



UFRJ



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Escola de Química
Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos**

Gabrielle Barbosa Pinto

PERFIL TECNOLÓGICO DAS LIPASES NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Dissertação de Mestrado

**Rio de Janeiro, RJ - Brasil
Setembro de 2019**

Gabrielle Barbosa Pinto

PERFIL TECNOLÓGICO DAS LIPASES NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadores: Adelaide Maria de Souza Antunes, D.Sc
Flávia Maria Lins Mendes, D.Sc

Rio de Janeiro
2019

Pinto, Gabrielle Barbosa.

Perfil tecnológico das lipases na indústria farmacêutica / Gabrielle
Barbosa Pinto. - Rio de Janeiro, 2019.
135 f.: il.

Orientador: Adelaide Maria de Souza Antunes, D.Sc
Coorientador: Flávia Maria Lins Mendes, D.Sc

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Escola de Química, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos
Químicos e Bioquímicos, 2019.

1. Biocatalisador. 2. Lipase. 3. Indústria farmacêutica. 4. Síntese
Dirigida. 5. Inibidores enzimáticos. I. Antunes, Adelaide Maria de Souza, orient.
II. Mendes, Flávia Maria Lins, coorient. III. Título.

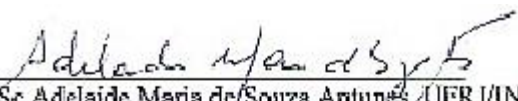
Gabrielle Barbosa Pinto

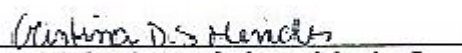
PERFIL TECNOLÓGICO DAS LIPASES NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

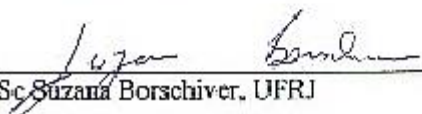
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Rio de Janeiro, 27 de Setembro de 2019.

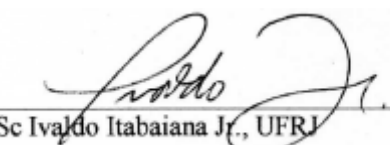
Aprovada por:


D.Sc Adelaide Maria de Souza Antunes, UFRJ/INPI


D.Sc Cristina d'Urso de Souza Mendes Santos, INPI


D.Sc Suzana Borschiver, UFRJ


D.Sc Jorge Lima de Magalhães, FIOCRUZ


D.Sc Iváldo Itabaiana Jr., UFRJ

Rio de Janeiro, RJ - Brasil
Setembro de 2019

In memoriam

Friedrich Nietzsche e o Cavalo de Turim

Um dia, os pensamentos fincando como alfinetes, vislumbres como cortes de navalha, escutou um cavalo sendo açoitado na rua. Brados enraivecidos contra o indefeso animal, o chicote estalando, sangue e relinchos para todo lado. Os transeuntes ocupados sem perceber a cena, cada um preso em suas mesquinhas responsabilidades. Nietzsche rompeu à rua, em desespero atroz, rangendo os dentes na direção do açoite, rosando blasfêmias contra o algoz. Era o fim do maior filósofo desde Kant: abraçado ao cavalo, chorando, chorando, chorando seu desespero. Enfim, desmaiou para nunca mais. Quando acordou era um nada, um catatônico Nietzsche sem frases inteligíveis, olhar parado, babando. Morreu uma década depois, sob cuidados da irmã, Elizabeth Förster-Nietzsche, aquela que não lhe compartilhou da inteligência e que, por falta dela, serviu para a terrível interpretação de Nietzsche pelo Nazismo (Itália, 1899).

Texto Homero Nunes

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço ao Criador Celestial por ter me ajudado a superar todas as dificuldades e pela realização de ter concluído o curso de Mestrado.

Agradeço, especialmente, à minha irmã, Farmacêutica Vanessa B. Pinto, que acompanhou de perto esta trajetória acadêmica sempre apoiando e acreditando em minhas potencialidades.

Agradeço aos meus pais, Elisabete dos S.B. Pinto e André S. Pinto, por todo apoio.

Agradeço ao Farmacêutico Raphael Lina que esteve comigo durante todo o tempo e, não permitiu que eu desistisse.

Agradeço aos Irmãos M Sc. Rodrigo Cavalcante e M Sc. Rafael Cavalcante pelo apoio desde o meu ingresso no curso de Mestrado.

