



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Aminólise do (S)-Mandelato de Etila Catalisada pela Lipase de *Candida antarctica*-CALB

Rafaely Nascimento Lima e André Luiz Meleiro Porto

Universidade de São Paulo – Instituto de Química de São Carlos
Caixa Postal 780 - CEP 13566-590 São Carlos– SP - E-mail: raffinha_lima@hotmail.com

RESUMO

Neste trabalho foram sintetizadas amidas via reações de aminólise catalisada pela lipase de *Candida antarctica* (CALB). Sem excesso de reagentes (1:1) e com CALB obteve-se a reação entre o (S)-mandelato de etila (S-MEt) e a etanolamina (45 °C, hexano, 50 mg de CALB, 3 h) que forneceu 97% de rendimento da (S)-2-hidroxi-N-(2-hidroxietil)-2-fenilacetamida, **M-2491**). Aplicado a condição padrão estabelecida utilizaram-se as aminas (4-aminopentan-1-ol, n-butilamina e n-pentilamina) que resultaram na (S)-2-hidroxi-N-(5-hidroxipentil)-2-fenilacetamida (**M-2363**, 100%; 67%), (S)-N-butil-2-hidroxi-2-fenilacetamida (**M-B081**, 100%; 2%) e (S)-N-pentil-2-hidroxi-2-fenilacetamida (**M-B082**, 100%; 23%). Os valores entre parênteses correspondem aos rendimentos com e sem o uso de CALB no tempo de 6 h determinados via curva analítica por CG-EM. Estes estudos mostraram o potencial da CALB em reações de aminólise para síntese de amidas em condições sustentáveis.

Palavras-chave: Aminólise, CALB, Amida, Biocatálise

INTRODUÇÃO

Através da biocatálise é possível produzir compostos antioxidantes de forma sustentável e em condições brandas, resultando em produtos com altos percentuais de seletividade. O uso de lipases para a síntese de compostos quirais, como cosméticos ou produtos nutricionais, cada vez mais vem sendo investigada e estratégias que promovem modificações lipídicas para a indústria, como fracionamento, hidrogenação, esterificação, oferecem um grande potencial via produção de novas moléculas (COUTURIER *et al.*, 2009). O crescente interesse por esse tipo de síntese promoveu um desenvolvimento nesta área via biocatálise. A habilidade das enzimas para agir como catalisadores quirais específicos é reconhecida principalmente pela indústria farmacêutica. Contudo, a utilização rotineira de enzimas em laboratórios de síntese orgânica só foi expandida nas duas últimas décadas (SANTANIELLO *et al.*, 1992).

Com o interesse em vias sintéticas sustentáveis que forneçam produtos específicos com elevados rendimentos, reações para síntese de amidas pelo processo de aminólise utilizando a lipase *Candida antarctica* foram realizadas neste trabalho.

MATERIAIS E MÉTODOS

Procedimento geral para a síntese de amidas

Em um frasco tipo *vial* de 5 mL foi adicionado o (S)-mandelato de etila (0,05 g, 0,000278 mol), a amina (etanolamina) em diferentes proporções de reagentes (1:1, 1:2 ou 1:3), a CALB (5, 12,5, 25 e 50 mg), hexano (3 mL) em diferentes temperaturas (25, 45 e 60 °C) com agitação magnética (450 rpm). As conversões foram determinadas por meio da amida isolada ou por meio de alíquotas analisadas em CG-EM via curva analítica. Os solventes dessas alíquotas (200 µL) foram evaporados e as amostras foram diluídas em metanol em balões de 5



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

mL e analisadas por CG-EM. Os rendimentos foram calculados com base em curva analítica ($R^2=0,9912$) tendo soluções padrões do (*S*)-mandelato de etila nas concentrações de 670, 470, 270, 70, 12 ppm que gerou a equação $y=86615x-576557$. As reações foram realizadas em duplicata.

Cromatografia a Gás- Espectrometria de Massas (CG-EM)

As análises foram realizadas utilizando um cromatógrafo a gás (GCEMQP2010 Ultra, Shimadzu Corporation, Japão) equipado com um amostrador com injeção automática AOC-20i (Shimadzu). As separações foram realizadas em uma coluna capilar de sílica fundida (Rtx®-5EM Restek 5%-difênil-95%-dimetilpolisiloxano 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 mm de espessura de filme), em um fluxo constante de gás hélio 5,0 de 0,74 mL min^{-1} . A temperatura do injetor foi de 230 °C e utilizou-se 1,0 μL de amostra no modo *splitless*. A programação de temperatura do forno iniciou-se a partir de 100 °C com um aumento de 7 °C min^{-1} até 200 °C e 20 °C min^{-1} até 300 °C permanecendo por 2 min. A fonte de ionização foi a 70 eV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Condição ótima de reação de aminólise sem o uso de lipase

Nos testes de otimização das condições das reações de aminólise empregou-se o *S-MEt* e etanolamina (50 mg, 17 μL , 1:1 dos reagentes, 60 °C, 400 rpm).

