHases microbianas.

Organismo	Indutor	Ótimo		Estabilidade		Substrato específico
		pH	T (°C)	pH	T (°C)	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> d3	Fenilacetonitrila	7,0	40	-	-	Nitrila quirál
<i>A. tumefaciens</i> IAMB-261	Pivalamida	7,5	-	6,5-9,5	-	Indol-3-acetonitrila
<i>Arthrobacter</i> sp. J1	Acetamida	7,0-7,2	35	-	-	Nitrilas alifáticas
<i>Bacillus</i> RAPc8	-	7,0	60	-	>50	Nitrilas alifáticas
<i>B. pallidus</i> Dac 521	Constitutivo	7,0-7,5	50	6,2-8,7	50	-
<i>Brevibacterium</i> sp. R312	Constitutivo	7,8	25	6,5-8,5	-	Nitrilas alifáticas
<i>Corynebacterium</i> sp. C5	Isobutironitrila	8,0-8,5	-	-	-	Dinitrilas alifáticas
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> B23	Metacrilamida	7,5	20	6,0-7,5	20	Nitrilas alifáticas
<i>P. putida</i> NRRL 18668	Butironitrila	7,2-7,8	-	-	<35	Nitrilas alifáticas
<i>Pseudonocardia thermophila</i> JCM 3095	Metacilamida	-	60	-	60	Nitrilas alifáticas
<i>Rhodococcus</i> sp. N771	Constitutivo	7,8	30	6,0-8,0	<30	Nitrilas alifáticas
<i>Rhodococcus</i> sp. N774	Constitutivo	7,7	35	7,0-8,5	-	Nitrilas alifáticas
<i>Rhodococcus</i> sp. YH3-3	Nitrila/amida/ aldoxima	-	-	2,5-11,0	40-60	Nitrilas alifáticas e aromáticas
<i>R. rhodochrous</i> J1 H–NHase	Ureia	6,5-6,8	35	6,5-8,0	<30	Nitrilas alifáticas
<i>R. rhodochrous</i> J1 L–NHase	Ciclohexanocarbo- xamida	8,8	40	6,0-8,5	<50	Nitrilas aromáticas
<i>R. erythropolis</i> A4	Metacrilamida	7,5	32-35	6,0-9,0	<50	Nitrila quirál
<i>R. erythropolis</i> JCM 6823	ϵ -caprolactama	-	-	-	-	Nitrilas alifáticas e aromáticas

Fonte: Adaptado de Prasad e Bhalla⁵⁰.

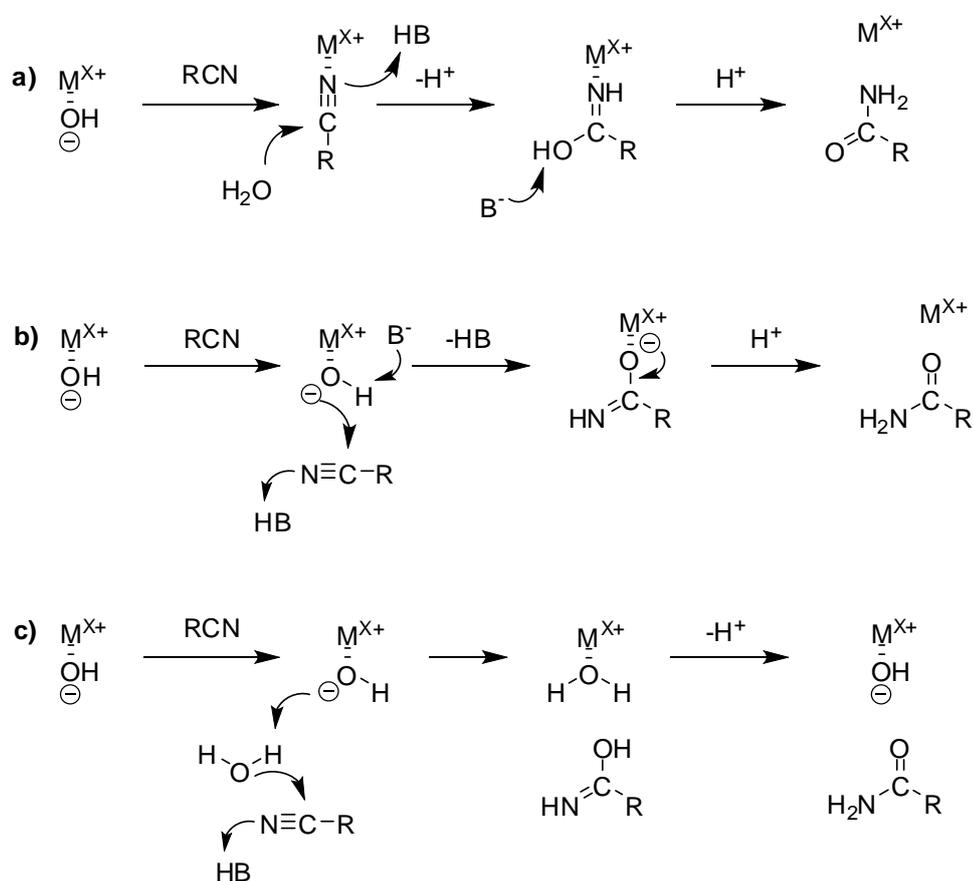
Em relação à estereosseletividade, os trabalhos iniciais com NHases apontam uma baixa estereosseletividade,⁴⁷ onde a etapa estereosseletiva da conversão de uma nitrila ao correspondente ácido carboxílico era realizado por amidases ou nitrilases.⁵⁹ Trabalhos mais recentes com um sistema bienzimático NHases-amidases, na presença de inibidores de amidase, relatam o acúmulo de amidas quirais. Assim, foi observado que tais NHases estereosseletivas podem ser isoladas a partir de alguns gêneros de bactérias, tais como: *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Rhodococcus*, *Moraxella* e *Serratia*.⁵⁹

O mecanismo catalítico exato das NHases ainda não foi elucidado.⁴⁷ Entretanto, são propostos três mecanismos, sendo um de esfera interna e dois de esfera externa (Esquema 7). No mecanismo de esfera interna, a nitrila do substrato desloca um hidróxido da esfera de coordenação do M^{X+} . A nitrila, então ligada ao metal, sofre hidrólise por uma molécula de

água. Isto gera um intermediário iminol ligado ao metal, que rearranja para amida (Esquema 7a).^{48;50}

No mecanismo de esfera externa, a nitrila sofre um ataque nucleofílico do hidróxido ligado ao metal no sítio ativo. A reação gera um iminolato transiente ligado ao metal. Esta espécie, em seguida, é rearranjada para amida (Esquema 7b). No segundo mecanismo de esfera externa, o hidróxido ligado ao metal desprotona uma molécula de água livre próxima ao sítio ativo. Esse hidróxido recém-formado realiza a hidrólise da nitrila, levando a formação de um ácido imídico que é tautomerizado para amida (Esquema 7c).^{48;50}

Esquema 7 – Possíveis mecanismos de hidratação de nitrilas por NHases (a) Mecanismo de esfera interna, (b) Mecanismo de esfera externa e (c) Outro Mecanismo de esfera externa.



Fonte: Adaptado de Mascharak⁴⁸.

As NHases apresentam estreita interface entre academia-indústria. Suas aplicabilidades fizeram com que fossem inseridas rapidamente na indústria para produção de amidas, como a acrilamida e nicotinamida. No entanto, estas aplicabilidades ainda não são totalmente exploradas. Um dos motivos é a moderada estereosseletividade das NHases até

agora conhecidas. A descoberta de novas propriedades catalíticas das NHases ampliará, ainda mais, a presença desta enzima no âmbito industrial.^{47;50;59}

1.5 Meios reacionais

Embora a água seja o solvente tradicional em biocatálise, algumas reações ocorrem apenas em solventes orgânicos ou são mais efetivas nestes do que em água, como as condensações, por exemplo.⁶⁰ Entretanto, a recomendação do uso de solventes orgânicos em escala industrial tem sido cada vez mais limitada. Desde 2000, pesquisadores mostraram que os líquidos iônicos (LIs) podem substituir os solventes orgânicos.⁶¹

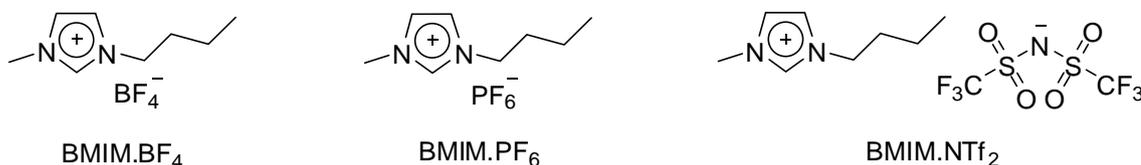
Os LIs são sais, líquidos à temperatura ambiente e permanecem líquidos até altas temperatura (< 400 °C). Diferentemente dos solventes tradicionais; que podem ser descritos como líquidos moleculares, LIs são compostos de íons. Suas propriedades únicas, como não volatilidade, não inflamabilidade e excelente estabilidade química e térmica os colocaram como uma alternativa ambientalmente atraente para solventes orgânicos convencionais. Além disto, as propriedades físico-químicas dos LIs, tais como viscosidade, hidrofobicidade, densidade e solubilidade, podem ser alteradas pela combinação de diferentes cátions e ânions, de acordo com a necessidade específica.^{62;63}

O primeiro LI relatado foi o nitrato de etilamônio (EtNH_3NO_3), em 1914. A primeira geração de LIs empregava principalmente cátions dialquilimidazólicos, alquilpiridínicos e derivados. Os ânions mais comuns eram cloroaluminato e iodetos metálicos, que reagem com a água e, portanto, não são adequados para biotransformações. Esta geração de LIs também era sensível ao oxigênio e só podia ser manuseada sob atmosfera inerte. Depois de uma década, a segunda geração de LIs substituiu os ânions por haletos, BF_4^- , PF_6^- e $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}_2^-$, que são estáveis em água e ao ar. Aos cátions foram adicionados amônio e fosfônio. Estes LIs apresentam propriedades interessantes, como pontos de fusão mais baixos, diferente solubilidade em solventes orgânicos clássicos, viscosidades, etc. Devido a estas propriedades, a segunda geração atraiu um grande interesse em diversas áreas, e a pesquisa em LIs foi impulsionada a partir da década de 1990.⁶⁴

A terceira geração de LIs baseia-se em ânions hidrofóbicos e mais estáveis, tais como $(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-$. Os cátions e/ou ânions utilizados são biodegradáveis, facilmente disponíveis e de menor toxicidade. Apresentam maior hidrofiliabilidade que a segunda geração e, em geral, são miscíveis em água.⁶⁴ Atualmente, os LIs mais comumente utilizados em biocatálise são os

imidazólicos, sobretudo os sais de 1-butil-3-metilimidazólio com tetrafluoroborato, hexafluorofosfato e bis[(trifluorometil)sulfonil]imida (Figura 11).⁶⁰

Figura 11 – Líquidos iônicos comumente utilizados em biocatálise.



Os líquidos iônicos de 1-butil-3-metilimidazólio são polares, miscíveis com solventes como diclorometano, e imiscível com hexano. A polaridade dos líquidos iônicos comuns, de acordo com a escala de polaridade de Reichardt, são semelhantes ao metanol, 2-cloroetanol e *N*-metilformamida. Embora BMIM.PF_6 , BMIM.NTf_2 e BMIM.BF_4 são semelhantes na escala de polaridade de Reichardt, apenas o último é completamente solúvel em água. BMIM.PF_6 e BMIM.NTf_2 são ligeiramente solúveis em água (0,13% v/v e 1,4% m/v, respectivamente).⁶⁰

Desta maneira, os LIs podem atuar como co-solventes, segunda fase ou como solventes não aquosos, dependendo da natureza do LI utilizada, bem como da enzima. Mesmo quando determinada enzima é inativada ou desnaturada por solventes orgânicos polares, esta pode tolerar um LI com polaridade semelhante.⁶⁵

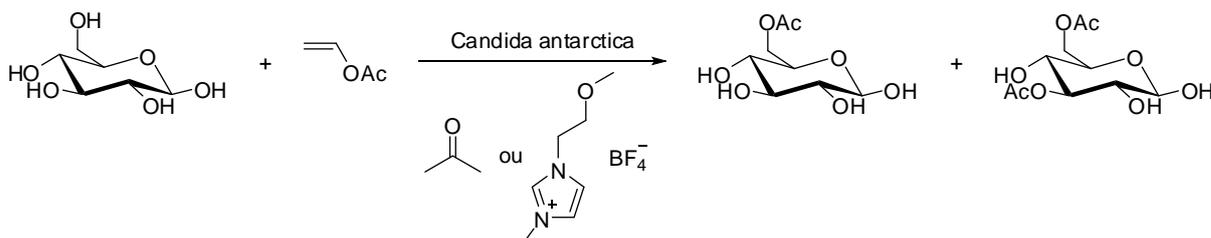
A estrutura tridimensional da enzima é um pré-requisito para sua atividade, mantida por ligação dissulfeto, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Desdobramentos requerem a dissociação de muitas ligações de hidrogênio e o contato de grupos hidrofóbicos com o solvente. Por conseguinte, as enzimas são desestabilizadas por compostos que interagem especificamente com a proteína desdobrada. A água realiza interações suficientemente fortes para dissolver enzimas, mas não suficientemente fortes para dissociar as ligações de hidrogênio estruturais. As soluções enzimáticas em água pura são frequentemente instáveis e, por isso, são geralmente mantidas em tampões. Neste meio, o efeito de estabilização pode ser atribuída ao efeito *salting out* dos grupos hidrofóbicos, o que aumenta a barreira energética para o desdobramento e exposição de tais grupos.⁶⁶

Nem todos os líquidos iônicos são adequados para biocatálise. As enzimas são geralmente ativas em líquidos iônicos que contenham os ânions BF_4^- , PF_6^- e NTf_2^- , mas não Cl^- , NO_3^- e CF_3SO_3^- , trifluoroacetato ou acetato. Uma possível razão para esta diferença reside na basicidade da ligação de hidrogênio dos ânions com a enzima. Quanto menor a basicidade

da ligação de hidrogênio do ânion, menor será a interferência com as ligações de hidrogênio internas da enzima. O ânion BF_4^- espalha sua carga negativa ao longo de quatro átomos de flúor, os ânions PF_6^- e NTf_2^- ; em seis átomos de flúor, minimizando a basicidade da ligação de hidrogênio.⁶⁰

Assim, a utilização de LIs pode ser bastante eficiente em processos biocatalíticos substituindo os solventes orgânicos, aumentando a solubilidade de substratos e a velocidade reacional, além de uma melhora na regio- e enantiosseletividade.⁶⁵ Por exemplo, a acilação de glicose por lipase-B de *C. antarctica*, Esquema 8, apresentou melhora significativa de rendimento (99%) e regioseletividade (93%) em LI, comparada com a reação realizada em solventes orgânicos (73% e 76%, respectivamente).⁶⁷ Do ponto de vista econômico, é preciso encontrar metodologias para a reutilização e reciclagem dos LIs, bem como biocatalisadores neste meio, para que o processo seja conduzido de forma mais eficaz.⁶³

Esquema 8 – Acetilação regioseletiva de β -D-glicose catalisada por lipase em acetona e MOEMIM. BF_4 .



Fonte: Adaptado de Park e Kazlauskas⁶⁷.

Na literatura há apenas três trabalhos envolvendo NHases e líquidos iônicos. No primeiro deles, Cull et al.⁶⁸ relatam, em 2000, a biotransformação de 1,3-dicianobenzeno para 3-cianobenzamida e ácido 3-cianobenzóico por células de *Rhodococcus* R312, em um sistema bifásico água-BMIM. PF_6 comparativo ao convencional sistema água-tolueno. O perfil de conversão em ambos os sistemas foi o mesmo, com cinética mais lenta para água-BMIM. PF_6 ; devido a viscosidade do LI, porém, a atividade específica do biocatalisador no sistema contendo LI foi quase uma ordem de magnitude maior do que no sistema água-tolueno.

O estudo realizado por Housaindokht et al.⁶⁹ em 2013 aborda a instabilidade térmica de NHases e a baixa solubilidade dos substratos de interesse em meio aquoso. Desta forma, os referidos autores realizaram uma simulação computacional molecular dinâmica para verificar a estabilidade térmica de NHases no LI hidrofóbico bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-etil-3-metilimidazólio, onde o sítio ativo permaneceu inalterado a altas temperaturas. Ainda

neste estudo, há uma observação sobre o número limitado de trabalhos com NHases em solventes orgânicos, além de nenhum que utilize LIs como solvente ou co-solventes em reações catalisadas por NHase.

Por último, Neumann et al.⁷⁰, em 2014, mostraram a biodegradação de líquidos iônicos contendo os ânions $B(CN)_4^-$, $C(CN)_3^-$, $N(CN)_2^-$ e metais alcalinos como cátions, por *Cupriavidus spp.* e NHase comercial. Em ambos os casos, foi verificada a presença de todas as respectivas amidas.

Os resultados relatados na literatura, até agora, mostram claramente os potenciais de utilização dos LIs como solventes para biocatálise. Em comparação com os solventes orgânicos convencionais, as enzimas em LIs têm apresentado um aumento significativo em todos os aspectos. O funcionamento das enzimas em LIs ainda não está esclarecido, o que torna importante as observações experimentais para um correlacionamento com aspectos teóricos. Assim, os LIs trazem novas perspectivas para a biocatálise.^{62;71}

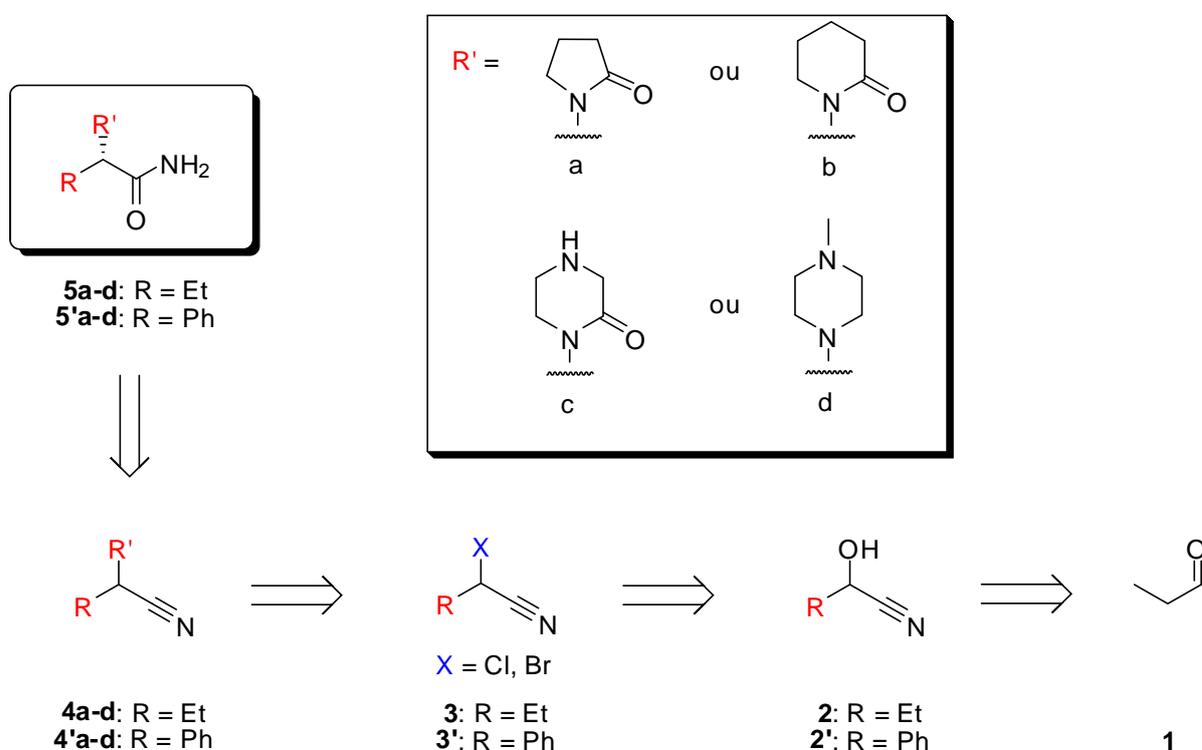
Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

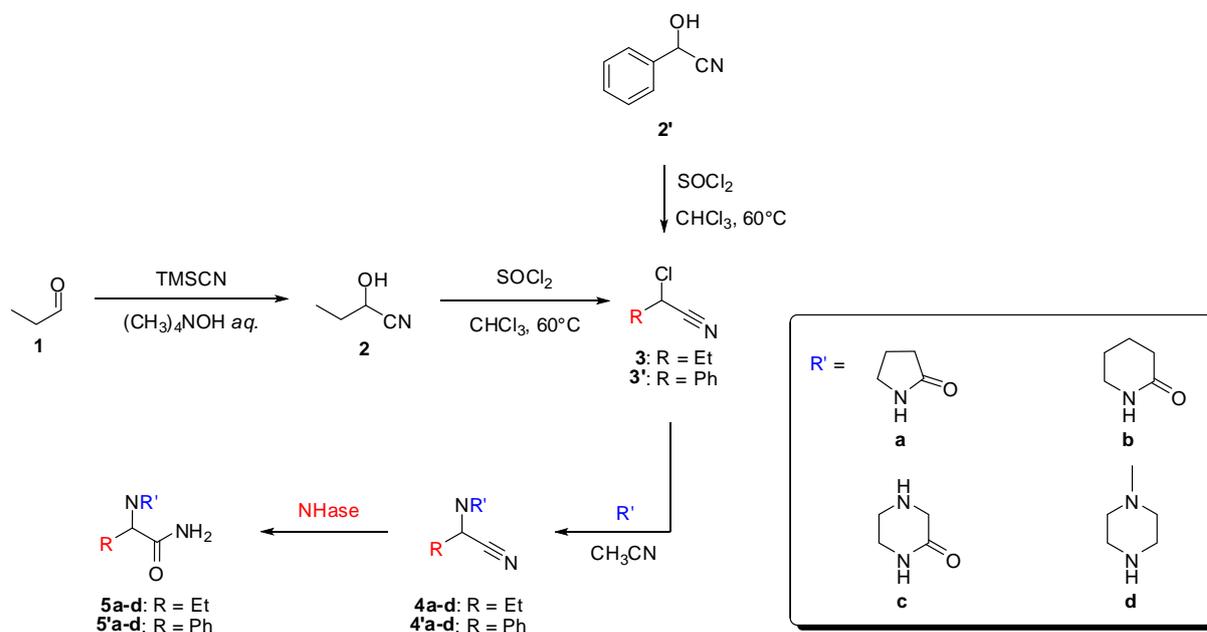
Realizar a síntese quimioenzimática do levetiracetam (**5a**) e análogos. Para tanto, a proposta retrossintética para o levetiracetam está apresentada no Esquema 9.

Esquema 9 – Proposta retrossintética para obtenção do levetiracetam **5a**.



Através da retrossíntese sugerida, a preparação do composto **4** é essencial para a formação do produto **5**, por ação da enzima nitrila hidratase (E.C. 4.2.1.84). Desta maneira, foi proposta a seguinte rota sintética:

Esquema 10 – Rota quimioenzimática proposta para a síntese do levetiracetam e análogos.



2.2 Objetivos específicos

1. Sintetizar e caracterizar o composto **2**;
2. Sintetizar e caracterizar os compostos **3a** e **3'a**;
3. Sintetizar e caracterizar os compostos **4a-4d** e **4'a-4'd**;
4. Avaliar a especificidade de substrato e enantiosseletividade de nitrila hidratases (E.C. 4.2.1.84) na conversão de **4a-4d** e **4'a-4'd** em **5a-5d** e **5'a-5'd**, em meio aquoso tamponado;
5. Sintetizar e caracterizar os líquidos iônicos BMIM.BF₄, BMIM.PF₆ e BMIM.NTf₂ que serão utilizados como meio reacional;
6. Avaliar a especificidade de substrato e enantiosseletividade de nitrila hidratases (E.C. 4.2.1.84) na conversão de **4a-4d** e **4'a-4'd** em **5a-5d** e **5'a-5'd**, em líquidos iônicos.

Resultados e Discussão

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

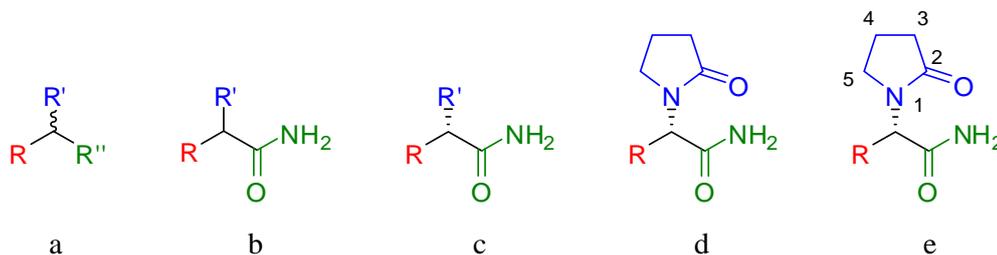
3.1 Planejamento sintético

A análise retrossintética inicialmente proposta para a síntese do levetiracetam **5a** e análogos foi mostrada no Esquema 9. Nesta proposta **5a** e análogos **5b-d** (série alifática) seriam sintetizados a partir das respectivas α -alquilnitrilas *N*-substituídas **4a-d** empregando NHases como biocatalisador. Estas nitrilas seriam obtidas a partir de **2** através de duas reações de substituição nucleofílica consecutivas passando pelos compostos halogenados **3**. O composto **2** seria sintetizado a partir do propanal **1**. Entretanto, durante o desenvolvimento desta rota constatou-se que os compostos **4a-d** poderiam ser sintetizados diretamente a partir de **2** o que reduziu em uma etapa a proposta sintética inicial tornando esta nova rota mais curta e eficiente.

Os análogos alifáticos de **5a** foram escolhidos baseados no trabalho de estrutura-atividade realizado por Kenda et al.⁷² Neste estudo foi avaliado o sítio específico de ligação do LEV no receptor cerebral. A partir das informações aí geradas foram realizadas uma série de alterações no esqueleto do composto representado na Figura 12 a a fim de identificar o(s) grupo(s) farmacofórico(s). Desta maneira, os autores constataram que para este composto apresentar atividade anticonvulsivante os requisitos abaixo listados deveriam ser considerados:

- (i) a porção amida é essencial para a afinidade (Figura 12b);
- (ii) o grupo R deve ser pequeno e com configuração (*S*); sendo que a maior afinidade é obtida quando R é uma etila (Figura 12c);
- (iii) em R' o anel pirrolidin-2-ona (**a**) é preferido sobre os análogos de piperidina ou compostos nitrogenados acíclicos (Figura 12d);
- (iv) a substituição das posições 3 ou 5 do anel lactâmico diminui a afinidade de ligação do LEV no receptor cerebral (Figura 12e);
- (v) a substituição na posição 4 do anel lactâmico por cadeias alifáticas pequenas pode aumentar a afinidade (Figura 12e).

Figura 12 – Modificações estruturais a partir do esqueleto do LEV.



Com base nas informações supracitadas, foram elaborados os análogos sintéticos de **5a**. Assim, os heterociclos **b** e **c** foram propostos por serem lactamas que diferenciam-se de **a** pela tamanho do ciclo e presença de uma amina secundária na posição 4 do anel, respectivamente. A escolha do heterociclo **d** foi baseada nos trabalhos de Altenkämper et al.⁷³ que descrevem a metil-piperazina ligada ao carbono assimétrico α -amida como grupo farmacofórico em compostos com atividade antimalárica e anti-*Trypanosoma*.⁷³

Além da série alifática (**5a-5d**) foi incluída na proposta inicial a síntese da respectiva série aromática **5'a-5'd**, conforme apresentado no Esquema 9, e cuja relação estrutural-atividade ainda não foi descrita na literatura. Também, nos estudos de Kenda et al.⁷², ao substituírem, em **5a**, a etila de R por um *n*-propila, *i*-propila e *t*-butila, a atividade antiepilépsia foi diminuída. Assim, foi generalizado que para quaisquer substituintes em R, maior que uma etila, a atividade seria diminuída. No entanto, o efeito de um anel aromático não foi avaliado. Nos compostos com atividade antimalárica e anti-*Trypanosoma*, um substituinte aromático em R de **5'd** apresenta maior atividade. Ademais, a síntese dos respectivos compostos aromáticos permitiria avaliar a especificidade das NHases em relação aos substratos α -alquil e α -arilnitrilas (**4a-d** e **4'a-d** respectivamente).

3.2 Obtenção das cianidrinas 2 e 2'

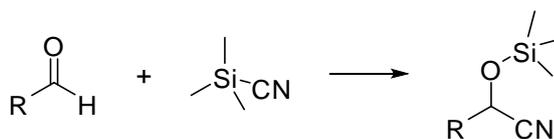
O composto **2'**, mandelonitrila, foi obtido comercialmente junto a empresa Sigma-Aldrich. Entretanto a comercialização do análogo **2** foi descontinuada. Para a síntese de **2** foram avaliadas duas estratégias que envolviam o emprego de doadores de cianeto diferentes. Na primeira metodologia optou-se pelo uso de TMS-CN (cianeto de trimetilsilila), um doador de cianeto mais seguro quando comparado ao tradicional NaCN (cianeto de sódio) utilizado na segunda metodologia.

3.2.1 Síntese da 2-hidroxiutanonitrila (**2**)

A primeira etapa da rota sintética proposta consiste na síntese do composto **2** (2-hidroxiutanonitrila). A adição de uma nitrila à carbonila de um aldeído leva a formação de cianidrina, uma importante reação de formação de ligação C–C.⁷⁴ A síntese iniciou-se através da cianossililação de **1**.

Inúmeras metodologias de preparação de cianidrinas são reportadas na literatura devido à sua importância sintética: são precursoras de diversos grupos funcionais como β-amino-álcoois, α-hidróxi-aldeídos e α-hidróxi-ácidos.⁷⁵ O TMS-CN é, atualmente, uma das fontes de cianeto mais eficientes, segura e de fácil manuseio nas reações de adição nucleofílica de cianeto à compostos carbonílicos.⁷⁶ Esta reação leva ao respectivo α-ciano trimetilsililéter (Esquema 11), e pode ser catalisada por ácidos ou bases de Lewis, catalisadores bifuncionais, alcóxidos e sais inorgânicos.⁷⁴ Entretanto, muitos destes métodos apresentam tempos de reação prolongados, uso de catalisadores contendo metais pesados e baixos rendimentos.⁷⁴

Esquema 11 – Cianossililação de aldeídos.

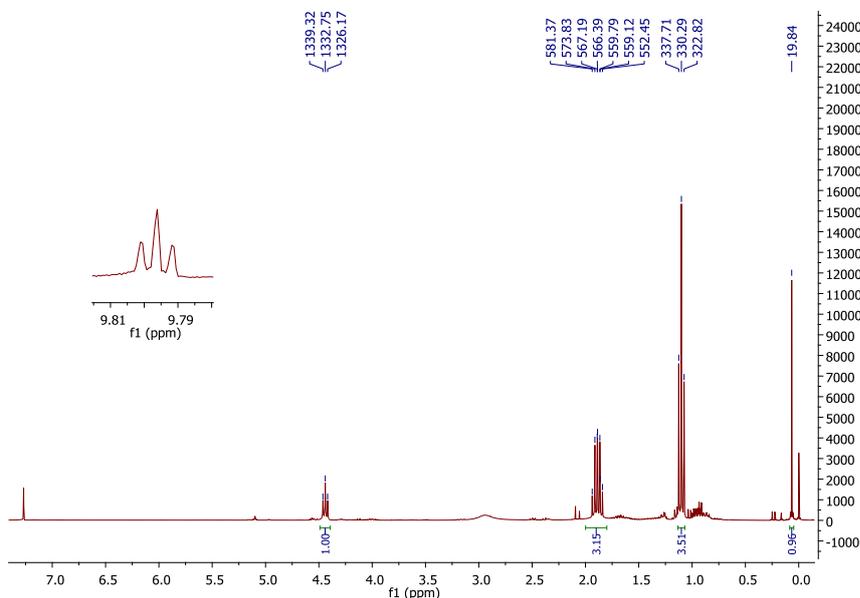


Uma das alternativas para contornar estes problemas é o uso de sais quaternários de amônio que têm sido reportados como organocatalisadores eficientes para as reações de cianossililação de aldeídos. As reações empregando esta base de Lewis são livre de metais e, na maioria das vezes, as reações ocorrem na ausência de solventes.^{74;77;78} Uma dificuldade na utilização destes sais quaternários de amônio como organocatalisadores reside no fato de que a maioria deles não está disponível comercialmente. Porém, Yeqian et al.⁷⁷ relataram a utilização do hidróxido de tetrametilamônio, disponível comercialmente, em solução aquosa com bons resultados.

Na síntese de **2** a reação foi iniciada com 0,0002 mol% de hidróxido de tetrametilamônio seguido pela adição de propanal **1** e, após homogeneização dos mesmos, adição de TMS-CN equimolar ao aldeído. Esta reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD), eluída com hexano/EtOAc 3:1 e revelada com ácido fosfomolibdico, fornecendo um produto cujo fator de retenção (R_F) foi de 0,24 enquanto o material de partida **1** apresentou R_F igual a 0,44. Análise de RMN de ^1H revelou que o produto obtido na reação

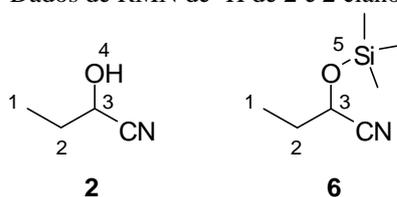
tratava-se de uma mistura dos compostos **2** e **6**, seu análogo sililado, como apresentado na Figura 13 e sumarizado na Tabela 2.

Figura 13 – Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do produto da reação de cianossililação.



Fonte: o autor.

Tabela 2 – Dados de RMN de ^1H de **2** e **2** cianossililado (**6**).



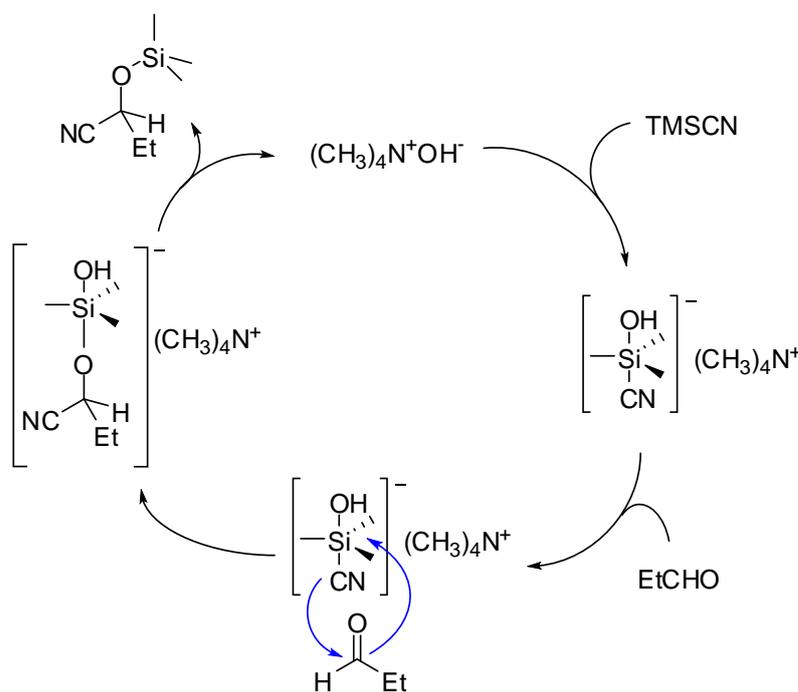
H	δ (ppm)	J (Hz)	Literatura para 2 ⁷⁵		Literatura para 6 ⁷⁹	
			δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	J (Hz)
1	1,10 (t)	7,4	1,15 (t)	7,5	0,89	7,5
2	2,00 – 1,80 (m)	-	1,90 – 1,84 (m)	-	1,67	-
3	4,44 (t)	6,6	4,42 (t)	6,6	4,23	n.i.
4	2,96 (sl)	-	-	-	-	-
5	0,07 (s)	-	-	-	0,06 (s)	-

O singlete com deslocamento químico de 0,07 ppm é referente às três metilas provenientes do grupo trimetilsilila do composto **6** enquanto o singlete largo com deslocamento químico de 2,96 ppm sugere a presença do hidrogênio da hidroxila da cianoidrina **2**. A questão da mistura de produtos foi facilmente solucionada, deixando-a sob

agitação com uma solução de HCl 2 mol L⁻¹ por 2 h. Contudo, o rendimento desta reação foi de 7%. Visando aumentar o rendimento várias condições reacionais foram avaliadas, explicadas a seguir.

Ao observar o mecanismo proposto por Yequian et al.⁷⁷ para esta reação, apresentado no Esquema 12, viu-se que a ordem de adição dos reagentes não era condizente com o mesmo. Entretanto, os artigos da literatura que relatam reações de cianossililação empregando-se sais quaternários de amônio como catalisador fazem o mesmo.^{74;78;80;81}

Esquema 12 – Mecanismo proposto por Yequian et al.⁷⁷ para reação de cianossililação de aldeídos.



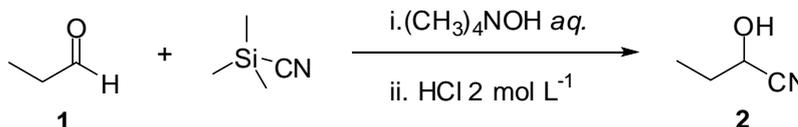
Fonte: Adaptado de Yequian et al.⁷⁷

O mecanismo sugere que, em princípio, seja formado um complexo entre o catalisador e o quaternário de amônio. Os intermediários penta e hexavalentes de silício são muito reativos, facilitando a transferência da nitrila por ataque nucleofílico à carbonila que, por sua vez, ataca o silício. A decomposição do intermediário pentavalente de silício leva ao produto cianossililado. Desta maneira, repetiu-se a reação com a ordem da proposta mecanística; catalisador e TMS-CN, seguido do aldeído (Tabela 3, entrada 2).

Outra alteração realizada foi no tempo de reação (Tabela 3, entrada 3). Foi verificado, por RMN de ¹H, que após 1 h de reação ainda restava material de partida que não foi detectado por CCD e por GC-FID. Por último, foram testadas outras proporções de reagentes, como sugerem outras metodologias de cianossililação com sais quaternários de amônio,

(Tabela 3, entrada 4 a 6). O aumento da quantidade de catalisador resultou em uma reação mais exotérmica e foi acompanhada pela diminuição do rendimento, devido a volatilização do composto **1**.

Tabela 3 – Síntese do composto **2** a partir de **1** com TMS-CN.

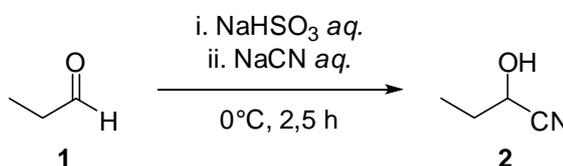


Entrada	Proporção aldeído/TMSCN	Catalisador (mol%)	Tempo (h)	Rendimento (%)
1	1:1	0,0002	1	7
2	1:1	0,0002	1	5
3	1:1	0,0002	24	13
4	1:1,2	0,0004	36	49
5	1:1,2	0,5	20	10
6	1:1,2	1,0	20	2

Fonte: o autor.

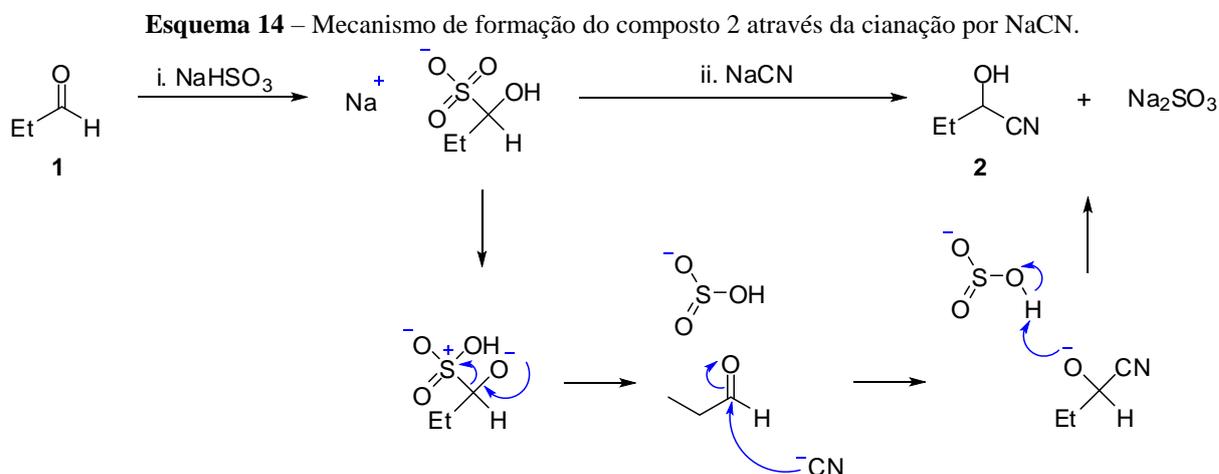
Mesmo com as tentativas de otimização, os rendimentos continuaram insatisfatórios. Por se tratar da primeira etapa da rota sintética optou-se por avaliar a reação clássica de formação de cianidrina, utilizando NaCN como doador de cianeto. A cianação de aldeídos leva diretamente à respectiva cianidrina, como apresentado no Esquema 13.

Esquema 13 – Cianação de **1** com NaCN para a síntese do composto **2**.



A adição de nitrila é, na realidade, um ataque nucleofílico do CN⁻ à carbonila. Porém, a taxa reacional pode ser aumentada pela adição de base, como demonstrado por Lapworth, em 1903, sendo um dos primeiros mecanismos orgânico conhecidos.⁸² Desta maneira, melhor que realizar a adição direta de cianeto a um aldeído ou cetona, é tratar o produto da adição de bissulfito com cianeto,⁸³ como sugerido no Esquema 14. Esta é uma reação em equilíbrio e,

para os aldeídos e cetonas alifáticos, o equilíbrio é deslocado para a direita. Por conseguinte, a reação é bastante viável.⁸³



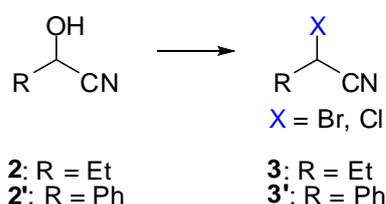
A metodologia sintética seguida foi proposta por Young, Buse e Heathcock.⁸⁴ Na primeira etapa, fez-se reagir o propanal com uma solução de bissulfito de sódio a 0 °C por 30 minutos, seguida pela adição de uma solução de cianeto de sódio a 0 °C, sob agitação, por 2 horas. Ao final, a mistura reacional foi extraída com acetato de etila. O extrato da reação foi purificado por cromatografia em sílica seca (DSC)⁸⁵ obtendo-se a cianidrina 2 com 70% de rendimento.

O composto 2 foi sintetizado na escala de alguns gramas, utilizando NaCN como doador de cianeto, a fim de se obter quantidade suficiente de material para prosseguir com os estudos propostos.

3.3 Síntese das α -halonitrilas 3 e 3'

Esta etapa visou à substituição da hidroxila por um melhor grupo abandonador como cloro ou bromo que seria posteriormente substituído por heterociclos nitrogenados.

Esquema 15 - Conversão das cianidrinhas 2 e 2' para as α -halonitrilas correspondentes.

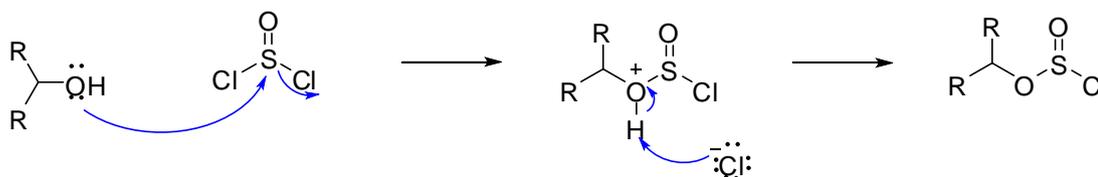


É extensamente reportado na literatura a halogenação de hidroxilas de álcoois. Porém o mesmo não ocorre com a hidroxila de cianidrinas.

α -Cloronitrilas são comumente sintetizadas por desidratação de α -cloroamidas, cloração de nitrilas ou cloração de cianidrinas. No entanto, tais metodologias nem sempre são satisfatórias como um método de preparação. Os dois primeiros requerem condições vigorosas de reação (temperatura elevada e uso de uma base forte). A cloração de cianidrinas é bastante satisfatória, porém são relatados casos de sucesso somente para a mandelonitrila.⁸⁶

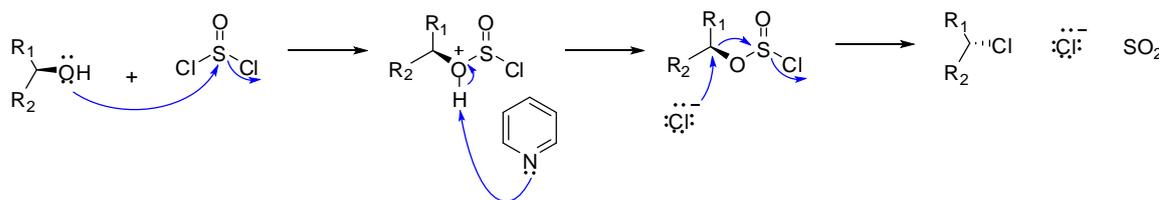
A reação de álcoois primários, secundários e terciários com cloreto de tionila leva a formação de um éster de clorosulfito intermediário (Esquema 16). O produto final dependerá das condições reacionais empregadas.^{87;88}

Esquema 16 – Mecanismo de formação do éster de clorosulfito.



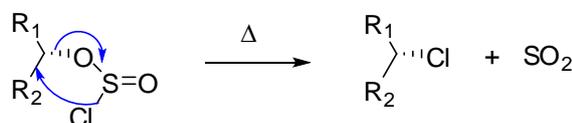
Quando há um excesso de cloreto de tionila ou quantidades aproximadamente equimolares de material de partida, cloreto de tionila e base, o ataque nucleofílico, via S_N2 , ocorre e o produto será o haleto de alquila com inversão da configuração (Esquema 17).^{87;88}

Esquema 17 – Mecanismo de formação do haleto de alquila.



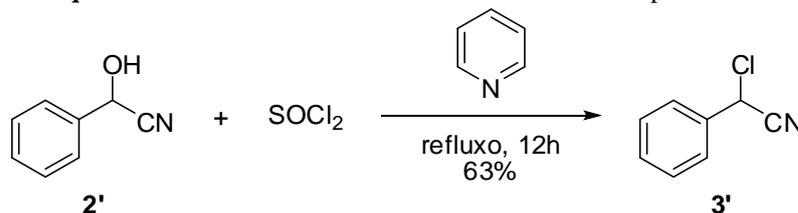
Se a reação é feita sem o uso de base, o mecanismo S_Ni ocorre e o produto possuirá a mesma configuração do álcool de partida, como representado no Esquema 18.^{87;88}

Esquema 18 – Mecanismo S_Ni , com retenção da configuração inicial.



Partimos da cloração da mandelonitrila **2'** com SOCl_2 (Esquema 19).⁸⁹ A reação foi realizada na presença de piridina e clorofórmio como solvente, sob refluxo, e monitorada por CCD (eluída com hexano/acetato 1:1, revelado em câmera de UV a 254 nm e R_F do produto de 0,38) e/ou GC-FID. Após 12 horas de reação observou-se 100% de conversão do material de partida. O produto foi purificado através de DSC. A 2-cloro-2-fenilacetoneitrila **3'** foi obtida com um rendimento de 63%, como um óleo amarelo. A análise de RMN de ^1H e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) confirmou a estrutura do produto.

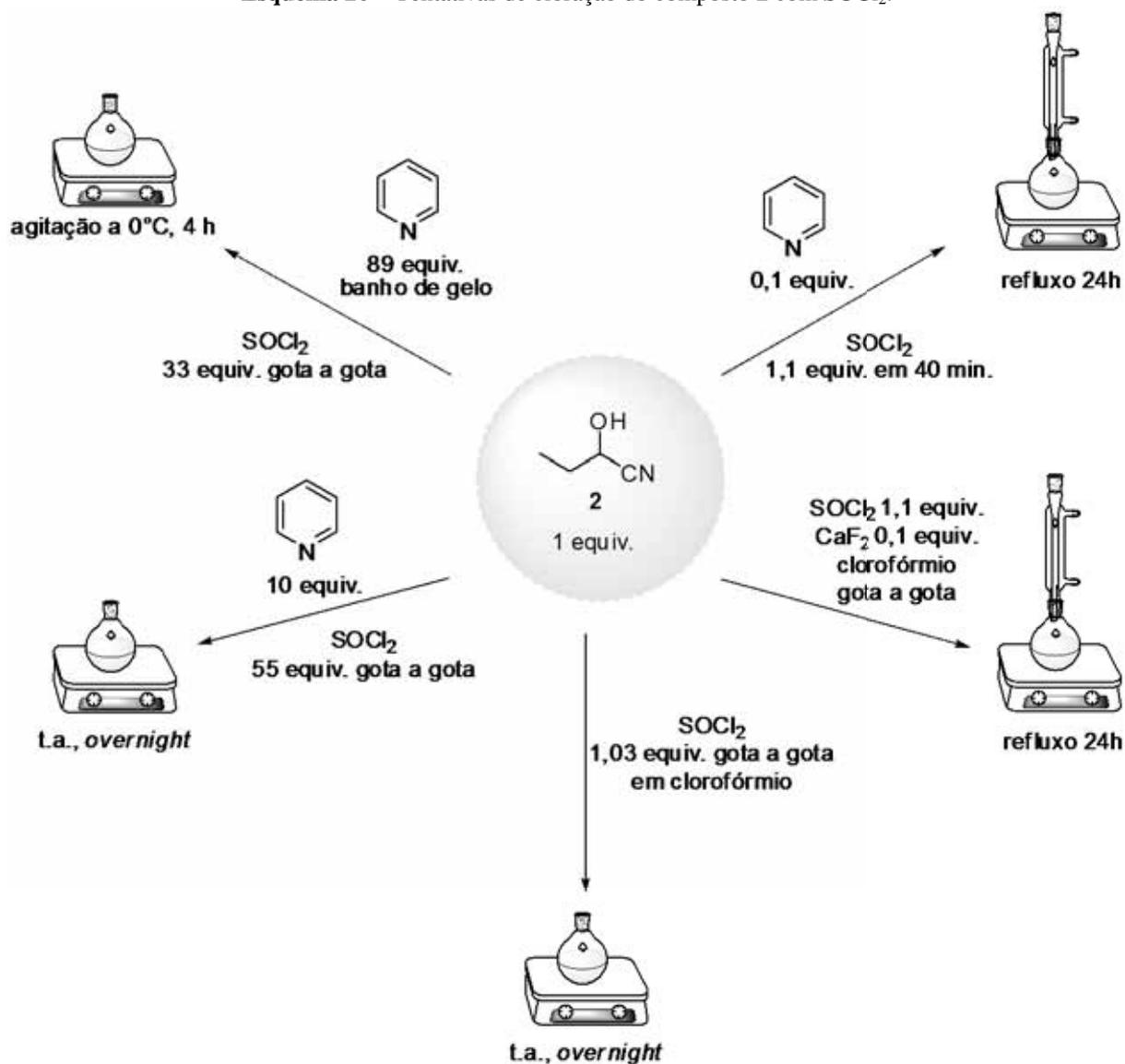
Esquema 19 – Síntese da 2-cloro-2-fenilacetoneitrila **3'** a partir de **2'**.



Entretanto, a reação de cloração do composto **2**, nas mesmas condições realizadas para o composto **2'**, não foi bem sucedida. Assim, cinco condições reacionais foram avaliadas para cloração de **2**, descritas como segue e sumarizadas no Esquema 20, porém todas sem sucesso.

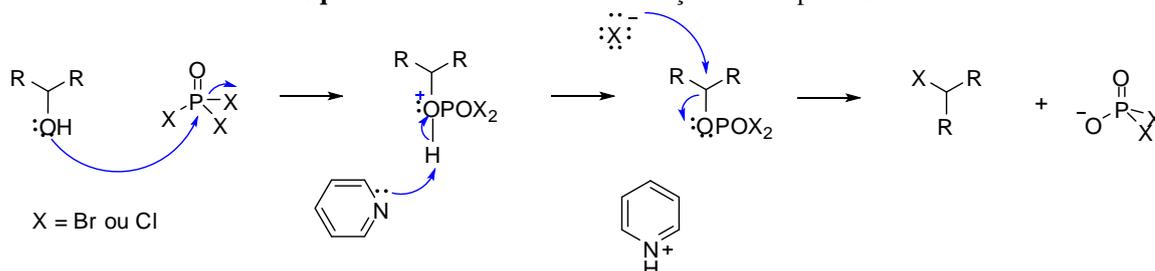
- I. Para 1 mmol de **2** foi adicionado piridina (10 mol%). À mistura foi acrescentado, durante 40 minutos, uma solução de SOCl_2 (1,1 mmol) em clorofórmio. A reação foi mantida sob agitação em refluxo por 24 h.⁹⁰
- II. 1 mmol de **2** foi dissolvido em 89 mmol de piridina e levado para banho de gelo. Atingido $0\text{ }^\circ\text{C}$, adicionou-se SOCl_2 (33 mmol) gota a gota. A mistura foi mantida sob agitação em banho de gelo por 4 h.⁹¹
- III. 1 mmol de **2** foi dissolvido em 10 mmol de piridina. Adicionou-se SOCl_2 (55 mmol) gota a gota. A mistura foi mantida sob agitação *overnight*.⁹²
- IV. À 1 mmol de **2** foi adicionado, em banho de gelo, uma solução de SOCl_2 (1,03 mmol) em clorofórmio, gota a gota. A mistura foi mantida sob agitação *overnight* a temperatura ambiente.⁹³
- V. Foi preparado uma solução contendo SOCl_2 (1,1 mmol) e CaF_2 (10 mol%) em clorofórmio. À solução, foi adicionado o composto **2** (1 mmol) gota a gota. A mistura foi mantida sob agitação a $70\text{ }^\circ\text{C}$ por 2h e, em seguida, levou-se para refluxo por 24 h.⁸⁹

Esquema 20 – Tentativas de cloração do composto 2 com SOCl₂.



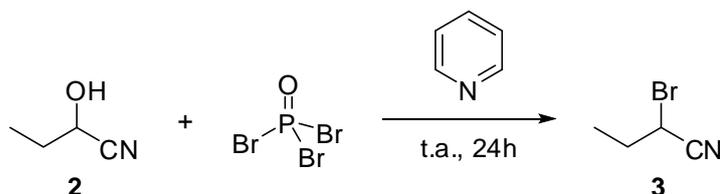
A tentativa seguinte consistiu na bromação do composto **2**, com brometo de fosforila. Já é relatado na literatura a cloração de **2'** com cloreto de fosforila.⁹⁴ O mecanismo para ambas as halogenações é o mesmo, como representado no Esquema 21 e, o bromo, é um abandonador ainda melhor que o cloro.

Esquema 21 - Mecanismo de formação do composto 3.



A síntese de **3** com brometo de fosforila foi realizada na presença de piridina e benzeno como solvente (Esquema 22). A reação foi monitorada por CCD e o produto formado caracterizado por GC-MS. O rendimento bruto desta reação foi de 22%.

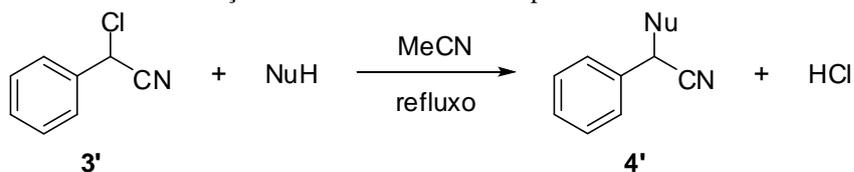
Esquema 22 - Síntese da 2-bromobutanonitrila, **3**.



Não foi realizada purificação em CCD preparativa, pois o produto da reação não foi revelado com os reveladores disponíveis no laboratório: ácido fosfomolibdico, anisalaldeído, Dragendorff, sulfato de cério e verde de bromocresol. Isso dificultaria até mesmo a purificação por DSC, pois todas as frações teriam que ser analisadas em GC-FID para verificar a presença de **3**. Porém, o rendimento isolado foi estimado em 15%, por comparação das áreas obtidas em análise por GC-FID.

3.4 Síntese dos derivados heterocíclicos

Já foi descrito na literatura uma metodologia para substituição de cloro por 1-metilpiperazina **d**.⁷³ Assim, iniciamos pela reação de substituição do cloro de **3'** pelos heterociclos propostos. O composto **3'** foi diluído em acetonitrila anidra, seguido da adição do respectivo heterociclo e aquecimento até refluxo. A proporção do material de partida e heterociclo foi de 1:3. As reações foram monitoradas por CCD e/ou GC-FID e os resultados para estas reações estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Substituição do átomo de cloro de **3'** por heterociclos nucleofílicos.

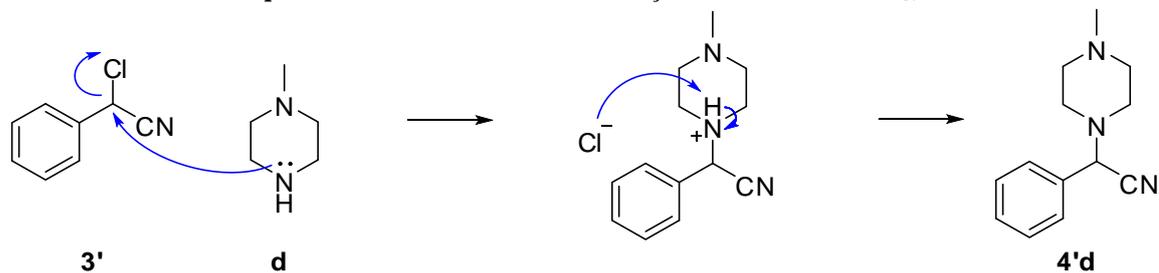
Nucleófilo	Tempo de reação (h)	Rendimento (%)
 a	60	-
 b	60	-
 c	24	27
 d	20	75

Fonte: o autor.

A substituição em **3'** pela piperazin-2-ona **c** e 1-metilpiperazina **d** como nucleófilos, levou aos compostos **4'c** e **4'd** com rendimentos de 27% e 75%, respectivamente, que foram devidamente caracterizados. Porém, com a pirrolidin-2-ona **a** e piperidin-2-ona **b** como nucleófilos não houve a substituição.

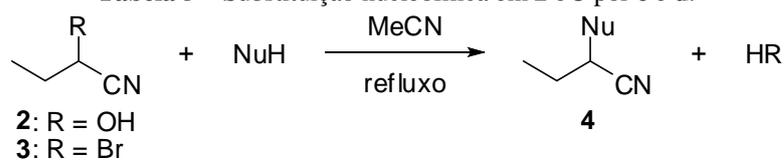
Tais resultados podem ser justificados pelo fato das aminas serem melhores nucleófilos comparado às amidas, devido à maior disponibilidade do par de elétrons não ligante do nitrogênio. O mecanismo da reação está apresentado no Esquema 23. Na reação com **c**, a substituição procedeu através da amina devido sua maior força nucleofílica.

Esquema 23 – Mecanismo de substituição do cloro 3' de via S_N2.



Para o correspondente alifático **3**, foi utilizado a mesma metodologia para a substituição por **d**. Mas, como o rendimento para sua síntese, na etapa anterior, foi baixo (22%), avaliou-se, também, a substituição direta de **2** pelos heterociclos **c** e **d**, conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 – Substituição nucleofílica em **2** e **3** por **c** e **d**.



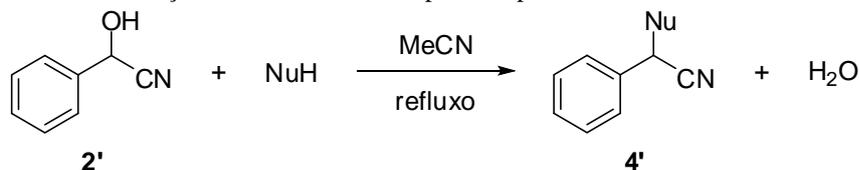
Nitrila	Nucleófilo	Tempo de reação (h)	Rendimento (%)
2	c	5	20
2	d	8	38
3	d	10	59

Fonte: o autor.

As duas reações com **d** levaram ao mesmo produto final, a 2-(4-metilpiperazin-1-il)butanonitrila, **4d**, cujas estruturas foram confirmadas por RMN de ¹H, ¹³C e experimento DEPT-135. A reação do composto **2** com **c** também levou ao 2-(3-oxipiperazin-1-il)butanonitrila, **4c**, confirmada por RMN de ¹H, ¹³C e experimento DEPT-135. Isso sugere que a halogenação de **2**, para a obtenção de **4c** e **4d**, não é necessária para realizar a substituição da hidroxila de **2** pela piperazin-2-ona e 1-metilpiperazina.

A mesma reação foi feita com **2'**, a fim de verificar se a substituição direta da hidroxila em compostos α-aromáticos também ocorreria.

Tabela 6 – Substituição da hidroxila do composto 3' pelos heterociclos nucleofílicos c e d.



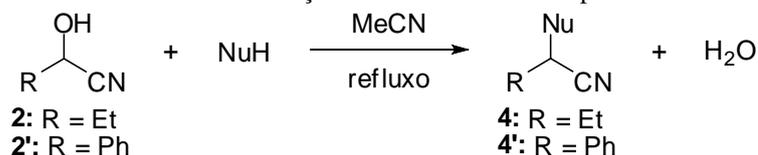
Nucleófilo	Tempo de reação (h)	Rendimento (%)
c	24	22
d	20	71

Fonte: o autor.

A reação de substituição direta da hidroxila de 2' por c e d ocorreu tal como em 2. Os rendimentos para a substituição direta são levemente inferiores que a substituição pelo cloro, o que evidencia o fato deste ser um melhor abandonador.

Assim, os compostos 4c, 4'c, 4d e 4'd foram devidamente sintetizados, restando os compostos 4a, 4'a, 4b e 4'b. Testou-se a reação de substituição direta de 2 e 2' pelos heterociclos pirrolidin-2-ona e piperidin-2-ona, conforme mostrado na Tabela 7, mas não foi observada a reação de substituição em nenhuma das condições testadas.

Tabela 7 – Substituição da hidroxila de 2 e 2' por a e b.



Composto	Nucleófilo	Tempo de reação (h)	Rendimento (%)
2	a	20	-
2	b	20	-
2'	a	20	-
2'	b	20	-
3	a	20	-

Fonte: o autor.

Não ocorreu a substituição em nenhuma das reações acima testadas. Como para a síntese 4c, 4'c, 4d e 4'd não seria mais necessário a síntese de 3 e 3', a bromação de 2 apresentou baixo rendimento e com dificuldades para a purificação; buscamos metodologias de substituição direta de hidroxilas por lactamas.

Jenner⁹⁵ reportou a *N*-alquilação de amidas e lactamas por álcoois (primários, secundários e terciários), através dos catalisadores de rutênio RuCl₃.xH₂O e Ru₃(CO)₁₂ na presença do indutor básico tributilfosfina. Nishibayashi⁹⁶ realizou a substituição da hidroxila do 1-fenilprop-2-in-1-ol por diversos nucleófilos, inclusive a pirrolidin-2-ona **a**, com os catalisadores [Cp*RuCl(μ₂-SeMe)₂], [Cp*RuCl(μ₂-SeMe)₂RuCp*(OH₂)]OTf, [Cp*RuCl(μ₂-TeMe)₂] e [Cp*RuCl(μ₂-TeMe)₂-RuCp*(OH₂)]OTf, sendo Cp = η⁵-C₅Me₅ e OTf = OSO₂CF₃. Desta forma, foram avaliadas metodologias para a substituição direta da hidroxila em **2** e **2'** pelos heterociclos utilizando-se catalisador de rutênio RuCl₃.xH₂O (3,5 mol%) sob pressão maior que 1 atm (reações em autoclave a 150 °C).

O primeiro experimento teste foi realizado com **2** e **a** como nucleófilo. Após 12 horas de reação obteve-se um óleo marrom viscoso que foi lavado com água básica (pH 10) e purificado por TLC preparativa, fornecendo o produto **4a** que foi caracterizado por RMN de ¹H, ¹³C e experimento DEPT-135. Em seguida, esta reação foi repetida com **2'** e **a**, para formar o produto **4'a**, além de **b** com **2** e **2'**; para formar os compostos **4b** e **4'b**. Estes resultados estão sumarizados na Tabela 8.

Tabela 8 – Substituição da hidroxila de **2** e **2'** por **a** e **b**, na presença de rutênio.

$$\begin{array}{c}
 \text{OH} \\
 | \\
 \text{R}-\text{C}-\text{CN} \\
 \text{2: R = Et} \\
 \text{2': R = Ph}
 \end{array}
 + \text{NuH}
 \xrightarrow[150^\circ\text{C, 12h}]{\text{RuCl}_3}
 \begin{array}{c}
 \text{Nu} \\
 | \\
 \text{R}-\text{C}-\text{CN} \\
 \text{4: R = Et} \\
 \text{4': R = Ph}
 \end{array}
 + \text{H}_2\text{O}$$

Composto	Nucleófilo	Tempo de reação (h)	Rendimento (%)
2	a	12	38
2	b	12	39
2'	a	12	42
2'	b	12	45

Fonte: o autor.

Todos os produtos foram devidamente caracterizados. Então, repetiu-se a síntese destes, a fim de se obter quantidade de material para prosseguir com o trabalho. Apesar dos rendimentos moderados, foi possível obter todas as nitrilas α-substituídas com os *N*-heterociclos de interesse em uma substituição nucleofílica direta a partir das cianidrinhas **2** e **2'**. Esta estratégia reduziu em uma etapa a rota sintética inicialmente proposta, o que levou a um melhor rendimento global.

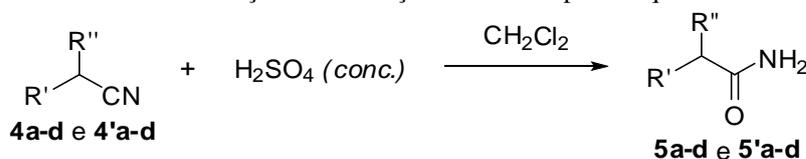
3.5 Síntese das amidas racêmicas

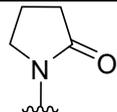
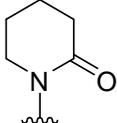
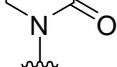
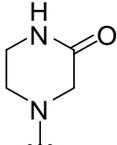
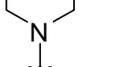
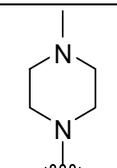
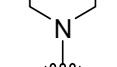
Nesta etapa buscou-se a síntese das respectivas amidas racêmicas, visando à obtenção dos padrões para as determinações da enantiosseletividade das reações biocatalisadas por NHases. Além disso, as amidas recém sintetizadas foram utilizadas como padrões para o monitoramento das reações de Biocatálise por GC-FID.

Para a síntese das amidas, utilizou-se a metodologia proposta por González-Vera, García-López e Herranz⁹⁷ para a hidratação de α -amino-nitrilas. Desta maneira, a nitrila é dissolvida em CH_2Cl_2 , adiciona-se H_2SO_4 concentrado (30 equivalentes) e a reação é mantida sob agitação a temperatura ambiente. Ao final, o excesso de ácido foi neutralizado com NaOH e se procede a extração com acetato de etila.