Agradeço à D Sc. Adelaide Maria de Souza Antunes, por ter concedido a imensa honra de tê-la como orientadora que, por sua vez, dispôs de seu tempo, compartilhou sua experiência e exímio conhecimento, contribuindo para minha formação acadêmica e aprendizagem. Agradeço, também, à minha co-orientadora, D Sc. Flávia Maria Lins Mendes, por efetuar seu trabalho como educadora com primor, colaborando para o desenvolvimento desta dissertação.

À Adelaide Maria de Souza Antunes e à Flávia Maria Lins Mendes minha profunda admiração e respeito como profissionais, educadoras e como pessoas.

Agradeço, ainda, aos Professores D Sc. Suzana Borschiver e D Sc. Eduardo Falabella. A primeira por evidenciar minhas capacidades e habilidades durante as disciplinas “Estrutura da Indústria química” e “Inovação Tecnológica” e, o segundo, por despertar em mim a paixão pela Escola de Química e mostrar a importância que temos para Ciência e para o Brasil ao conduzir com esmero a disciplina “Ciclo de Seminários”.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ.

Obrigada a todos por terem contribuído para minha formação como Mestre em Ciências pela Escola de Química da UFRJ.

“As mentes mais profundas de todos os tempos sentiram compaixão pelos animais.”

Friedrich Nietzsche

PINTO, Gabrielle Barbosa. **Perfil Tecnológico das Lipases na Indústria Farmacêutica**. Rio de Janeiro, 2019. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Nas últimas décadas, as enzimas experimentaram grandes iniciativas de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação. Neste trabalho, o objetivo é identificar o panorama atual da aplicação da lipase no Setor Industrial Farmacêutico. O recolhimento de dados e informações técnico-científicas sobre a lipase foi realizado a recuperação de documentos de patentes no período de 1997 à Junho de 2018, na base de dados *SciFinder*, disponível via portal CAPES. Após o refino da busca, o estudo prospectivo revelou 260 documentos de patentes que foram analisados individualmente. As lipases têm sido utilizadas de várias maneiras na indústria farmacêutica, tanto para a obtenção de moléculas bioativas quanto para superar limitações na formulação de medicamentos e no design de medicamentos. Desta forma, pode-se concluir que, tecnologias alternativas têm propiciado o surgimento de lipases com características diferenciadas e mais específicas afim de atender as perspectivas dos processos industriais, além disso, a imobilização e a utilização de solventes não aquosos têm facilitado o uso da lipase em processos de escala comercial. Deste modo, a pesquisa aponta que os próximos anos devem ser promissores quanto à aplicação de lipases na área da biocatálise industrial e na produção de fármacos.

Palavras-chave: biocatalisador, lipase, indústria farmacêutica, síntese dirigida, inibidores enzimáticos.

PINTO, Gabrielle Barbosa. **Technological Profile of Lipases in the Pharmaceutical Industry**. Rio de Janeiro, 2019. Dissertation (Master in Chemical and Biochemical Process Engineering) - School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

In recent decades, enzymes have been the target of considerable research, development and innovation. This paper presents an up-to-date overview of the technological application of lipases in the pharmaceutical industry. The collection of data and technical-scientific information on lipases was performed to retrieve patent documents from 1997 to June 2018, in the SciFinder database, available via CAPES portal. After refining the search, the prospective study revealed 260 patent documents that were individually analyzed. Lipases have been used in a variety of ways in the pharmaceutical industry, both for obtaining bioactive molecules to overcome limitations in the formulation of medicines and in drug design. This is possible from alternative technologies, such as immobilization and the use of non-aqueous solvents that allow the use of lipases in commercial-scale processes. In addition, other technologies have provided the emergence of differentiated and more specific lipases in order to meet the perspectives of industrial processes. The research indicates that the following years should be promising for the application of lipases in the industrial biocatalysis and in drug design.

Keywords: biocatalyst, lipase, pharmaceutical industry, directed synthesis, enzyme inhibitors.