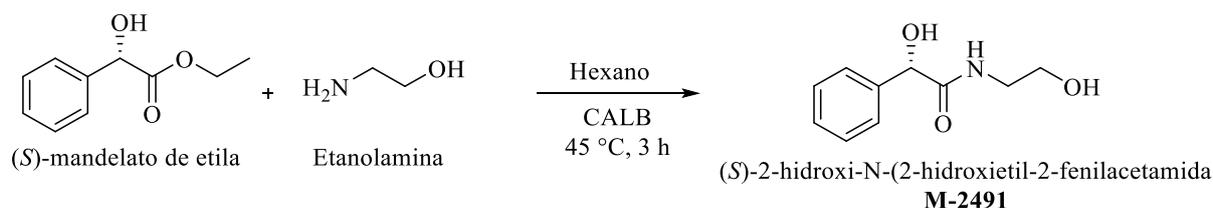
Experimento 1: as reações foram realizadas em diferentes solventes (hexano, EtOH, *n*-PrOH, MeCN, CHCl_3 , THF, tolueno, AcOEt e dioxano) para verificar qual a melhor condição de reação na conversão do produto desejado. Após 24 h, a reação em hexano consumiu praticamente os reagentes de partida, apresentando melhor desempenho que os demais solventes.

Experimento 2: Aplicando as condições do *Experimento 1* (60 °C, 400 rpm, hexano), variou-se a proporção entre o *S-MEt* e etanolamina (1:1), (1:2) e (1:3). Foi observado que em 3 h a reação na proporção dos reagentes de 1:3 já havia ocorrido resultando em 98% de rendimento isolado da amida **M-2491** (Tabela 1).

Experimento 3: Em temperaturas inferiores (45 °C e 25 °C) utilizando hexano e *S-MEt* e etanolamina na proporção 1:3 foi observado que a reação na temperatura de 45 °C forneceu 95% de rendimento para **M-2491** quando comparado com a reação a 60 °C (98%) (Tabela 1).

Assim, a condição ótima obtida sem o uso de biocatalisador foi com os reagentes (*S*)-mandelato de etila e etanolamina na proporção (1:3) a 45°C, em hexano por 3 h fornecendo 95% de rendimento isolado da amida **M-2491**.

Tabela 1. Otimização da reação de aminólise entre o (*S*)-mandelato de etila e etanolamina na ausência de lipase.





XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Proporção ^a	Rendimento (g) ^b	Rendimento (%)
60	3	(1:1)	0,0340	63
60	3	(1:2)	0,0441	81
60	3	(1:3)	0,0529	98
45	3	(1:3)	0,0515	95
25	3	(1:3)	0,0460	85

^a Proporção entre *S-MEt* e etanolamina.

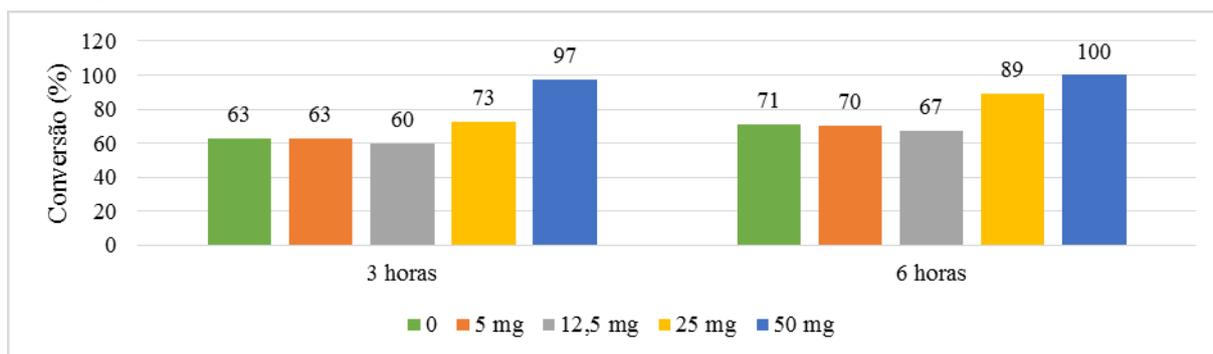
^b Rendimento isolado, proporção com base em 50 mg de (*S*)-mandelato de etila, 3 mL de hexano, 400 rpm.

É desejável que as reações de síntese atendam os princípios da Química Verde como a economia atômica, baixo gasto energético e catalisadores biodegradáveis que possibilitem o seu reciclo.

Tendo em vista que os reagentes (*S*)-*MEt* e etanolamina na proporção (1:3) forneceram o melhor resultado nos testes iniciais buscou-se a otimização da reação para CALB com quantidades equivalentes de reagentes (1:1). Neste caso, ainda empregou-se a CALB imobilizada (5, 12,5, 25 e 50 mg) para avaliar a capacidade catalítica da enzima na reação de aminólise.