A benzonitrila foi utilizada como reação modelo, que levou 22 h e apresentou 67% de rendimento, acompanhada por comparação com o padrão autêntico em GC-FID. Desta maneira, procederam-se as demais reações, como sumarizado na Tabela 9.

Tabela 9 – Reação de hidratação das nitrilas por via química.



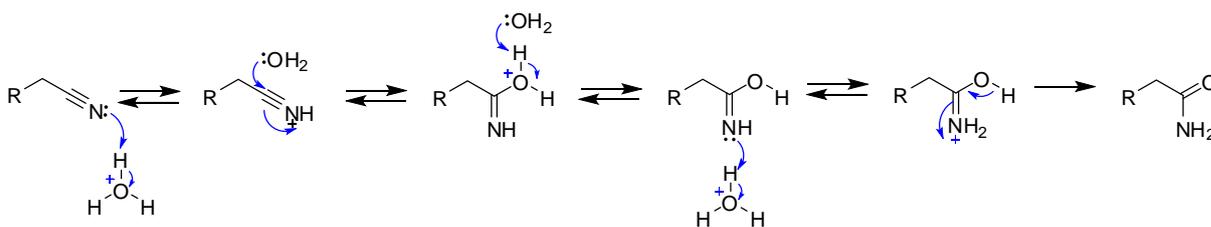
Composto	R'	R''	Tempo (h)	Rendimento (%)
4a	Et		4	80
4'a	Ph		20	96
4b	Et		60	21
4'b	Ph		60	58
4c	Et		60	-
4'c	Ph		60	-
4d	Et		22	28
4'd	Ph		23	85

Não foi necessária a purificação do produto de nenhuma reação, pois a análise em GC-FID revelou que só havia um produto formado e não restou material de partida em nenhuma

reação. Todos os produtos tiveram sua estrutura confirmada por técnicas espectroscópicas (RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e IV) e espectrometria de massas.

A reação é uma hidratação da nitrila. Um excesso de água poderia levar ao ácido carboxílico correspondente. Mas, o uso do ácido sulfúrico concentrado garantiu o meio fortemente ácido para protonação da nitrila, ao mesmo tempo que não apresentou excesso de água. O mecanismo proposto para a reação está ilustrado no Esquema 24.

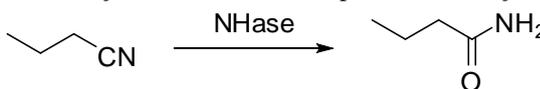
Esquema 24 - Mecanismo de hidratação das nitrilas para amidas com catálise ácida.



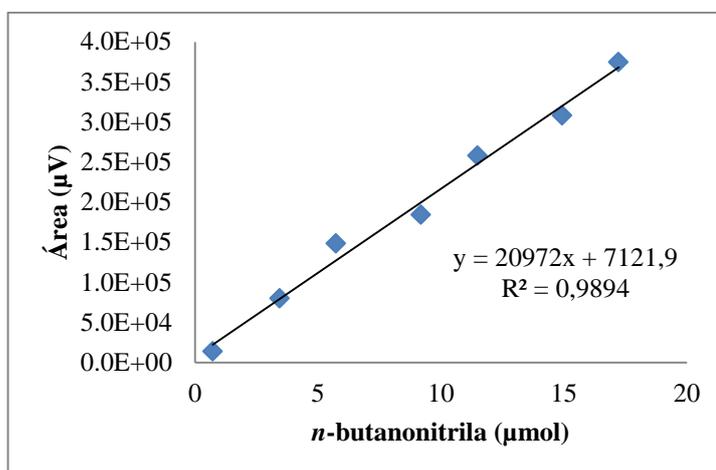
Apenas as nitrilas **4c** e **4'c** não levaram a formação das amidas correspondentes. Estas são insolúveis no meio reacional e, mesmo realizando a reação na presença de DMSO como co-solvente, não houve a formação de produto.

3.6 Medida da atividade enzimática das nitrila hidratases, EC 4.2.1.84 NHases

Uma coleção de 22 nitrila hidratases, sendo 02 enzimas imobilizadas em CLEA (Cross-Linked Enzymes Aggregates) e 20 em suas formas livre em suspensão de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, foram obtidas junto à empresa Prozomix Limited e avaliadas nesta etapa inicial de triagem dos biocatalisadores. A atividade enzimática foi verificada frente à *n*-butanonitrila, onde foi monitorado o consumo de material de partida através da curva analítica apresentada na Tabela 10 e Figura 14.

Tabela 10 – Dados para a construção da curva analítica para determinação da atividade das NHases.

Ponto	<i>n</i> -Butanonitrila (μmol)	Área (uV)
1	0,72	13571,4
2	3,45	79624,8
3	5,74	148380,8
4	9,19	184227,9
5	11,49	257680,0
6	14,93	307844,2
7	17,23	374529,9

Figura 14 – Curva analítica do consumo de *n*-butanonitrila monitorada por GC-FID.

Como a curva analítica apresentou coeficiente de correlação (R^2) de aproximadamente 0,99, a equação da reta apresentou um bom ajuste e pode ser utilizada para os cálculos de atividade. Os testes foram realizados em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,00 à 25 °C e 1000 rpm e 5 μL de solução enzimática e 1 mg de *n*-butanonitrila como substrato. A *n*-butanonitrila por se tratar do esqueleto dos substratos alifáticos de interesse neste trabalho. Ao tampão foi adicionado solução de elementos traços contendo Co(III) e Fe(III). A reação foi interrompida após 1 minuto pela adição de acetato de etila e a fase orgânica foi analisada em GC-FID.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de butanamida formada, a partir da *n*-butanonitrila, por minuto, por mililitro de solução enzimática, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,00, à 25 °C. Os dados obtidos são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Cálculo da unidade de atividade enzimática de NHases frente à *n*-butanonitrila.

Enzima	Área	<i>n</i> -Butanonitrila (μmol)			U/mL
		Adicionado	Residual	Consumido	
PRO-E256	218303,6	14,48	10,07	4,41	881
PRO-E257	255085,7	14,48	11,82	2,65	530
PRO-E258	252662,5	14,48	11,71	2,77	554
PRO-E259	238693,4	14,48	11,04	3,43	687
PRO-001	113754,2	14,48	5,08	9,39	1878
PRO-002	263478,0	14,48	12,22	2,25	450
PRO-003	237224,7	14,48	10,97	3,50	701
PRO-004	336021,7	14,48	14,47	0,01	1
PRO-007	299096,1	14,48	13,92	0,55	111
PRO-008	95574,5	14,48	4,22	10,26	2052
PRO-009	170391,9	14,48	7,79	6,69	1338
PRO-010	309282,4	14,48	14,41	0,07	14
PRO-011	279036,8	14,48	12,97	1,51	302
PRO-012	262817,1	14,48	14,46	0,02	3
PRO-013	254737,8	14,48	11,81	2,67	534
PRO-014	322431,4	14,48	14,47	0,01	1
PRO-015	274248,5	14,48	12,74	1,74	348
PRO-016	264222,3	14,48	12,26	2,22	443
PRO-017	280983,8	14,48	13,06	1,42	284
PRO-018	173,2	14,48	0,00	14,48	>2895*
PRO-CLEA02	268550,8	14,48	12,47	2,01	402
PRO-CLEA03	284870,9	14,48	13,24	1,23	246

*A área de *n*-butanonitrila obtida para a enzima PRO-NHASE (018) estava próxima ao erro do GC-FID.

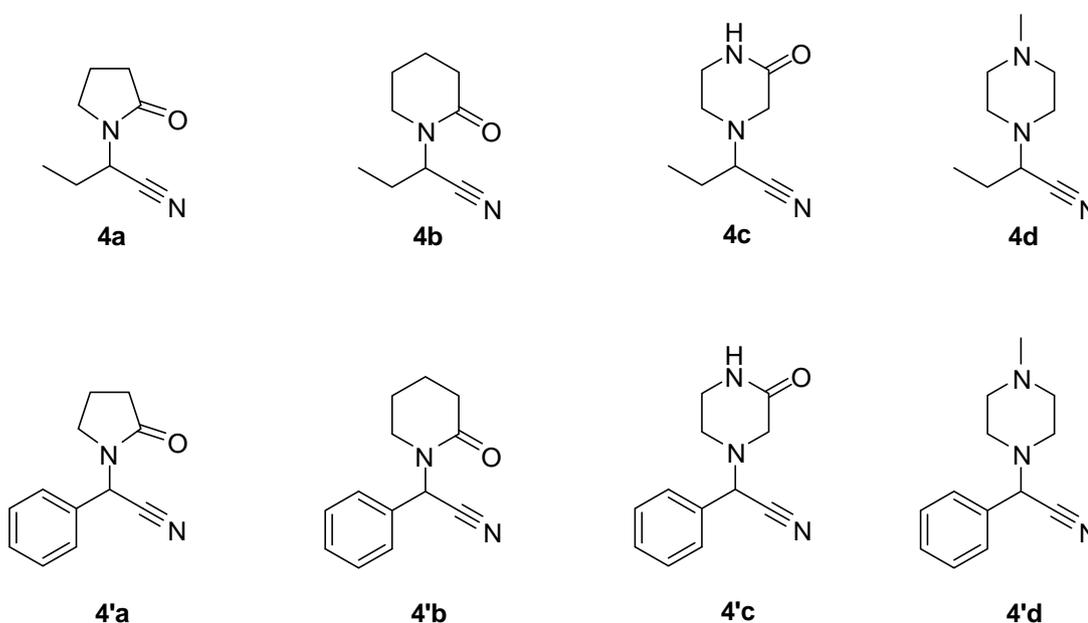
Houve uma grande variação de afinidade das NHases pela *n*-butanonitrila. Mesmo assim, todas as enzimas apresentaram atividade para o substrato testado. Mesmo para as NHases PRO-004, PRO-012 e PRO-014 que apresentaram baixa atividade, foi possível observar uma pequena quantidade de butanamida por GC-FID.

Desta maneira, foi verificado que todas as NHases apresentam atividade catalítica nas condições de pH, temperatura e agitação utilizadas. Assim, a não conversão de alguma das nitrilas sintetizadas (**4a-d** e **4'a-d**) tratar-se-á de uma questão de afinidade pelo substrato.

3.7 Reações de biocatálise utilizando nitrila hidratases em meio aquoso tamponado

As reações iniciais de Biocatálise foram realizadas em meio aquoso (tampão $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,00), na presença de 0,5 mg de substrato (**4a-d** e **4'a-d**, Figura 15), 1 mL de tampão e 10 μL de solução enzimática que permaneceu sob agitação por 48 h à 25 °C e 1000 rpm. Além disso, realizou-se um experimento branco onde as condições reacionais foram reproduzidas, porém na ausência da solução enzimática. As reações foram interrompidas pela adição de acetato de etila e a fase orgânica foi analisada por GC-FID, para determinação da conversão, e por HPLC-DAD-CD; para o excesso enantiomérico.

Figura 15 – Substratos sintetizados neste trabalho e empregados nas reações de catálise enzimática.

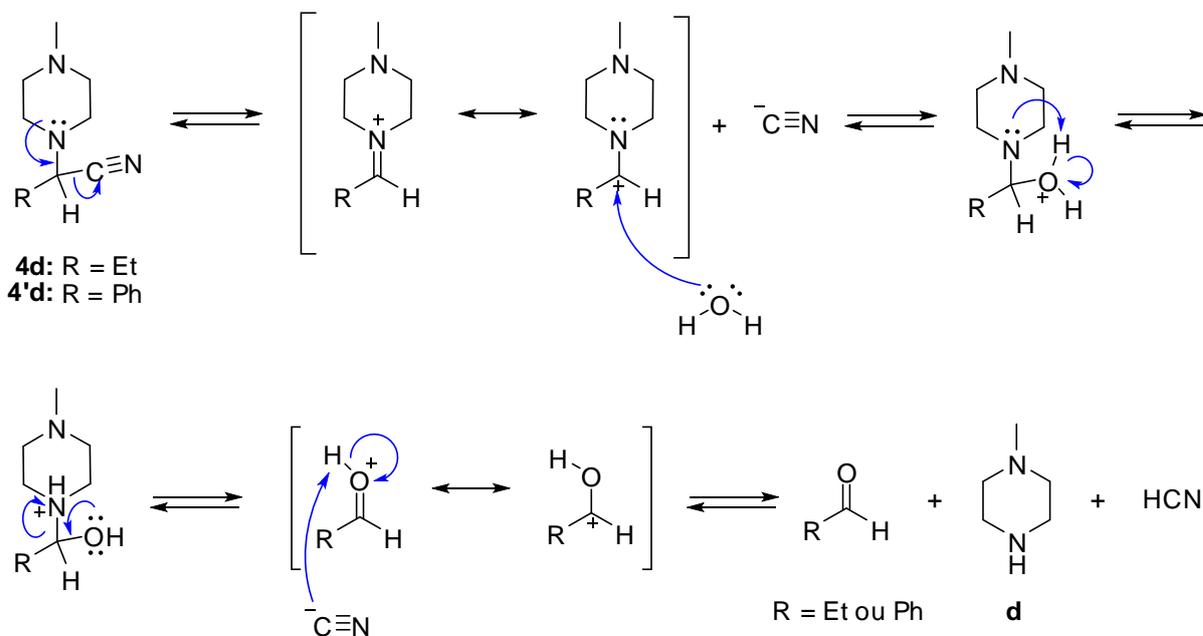


A primeira observação realizada foi que não houve a formação das amidas **5c-d** e **5'c-d** através da hidratação por NHases de **4c-d** e **4'c-d**, visto que estes substratos sofreram rápida decomposição em meio aquoso. Nas reações controle (experimento branco) para os substratos **4c-d**, houve a formação de propanal **1** e do *N*-heterociclo, com grau de decomposição de 54 e 92%, respectivamente. Já os substratos aromáticos **4'c** e **4'd** degradaram para benzaldeído e o *N*-heterociclo, com grau de hidrólise de 31 e 54%.

Wang et al.⁹⁸ relataram o mesmo problema na hidratação de 2-(metilamino)-2-fenilacetoneitrila por NHases, onde várias alterações de pH da solução tampão, temperatura e concentração do substrato foram feitas sem êxito. Embora não ocorra decomposição total dos substratos, a quantidade remanescente não foi convertida para a respectiva amida. Yasukawa,

Hasemi e Asano⁹⁹ afirmam que α -aminonitrilas sofrem degradação espontânea por reação de retro-Strecker em meio aquoso. Tal reação leva a formação de aldeído e cianeto que, por sua vez, é um forte inibidor de NHases.

Esquema 25 – Mecanismo retro-Strecker de degradação de α -aminonitrilas em meio aquoso.



Os demais substratos, por sua vez, se tratam de lactamas em posição α -nitrilas. Acredita-se que por as lactamas serem menos básicas a decomposição não ocorre, ou seja, o ataque do par de elétrons do nitrogênio no carbono assimétrico. As reações com estes substratos estão apresentadas no Esquema 26 e os dados obtidos para estes quatro substratos estão sumarizados na Tabela 12.

Esquema 26 – Reações de catálise enzimática por NHase com os substratos **4a**, **4b**, **4'a** e **4'b**.

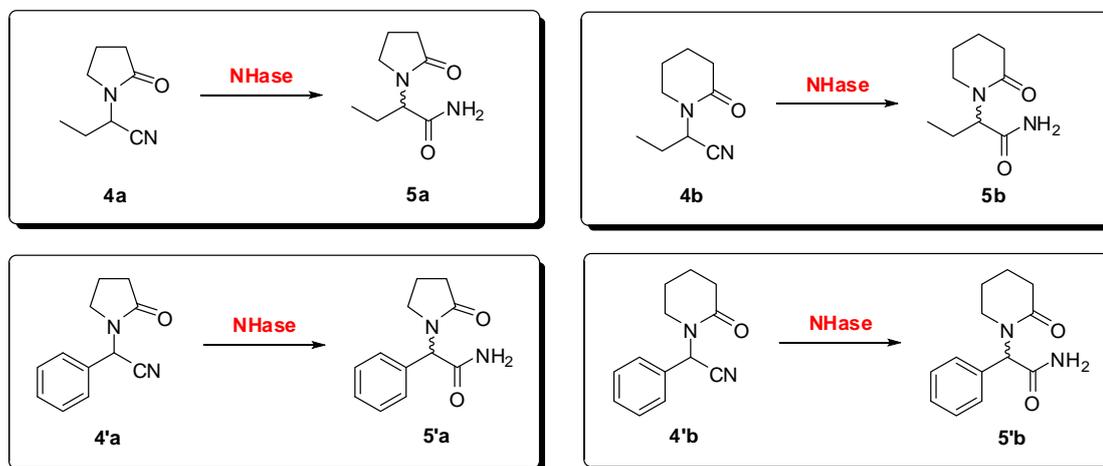
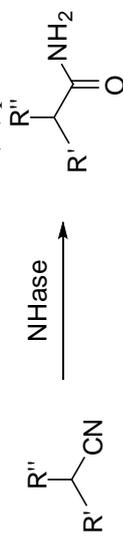


Tabela 12 – Conversão dos substratos 4a-b e 4'a-b e excessos enantioméricos (ee) para as respectivas amidas 5a-b e 5'a-b por NHases.



Enzima	Tipo	4a*		4b		4'a		4'b	
		Conversão (%)	ee (%)	Conversão (%)	ee (%)	Conversão (%)	ee (%)	Conversão (%)	ee (%)
PRO-E256	Fe	-	-	-	-	-	-	-	-
PRO-E257	Co	0,3	-	0,7	n.d.	5,2	0,7 (d)	2,2	5,2 (d)
PRO-E258	Co	0,6	-	1,2	n.d.	10,4	2,4 (d)	5,4	7,0 (d)
PRO-E259	Co	0,9	17,5 (l)	4,8	n.d.	4,7	1,2 (d)	0,9	-
PRO-001	Fe	-	-	0,2	n.d.	-	-	-	-
PRO-002	Co	0,4	-	1,9	n.d.	28,0	3,9 (d)	8,6	14,7 (d)
PRO-003	Co	-	-	1,1	n.d.	5,2	4,3 (d)	2,9	14,5 (d)
PRO-004	Co	0,4	-	1,1	n.d.	2,4	n.d.	2,3	n.d.
PRO-007	Co	-	-	0,3	n.d.	1,4	n.d.	-	-
PRO-008	Co	-	-	0,3	n.d.	1,2	n.d.	-	-
PRO-009	Fe	-	-	-	-	-	-	-	-
PRO-010	Co	-	1,8 (l)	42,0	n.d.	-	-	-	-
PRO-011	Co	3,1	20,6 (l)	14,2	7,9 (l)	13,5	4,9 (d)	13,4	-
PRO-012	Fe	-	-	-	-	-	-	-	-
PRO-013	Co	0,9	38,9 (l)	5,0	n.d.	3,3	2,4 (d)	4,1	n.d.
PRO-014	Co	1,2	n.d.	2,4	n.d.	14,9	8,0 (d)	18,0	3,7 (l)
PRO-015	Co	20,7	52,3 (l)	91,9	13,7 (l)	35,9	9,6 (d)	47,5	51,2 (d)
PRO-016	Co	-	n.d.	0,4	-	3,8	n.d.	2,1	n.d.
PRO-017	Co	-	n.d.	0,5	-	6,4	4,5 (d)	2,4	17,3 (d)
PRO-018	Co	6,8	0,4 (l)	5,6	n.d.	0,5	n.d.	1,9	n.d.
PRO-CLEA02	n.i	-	-	-	-	0,9	n.d.	0,7	n.d.
PRO-CLEA03	n.i	-	n.d.	0,2	-	10,1	3,8 (d)	4,6	9,3 (l)

*Reação na presença de *n*-butanamida.

n.d. = não determinado.

n.i. = não informado.

O substrato **4a** leva a amida **5a**; o LEV. A atividade anticonvulsivante está relacionada ao enantiômero levógiro, com configuração (*S*). As amidas **5'a**, **5b** e **5'b** não possuem configurações determinadas e estão denominadas por dextrógiros e levógiros.

Dentre as vinte enzimas livres utilizadas, apenas quatro eram dependentes de ferro; PRO-E256, PRO-001, PRO-009 e PRO-012. Destas, apenas a PRO-001 exibiu uma modesta conversão para o substrato **4b**. Porém, no ensaio de atividade, as enzimas PRO-E256, PRO-001 e PRO-009 apresentaram valores altos de atividade para o substrato *n*-butanonitrila e, embora PRO-012 tenha apresentado um baixo valor, revelou-se seletiva para o substrato. Os resultados obtidos vão de encontro com informações da literatura que afirmam que as NHases-Fe possuem afinidade por nitrilas alifáticas pequenas⁵⁸ pois, a presença do *N*-heterociclo α -substituído de **4a** e **4b**, já foram suficientes para impedir a afinidade das quatro NHases-Fe por estes substratos.

Alguns autores também relacionam a afinidade de NHases-Co por substratos aromáticos. Esta relação não foi diretamente observada neste trabalho, pois 11 NHases-Co (PRO-E257, PRO-E258, PRO-E259, PRO-002, PRO-003, PRO-004, PRO-011, PRO-013, PRO-014, PRO-015 e PRO-018), converteram os quatro substratos. Porém, dentre as 11 NHases-Co, 7 apresentaram maiores conversões para os substratos aromáticos.

A enzima PRO-015 apresentou o melhor desempenho para a conversão de todas as nitrilas em amidas, seguidas pela PRO-011, PRO-013 e PRO-018. A enzima PRO-010 foi seletiva para os substratos alifáticos, enquanto as imobilizadas PRO-CLEA02 e PRO-CLEA03; para os substratos aromáticos.

Os substratos alifáticos e aromáticos diferem entre si pelo aumento de um carbono no anel lactâmico. As conversões de **4a** formam superiores a **4b**, assim como as de **4'a** em relação a **4'b**. Isso sugere que substratos menores são melhores ancorados no sítio ativo das NHases deste trabalho.

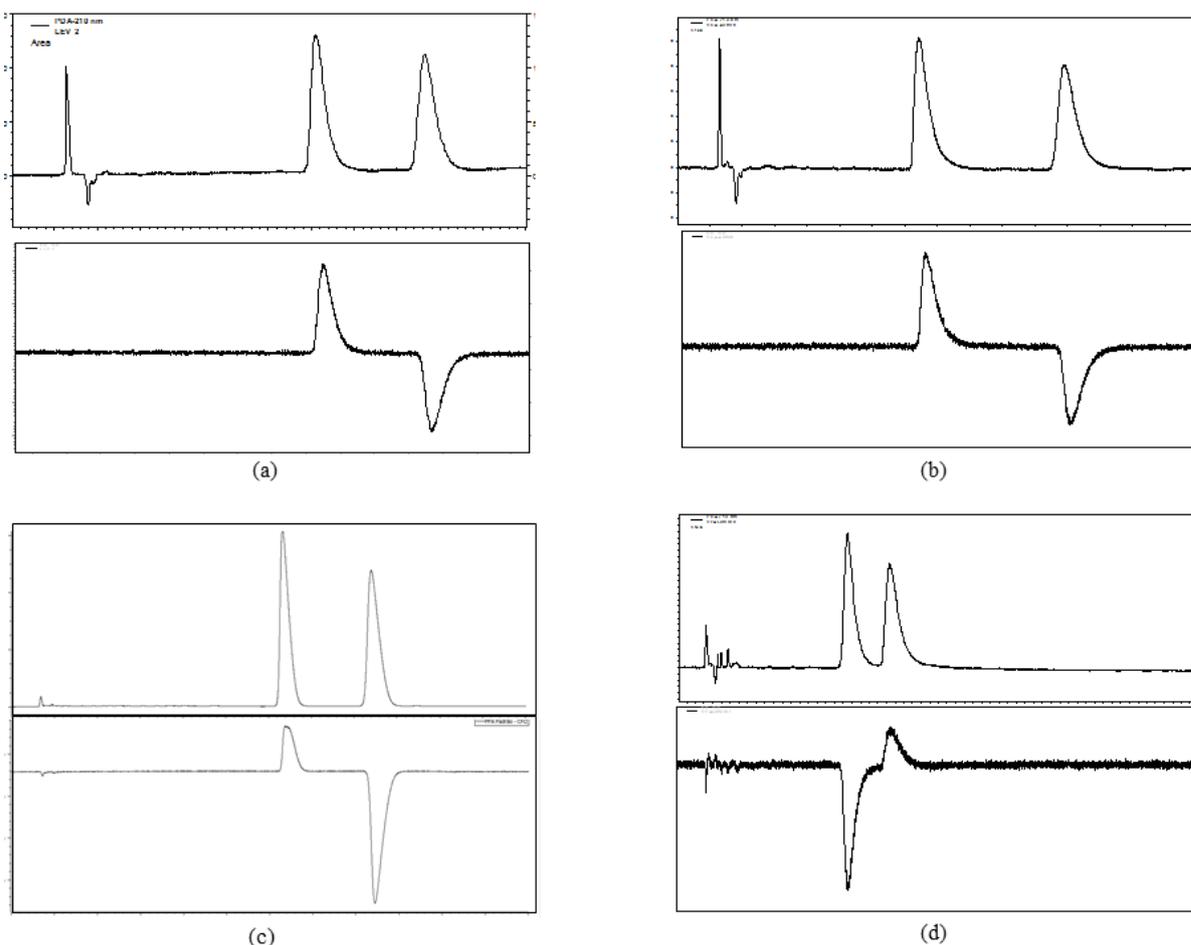
Para o substrato **4a** também foi realizado um teste de inibição enzimática empregando a *n*-butanamida como inibidor. Desta maneira, o mesmo procedimento foi realizado, mas, junto ao meio reacional, foram adicionados 0,5 mg de *n*-butanamida. Pelos dados acima expostos, observou-se que adição de *n*-butanamida na reação causa inibição enzimática desde parcial até total.

Nenhuma enzima apresentou enantiosseletividade, com o melhor *ee* de 52% (*l*) e 51% (*d*) para a enzima PRO-015 e os substratos **4a** e **4'b**, respectivamente. Tal perfil de enantiosseletividade das NHases vão de encontro com a literatura, onde esta característica é

apontada como um limitante para uma aplicação ainda maior dessas enzimas na prática. Algumas NHases enantiosseletivas são reportadas mas, a maioria, foram expressas em *E. coli*, seguida de modificações, além disso um limitado número de substratos são relatados.⁵⁷ Ainda que com baixa enantiosseletividade, existe uma clara preferência por substratos alifáticos levógiros e substratos aromáticos dextrógiros.

Os excessos enantioméricos foram determinados por HPLC-PDA-CD. Para as amidas **5a**, **5b** e **5'b** foi utilizando a coluna quiral Chiralcel OD-H (250 x 4,6 mm, 5 µm) e, para a amida **5'a**; a coluna Chiralcel IC (250 x 4,6 mm, 5 µm), ambas em fase normal. As separações dos padrões racêmicos de **5a-b** e **5'a-b** estão apresentadas a seguir.

Figura 16 – Cromatogramas (HPLC-PDA-CD) obtidos para as misturas racêmicas de (a) **5a**, (b) **5b**, (c) **5'a** e (d) **5'b**.



Fonte: o autor.

Muitas reações de catálise enzimática, utilizando células inteiras contendo NHases, utilizam temperaturas baixas (5 – 10 °C). Por isso, realizamos reações com NHase PRO-015 nas mesmas condições já descritas, porém a 15 °C, utilizando os quatro substratos que não

sofreram decomposição em meio aquoso. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 13, juntamente aos resultados das reações a 25 °C.

Tabela 13 - Conversão dos substratos **4a-b** e **4'a-b** para as respectivas amidas **5a-b** e **5'a-b** por NHase PRO-015 a 15 °C.

Substrato	Conversão (%)	
	15 °C	25 °C
4a	5,5	91,9
4b	0,5	8,4
4'a	8,0	35,9
4'b	4,5	47,5

Fonte: o autor.

Um abaixamento de 10 °C na temperatura de reação causou uma grande diminuição na atividade da NHase PRO-015, frente aos substratos. Pode ter ocorrido uma diminuição da cinética da reação, devido ao menor grau de agitação molecular ou, até mesmo, alterações na estrutura tridimensional da enzima. Contudo, o efeito do abaixamento da temperatura foi negativo para a NHase PRO-15 e, assim, não foram testadas temperaturas mais baixas, como no caso das células.

3.8 Síntese dos líquidos iônicos

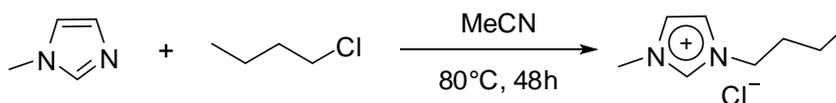
Foram utilizados três líquidos iônicos como meio reacional das reações de Biocatálise para uma tentativa de melhora nos rendimentos e/ou enantiosseletividade. Uma limitação ainda presente na utilização dos LIs reside no seu custo; em torno de 800 vezes maior que os solventes orgânicos convencionais.⁶⁰

Desta maneira, os LIs selecionados foram preparados em laboratório. A síntese destes se inicia com a preparação do precursor cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio para a formação do cátion BMIM⁺. As etapas seguintes consistiram na obtenção dos líquidos iônicos selecionados, a partir da metátese do íon Cl⁻ pelos três íons de interesse: BF₄⁻, PF₆⁻ e NTf₂⁻.

3.8.1 Síntese do cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (BMIM.Cl)

A síntese foi realizada pela reação sob refluxo de clorobutano e 1-metilimidazol (3:2), em acetonitrila, não ultrapassando 80 °C, por 48 h,¹⁰⁰ como no Esquema 27.

Esquema 27 – Síntese do LI precursor BMIM.Cl.

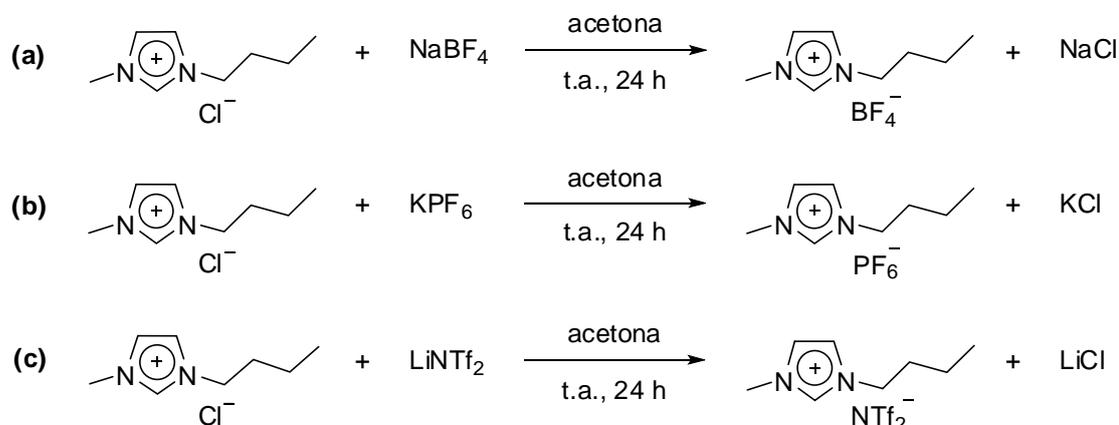


Ao final, a acetonitrila foi eliminada sob pressão reduzida, obtendo-se um óleo amarelo. Este óleo foi então redissolvido em acetonitrila e adicionado, gota a gota, para um balão contendo acetato de etila, sob atmosfera inerte de N₂ e agitação magnética. Imediatamente inicia-se a cristalização do BMIM.Cl e, após adição de toda a solução em acetonitrila, o sobrenadante foi removido com uma seringa e o resíduo seco sob pressão reduzida. O produto foi obtido com 88% de rendimento e sua estrutura foi confirmada por RMN de ¹H, ¹³C, experimento DEPT-135 e Espectrometria de Massas (MALDI-TOF) no modo positivo.

3.8.2 Síntese do BMIM.BF₄, BMIM.PF₆ e BMIM.NTf₂

Os três líquidos iônicos de interesse foram sintetizados da mesma maneira, a partir da troca do ânion cloreto do LI precursor. Desta maneira, levou-se para reagir uma mistura equimolar de BMIM.Cl com os sais NaBF₄, KPF₆ e LiNTf₂ em excesso de acetona, a temperatura ambiente, por 24 h,¹⁰¹ como apresentado no Esquema 28.

Esquema 28 – Síntese do LI (a) BMIM.BF₄, (b) BMIM.PF₆ e (c) BMIM.NTf₂ pela metátese do Cl⁻ do BMIM.Cl.



Ao final, ocorreu a formação de duas fases que foram filtradas em coluna de celite, com a obtenção de uma solução amarela translúcida.¹⁰¹ O solvente foi eliminado sob pressão reduzida e aquecimento brando. O resíduo foi ressuspensionado em diclorometano, lavado três vezes com água, e acrescido de sulfato de magnésio anidro. Após uma hora, a suspensão foi filtrada e o solvente eliminado sob pressão reduzida e aquecimento brando.¹⁰⁰

Aos LIs sintetizados, é necessário a verificação de íons cloretos residuais, com solução de AgNO₃ 10%. Para tanto, duas gotas do LI é dissolvida em água ultrapura (Milli-Q) e, em seguida, adiciona-se 3 gotas da solução de AgNO₃. A turvação ou precipitação devido a formação de AgCl indica a presença de cloreto. Porém, em nenhuma das sínteses realizadas foi verificado cloretos residuais.

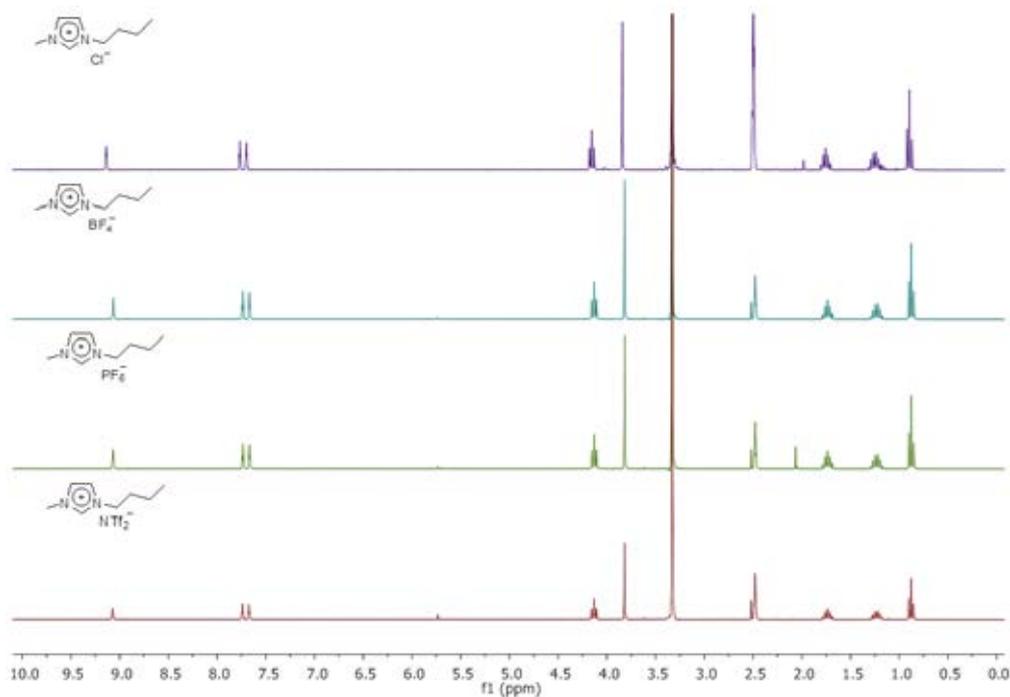
Desta maneira, os LIs BMIM.BF₄, BMIM.PF₆ e BMIM.NTf₂ foram obtidos com 80%, 92% e 78% de rendimento, respectivamente, e foram devidamente caracterizados por RMN de ¹H, ¹⁹F, ¹³C, experimento DEPT-135 e calorimetria diferencial de varredura (DSC).

3.8.3 Caracterização dos LIs sintetizados

Neste trabalho, optou-se por utilizar três LIs *N,N*-dialquilimidazólicos mais frequentes em Biocatálise, onde o cátion dos três LIs é o mesmo. Desta maneira, a caracterização por RMN de ¹H reflete apenas a estrutura do cátion, visto que nenhum ânion contém hidrogênio, havendo sutis diferenças de deslocamento químico devido à influência do ânion, como mostrado na Figura 17. Com o RMN de ¹³C ocorre o mesmo, diferindo apenas para o BMIM.NTf₂ que possui dois sinais a mais no espectro, referente aos dois carbonos em seu

ânion. Porém, como todos são sintetizados a partir do BMIM.Cl, onde o cátion já está devidamente sintetizado, outras caracterizações devem ser realizadas para a confirmação da estrutura completa, e não apenas o cátion.

Figura 17 – Espectros de RMN de ^1H (300,19 MHz, DMSO- d_6) dos LIs BMIM.Cl, BMIM.BF $_4$, BMIM.PF $_6$ e BMIM.NTf $_2$.



Fonte: o autor.

O RMN de ^{19}F é reportado na literatura para caracterização do ânion do LI, pois cada estrutura possui átomos de flúor em diferentes ambientes químicos, com conseqüente diferenças no deslocamento químico. Os valores atribuídos aos sinais dos espectros de RMN de ^{19}F estão sumarizados na Tabela 14, juntamente aos dados da literatura.

Tabela 14 – Atribuições dos espectros de RMN de ^{19}F dos LIs deste trabalho, comparados à literatura.

Líquido iônico	δ (ppm)			
	Neste trabalho		Literatura	
BMIM.BF $_4$	-148,29 (s)	-148,34 (s)	-148,66 (s)	-148,71 (s) ¹⁰²
BMIM.PF $_6$	-70,1 (d, $J = 711,1$ Hz)		-70,2 (d, $J = 710,4$ Hz) ¹⁰³	
BMIM.NTf $_2$	-78,7 (s)		-78,8 (s) ¹⁰³	

Os dados obtidos tanto para os deslocamentos químicos nos espectros de RMN de ^{19}F estão de acordo com a descrição da literatura, bem como o tipo de sinal e constante de acoplamento.

Os LIs são descritos como compostos de grande estabilidade térmica. Outra maneira de caracterizá-los reside na análise por calorimetria diferencial de varredura (DSC), para verificação das temperaturas de transição vítrea (T_g) e temperatura de fusão (T_m).

Tabela 15 – Temperatura de transição vítrea e de fusão dos LIs, obtidas por DSC e comparadas à literatura.

Líquido iônico	Efeito térmico			
	T_g (°C)		T_m (°C)	
	Neste trabalho	Literatura	Neste trabalho	Literatura
BMIM.BF ₄	-67	-74 ¹⁰⁰	-	-
BMIM.PF ₆	-64	-61 ¹⁰⁴	6	10
BMIM.NTf ₂	-85	-85,5 ¹⁰⁵	-2,5	-3,5

Fonte: o autor.

As temperaturas de transição vítrea e temperaturas de fusão obtidas estão em coerência com a literatura. Dessa maneira, os LIs sintetizados foram devidamente caracterizados e podemos seguir para a próxima etapa de sua aplicação.

3.9 Reações de biocatálise em meios não convencionais

3.9.1. Reações de catálise enzimática utilizando NHase (PRO-001 e PRO-015) em líquidos iônicos

Em reações de catálise enzimática em solventes orgânicos, já está estabelecido que a quantidade de água associada à enzima é um fator determinante de suas propriedades – atividade, estabilidade e especificidade.⁶² Muitas enzimas tem se mostrado mais ativa em LIs menos hidrofílicos devido a menor tendência destes em retirar a água essencial das enzimas.

Reações enzimáticas contendo LI e tampão como meio reacional tem sido empregadas com sucesso. Sistemas mono- e bifásico são extensamente reportados, dependendo da natureza do LI; se miscível ou não com água. Dentre os LIs utilizados neste trabalho, apenas um é totalmente miscível com água; o BMIM.BF₄, enquanto BMIM.PF₆ e BMIM.NTf₂ são pouco solúveis, formando um sistema bifásico.

Para os LIs BMIM.BF₄ e BMIM.PF₆, as reações foram realizadas em meio contendo 10%, 20%, 40% e 80% (v/v) de LI : tampão fosfato a pH 7,00 (0,1 mol/L), na presença de 0,5 mg de substrato (**4a-d** e **4'a-d**) e 10 µL de solução enzimática (PRO-001 e PRO-015), que permaneceu sob agitação por 48 h à 25 °C e 1500 rpm. As reações foram interrompidas pela adição de éter etílico. Para BMIM.NTf₂, as reações foram realizadas em meio contendo 10% (v/v) de LI:tampão e interrompidas pela adição de acetato de etila. Todas as fases orgânicas foram analisadas por GC-FID.

A grande viscosidade dos LIs exigiu uma maior rotação nas reações em sistema LIs:tampão, devido a menor transferência de massa comparado às reações em sistema tamponado apenas. Ao observar os valores de viscosidade, essa diferença fica clara. Para a água, a 25 °C, a viscosidade é de 0,9 cP, enquanto para BMIM.BF₄, BMIM.PF₆ e BMIM.NTf₂ são 180, 219 e 69 cP,¹⁰⁴ respectivamente, na mesma temperatura.

Selecionamos as enzimas PRO-001 e PRO-015 por terem fornecido as menores e maiores conversões, respectivamente. Como os LIs, em geral, tem melhorado o desempenho das reações enzimáticas, comparado ao sistema tamponado, buscamos verificar qual a influência destes frente a duas enzimas com perfis de conversão tão distintos.

As reações em BMIM.BF₄ e BMIM.PF₆ foram interrompidas pela adição de éter etílico, pois os mesmos são parcialmente miscíveis em acetato de etila, o que dificulta a análise por GC. Embora com BMIM.NTf₂ ocorra o mesmo, as reações não foram interrompidas por éter etílico devido a formação de um sistema trifásico, onde a fase etérea apresenta um pequeno volume, frente ao volume de éter adicionado.

Contudo, nenhuma reação levou à formação das respectivas amidas, para nenhum substrato. Isso indica que a presença de 10% do LI já foi suficiente para inibir as NHases. Nas reações com o LI BMIM. BF₄ os substratos **4c-d** e **4'c-d** não sofreram degradação desde 10% até 80% (v/v) do LI. Como BMIM.BF₄ é totalmente solúvel em água, provavelmente, a sua presença inibiu a etapa de formação do cátion imina e do cianeto (Esquema 25) que, ao serem formados, são estabilizados por solvatação das moléculas de água, além de sofrerem ataque nucleofílico desta. A interação do BMIM.BF₄ deve ser suficientemente forte para impedir tal etapa.

Na literatura, há relatos de enzimas que não são ativas em determinado LI por alguns autores, enquanto que outros demonstraram atividade da mesma enzima no LI.⁶⁰ Tais inconsistências são atribuídas as impurezas presentes nos LIs, que inibem as enzimas. As impurezas mais reportadas são os resíduos de haletos que não sofreram metátese. Porém, as

lavagens com água são considerados processos de purificação de haletos e demais impurezas para LIs hidrofóbicos.⁶⁰ Mesmo o BMIM.BF₄, solúvel em água, foi dissolvido em diclorometano e lavado sucessivamente com água. Também, todos os LIs passaram por coluna de celite. Ademais, foram realizados testes qualitativos com AgNO₃ onde não foi detectado a presença de cloreto em nenhum LI. Resíduos dos sais que deram origem aos ânions teriam sido observados nos espectros de RMN de ¹⁹F.

A desnaturação da enzima nos líquidos iônicos pode estar relacionada à natureza iônica do líquido iônico. O cátion ou ânion pode interagir com os grupos carregados da enzima, tanto no sítio ativo quanto na sua periferia, provocando alterações em sua estrutura.⁶² Também pode ocorrer a complexação do cofator metálico pelo LI e levar a inativação da enzima.

Assim como os solventes orgânicos podem diminuir as interações hidrofóbicas das enzimas, em determinadas concentrações, e comprometer sua estrutura, os LIs podem interferir nas ligações de hidrogênio. Os ânions dos LIs podem formar fortes ligações de hidrogênio com a enzima e dissociar as ligações de hidrogênio que mantêm a integridade estrutural das α -hélices e folhas- β , levando a um desdobramento parcial ou totalmente da enzima.⁶⁶

Os LIs são, geralmente, considerados como altamente estáveis, sendo os LIs dialquilimidazólicos termoestáveis em temperaturas superiores a 300°C.⁶⁶ Porém, a estabilidade em água sob diversas condições experimentais, estudadas por Freire et al.¹⁰⁵ revelaram que BF₄⁻ e PF₆⁻ sofrem hidrólise. O PF₆⁻ foi observado ser química e termicamente estável, em condições experimentais moderadas. Por outro lado, a hidrólise de BF₄⁻ foi observada sob todas as condições experimentais utilizadas, mesmo à temperatura ambiente. A propensão dos ânions BF₄⁻ e PF₆⁻ em hidrolisar e liberar HF pode ter levado a desativação das NHases.

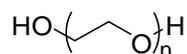
O primeiro relato de biocatálise com células inteiras usando uma segunda fase de LI, foi com células de *Rhodococcus* R312 e BMIM.PF₆.⁶⁸ As células continham NHase, que catalisou a hidratação de 1,3-dicianobenzeno para 3-cianobenzamida, com uma segunda fase composta por 20% de BMIM.PF₆ (v/v), em detrimento da segunda fase de tolueno. Estes tipos de reações usualmente empregam células inteiras contendo NHases, porque a enzima isolada é instável. Este trabalho não foi somente o primeiro a relatar a utilização de células inteiras com segunda fase de LI, mas também o primeiro; e único, trabalho que reporta a utilização de NHases e LIs.

Embora não tenhamos obtido nenhuma conversão para as duas enzimas testadas com três diferentes LIs, tais resultados são os primeiros empregando NHase isolada em LIs imiscíveis e miscíveis em água. Ainda que realizamos todos os procedimentos de purificação dos LIs cabíveis em nosso laboratório, mais experimentos com LIs comerciais; com impurezas identificadas e quantificadas, somariam aos resultados aqui obtidos. Outras NHases (em células inteiras e isoladas) devem ser testadas e com diferentes LIs para que um panorama geral dessa classe de enzimas seja feito frente aos LIs. Como a estabilização/desestabilização bem como aumento/diminuição de atividade das enzimas em LIs ainda são suposições, mais trabalhos devem ser realizados para elucidação de teorias frente aos resultados experimentais.

3.9.2 Reações de catálise enzimática utilizando NHase PRO-015 em polietileno glicol

O polietileno glicol (PEG) é um polímero resultante da polimerização do óxido de etileno (Figura 18) que vem se tornando popular como meio reacional. Está disponível em uma ampla faixa de massa molecular (200-20000 Da) que define seu estado físico. À temperatura ambiente e com massa molecular menor que 600 Da, o polímero é um líquido viscoso, solúvel em água, higroscópico e incolor. Um sólido branco é observado com massas moleculares superiores a 800 Da e uma cera em massas intermediárias.¹⁰⁶

Figura 18 – Fórmula estrutural do polietileno glicol, com a unidade de repetição entre parênteses.



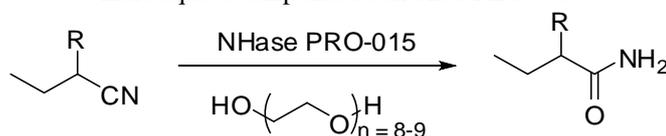
O PEG 300 e 400 tem sido aplicado como solvente em diversas reações de alilação, acoplamento cruzado de Suzuki, reações de Baylis-Hillman, reações aldólicas,¹⁰⁷ reações de Diels-Alder e reações S_N1.¹⁰⁶ Soluções aquosas de PEG representam sistemas de solventes interessantes para a substituição de outros sistemas de solvente atualmente em destaque, como LIs, dióxido de carbono supercrítico e sistemas micelares. Mesmo apresentando baixo custo, reduzida inflamabilidade, toxicidade e risco ambiental, o PEG ainda é o solvente alternativo menos popular.¹⁰⁷

Como uma tentativa de evitar a degradação dos substratos α-aminonitrilas, realizamos reações de catálise enzimática utilizando soluções aquosas de PEG 400 como meio reacional.

As reações foram realizadas em meio contendo 10%, 25%, 50%, 95 e 100% (v/v) de PEG 400:tampão fosfato a pH 7,00 (0,1 mol/L), na presença de 0,5 mg de substrato (**4a**, **4d** e **4'd**) e 10 µL de solução enzimática PRO-015, que permaneceu sob agitação por 48 h à 25 °C e 1500 rpm. As reações foram interrompidas pela adição éter etílico e as fases orgânicas foram analisadas por GC-FID.

Os testes foram realizados com a NHase PRO-015, visto que esta enzima se mostrou ativa para todos os substratos, resultando nas melhores conversões. O substrato modelo para esta reação foi o **4a**; substrato de maior afinidade da enzima. Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 16.

Tabela 16 – Conversão dos substratos **4a**, **4d** e **4'd** as respectivas amidas **5a**, **5d** e **5'd** por NHases PRO-015 em meio aquoso tamponado contendo PEG 400.



PEG 400 (%)	Conversão (%)		
	4a	4d	4'd
0	91,0	Decomposição	Decomposição
10	20,0	Decomposição	Decomposição
25	17,3	Decomposição	Decomposição
50	2,9	Decomposição	Decomposição
95	2,2	n.d.	Decomposição
100	1,4	n.d.	n.d.

n.d. = não decomposição.

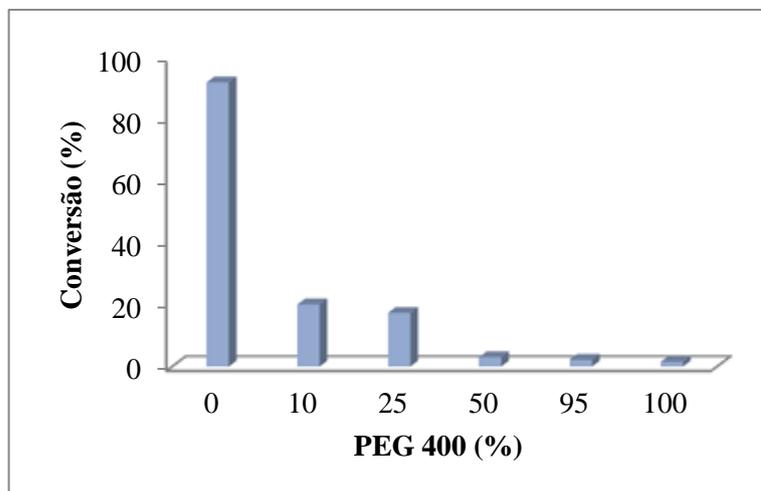
Fonte: o autor.

Como visto, mesmo na presença de PEG houve a degradação de **4d** e **4'd** para o aldeído e o heterociclo **d**. Em 95% e 100% de PEG para **4d**, e 100% de PEG para **4'd**, não houve degradação das substâncias, porém também não houve a formação das respectivas amidas **5d** e **5'd**. Não é possível afirmar a não afinidade da NHase PRO-015 para esses substratos pois, nas proporções de PEG onde não ocorreu a degradação, a enzima apresentou atividade extremamente reduzida, em comparação com tampão.

As reações com o substrato **4a** revelaram que, diferente dos LIs, a NHase PRO-015 foi ativa em todas as proporções de PEG, até mesmo em 100%. Porém, a adição de PEG diminuiu expressivamente a atividade desta enzima, como apresentado na Figura 19. Na menor proporção de PEG, em 10%, já houve uma diminuição de 4,5 vezes a atividade da

NHase PRO-015. A diminuição da atividade ocorreu de maneira não linear entre 10 e 100% de PEG.

Figura 19 – Conversão de **4a** em **5a** por NHase PRO-015 em diferentes proporções de PEG.



Fonte: o autor.

O perfil de conversão de **4a** em 10% e 25% de PEG 400, bem como de 50% e 95%, foi semelhante. A diminuição da conversão quase pela metade, entre 95% e 100% de PEG, para **4a**, provavelmente se deve a grande hidrofiliçidade deste. Em condições anidras, porém em meios hidrofílicos, os solventes tendem a retirar a água essencial da enzima, diminuindo ou até mesmo impedindo sua atividade.

3.10 Clonagem de NHase e expressão em *E. coli*

A expressão de proteínas recombinantes, em geral, fornece biocatalisadores melhores que seus hospedeiros naturais, além de produzi-los em quantidades suficiente para aplicações preparativas. Todas as atividades reportadas nesta seção (exceto o ensaio de triagem de NHase) foram realizadas na Facultad de Química da Universidad de la República, Montevideo/Uruguai, sob a supervisão da Profa. Dra. Sonia Rodríguez Giordano.

Foram selecionados dois micro-organismos para tentativa de clonagem e expressão de NHase; *Klebsiella oxytoca* e *Rhodococcus erythropolis*. A bactéria gram negativa *Klebsiella oxytoca* estava presente na coleção de micro-organismos do grupo da Profa. Dra. Sonia Rodríguez Giordano e, embora sua produção de NHase seja relatada na literatura, pouco foi

explorado em nível molecular. A bactéria gram positiva *Rhodococcus erythropolis* foi triada, dentre cinco micro-organismos que fazem parte da coleção do Milagre Research Group.

3.10.1 Triagem de NHases

Os ensaios de triagem foram realizados com os micro-organismos *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus equi* e *Rhodococcus ruber*, da Cultura de Coleção Tropical (CCT), por já apresentarem relatos na literatura para produção de NHase. Também foram triados *Bacillus cereus* (isolado de solo) e N2PVF3 (micro-organismo isolado de insetos sociais, ainda não identificado), ambos devido aos bons resultados em triagens de NHase em trabalho preliminar do grupo de pesquisa.

Para as triagens, foi utilizado o substrato *n*-butanonitrila, devido ao ótimo desempenho das NHases livres e imobilizadas no teste de atividade com este. Os micro-organismos cresceram em erlenmeyer, no meio de cultura adequado. Após 20 horas, a biomassa foi ressuspensa em meio de cultura contendo acetonitrila, como indutor das NHases. Assim, passados 24 horas, a biomassa foi ressuspensa em tampão fosfato (contendo ferro e cobalto) a pH 7,00 e *n*-butanonitrila. Ao final de 24 horas, todo o conteúdo do erlenmeyer foi extraído com acetato de etila e analisado por GC-FID.

Apenas *B. cereus* e *R. erythropolis* converteram o substrato para a respectiva amida, sendo que para o primeiro a conversão foi de 100% e, o segundo; 2%. Desta maneira, *B. cereus* seria o micro-organismo selecionado para realizar a transformação em *E. coli*. Porém, ao verificar a literatura, não foi encontrado a sequência genômica que codifica NHase para este micro-organismo. Embora a conversão para *R. erythropolis* tenha sido modesta, a enzima está presente neste micro-organismo e, suas informações genéticas são extensamente descritas. A pequena conversão pode ter sido resultado de uma indução na eficiente, ou de condições reacionais não ideais.

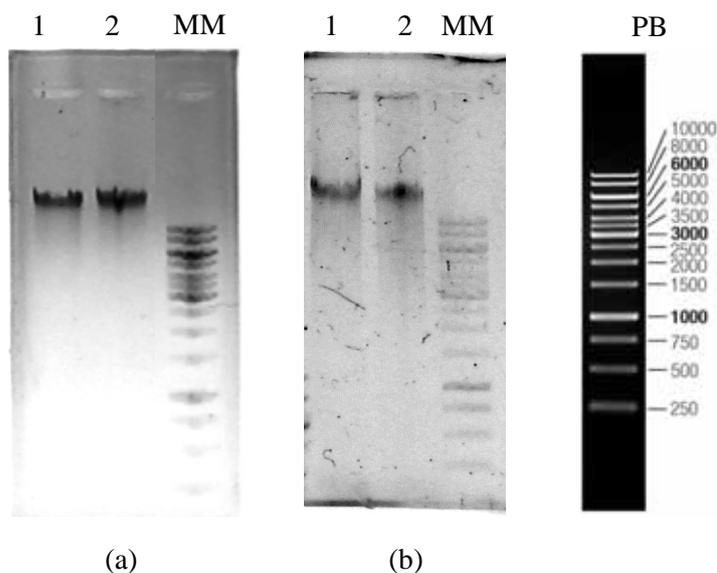
3.10.2 Extração e purificação do DNA genômico

A extração e purificação do DNA genômico de *K. oxytoca* foi realizada através do kit Invitrogen PureLink® Genomic DNA. Para tanto, partiu-se de 1 mL de meio de cultura *Trypticase Soy Broth* (TSB) contendo *K. oxytoca* incubada overnight, a 37°C e 150 rpm, e seguiu-se o protocolo do fabricante. A extração do DNA genômico de *R. erythropolis* foi

realizada na presença de lisozima e o surfactante brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTBA) 10%, além de um passo de purificação com clorofórmio e ribonuclease (RNase).

A qualidade da extração foi verificada por eletroforese em gel de agarose, apresentada na Figura 20. Foram obtidos DNA de alta massa molecular, verificado com auxílio do marcador de massa, expresso em pares de base multiplicado por 1000 (kpb).

Figura 20 – Eletroforese em agarose das amostras de DNA genômico de (a) *Klebsiella oxytoca* e (b) *Rhodococcus erythropolis*. MM: marcador de massa molecular, PB: pares de base.



Fonte: o autor.

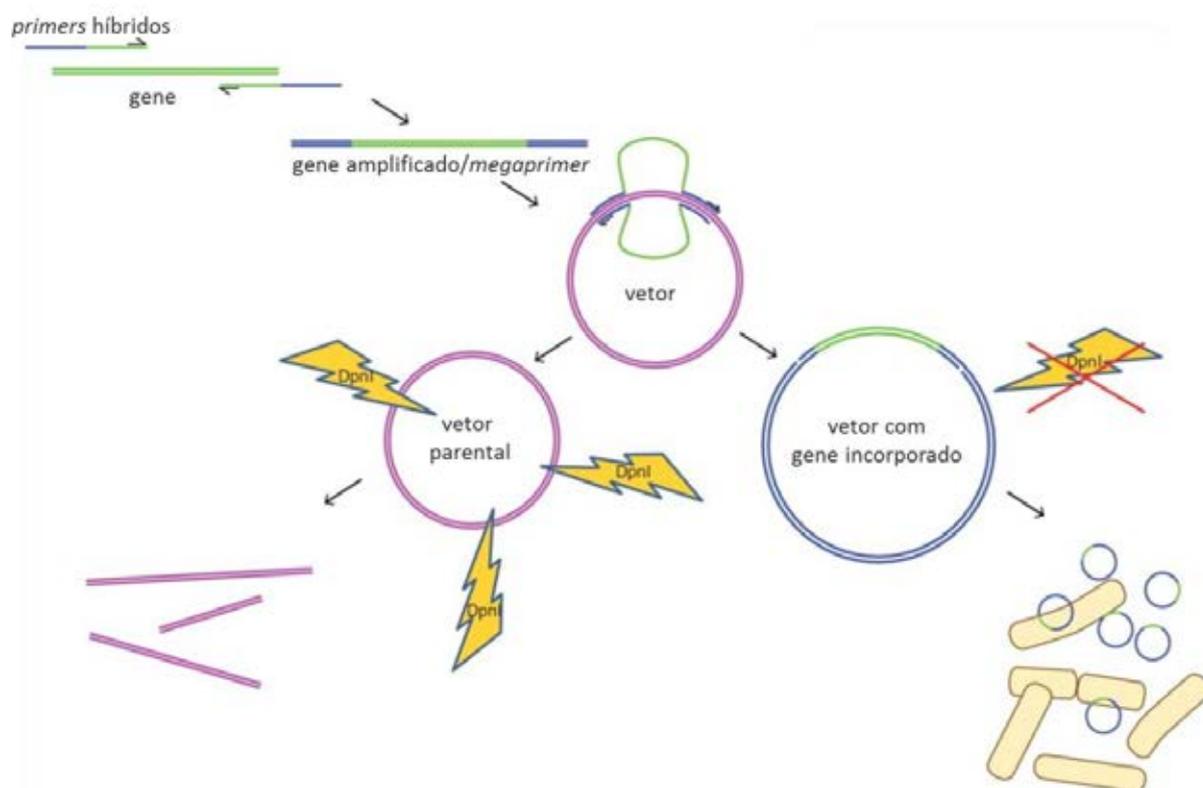
3.10.3 Clonagem dos genes de interesse

Neste trabalho foi utilizada a estratégia de *Restriction free cloning* que, a partir de um desenho diferenciado de primers, torna o trabalho de expressão menos intensivo. As técnicas de clonagem convencionais necessitam de uma digestão enzimática do inserto e do vetor antes do clone ser obtido. Uma frequente limitação reside na escolha de estratégia de clonagem, devido à falta de sítios de restrição adequados.¹⁰⁸

Em síntese, a *Restriction free cloning* é baseada na realização de duas reações em cadeia da polimerase (PCR). A primeira PCR amplifica o gene que codifica a proteína de interesse. Na segunda PCR, o produto da primeira é utilizado como *megaprimer* para amplificação linear com um vetor circular escolhido. O produto da segunda PCR possui sítios de ligações únicos nas extremidades, que são complementares a sequências que flanqueiam o sítio de inserção no vetor. O gene de interesse é incorporado no vetor utilizando DNA

polimerase de alta fidelidade, que se estende das extremidades do *megaprimer* ao longo de todo o plasmídeo. Em seguida, o vetor parental é digerido por DpnI (endonuclease de restrição, capaz de reconhecer e clivar DNA metilado), e a mistura é, finalmente, transformada em células competentes de *E. coli*. Uma representação esquemática está apresentada na Figura 21.

Figura 21 – Representação esquemática da estratégia de *Restriction free cloning*. Primers híbridos são desenhados para se ligarem ao gene (verde) e ao plasmídeo (azul). A primeira PCR leva ao *megaprimer* que possui em suas extremidades sequências que se flanqueiam ao plasmídeo. Na segunda PCR, o *megaprimer* replica o plasmídeo de interesse (rosa). Uma vez que todo plasmídeo é replicado, é realizada uma digestão com DpnI, para degradar seletivamente o DNA parental metilado. Os produtos não metilados não sofrem degradação e são utilizados na transformação de células competentes.



Fonte: Adaptado de Bond e Naus¹⁰⁹.

Os genes de interesse foram amplificados do DNA genômico anteriormente extraído. Para clonar uma NHase, são necessários os genes que codificam as subunidades α e β . Mas, para clonar NHase de *R. erythropolis*, é relatado na literatura a necessidade de um gene adicional, ativador da enzima que, provavelmente, está relacionado com o correto envelhecimento das subunidades.¹¹⁰ No entanto, o gene ativador não foi necessário para a ativação das NHases recombinantes de *Bacillus sp.* BR449 e *Comamonas testosteroni* Ni1.¹¹⁰ Para NHase de *K. oxytoca*, foi clonado conjuntamente quatro genes, os dois componentes da

enzima (subunidades α e β), mais um ativador e transportador de cobalto. São esperados bons resultados de transformações de genes de *K. oxytoca* em *E. coli*, pois ambas as bactérias são da mesma família; Enterobacteriaceae.

Assim, foram construídos oligômeros (*primers*) para obter os genes que codificam as subunidades α e β , para ambos os micro-organismos, e o gene ativador para *R. erythropolis*, sumarizados na Tabela 17.

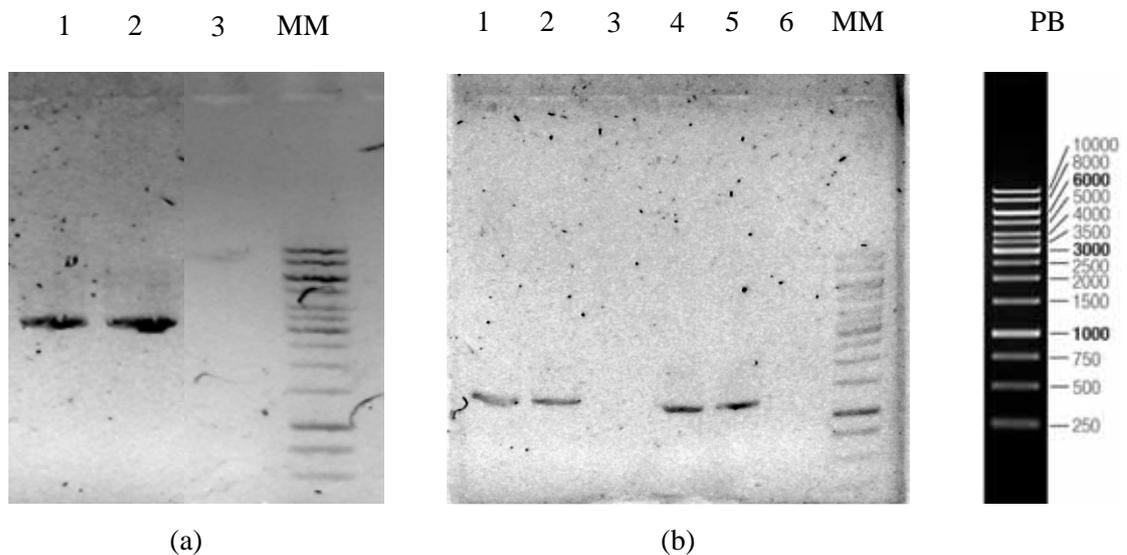
Tabela 17 – *Primers* desenhados para a amplificação dos genes que codificam NHase (entrada 1 a 4) e o gene ativador (entrada 5 e 6). Em vermelho, estão representadas as caudas que ficarão livres para se ligar ao vetor na segunda PCR. Os códons grifados representam start e stop.

Entrada	Primer	Sequência
1	Koxyt NHase F	5' - GGATAACAATTTACACAGGAAACATGAGCCATAAACACGACCACG - 3'
2	Koxyt NHase R	5' - GAAAATCTTCTCTCATCCGCCGACGCTCTCATGTTGTT AACC - 3'
3	Rhodo alpha F	5' - AGATATACCATGGGCAGCAGCATGTCAGTAACGATCGACCACAC - 3'
4	Rhodo beta R	5' - TACGATTACTTTCTGTTCGACTTAAGCCCTGGAATGCTGGAAGATCAG - 3'
5	Rhodo ativador F	5' - TAAGAAGGAGATATACATATGGCAGATCTCATGGTCGACACACGACTTCC - 3'
6	Rhodo ativador R	5' - CTCAGCGGTGGCAGCACAATATCAAACGGTCTGGTC - 3'

Com os *primers* apresentados, foram realizados PCRs com DNA polimerase de alta fidelidade (Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase), utilizando o DNA genômico e em duplicata. Também foram realizados controles negativos, onde o DNA foi substituído por água. Há uma diferença experimental na PCR desses micro-organismos, onde para *R. erythropolis* foi utilizado um tampão para alto conteúdo de guanina e citosina, além da adição de dimetilsulfóxido.

A amplificação dos genes que codificam NHases de *K. oxytoca* e *R. erythropolis* apresentam 2722 e 1306 pb, respectivamente, e o gene ativador apresenta 1196 pb. As amplificações foram confirmadas por eletroforese, apresentada na Figura 22.

Figura 22 – Eletroforese em agarose das ampliações de (a) NHase de *Klebsiella oxytoca* e (b) NHase de *Rhodococcus erythropolis* em 1 e 2 e do gene ativador em 4 e 5. Os controles negativos estão em 3 e 6. MM: marcador de massa molecular, PB: pares de base.



Fonte: o autor.

Desta maneira, foi possível confirmar a amplificação dos genes e as massas dos pares de bases foram confirmados pelo marcador.

A próxima PCR consiste na incorporação do gene ao vetor. Os *megaprimers* utilizados foram os genes amplificados que, com as caldas livres (Tabela 17, representação em vermelho) se ligarão aos vetores. Foram realizados controles negativos utilizando como *megaprimers* os controles negativos da primeira PCR.