Capítulo 1

<i>1 Introdução</i>	17
---------------------------	----

Capítulo 2

<i>2 Justificativa e Objetivos</i>	22
--	----

2.1 Justificativa	22
-------------------------	----

2.2 Objetivo Geral.....	24
-------------------------	----

2.3 Objetivos Específicos	24
---------------------------------	----

Capítulo 3

<i>3 Revisão bibliográfica</i>	25
--------------------------------------	----

3.1 Enzimas.....	25
------------------	----

3.1.1 Classificação das Enzimas.....	25
--------------------------------------	----

3.1.2 Características das Enzimas	26
---	----

3.1.3 Inibidores Enzimáticos	27
------------------------------------	----

3.2 Lipases	28
-------------------	----

3.2.1 Fontes de Lipases	29
-------------------------------	----

3.2.2 Características e Propriedades das Lipases	30
--	----

3.2.3 Especificidade das Lipases	31
--	----

3.2.4 Reações Catalisadas por Lipases	32
---	----

3.2.5 Solventes e Lipases	34
---------------------------------	----

3.2.6 Imobilização de Lipases	37
-------------------------------------	----

3.2.7 Inibição da Lipases	38
---------------------------------	----

3.3 Aplicação Das Lipases Na Indústria Farmacêutica	39
3.3.1 Diagnóstico e Tratamento	41
3.3.2 Síntese Dirigida e Planejamento de Fármacos	42
3.3.3 Otimização de Processos	42
3.3.4 Síntese Orgânica e Resolução de Racemato.....	45
3.3.5 Síntese de Compostos Nitrogenados	51
3.3.6 Síntese De Ésteres	56
3.3.7 Síntese de Lipídeos Estruturados e Modificação de Óleos e Gorduras.....	60

Capítulo 4

4 <i>Metodologia</i>	64
4.1 Metodologia Proposta	64
4.2 Estratégia de Busca de Patentes	66

Capítulo 5

5 <i>Resultados e Discussões</i>	69
5.1 Lipase como Alvo Terapêutico	72
5.2 Lipase, Planejamento de Fármacos e Síntese Dirigida	76
5.2.1 Ativação de pró-fármacos.....	77
5.2.2 Otimização da Formulação	83
5.3 Lipase, Síntese Orgânica e Resolução de Racematos	90

Capítulo 6

6 <i>Considerações Finais</i>	101
-------------------------------------	-----

6.1 Conclusão.....	101
6.2 Limitações.....	102
6.3 Sugestões para trabalhos futuros.....	103
<i>Trabalhos Publicados.....</i>	<i>103</i>
<i>Referências Bibliográficas.....</i>	<i>104</i>
<i>Apêndices.....</i>	<i>129</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais diferenças entre medicamentos sintéticos e biológicos.	20
Tabela 2. Classificação das enzimas segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB).	26
Tabela 3. Seletividade das enzimas.	27
Tabela 4. Aplicações industriais da lipase no ramo farmacêutico.	40
Tabela 5. Meios de incidência de direitos patentário no Setor Farmacêutico.	64
Tabela 6. Inibidores de lipase.	73
Tabela 7. Locais de clivagem "T", enzimas de clivagem e grupos de ligação.	78
Tabela 8. Lipase na biocatálise de fármacos e/ou intermediários.	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A- estrutura química da Tetrahidrolipstatina (THL). B- estrutura química da Lipstatina.	39
Figura 2. Mecanismo químico de síntese da isoniazida catalisada por lipases.	43
Figura 3. Rotas sintéticas de produção do (R)-ácido mandélico.	44
Figura 4. Obtenção do (s)-ibuprofeno 84 via resolução sintética.	46
Figura 5. Esterificação enantiosseletiva do (R, S) -ibuprofeno 84 por lipases em meio de propanol, com enantiopreferência para o (R)-enantiômero.	46
Figura 6. Reação enantiosseletiva de (\pm)-9 catalisada pela lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> , utilizando acetato de vinila como agente acilante em 75h a temperatura ambiente.	47
Figura 7. Resolução cinética de (\pm)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-3-ol catalisado por CALB utilizando acetato de vinila em THF a 250rpm.	48
Figura 8. Resolução racêmica de (1) catalisado por CALB após 120h de reação.	48
Figura 9. Síntese de (R)-1 e aperfeiçoamento da enantiosseletividade utilizando lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>	49
Figura 10. Síntese quimioenzimática de (-) - Alloyohimbane e (-) - Yohimbane envolvendo dessimetração catalisada por lipase de intermediário diacetato.	50
Figura 11. Dessimetração enantiosseletiva de meso-compostos por acilação ou hidrólise para a síntese de cis-2-[(hidroximetil) enantiômeros de acetato de ciclopentilo]metil.	50
Figura 12. Dessimetração de N-benzil-5-hidroxi-4-(hidroximetil)pentanamida através de acetilação catalisada por lipase.	51
Figura 13. Dessimetração catalisada por PSL de 2- (2-metilbenzil) propano-1,3-diamina.	51
Figura 14. Processo BASF para a obtenção de uma variedade de aminas quirais.	52
Figura 15. Resolução cinética enzimática de isopropil aminas β -substituídas.	53
Figura 16. Resolução cinética catalisado por lipase do racemato dimetil-3-metilenosuccinato para a síntese de (+) -artabotriol e outros derivados.	53
Figura 17. Resolução catalisada por CAL-B de precursores de Atenolol utilizando butanoato de vinilo como doador de acilo.	54
Figura 18. Resolução cinética de fenil [4- (trimetilsilil) fenil] metanol para a síntese quimioenzimática de L-Cloperastina.	54
Figura 19. Resolução hidrolítica de cis-dimetil-1-acetilpiperidina 2,3-dicarboxilato para a síntese de Moxifloxacina.	55