Na Figura 1 observa-se que nas quantidades de 5 e 12,5 mg de enzima praticamente não houve catálise da reação com o uso da enzima. A adição de 25 mg de CALB possibilitou um aumento de cerca de 12% no rendimento, valor ainda mais pronunciado quando foi utilizado 50 mg de enzima (97%). Reações com cinética de 6 h também foram analisadas por CG-EM com o uso de 25 mg de CALB, mas ainda não havia obtido a formação quantitativa da **M-2491**. Assim, a condição ótima estabelecida foi em hexano, *S-MEt* e etanolamina na proporção de 1:1, 45 °C e 50 mg de CALB em 3 h.

Figura 1. Otimização do rendimento da reação de aminólise entre o *S-MEt* e etanolamina e CALB.



A melhor condição reacional obtida dentre os experimentos realizados para síntese da amida **M-2491** foi aplicada entre o *S-MEt* e as aminas, *5-aminopentan-1-ol*, *n-butilamina* e *n-pentilamina* (Tabela 2). Em todos os casos foram obtidos excelentes rendimentos das amidas **M-2363**, **M-B081** e **M-B082** em 6 h de reação.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

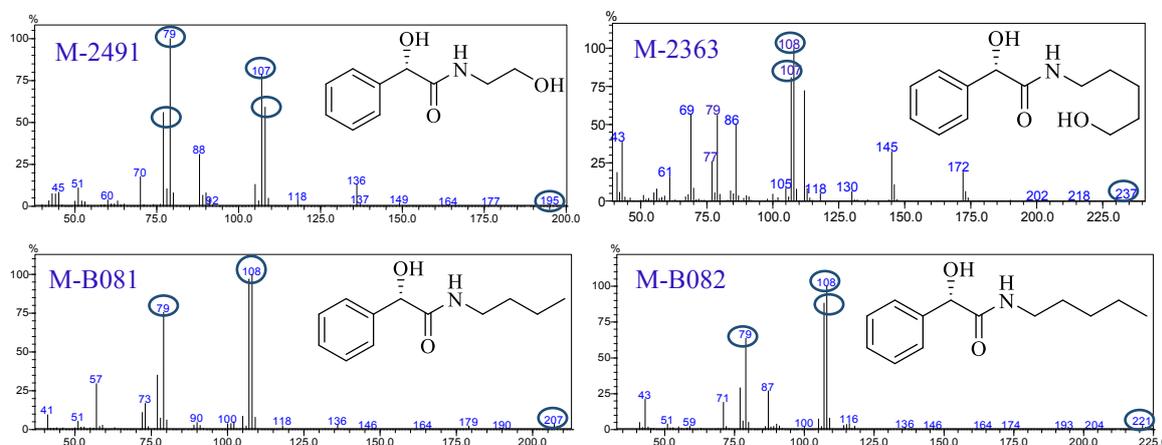
Tabela 2. Reação de aminólise entre (*S*)-mandelato de etila com diferentes aminas e na presença de CALB.

R = CH₂CH₂OH (**M-2362**)
R = CH₃ (**M-B081**)
R = CH₂CH₃ (**M-B082**)

Amida	Tempo (h)	Conversão (%) sem CALB	Conversão (%) com CALB	Tempo (h)	Conversão (%) sem CALB	Conversão (%) com CALB
M-2363	3	40	80	6	60	96
M-B081	3	1	90	6	2	100
M-B082	3	10	92	6	23	100

As análises das amidas obtidas por CG-EM com impacto de elétrons (70 eV) observou-se que os espectros de massas forneceram íons moleculares ímpares que correspondem às massas moleculares das amidas **M-2491**, **M-2363**, **M-B081** e **M-B082** (195, 237, 207, 221 u.m.a), respectivamente. Os espectros de massas (Figura 2) mostraram semelhanças na formação dos fragmentos mais estáveis (m/z 108, 107, 79 e 77).

Figura 2. Espectros de massas das amidas **M-2491**, **M-2363**, **M-B081** e **M-B082** obtidos por análise de CG-EM (70 eV).



CONCLUSÕES

Por meio dos experimentos realizados foi possível sintetizar 4 amidas derivadas do (*S*)-mandelato de etila com cinéticas otimizadas pelo uso de CALB e com altos rendimentos. Este estudo mostra o potencial da lipase CALB na catálise de reações de aminólise em condições sustentáveis de acordo com os princípios da Química Verde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Couturier L; Taupin D; Yvergnaux F. **2009**. Lipase-catalyzed chemoselective aminolysis of various aminoalcohols with fatty acids. *Int J Cosmetic* 31:1-5.
Santaniello E; Ferraboschi P; Grisenti P; Manzocchi A. **1992**. The biocatalytic approach to the preparation of enantiomerically pure chiral building blocks. *Chem Rev* 92:1071-140.