O vetor utilizado para o gene de NHase de *K. oxytoca* foi o pKK223-3 e, para NHase de *R. erythropolis*, pACYCDuet-1. Os mapas desses vetores estão apresentados a seguir. Entretanto, esta PCR não pode ser verificada por eletroforese, seguindo para a etapa de digestão.

vetores (200 ng/mL) e controles negativos com 10 µL dos controles negativos da etapa anterior.

Após a eletroporação, as células são imediatamente acrescidas de 1 mL de meio de cultura SOC e incubadas a 37 °C por 1 a 2 h. Em seguida, as células foram plaqueadas em meio seletivo Luria Bertani ágar (LB-ágar) contendo antibiótico e novamente incubadas a 37 °C por 24 h. Para confirmar a eficiências das células, o controle positivo foi diluído 10⁵ vezes e plaqueado. Os antibióticos utilizados foram ampicilina e cloroanfenicol para as transformações de células de *K. oxytoca* e *R. erythropolis*, respectivamente.

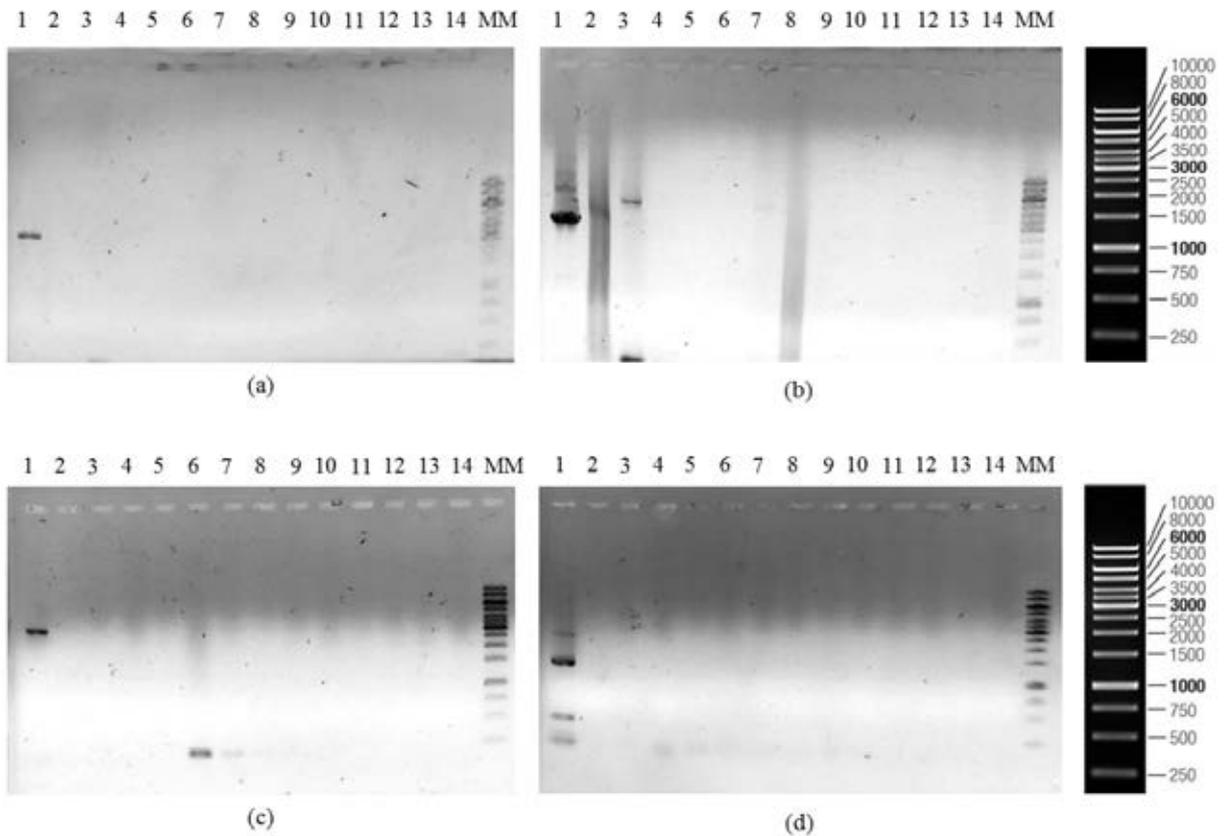
Somente se obteve clones das transformantes advindas da digestão com DpnI seguida de tratamento com ribonuclease T, o controle negativo não apresentou clones e o controle positivo, bem como sua diluição, apresentaram clones.

3.10.5 Verificação dos clones obtidos

Os clones obtidos foram inoculados em tubos, contendo 5 mL de meio líquido LB com o devido antibiótico e incubados a 37 °C e 150 rpm, *overnight*, para realizar a *miniprep*. Para tanto, tomou-se 1 mL dos cultivos crescidos, que foram centrifugados para remoção do sobrenadante, e ressuspendeu-se em tampão, RNase, NaOH e dodecil sulfato de sódio. Após a formação de um sólido precipitado o sobrenadante foi extraído com uma mistura de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). O DNA da fase aquosa foi precipitado com etanol.

Assim, com o DNA plasmídico obtido, realizou-se uma PCR com duas enzimas DNA polimerase, a Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase e a KAPA2G Robust DNA Polymerase que opera melhor em meios não tão puros como os obtidos por *minipreps*. Para os clones de *K. oxytoca* foram utilizados os *primers* das Entradas 1 e 2 (Tabela 17), para os de *R. erythropolis*; Entradas 3 e 4. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 24.

Figura 24 – Eletroforese em agarose dos clones de *K. oxytoca*, acima, e *R. erythropolis*, abaixo, utilizando (a) e (c) Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase e (b) e (d) KAPA2G Robust DNA Polymerase. Os controles positivos estão em 1 e os negativos em 2. MM: marcador de massa molecular, com a indicação das bandas mais importantes.



Fonte: o autor.

Por eletroforese utilizando a DNA polimerase KAPA2G, dois possíveis clones de *K. oxytoca* foram identificados nas corridas 3 e 7 da Figura 24b. Com a DNA polimerase Phusion® não foi observado mas, esta enzima é mais sensível para sofrer inibição por influência do meio. Para o *R. erythropolis* não foi observado clones. As bandas de baixa massa molecular que se vê na Figura 24c e d são os *primers*.

Contudo, uma análise de sequenciamento revelou que os possíveis clones indicados por eletroforese, não apresentam homologia com a sequência de *K. oxytoca*. Assim, nenhum clone foi obtido.

Considerações finais

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi proposta a síntese quimioenzimática de oito compostos (**5a-d** e **5'a-d**). A substituição direta da hidroxila de **2** e **2'**, para obtenção dos substratos **4a-d** e **4'a-d**, levou a eliminação da etapa de halogenação das cianidrinas. A redução de uma etapa da rota sintética proposta resultou em uma melhora no rendimento global, além de dispensar o uso de reagentes tóxicos, como o benzeno, SOCl₂ e POBr₃.

Para as reações de catálise enzimática foram empregadas vinte NHases livres e duas imobilizadas em CLEA. Em meio aquoso tamponado, estas enzimas apresentaram ampla especificidade. Os substratos **4c-d** e **4'c-d** sofreram degradação em meio aquoso, por retro-Strecker. As NHases-Fe não apresentaram afinidade por nenhum substrato de interesse, apenas para *n*-butanonitrila.

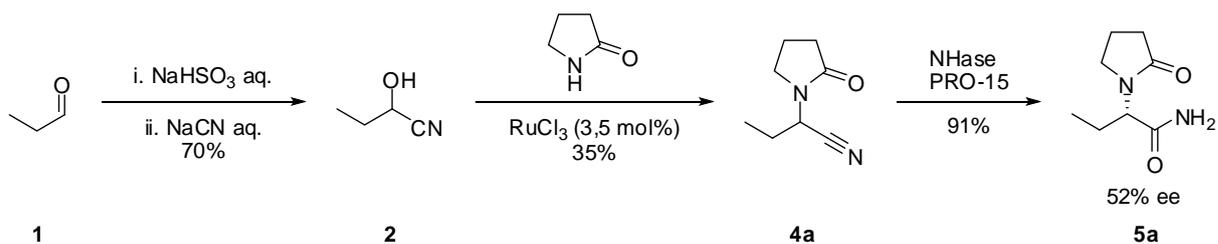
As NHases apresentaram uma baixa enantiosseletividade, com uma tendência a amida levógira, para substratos alifáticos, e dextrógira; para aromáticos. Estes resultados vão de encontro com a literatura que aponta baixa enantiosseletividade para NHases selvagens.

Embora a literatura relate uma melhora na conversão, regio- e enantiosseletividade na utilização de LIs como meio reacional, as NHases não apresentaram atividade nos três LIs propostos. A utilização de BMIM.BF₄ evitou decomposição de **4c-d** e **4'c-d**. Quando foi utilizado PEG 400, a NHase PRO-015 foi ativa até mesmo em 100% deste. Em proporções superiores a 95% de PEG, não houve a decomposição de **4c** e **4'c**, embora também não tenha ocorrido conversão.

A tentativa de clonagem das NHases de *K. oxytoca* e *R. erythropolis* não apresentaram êxito nas condições empregadas. Novas estratégias de clonagem serão abordadas por nosso grupo de pesquisa.

A rota sintética patenteada,⁴⁶ apresentada no Esquema 4, possui rendimento global de 14% e *ee* >99,5%, partindo-se do composto **2**. Para adição da lactama **a**, a hidroxila de **2** é tosilada e, então, substituída em uma reação com um excesso de 15,6 equivalentes de **a** na presença de *t*-BuONa. Nós realizamos a substituição direta, com uma reação que emprega 5 equivalentes de **a** na presença de RuCl₃ (Esquema 29). Se partíssemos também do composto **2**, a rota aqui proposta teria apenas duas etapas, com rendimento global de 32% havendo, assim, a necessidade de um melhoramento na enantiosseletividade da NHase. A parte fundamental desta patente, certamente foi a modificação genética da NHase.

Esquema 29 – Rota quimioenzimática, proposta neste trabalho, para síntese de 5a.



Fonte: o autor.

Finalmente, após explorarmos a utilização das NHases como catalisadores; empregando diferentes meios reacionais e substratos, acreditamos que ainda existe uma necessidade de trabalhos de engenhieramento das NHases, a fim de se obter melhores conversões e enantiosseletividade. Assim, essas enzimas serão, ainda mais, aplicadas na síntese de compostos de interesse.

Parte experimental

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Considerações gerais

Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H)

Os espectros de RMN de ^1H foram registrados no espectrômetro Bruker – Fourier 300 ($B_0 = 7,05 \text{ T}$), operando a 300,19 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) de hidrogênio foram registrados em ppm utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$) e referência externa CDCl_3 ($\delta = 7,26$) ou $\text{DMSO-}d_6$ ($\delta = 3,30$). As constantes de acoplamento (J) foram medidas em Hertz (Hz) e os sinais foram caracterizados como: dubleto (d), duplo dubleto (dd), multipeto (m), singleto (s), singleto largo (sl) e tripleto (t).

Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN de ^{13}C)

Os espectros de RMN de ^{13}C foram registrados no espectrômetro Bruker – Fourier 300, operando a 75,48 MHz. Os sinais de deslocamentos químicos de carbonos foram registrados em ppm, sendo $\delta 77,0$ para CDCl_3 e $\delta 39,52$ para $\text{DMSO-}d_6$. As interpretações dos espectros de RMN de ^{13}C foram realizadas com auxílio da técnica DEPT 135° onde: $\text{CH}_3/\text{CH} =$ sinal negativo (+), $\text{CH}_2 =$ sinal positivo (-) e $\text{C}_0 =$ carbono quaternário ausente (intensidade nula).

Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Flúor (RMN de ^{19}F)

Os espectros de RMN de ^{19}F foram registrados no espectrômetro Bruker Avance 400, operando a 376,48 MHz. Os sinais de deslocamentos químicos de flúor foram registrados em ppm.

Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chama (CG-FID)

As análises por CG-FID foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo gasoso modelo Shimadzu GC-2010 Plus equipado com injetor automático AOC-20i e acoplado a um detector de ionização em chamas. O cromatógrafo operou a um fluxo constante de gás H_2 de

40 mL min⁻¹, temperatura do injetor igual a 260 °C. Para CG foi utilizada coluna capilar de sílica fundida Restek Rtx[®]-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano). As injeções das amostras foram de 1 µL na concentração de 0,5 – 1 mg mL⁻¹.

Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM)

As análises por CG-EM foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo gasoso modelo Shimadzu GC-2010 equipado com um injetor automático AOC-5000 e acoplado a um detector de massas Shimadzu MS2010plus com impacto de elétrons (IE, 70 eV) no Instituto de Química de São Carlos (Prof. Dr. André Luiz Meleito Porto). O cromatógrafo operou a um fluxo constante de gás He de 40 mL min⁻¹, temperatura do injetor igual a 260 °C. Para CG foi utilizada coluna capilar de sílica fundida J&W Scientific (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano). As injeções das amostras foram de 1 µL na concentração de 0,5 – 1 mg mL⁻¹.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE (HPLC)

As análises por HPLC foram realizadas em um equipamento Jasco modular: bomba de quatro canais e degaseificador *on-line*, modelo PU-2089; detector de arranjo de fotodiodos (DAD), modelo MD-2010; detector de dicroísmo circular (DC), modelo CD-2095; injetor automático, modelo AS-2055. As injeções das amostras foram de 10 µL na concentração de 0,5 – 1 mg mL⁻¹.

Foi utilizada a coluna Diacel, de sílica encapada com celulose ligada a 3,5-dimetilfenilcarbamato (250 x 4,6 mm, 5 µm) e pré-coluna (10 x 4,6 mm, 5µm), modelo Chiralcel OD-H (fase normal). O cromatógrafo operou em modo isocrático com fase móvel composta por 90% hexano e 10% isopropanol.

Também foi utilizado a Diacel, de sílica encapada com celulose ligada a 3,5-diclorofenilcarbamato (250 x 4,6 mm, 5 µm) e pré-coluna (10 x 4,6 mm, 5µm), modelo Chiralcel IC (fase normal). O cromatógrafo operou em modo isocrático com fase móvel composta por 70% hexano e 30% isopropanol.

Espectrometria no Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro modelo Thermo Scientific Nicolet iS5, com transformada de Fourier, em pastilha de KBr (4000 a 500 cm^{-1}).

Calorimetria Diferencial Exploratória – DSC

Os LIs foram submetidos a análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) entre -90°C e 30°C , no equipamento TA (DSC), modelo Q100. Foram utilizados cadinhos de alumínio como porta amostras e fechados hermeticamente. A taxa de aquecimento foi de $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de 20°C até -90°C , seguido de isoterma por 10 min e, então, aquecido até 30°C na mesma taxa, sob fluxo de nitrogênio.

Ponto de Fusão

Os pontos de fusão foram medidos em um aparelho digital de ponto de fusão da Microquímica, modelo MQAPF-302, com resolução de $0,1^{\circ}\text{C}$, por lamínulas.

Métodos Cromatográficos

As cromatografias em DSC (cromatografia em sílica seca)⁸⁵ foram realizadas com sílica gel 230-400 mesh da marca Macherey-Nagel com gradiente de eluição em hexano/acetato de etila.

As placas cromatográficas em camada delgada preparativa (CCDP) foram preparadas com sílica gel com indicador de fluorescência da marca Sigma-Aldrich (288586) com 1 mm de espessura, sobre placas de vidro de 20 x 20 cm.

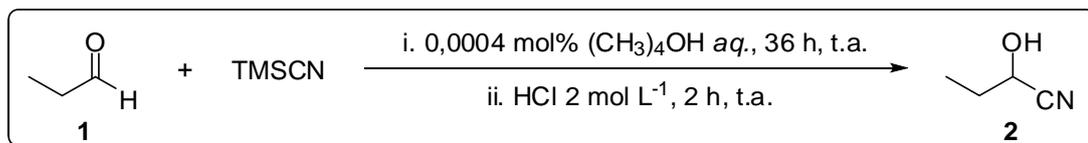
Todas as purificações realizadas foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD) em cromatoplas de 20 x 20 cm, da marca Macherey-Nagel, sobre suporte de alumínio com filme de sílica gel 60 F₂₅₄.

A detecção nas placas dos compostos com grupos cromóforos foi feita utilizando-se irradiação ultravioleta no equipamento Solab SL-204 com irradiação no comprimento de onda (λ) de 254 nm.

5.2 Procedimento Experimental e Dados Espectroscópicos dos Compostos Sintetizados

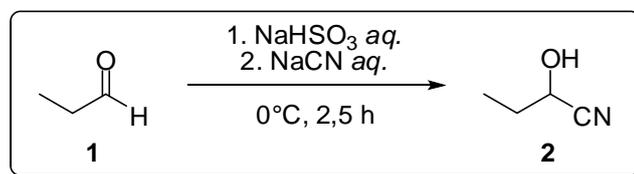
5.2.1 Síntese do composto 2

5.2.1.1 Síntese do composto 2 com TMSCN



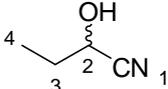
Em um balão de 5 mL, adicionou-se 8 nmol de (CH₃)₄NOH (100 μL a partir de uma solução 80 nmol L⁻¹) e 2 mmol de propanal (145 μL). O balão foi tampado com um septo e iniciou-se a agitação magnética. Após homogeneização do sistema, adicionou-se 2,4 mmol de TMSCN (300 μL) com o auxílio de uma seringa. A reação permaneceu sob agitação magnética por 36 h. A reação foi interrompida com a adição de 5 mL de acetato de etila que foi lavado com água (3x). A fase orgânica foi concentrada em rotaevaporador e o resíduo foi ressuspensionado em HCl 2 mol L⁻¹ que permaneceu sob agitação por 2 h. Ao final, procedeu-se a extração com EtOAc (3x 5 mL), as fases orgânicas foram combinadas, seca com sulfato de magnésio anidro e evaporadas em rotaevaporador. O resíduo foi purificado por CCD (75% Hex/EtOAc) com um R_F de 0,24. Rendimento: 49%.

5.2.1.2 Síntese do composto 2 com NaCN

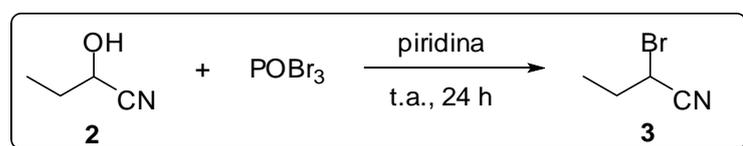


Em um balão de fundo redondo de 10 mL foi adicionado 1 mmol de NaHSO₃ (104 mg) e 350 μL de água e tampado com um septo. O balão foi levado para um banho de gelo sob uma placa de agitação magnética para atingir 0 °C. Enquanto isso, uma solução de 1 mmol de NaCN (49,01 mg) em 150 μL de água e 1 mmol de propanal (75 μL) são, separadamente, levadas para banho de gelo. Atingido 0 °C, o propanal é adicionado, em

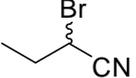
porção única, à solução de NaHSO₃ e mantidos sob agitação por 30 min. Em seguida, um borbulhador contendo NaOH 2 mol L⁻¹ é acoplado ao balão contendo NaHSO₃ e propanal. Com uma seringa, adiciona-se a solução de NaCN, em porção única, e deixa-se reagir por 2 h, sob agitação constante e vigorosa. A mistura foi filtrada em papel de filtro, e extraída com acetato de etila (3x). As fases orgânicas combinadas foram lavadas com brine, seca com sulfato de magnésio anidro e evaporadas em rotaevaporador. O resíduo foi purificado por DSC (30% Hex/EtOAc) ou CCD (75% Hex/EtOAc) dependendo da quantidade. Rendimento: 70%.


 (*±*)-2-hidroxiutanonitrila **2**: **FM** C₄H₇NO **MM** 85,1, óleo incolor; **IV** (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3431, 2976, 2941, 2883, 2248, 1463, 1123, 1104, 1059, 1025, 982; **EM** *m/z* (%): 59 (30), 58 (30), 57 (100), 56 (30); **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ : 4,44 (t, *J* = 6,6 Hz, 1H, H-2), 1,96 – 1,80 (m, 2H, H-3), 1,10 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, H-4); **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ : 119,93 (C₀, C-1), 62,48 (CH, C-2), 28,49 (CH₂, C-3), 8,91 (CH₃, C-4).

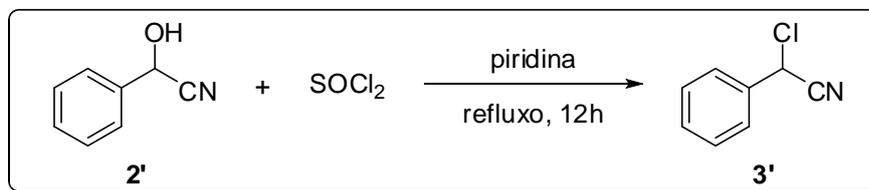
5.2.2 Síntese do composto 3



Em um balão de 50 mL, pesou-se 0,335 g (1,17 mmol) de POBr₃. O balão foi fechado com um septo e, com uma seringa, adicionou-se 400 μ L de benzeno anidro e 195 μ L de piridina. Por último, adicionou-se 85 mg de **2** (1 mmol). A reação foi mantida sob agitação por 24 h à temperatura ambiente. Ao final, o balão é levado para rotaevaporador, a fim de eliminar todo o benzeno. O resíduo é ressuspensionado em acetato de etila (10 mL) e lavado com água (3x 10 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro e evaporada em rotaevaporador. Devido a este composto não ter sido revelado nos reveladores disponíveis, não foi feita a purificação.


 (*±*)-2-bromobutanonitrila **3**: **FM** C₄H₆BrN **MM** 148,0, óleo roxo; **EM**: 121 (12), 119 (12), 81 (13), 79 (13), 68 (83), 52 (16), 41 (100), 39 (57).

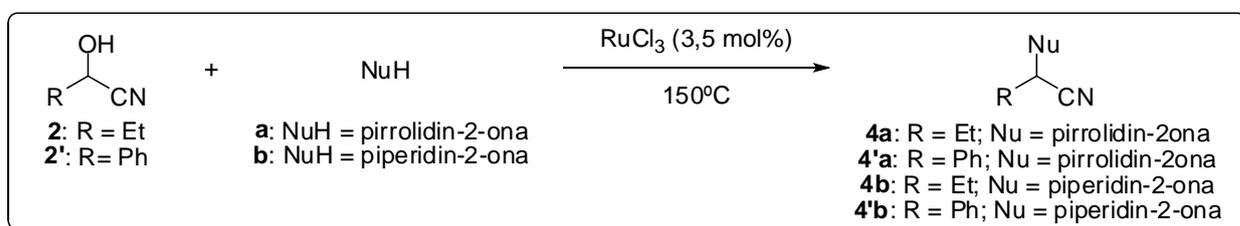
5.2.3 Síntese do composto 3'



Em um balão de 10 mL, adicionou-se 120 μ L de **2'** (1 mmol), 89 μ L de piridina (1,1 mmol) e 1 mL de clorofórmio. O balão foi levado para banho de gelo até atingir 0 °C. À solução foi adicionado, gota a gota e também a 0 °C, uma solução contendo 80 μ L de SOCl₂ (1,1 mmol) e 0,5 mL de clorofórmio. A mistura foi mantida sob refluxo por 12 h. Após atingir a temperatura ambiente, a mistura reacional foi neutralizada com solução saturada de NaHCO₃, extraído com acetato de etila (3x 5 mL), seca com sulfato de magnésio anidro e evaporada em rotaevaporador. O resíduo foi purificado por DSC (30% Hex/EtOAc) ou CCD (50% Hex/EtOAc) dependendo da quantidade. Rendimento: 63%.

(\pm)-2-cloro-2-fenilacetoneitrila **3'**: FM C₈H₆ClN MM 151,6, óleo amarelo;
 EM *m/z* (%): 153 (6), 151 (M⁺), 117 (12), 116 (100), 89 (23), 63 (11).
 RMN de ¹H (600,13 MHz, CDCl₃) δ : 7,58 – 7,53 (m, 2H, H-4 e H-8), 7,48 – 7,45 (m, 3H, H-5, H-6 e H-7), 5,56 (s, 1H, H-2).

5.2.4 Síntese dos compostos 4a, 4'a, 4b, e 4'b



Em uma autoclave, adicionou-se 7,3 mg de RuCl₃.xH₂O (3,5 mol%), 1 mmol do material de partida (**2** ou **2'**) e 5 mmol do nucleófilo (**a** ou **b**), além de uma barra magnética. A autoclave foi fechada e levada para um banho de glicerol a 150 °C, sob agitação magnética, por 12 h.

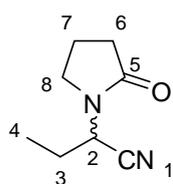
Após atingir temperatura ambiente, a autoclave foi aberta e adicionou-se 5 mL de EtOAc. A mistura foi filtrada em papel de filtro e, em seguida, lavada com água basificada por NaOH em pH 10. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro e evaporada em rotaevaporador. A purificação em DSC ou CCD foi feita dependendo da quantidade.

Quando o material de partida foi o composto **2** e o nucleófilo **a**, o resíduo foi purificado por DSC (100% EtOAc) ou CCD (75% Hex/EtOAc). Rendimento: 38%.

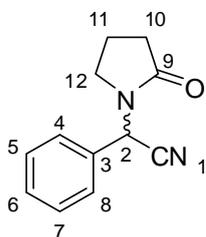
Quando o material de partida foi o composto **2'** e o nucleófilo **a**, o resíduo foi purificado por DSC (80% Hex/EtOAc) ou CCD (50% Hex/EtOAc). Rendimento: 42%.

Quando o material de partida foi o composto **2** e o nucleófilo **b**, o resíduo foi purificado por DSC (90% Hex/EtOAc) ou CCD (75% Hex/EtOAc). Rendimento: 39%.

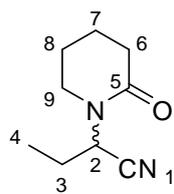
Quando o material de partida foi o composto **2'** e o nucleófilo **b**, o resíduo foi purificado por DSC (70% Hex/EtOAc) ou CCD (75% Hex/EtOAc). Rendimento: 45%.



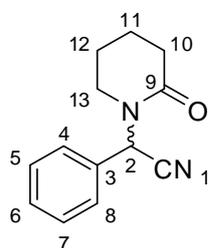
(±)-2-(2-oxopirrolidin-1-yl)butanonitrila **4a**: **FM** C₈H₁₂N₂O **MM** 152,2, óleo laranja; **IV** (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3515, 2976, 2938, 2881, 2243, 1690, 1417, 1281, 1216, 933, 814, 642, 567; **EM** m/z (%): 152 (M⁺), 124 (21), 123(100), 112 (37), 84 (17), 69 (66), 68 (35), 41 (50); **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ : 5,01 (t, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-2), 3,58 – 3,36 (m, 2H, H-8), 2,43 (t, $J = 8,0$ Hz, 2H, H-6), 2,23 – 2,00 (m, 2H, H-7), 2,00 – 1,84 (m, 1H, H-3), 1,84 – 1,67 (m, 1H, H-3), 1,03 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H, H-4); **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ : 174,88 (C₀, C-5), 117,12 (C₀, C-1), 44,32 (CH, C-2), 43,56 (CH₂, C-8), 30,47 (CH₂, C-6), 24,97 (CH₂, C-7), 17,92 (CH₂, C-3), 10,23 (CH₃, C-4).



(±)-2-(2-oxopirrolidin-1-yl)-2-fenilacetone nitrila **4'a**: **FM** C₁₂H₁₂N₂O **MM** 200,2, óleo marrom; **IV** (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3426, 2923, 2243, 1687, 1493, 1455, 1411 1263, 947, 743, 701; **EM** m/z (%): 200 (M⁺), 145 (51), 144 (57), 117 (74), 116 (64), 104 (25), 89 (34), 77 (11); **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ : 7,46 – 7,38 (m, 5H_{arom}), 6,47 (s, 1H, H-2), 3,56 – 3,44 (m, 1H, H-12), 3,14 – 3,04 (m, 1H, H-12), 2,58 – 2,36 (m, 2H, H-10), 2,20 – 1,91 (m, 2H, H-11); **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ : 174,69 (C₀, C-9), 131,67 (C₀, C-3), 129,54 (CH, C-5, C-6 e C-7), 127,27 (CH, C-4, C-8), 115,75 (C₀, C-1), 46,66 (CH, C-2), 43,23 (CH₂, C-12), 30,40 (CH₂, C-10), 17,65 (CH₂, C-11).

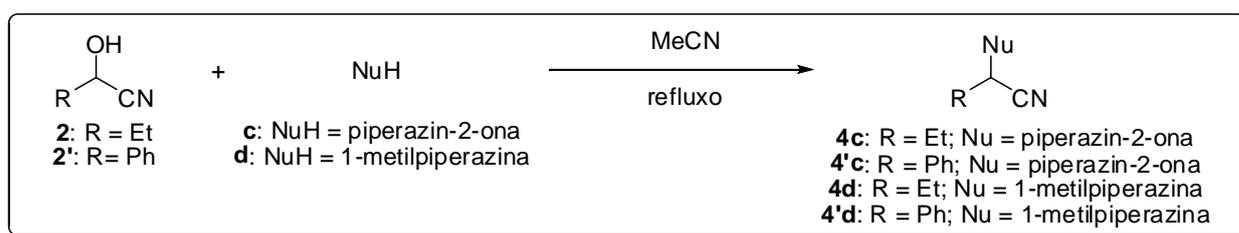


(±)-2-(2-oxopiperidin-1-yl)butanonitrila **4b**: **FM** C₉H₁₄N₂O **MM** 166,2, óleo laranja; **IV** (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3527, 2936, 2878, 2240, 1651, 1487, 1348, 1289, 1178, 1069, 980, 930, 554; **EM** m/z (%): 166 (M⁺), 151 (35), 138 (32), 137 (36), 109 (100), 99 (72), 98 (79), 82 (34), 67 (32), 55 (75), 41 (39); **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ : 5,67 (t, J = 8,2 Hz, 1H, H-2), 3,54 – 3,52 (m, 1H, H-9), 3,35 – 3,25 (m, 1H, H-9), 2,46 (t, J = 6,5 Hz, 2H, H-6), 1,93 – 1,70 (m, 6H, H-3, H-7 e H-8), 1,03 (t, J = 7,4 Hz, 3H, H-4); **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ : 169,87 (C₀, C-5), 117,77 (C₀, C-1), 46,04 (CH, C-2), 43,98 (CH₂, C-9), 32,31 (CH₂, C-6), 24,25 (CH₂, C-8), 23,04 (CH₂, C-3), 21,05 (CH₂, C-7), 10,20 (CH₃, C-4).



(±)-2-(2-oxopiperidin-1-yl)-2-fenilacetone nitrila **4'b**: **FM** C₁₃H₁₄N₂O **MM** 214,3, óleo marrom; **IV** (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3520, 2939, 2244, 1641, 1485, 1273, 1171, 1076, 981, 921, 821, 725, 695, 651, 544; **EM** m/z (%): 214 (M⁺), 170 (47), 158 (46), 116 (61), 104 (29), 89 (33), 55 (43); **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ : 7,50 – 7,32 (m, 5H_{arom}), 7,21 (s, 1H, H-2), 3,48 – 3,36 (m, 1H, H-13), 3,03 – 2,90 (m, 1H, H-13), 2,64 – 2,42 (m, 2H, H-10), 1,92 – 1,72 (m, 4H, H-11 e H-12); **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ : 169,93 (C₀, C-9), 132,04 (C₀, C-3), 129,36 (CH, C-5 e C-6, C-7), 127,38 (CH, C-4 e C-8), 116,30 (C₀, C-1), 47,99 (CH, C-2), 43,81 (CH₂, C-13), 32,46 (CH₂, C-10), 22,99 (CH₂, C-12), 21,12 (CH₂, C-11).

5.2.5 Síntese dos compostos 4c, 4'c, 4d e 4'd

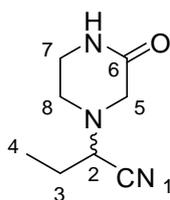


Em um balão de 5 mL foi solubilizado 1 mmol do material de partida em 0,5 mL de acetonitrila anidra. Adicionou-se 3 mmol do nucleófilo e a mistura reacional foi mantida sob refluxo.

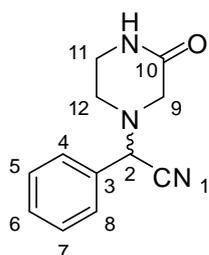
Após conversão de 100% do material de partida, o excesso de acetonitrila foi removido em rotaevaporador, o resíduo foi ressuspensionado em EtOAc e purificado pela lavagem com água basificada por NaOH em pH 10 (3x). A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro e evaporada em rotaevaporador.

Quando o material de partida foi o composto **2** (1 mmol, 85,1 mg) e o nucleófilo **c** (3 mmol, 300 mg), a reação ficou sob refluxo por 5 h e o rendimento foi de 20%. Com o composto **2'** como material de partida (1 mmol, 121 μL) e o nucleófilo **c**, a reação ficou sob refluxo por 24 h o rendimento foi de 22%.

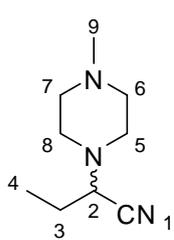
Quando o material de partida foi o composto **2** e o nucleófilo **d** (3 mmol, 335 μL) a reação ficou sob refluxo por 8 h e o rendimento foi de 38%. Com o composto **2'** como material de partida e o nucleófilo **d** a reação ficou sob refluxo por 20 h e o rendimento foi de 71%.



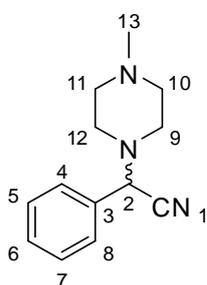
(±)-2-(3-oxopiperazin-1-yl)butanenitrila **4c**: **FM** C₈H₁₃N₃O **MM** 167,2, sólido branco; **PF** 114-115 °C; **IV** (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3266, 2975, 2940, 2883, 2798, 2227, 1664, 1347, 1170, 1077, 855, 753, 622; **EM** *m/z* (%): 167 (M⁺), 138 (98), 110 (100), 99 (31), 97 (27), 42 (82), 41 (35); **RMN de** ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) δ : 6,37 (sl, 1H, NH), 3,56 – 3,12 (m, 5H, H-2, H-5, H-7), 2,96 – 2,84 (m, 1H, H-8), 2,75 – 2,58 (m, 1H, H-8), 1,94 – 1,75 (m, 2H, H-3), 1,08 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, H-4); **RMN de** ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃) δ : 168,31 (C₀, C-6), 116,21 (C₀, C-1), 58,76 (CH, C-2), 53,28 (CH₂, C-5), 46,39 (CH₂, C-8), 41,18 (CH₂, C-7), 24,43 (CH₂, C-3), 10,64 (CH₃, C-4).



2-(3-oxopiperazin-1-yl)-2-fenilacetonitrila **4'c**: **FM** C₁₂H₁₃N₃O **MM** 215,2; sólido branco, **PF** 173-175 °C; **IV** (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3439, 3208, 2972, 2893, 2849, 2231, 1666, 1497, 1334, 1156, 1069, 758, 710, 521; **EM** *m/z* (%): 215 (M⁺), 186 (7), 171 (9), 145 (16), 116 (73), 99 (100), 89 (25), 43 (29), 42 (64); **RMN de** ¹H (300,19 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7,91 (s, 1H, NH), 7,51 – 7,39 (m, 5H_{arom}), 5,52 (s, 1H, H-2), 3,26 – 3,05 (m, 3H, H-9 e H-11), 2,85 (d, *J* = 15,9 Hz, 1H, H-9), 2,74 – 2,62 (m, 1H, H-12), 2,62 – 2,53 (m, 1H, H-12); **RMN de** ¹³C (75,48 MHz, DMSO) δ : 166,42 (C₀, C-10), 132,54 (C₀, C-3), 128,96 (CH, C-5, C-6 e C-7), 127,75 (CH, C-4 e C-8), 115,48 (C₀, C-1), 59,57 (CH, C-2), 53,16 (CH₂, C-9), 45,42 (CH₂, C-12), 40,02 (CH₂, C-11).

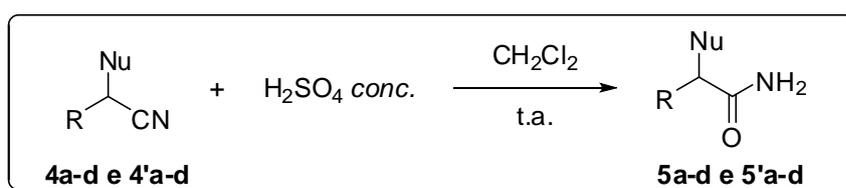


(±)-2-(4-metilpiperazin-1-il)butanonitrila **4d**: **FM** C₉H₁₇N₃ **MM** 167,2, óleo amarelo; **IV** (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 2937, 2878, 2797, 2222, 1456, 1377, 1285, 1167, 1010, 859, 809; **EM** m/z (%): 167 (M⁺), 141 (3), 140 (4), 111 (13), 99 (100), 70 (31), 56 (66); **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ : 3,39 (dd, $J = 8,6, 7,1$ Hz, 1H, H-2), 2,82 – 2,67 (m, 2H, H-5), 2,64 – 2,40 (m, 6H, H-6, H-7 e H-8), 2,32 (s, 3H, H-9), 1,91 – 1,66 (m, 2H, H-3), 1,06 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H, H-4); **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ : 117,02 (C₀, C-1), 59,55 (CH, C-2), 54,82 (CH₂, C-5, C-6, C-7 e C-8), 45,85 (CH₃, C-9), 24,47 (CH₂, C-3), 10,76 (CH₃, C-4).



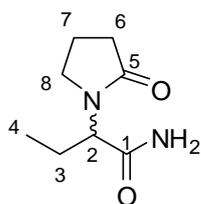
(±)-2-(4-metilpiperazin-1-il)-2-fenilacetonnitrila **4'd**: **FM** C₁₃H₁₇N₃ **MM** 215,3, sólido amarelo; **PF** 63-64 °C; **IV** (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3442, 3064, 2946, 2827, 2792, 2223, 1450, 1285, 1144, 1010, 914, 812, 736, 700; **EM** m/z (%): 215 (M⁺), 116 (10), 99 (100), 70 (19), 56 (60), 44 (37), 42 (26); **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ : 7,56 – 7,47 (m, 2H, H-4 e H-8), 7,45 – 7,33 (m, 3H, H-5, H-6 e H-7), 4,82 (s, 1H, H-2), 2,63 (m, 4H, H-9 e H-12), 2,47 (m, 4H, H-10 e H-11), 2,31 (s, 3H, H-13); **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ : 133,10 (C₀, C-3), 129,01 (CH, C-5, C-6 e C-7), 128,09 (CH, C-4 e C-8), 115,45 (C₀, C-1), 62,14 (CH, C-2), 54,87 (CH₂, C-9, C-10, C-11 e C-12), 45,89 (CH₃, C-13).

5.2.6 Síntese dos compostos **5a**, **5b**, **5d**, **5'a**, **5'b** e **5'd**

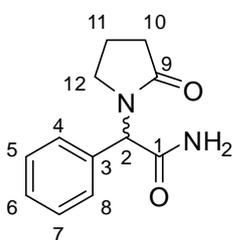


Em um balão de 25 mL, adicionou-se 1 mmol da nitrila, que foi dissolvida em 4 mL de CH₂Cl₂, seguido pela adição de H₂SO₄ concentrado (30 equivalentes, ~ 1,7 mL), a reação é mantida sob agitação a temperatura ambiente. Ao final, adiciona-se NaOH até completa neutralização do excesso de ácido e se procede a extração com acetato de etila (3 x 10 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro e concentrada em rotaevaporador.

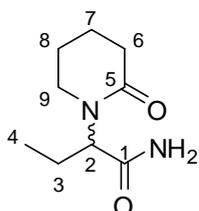
Como partiu-se das nitrilas puras, não houve a necessidade de realizar a purificação da amida.



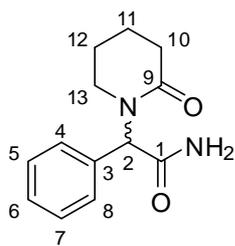
(±)-2-(2-oxopirrolidin-1-yl)butanamida **5a**: **FM** C₈H₁₄N₂O₂ **MM** 170,2; sólido branco; **PF** 116-117 °C; **IV** (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3392, 3320, 3255, 3204, 2966, 2922, 2871, 1677, 1271, 1442, 694, 629; **EM** m/z (%): 170 (M⁺), 126 (100), 98 (12), 69 (28), 58 (13), 41 (26); **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ : 6,33 (sl, 1H, NH₂), 5,46 (sl, 1H, NH₂), 4,45 (dd, $J = 8,8, 6,9$ Hz, 1H, H-2), 3,49 – 3,35 (m, 2H, H-8), 2,54 – 2,35 (m, 2H, H-6), 2,12 – 1,89 (m, 3H, H-3 e H-7), 1,78 – 1,61 (m, 1H, H-3), 0,91 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H, H-4); **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ : 176,26 (C₀, C-5), 172,41 (C₀, C-1), 56,30 (CH, C-2), 44,07 (CH₂, C-8), 31,20 (CH₂, C-6), 21,15 (CH₂, C-7), 18,28 (CH₂, C-3), 10,62 (CH₃, C-4).



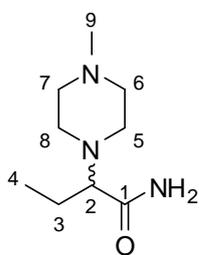
(±)-2-(2-oxopirrolidin-1-yl)-2-fenilacetamida **5'a**: **FM** C₁₂H₁₄N₂O₂ **MM** 218,2, sólido branco; **PF** 156-157 °C; **IV** (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3383, 3314, 3257, 3201, 2964, 2924, 2872, 1674, 1423, 1270, 702, 619, 549; **EM** m/z (%): 174 (100), 131 (36), 106 (18), 91 (19), 77 (9), 70 (1); **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ : 7,41 – 7,35 (m, 5H_{arom}), 5,94 (sl, 1H, NH₂), 5,89 (s, 1H, H-2), 5,75 (sl, 1H, NH₂), 3,78 – 3,65 (m, 1H, H-12), 3,10 – 2,98 (m, 1H, H-12), 2,56 – 2,30 (m, 2H, H-10), 2,09 – 1,99 (m, 1H, H-11), 1,97 – 1,82 (m, 1H, H-11); **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ : 175,82 (C₀, C-9), 171,44 (C₀, C-1), 134,33 (C₀, C-3), 129,30 (CH, C-5 e C-7), 129,12 (CH, C-4 e C-8), 128,88 (CH, C-6), 58,74 (CH, C-2), 45,02 (CH₂, C-12), 31,08 (CH₂, C-10), 18,19 (CH₂, C-11).



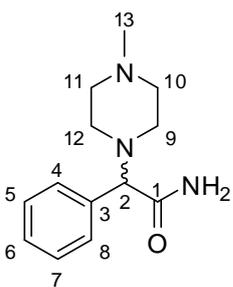
(±)-2-(2-oxopiperidin-1-yl)butanamida **5b**: **FM** C₉H₁₆N₂O₂ **MM** 184,2; sólido marom; **PF** 106-108 °C; **IV** (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3351, 3204, 2947, 2872, 1675, 1626, 1465, 1419, 1288, 1181, 976, 668; **EM** m/z (%): 184 (M⁺), 167 (7), 141 (10), 140 (100), 112 (25), 70 (12), 55 (24), 41 (13); **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ : 6,33 (sl, 1H, NH₂), 5,33 (sl, 1H, NH₂), 5,00 (dd, $J = 8,5, 7,3$ Hz, 1H, H-2), 3,25 (m, 2H, H-9), 2,59 – 2,30 (m, 2H, H-6), 2,00 – 1,65 (m, 6H, H-3, H-7 e H-8), 0,91 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H, H-4); **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ : 172,74 (C₀, C-5), 171,48 (C₀, C-1), 57,37 (CH, C-2), 43,40 (CH₂, C-9), 32,64 (CH₂, C-6), 23,25 (CH₂, C-8), 20,94 (CH₂, C-7), 20,13 (CH₂, C-3), 10,58 (CH₃, C-4).



(±)-2-(2-oxopiperidin-1-yl)fenilacetamida **5'b**: **FM** C₁₃H₁₆N₂O₂ **MM** 232,3; sólido marrom; **PF** 154-155 °C; **IV** (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3313, 3161, 2960, 2869, 1697, 1613, 1484, 1412, 1296, 1178, 740, 701, 516; **EM** m/z (%): 232 (M⁺), 215 (12), 189 (17), 188 (100), 91 (45), 82 (20), 55 (18); **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ : 7,47 – 7,30 (m, 5H_{arom}), 6,34 (s, 1H, H-2), 5,92 (sl, 1H, NH₂), 5,64 (sl, 1H, NH₂), 3,52 – 3,38 (m, 1H, H-13), 2,96 – 2,84 (m, 1H, H-13), 2,60 – 2,39 (m, 2H, H-10), 1,90 – 1,60 (m, 4H, H-11 e H-12); **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ : 171,70 (C₀, C-9), 171,10 (C₀, C-1), 134,52 (C₀, C-3), 129,70 (CH, C-5 e C-7), 128,96 (CH, C-4 e C-8), 128,65 (CH, C-6), 60,34 (CH, C-2), 45,27 (CH₂, C-13), 32,57 (CH₂, C-10), 23,30 (CH₂, C-12), 21,04 (CH₂, C-11).



(±)-2-(4-metilpiperazin-1-yl)butanamida **5d**: **FM** C₉H₁₉N₃O **MM** 185,3, líquido laranja; **IV** (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3357, 2962, 2798, 1671, 1459, 1284, 1172, 1010, 866, 640; **EM** m/z (%): 185 (M⁺), 142 (10), 141 (100), 98 (50), 70 (65), 56 (21), 42 (29); **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ : 6,77 (sl, 1H, NH₂), 5,57 (sl, 1H, NH₂), 2,82 (dd, $J = 7,4, 5,2$ Hz, 1H, H-2), 2,76 – 2,48 (m, 8H, H-5, H-6, H-7 e H-8), 2,36 (s, 3H, H-9), 1,83 – 1,65 (m, 2H, H-3), 0,99 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H, H-4); **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ : 175,86 (C₀, C-1), 70,62 (CH, C-2), 55,48 (CH₂, C-5, C-6, C-7 e C-8), 45,88 (CH₃, C-9), 21,56 (CH₂, C-3), 11,03 (CH₃, C-4).



(±)-2-(4-metilpiperazin-1-yl)fenilacetamida **5'd**: **FM** C₁₃H₁₉N₃O **MM** 233,3, sólido amarelo; **PF** 163-164 °C; **IV** (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3405, 3176, 2949, 2795, 1655, 1449, 1291, 1157, 1011, 854, 692, 663; **EM** m/z (%): 233 (M⁺), 190 (14), 189 (100), 146 (13), 91 (37), 70 (35), 56 (16), 42 (22); **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ : 7,39 – 7,28 (m, 5H_{arom}), 6,85 (sl, 1H, NH₂), 5,62 (sl, 1H, NH₂), 3,86 (s, 1H, H-2), 2,57 (s, 8H, H-9, H-10, H-11 e H-12), 2,35 (s, 3H, H-13), **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ : 174,02 (C₀, C-1), 135,55 (C₀, C-3), 128,94 (CH, C-5 e C-7), 128,85 (CH, C-4 e C-8), 128,59 (CH, C-6), 75,75 (CH, C-2), 55,10 (CH₂, C-9, C-10, C-11 e C-12), 45,54 (CH₃, C-13).

5.2.7 Solução tampão fosfato pH 7,00 (0,1 mol L⁻¹)

39 mL de NaH₂PO₄ (0,2 mol L⁻¹); 61 mL de Na₂HPO₄ (0,2 mol L⁻¹); 99,8 mL de água e 200 µL de uma solução 4 mg L⁻¹ de CoCl₂.6H₂O e FeCl₃.6H₂O. O pH foi corrigido para 7,00 em pHmetro com HCl 2 mol L⁻¹ ou NaOH 2 mol L⁻¹.

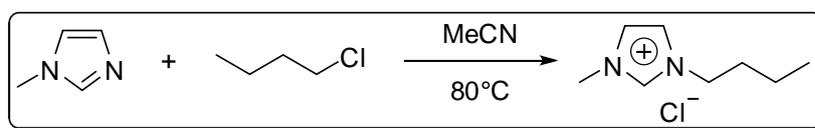
5.2.8 Determinação da atividade enzimática

As 22 enzimas foram obtidas da Prozomix Limited, sendo 20 na forma livre (15 mg/mL em suspensão de (NH₄)₂SO₄ 3,2 mol/L) e 2 imobilizadas em CLEA (10 mg/mL). Para o ensaio da atividade enzimática, adicionou-se 1 mL de tampão fosfato em um eppendorff de 2 mL e 5 µL de solução enzimática. Esta mistura foi deixada ao abrigo da luz por 1,5 h em banho de gelo. Em seguida, os eppendorffs foram levados para termomixer a 25 °C e, após atingir esta temperatura, adicionou-se 1 mg de *n*-butanonitrila que ficou sob agitação a 1000 rpm. Após 1 minuto de reação, adicionou-se 500 µL de acetato de etila e a mistura foi agitada em vórtex. A fase orgânica foi separada, seca com sulfato de magnésio anidro e, ao final, analisada em GC-FID.

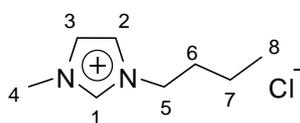
5.2.9 Reações de Biocatálise com 4a-d e 4'a-d em meio aquoso tamponado

Em um eppendorff de 2 mL, adicionou-se 1 mL de tampão fosfato e 10 µL de solução enzimática. Esta mistura foi deixada ao abrigo da luz por 1,5 h em banho de gelo. Em seguida, os eppendorffs foram levados para termomixer a 25 °C e, após atingir esta temperatura, adicionou-se 0,5 mg de substrato (**4a-d** e **4'a-d**) que ficou sob agitação a 1000 rpm. Após 48 horas de reação, adicionou-se 500 µL de acetato de etila (contendo 0,5 mg de *n*-butanamida como padrão interno) e a mistura foi agitada em vórtex. Em seguida, para separação das fases aquosa e orgânica, os eppendorffs foram centrifugados a 5000 rpm por 1 minuto. A fase orgânica foi separada, seca com sulfato de magnésio anidro e, ao final, analisada em GC-FID; para determinação das conversões, e em HPLC-PDA-CD; para os excessos enantioméricos.

5.2.10 Síntese do cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio



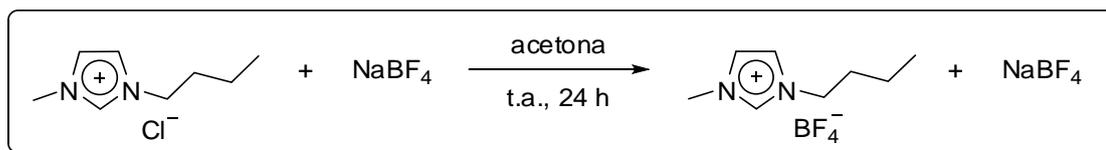
Em um balão de 5 mL, foi adicionado 80 μ L de 1-metilimidazol (1 mmol), 55 μ L de acetonitrila grau HPLC e 136 μ L de clorobutano (1,3 mmol). A mistura permaneceu sob agitação magnética e refluxo por 48 h sem ultrapassar a temperatura de 80°C. Após atingir a temperatura ambiente, a acetonitrila foi eliminada sob pressão reduzida, obtendo-se um óleo amarelo. Este óleo é então redissolvido em 140 μ L de acetonitrila grau HPLC e adicionado, gota a gota, para um balão contendo 560 μ L acetato de etila grau HPLC, sob atmosfera inerte de N₂ e agitação magnética. Imediatamente inicia-se a cristalização do BMIM.Cl e, após adição de toda a solução em acetonitrila, o sobrenadante foi removido com uma seringa e o resíduo seco sob pressão reduzida. O produto foi obtido com 88% de rendimento, e estocado sob atmosfera de N₂.



Cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio: **FM** C₈H₁₅N₂Cl **MM** 174,5;

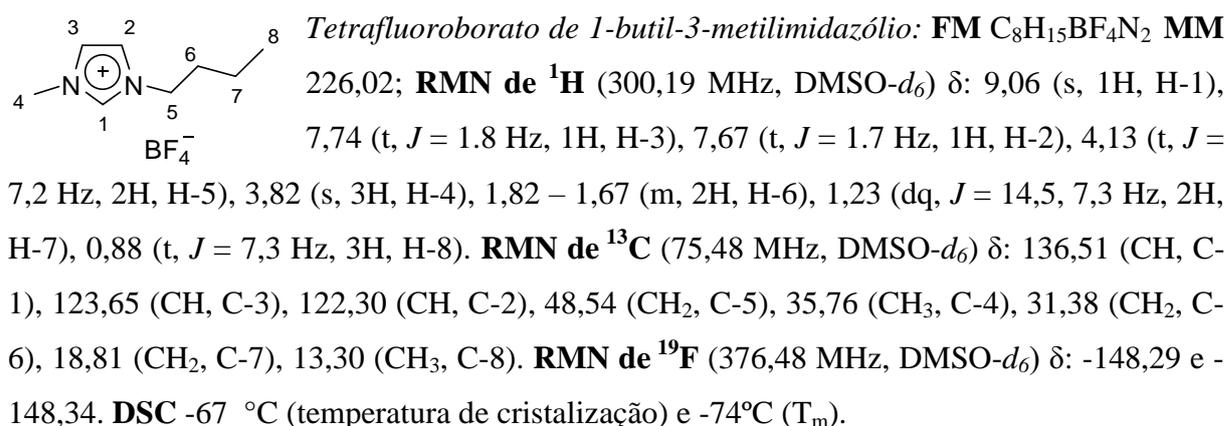
RMN de ¹H (300,19 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9,14 (s, 1H, H-1), 7,73 (dt, *J* = 20,3, 1,7 Hz, 2H, H-2 e H-3), 4,15 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H, H-5), 3,84 (s, 3H, H-4), 1,84 – 1,67 (m, 2H, H-6), 1,33 – 1,13 (m, 2H, H-7), 0,90 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, H-8). **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 136,70 (CH, C-1), 123,60 (CH, C-3), 122,28 (CH, C-2), 48,42 (CH₂, C-5), 35,73 (CH₃, C-4), 31,39 (CH₂, C-6), 18,78 (CH₂, C-7), 13,30 (CH₃, C-8). **EM** (MALDI-(+)-TOF-MS): 139,5 [M – Cl].

5.2.11 Síntese do tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio

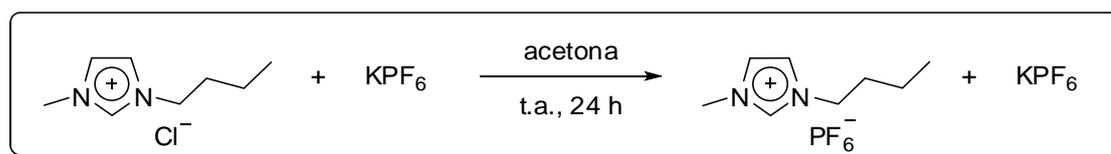


Em um balão de 5 mL, foi adicionado 174,7 mg de cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (1 mmol), 109,8 mg de NaBF₄ (1 mmol) e 340 μ L de acetona. A mistura

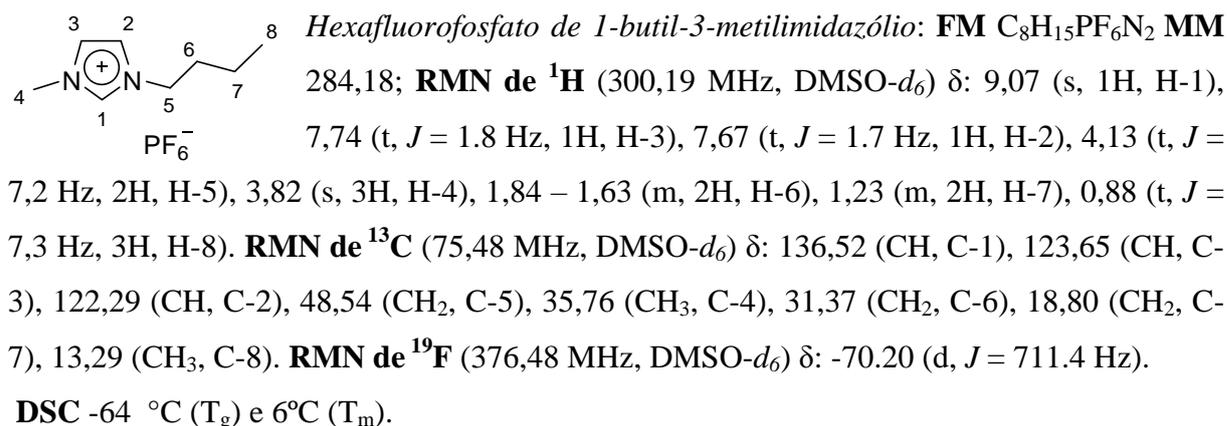
permaneceu sob agitação magnética, por 24 h, a temperatura ambiente. Ao final, forma-se duas fases que foi filtrada em coluna de celite, em funil de placa porosa, sob vácuo. Obtem-se um filtrado amarelo translúcido. A acetona do filtrado é eliminada sob pressão reduzida e o resíduo foi ressuspensionado em 200 μ L de diclorometano e lavado com água (3x 200 μ L). À fase orgânica é adicionado sulfato de magnésio anidro que, após 1 h, é removido por filtração. O solvente foi eliminado por filtração reduzida (0,1 bar) por 2 h a 30 °C. O produto é um óleo amarelo, obtido com 80% de rendimento.



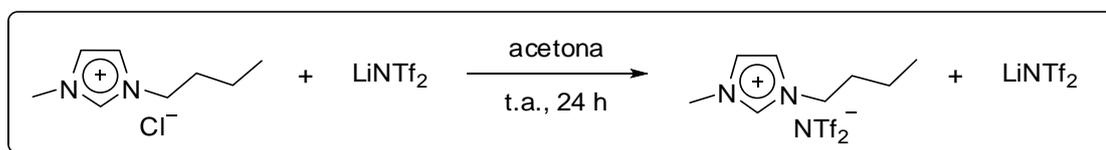
5.2.12 Síntese do hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio



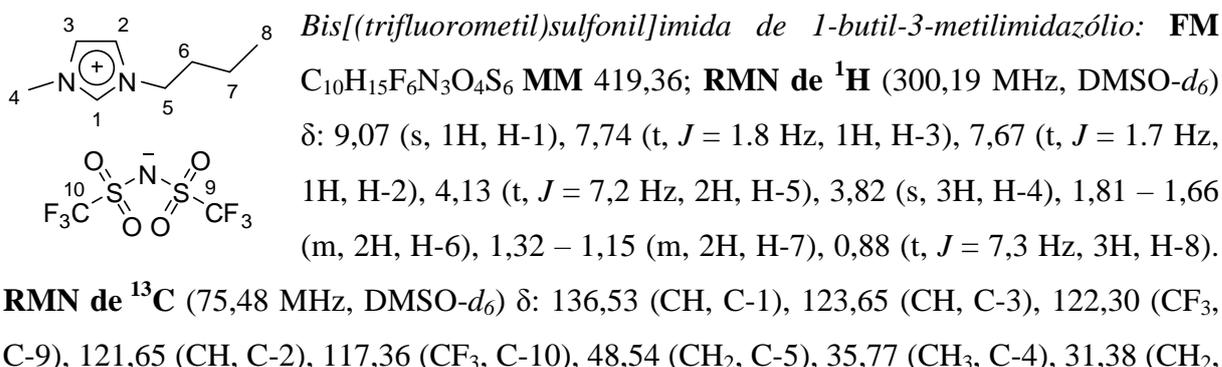
Em um balão de 5 mL, foi adicionado 174,7 mg de cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (1 mmol), 184,1 mg de KPF₆ (1 mmol) e 340 μ L de acetona. A mistura permaneceu sob agitação magnética, por 24 h, a temperatura ambiente. Ao final, forma-se duas fases que foi filtrada em coluna de celite, em funil de placa porosa, sob vácuo. Obtem-se um filtrado amarelo translúcido. A acetona do filtrado é eliminada sob pressão reduzida e o resíduo foi ressuspensionado em 200 μ L de diclorometano e lavado com água (3x 200 μ L). À fase orgânica é adicionado sulfato de magnésio anidro que, após 1 h, é removido por filtração. O solvente foi eliminado por filtração reduzida (0,1 bar) por 2 h a 30 °C. O produto é um óleo amarelo, obtido com 92% de rendimento.



5.2.13 Síntese do bis[(trifluorometil)sulfonyl]imida de 1-butil-3-metilimidazólio



Em um balão de 5 mL, foi adicionado 174,7 mg de cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (1 mmol), 287,1 mg de LiNTf₂ (1 mmol) e 340 µL de acetona. A mistura permaneceu sob agitação magnética, por 24 h, a temperatura ambiente. Ao final, forma-se duas fases que foi filtrada em coluna de celite, em funil de placa porosa, sob vácuo. Obtem-se um filtrado amarelo translúcido. A acetona do filtrado é eliminada sob pressão reduzida e o resíduo foi ressuspendido em 200 µL de diclorometano e lavado com água (3x 200 µL). À fase orgânica é adicionado sulfato de magnésio anidro que, após 1 h, é removido por filtração. O solvente foi eliminado por filtração reduzida (0,1 bar) por 2 h a 30 °C. O produto é um óleo amarelo, obtido com 78% de rendimento.



C-6), 18,80 (CH₂, C-7), 13,29 (CH₃, C-8). **RMN de ¹⁹F** (376,48 MHz, DMSO-*d*₆) δ: -78,73 (s). **DSC** -85 °C (T_g) e -2,5°C (T_m).

5.2.14 Reações de Biocatálise com 4a-d e 4'a-d em líquidos iônicos

Em um eppendorff de 2 mL, adicionou-se X μL de tampão fosfato e 10 μL de solução enzimática (PRO-001 e PRO-015). Esta mistura foi deixada ao abrigo da luz por 1,5 h em banho de gelo. Em seguida, os eppendorffs foram levados para termomixer a 25 °C e, após atingir esta temperatura, adicionou-se Y μL do líquido iônico (BMIM.BF₄, BMIM.PF₆ ou BMIM.NTf₂) e 0,5 mg de substrato (**4a-d** e **4'a-d**) que ficou sob agitação a 1500 rpm. Após 48 horas de reação, adicionou-se 500 μL de éter etílico, para as reações com BMIM.BF₄, e BMIM.PF₆, e acetato de etila, para as reações com BMIM.NTf₂. As misturas foram agitadas em vórtex, seguida de centrifugação a 5000 rpm por 1 minuto, para separação das fases. A fase orgânica foi separada, seca com sulfato de magnésio anidro e, ao final, analisada em GC-FID.

As proporções de líquido iônico e tampão foram:

- 10%: X = 900 μL e Y = 100 μL;
- 20%: X = 800 μL e Y = 200 μL;
- 40%: X = 600 μL e Y = 400 μL;
- 80%: X = 200 μL e Y = 800 μL;

5.2.15 Reações de Biocatálise com 4a, 4d e 4'd em PEG 400

Em um eppendorff de 2 mL, adicionou-se X μL de tampão fosfato, 10 μL de solução enzimática NHase PRO-015, Y μL de PEG 400 e 0,5 mg de substrato (**4a**, **4d** e **4'd**). Os eppendorffs foram levados para termomixer a 25 °C e ficou sob agitação a 1500 rpm. Após 48 horas de reação, adicionou-se 500 μL de éter etílico e a mistura foi agitada em vórtex. Em seguida, para separação das fases aquosa e orgânica, os eppendorffs foram centrifugados a 5000 rpm por 1 minuto. A fase orgânica foi separada, seca com sulfato de magnésio anidro e, ao final, analisada em GC-FID.

As proporções de PEG 400 e tampão foram:

- 10%: X = 900 μL e Y = 100 μL;
- 25%: X = 750 μL e Y = 250 μL;

- 50%: X = 500 μ L e Y = 500 μ L;
- 95%: X = 50 μ L e Y = 950 μ L;
- 100%: X = 0 μ L e Y = 1000 μ L;

5.2.16 Meios de cultura

Todos os meios foram preparados com água destilada e autoclavados a 121 °C e 1 atm durante 15 minutos.

- LB – Triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e cloreto de sódio 10 g/L.
- LB-ágar – Ágar 15 g para 1 L de meio de cultura líquido LB.
- LB-amp – meio LB ou LB-ágar, acrescido de ampicilina 4 μ L por mL de meio.
- LB-can – meio LB ou LB-ágar, acrescido de cloranfenicol 2 μ L por mL de meio.
- L-broth – Triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e cloreto de sódio 5 g/L.
- SOC – Triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L e cloreto de sódio 0,5 g/L. Antes de utilizar, acrescentar 10 mmol de MgCl₂, 10 mmol de MgSO₄ e 22 mmol de glicose.

5.2.17 Ensaio de triagem enzimática para NHase

Os micro-organismos *Rhodococcus erythropolis* (CCT 1878), *Rhodococcus equi* (CCT 0541), *Rhodococcus ruber* (CCT 1879) e *Bacillus cereus* foram cultivados em meio de cultura nutriente (NB) e N2PVF3 em meio Gymp. Para as reações, os micro-organismos cresceram em 10 mL de meio de cultura, em um erlenmeyer de 50 mL a 28°C e 156 rpm sob agitação orbital durante 20 horas. Em seguida, todo o cultivo foi centrifugado em tubos estéreis a 3000 rpm por 10 minutos e ressuspendido 10 mL de meio de cultura, contendo 29 μ L de acetonitrila. Então, incubou-se novamente durante 24 horas e, em seguida, centrifugou-se todo o cultivo; ambos os procedimentos nas mesmas condições. Após a centrifugação, a biomassa foi ressuspendida em tampão fosfato pH 7,00 (0,1 mol/L) contendo ferro e cobalto em quantidade suficiente para atingir a concentração celular de 200 mg/mL. Adicionou-se o substrato *n*-butanonitrila de tal forma a atingir uma concentração de 2 mg/mL. A reação ficou a 28°C e 156 rpm sob agitação orbital durante 24 horas e, após, extraída com acetato de etila, seca com sulfato de magnésio anidro e analisada por GC-FID.

5.2.18 Extração de DNA genômico

Em todos os procedimentos desse item, bem como dos seguintes, água se refere à água Mill-Q estéril.