Figura 20. Resolução hidrolítica catalisada por CAL-B de γ -lactâmicos protegidos com o grupo N-hidroximetil com desproteção espontânea do produto aminoácido.	55
Figura 21. CAL-B catalisou a resolução hidrolítica de precursores β -lactâmicos de compostos farmacologicamente ativos protegidos com o grupo N-hidroximetilo.....	56
Figura 22. Esterificação do retinol 105 por enzima imobilizada.....	59
Figura 23. Síntese de lactonas com lipases modificadas.....	59
Figura 24. Número de documentos de patente por tópico selecionado através do sistema <i>CA Section Title</i> na base <i>SciFinder</i>	67
Figura 25. Passo a passo da busca por patentes contendo lipase como catalisador ou em produtos na base de dados <i>SciFinder</i> ®.....	68
Figura 26. Resumo evolutivo da busca por patentes com rota de síntese contendo lipase.	68
Figura 27. Evolução temporal dos depósitos de patentes.....	69
Figura 28. Classificação das patentes de acordo com o uso da lipase.....	70
Figura 29. Uso geral da lipase observado em documentos de patente.	71
Figura 30. Mecanismo de clivagem pela lipase de um pró-fármaco utilizado no tratamento de tumores.	77
Figura 31. Conjugação de pró-fármacos.	79
Figura 32. Exemplos da ação da lipase sob conjugados compreendendo um ácido dicarboxílico como ligante são mostrados.....	79
Figura 33. Representação gráfica de uma composição de gel em cadeia para encapsulação de agentes terapêuticos.....	81
Figura 34. Representação esquemática de um porfissoma a partir dos isômeros conjugados de porfirina-fosfolipídica.....	82
Figura 35. Diagrama esquemático de uma estrutura proteica desenvolvida como sistema dirigido de fármacos, incluindo o transporte de enzimas.....	83
Figura 36. Exemplo de um transportador conjugado com uma enzima.	86
Figura 37. Aplicações da lipase no planejamento de fármacos.....	89
Figura 38. Abertura enzimática da azalactona para formar um alquil amida.....	91
Figura 39. Desproteção da alquil amida com um agente oxidante para produzir alquil éster de fluoroleucina.....	91
Figura 40. Processo de obtenção de éster de rapamicina utilizando a lipase como catalisador.	92
Figura 41. Composto anti-influenza, Tamiflu.	92
Figura 42. Resolução do intermediário racêmico para produção do Canolídeo C.....	93

Figura 43. Síntese do pimecrolimus por transesterificação enzimática da ascomicina.....	95
Figura 44. Processo de obtenção dos intermediários do Pimecrolimus através de síntese enzimática.....	96
Figura 45. Preparação de Hexadecil cis-9-Tetradecenoato.....	96
Figura 46. Preparação de Hexadecil cis-10-Tetradecenoato.....	97
Figura 47. Síntese assimétrica catalisada por lipase para formação do produto alvo.....	98
Figura 48. Preparo da pregabalina por resolução quimioenzimática.....	98
Figura 49. Síntese do intermediário III catalisado pela lipase.....	99
Figura 50. Hidrólise dos compostos VI e VIII em pregabalina (I).....	99
Figura 51. Processo de obtenção de Lacosamida utilizando lipase.....	99
Figura 52. Síntese e resolução de fármacos e/ou intermediários tendo lipases como biocatalisador.....	100