Os micro-organismos foram incubados em 5 mL de meio TSB, a 37 °C e 150 rpm, *overnight*. Em seguida, procedeu-se a extração:

- *K. oxytoca*: foi transferido 1 mL do meio contendo *K. oxytoca* para um eppendorf de 1,5 mL, que foi centrifugado a $4.000 \times g$ e 4 °C durante 15 minutos. O sobrenadante foi removido e a biomassa ressuspensa em 180 µL de PureLink® Genomic Digestion Buffer. Adicionou-se 20 µL de proteinase K, seguido de agitação em vórtex e incubação a 55 °C por 30 minutos. Adicionou-se 20 µL de RNase A, seguido de agitação em vórtex e incubação a temperatura ambiente por 2 minutos. Adicionou-se 200 µL de PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer que foi agitado em vórtex, seguido da adição de 200 µL de etanol que foi agitado em vórtex até obtenção de uma mistura homogênea. A solução obtida foi transferida para uma coluna PureLink® Spin Column e centrifugada a $10.000 \times g$ por 1 minuto. O eluído foi descartado, adicionou-se 500 µL de Wash Buffer 1 e, novamente, centrifugou-se a $10.000 \times g$ por 1 minuto. O eluído foi descartado, adicionou-se 500 µL de Wash Buffer 2 e centrifugou-se a $17.000 \times g$ por 3 minutos. A coluna foi colocada em um eppendorf de 1,5 mL estéril e foi adicionado 70 µL PureLink® Genomic Elution Buffer. A coluna foi incubada por 1 minuto e centrifugada a $17.000 \times g$ por 1 minuto. O eluído contém o DNA puro. Uma nova eluição foi realizada da mesma maneira.
- *R. erythropolis*: foi transferido 1 mL do meio contendo *R. erythropolis* para um eppendorf de 1,5 mL, que foi centrifugado a $12.000 \times g$ e 4 °C durante 15 minutos. O sobrenadante foi removido e a biomassa ressuspensa em 100 µL de água estéril. Acrescentou-se uma ponta de espátula de lisozima e 5 esferas de vidro de 2,5 mm de diâmetro, seguido de agitação em vórtex e 10 minutos em ultrassom. Incubou-se a 37°C por 2 horas, com agitação em vórtex a cada 30 minutos. Passados 2 horas, foi realizado outra exposição ao ultrassom por 10 minutos. Adicionou-se 35 µL de dodecil sulfato de sódio 20% e 10 µL de proteinase K. Incubou-se a 37°C por 2 horas, com agitação em vórtex a cada 30 minutos. Adicionou-se 100 µL de NaCl 5 mol/L e agitou-se em vórtex. Adicionou-se 80 µL de CTBA 10% e incubou-se a 65°C por 30 minutos. Realizou-se uma extração com 750 µL de clorofórmio, onde a fase aquosa

foi transferida para outro eppendorf contendo 420 μL de isopropanol, agitado vigorosamente e deixado em geladeira por 2 horas. Centrifugou-se a 1.000 rpm e 4 °C durante 30 minutos. O sobrenadante foi removido e o DNA precipitado foi ressuspenso em 40 μL de água e 5 μL de tampão TE 10x (tris-HCl 100 mM, EDTA 10 mM, com pH 8,0; tris = hidroximetilaminometano). Adicionou-se 1 μL de RNase 10 mg/mL e incubou-se a 37 °C por 30 minutos. Adicionou-se 115 μL de etanol 95% frio e 1,15 μL de NaCl 4 mol/L. A mistura foi deixada em freezer por 2 horas. Centrifugou-se a 10.000 rpm e 4 °C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o DNA lavada com 40 μL de etanol 70% frio e centrifugado a 10.000 rpm e 4 °C por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o DNA deixado para secar a temperatura ambiente e, em seguida, ressuspenso em 40 μL de água.

5.2.19 Eletroforese em gel de agarose

Os DNA genômicos, bem como os fragmentos amplificados, foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 0,8%. Os géis foram preparados pela solubilização de agarose em tampão TE 0,5x por aquecimento em micro-ondas. Após um pequeno resfriamento, foi adicionado 5 μL de GoodViewTM (indicador de fluorescência) para cada 100 mL de solução e, em seguida, adiciona-se a mistura no suporte para solidificação. Todas as corridas foram realizadas no equipamento ENDUROTM Gel XL (Labnet), com tampão de corrida TE 0,5x, sob corrente de 100 mA, durante 45 minutos do polo negativo para o positivo. Os tamanhos do DNA foram estimados por comparação com o marcador (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific), aplicado sempre na última canaleta.

5.2.20 Amplificação dos genes

A partir da sequência de nucleotídeos que codificam NHase para *K. oxytoca* e *R. erythropolis*, foram desenhados os pares de *primers forward* e *reverse*, que estão apresentados na Tabela 17, para amplificação pela estratégia de *restriction free cloning*. A síntese dos primers foi realizada pela empresa Macrogen (Coréia).

A amplificação foi realizada por meio de PCR, utilizando o DNA genômico extraído, na presença de desoxirribonucleotídeos adenina, citosina, guanina e timina (dNTPs) e DNA polimerase Phusion High Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs). As condições

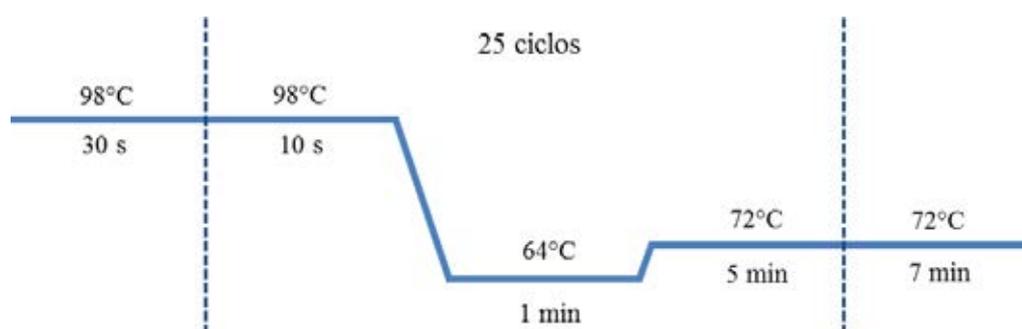
para PCR de cada micro-organismo estão sumarizadas na Tabela 18 e o ciclo utilizado está apresentado na Figura 25.

Todas as PCRs foram realizadas em termociclador Applied Biosystems® 2720 Thermal Cycler.

Tabela 18 – Reagentes e quantidades utilizadas nas reações de ampliações dos genes de NHase de *K. oxytoca* e *R. erythropolis* e o gene ativador de *R. erythropolis*, de acordo com as especificações no manual da Phusion High Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs).

<i>Klebsiella oxytoca</i>		<i>Rhodococcus erythropolis</i>	
Reagentes	Quantidade (µL)	Reagentes	Quantidade (µL)
Tampão (Phusion HF Buffer)	4,0	Tampão (Phusion GC Buffer)	4,0
dNTPs (10 mmol/L)	0,4	dNTPs (10 mmol/L)	0,4
Primer forward (10 pmol/µL)	5,0	Primer forward (10 pmol/µL)	5,0
Primer reverse (10 pmol/µL)	5,0	Primer reverse (10 pmol/µL)	5,0
DNA	1,0	DNA	1,0
Phusion HF DNA Polimerase (2 U/µL)	0,2	DMSO	0,6
H ₂ O Milli-Q	4,4	Phusion HF DNA Polimerase (2 U/µL)	0,2
		H ₂ O Milli-Q	3,8

Figura 25 – Representação do ciclo de PCR utilizado para as ampliações. A temperatura de desnaturação inicial e cíclica foi de 98°C, o anelamento ocorreu em 64°C seguido pela extensão, cíclica e final, a 72 °C.



Também foram realizados controles negativos, substituindo o DNA por água. Todas as ampliações foram verificadas por eletroforese.

5.2.21 Amplificação linear

Os produtos de PCR que codificam os genes de interesse foram utilizados como primers em uma reação de amplificação linear com pKK223-3 (genes de *K. oxytoca*) e

pACYCDuet-1 (genes de *R. erythropolis*). Os produtos de PCR apresentam caudas não ligadas (fita simples) em cada extremidade; representados em vermelho na Tabela 17, que atuam como pares de *primers*, que são complementares a sequências que flanqueiam o sítio de inserção no vetor. Assim, os produtos de PCR são denominados *megaprimers*. As condições para PCR de cada micro-organismo estão sumarizadas na Tabela 19.

Tabela 19 – Reagentes e quantidades utilizadas nas reações de ampliações lineares com os vetores.

<i>Klebsiella oxytoca</i>		<i>Rhodococcus erythropolis</i>	
Reagentes	Quantidade (μL)	Reagentes	Quantidade (μL)
Tampão (Phusion HF Buffer)	10,0	Tampão (Phusion GC Buffer)	10,0
dNTPs (10 mmol/L)	1,0	dNTPs (10 mmol/L)	1,0
<i>Megaprimer</i>	1,0	<i>Megaprimer</i>	1,0
pKK223-3 (20 ng/μL)	1,0	pACYCDuet-1 (20 ng/μL)	1,0
Phusion HF DNA Polimerase (2 U/μL)	0,5	DMSO	1,5
H ₂ O Milli-Q	36,5	Phusion HF DNA Polimerase (2 U/μL)	0,5
		H ₂ O Milli-Q	35,0

O ciclo utilizado foi o mesmo da Figura 25, porém com temperatura de anelamento a 60 °C e 30 ciclos. Foram realizados controles negativos, substituindo o *megaprimer* por água. Após a amplificação, os produtos foram submetidos à digestão com DpnI (enzima que digere vetores metilados, extraídas de cepas de *E. coli* que carregam o gene DpnI de *Diplococcus pneumoniae* G41).

As digestões foram realizados em eppendorfs de 1,5 mL onde, para cada 10 μL de produtos de PCR de amplificação linear, adicionou-se 2 μL de Buffer4 10x (New England BioLabs), 1 μL de DpnI 20 U/μL (New England BioLabs) e 7 μL de água. A mistura foi incubada a 37 °C por 2 horas. Os produtos digeridos foram submetidos à diálise ou precipitação, como segue:

- Diálise – 20 μL do conteúdo digerido foi posto sobre membrana de celulose para diálise (0,025 μm de poros, 25 mm de diâmetro, Millipore) flutuando em água durante 30 minutos.
- Precipitação: 20 μL do conteúdo digerido foi acrescido de 20 μL de ribonuclease (0,2 μg/μL), 40 μL de água e 20 μL de etanol 95%. A mistura foi deixada em freezer durante 1 h. Em seguida, centrifugou-se 13.300 × g e 4 °C durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o plasmídeo foi lavado com 400 μL de

etanol 70% e, novamente, centrifugou-se a $13.300 \times g$ e 4°C durante 20 minutos. O sobrenadante foi removido, o plasmídeo foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em $8 \mu\text{L}$ de água.

5.2.22 Preparação de *Escherichia coli* TOP10 competentes

E. coli TOP10, preservadas em glicerol a -70°C , foram inoculadas em placas LB-ágar e incubadas a 37°C durante 24 h. Uma colônia foi transferida para um tubo contendo 5 mL de LB e incubou-se a 37°C e 150 rpm *overnight*. Do cultivo, 1 mL foi transferido para um erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL de meio L-broth, e incubou-se a 37°C e 150 rpm até obtenção de uma densidade ótica a 600 nm (OD_{600}) entre 0,4 - 0,5. Após, o erlenmeyer com o cultivo foi levado para banho de gelo durante 15 minutos. Em seguida, todo o conteúdo foi centrifugado a $4000 \times g$ e 4°C durante 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e a biomassa lavada com 100 mL de glicerol 10% frio. O conteúdo foi centrifugado a $4000 \times g$ e 4°C durante 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e a biomassa lavada com 50 mL de glicerol 10% frio. Novamente, o conteúdo foi centrifugado a $4000 \times g$ e 4°C durante 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e a biomassa lavada com 4 mL de glicerol 10% frio. Finalmente, o conteúdo foi centrifugado a $4000 \times g$ e 4°C durante 15 minutos, o sobrenadante foi descartado, a biomassa ressuspendida em $400 \mu\text{L}$ de glicerol 10% frio, aliqüotada em volumes de $40 \mu\text{L}$ e armazenadas em freezer a -70°C mas, preferencialmente, utilizadas no mesmo dia. Todas as etapas foram realizadas em ambiente estéril e banho de gelo.

5.2.23 Transformação de *Escherichia coli* TOP10 competentes

Às células competentes recém preparadas e aliqüotadas em $40 \mu\text{L}$, adicionou-se $10 \mu\text{L}$ de DNA (gene incorporado ao vetor) preparado por diálise e precipitação. Para cada micro-organismo, realizou-se um controle positivo, utilizando $1 \mu\text{L}$ do plasmídeo (pkk223-3 ou pACYCDuet-1), e um controle negativo, utilizando $10 \mu\text{L}$ dos controles negativos preparados. As misturas de células e DNA foram incubadas por 5 minutos em banho de gelo e transferidas para uma cubeta de eletroporação de 2 mm, previamente resfriada em banho de gelo. A eletroporação foi realizada aplicando-se um pulso de 2 kV (eletroporador MicroPulserTM, Bio-Rad) e, logo em seguida, adicionou-se 1 mL de meio SOC e agitou-se por inversão. As células eletroporadas foram incubadas a 37°C por 2 horas e plaqueadas, em seguida, em meio LB-

amp (*K. oxytoca*) ou LB-can (*R. erythropolis*) e incubadas a 37 °C por 24 horas. Para verificar a eficiência das *E. coli* TOP10, 10 µL do controle positivo eletroporado e incubado em meio SOC foi por duas vezes consecutivas em 990 µL de meio LB e, em seguida, plaqueado em LB-amp ou LB-can.

5.2.24 Análise das transformantes de *Escherichia coli* TOP10

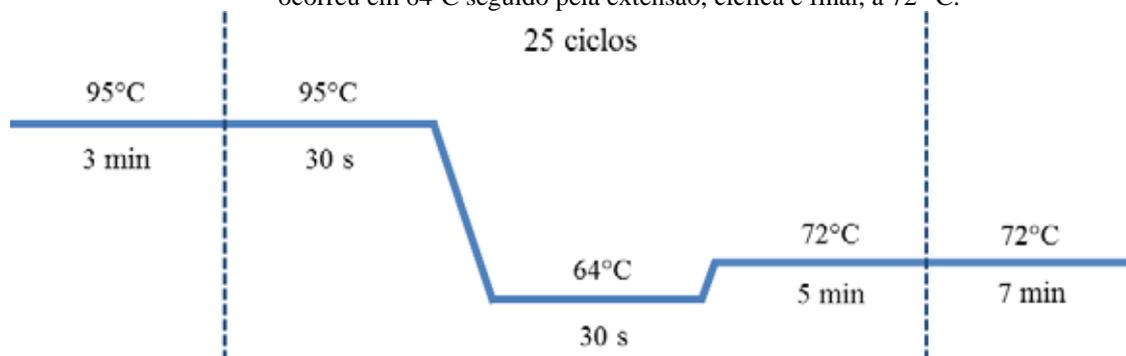
Obteve-se diversos clones de *K. oxytoca* e *R. erythropolis*, dos quais foram selecionados doze. Os doze foram inoculados em 5 mL de meio líquido LB-amp ou LB-can e incubados a 37 °C e 150 rpm, *overnight*. Foi transferido 1 mL dos cultivos para eppendorfs de 1,5 mL e centrifugou-se a 5.000 rpm a 15°C durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e a biomassa ressuspensa em 300 µL de Resuspension Buffer (R3) contendo RNase A (PureLink™ HiPure Plasmid DNA Midiprep Kit) e 300 µL de solução recém preparada de P2 (930 µL de água, 20 µL de NaOH 10 mol/L e 50 µL de SDS 20%). Incubou-se a mistura por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 300 µL de solução P3 (acetato de potássio 3 mol/L em pH 5,5 por ácido acético glacial) e agitou-se por inversão. A mistura foi deixada em geladeira por 1 hora e, em seguida, centrifugada a 10.000 rpm e 4°C durante 15 minutos. Separou-se 500 µL do sobrenadante que foi extraído com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) por agitação em vórtex (10 segundos), seguido de centrifugação a 10.000 rpm e 4°C durante 10 min. Recuperou-se 400 µL da fase aquosa, que acrescida de 400 µL de etanol 95%, 10 µL de NaCl 4 mol/L e levado para freezer por 1 hora. Em seguida, centrifugou-se a 10.000 rpm e 4°C durante 15 min, descartou-se o sobrenadante, o DNA foi lavado em 400 µL de etanol 70% e centrifugado a 10.000 rpm e 4°C durante 15 minutos. O sobrenadante foi removido e secou-se o DNA a temperatura ambiente. Ao final, o DNA foi ressuspensa em 20 µL de tampão TE 1x.

Para as PCRs, os DNA obtidos foram diluídos em água, em uma proporção de 1:2. Foram realizados PCRs com diferentes DNA polimerase; a Phusion High Fidelity DNA polymerase e a KAPA2G Robust DNA Polymerase. Para a primeira, as PCRs foram idênticas à apresentada na Tabela 18 com o ciclo da Figura 25. Já para a KAPA2G, as condições estão apresentadas a seguir.

Tabela 20 – Reagentes e quantidades utilizadas nas reações de ampliações dos genes dos clones de NHase de *K. oxytoca* e *R. erythropolis*, de acordo com as especificações no manual da KAPA2G Robust DNA Polymerase (KappaBiosystems).

<i>Klebsiella oxytoca</i>		<i>Rhodococcus erythropolis</i>	
Reagentes	Quantidade (µL)	Reagentes	Quantidade (µL)
Tampão (KAPA2G BufferB)	5,0	Tampão (KAPA2G GC Buffer)	4,0
dNTPs (10 mmol/L)	0,5	dNTPs (10 mmol/L)	0,4
Primer forward (10 pmol/µL)	5,0	Primer forward (10 pmol/µL)	5,0
Primer reverse (10 pmol/µL)	5,0	Primer reverse (10 pmol/µL)	5,0
DNA	2,0	DNA	1,0
KAPA2G Robust (5 U/µL)	0,1	KAPA2G Robust (5 U/µL)	0,6
MgCl ₂ (25 mmol/L)	0,5	MgCl ₂ (25 mmol/L)	
KAPA Enhancer 1 (5X)	5,0	KAPA Enhancer 1 (5X)	0,2
H ₂ O Milli-Q	1,9	H ₂ O Milli-Q	3,8

Figura 26 – Representação do ciclo de PCR utilizado para as ampliações com KAPA2G Robust DNA Polymerase (KappaBiosystems). A temperatura de desnaturação inicial e cíclica foi de 95°C, o anelamento ocorreu em 64°C seguido pela extensão, cíclica e final, a 72 °C.



Referências

6. REFERÊNCIAS

- 1 GHISALBA, O.; MEYER, H.-P.; WOHLGEMUTH, R. Industrial biotransformation. In: FLICKINGER, M. (Ed.). **Encyclopedia of industrial biotechnology**. New York: John Wiley & Sons, 2009. p. 1-18.
- 2 PARALES, R. E.; BRUCE, N. C.; SCHMID, A.; WACKETT, L. P. Biodegradation, biotransformation, and biocatalysis (B3). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 4699-4709, 2002.
- 3 REETZ, M. T. Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: past, present, and future. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 34, p. 12480-12496, 2013.
- 4 GLASER, J. Biocatalyst greenness. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 16, n. 6, p. 991-999, 2014.
- 5 BORNSCHEUER, U. T.; HUISMAN, G. W.; KAZLAUSKAS, R. J.; LUTZ, S.; MOORE, J. C.; ROBINS, K. Engineering the third wave of biocatalysis. **Nature**, v. 485, n. 7397, p. 185-194, 2012.
- 6 FASAN, R. Natural, engineered, and artificial biocatalysts for organic synthesis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 20, p. 5537-5538, 2014.
- 7 SCHOEMAKER, H. E.; MINK, D.; WUBBOLTS, M. G. Dispelling the myths--biocatalysis in industrial synthesis. **Science**, v. 299, n. 5613, p. 1694-1697, 2003.
- 8 SOLANO, D. M.; HOYOS, P.; HERNÁIZ, M. J.; ALCÁNTARA, A. R.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M. Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 196-207, 2012.
- 9 HOYOS, P.; PACE, V.; HERNÁIZ, M. J.; ALCANTARA, A. R. biocatalysis in the pharmaceutical industry. A greener future. **Current Green Chemistry**, v. 1, n. 2, p. 155-181, 2014.
- 10 CLOUTHIER, C. M.; PELLETIER, J. N. Expanding the organic toolbox: a guide to integrating biocatalysis in synthesis. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 4, p. 1585-1605, 2012.
- 11 FERNANDES, P. Miniaturization in biocatalysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 3, p. 858-879, 2010.
- 12 SHELDON, R. A. Fundamentals of green chemistry: efficiency in reaction design. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 4, p. 1437-1451, 2012.
- 13 PATEL, R. N. Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. **Chiral Catalysis**, v. 252, n. 5-7, p. 659-701, 2008.

- 14 BORNSCHEUER, U. T.; BUCHHOLZ, K. Highlights in biocatalysis – historical landmarks and current trends. **Engineering in Life Sciences**, v. 5, n. 4, p. 309-323, 2005.
- 15 MEYER, H.-P.; EICHHORN, E.; HANLON, S.; LÜTZ, S.; SCHÜRMAN, M.; WOHLGEMUTH, R.; COPPOLECCHIAG, R. The use of enzymes in organic synthesis and the life sciences: perspectives from the Swiss Industrial Biocatalysis Consortium (SIBC). **Catalysis Science & Technology**, v. 3, n. 1, p. 29-40, 2013.
- 16 TORRELO, G.; HANEFELD, U.; HOLLMANN, F. Biocatalysis. **Catalysis Letters**, p. 1-37, 2014.
- 17 NESTL, B. M.; HAMMER, S. C.; NEBEL, B. A.; HAUER, B. New generation of biocatalysts for organic synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 12, p. 3070-3095, 2014.
- 18 ANTHONSEN, T. Chiral drugs: chemistry and biological action. Edited by Guo-Qiang Lin, Qi-Dong You and Jie-Fei Cheng. **ChemMedChem**, v. 7, n. 3, p. 534, 2012.
- 19 POLLARD, D. J.; WOODLEY, J. M. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 66-73, 2007.
- 20 GOTOR, V. Biocatalysis applied to the preparation of pharmaceuticals. **Organic Process Research & Development**, v. 6, n. 4, p. 420-426, 2002.
- 21 LIN, G.-Q.; ZHANG, J.-G.; CHENG, J.-F. Overview of chirality and chiral drugs. In: LIN, G.-Q.; YOU, Q.-D.; CHENG, J.-F. (Ed.). **Chiral drugs**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2011. Chap. 1, p. 3-28.
- 22 WU, L.; VOGT, F. G. A review of recent advances in mass spectrometric methods for gas-phase chiral analysis of pharmaceutical and biological compounds. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 69, p. 133-147, 2012.
- 23 LIMA, P. F. **Avaliação farmacocinética da influência de drogas antiepilépticas indutoras enzimáticas na disposição do levetiracetam em pacientes com epilepsia**. 2010. 150 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
- 24 KENDA, B. M.; MATAGNE, A. C.; TALAGA, P. E.; PASAU, P. M.; DIFFERDING, E.; LALLEMAND, B. I.; FRYCIA, A. M.; MOUREAU, F. G.; KLITGAARD, H. V.; GILLARD, M. R.; B, FUKS.; MICHEL, P. Discovery of 4-substituted pyrrolidone butanamides as new agents with significant antiepileptic activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 3, p. 530-549, Jan. 2004.
- 25 ANURADHA, S.; PREETI, K. Levetiracetam with its therapeutic potentials. **International Journal of Universal Pharmacy and Bio Sciences**, v. 2, n. 5, p. 45-58, 2013.
- 26 KRASOWSKI, M. D.; MCMILLIN, G. A. Advances in anti-epileptic drug testing. **Clinica Chimica Acta**, v. 436, p. 224-236, 2014.

- 27 LYSENG-WILLIAMSON, K. A. Spotlight on levetiracetam in epilepsy. **CNS Drugs**, v. 25, n. 10, p. 901-905, 2011.
- 28 LYSENG-WILLIAMSON, K. A. Levetiracetam - a review of its use in epilepsy. **Drugs**, v. 71, n. 4, p. 489-514, 2011.
- 29 CHAUDHRY, S. A.; JONG, G. T.; KOREN, G. The fetal safety of levetiracetam: a systematic review. **Reproductive Toxicology**, v. 46, p. 40-45, 2014.
- 30 BRODIE, M. J. Antiepileptic drug therapy the story so far. **Seizure**, v. 19, n. 10, p. 650-655, 2010.
- 31 BOOTSMA, H. P. R.; RICKER, L.; DIEPMAN, L.; GEHRING, J.; HULSMAN, J.; LAMBRECHTS, D.; LEENEN, L.; MAJOIE, M.; SCHELLEKENS, A.; DE KROMB, M.; ALDENKAMP, A. P. Long-term effects of levetiracetam and topiramate in clinical practice: A head-to-head comparison. **Seizure**, v. 17, n. 1, p. 19-26, 2008.
- 32 LEVETIRACETAM. In: WHO COLLABORATING CENTRE FOR DRUG STATISTICS METHODOLOGY. **ATC/DDD Index**. Nydalen, 2013. Disponível em: <http://www.whocc.no/atc_ddd_index/?code=N03AX14>. Acesso em: 12 dez. 2014.
- 33 ESPAÑA. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. **Información actualizada de los precios menores de las nuevas agrupaciones homogéneas (Efectivo Octubre 2014)**. 2014. Disponível em: <<http://www.msssi.gob.es/profesionales/farmacia/pdf/ListadoAgruHomoPMoctubre2014.pdf>>. Acesso em: 13 dez. 2014.
- 34 ALEXANDRE JUNIOR, V. **Um estudo sobre fármaco-resistência e potencial utilidade de uma intervenção para reduzir os efeitos adversos em pacientes com epilepsia refratária**. 2009. 120 f. Tese (Doutorado em Medicina) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
- 35 HULHOVEN, R.; ROSILLON, D.; BRIDSON, W. E.; MEEUS, M. A.; SALAS, E.; STOCKIS A. Effect of levetiracetam on cardiac repolarization in healthy subjects: A single-dose, randomized, placebo- and active-controlled, four-way crossover study. **Clinical Therapeutics**, v. 30, n. 2, p. 260-270, 2008.
- 36 UCB PHARMA. **Keppra®**. Brussels, 2014. Disponível em: <<http://www.ucb.com/investors/UCB-today/Keppra>>. Acesso em: 13 dez. 2014.
- 37 TAO, J.; XU, J.-H. Biocatalysis in development of green pharmaceutical processes. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 13, n. 1, p. 43-50, 2009.
- 38 RAJU, V.; SOMAIAH, S.; SASHUKANTH, S.; LAXMINARAYANA, E.; MUKKANTI, K. An asymmetric synthesis of levetiracetam. **Indian Journal of Chemistry**, v. 53B, n. 9, p. 1218-1221, 2014.

- 39 DAS SARMA, K.; ZHANG, J.; HUANG, Y.; DAVIDSON, J. G. Amino acid esters and amides for reductive amination of mucochloric acid: synthesis of novel γ -lactams, short peptides and antiseizure agent levetiracetam (Keppra[®]). **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2006, n. 16, p. 3730-3737, 2006.
- 40 KOTKAR, S. P.; SUDALAI, A. A short enantioselective synthesis of the antiepileptic agent, levetiracetam based on proline-catalyzed asymmetric α -aminooxylation. **Tetrahedron Letters**, v. 47, n. 38, p. 6813-6815, 2006.
- 41 MYLAVARAPUA, R.; ANANDA, R. V.; KONDAIAHA, G. C. M.; REDDYA, L. A.; REDDYA, G. S.; ROYA, A.; BHATTACHARYA, A.; MUKKANTIB, K.; BANDICHHORA, R. An alternate synthesis of levetiracetam. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 3, n. 3, p. 225-230, 2010.
- 42 IMAHORI, T.; OMOTO, K.; HIROSE, Y.; TAKAHATA, H. Asymmetric synthesis of the antiepileptic drug levetiracetam. **Heterocycles**, v. 76, n. 2, p. 1627-1632, 2008.
- 43 MUJAHID, M.; MUJUMDAR, P.; SASIKUMAR, M.; KUNTE, S.S.; MUTHUKRISHNAN, M. An alternate synthesis of enantiomerically pure levetiracetam (Keppra[®]). **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 23, n. 20-21, p. 1542-1515, 2012.
- 44 BABU, K. C.; REDDY, R. B.; NARESH, E.; MOHAN, K. R.; MADHUSUDHAN, G.; MUKKANTI, K. Enantioselective synthesis of antiepileptic drug: (-)-levetiracetam—synthetic applications of the versatile new chiral *N*-sulfinimine. **Journal of Chemistry**, v. 2013, p. 6, 2013.
- 45 BABU, K. C.; REDDY, R. B.; MUKKANTI, K.; SURESH, K.; MADHUSUDHAN, G.; NIGAM, S. Enantioselective synthesis of antiepileptic agent, (-)-levetiracetam, through Evans asymmetric strategy. **Journal of Chemistry**, v. 2013, 2013. doi:10.1155/2013/176512.
- 46 BOSCHIA, F.; CAMPSA, P.; COMES-FRANCHINI, M.; MUÑOZ-TORREROA, D.; RICCI, A.; SÁNCHEZA, L. A synthesis of levetiracetam based on (*S*)-*N*-phenylpantolactam as a chiral auxiliary. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 16, n. 22, p. 3739-3745, 2005.
- 47 BIOVERDANT INC. (United States). J. L. Tucker; L. Xu; W. Yu; R. W. Scott; L. Zhao; N. Ran. **Chemoenzymatic processes for preparation of levetiracetam**. WO 2009/009117 A2, 11 July 2007, 15 Jan. 2009.
- 48 D'ANTONA, N.; MORRONE, R. Biocatalysis: green transformations of nitrile function. In: SHARMA, S. K.; MUDHOO, A. (Ed.). **Green chemistry for environmental sustainability**. New York: CRC Press, 2010. Chap. 17, p. 357-415.
- 49 MASCHARAK, P. K. Structural and functional models of nitrile hydratase. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 225, n. 1-2, p. 201-214, 2002.
- 50 GONG, J.-S.; LU, Z.-M.; LI, H.; SHI, J.-S.; ZGOU, Z.-M.; XU, Z.-H. Nitrilases in nitrile biocatalysis: recent progress and forthcoming research. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, p. 142-159, 2012.

- 51 PRASAD, S.; BHALLA, T. C. Nitrile hydratases (NHases): at the interface of academia and industry. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 725-741, 2010.
- 52 RAMTEKE, P. W.; MAURICE, N. G.; JOSEPH, B.; WADHER, B.J. Nitrile-converting enzymes: an eco-friendly tool for industrial biocatalysis. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 60, n. 5, p. 459-481, 2013.
- 53 KOBAYASHI, M.; SHIMIZU, S. Nitrile hydrolases. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, n. 1, p. 95-102, 2000.
- 54 ASANO, Y.; TANI, Y.; YAMADA, H. A new enzyme “nitrile hydratase” which degrades acetonitrile in combination with amidase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 2251-2252, 1980.
- 55 ASANO, Y.; FUJISHIRO, K.; TANI, Y.; YAMADA, H. Aliphatic nitrile hydratase from *Arthrobacter sp. J-1* purification and characterization. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1165-1174, 1982.
- 56 ASANO, Y.; YASUDA, T.; TANI, Y.; YAMADA, H. A new enzymatic method of acrylamide production. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1183-1189, 1982.
- 57 NELP, M. T.; ASTASHKIN, A. V.; BRECI, L. A.; MCCARTY, R. M.; BANDARIAN, V. The alpha subunit of nitrile hydratase is sufficient for catalytic activity and post-translational modification. **Biochemistry**, v. 53, n. 24, p. 3990-3994, 2014.
- 58 van PELT, S.; ZHANG, M.; OTTEN, L. G.; HOLT, J.; SOROKIN, D. Y.; van RANTWIJK, F.; BLACK, G. W.; PERRY, J. J.; SHELDON, R. A. Probing the enantioselectivity of a diverse group of purified cobalt-centred nitrile hydratases. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 9, n. 8, p. 3011-3019, 2011.
- 59 MIYANAGA, A.; FUSHINOBU, S.; ITO, K.; SHOUN, H.; WAKAGI, T. Mutational and structural analysis of cobalt-containing nitrile hydratase on substrate and metal binding. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 2, p. 429-438, 2004.
- 60 SHEN, Y.; DU, F.; GAO, W.; WANG, A.; CHEN, C. Stereoselective nitrile hydratase. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 32, p. 6114-6121, 2012.
- 61 PARK, S.; KAZLAUSKAS, R. J. Biocatalysis in ionic liquids – advantages beyond green technology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 432-437, 2003.
- 62 DOMÍNGUEZ de MARÍA, P. “Nonsolvent” applications of ionic liquids in biotransformations and organocatalysis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 37, p. 6960-6968, 2008.
- 63 YANG, Z.; PAN, W. Ionic liquids: green solvents for nonaqueous biocatalysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 1, p. 19-28, 2005.

- 64 MONIRUZZAMANA, M.; NAKASHIMAB, K.; KAMIYAA, N.; GOTOA, M. Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 3, p. 295-314, 2010.
- 65 TAVARES, A. P. M.; RODRÍGUEZ, O.; MACEDO, E. A. New generations of ionic liquids applied to enzymatic biocatalysis. In: KADOKAWA, J.-I. (Ed.). **Ionic liquids - new aspects for the future**. Rijeka: InTech, 2013. Chap. 20, p. 537-556.
- 66 GORKE, J.; SRIENC, F.; KAZLAUSKAS, R. Toward advanced ionic liquids. Polar, enzyme-friendly solvents for biocatalysis. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, n. 1, p. 40-53, 2010.
- 67 van RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A. Biocatalysis in ionic liquids. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 6, p. 2757-2785, 2007.
- 68 PARK, S.; KAZLAUSKAS, R. J. Improved preparation and use of room-temperature ionic liquids in lipase-catalyzed enantio- and regioselective acylations. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 66, n. 25, p. 8395-8401, 2001.
- 69 CULL, S. G.; HOLBREY, J. D.; VARGAS-MORA, V.; SEDDON, K. R.; LYE, G. J. Room-temperature ionic liquids as replacements for organic solvents in multiphase bioprocess operations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 69, n. 2, p. 227-233, 2000.
- 70 HOUSAINDOKHT, M. R.; MONHEMI, H.; HOSSEINI, H. E.; GOOGERI, M. S. S.; NAJAFABADI, R. I.; ASHRAF, N.; GHOLIZADEH, M. It is explored that ionic liquids can be suitable solvents for nitrile hydratase catalyzed reactions: a gift of the molecular modeling for the industry. **Journal of Molecular Liquids**, v. 187, p. 30-42, 2013.
- 71 NEUMANN, J.; PAWLIK, M.; BRYNIOK, D.; THÖMING, J.; STOLTE, S. Biodegradation potential of cyano-based ionic liquid anions in a culture of *Cupriavidus* spp. and their in vitro enzymatic hydrolysis by nitrile hydratase. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 16, p. 9495-9505, 2014.
- 72 BAUDEQUINA, C.; BAUDOUSA, J.; LEVILLAINB, J.; CAHARDA, D.; GAUMONTB, A.; PLAQUEVENTA, J. Ionic liquids and chirality: opportunities and challenges. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, n. 20, p. 3081-3093, 2003.
- 73 KENDA, B. M.; MATAGNE, A. C.; TALAGA, P. E.; PASAU, P. M.; DIFFERDING, E.; LALLEMAND, B. I.; FRYCIA, A. M.; MOUREAU, F. G.; KLITGAARD, H. V.; GILLARD, M. R.; B, FUKS.; MICHEL, P. Discovery of 4-substituted pyrrolidone butanamides as new agents with significant antiepileptic activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 3, p. 530-549, 2004.
- 74 ALTENKÄMPER, M.; BECHEM, B.; PERRUCHON, J.; HEINRICH, S.; MÄDEL, A.; ORTMANN, R.; DAHSE, H. M.; FREUNSCHT, E.; WANG, Y.; RATH, J.; STICH, A.; HITZLER, M.; CHIBA, P.; LANZER, M.; SCHLITZER, M. Antimalarial and antitrypanosomal activity of a series of amide and sulfonamide derivatives of a 2,5-diaminobenzophenone. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 22, p. 7690-7697, 2009.

- 75 RAJ, I. V. P.; SURYAVANSHI, G.; SUDALAI, A. Organocatalytic activation of TMSCN by basic ammonium salts for efficient cyanation of aldehydes and imines. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 40, p. 7211-7214, 2007.
- 76 WANG, Y.; FENG, M.; LIU, Y.; ZHANG, X. An efficient cyanosilylation of aldehydes with trimethylsilyl cyanide catalysed by MgI₂ etherate. **Journal of Chemical Research**, v. 36, n. 10, p. 566-567, 2012.
- 77 KANTAM, M. L.; MAHENDAR, K.; SREEDHAR, B.; KUMAR, K. V.; CHOUDARY, B. M. Cyanosilylation of aldehydes and ketones catalyzed by nanocrystalline magnesium oxide. **Synthetic Communications**, v. 38, n. 22, p. 3919-3936, 2008.
- 78 WEN, Y.; LIANG, M.; WANG, Y.; REN, W.; LÜ, X. Perfectly green organocatalysis: quaternary ammonium base triggered cyanosilylation of aldehydes. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 30, n. 9, p. 2109-2114, 2012.
- 79 DEKAMIN, M. G.; KARIMI, Z.; FARAHMAND, M. Tetraethylammonium 2-(*N*-hydroxycarbamoyl)benzoate: a powerful bifunctional metal-free catalyst for efficient and rapid cyanosilylation of carbonyl compounds under mild conditions. **Catalysis Science & Technology**, v. 2, n. 7, p. 1375-1381, 2012.
- 80 CONSTANTIEUX, T.; PICARD, J.-P. Enamines of acylsilanes: electrochemical synthesis, structure, and use as a source of α -(trimethylsilyl)alkylamines. **Organometallics**, v. 15, n. 6, p. 1604-1609, 1996.
- 81 LACOUR, M.-A.; RAHIER, N. J.; TAILLEFER, M. Mild and efficient trimethylsilylcyanation of ketones catalysed by PNP chloride. **Chemistry: A European Journal**, v. 17, n. 44, p. 12276-12279, 2011.
- 82 ZHOU, H.; CHEN, F.-X.; QIN, B.; FENG, X.; ZHANG, G. Cyanosilylation of ketones catalyzed by quaternary ammonium salt and *N*-oxide. **Synlett**, v. 2004, n. 6, p. 1077-1079, 2004.
- 83 LAPWORTH, A. XCVI.-Reactions involving the addition of hydrogen cyanide to carbon compounds. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 83, p. 995-1005, 1903.
- 84 SMITH, M. B.; MARCH, J. **March's advanced organic chemistry: reactions, mechanisms and structure**. 6th ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2006. 2357 p.
- 85 YOUNG, S. D.; BUSE, C. T.; HEATHCOCK, C. H. 2-Methyl-2-(trimethylsiloxy)pentan-3-one. **Organic Syntheses: Collection**, v. 7, p. 381, 1990. doi:10.15227/orgsyn.063.0079.
- 86 HARWOOD, L. M. "Dry-column" flash chromatography. **Aldrichimica Acta**, v. 18, n. 1, p. 25, 1985.
- 87 MUKAIYAMA, T.; KAWATA, K.; SASAKI, A.; ASAMI, M. A convenient method for the preparation of α -chloronitriles. **Chemistry Letters**, v. 8, n. 9, p. 1117-1118, 1979.
- 88 BROWN, G. W. Displacement of hydroxyl groups. In: PATAI, S. (Ed.). **The hydroxyl group (1971)**. Chichester : John Wiley & Sons, 1971. Chap. 11, p. 593-639.

- 89 WIRTH, D. D. Thionyl chloride. In: *e-EROS encyclopedia of reagents for organic synthesis*. New York: John Wiley & Sons, 2001.
- 90 ZHANG, J.; WANG, H.; MA, Y.; WANG, Y.; ZHOU, Z.; TANG, C. CaF₂ catalyzed S_N2 type chlorodehydroxylation of chiral secondary alcohols with thionyl chloride: a practical and convenient approach for the preparation of optically active chloroalkanes. **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 18, p. 2261-2263, 2013.
- 91 JOHNSON, F.; NASUTAVICUS, W. A. Polyfunctional aliphatic compounds. IV. The cyclization of nitriles by halogen acids. A new synthesis of thiazoles. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 28, n. 7, p. 1877-1883, 1963.
- 92 BARBOSA, L. C. D. de A.; ALVARENGA, E. S. de; DEMUNER, A. J.; FIGUEIREDO, R.; SILVA, A. A. da. Synthesis of new aliphatic and aromatic phytotoxic derivatives of 2 α ,4 α -dimethyl-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-6-en-3-one. **Pest Management Science**, v. 59, n. 9, p. 1043-1051, 2003.
- 93 BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; DEMUNER, A. J.; GANEN, F. R.; DA SILVA, A. A. da. Síntese de novas fitotoxinas derivadas do 8-oxabicyclo[3.2.1]oct-6-en-3-ona. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 444-450, 2005.
- 94 HICNETT, A. J.; KAY, F. W. Note on the preparation of phenylacetone nitrile from aromatic aldehydes. **Journal of the Society of Chemical Industry**, v. 54, n. 13, p. T98, 1935.
- 95 PARK, L.; KEUM, G.; KANG, S. B.; KIM, K. S.; KIM, Y. Indium-mediated reductive dehalogenation of α -halocarbonyl compounds in water. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, n. 24, p. 4462-4463, 2000.
- 96 JENNER, G. Homogeneous ruthenium catalysis of *N*-alkylation of amides and lactams. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 55, n. 1, p. 241-246, 1989.
- 97 NISHIBAYASHI, Y.; IMAJIMA, H.; ONODERA, G.; HIDAI, M.; UEMURA, S. preparation of a series of chalcogenolate-bridged diruthenium complexes and their catalytic activities toward propargylic substitution reactions. **Organometallics**, v. 23, n. 1, p. 26-30, 2004.
- 98 GONZÁLEZ-VERA, J. A.; GARCÍA-LÓPEZ, M. T.; HERRANZ, R. Molecular diversity via amino acid derived α -amino nitriles: synthesis of spirocyclic 2,6-dioxopiperazine derivatives. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 70, n. 9, p. 3660-3666, 2005.
- 99 WANG, M.-X.; LIU, J.; WANG, D.-X.; ZHENG, Q.-Y. Synthesis of optically active α -methylamino acids and amides through biocatalytic kinetic resolution of amides. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 16, n. 14, p. 2409-2416, 2005.
- 100 YASUKAWA, K.; HASEMI, R.; ASANO, Y. Dynamic kinetic resolution of α -aminonitriles to form chiral α -amino acids. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 13, p. 2328-2332, 2011.

101 DUPONT, J.; CONSORTI, C. S.; SUAREZ, P. A. Z.; SOUZA, R. F. de. Preparation of 1-butyl-3-methyl imidazolium-based room temperature ionic liquids. **Organic Syntheses: Collection**, v. 10, p. 184, 2004. doi:10.15227/orgsyn.079.0236.

102 AQUINO, A. S. **Estudos de solubilidade de CO₂ em líquidos iônicos formados pelo cátion dialquilimidazólio e diferentes ânions**. 2010. 87 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

103 ZHANG, B.; ZHOU, M.-D.; COKOJA, M.; MINK, J.; ZANG, S.-L.; KÜHN, F. E. Oxidation of sulfides to sulfoxides mediated by ionic liquids. **RSC Advances**, v. 2, n. 22, p. 8416-8420, 2012.

104 JAMESON, L. P.; KIMBALL, J. D.; GRZYCZYNSKI, Z.; BALAZ, M.; DZYUBA, S. V. Effect of ionic liquids on the conformation of a porphyrin-based viscometer. **RSC Advances**, v. 3, n. 40, p. 18300-18304, 2013.

105 DUPONT, J. On the solid, liquid and solution structural organization of imidazolium ionic liquids. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, p. 341-350, 2004.

106 FREIRE, M. G.; NEVES, C. M. S. S.; MARRUCHO, I. M.; COUTINHO, J. A. P.; FERNANDES, A. M. Hydrolysis of tetrafluoroborate and hexafluorophosphate counter ions in imidazolium-based ionic liquids. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 114, n. 11, p. 3744-3749, 2009.

107 CHEN, J.; SPEAR, S. K.; HUDDLESTON, J. G.; ROGERS, R. D. Polyethylene glycol and solutions of polyethylene glycol as green reaction media. **Green Chemistry**, v. 7, n. 2, p. 64-82, 2005.

108 TAKADA, S. C. S. **Estudo da reação de Passerini em solventes alternativos**. 2006. 161 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília. 2006.

109 van den ENT, F.; LÖWE, J. RF cloning: a restriction-free method for inserting target genes into plasmids. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 67, n. 1, p. 67-74, 2006.

110 BOND, S. R.; NAUS, C. C. RF-Cloning.org: an online tool for the design of restriction-free cloning projects. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. Web Server Issue, p. W209-213, 2012.

111 PEI, X.; YANG, L.; XU, G.; WANG, Q.; WU, J. Discovery of a new Fe-type nitrile hydratase efficiently hydrating aliphatic and aromatic nitriles by genome mining. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 26-33, 2014.

112 PLASMID: pACYCDuet-1. In: ADDGENE. **Vector Database**. Disponível em: <<http://www.addgene.org/vector-database/1680/>>. Acesso em: 02 jan. 2014.

113 PLASMID: pKK223-3. In: ADDGENE. **Vector Database**. Disponível em: <<http://www.addgene.org/vector-database/3332/>>. Acesso em: 02 jan. 2014.

Anexos

7. ANEXOS

7.1 Lista de espectros

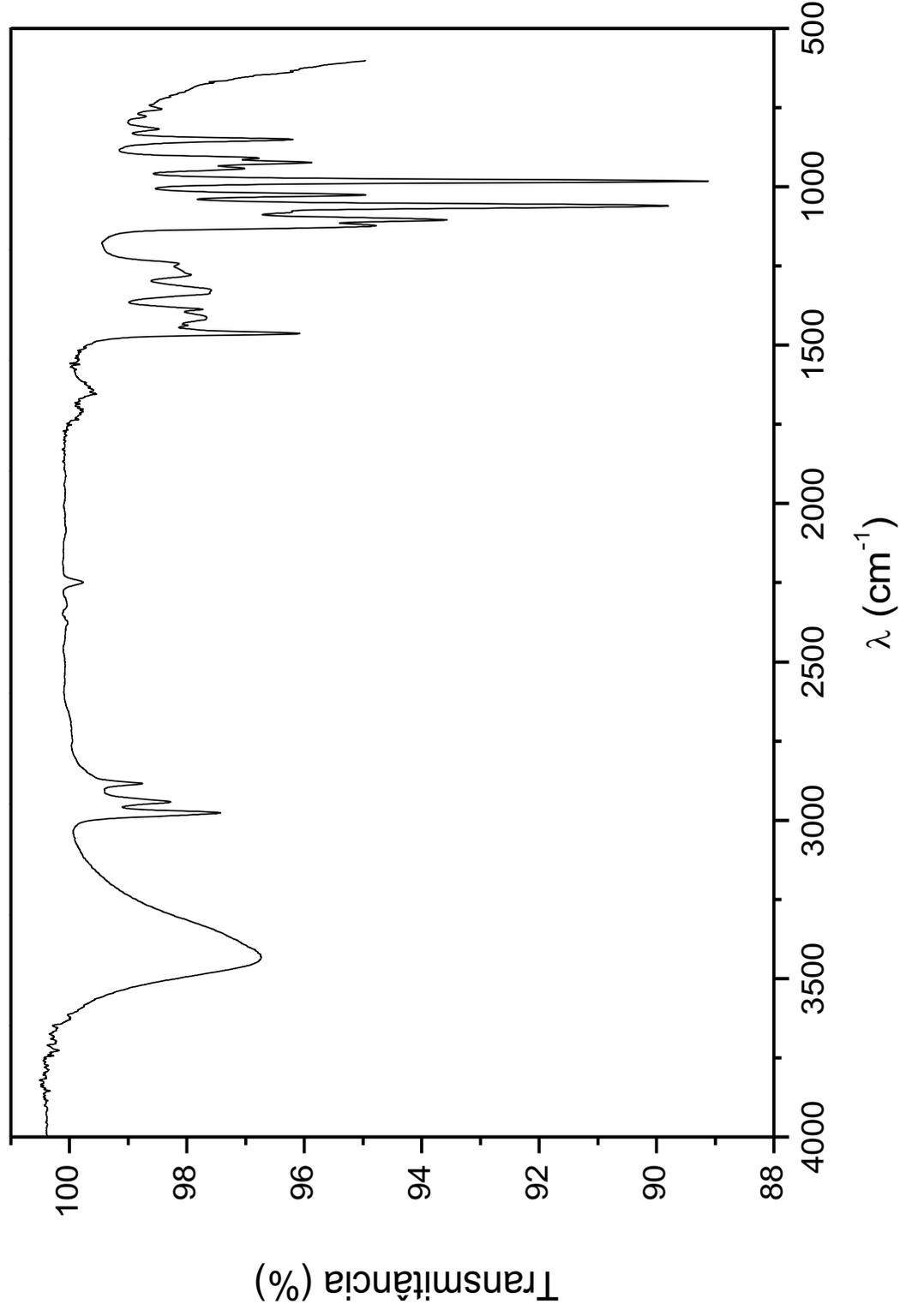
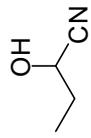
E01 - Espectro no IV da 2-hidroxiutanonitrila 2 .	135
E02 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-hidroxiutanonitrila 2 .	136
E03 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) da 2-hidroxiutanonitrila 2 .	137
E04 - Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) e experimento DEPT-135 da 2-hidroxiutanonitrila 2 .	138
E05 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-bromobutanonitrila 3 .	139
E06 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-cloro-2-fenilacetnitrila 3' .	140
E07 - Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, CDCl_3) da 2-cloro-2-fenilacetnitrila 3' .	141
E08 - Espectro no IV da 2-(2-oxopirrolidin-1-il)butanonitrila 4a .	142
E09 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-(2-oxopirrolidin-1-il)butanonitrila 4a .	143
E10 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) da 2-(2-oxopirrolidin-1-il)butanonitrila 4a .	144
E11 - Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) e experimento DEPT-135 da 2-(2-oxopirrolidin-1-il)butanonitrila 4a .	145
E12 - Espectro no IV da 2-(2-oxopiperidin-1-il)butanonitrila 4b .	146
E13 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-(2-oxopiperidin-1-il)butanonitrila 4b .	147
E14 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) da 2-(2-oxopiperidin-1-il)butanonitrila 4b .	148
E15 - Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) e experimento DEPT-135 da 2-(2-oxopiperidin-1-il)butanonitrila 4b .	149
E16 - Espectro no IV da 2-(3-oxopiperazin-1-il)butanonitrila 4c .	150
E17 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-(3-oxopiperazin-1-il)butanonitrila 4c .	151
E18 - Espectro de RMN de ^1H da (300,19 MHz, CDCl_3) 2-(3-oxopiperazin-1-il)butanonitrila 4c .	152
E19 - Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) e experimento DEPT-135 da 2-(3-oxopiperazin-1-il)butanonitrila 4c .	153

E20 - Espectro no IV da 2-(4-metilpiperazin-1-il)butanonitrila 4d .	154
E21 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-(4-metilpiperazin-1-il)butanonitrila 4d .	155
E22 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) da 2-(4-metilpiperazin-1-il)butanonitrila 4d .	156
E23 - Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) e experimento DEPT-135 da 2-(4-metilpiperazin-1-il)butanonitrila 4d .	157
E24 - Espectro no IV da 2-(2-oxopirrolidin-1-il)-2-fenilacetona 4'a .	158
E25 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-(2-oxopirrolidin-1-il)-2-fenilacetona 4'a .	159
E26 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) da 2-(2-oxopirrolidin-1-il)-2-fenilacetona 4'a .	160
E27 - Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) e experimento DEPT-135 da 2-(2-oxopirrolidin-1-il)-2-fenilacetona 4'a .	161
E28 - Espectro no IV da 2-(2-oxopiperidin-1-il)-2-fenilacetona 4'b .	162
E29 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-(2-oxopiperidin-1-il)-2-fenilacetona 4'b .	163
E30 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) da 2-(2-oxopiperidin-1-il)-2-fenilacetona 4'b .	164
E31 - Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) e experimento DEPT-135 da 2-(2-oxopiperidin-1-il)-2-fenilacetona 4'b .	165
E32 - Espectro no IV da 2-(3-oxopiperazin-1-il)-2-fenilacetona 4'c .	166
E33 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-(3-oxopiperazin-1-il)-2-fenilacetona 4'c .	167
E34 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da 2-(3-oxopiperazin-1-il)-2-fenilacetona 4'c .	168
E35 - Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) e experimento DEPT-135 da 2-(3-oxopiperazin-1-il)-2-fenilacetona 4'c .	169
E36 - Espectro no IV da 2-(4-metilpiperazin-1-il)-2-fenilacetona 4'd .	170
E37 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-(4-metilpiperazin-1-il)-2-fenilacetona 4'd .	171
E38 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) da 2-(4-metilpiperazin-1-il)-2-fenilacetona 4'd .	172

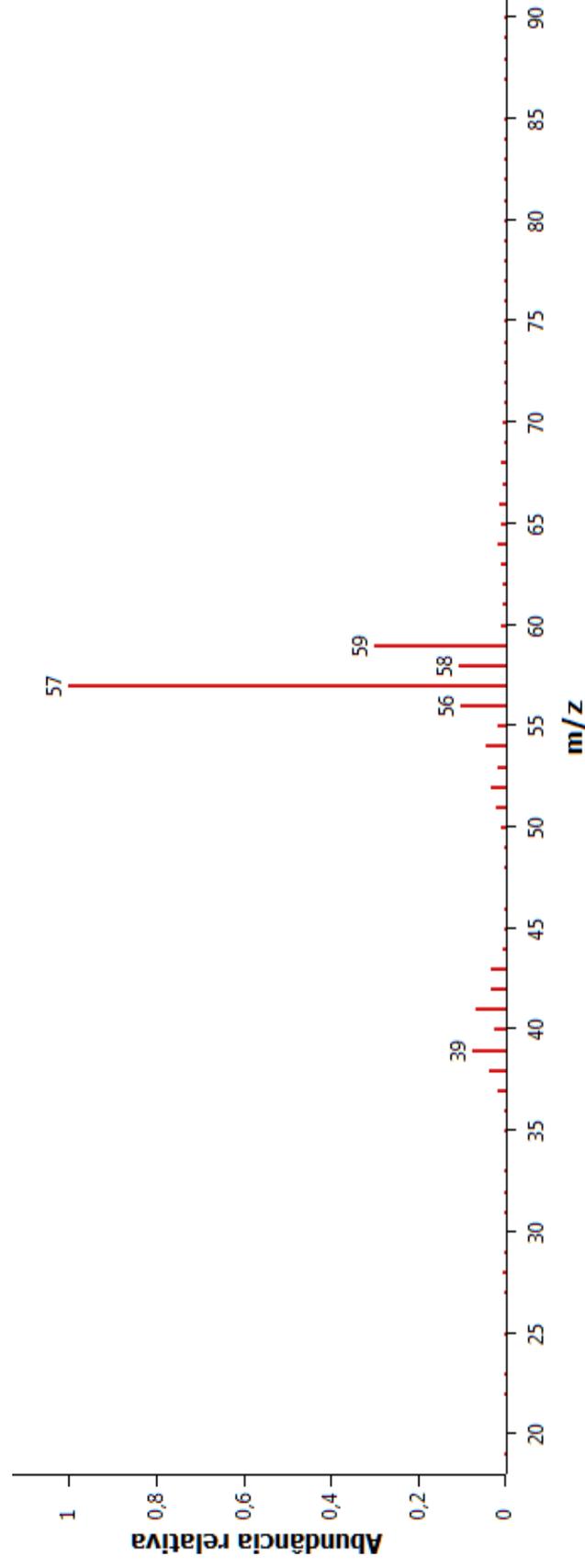
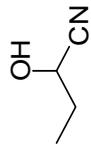
E39 - Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) e experimento DEPT-135 da 2-(4-metilpiperazin-1-il)-2-fenilacetoneitrila 4'd .	173
E40 - Espectro no IV da 2-(2-oxopirrolidin-1-il)butanamida 5a .	174
E41 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-(2-oxopirrolidin-1-il)butanamida 5a .	175
E42 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) da 2-(2-oxopirrolidin-1-il)butanamida 5a .	176
E43 - Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) e experimento DEPT da 2-(2-oxopirrolidin-1-il)butanamida 5a .	177
E44 - Espectro no IV da 2-(2-oxopiperidin-1-il)butanamida 5b .	178
E45 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-(2-oxopiperidin-1-il)butanamida 5b .	179
E46 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) da 2-(2-oxopiperidin-1-il)butanamida 5b .	180
E47 - Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) e experimento DEPT da 2-(2-oxopiperidin-1-il)butanamida 5b .	181
E48 - Espectro no IV da 2-(4-metilpiperazin-1-il)butanamida 5d .	182
E49 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-(4-metilpiperazin-1-il)butanamida 5d .	183
E50 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) da 2-(4-metilpiperazin-1-il)butanamida 5d .	184
E51 - Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) e experimento DEPT-135 da 2-(4-metilpiperazin-1-il)butanamida 5d .	185
E52 - Espectro no IV da 2-(2-oxopirrolidin-1-il)-2-fenilacetamida 5'a .	186
E53 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-(2-oxopirrolidin-1-il)-2-fenilacetamida 5'a .	187
E54 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) da 2-(2-oxopirrolidin-1-il)-2-fenilacetamida 5'a .	188
E55 - Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) e experimento DEPT-135 da 2-(2-oxopirrolidin-1-il)-2-fenilacetamida 5'a .	189
E56 - Espectro no IV da 2-(2-oxopiperidin-1-il)-2-fenilacetamida 5'b .	190
E57 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-(2-oxopiperidin-1-il)-2-fenilacetamida 5'b .	191

E58 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) da 2-(2-oxopiperidin-1-il)-2-fenilacetamida 5'b .	192
E59 - Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) e experimento DEPT-135 da 2-(2-oxopiperidin-1-il)-2-fenilacetamida 5'b .	193
E60 - Espectro no IV da 2-(4-metilpiperazin-1-il)-2-fenilacetamida 5'd .	194
E61 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-(4-metilpiperazin-1-il)-2-fenilacetamida 5'd .	195
E62 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) da 2-(4-metilpiperazin-1-il)-2-fenilacetamida 5'd .	196
E63 - Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) e experimento DEPT-135 da 2-(4-metilpiperazin-1-il)-2-fenilacetamida 5'd .	197
E64 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio.	198
E65 - Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio.	199
E66 - Espectro de massas (MALDI-(+)-TOF-MS) do cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio.	200
E67 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio.	201
E68 - Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio.	202
E69 - Espectro de RMN de ^{19}F (376,48 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio.	203
E70 - Termograma do tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio.	204
E71 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio.	205
E72 - Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio.	206
E73 - Espectro de RMN de ^{19}F (376,48 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio.	207
E74 - Termograma do hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio.	208
E75 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do bis[(trifluorometil)sulfonyl]imida de 1-butil-3-metilimidazólio.	209

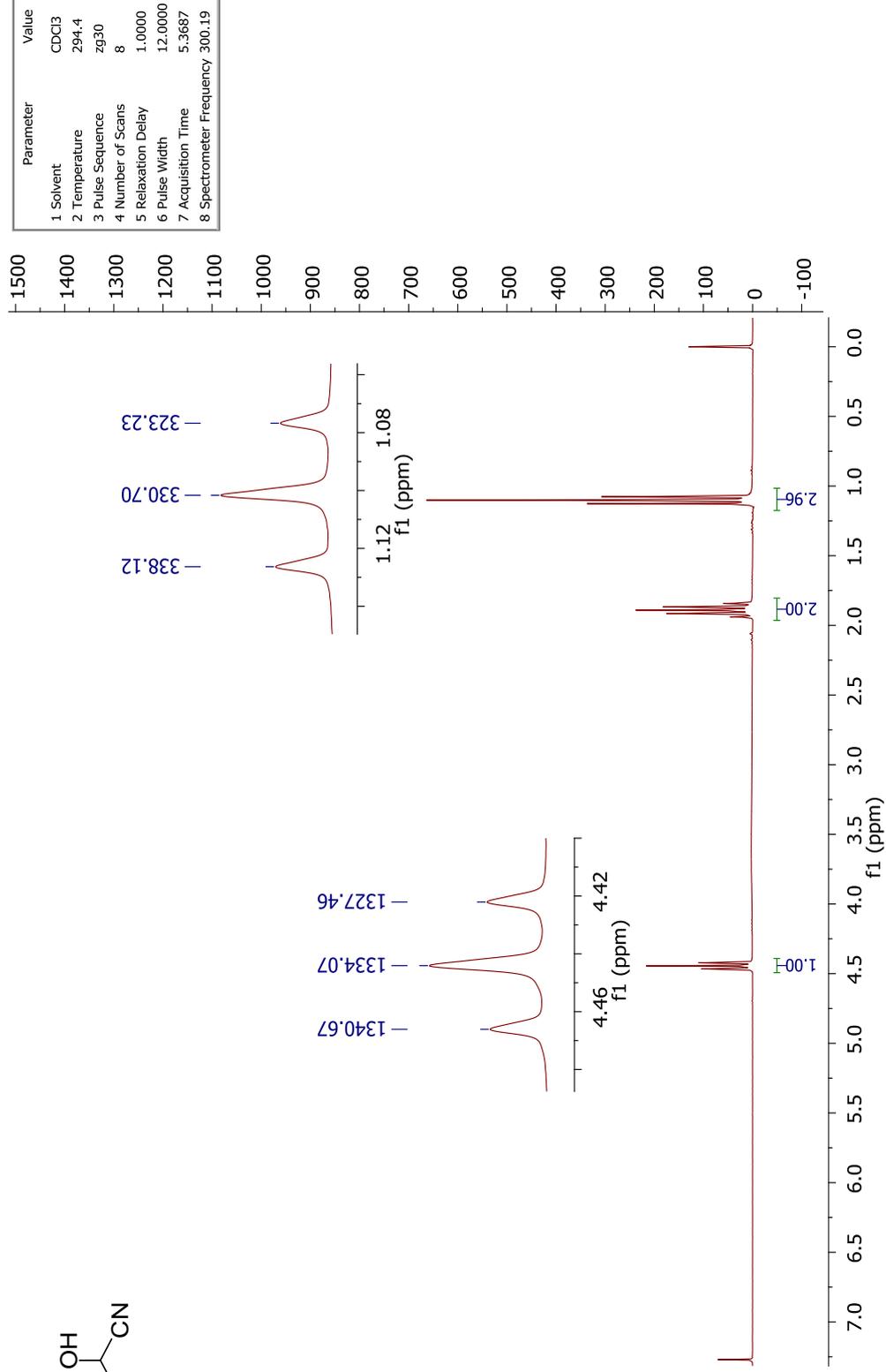
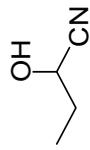
- E76** - Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do 210
bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-butil-3-metilimidazólio.
- E77** - Espectro de RMN de ^{19}F (376,48 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do 211
bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-butil-3-metilimidazólio.
- E78** - Termograma do bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-butil-3-metilimidazólio. 212



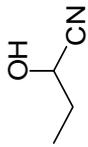
E01 - Espectro no IV da 2-hidroxiбутанонитрила **2**.



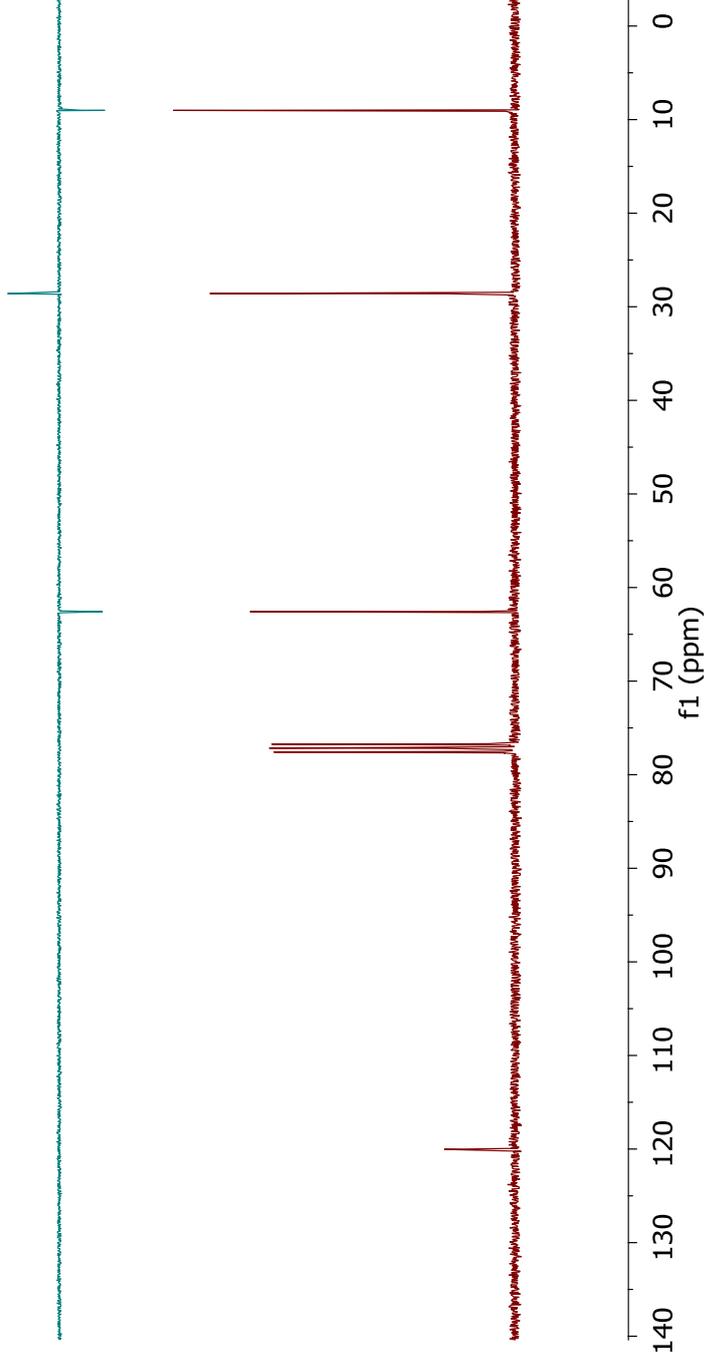
E02 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-hidroxióbutanonitrila **2**.



E03 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) da 2-hidroxiбутанонитрила **2**.