Capítulo 1

1 Introdução

A indústria farmacêutica global demanda 33% da produção de químicos, e seu lucro possui equivalente proporcional. De acordo com o relatório IQVIA (*Institute for Human Data Science Reports*, 2017), os principais impulsionadores do mercado farmacêutico global são os Estados Unidos e os mercados emergentes. Em sete anos (2011- 2018), o Brasil passou da 10^a posição para a 7^a no mercado farmacêutico mundial, ficando atrás dos países como Estados Unidos, China, Japão, Alemanha, França e Itália, necessariamente nesta ordem (INTERFARMA, 2019). As empresas competem principalmente com base na qualidade do produto, seu desempenho, pelo uso de direitos de propriedade intelectual, bem como a capacidade de inovar, dentre outros fatores (DE SOUSA, 2014). Os maiores polos produtores de medicamentos, principal produto da Indústria Farmacêutica, concentram-se nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Goiás (PUCRio, 2016). O Brasil, ainda, é fortemente dependente de importação, uma vez que 80% dos insumos são importados, além disso, o desempenho do setor farmacêutico é bastante influenciado pela taxa do dólar e pela energia elétrica, o que eleva de forma significativa os custos de produção (INTERFARMA, 2017).

Dentre os medicamentos comercializados no Brasil, cerca de 17% são antibióticos, 5% são analgésicos, 4% vitaminas, 4% medicamentos para gripe e tosse, 4% medicamentos utilizados em tratamento para inflamações e reumatismos, 3% para doenças gastrointestinais, 2% cardioterápicos, 2% vascular cerebral, 2% hormônios sexuais e 57% representam juntos as outras classes de medicamentos (PUCRio, 2016). Considerando os produtos microbianos, as enzimas são um dos produtos mais explorados no mundo pelo setor biotecnológico na produção e no desenvolvimento de medicamentos, sendo a indústria farmacêutica um dos maiores produtores e consumidores de enzimas, assunto da presente dissertação (MONTEIRO e SILVA, 2009).

O mercado mundial de enzimas industriais é muito competitivo, tendo a Novozymes (Dinamarquesa) a empresa líder de mercado, seguida pela DSM (Holandesa), e DuPont (empresa Americana que adquiriu uma participação majoritária na Danisco, empresa dinamarquesa e sua divisão Genencor, empresa americana) (DE SOUSA, 2014), desta forma, induzindo importantes atores do mercado global a realizarem grandes operações de fusão e aquisição (JOB e MEIRA, 2011), como exemplo, o ano de 2015 se revelou intenso para a

indústria farmacêutica no que diz respeito às fusões e aquisições, tais operações realizadas neste ano movimentaram mais de US\$ 300 bilhões, recorde para o setor, segundo levantamento realizado pela Ernst & Young (2016).

A utilização de enzimas isoladas na transformação de compostos orgânicos é conhecida há mais de 100 anos (HANSON, 1992; FABER, 1997). Entretanto, foi somente a partir da segunda metade da década de 80 que o verdadeiro potencial destes biocatalisadores começou a ser explorado (SIH e WU, 1989; SANTANIELLO *et al.*, 1990; THEIL, 1995; STECHER e FABER, 1997). Logo depois, intensas pesquisas foram realizadas sobre catálise enzimática, como por exemplo: elucidação estrutural, mecanismos de catálise das enzimas, desenvolvimento de biocatalisadores, resolução de isômeros e, outros (BELIVAQUA, 2005). Com isso, o mercado de enzimas tornou-se mais atrativo, sendo as mesmas comercializadas e empregadas em larga escala (CASTILHO *et al.*, 2001; SAID e PIETRO, 2004).

As enzimas são comumente aplicadas na formulação de detergentes, degradação de óleos e gorduras, síntese farmacêutica, produção de cosméticos, indústria de papel e couro, tratamento de efluentes, produção de biodiesel, kits diagnósticos e biossensores em análises clínicas, indústria de alimentos, indústria química, dentre outras (REETZ, 2002; HASAN *et al.*, 2006; FREIRE e CASTILHO, 2008).

Enzimas são biocatalisadores extremamente versáteis que permitem, em muitos casos, a redução dos custos com o *downstream*, um maior rendimento do processo, obtenção de produtos biodegradáveis (LENARDÃO *et al.*, 2003; CASTRO *et al.*, 2004; COELHO *et al.*, 2008; OLIVEIRA e MANTOVANI, 2009), por esse motivo, têm-se desenvolvido técnicas para promover a regeneração e reutilização de biocatalisadores (HAGEN, 2006).