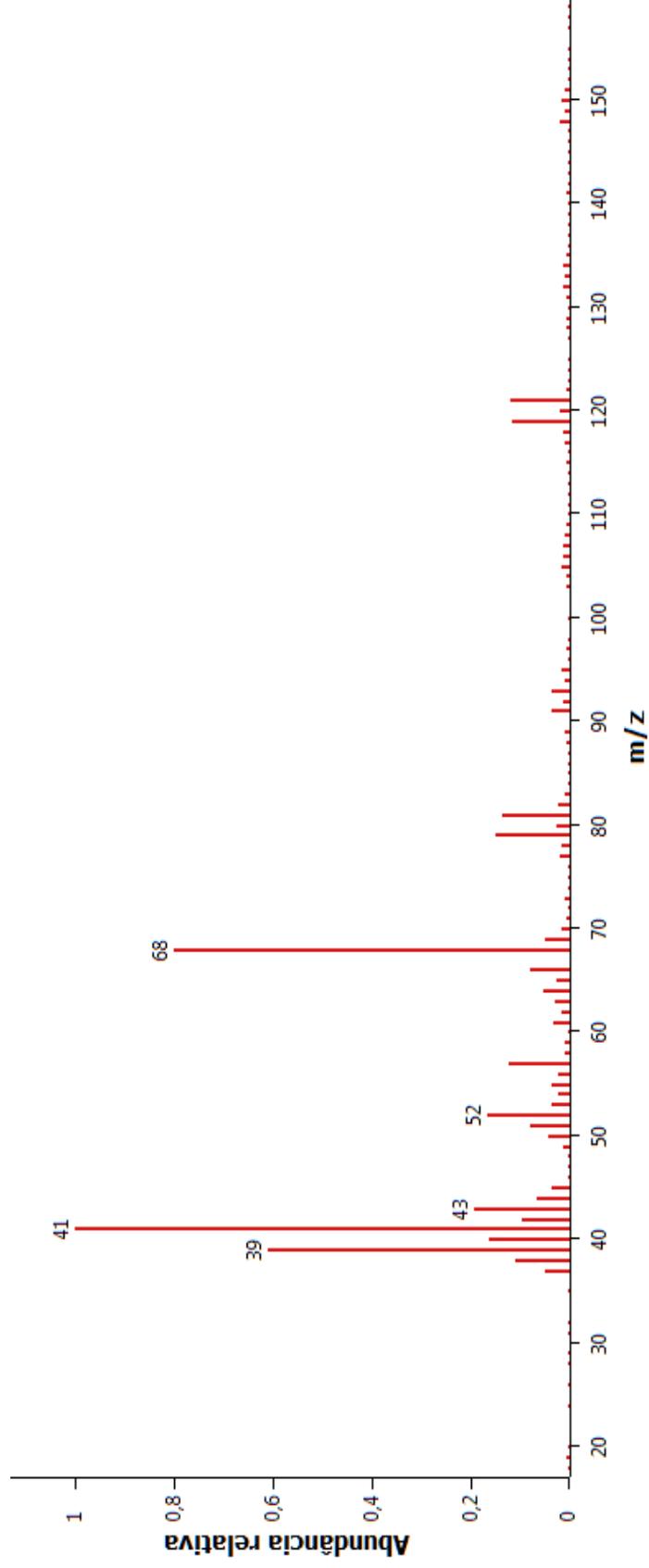
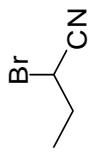


Parameter	Value
1 Solvent	CDCl ₃
2 Temperature	295.6
3 Pulse Sequence	dept135
4 Number of Scans	36
5 Relaxation Delay	1.5000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48

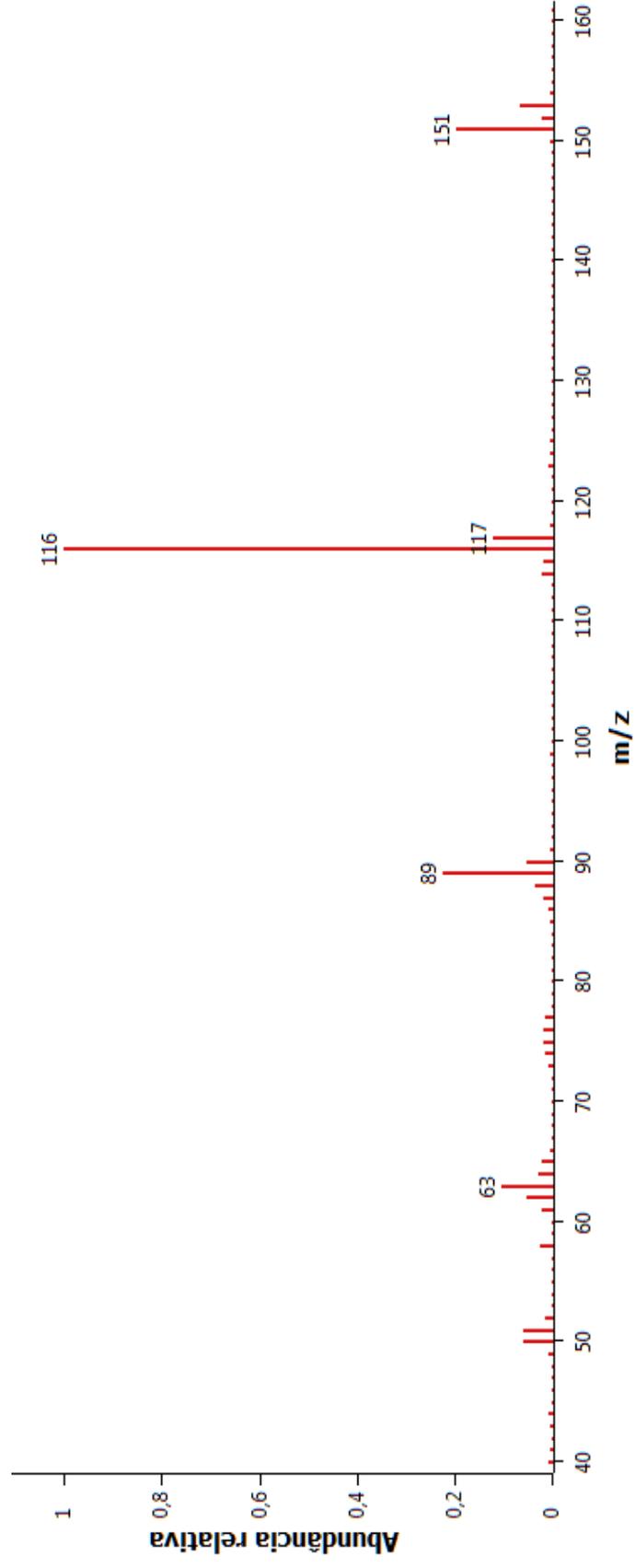
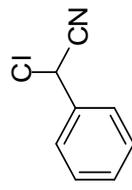


Parameter	Value
1 Solvent	CDCl ₃
2 Temperature	295.3
3 Pulse Sequence	zpgq30
4 Number of Scans	256
5 Relaxation Delay	1.0000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48

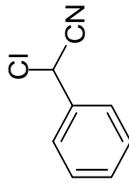
E04 - Espectro de RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃) e experimento DEPT-135 da 2-hidroxiutanonitrila **2**.



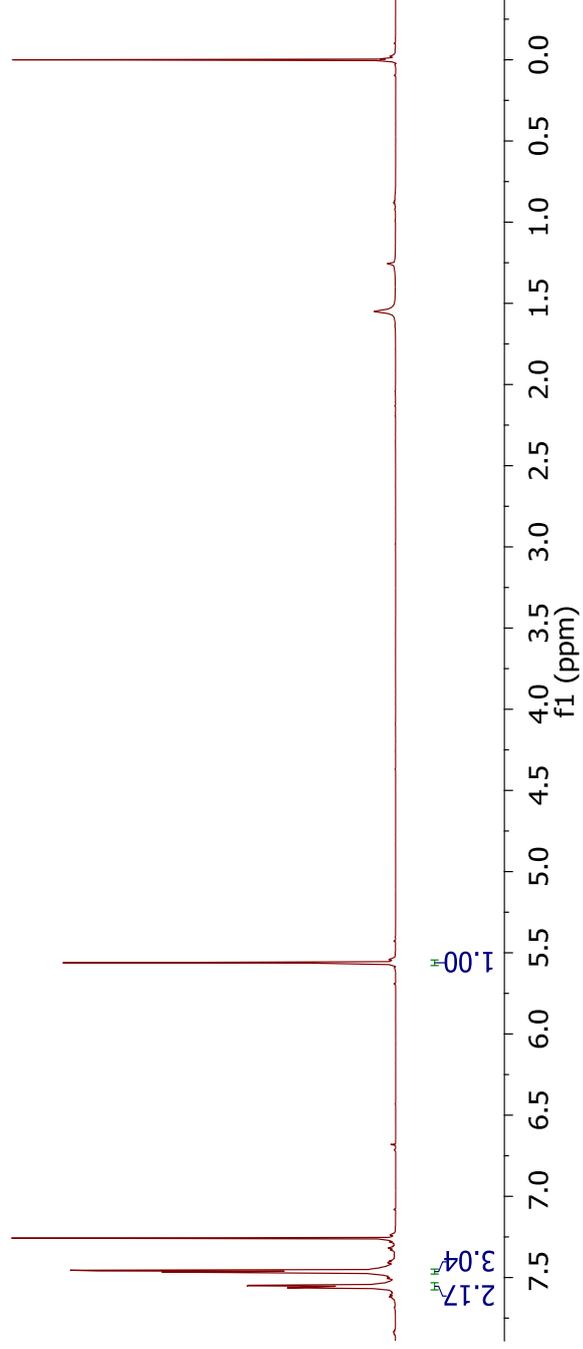
E05 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-bromobutanonitrila **3**.



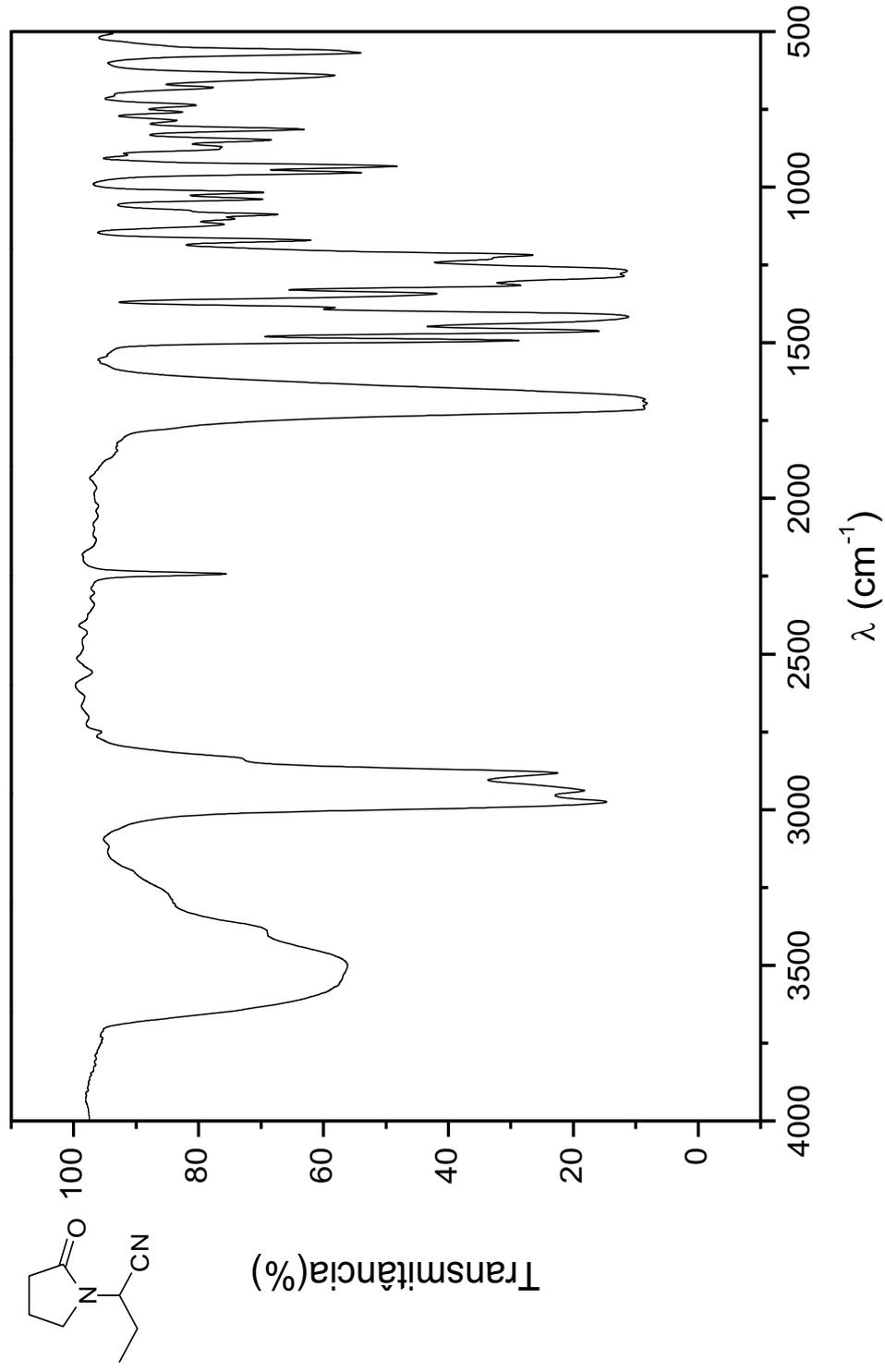
E06 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-cloro-2-fenilacetnitrila **3'**.



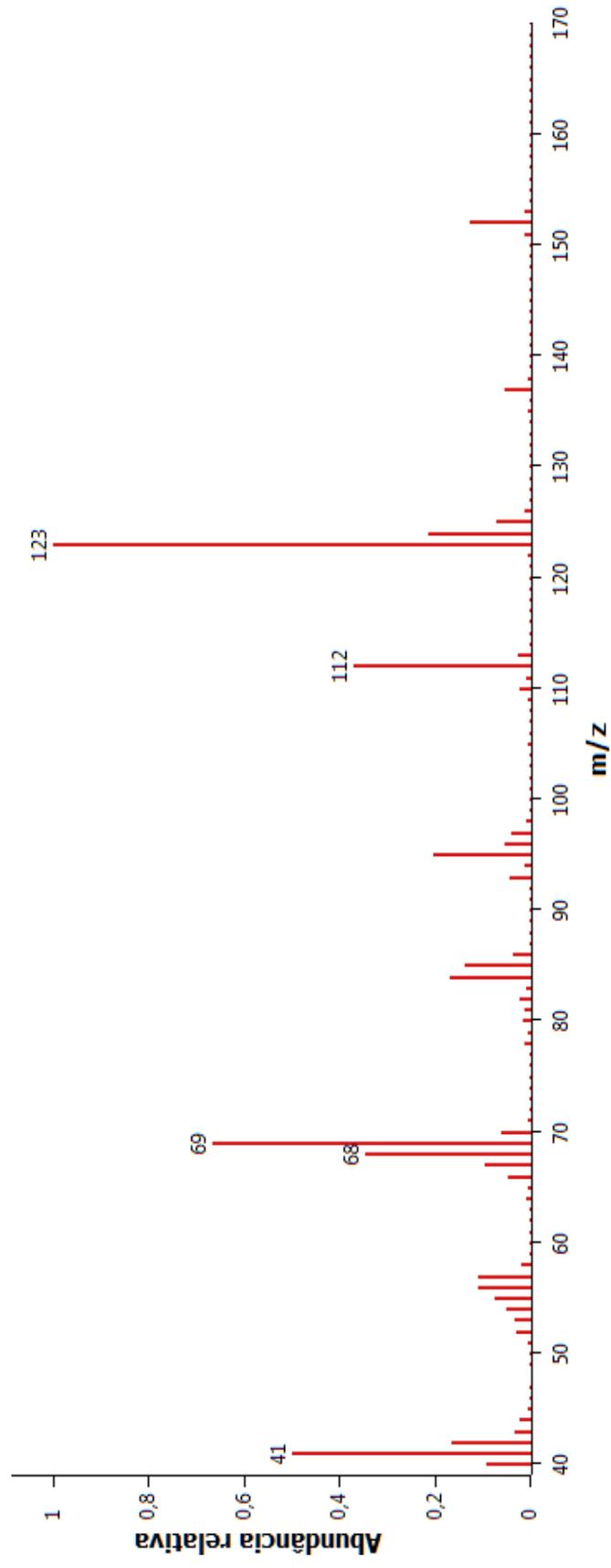
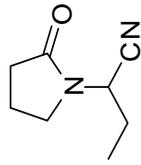
Parameter	Value
1 Solvent	CDCl ₃
2 Temperature	299.1
3 Pulse Sequence	zg30
4 Number of Scans	16
5 Relaxation Delay	1.0000
6 Pulse Width	11.0000
7 Acquisition Time	2.7263
8 Spectrometer Frequency	600.13



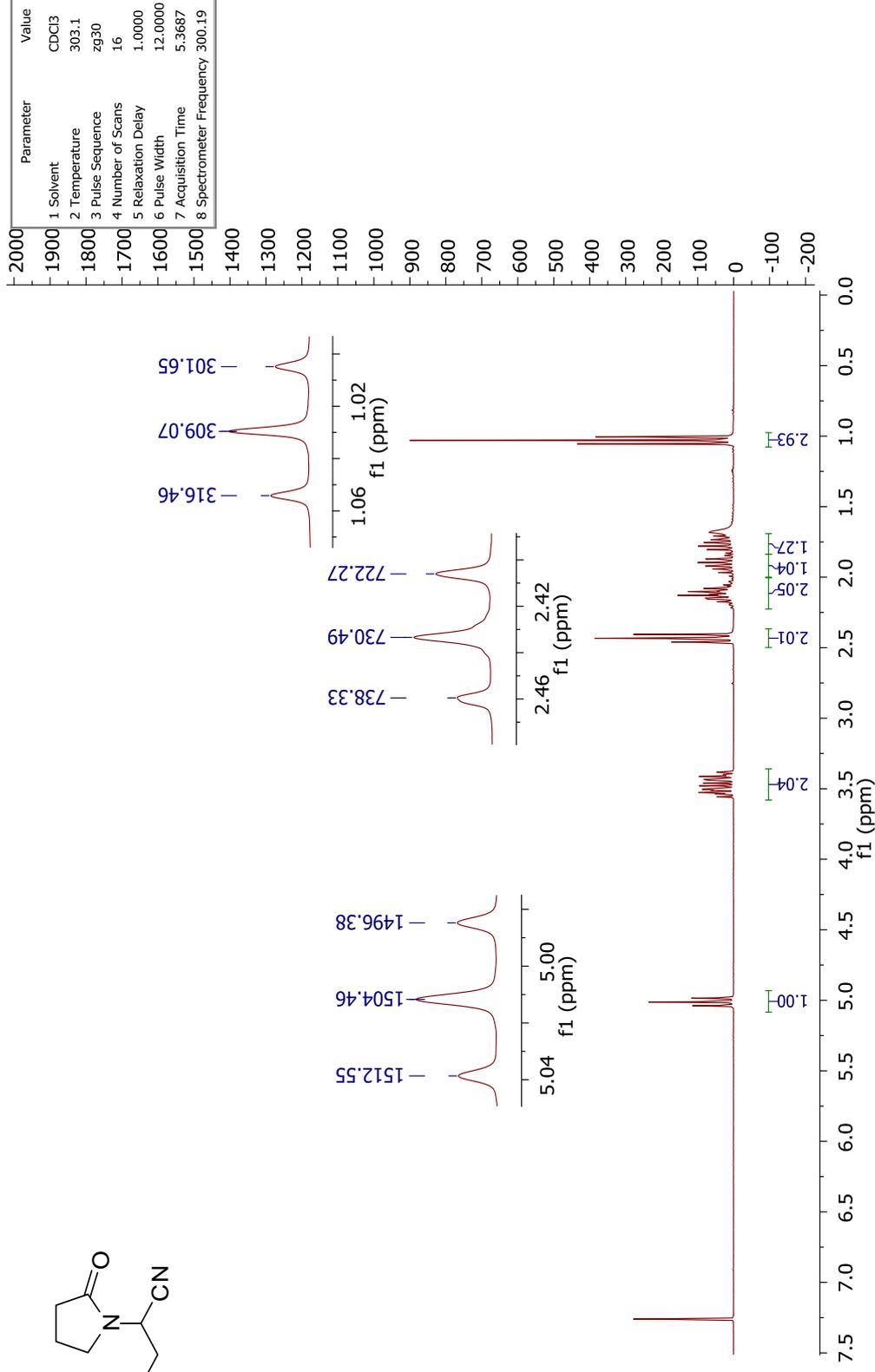
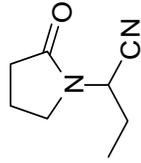
E07 - Espectro de RMN de ¹H (600,13 MHz, CDCl₃) da 2-cloro-2-fenilacetona 3'.



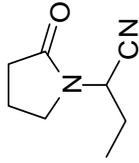
E08 - Espectro no IV da 2-(2-oxopirrolidin-1-yl)butanonitrila **4a**.



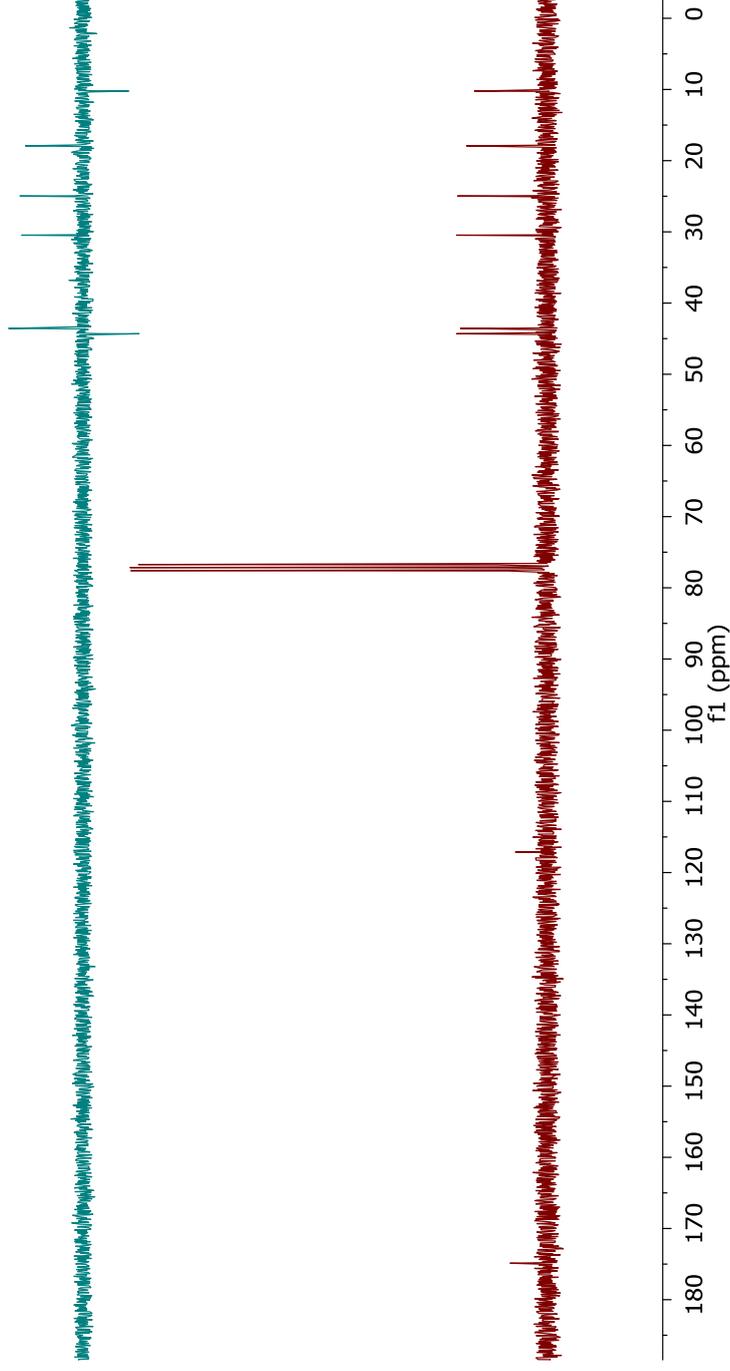
E09 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-(2-oxopirrolidin-1-yl)butanonitrila **4a**.



E10 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) da 2-(2-oxopirrolidin-1-yl)butanenitrila **4a**.

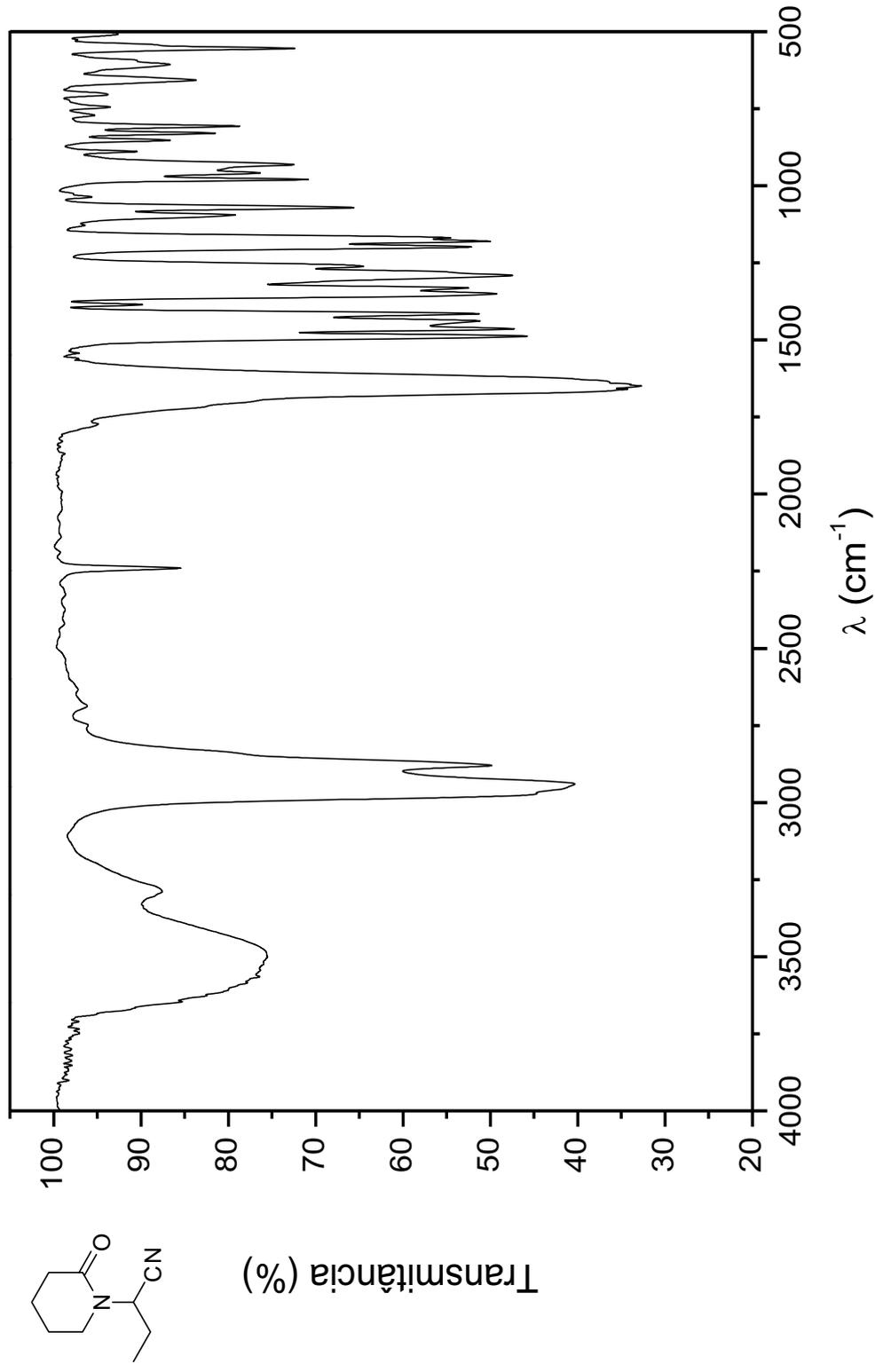


Parameter	Value
1 Solvent	CDCl ₃
2 Temperature	302.9
3 Pulse Sequence	dept135
4 Number of Scans	101
5 Relaxation Delay	1.5000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48

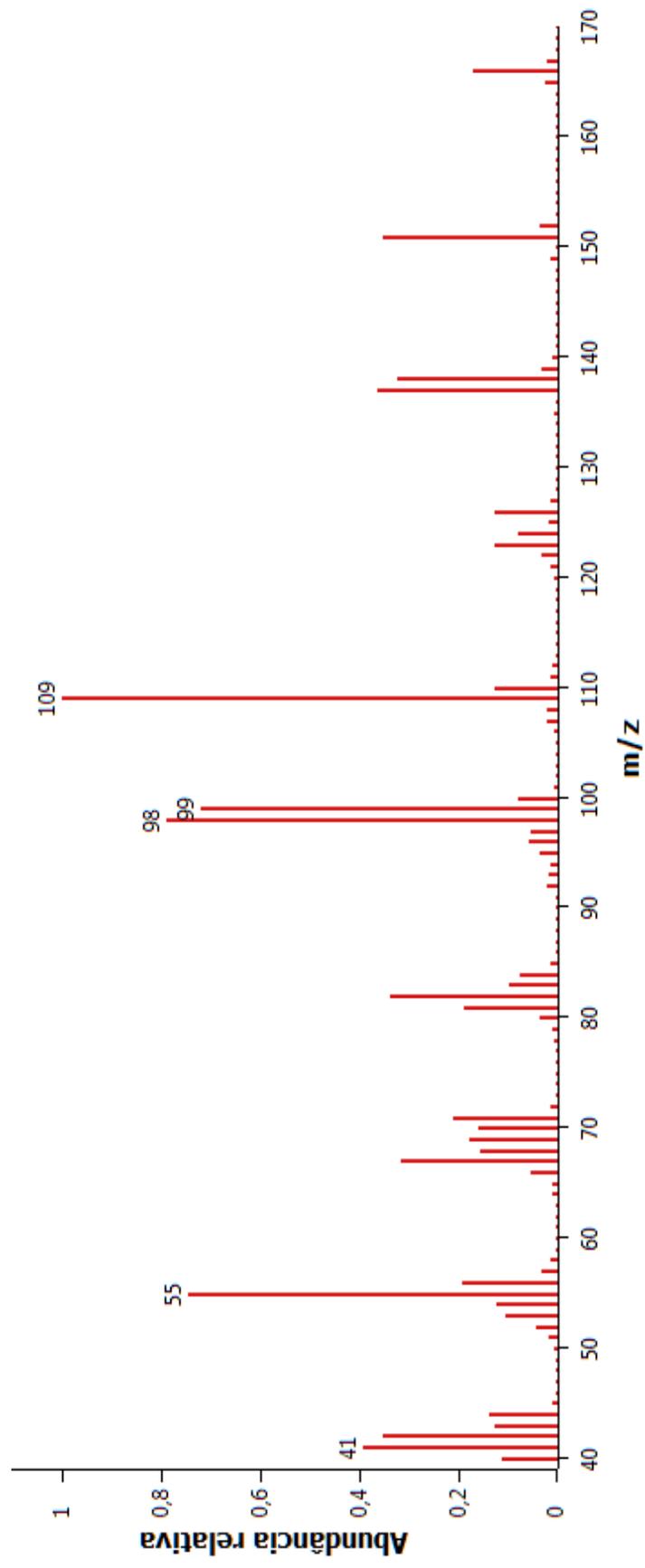
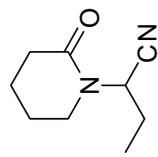


Parameter	Value
1 Solvent	CDCl ₃
2 Temperature	303.2
3 Pulse Sequence	zgpg30
4 Number of Scans	180
5 Relaxation Delay	1.0000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48

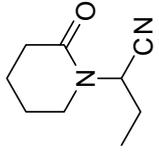
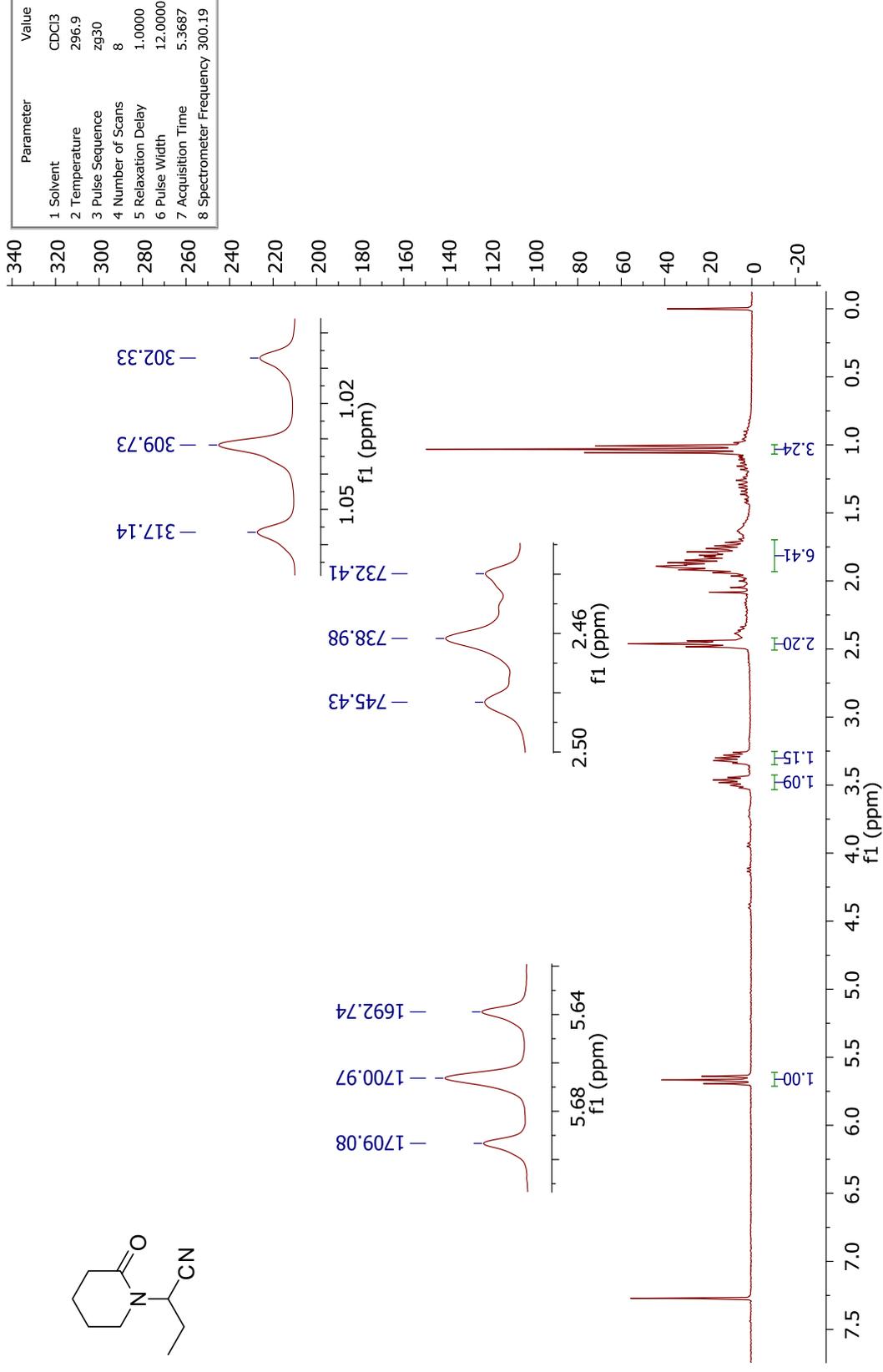
E11 - Espectro de RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃) e experimento DEPT-135 da 2-(2-oxopiperidin-1-yl)butanenitrila **4a**.



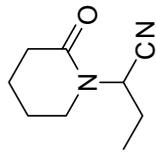
E12 - Espectro no IV da 2-(2-oxopiperidin-1-yl)butanenitrila **4b**.



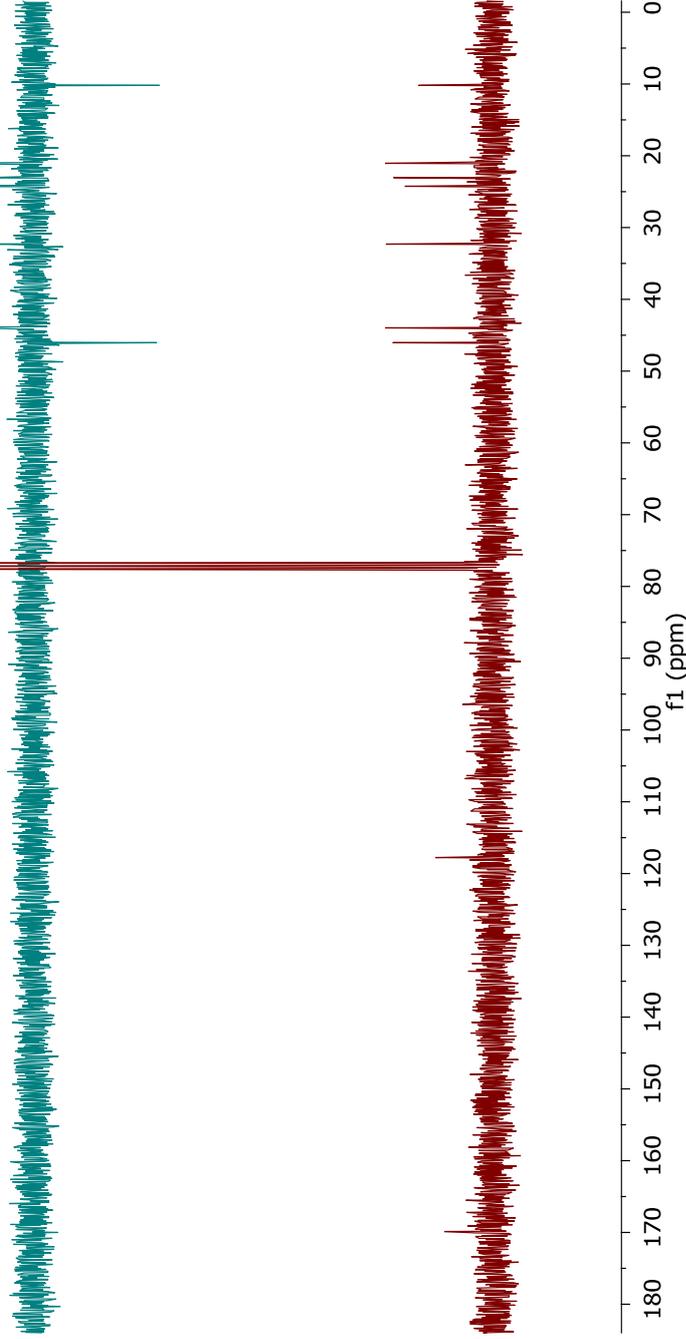
E13 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-(2-oxopiperidin-1-il)butanonitrila **4b**.



E14 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) da 2-(2-oxopiperidin-1-il)butanonitrila **4b**.

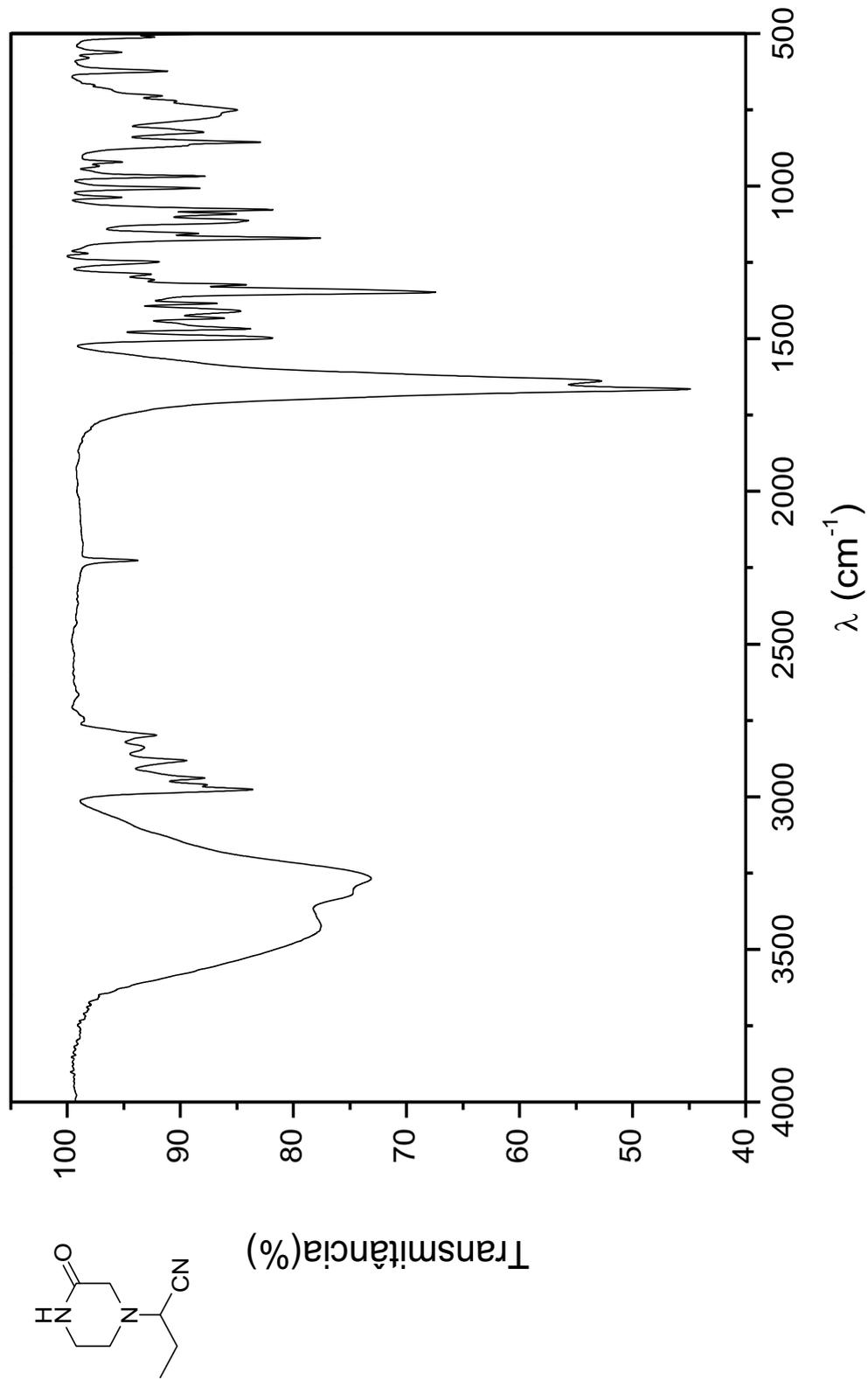


Parameter	Value
1 Solvent	CDCl ₃
2 Temperature	297.2
3 Pulse Sequence	dept135
4 Number of Scans	120
5 Relaxation Delay	1.5000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48

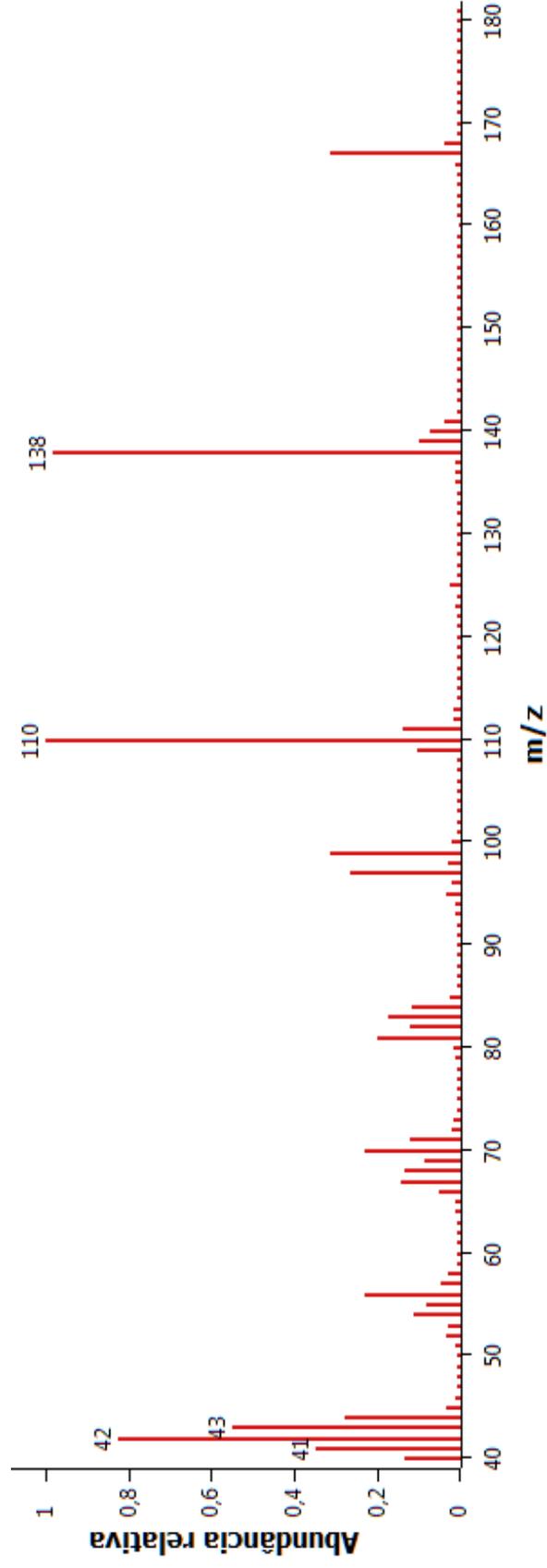
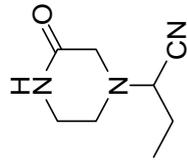


Parameter	Value
1 Solvent	CDCl ₃
2 Temperature	297.0
3 Pulse Sequence	zpgg30
4 Number of Scans	132
5 Relaxation Delay	1.0000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48

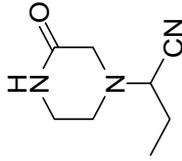
E15 - Espectro de RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃) e experimento DEPT-135 da 2-(2-oxopiperidin-1-il)butanonitrila **4b**.



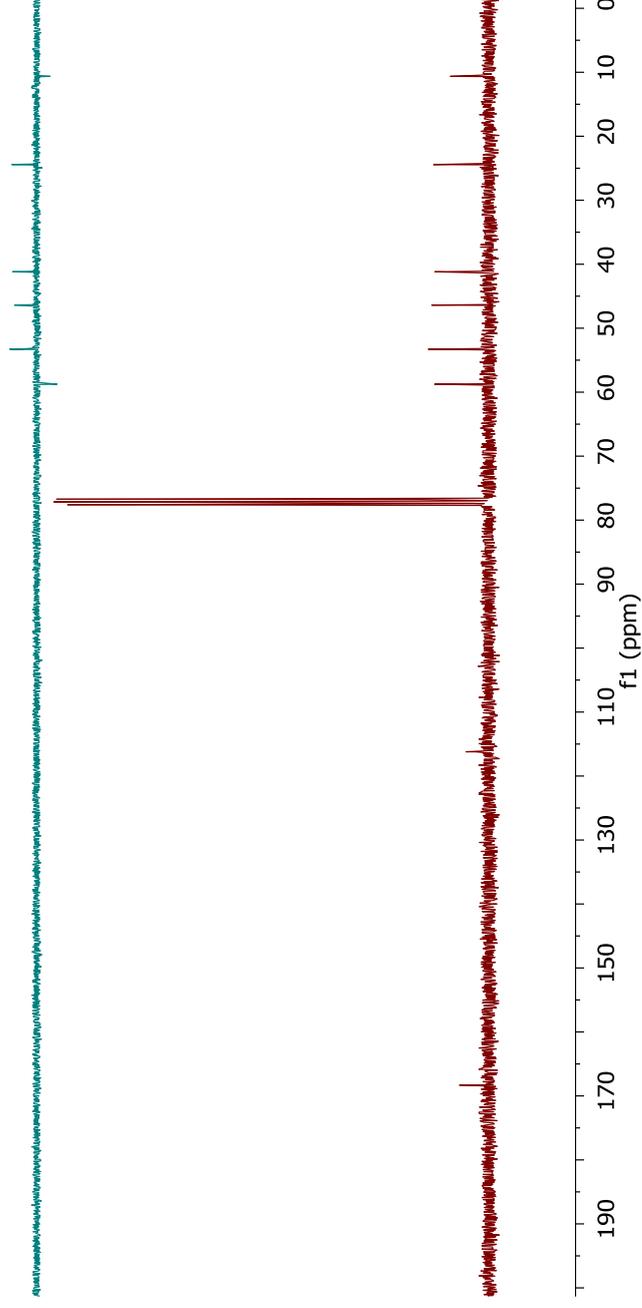
E16 - Espectro no IV da 2-(3-oxopiperazin-1-yl)butanenitrila **4c**.



E17 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-(3-oxopiperazin-1-yl)butanenitrila **4c**.

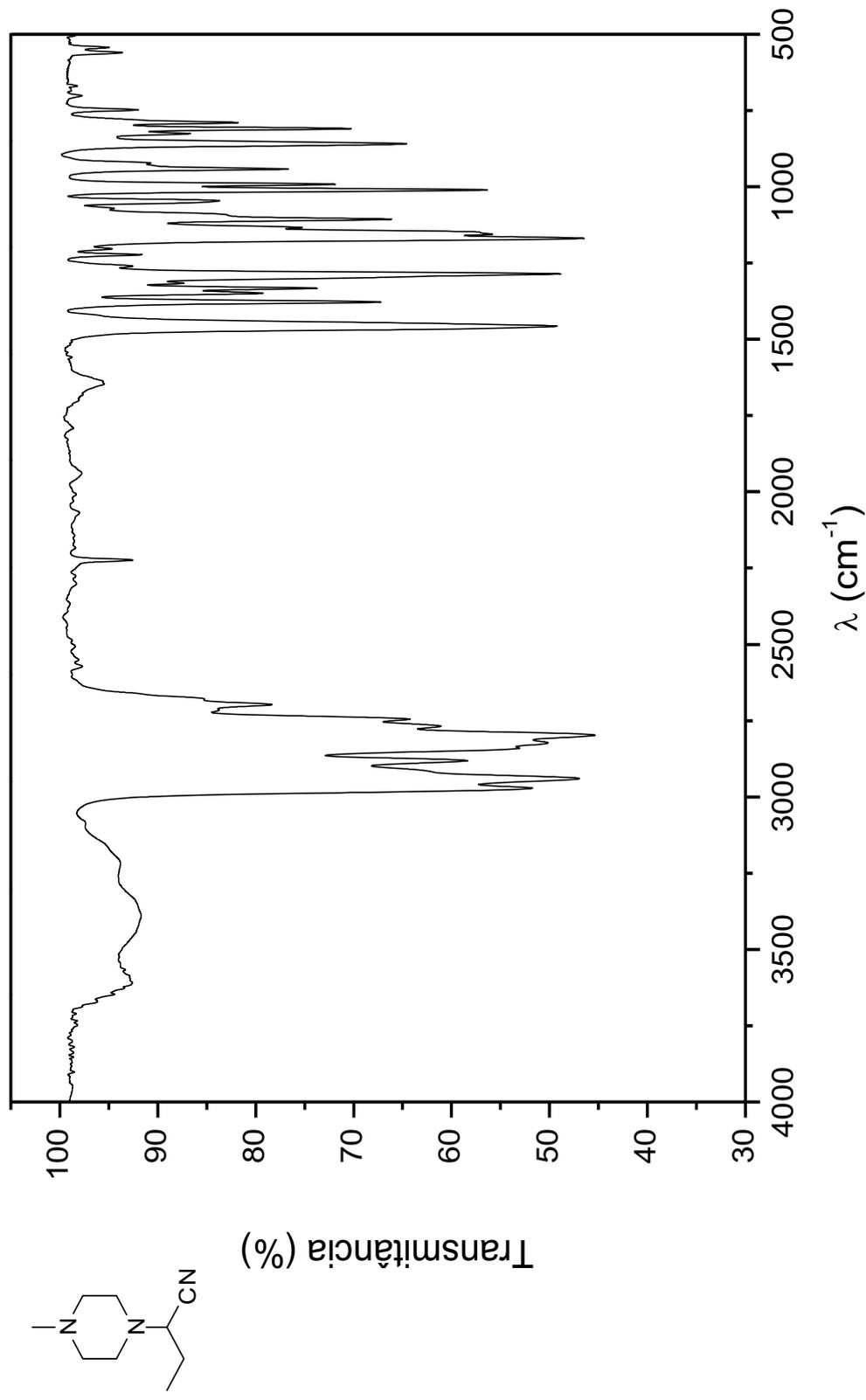


Parameter	Value
1 Solvent	CDCl ₃
2 Temperature	303.0
3 Pulse Sequence	dept135
4 Number of Scans	129
5 Relaxation Delay	1.5000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48

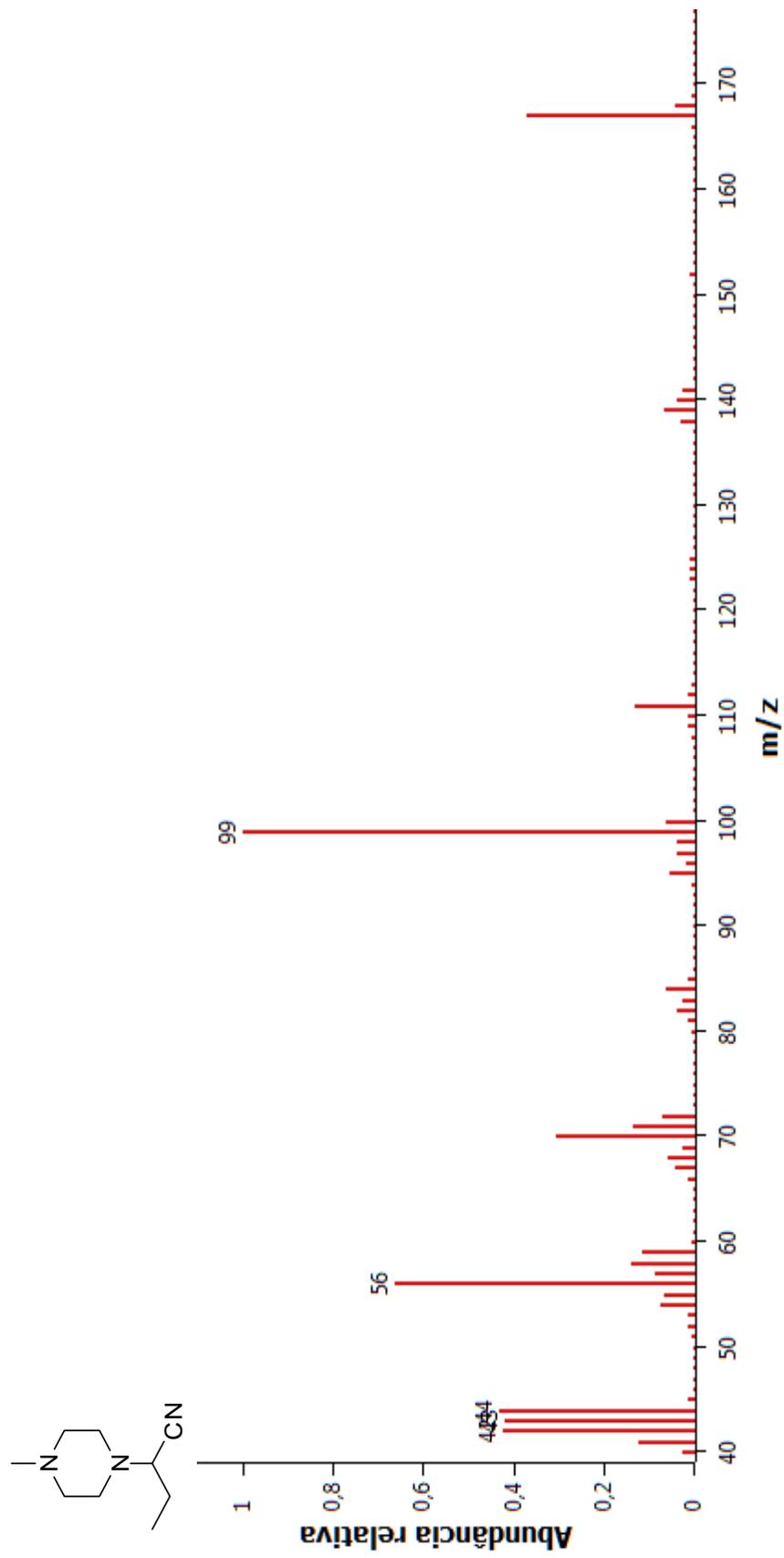


Parameter	Value
1 Solvent	CDCl ₃
2 Temperature	303.3
3 Pulse Sequence	zgpg30
4 Number of Scans	536
5 Relaxation Delay	1.0000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48

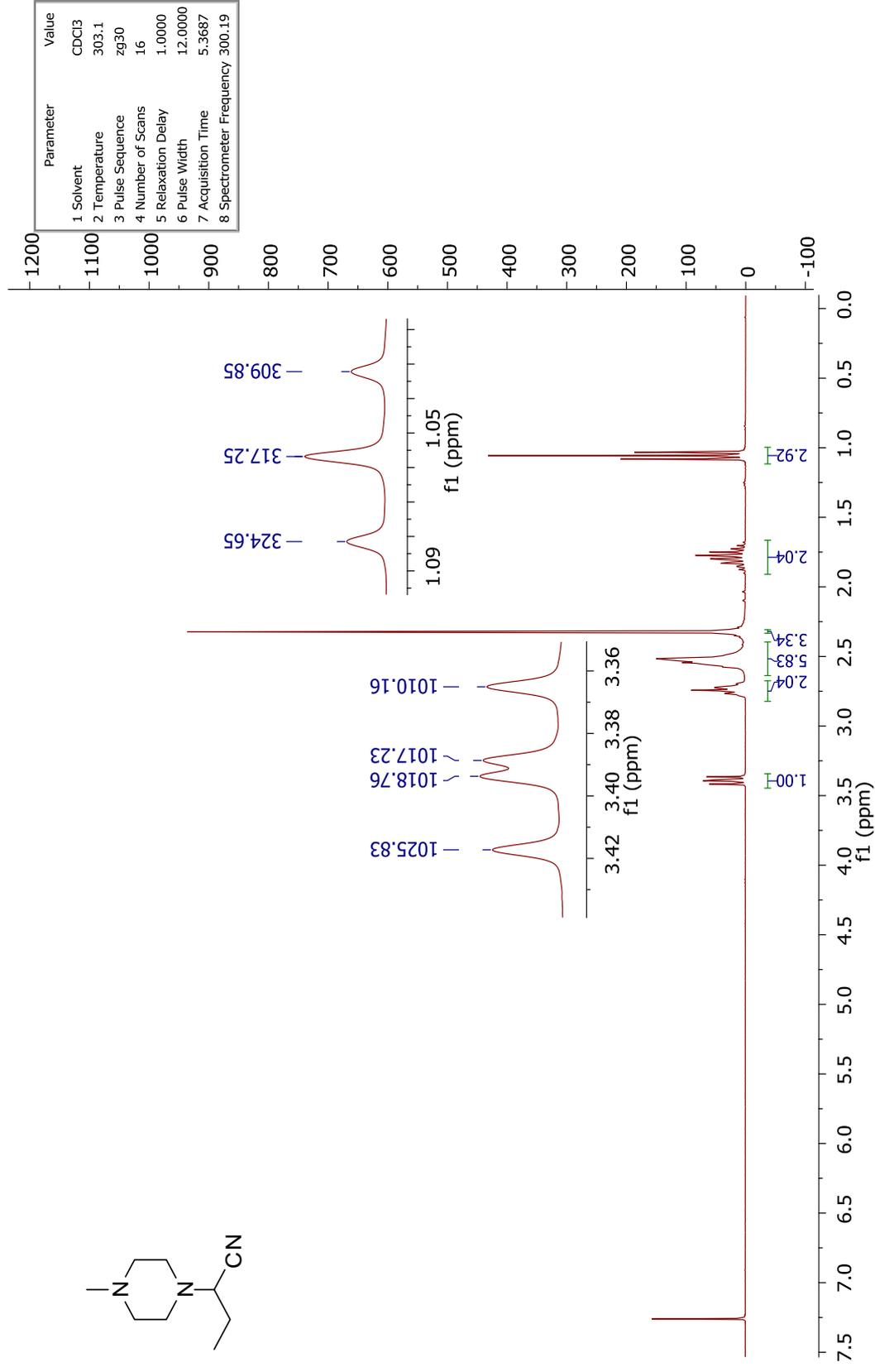
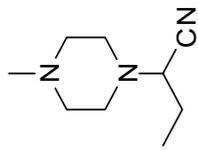
E19 - Espectro de RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃) e experimento DEPT-135 da 2-(3-oxopiperazin-1-il)butanonitrila **4c**.



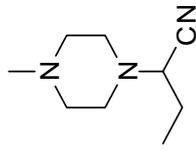
E20 - Espectro no IV da 2-(4-metilpiperazin-1-il)butanonitrila **4d**.



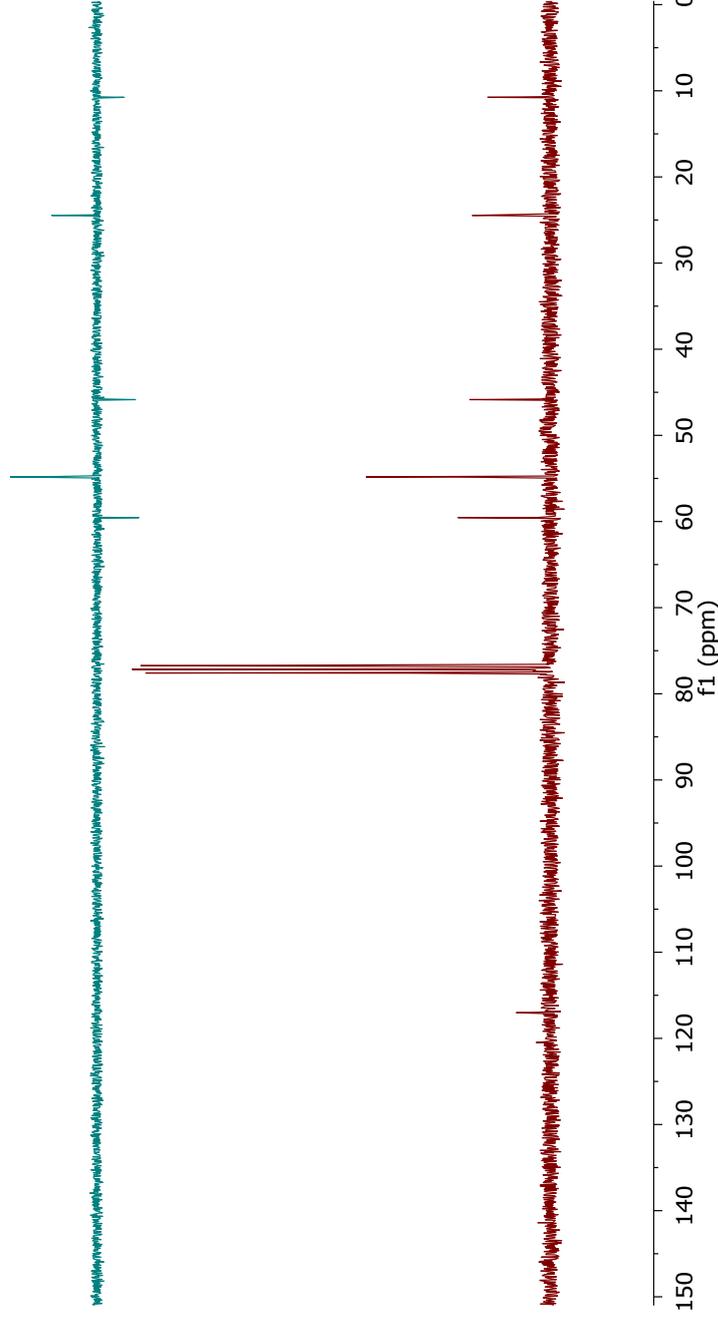
E21 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-(4-metilpiperazin-1-yl)butanonitrila **4d**.



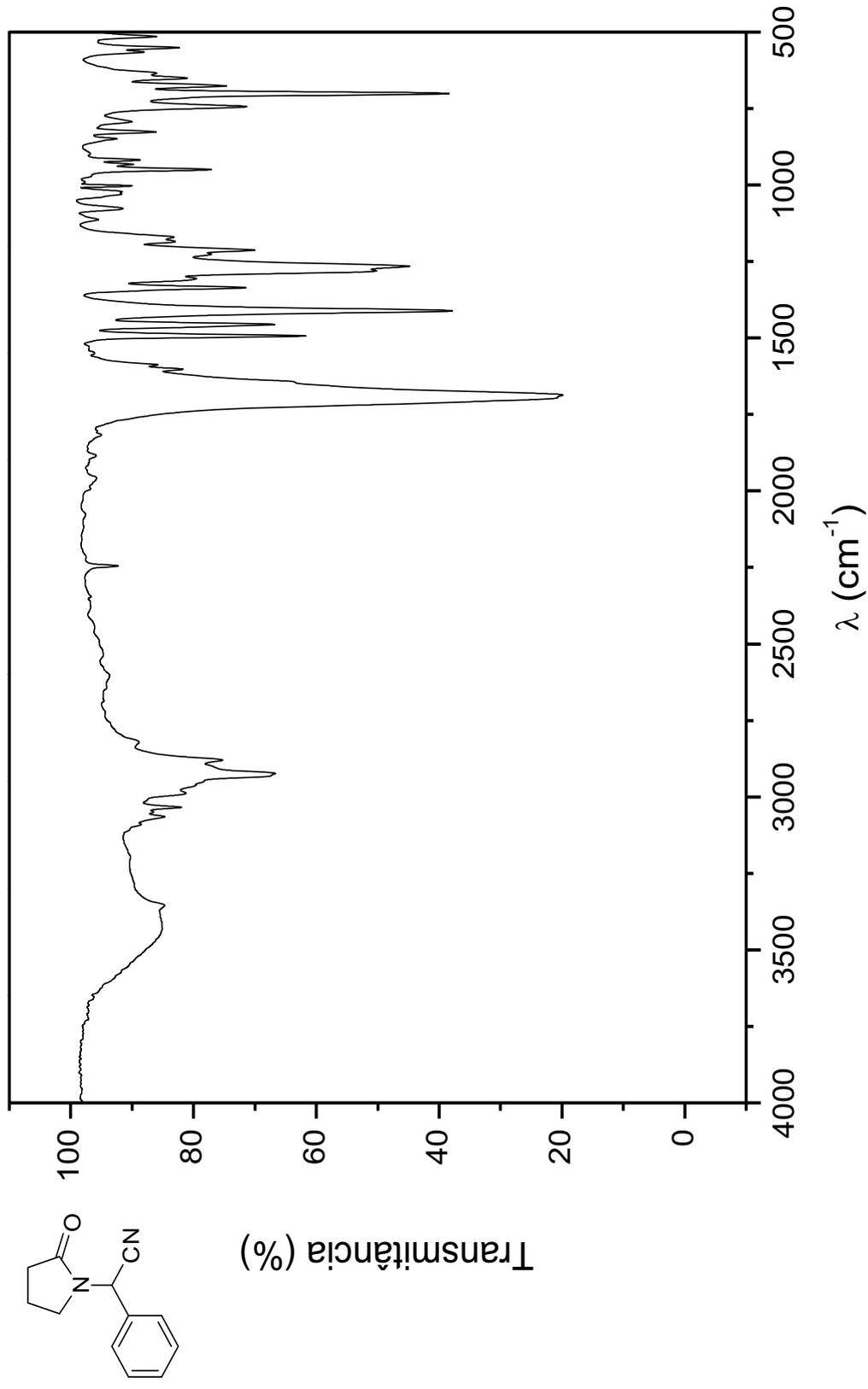
E22 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) da 2-(4-metilpiperazin-1-il)butanonitrila **4d**.



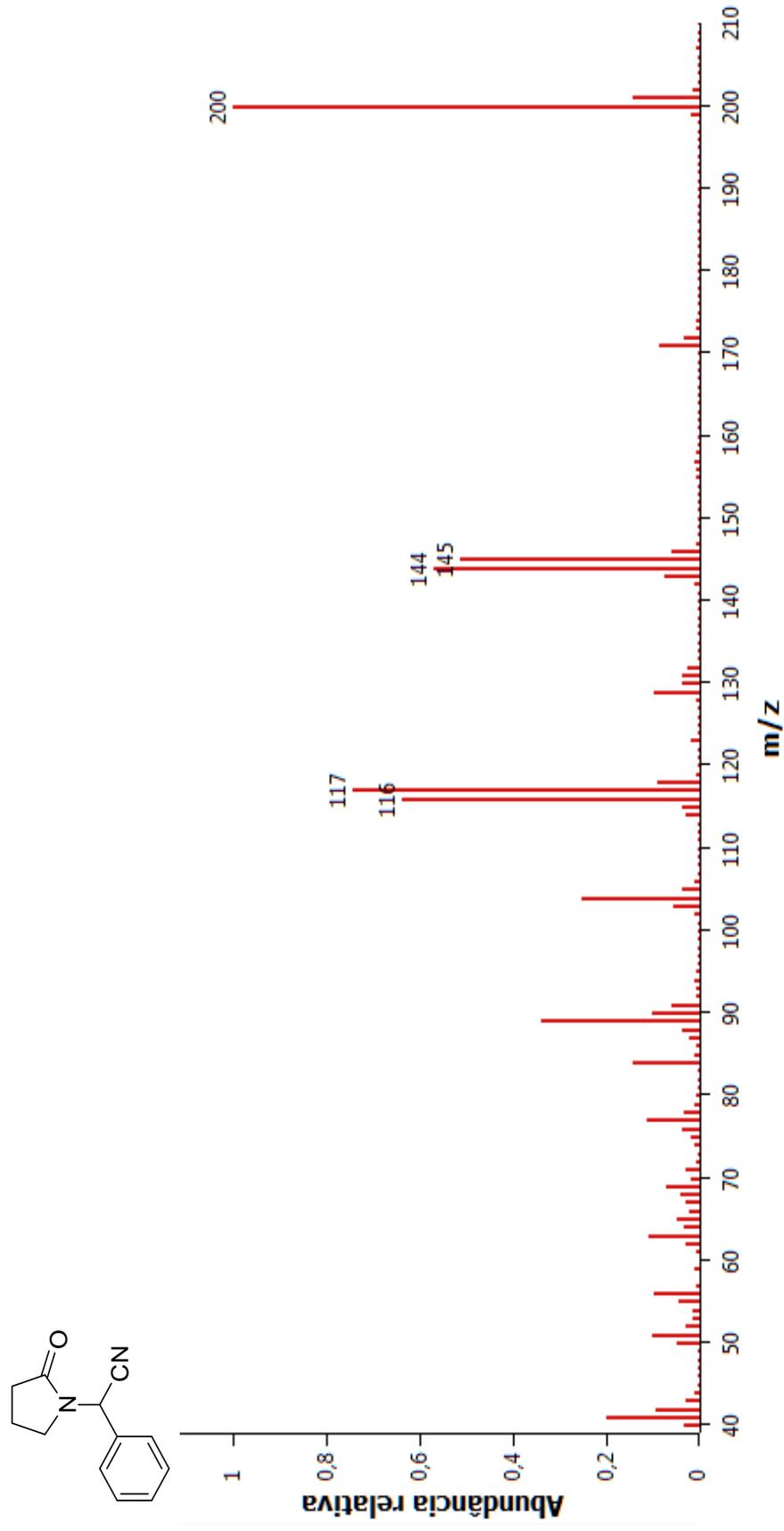
Parameter	Value
1 Solvent	CDCl ₃
2 Temperature	303.0
3 Pulse Sequence	dept135
4 Number of Scans	101
5 Relaxation Delay	1.5000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48



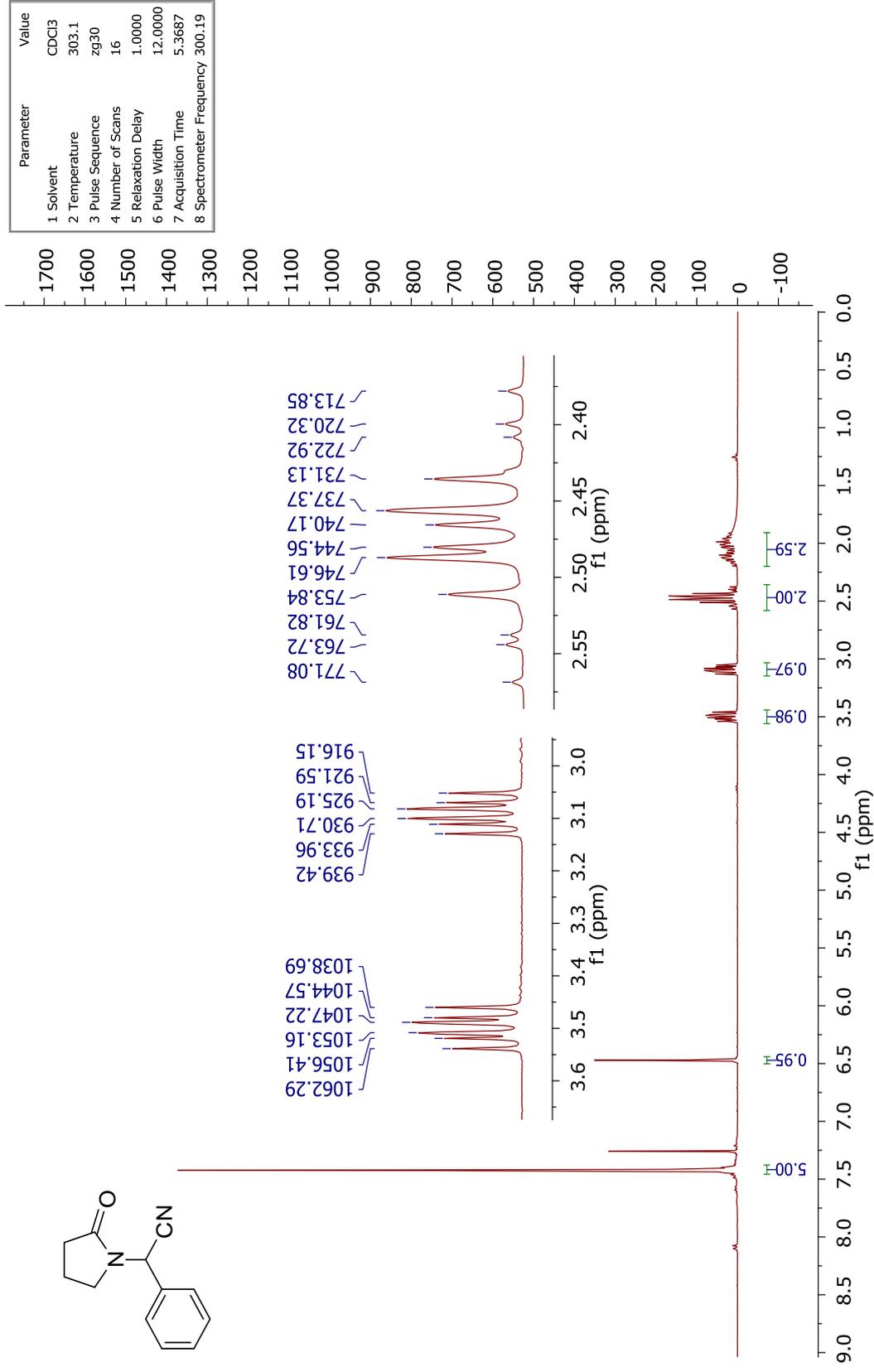
E23 - Espectro de RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃) e experimento DEPT-135 da 2-(4-metilpiperazin-1-yl)butanonitrila **4d**.



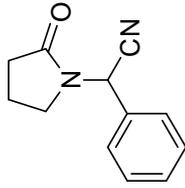
E24 - Espectro no IV da 2-(2-oxopiperidin-1-yl)-2-fenilacetoneitrila **4'a**.



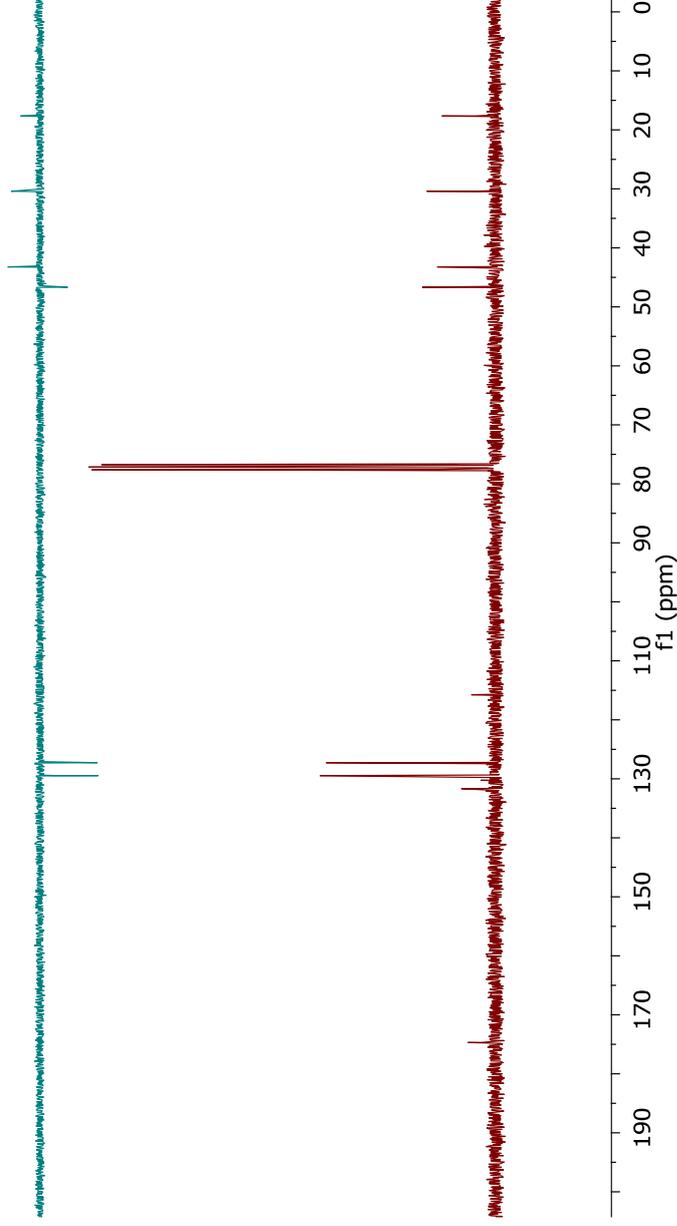
E25 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-(2-oxopirrolidin-1-yl)-2-fenilacetone nitrila **4'a**.



E26 - Espectro de RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) da 2-(2-oxopirrolidin-1-il)-2-fenilacetnitrila **4'a**.

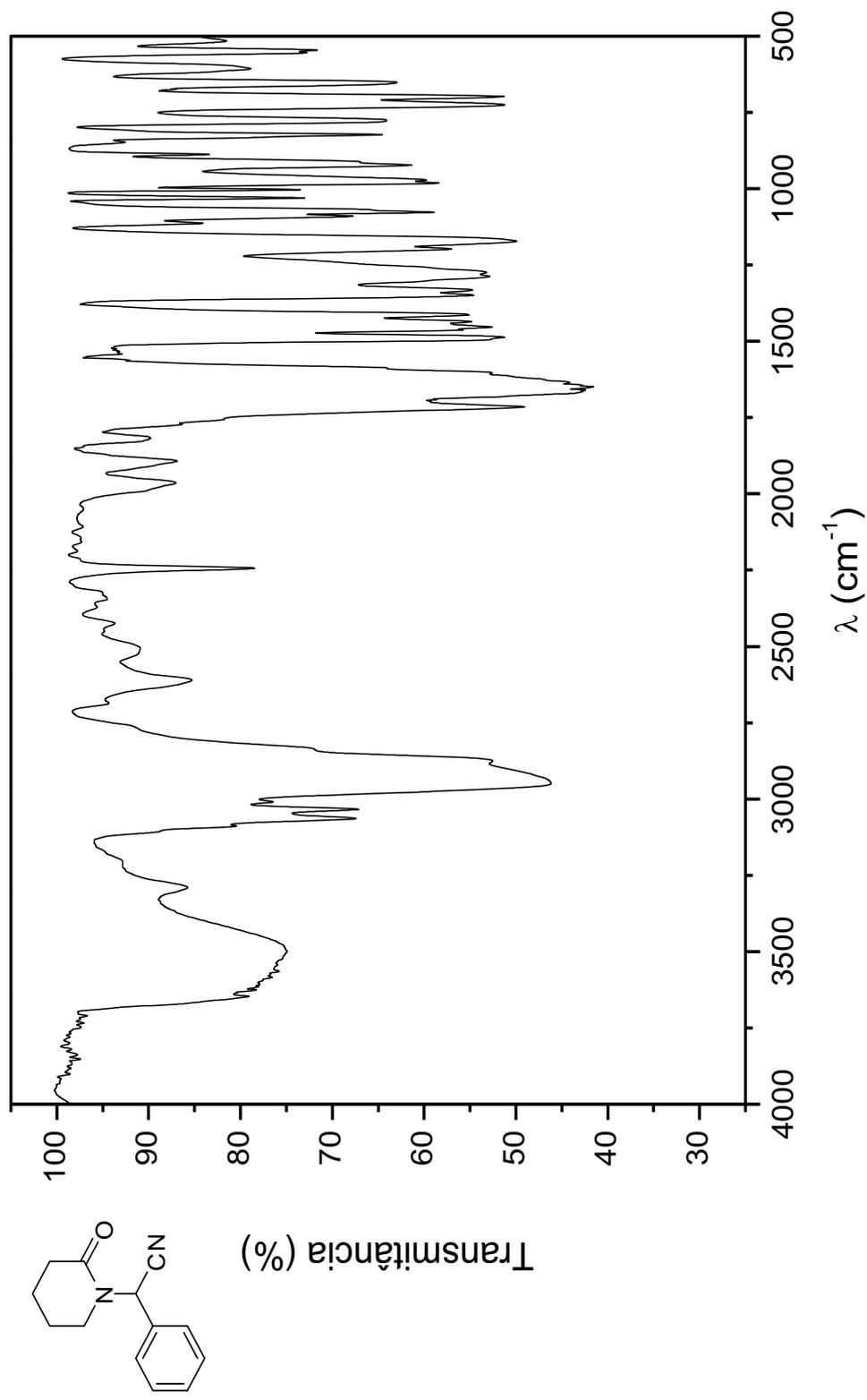


Parameter	Value
1 Solvent	CDCl ₃
2 Temperature	303.0
3 Pulse Sequence	dept135
4 Number of Scans	128
5 Relaxation Delay	1.5000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48

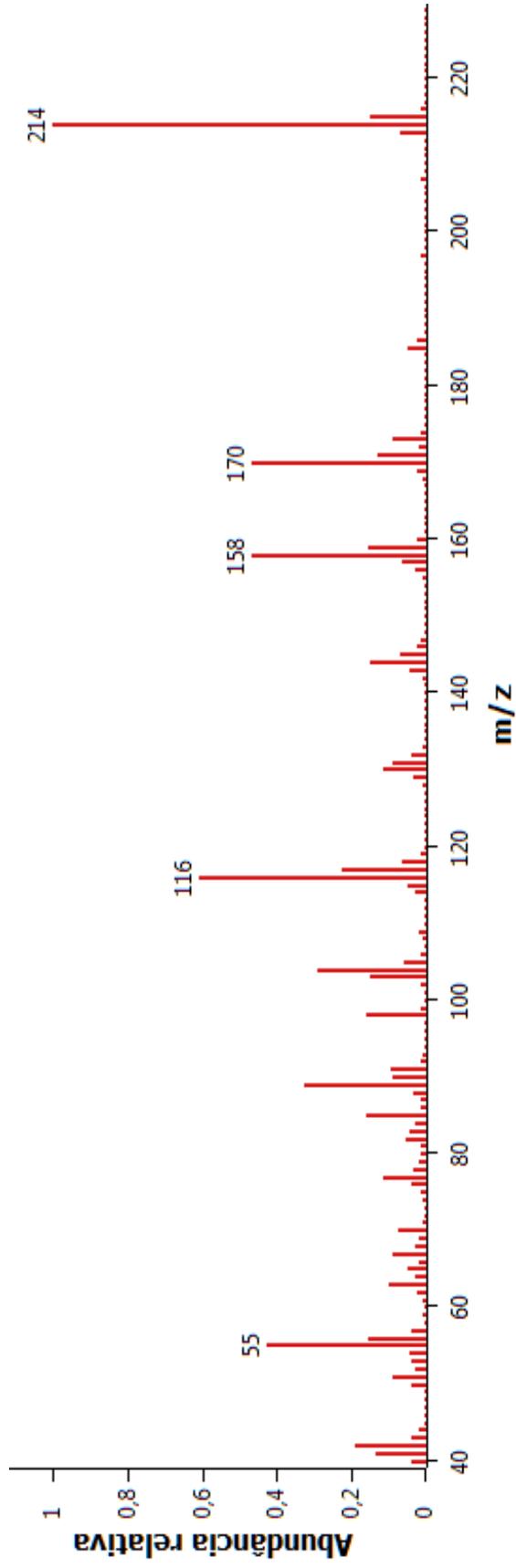
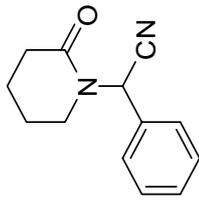


Parameter	Value
1 Solvent	CDCl ₃
2 Temperature	303.2
3 Pulse Sequence	zgpg30
4 Number of Scans	438
5 Relaxation Delay	1.0000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48

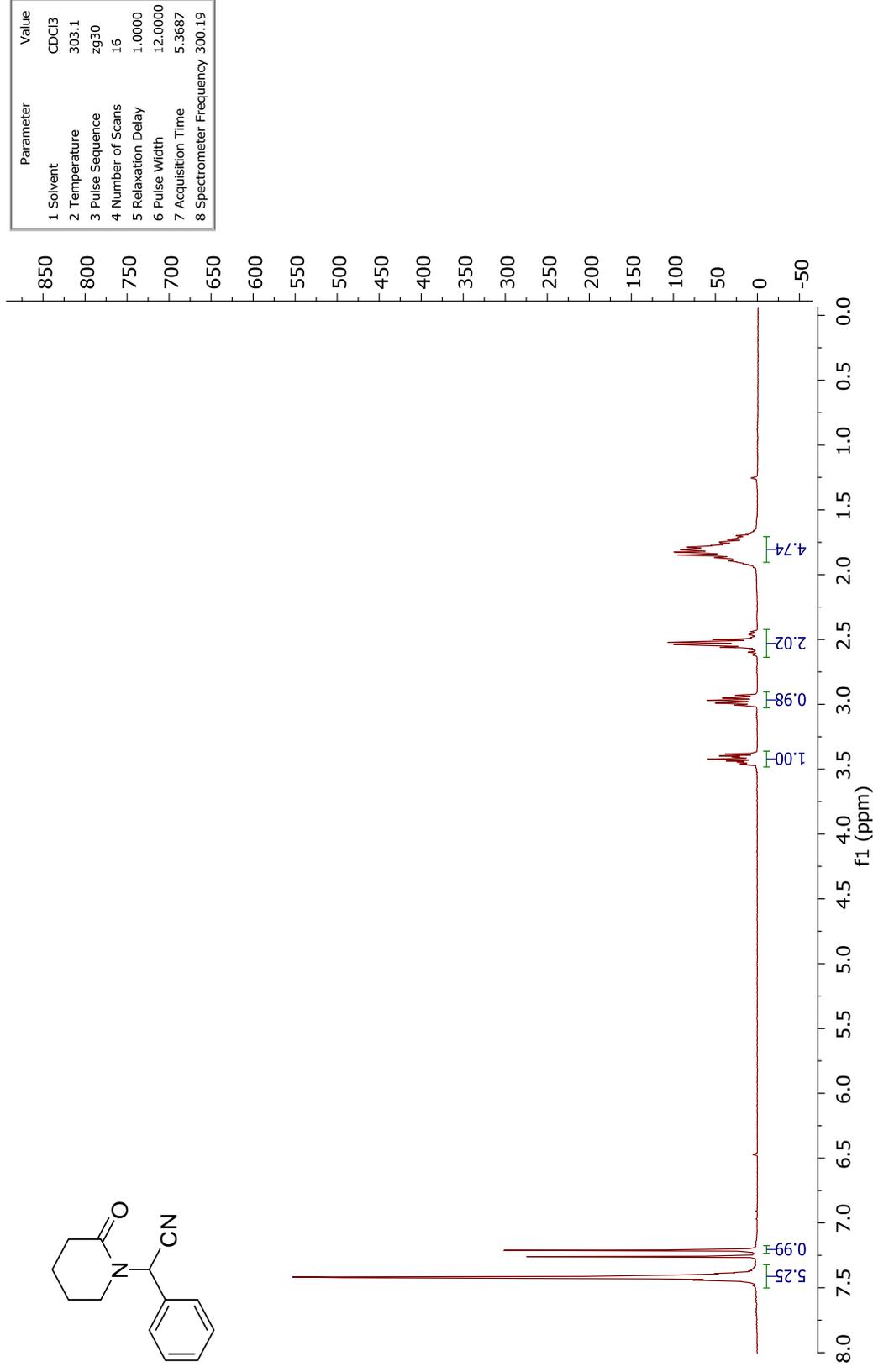
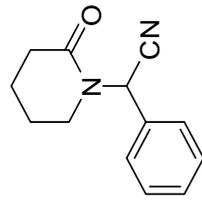
E27 - Espectro de RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃) e experimento DEPT-135 da 2-(2-oxopiperidin-1-yl)-2-fenilacetnitrila **4'a**.



E28 - Espectro no IV da 2-(2-oxopiperidin-1-il)-2-fenilacetoneitrila **4'b**.

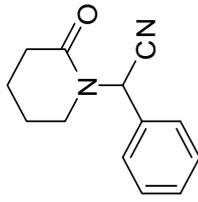


E29 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-(2-oxopiperidin-1-il)-2-fenilacetnitrila **4'b**.

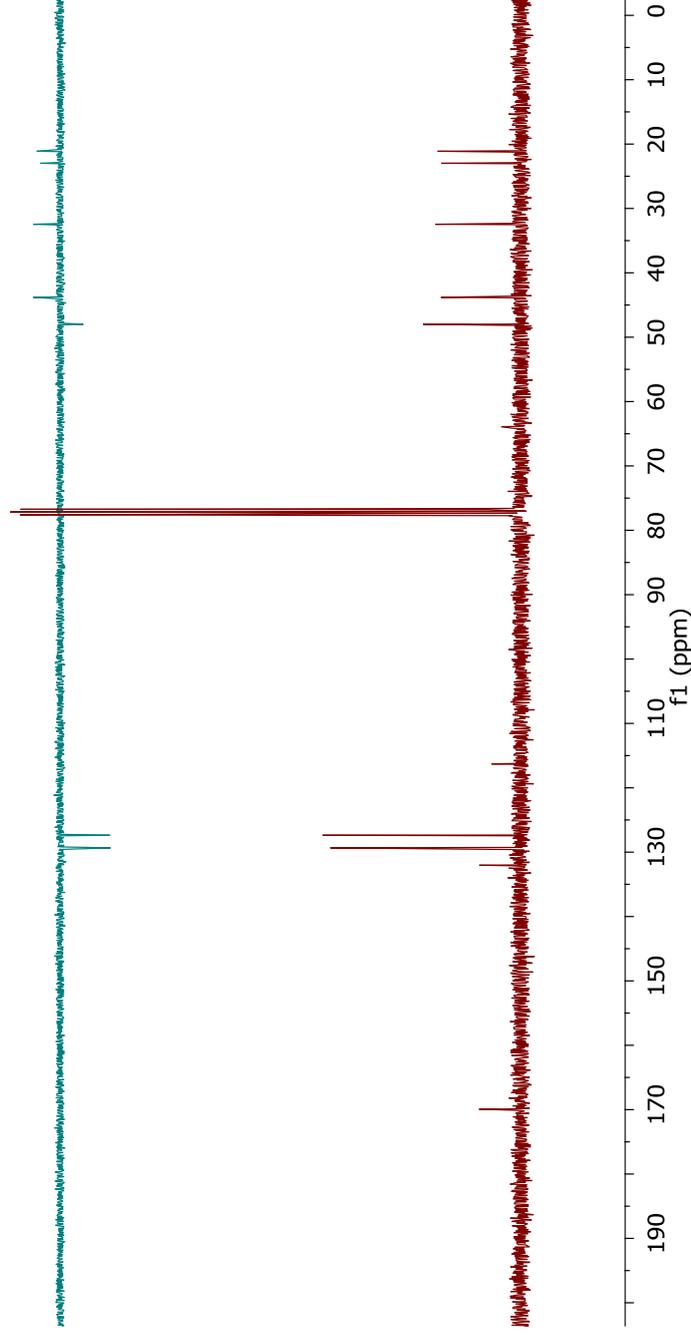


Parameter	Value
1 Solvent	CDCl ₃
2 Temperature	303.1
3 Pulse Sequence	zg30
4 Number of Scans	16
5 Relaxation Delay	1.0000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	5.3687
8 Spectrometer Frequency	300.19

E30 - Espectro de RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) da 2-(2-oxopiperidin-1-il)-2-fenilacetona nitrila **4'b**.

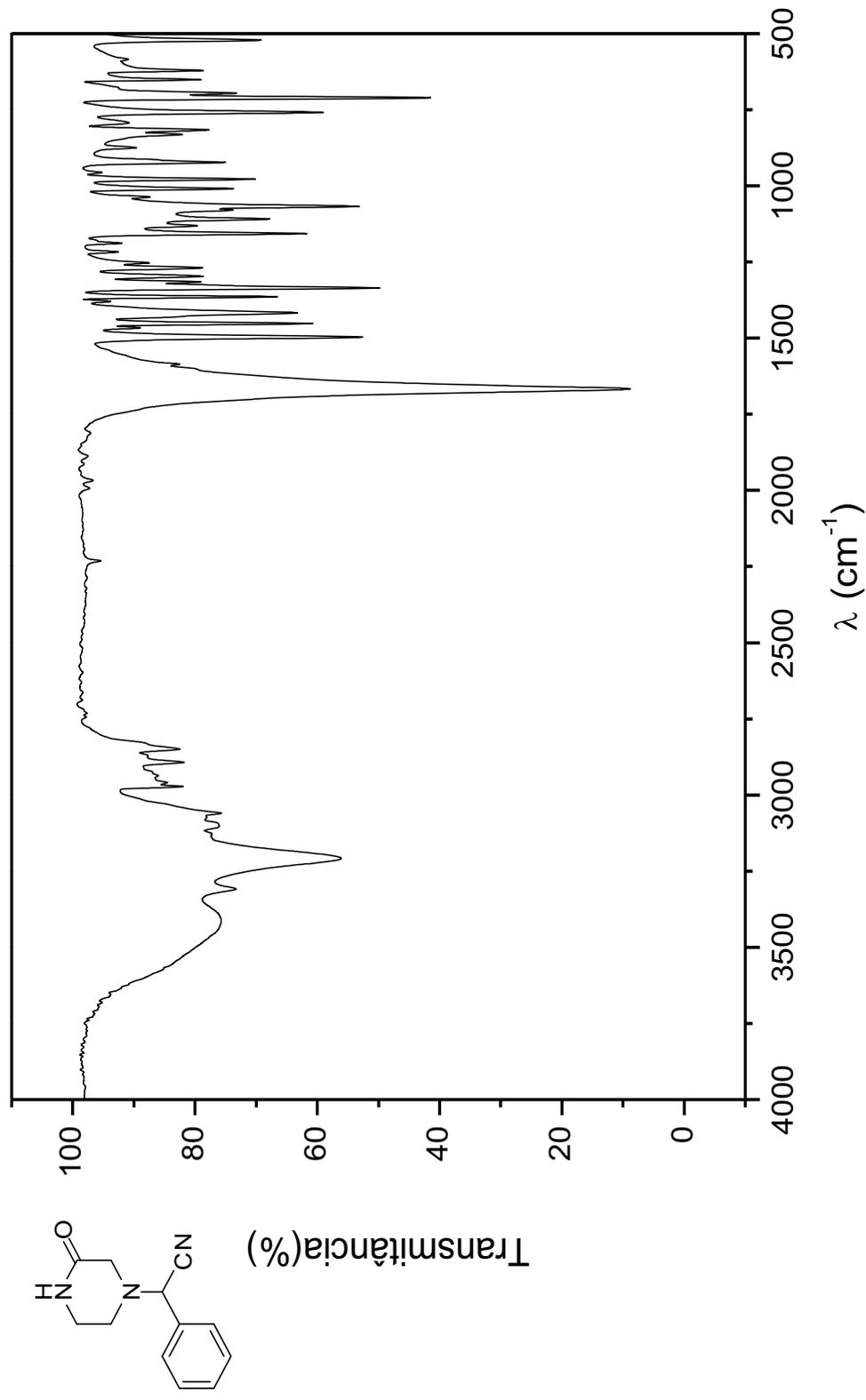


Parameter	Value
1 Solvent	CDCl3
2 Temperature	303.0
3 Pulse Sequence	dept135
4 Number of Scans	103
5 Relaxation Delay	1.5000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48

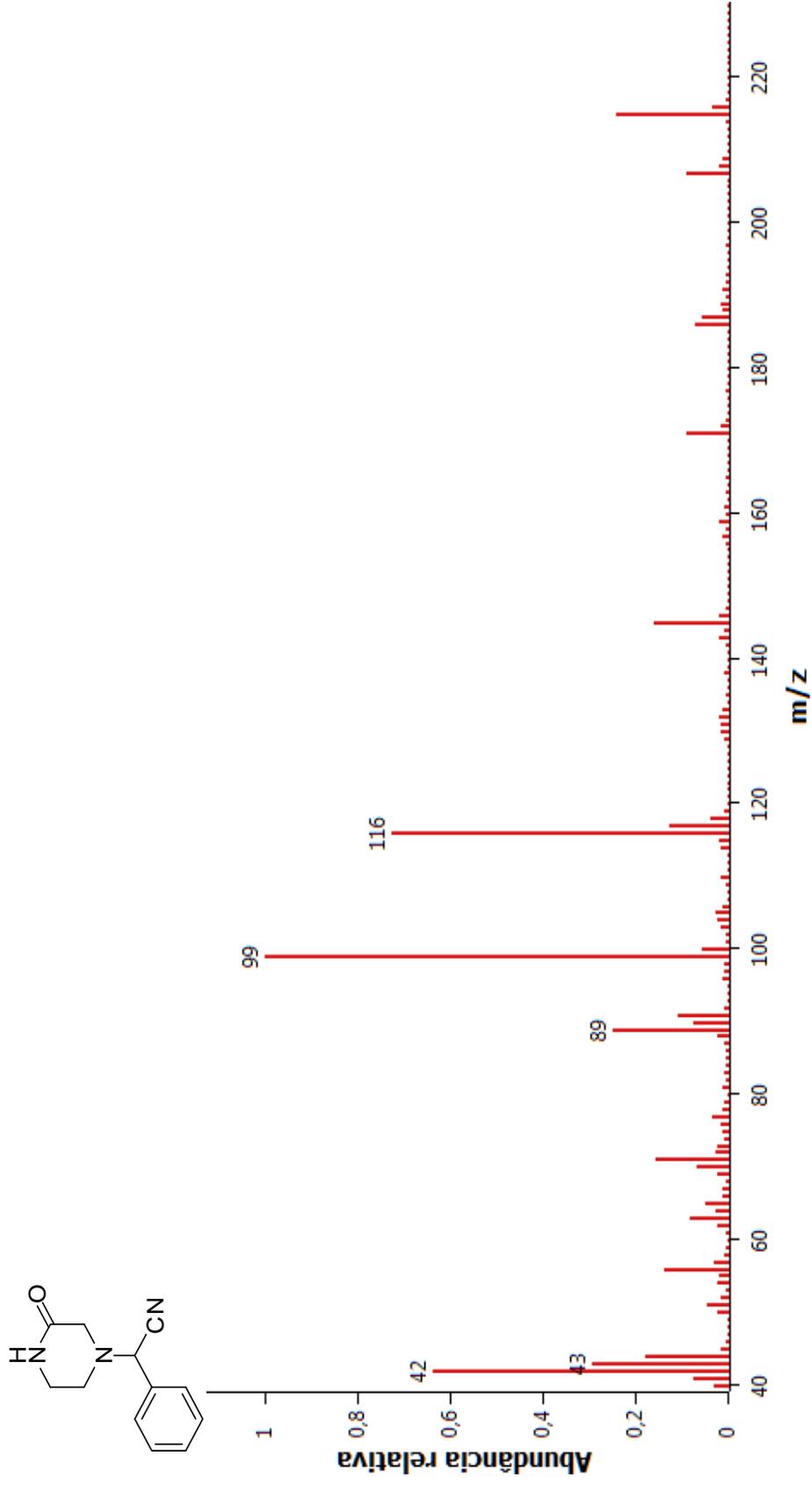


Parameter	Value
1 Solvent	CDCl3
2 Temperature	303.2
3 Pulse Sequence	zgpg30
4 Number of Scans	522
5 Relaxation Delay	1.0000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48

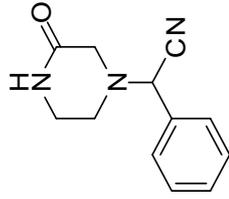
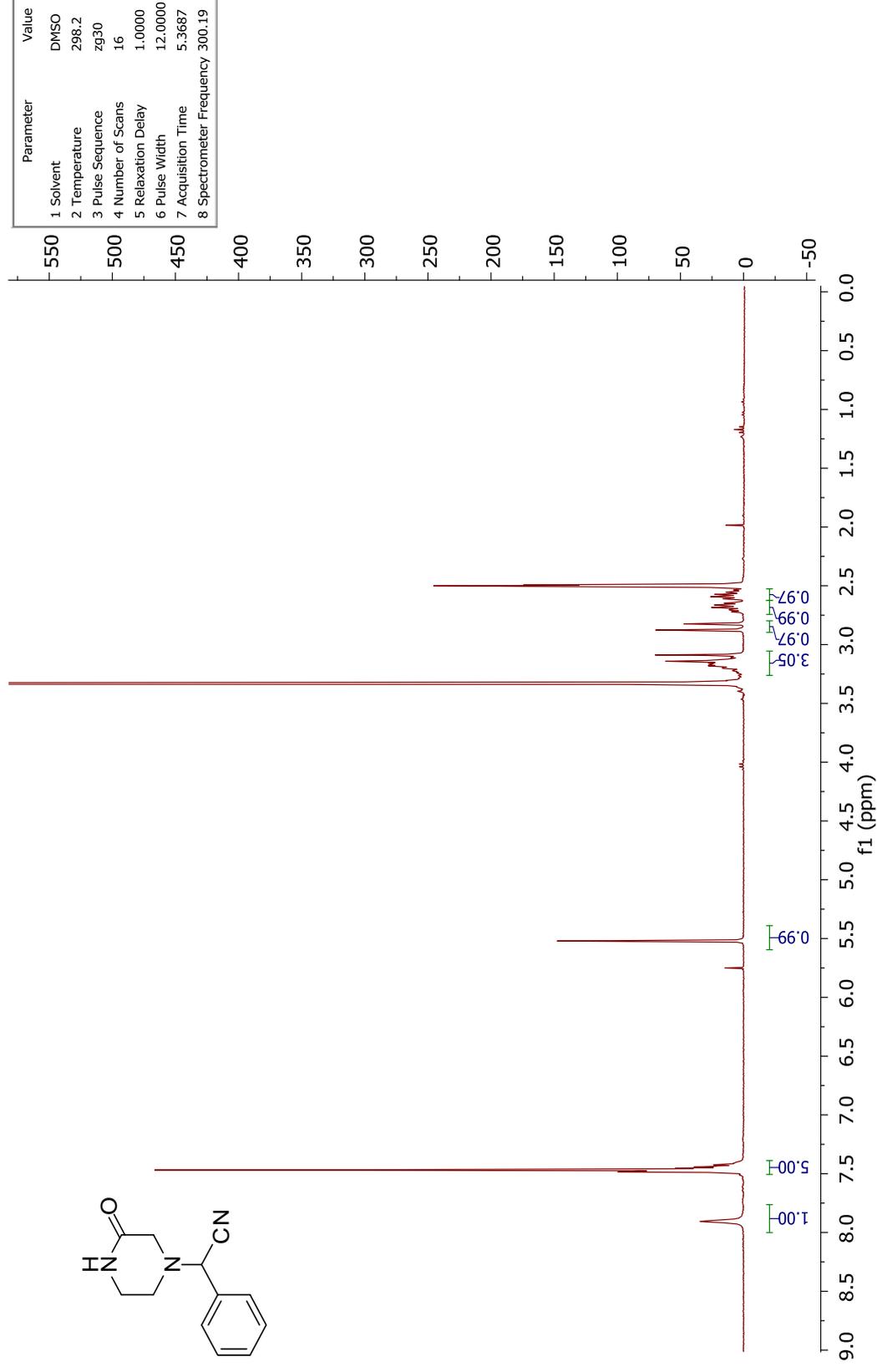
E31 - Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) e experimento DEPT-135 da 2-(2-oxopiperidin-1-il)-2-fenilacetnitrila **4'b**.



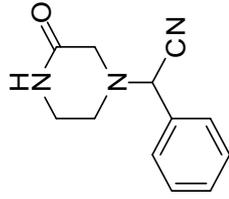
E32 - Espectro no IV da 2-(3-oxopiperazin-1-yl)-2-phenilacetoneitrila **4'c**.



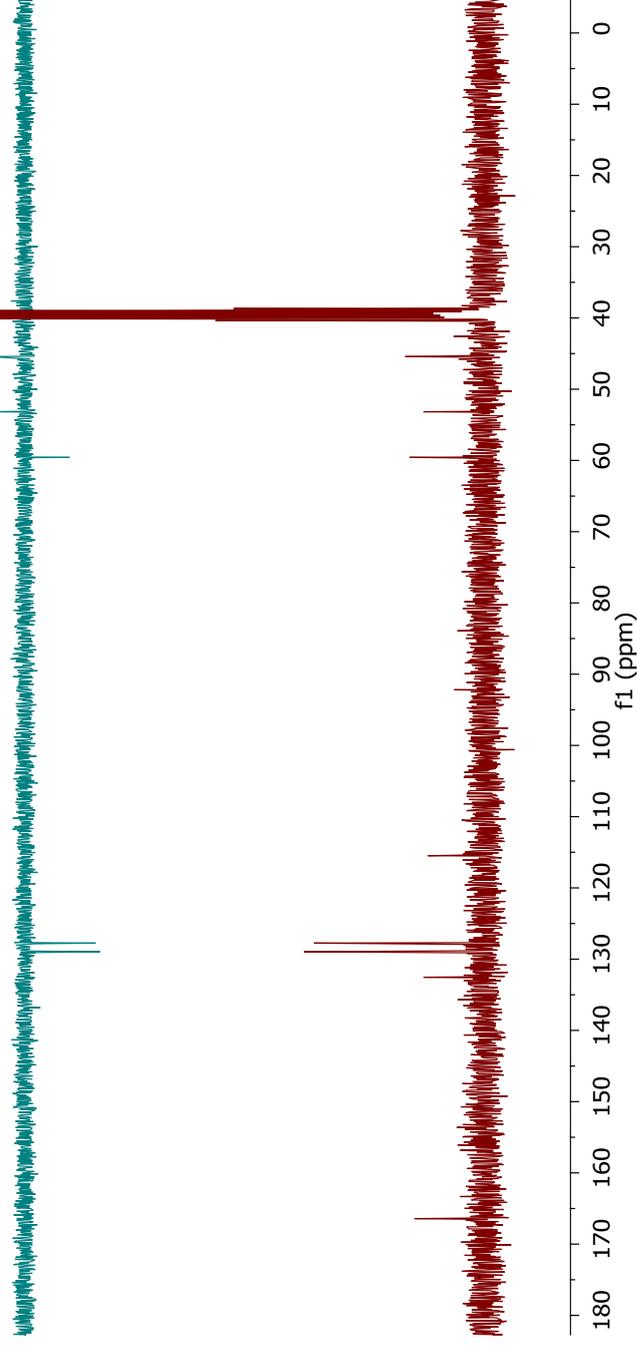
E33 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-(3-oxopiperazin-1-yl)-2-fenilacetoneitrila **4c**.



E34 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da 2-(3-oxopiperazin-1-il)-2-fenilacetnitrila **4c**.

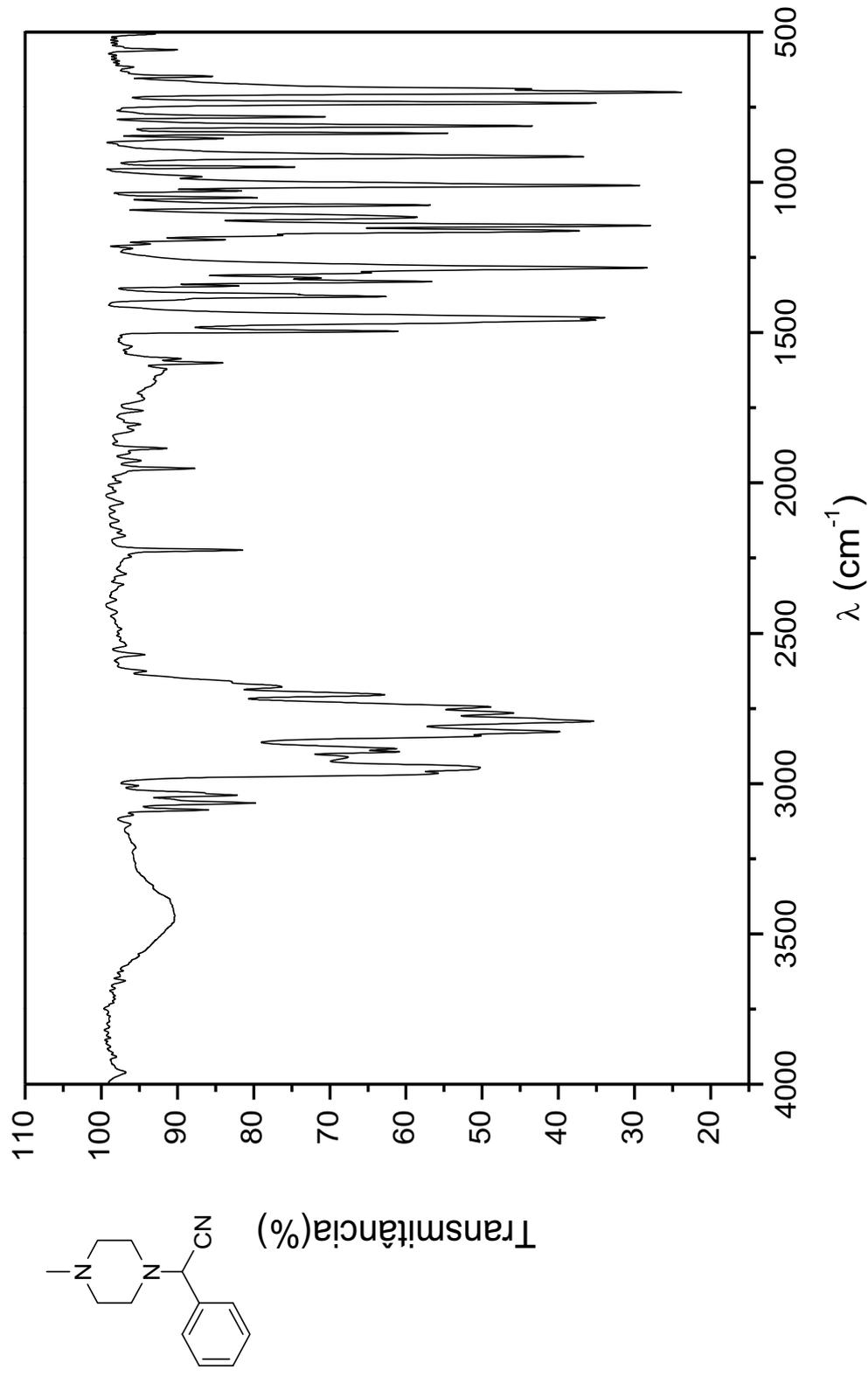


Parameter	Value
1 Solvent	DMSO
2 Temperature	297.9
3 Pulse Sequence	dept135
4 Number of Scans	100
5 Relaxation Delay	1.5000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48

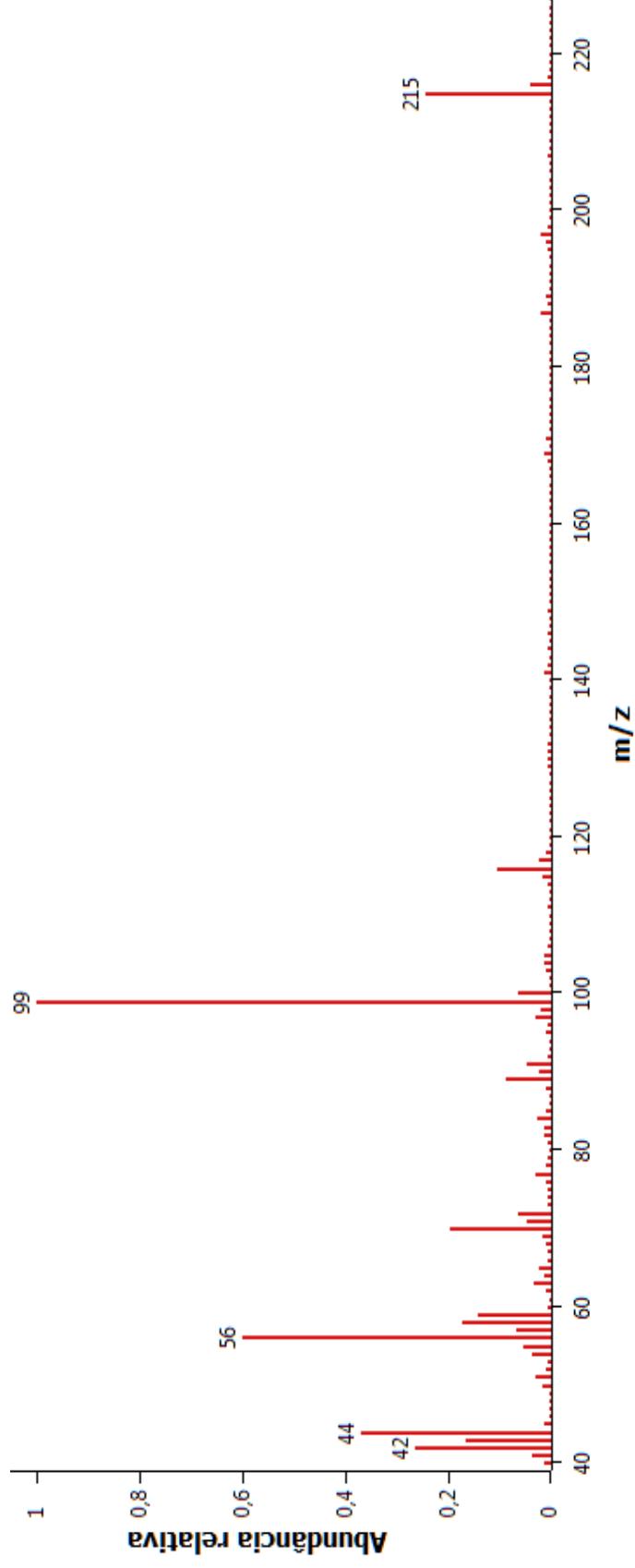
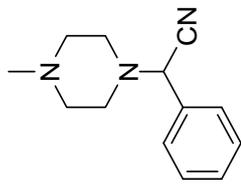


Parameter	Value
1 Solvent	DMSO
2 Temperature	298.3
3 Pulse Sequence	zgpg30
4 Number of Scans	383
5 Relaxation Delay	1.0000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48

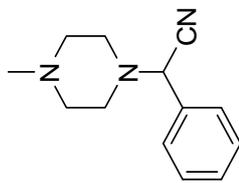
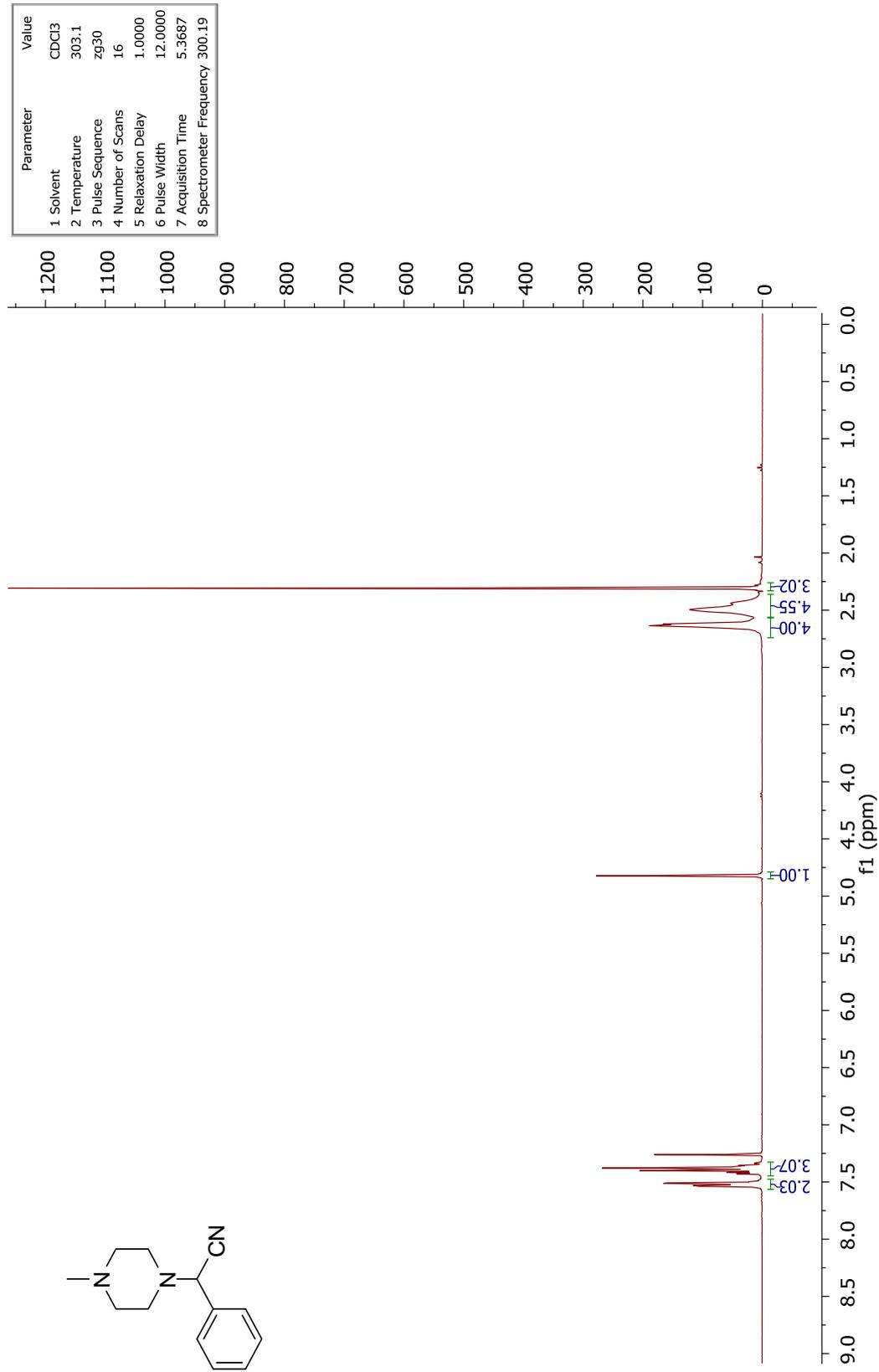
E35 - Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, DMSO- d_6) e experimento DEPT-135 da 2-(3-oxopiperazin-1-il)-2-fenilacetnitrila **4'c**.



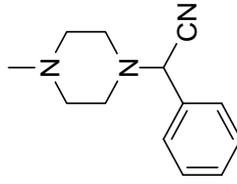
E36 - Espectro no IV da 2-(4-(1-metilpiperazín-1-il)-2-fenilacetónitrila **4'd**.



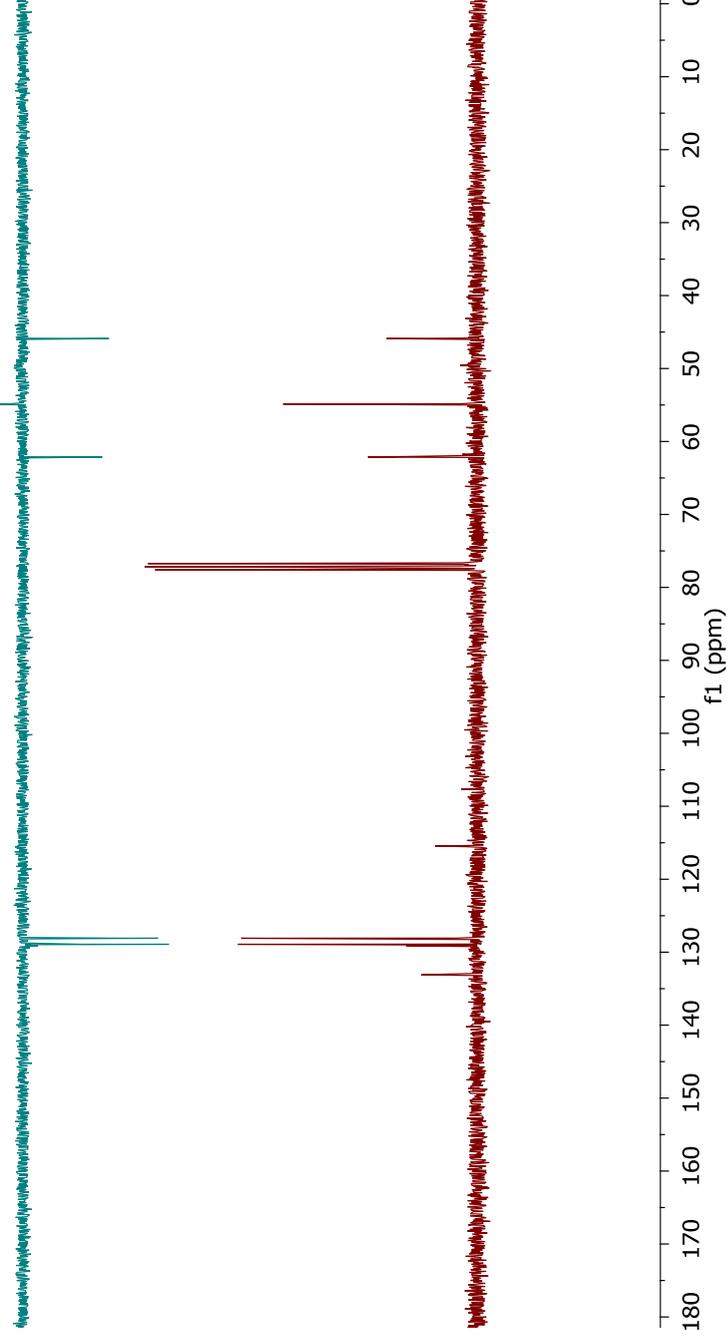
E37 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-(4-metilpiperazin-1-il)-2-fenilacetnitrila **4'd**.



E38 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) da 2-(4-metilpiperazin-1-il)-2-fenilacetnitrila **4'd**.

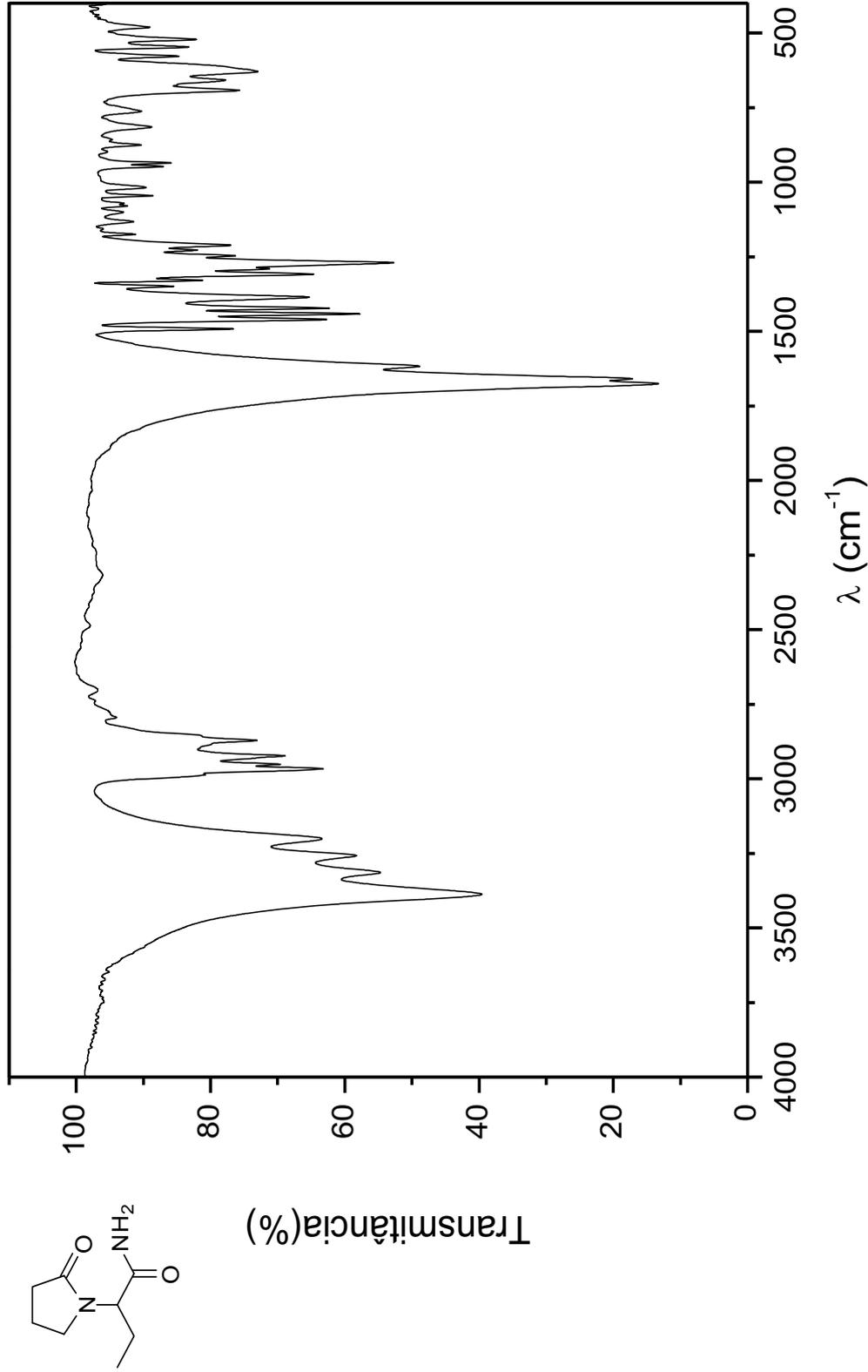


Parameter	Value
1 Solvent	CDCl ₃
2 Temperature	303.0
3 Pulse Sequence	dept135
4 Number of Scans	101
5 Relaxation Delay	1.5000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48

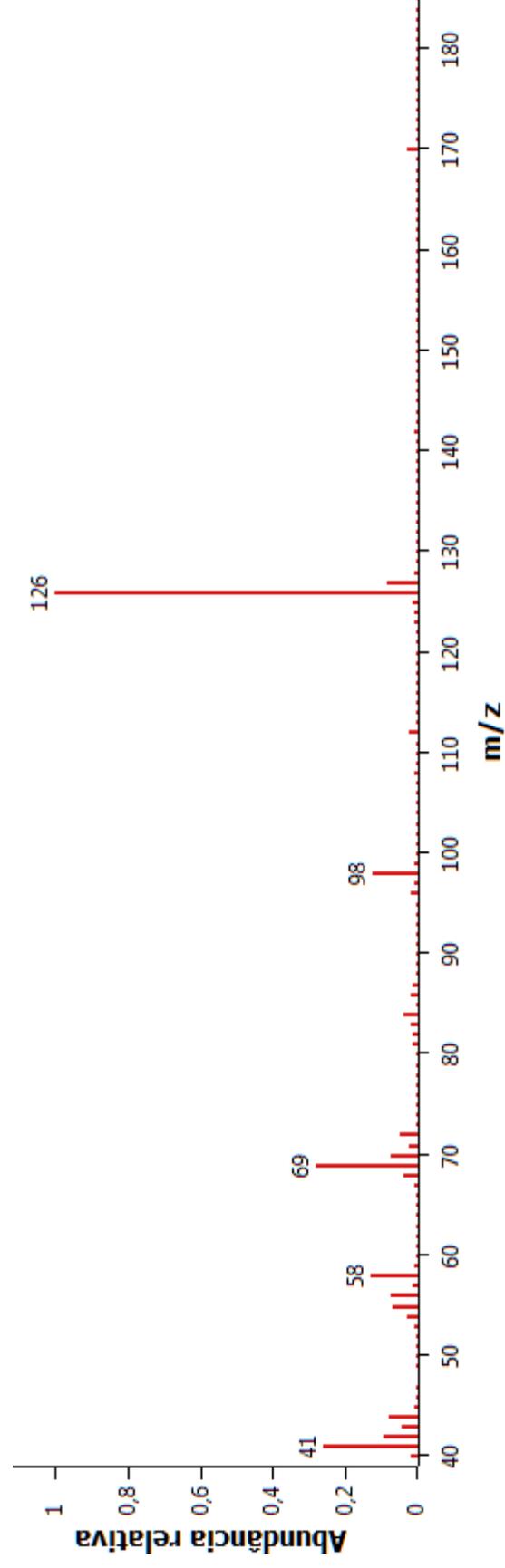
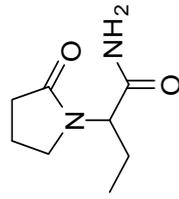


Parameter	Value
1 Solvent	CDCl ₃
2 Temperature	303.2
3 Pulse Sequence	zpgg30
4 Number of Scans	203
5 Relaxation Delay	1.0000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48

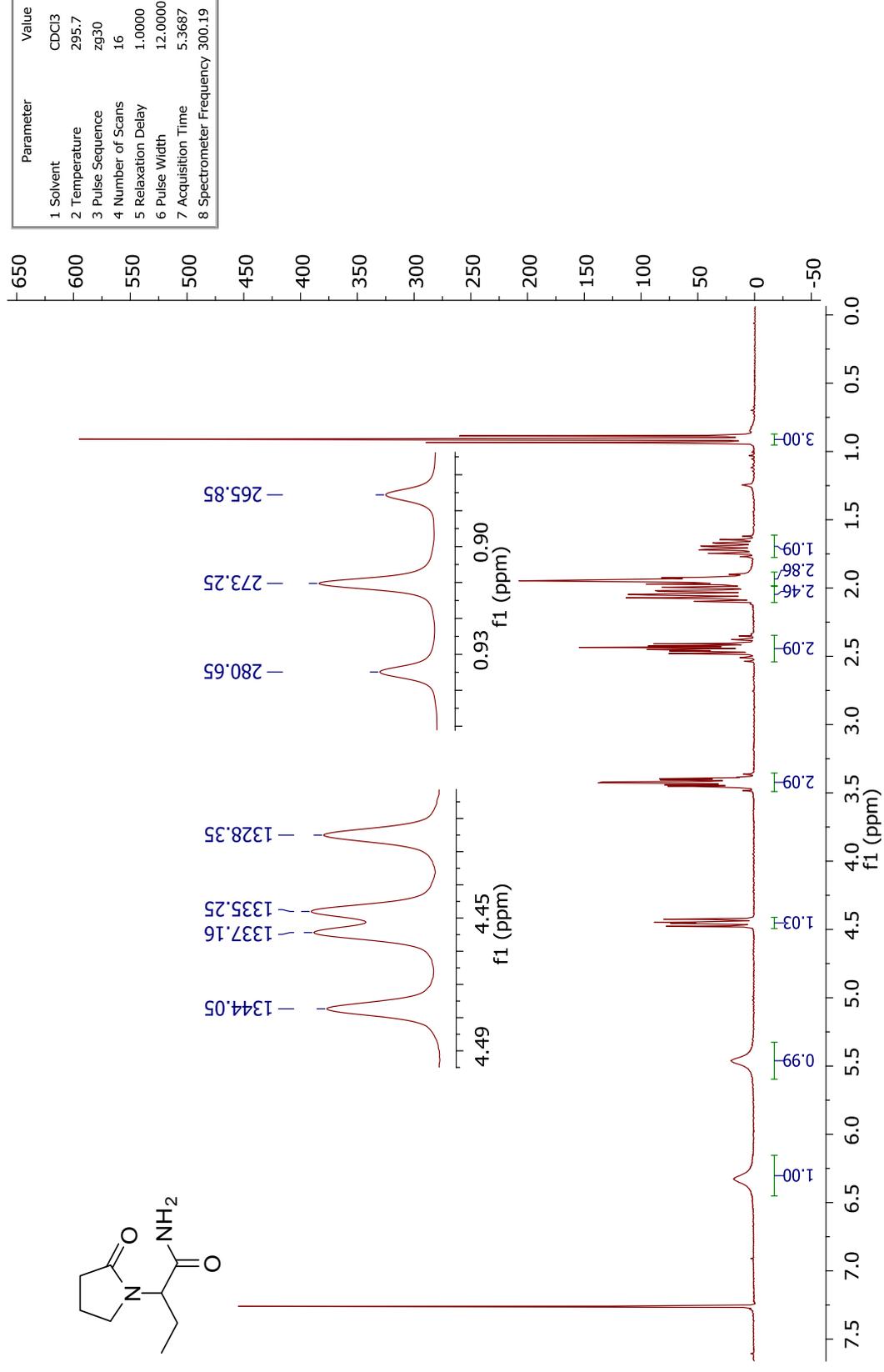
E39 - Espectro de RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃) e experimento DEPT-135 da 2-(4-metilpiperazin-1-il)-2-fenilacetnitrila **4'd**.



E40 - Espectro no IV da 2-(2-oxopirrolidin-1-yl)butanamida **5a**.

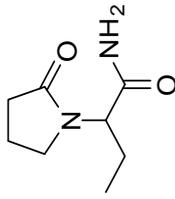


E41 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-(2-oxopirrolidin-1-yl)butanamida **5a**.

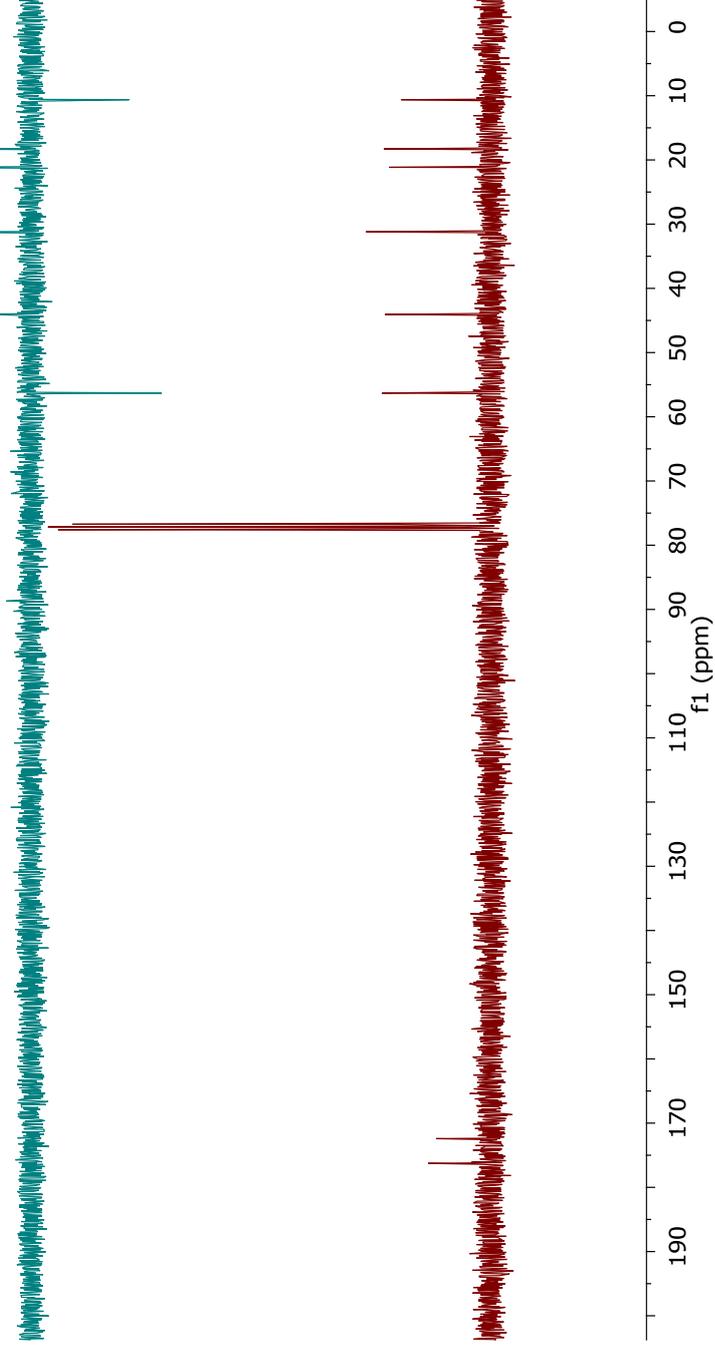


Parameter	Value
1 Solvent	CDCl3
2 Temperature	295.7
3 Pulse Sequence	zg30
4 Number of Scans	16
5 Relaxation Delay	1.0000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	5.3687
8 Spectrometer Frequency	300.19

E42 - Espectro de RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) da 2-(2-oxopirrolidin-1-yl)butanamida **5a**.

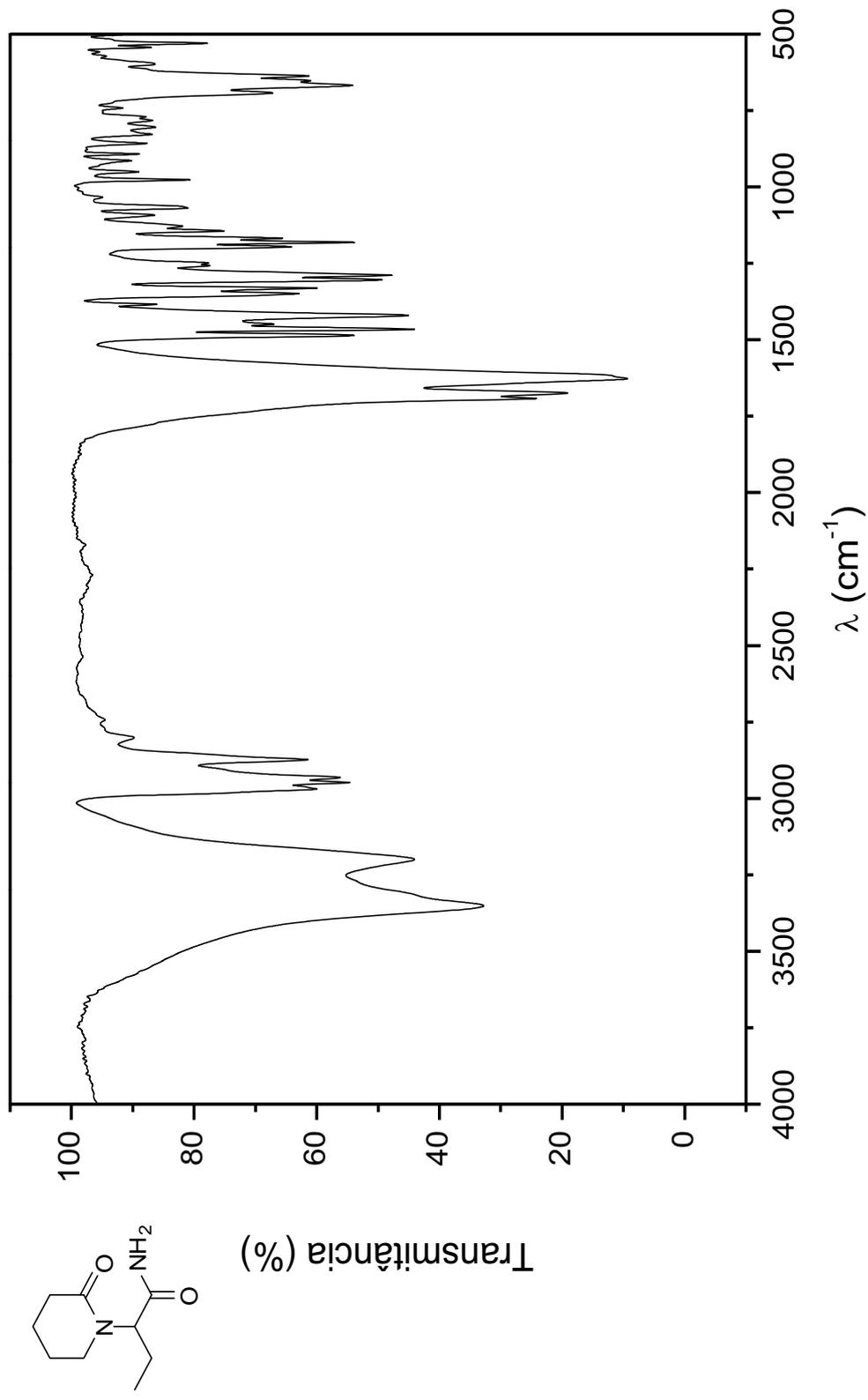


Parameter	Value
1 Solvent	CDCl ₃
2 Temperature	303.0
3 Pulse Sequence	dept135
4 Number of Scans	81
5 Relaxation Delay	1.5000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48

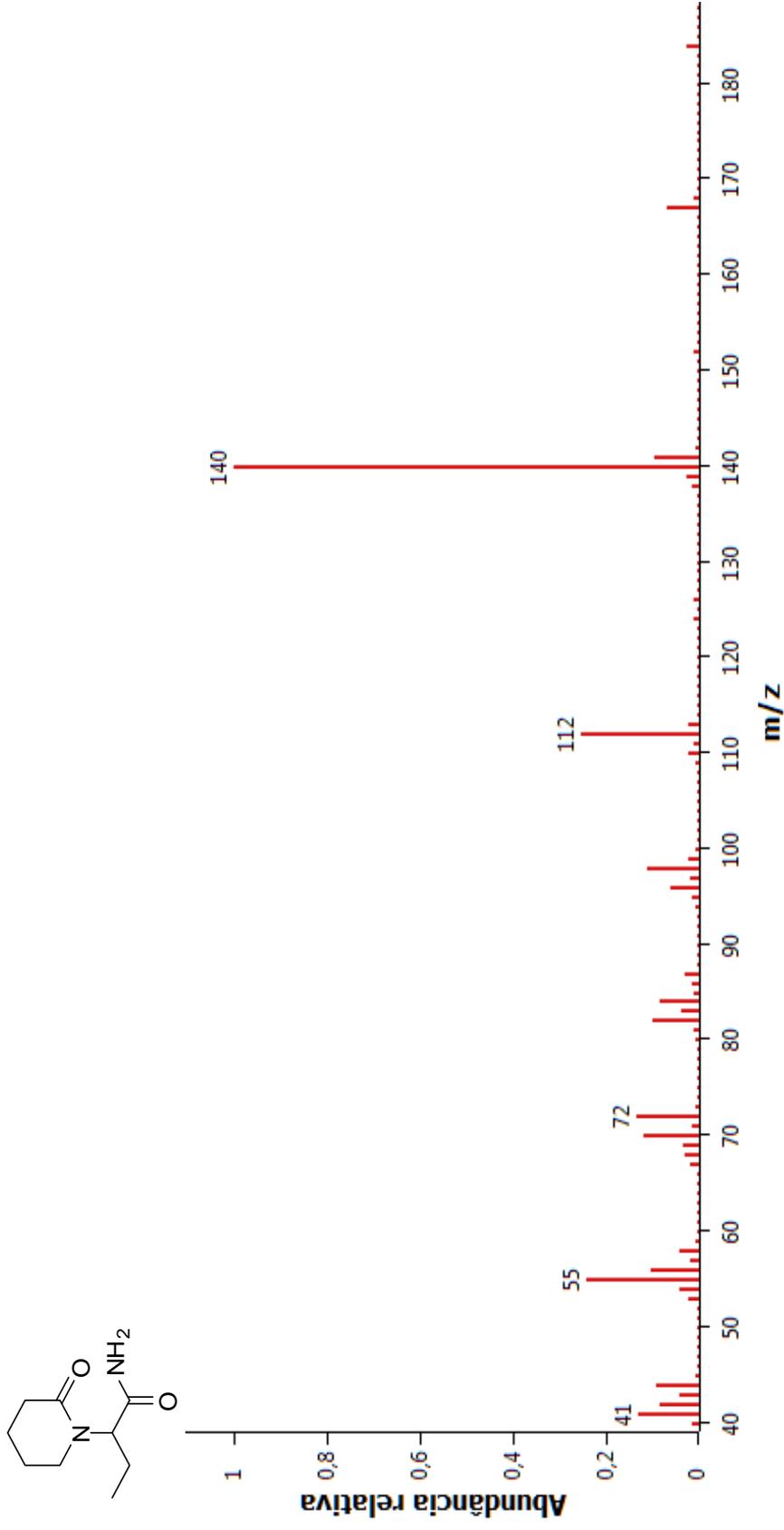


Parameter	Value
1 Solvent	CDCl ₃
2 Temperature	303.2
3 Pulse Sequence	zgpg30
4 Number of Scans	104
5 Relaxation Delay	1.0000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48

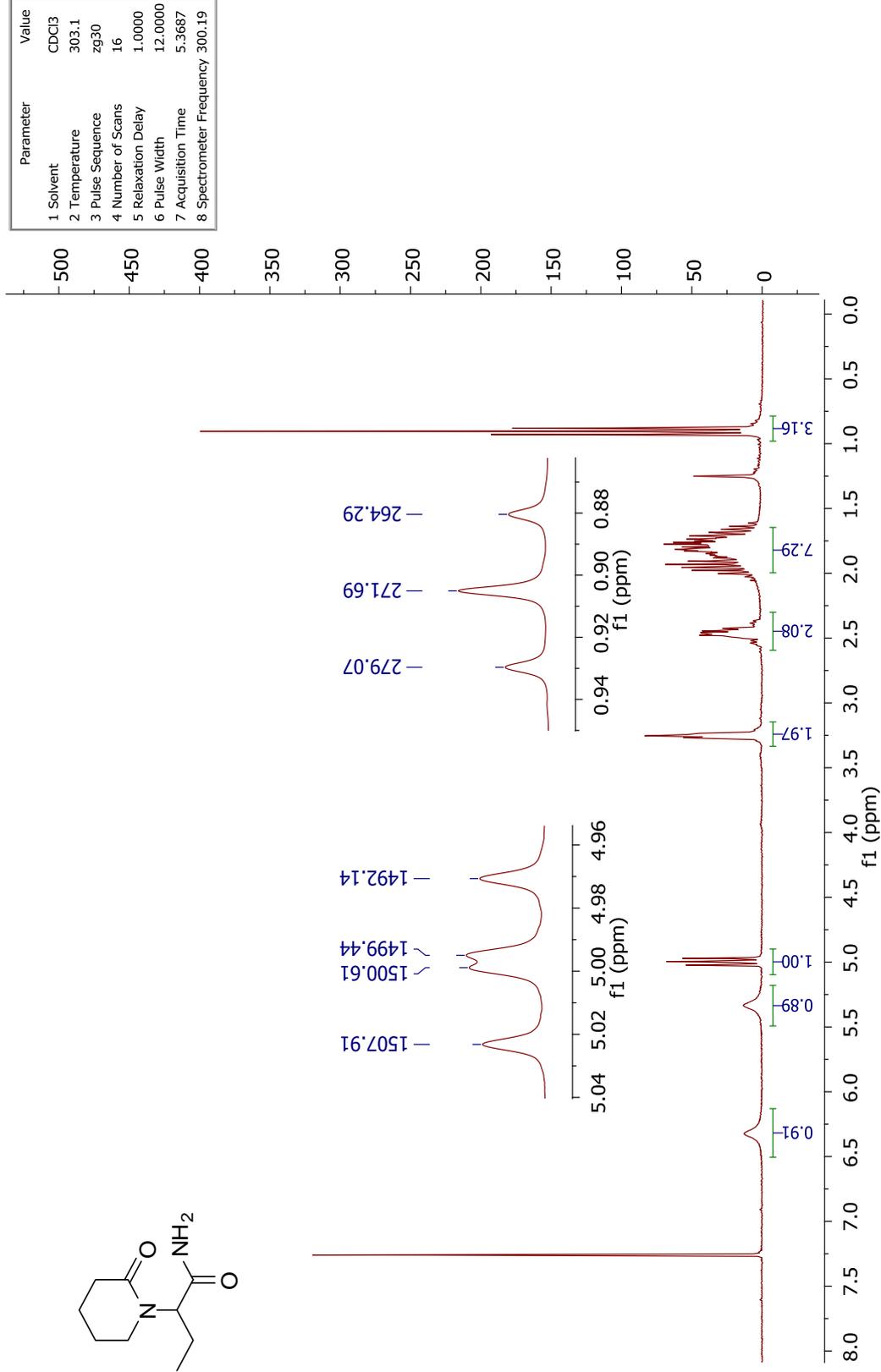
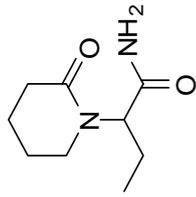
E43 - Espectro de RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃) e experimento DEPT da 2-(2-oxopiperidin-1-il)butanamida **5a**.



E44 - Espectro no IV da 2-(2-oxopiperidin-1-yl)butanamida **5b**.

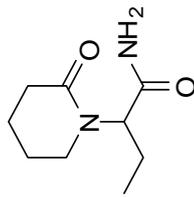


E45 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-(2-oxopiperidin-1-il)butanamida **5b**.

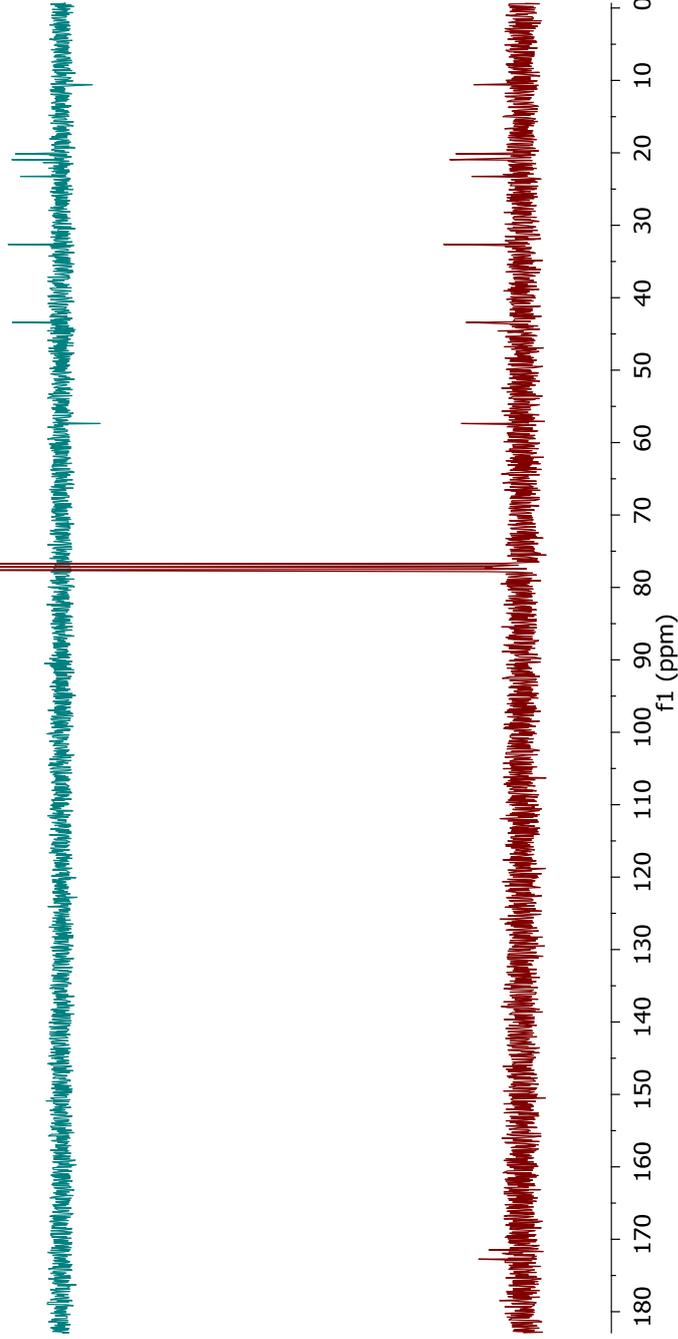


Parameter	Value
1 Solvent	CDCl ₃
2 Temperature	303.1
3 Pulse Sequence	zg30
4 Number of Scans	16
5 Relaxation Delay	1.0000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	5.3687
8 Spectrometer Frequency	300.19

E46 - Espectro de RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) da 2-(2-oxopiperidin-1-yl)butanamida **5b**.

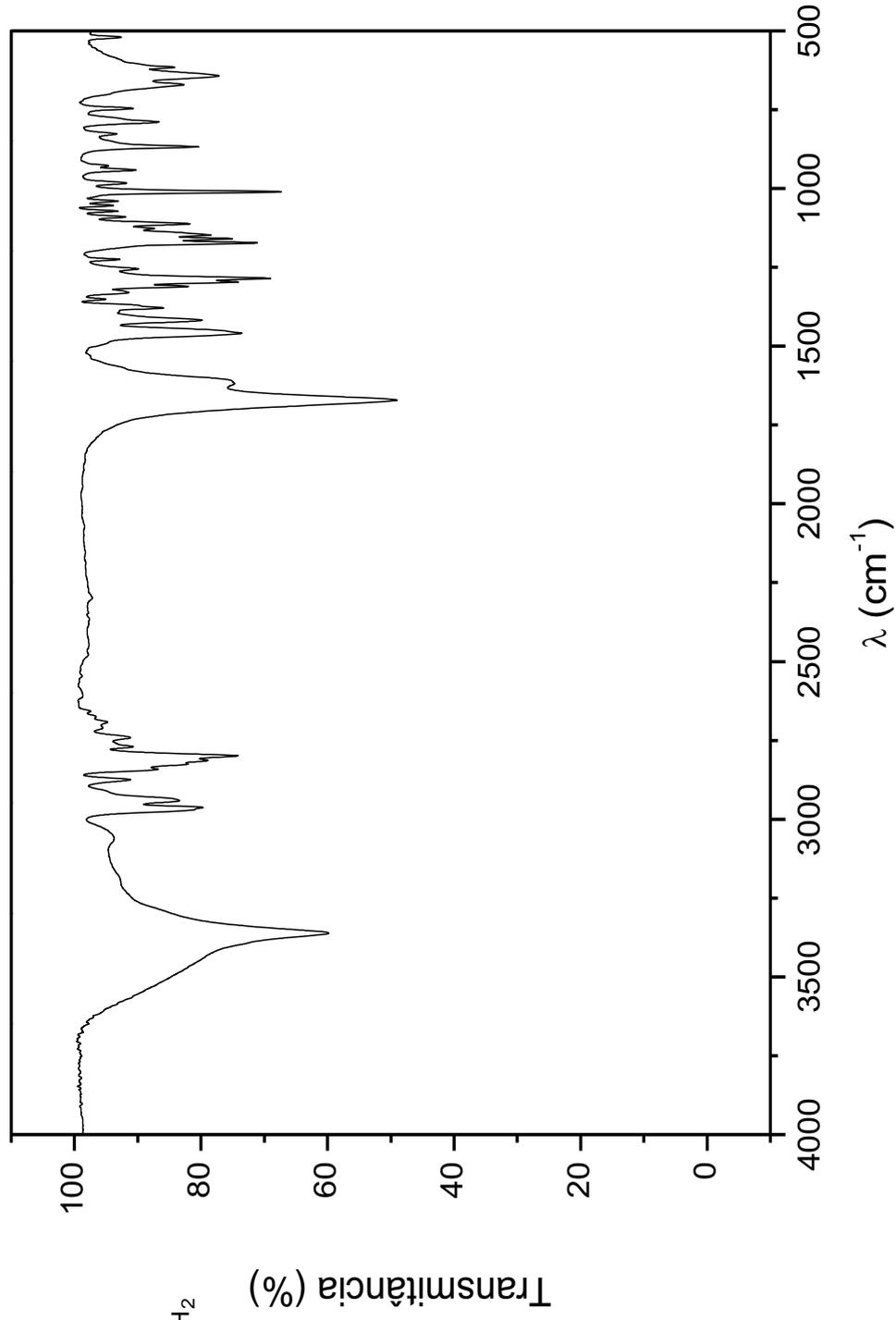
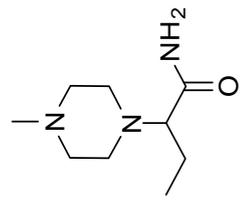


Parameter	Value
1 Solvent	CDCl ₃
2 Temperature	303.0
3 Pulse Sequence	dept135
4 Number of Scans	129
5 Relaxation Delay	1.5000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48

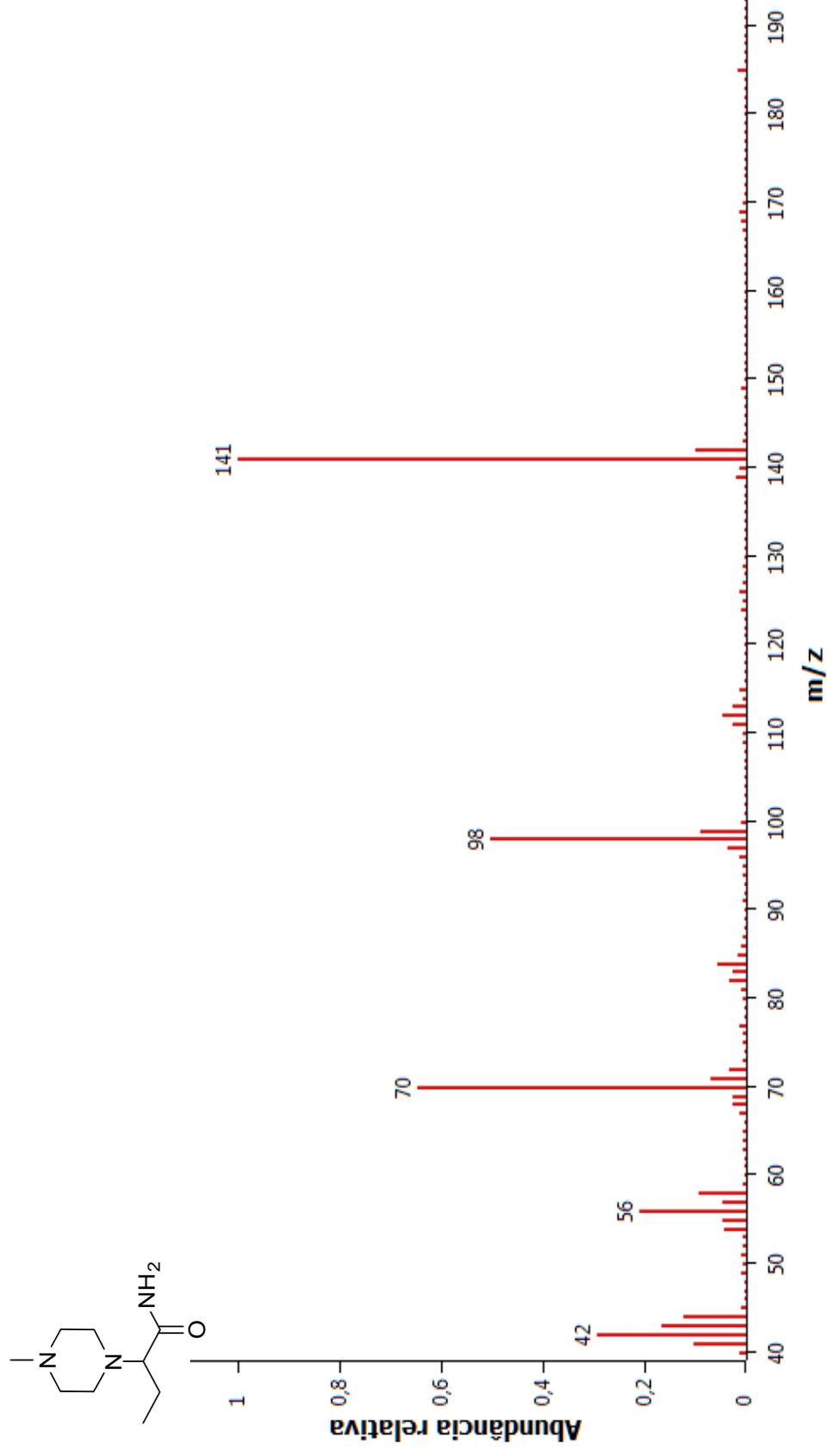


Parameter	Value
1 Solvent	CDCl ₃
2 Temperature	303.2
3 Pulse Sequence	zgpg30
4 Number of Scans	301
5 Relaxation Delay	1.0000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48

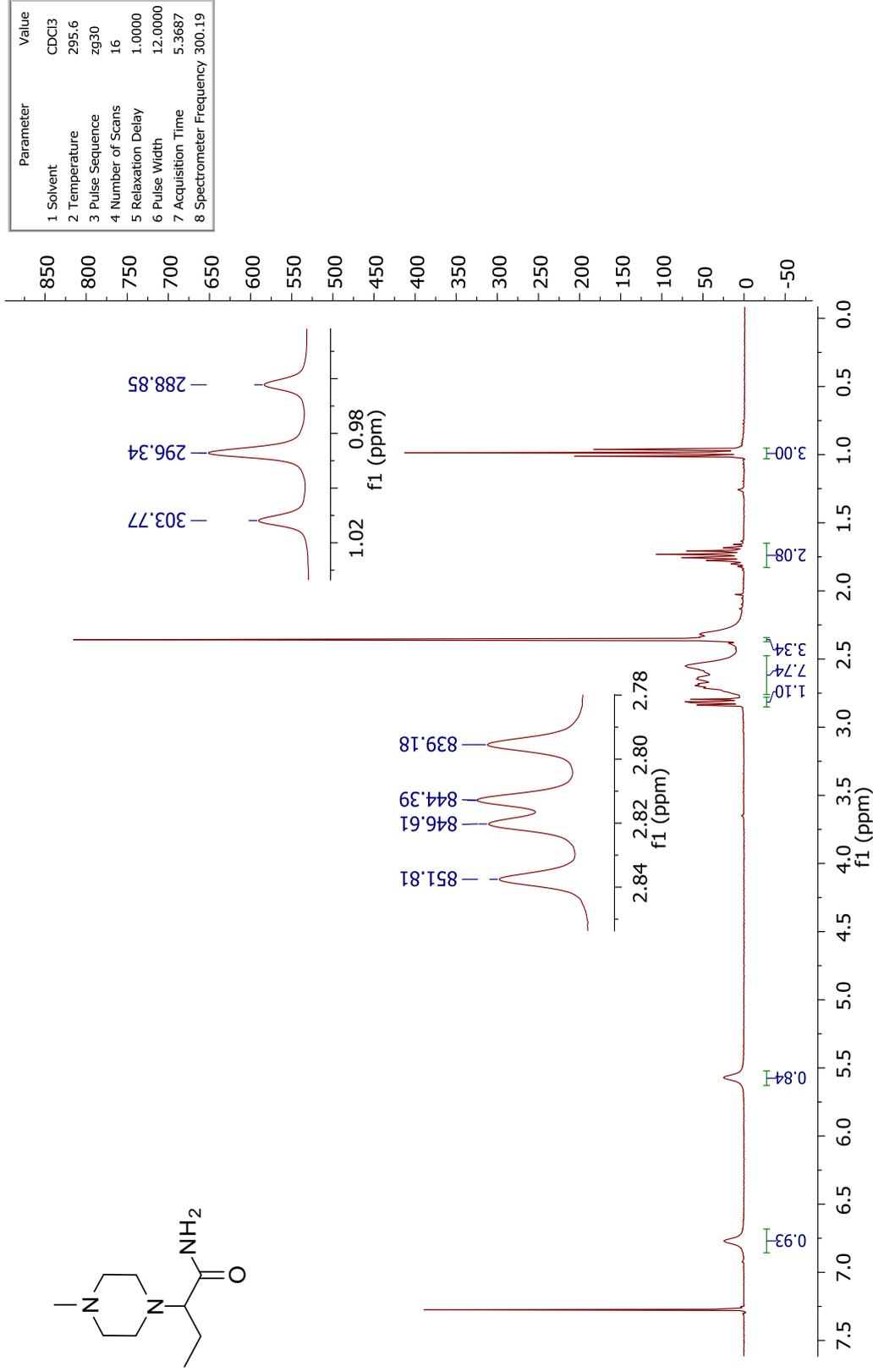
E47 - Espectro de RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃) e experimento DEPT da 2-(2-oxopiperidin-1-yl)butanamida **5b**.



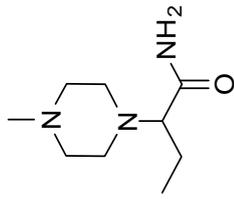
E48 - Espectro no IV da 2-(4-metilpiperazin-1-il)butanamida **5d**.



E49 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-(4-metilpiperazin-1-il)butanamida **5d**.



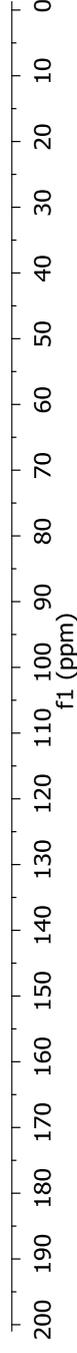
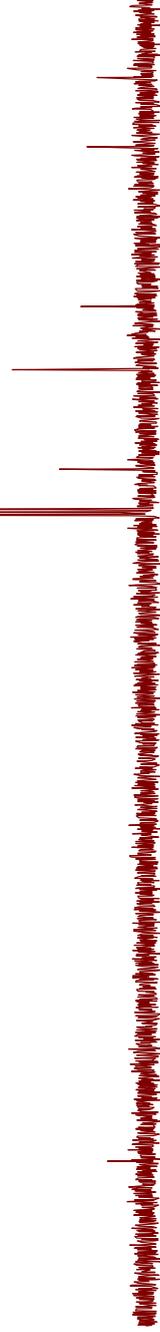
E50 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) da 2-(4-metilpiperazin-1-il)butanamida **5d**.



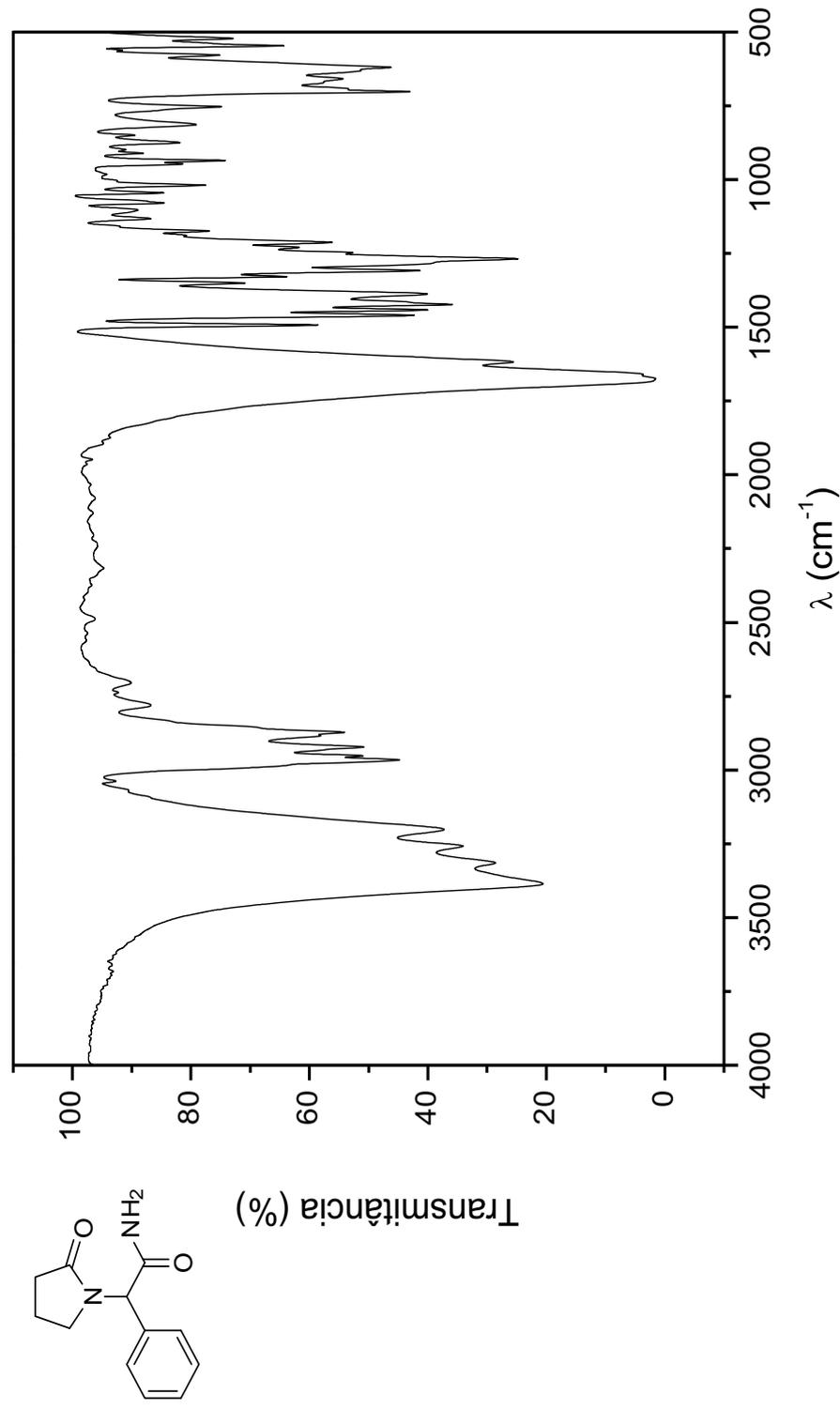
Parameter	Value
1 Solvent	CDCl ₃
2 Temperature	302.9
3 Pulse Sequence	dept135
4 Number of Scans	101
5 Relaxation Delay	1.5000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48



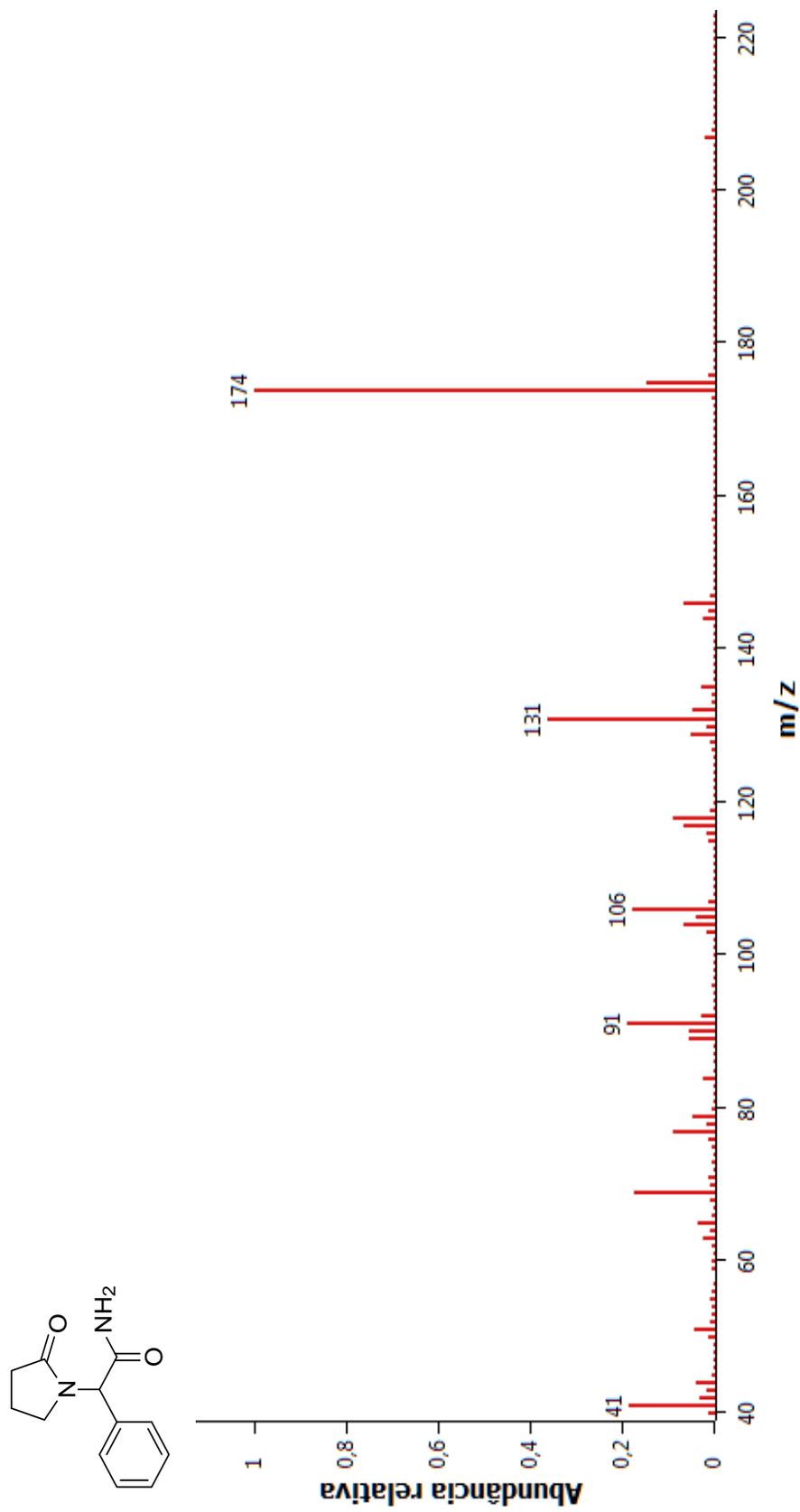
Parameter	Value
1 Solvent	CDCl ₃
2 Temperature	303.3
3 Pulse Sequence	zgpg30
4 Number of Scans	132
5 Relaxation Delay	1.0000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48



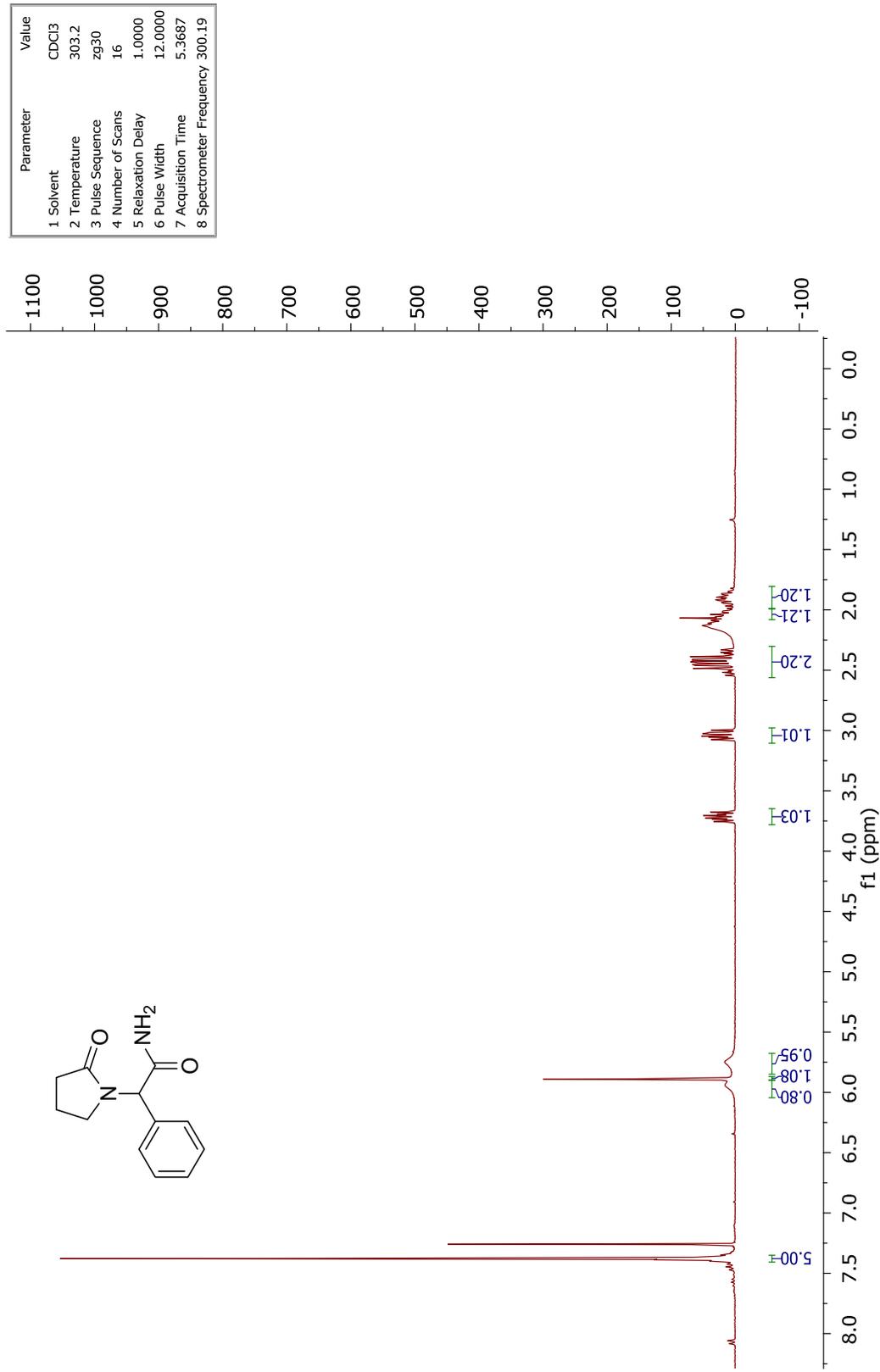
E51 - Espectro de RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃) e experimento DEPT-135 da 2-(4-metilpiperazin-1-il)butanamida **5d**.



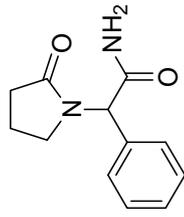
E52 - Espectro no IV da 2-(2-oxopirrolidin-1-yl)-2-fenilacetamida **5'a**.



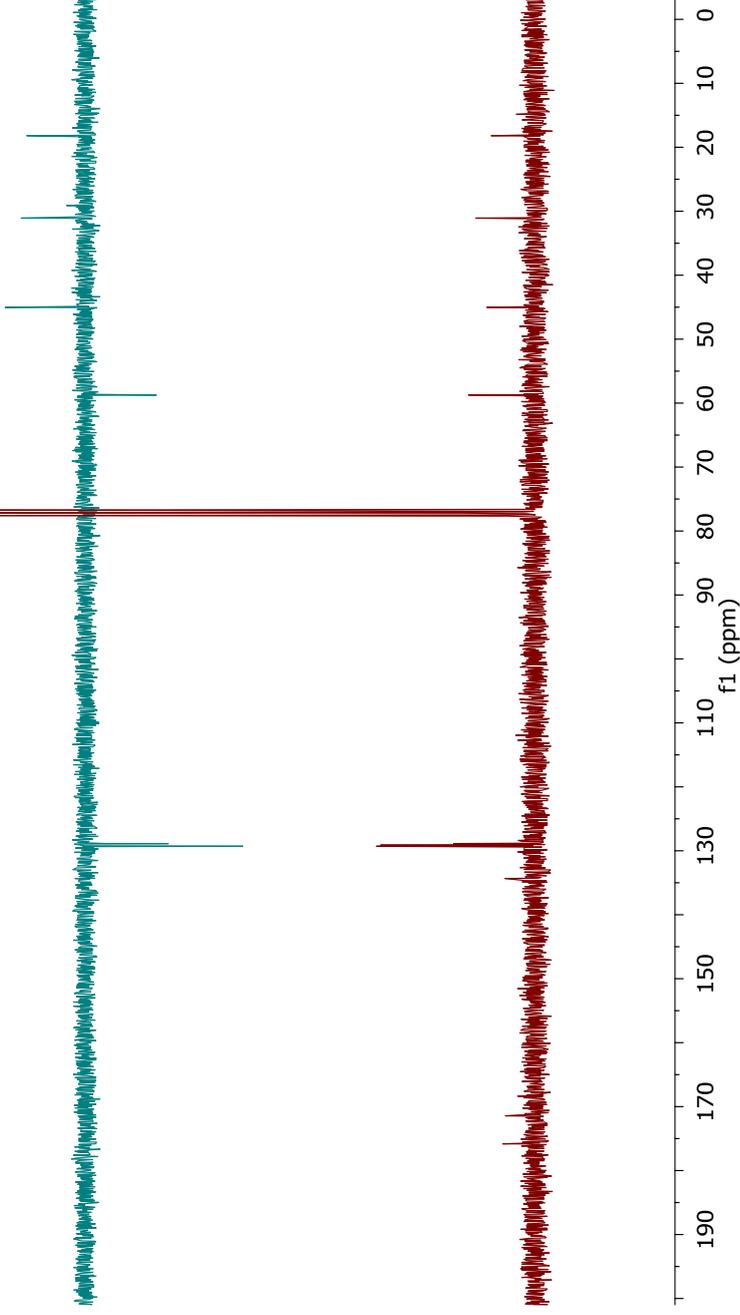
E53 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-(2-oxopirrolidin-1-yl)-2-fenilacetamida **5'a**.



E54 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) da 2-(2-oxopirrolidin-1-il)-2-fenilacetamida **5'a**.

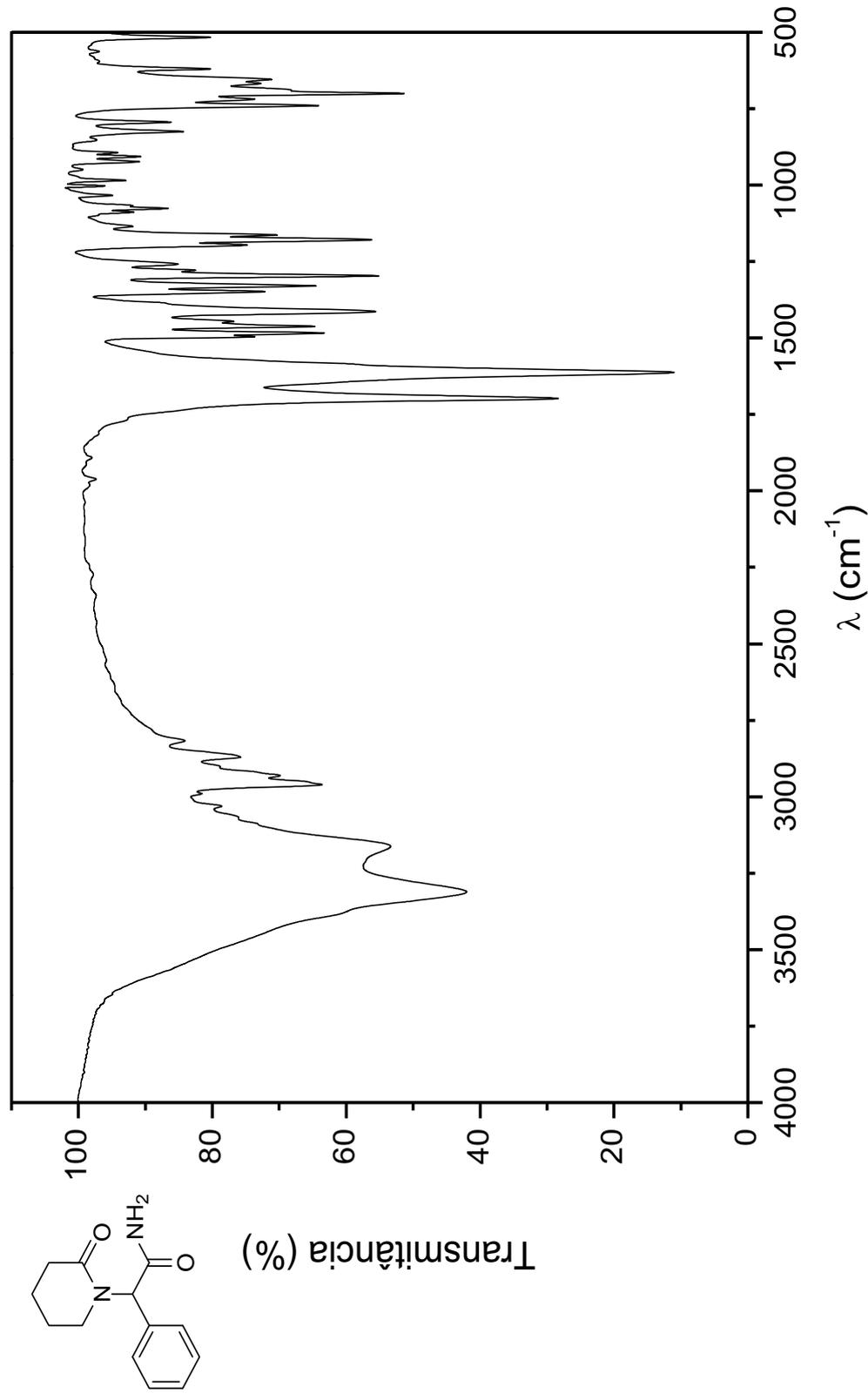


Parameter	Value
1 Solvent	CDCl ₃
2 Temperature	303,0
3 Pulse Sequence	dept135
4 Number of Scans	257
5 Relaxation Delay	1.5000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48

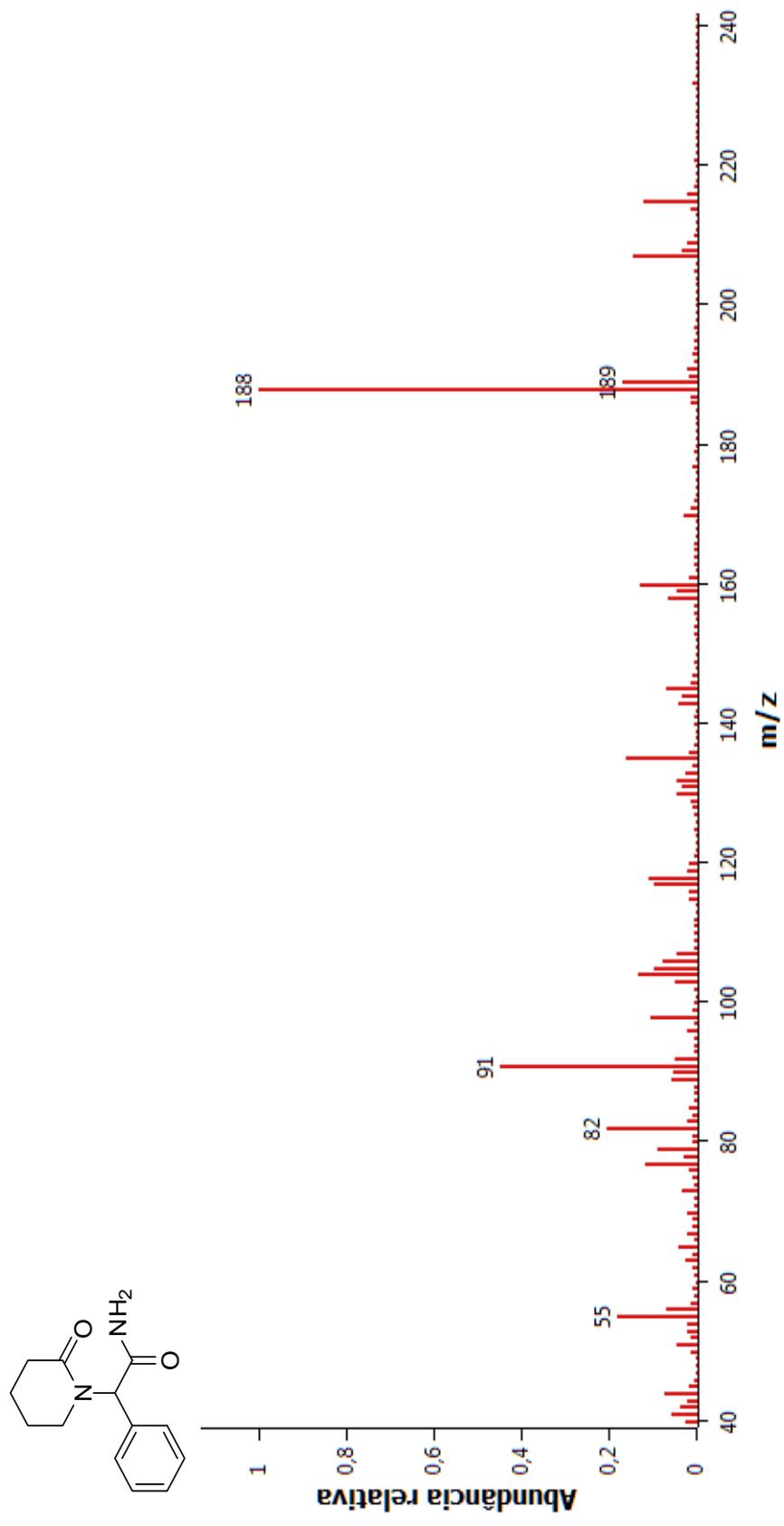


Parameter	Value
1 Solvent	CDCl ₃
2 Temperature	303,2
3 Pulse Sequence	zpg30
4 Number of Scans	376
5 Relaxation Delay	1.0000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48

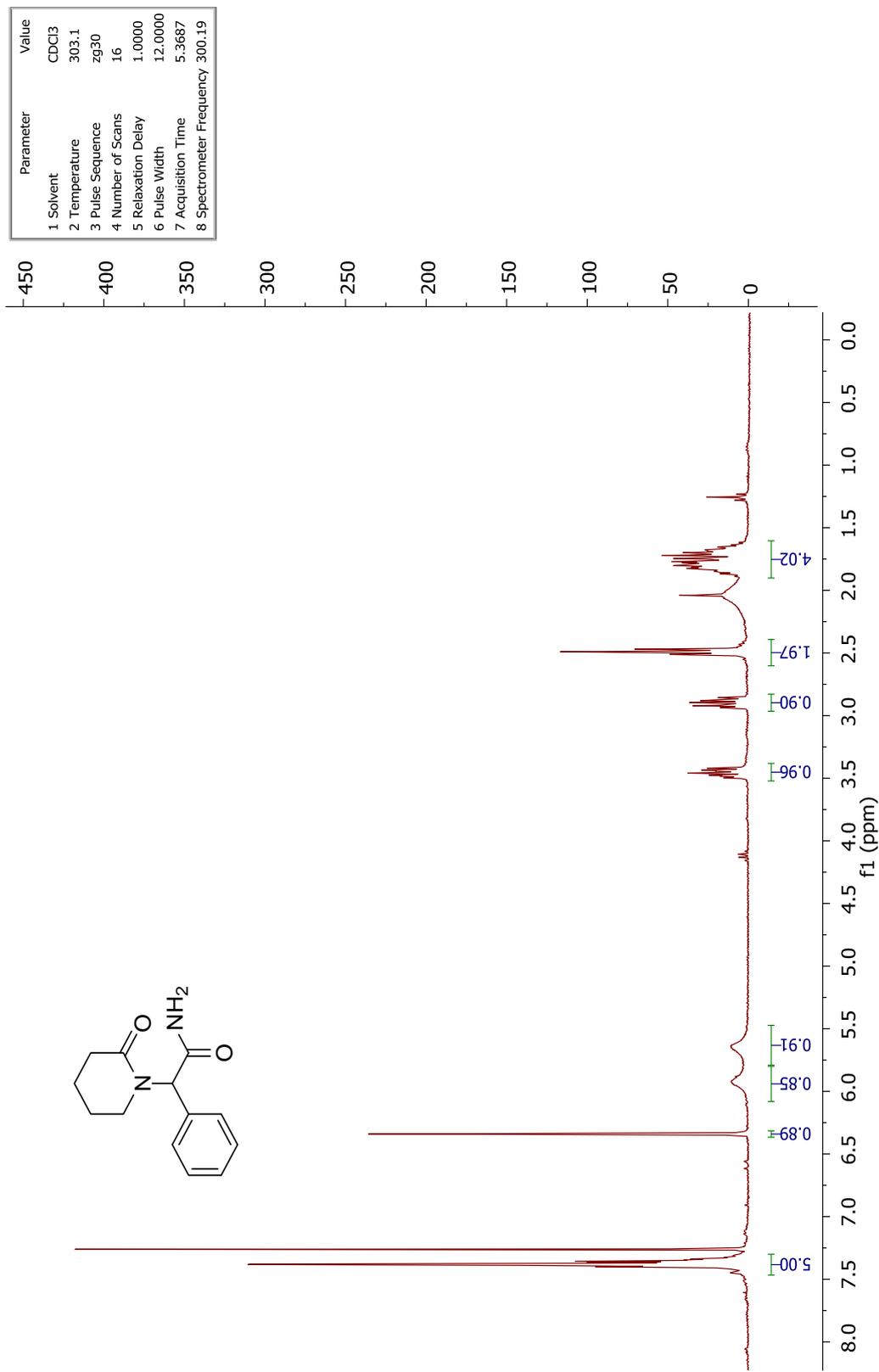
E55 - Espectro de RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃) e experimento DEPT-135 da 2-(2-oxopiperidin-1-yl)-2-fenilacetamida **5'a**.



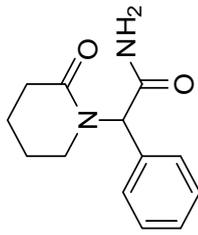
E56 - Espectro no IV da 2-(2-oxopiperidin-1-il)-2-fenilacetamida **5'b**.



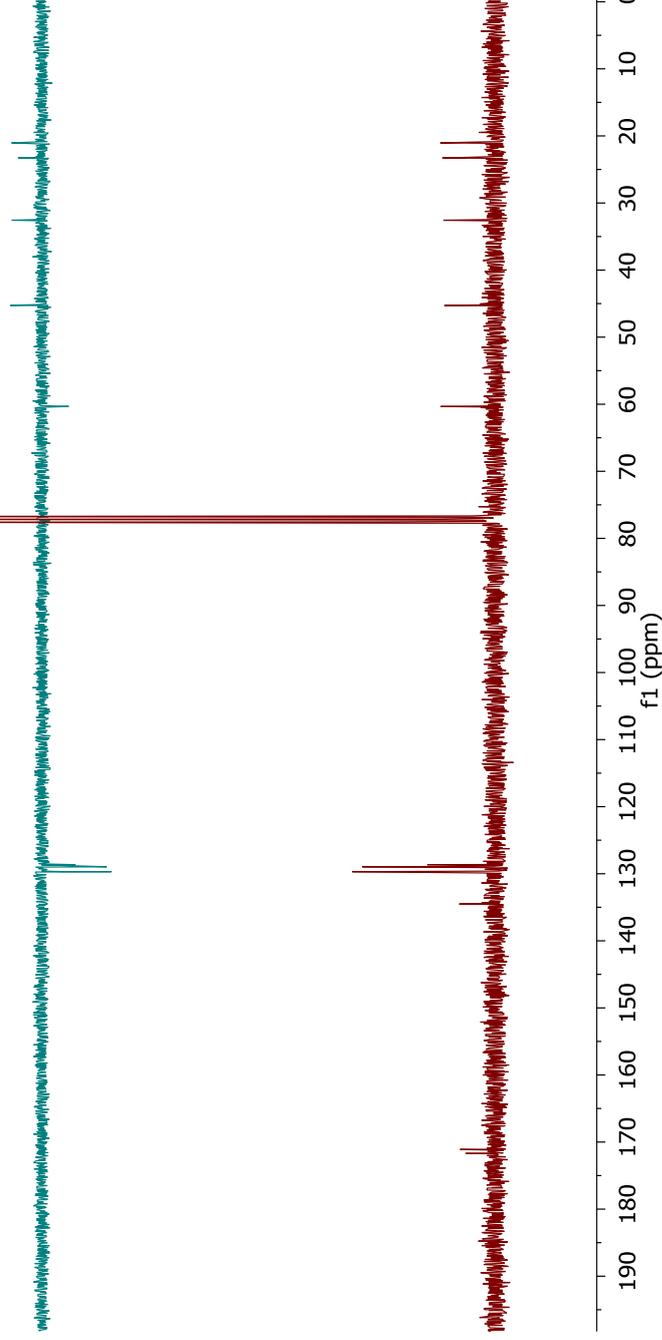
E57 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-(2-oxopiperidin-1-il)-2-fenilacetamida **5'b**.



E58 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) da 2-(2-oxopiperidin-1-il)-2-fenilacetamida **5'b**.

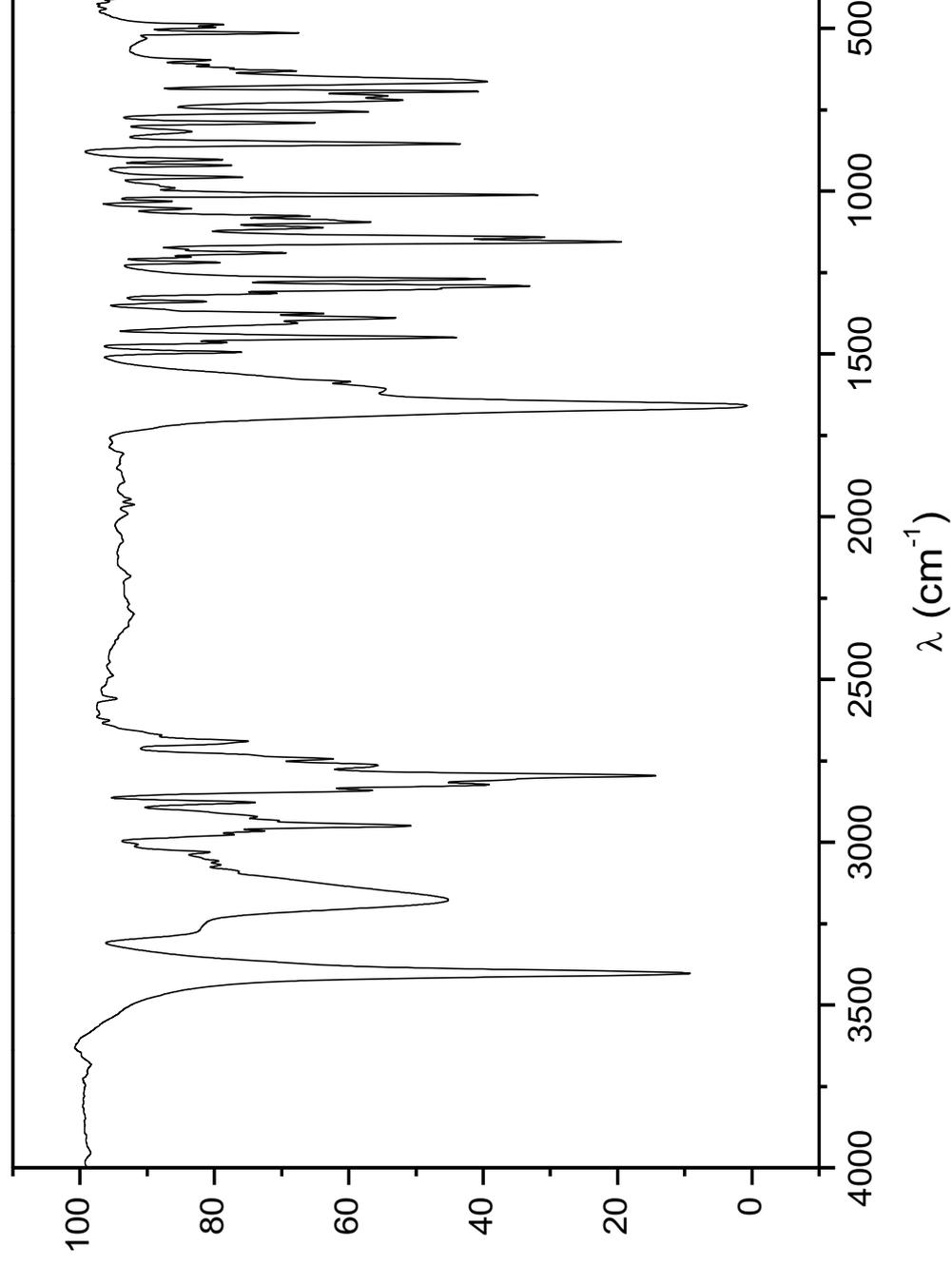
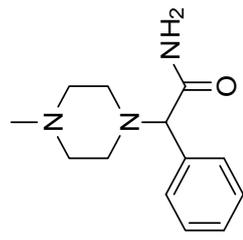


Parameter	Value
1 Solvent	CDCl ₃
2 Temperature	303.1
3 Pulse Sequence	dept135
4 Number of Scans	200
5 Relaxation Delay	1.5000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48

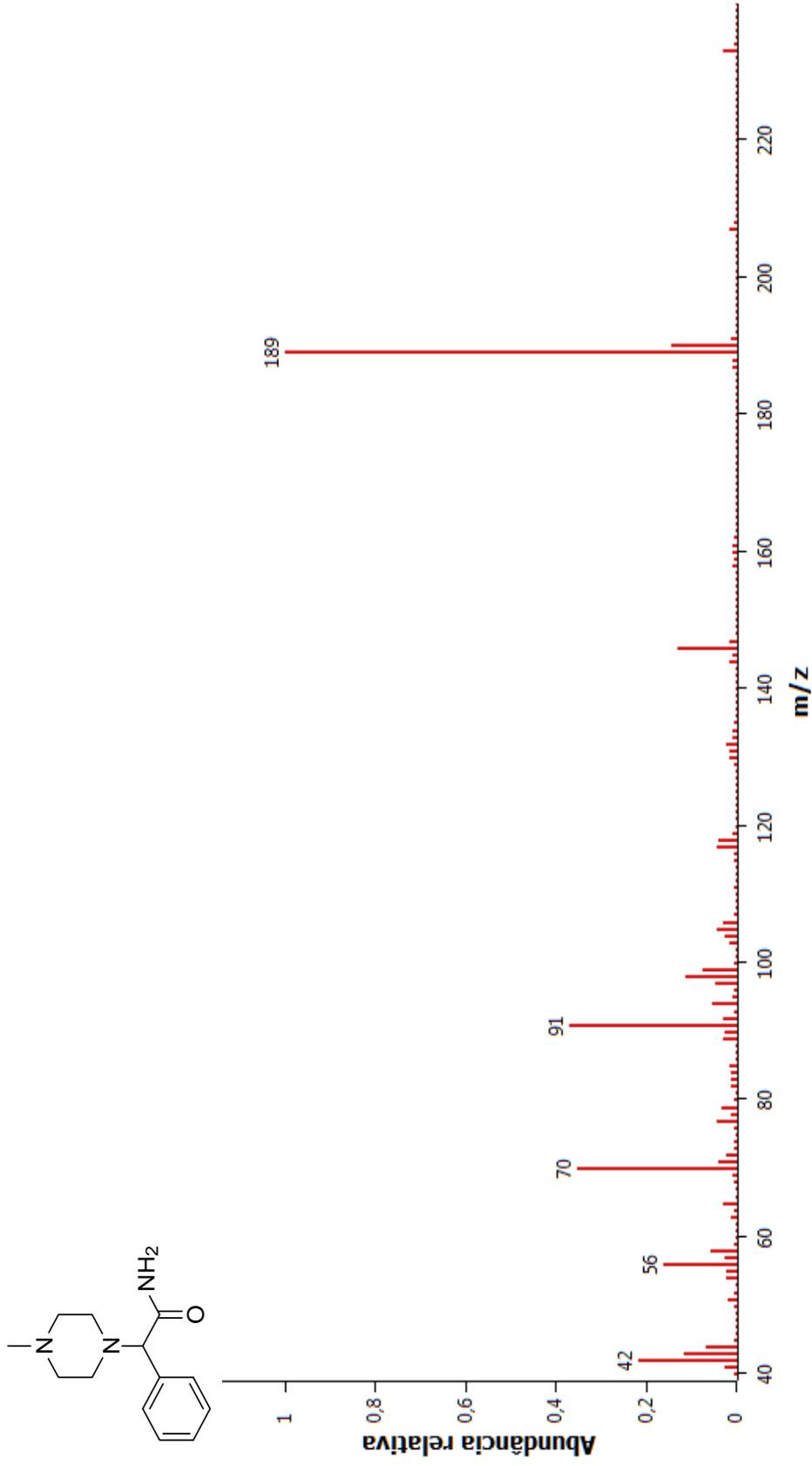


Parameter	Value
1 Solvent	CDCl ₃
2 Temperature	303.3
3 Pulse Sequence	zgpg30
4 Number of Scans	602
5 Relaxation Delay	1.0000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48

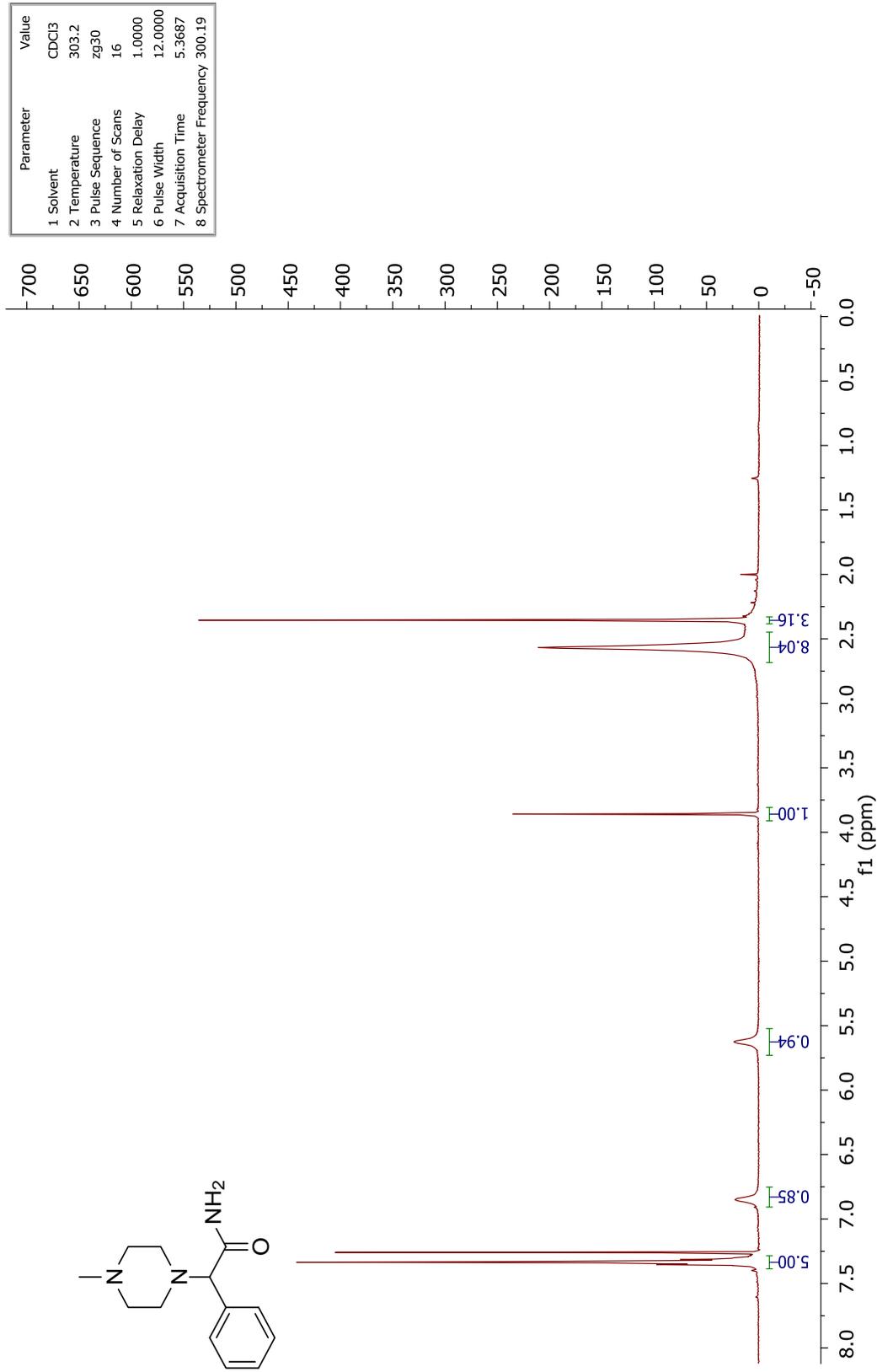
E59 - Espectro de RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃) e experimento DEPT-135 da 2-(2-oxopiperidin-1-il)-2-fenilacetamida **5'b**.



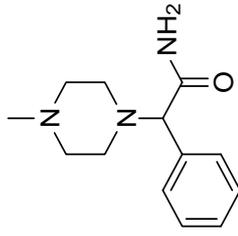
E60 - Espectro no IV da 2-(4-metilpiperazin-1-il)-2-fenilacetamida **5'd**.



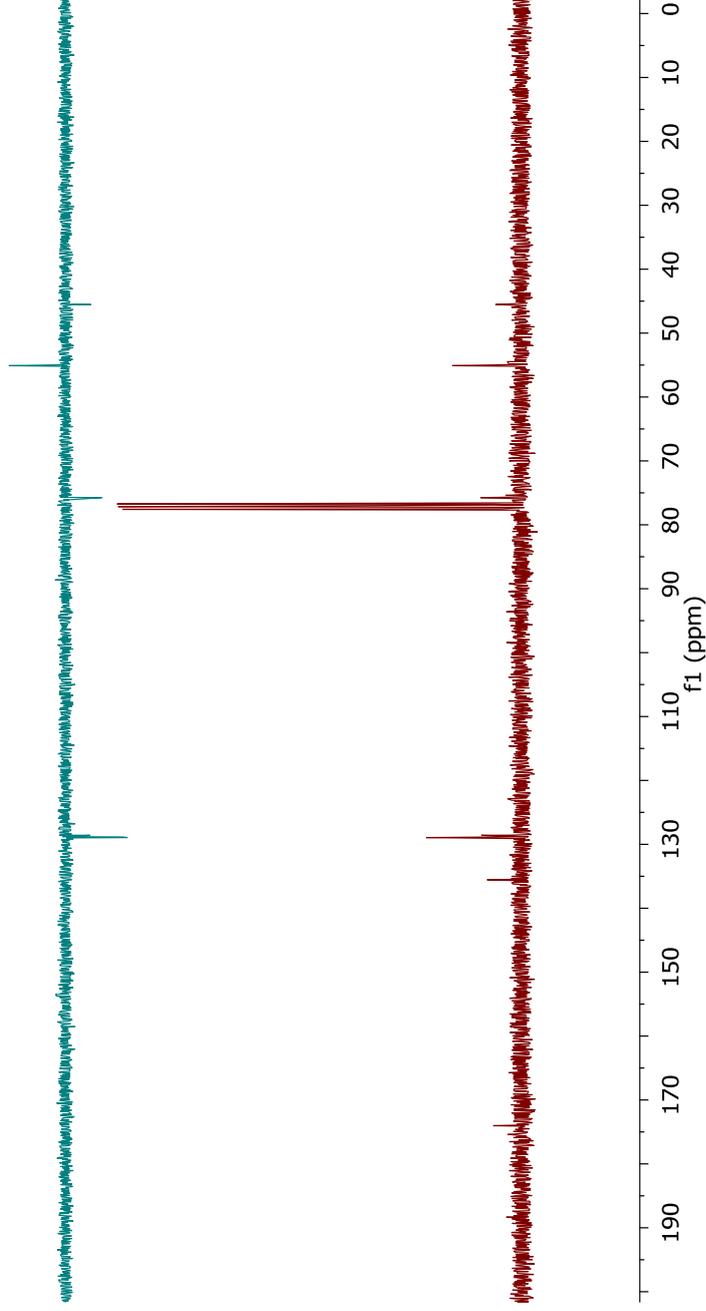
E61 - Espectro de massas (EI, 70 eV) da 2-(4-metilpiperazin-1-il)-2-fenilacetamida **5'd**.



E62 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) da 2-(4-metilpiperazin-1-il)-2-fenilacetamida **5'd**.

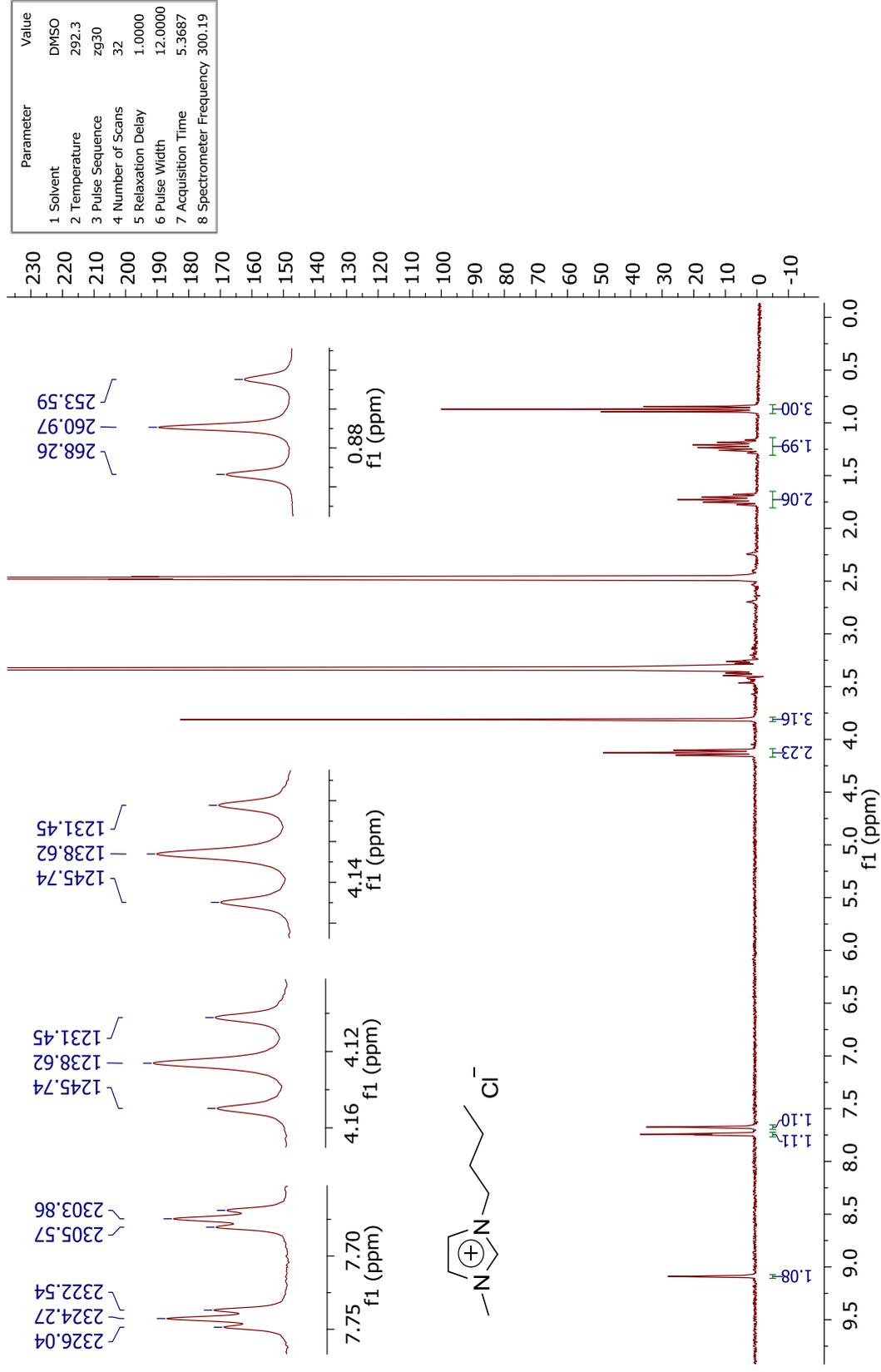


Parameter	Value
1 Solvent	CDCl ₃
2 Temperature	303.0
3 Pulse Sequence	dept135
4 Number of Scans	103
5 Relaxation Delay	1.5000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48

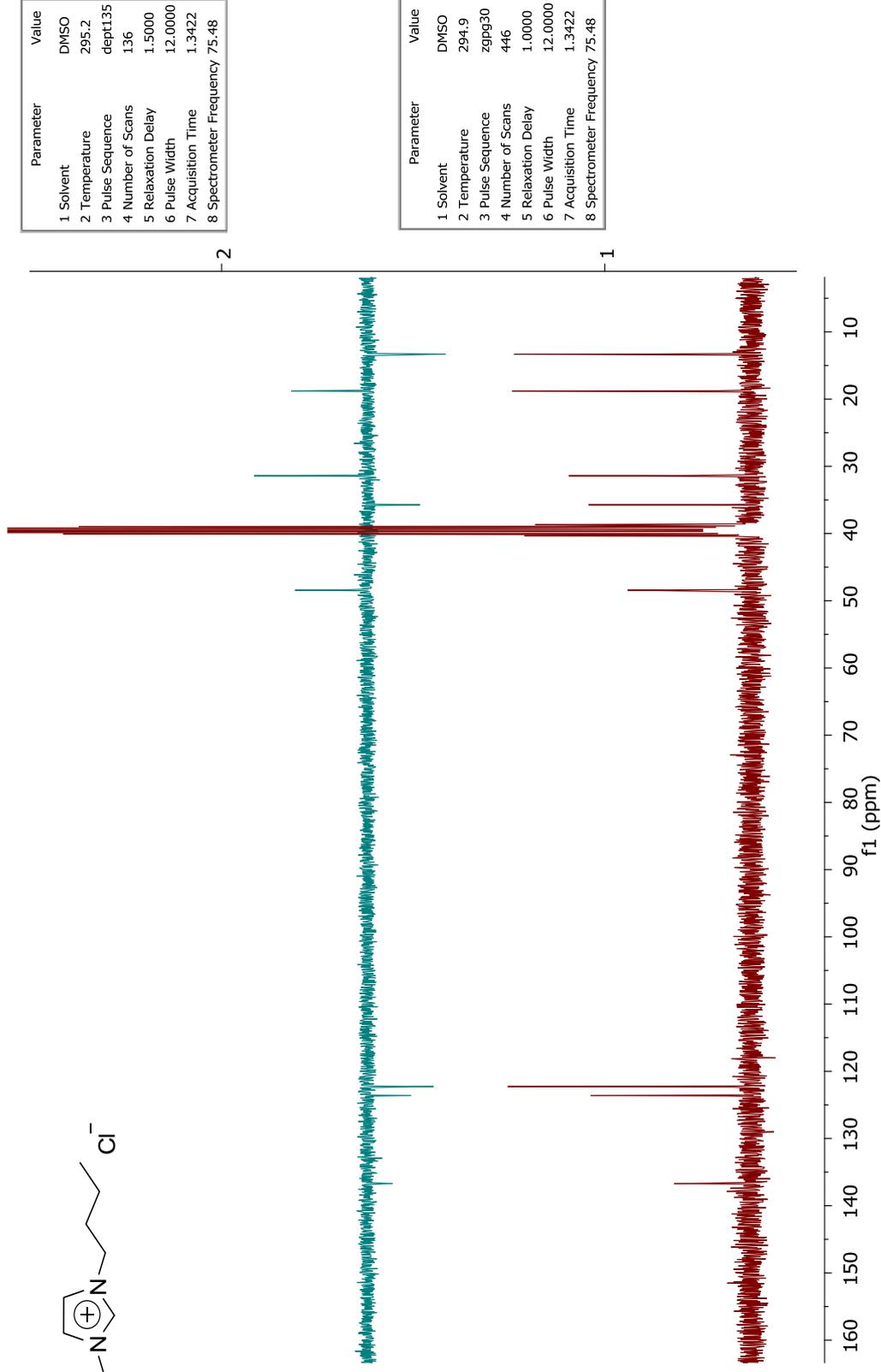


Parameter	Value
1 Solvent	CDCl ₃
2 Temperature	303.2
3 Pulse Sequence	zgpg30
4 Number of Scans	239
5 Relaxation Delay	1.0000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48

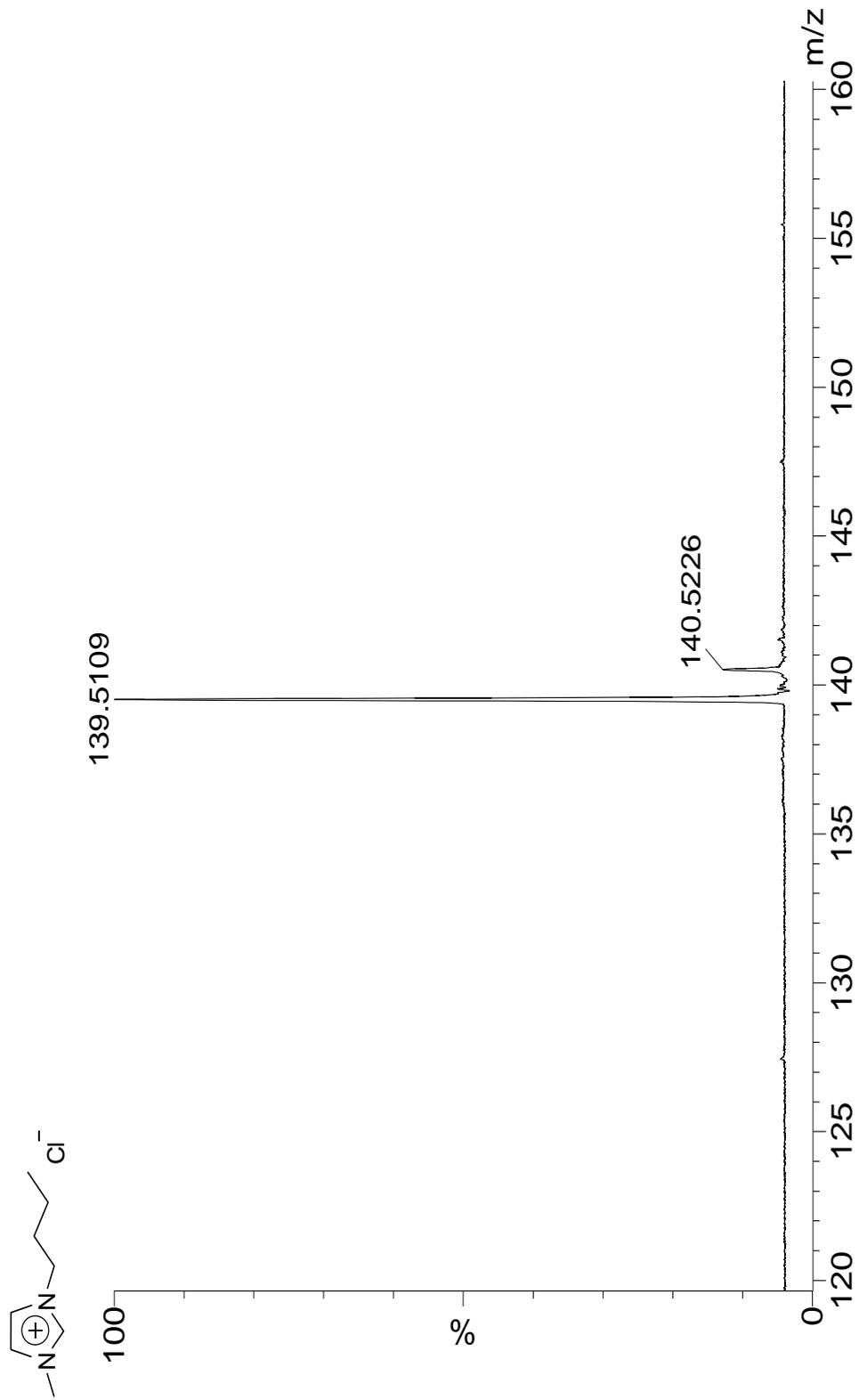
E63 - Espectro de RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃) e experimento DEPT-135 da 2-(4-metilpiperazin-1-il)-2-fenilacetamida **5d**.



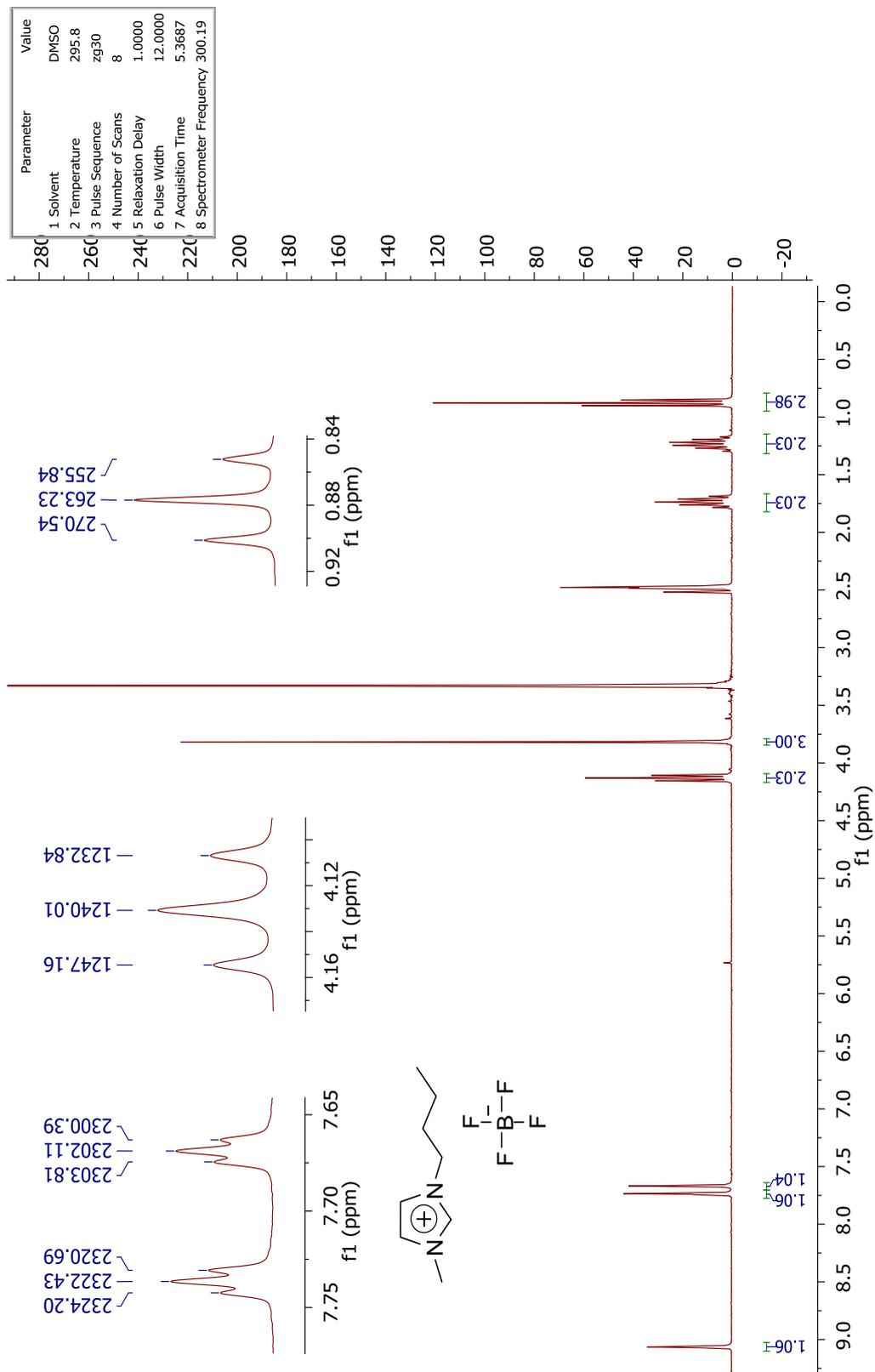
E64 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio.



E65 - Espectro de RMN de ¹³C (75,48 MHz, DMSO-d₆) do cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio.

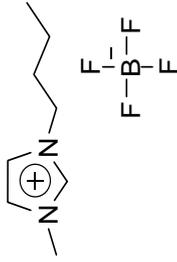


E66 - Espectro de massas (MALDI-(+)-TOF-MS) do cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio.

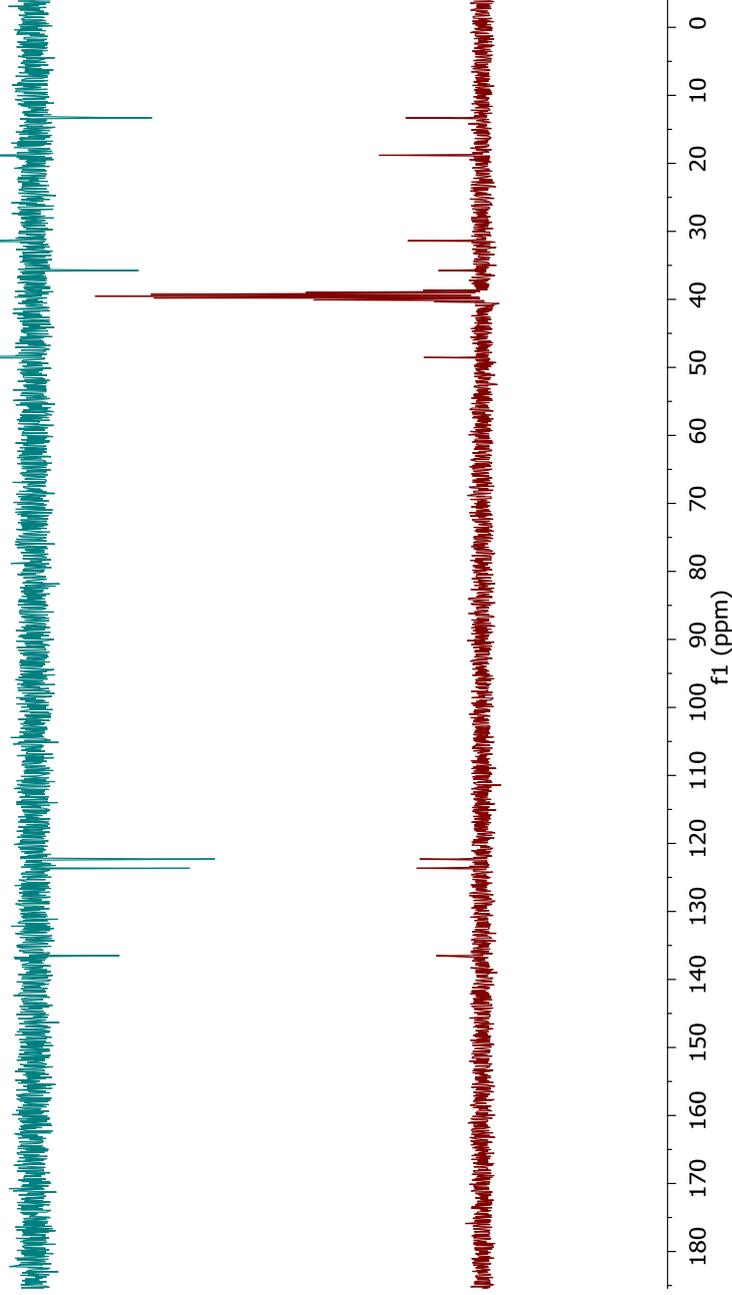


Parameter	Value
1 Solvent	DMSO
2 Temperature	295.8
3 Pulse Sequence	zg30
4 Number of Scans	8
5 Relaxation Delay	1.0000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	5.3687
8 Spectrometer Frequency	300.19

E67 - Espectro de RMN de ¹H (300,19 MHz, DMSO-*d*₆) do tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio.

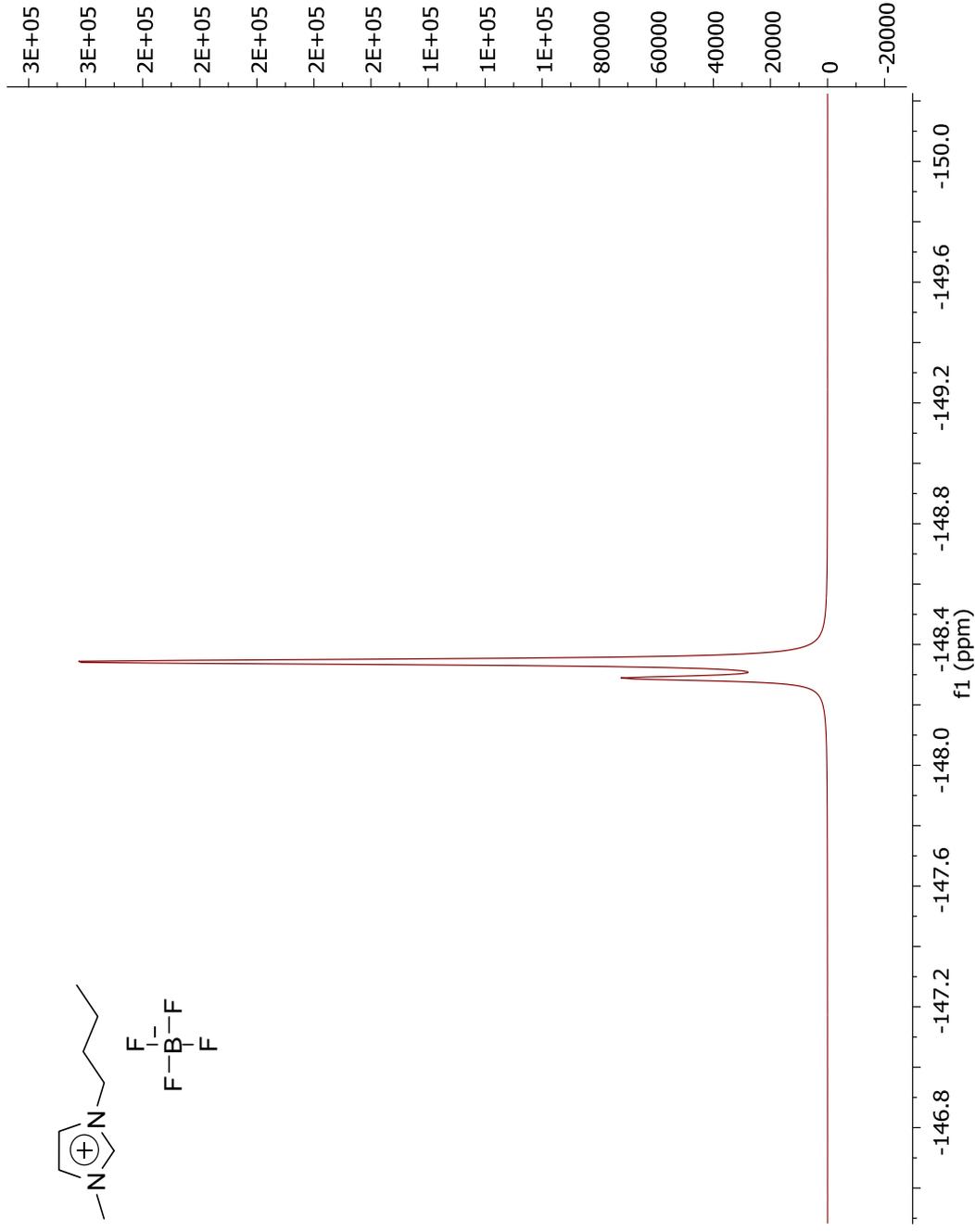
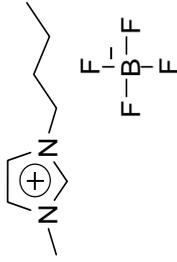


Parameter	Value
1 Solvent	DMSO
2 Temperature	296.4
3 Pulse Sequence	dept135
4 Number of Scans	91
5 Relaxation Delay	1.5000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48



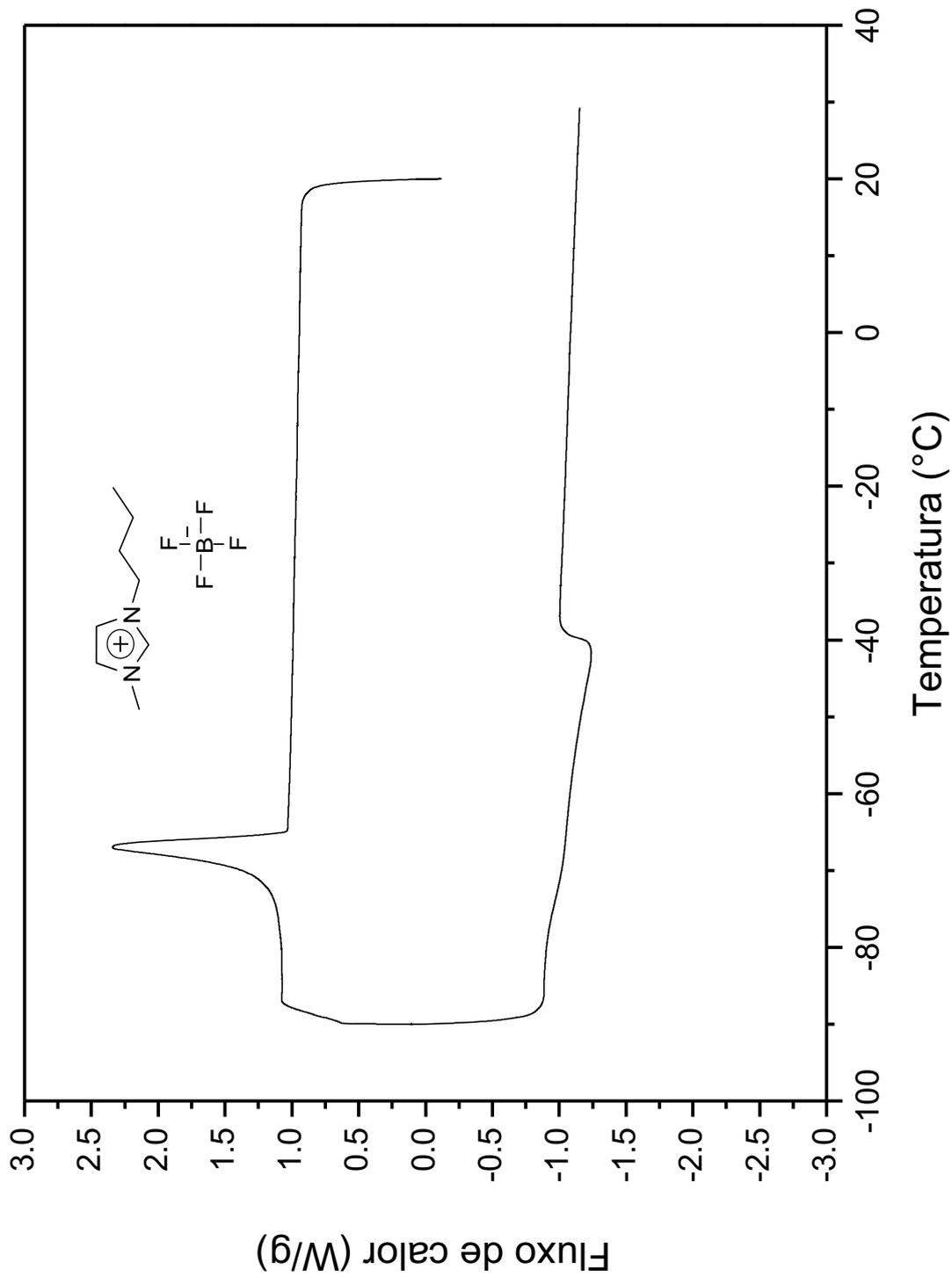
Parameter	Value
1 Solvent	DMSO
2 Temperature	296.4
3 Pulse Sequence	zgpg30
4 Number of Scans	34
5 Relaxation Delay	2.0000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48

E68 - Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio.

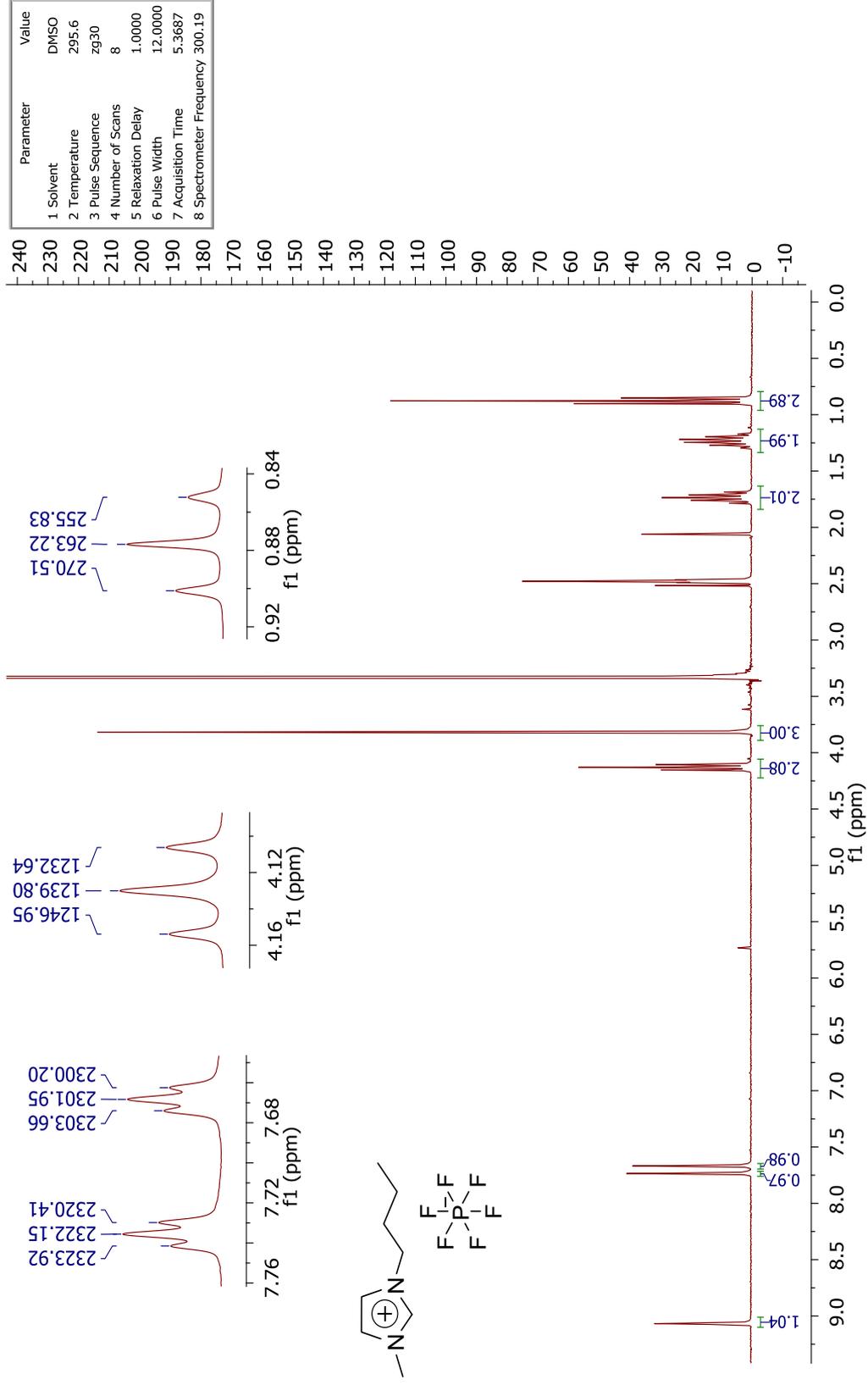


Parameter	Value
1 Solvent	DMSO
2 Temperature	299.9
3 Pulse Sequence	zgfgq
4 Number of Scans	256
5 Relaxation Delay	1.0000
6 Pulse Width	12.9000
7 Acquisition Time	0.3845
8 Spectrometer Frequency	376.48

E69 - Espectro de RMN de ^{19}F (376,48 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio.

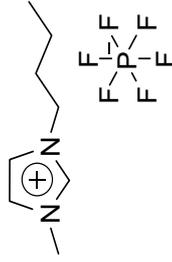


E70 - Termograma do tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio.



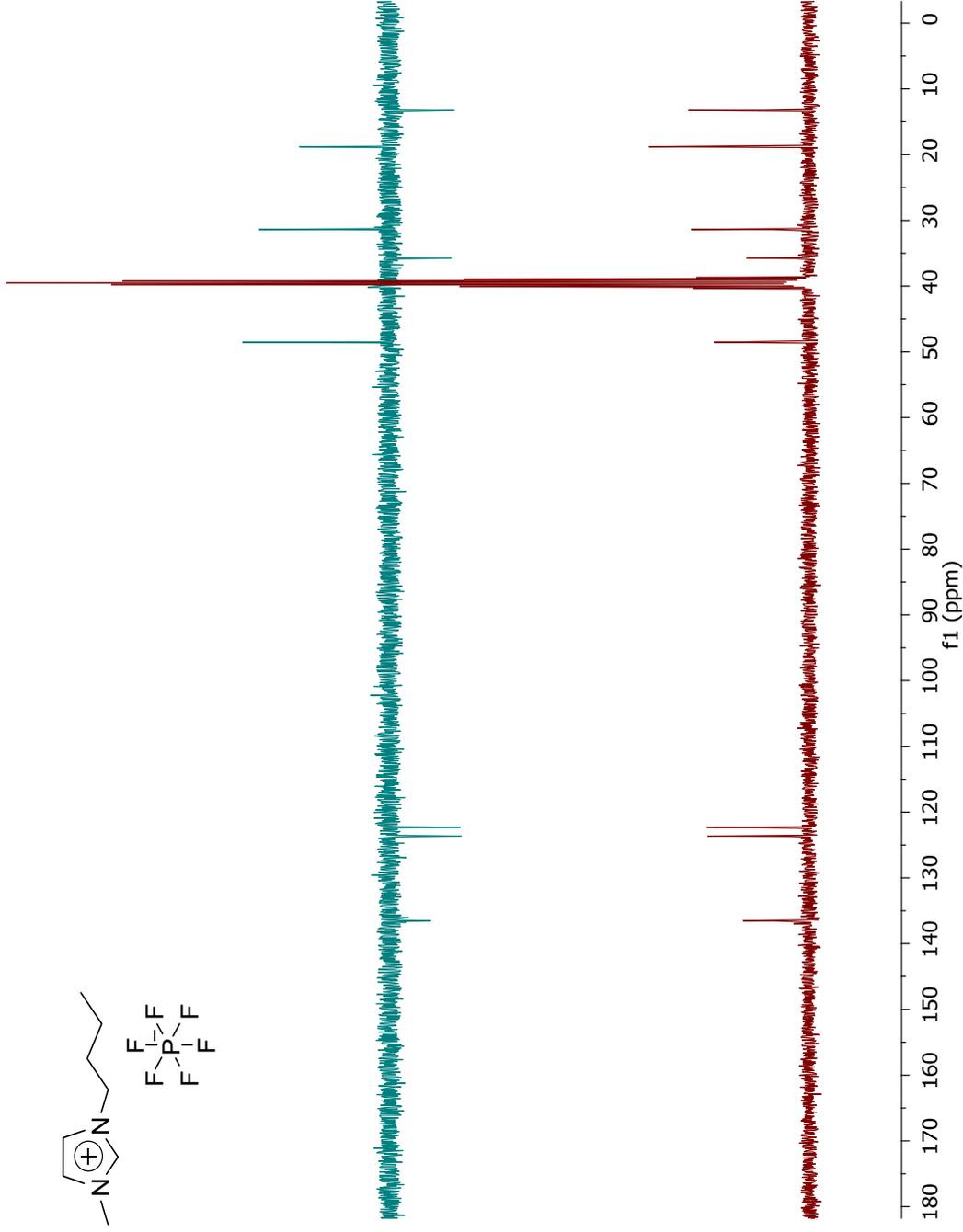
Parameter	Value
1. Solvent	DMSO
2. Temperature	295.6
3. Pulse Sequence	zg30
4. Number of Scans	8
5. Relaxation Delay	1.0000
6. Pulse Width	12.0000
7. Acquisition Time	5.3687
8. Spectrometer Frequency	300.19

E71 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio.

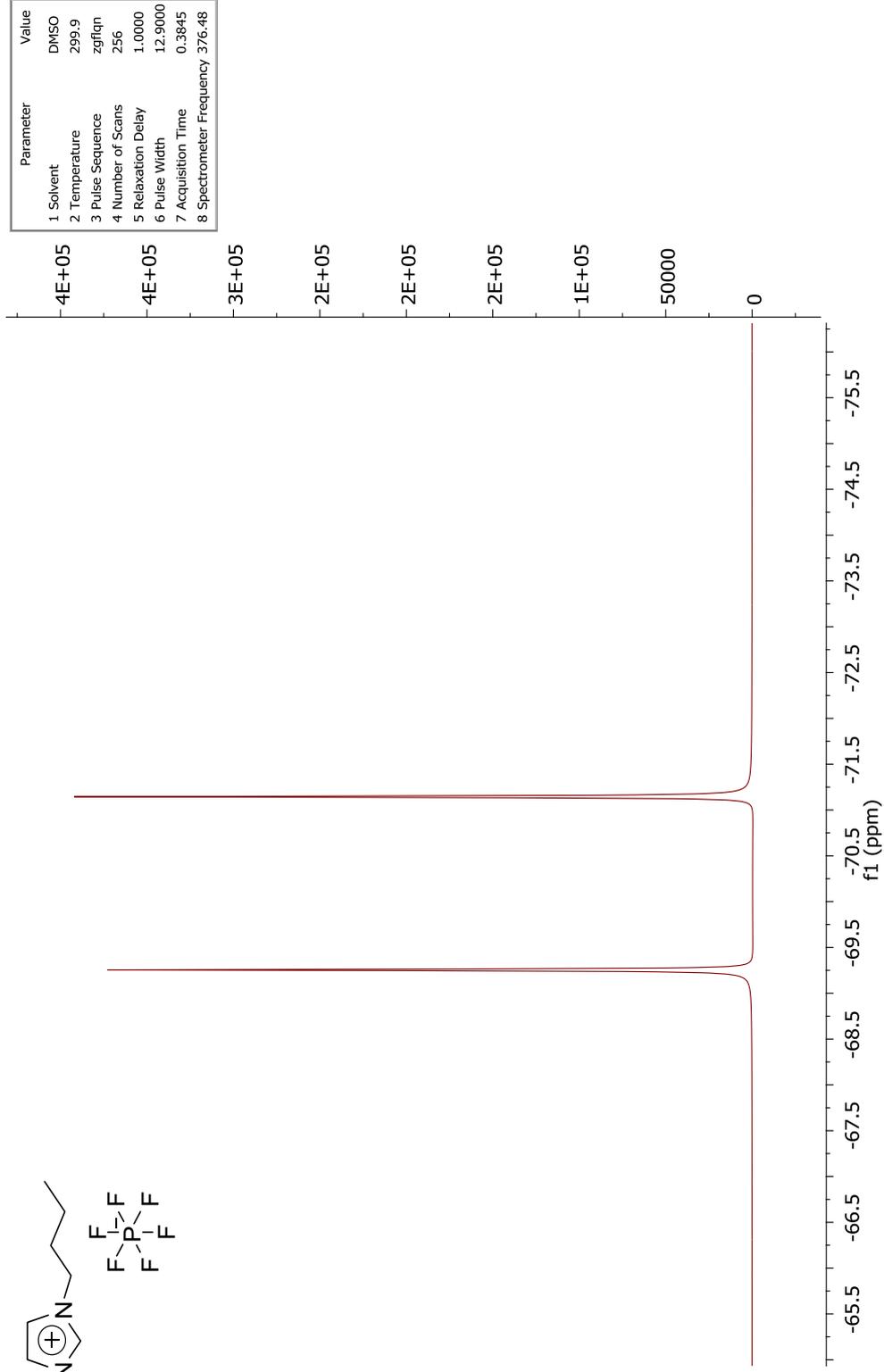
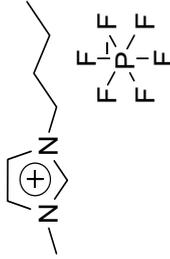


Parameter	Value
1 Solvent	DMSO
2 Temperature	296.5
3 Pulse Sequence	dept135
4 Number of Scans	91
5 Relaxation Delay	1.5000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48

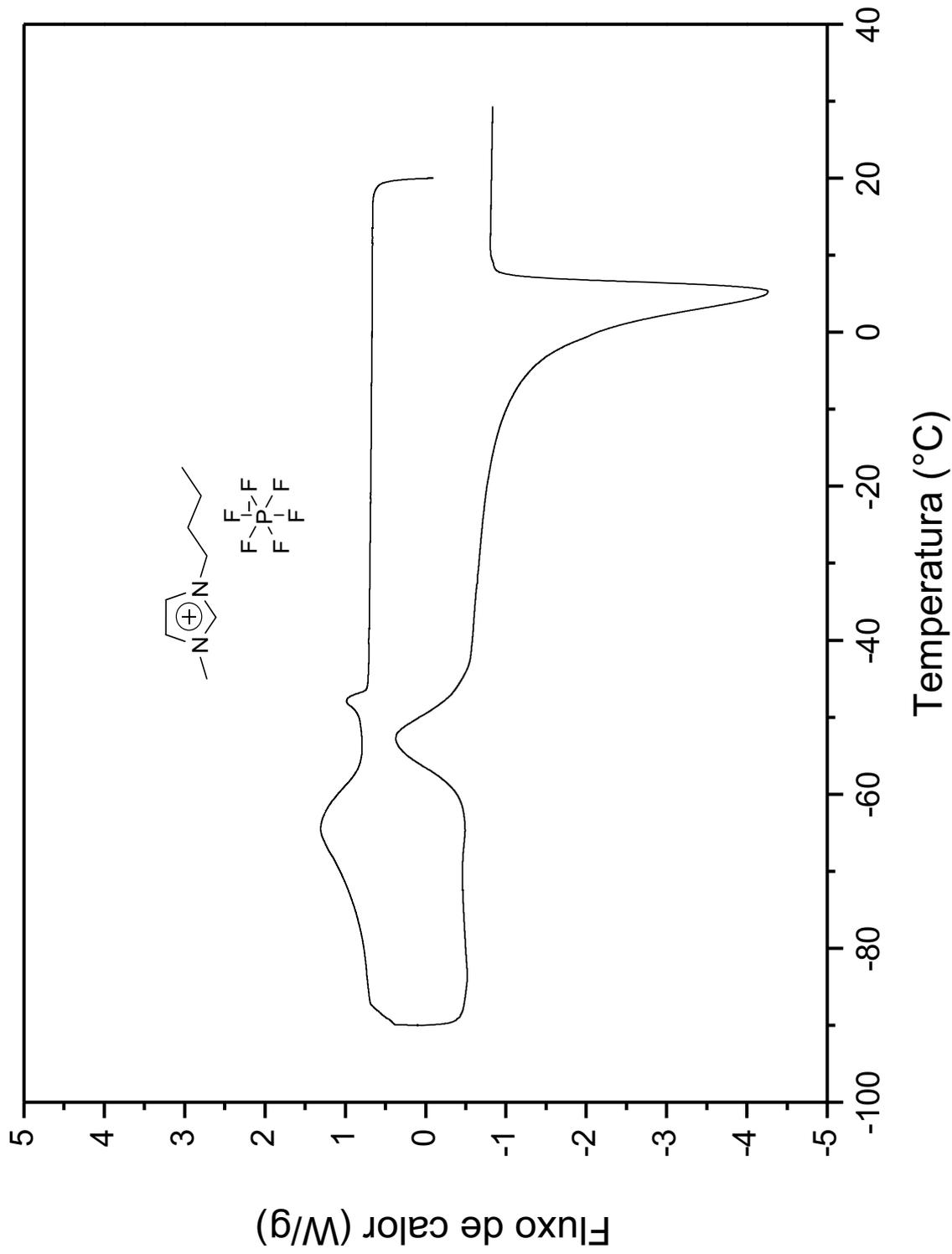
Parameter	Value
1 Solvent	DMSO
2 Temperature	296.6
3 Pulse Sequence	zgpg30
4 Number of Scans	281
5 Relaxation Delay	2.0000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48



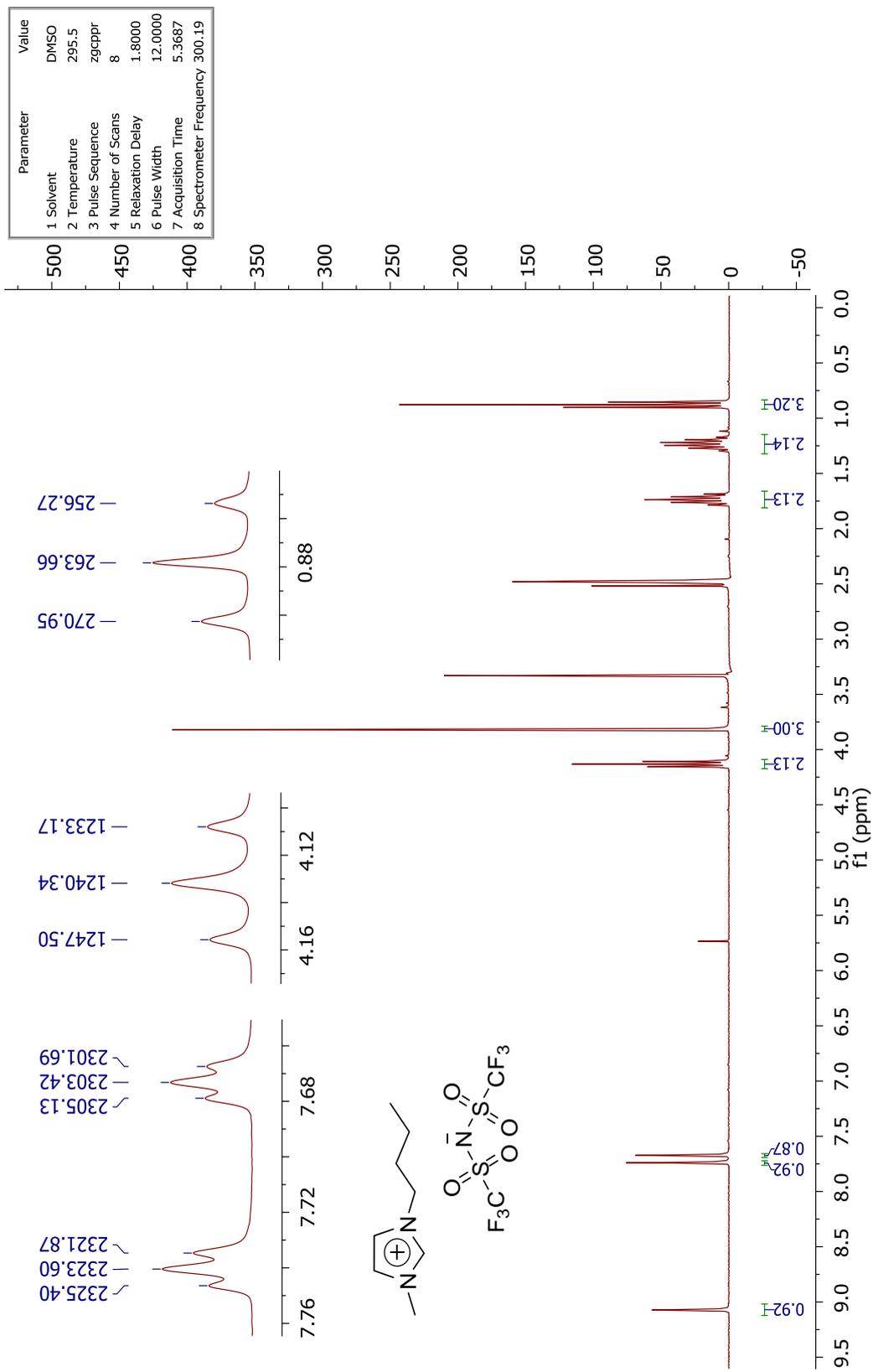
E72 - Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio.



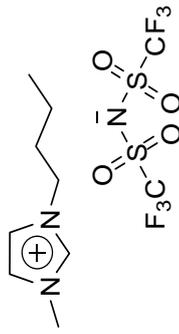
E73 - Espectro de RMN de ^{19}F (376,48 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio.



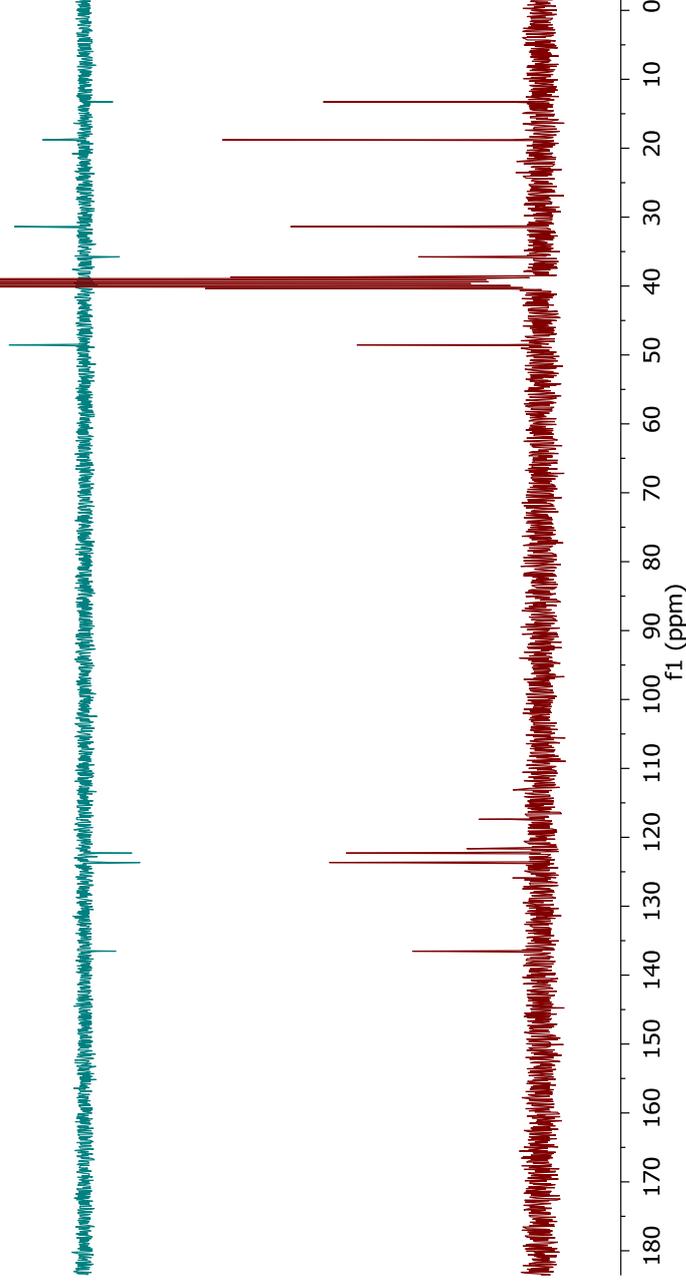
E74 - Termograma do hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio.



E75 - Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-butil-3-metilimidazólio.

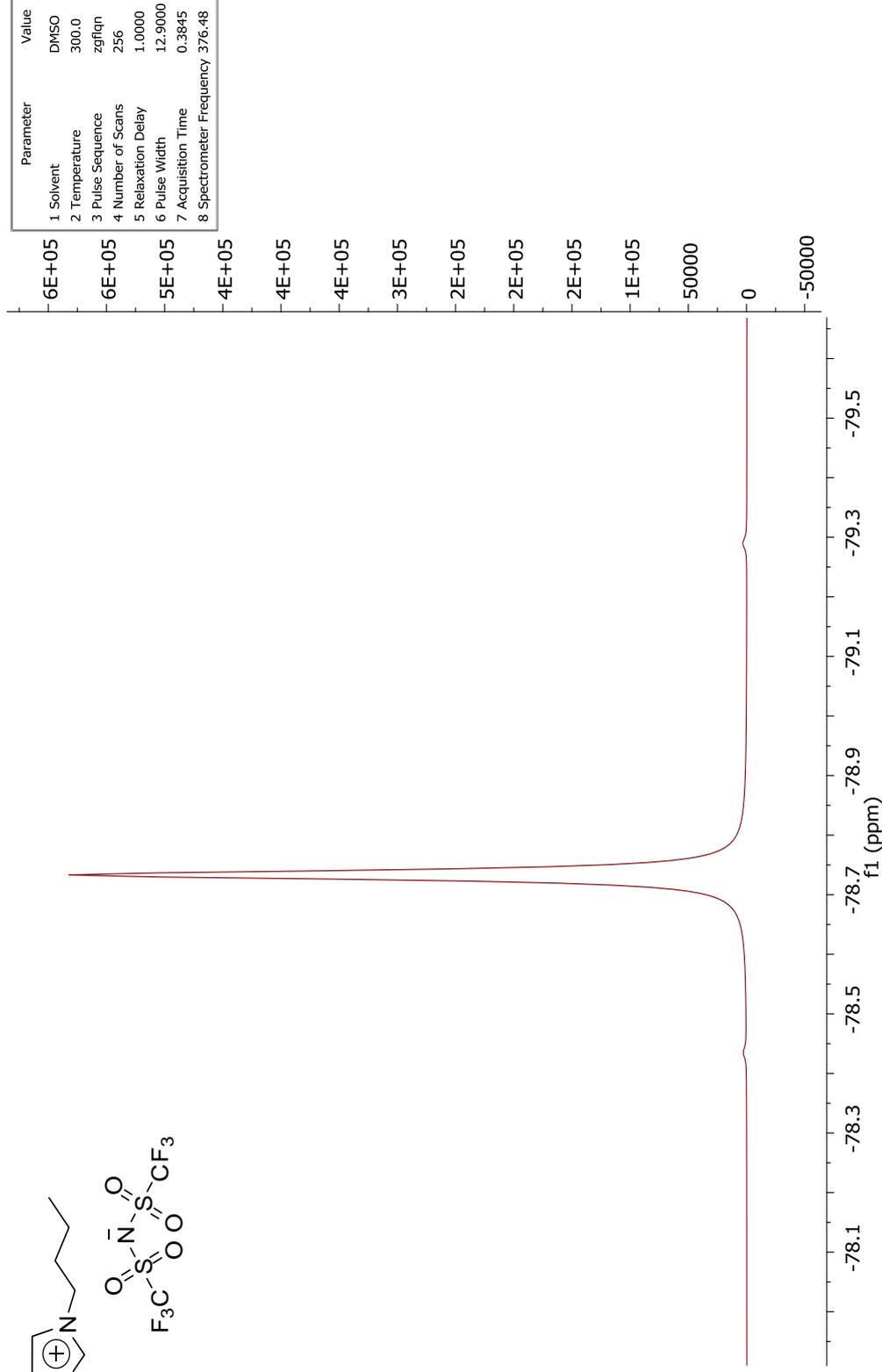
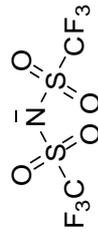
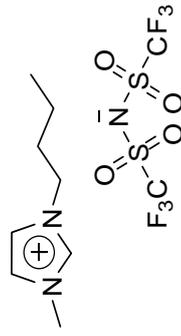


Parameter	Value
1 Solvent	DMSO
2 Temperature	296.6
3 Pulse Sequence	dept135
4 Number of Scans	129
5 Relaxation Delay	1.5000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48

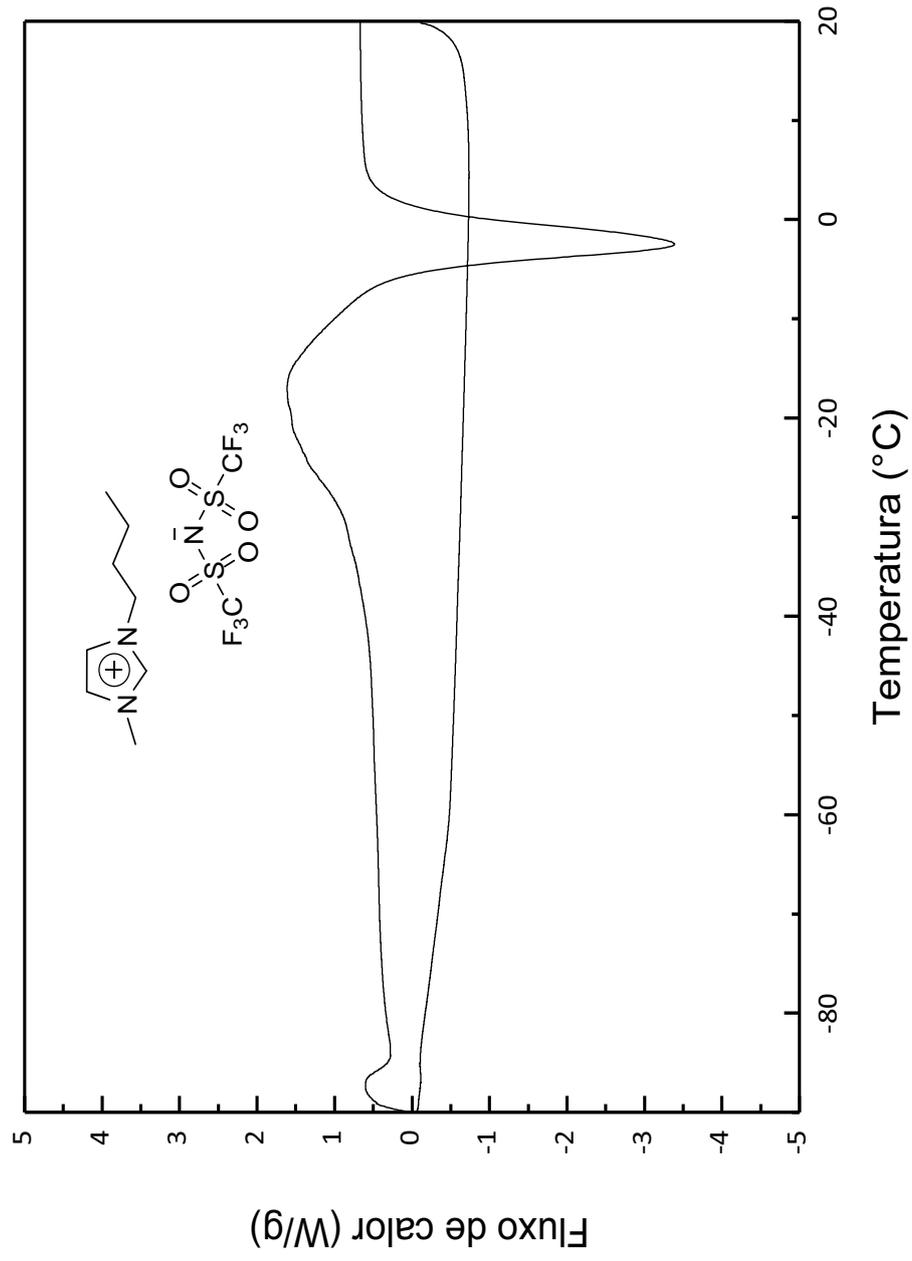


Parameter	Value
1 Solvent	DMSO
2 Temperature	296.3
3 Pulse Sequence	zgpg30
4 Number of Scans	500
5 Relaxation Delay	2.0000
6 Pulse Width	12.0000
7 Acquisition Time	1.3422
8 Spectrometer Frequency	75.48

E76 - Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do bis[(trifluorometil)sulfoni]imida de 1-butil-3-metilimidazólio.



E77 - Espectro de RMN de ^{19}F (376,48 MHz, DMSO- d_6) do bis[(trifluorometil)sulfonil]ímida de 1-butil-3-metilimidazólio.



E78 - Termograma do bis[(trifluorometil)sulfonyl]imida de 1-butil-3-metilimidazólio.