Principalmente em síntese orgânica, muitos procedimentos possuem uma sequência reacional extensa com purificações ou separações dos produtos durante e/ou no final da reação o que requer etapas adicionais (KOCIENSKI, 2005; WUTS, 2014). Este princípio é de grande interesse na síntese de moléculas altamente complexas, como é o caso de muitos dos compostos farmacêuticos (PATHAK e WALDMANN, 1998; KOCIENSKI, 2005; BAIRD e CANN, 2011; WUTS, 2014), pois cada etapa extra tende a incluir novos procedimentos, torna o processo mais caro, trabalhoso, arriscado e influencia negativamente na geração de resíduos e na formação de derivados (FERRARI, 2005; FARIAS e FÁVARO, 2011).

Em processos industriais as enzimas são altamente sensíveis a variações de pH, por serem formadas por grupos químicos que podem sofrer ionizações e adquirir cargas momentâneas e a altas temperaturas, causando rompimento de ligações e interações fracas (FABER, 1997; MONTEIRO e SILVA, 2009). No entanto, no início da década de 90 muitas limitações foram amenizadas, quanto a estereoquímica e a enantiosseletividade, pelo aperfeiçoamento e desenvolvimento de diversas técnicas para reações biocatalisadas, como por exemplo, o uso de solventes orgânicos, adição de inibidores, técnicas de imobilização e utilização de enzimas mais resistentes (extremoenzimas) (SANTANIELLO *et al.*, 1992).

Já o uso terapêutico de enzimas remonta ao final do século XIX, quando preparações brutas de enzimas pancreáticas de origem suína já eram empregadas no tratamento de distúrbios gastrointestinais (CRUZ *et al.*, 2008), sendo, também, as primeiras preparações enzimáticas industrialmente produzidas e comercializadas, como no tratamento de insuficiência pancreática exócrina, cuja suplementação é feita com pancreatina (extraída de pâncreas suíno ou bovino) ou pancrelipase (maior nível de pureza e extraída somente de pâncreas suíno) (LAYER *et al.*, 2001; LAYER e KELLER, 2003). Enzimas para fins terapêuticos exigem alto nível de pureza em decorrência da sua aplicação. Assim, uma sequência de processos de purificação é necessária até a obtenção final da enzima. Como o processo de purificação é sofisticado e de extrema complexidade, o custo desta etapa pode representar até 80% do custo do produto final (KILIKIAN *et al.*, 2001; NETO, 2001; AEHLE, 2007; MONTEIRO e SILVA, 2009).

De acordo com Benavide (2013), as enzimas terapêuticas estão entre os biofármacos mais importantes utilizados para as doenças autoimunes como a artrite reumatoide, a doença de Crohn e muitos outros (CARIA, 2014). Os medicamentos biológicos (também designados como “biofarmacêuticos”) são compostos por proteínas, como as enzimas, produzidas naturalmente no organismo humano (COMISSÃO EUROPEIA, 2013). O desenvolvimento de biofármacos tem permitido encontrar novas opções de tratamentos para doenças mais complexas e a utilização cada vez mais significativa da biotecnologia no desenvolvimento e produção destas moléculas possui grande impacto na saúde da população (LONG, 2010).

Por serem produzidos em sistemas vivos, os biofarmacêuticos não podem ser replicados de forma idêntica e, suas cópias autorizadas com os quais foram comparados em termos de qualidade, segurança e eficácia são denominadas biossimilares. Após o vencimento das patentes deste tipo de produto, cópias podem ser legalmente produzidas e comercializadas.

(COMISSÃO EUROPEIA, 2013; INTERFARMA, 2012). A Tabela 1 sintetiza as principais diferenças entre medicamentos sintéticos e biológicos.

Tabela 1. Principais diferenças entre medicamentos sintéticos e biológicos.

	<i>Fármacos Sintéticos</i>	<i>Fármacos Biológicos</i>
<i>Moléculas</i>	Pequenas	Grandes
<i>Estrutura</i>	Simples	Complexas
<i>Estabilidade</i>	Estáveis	Instáveis
<i>Caracterização</i>	Simple e completa	Difícil e incompleta
<i>Manufatura</i>	Previsível pelo processo químico	Variável, produzido por sistemas vivos
	Cópias idênticas podem ser feitas	Impossível de realizar cópias idênticas
<i>Patentes</i>	Algumas	Múltiplas
<i>Imunogenicidade</i>	Ocasional	Frequente
<i>Via de Administração Preferencial</i>	Via oral	Via parenteral
<i>Cópias legais</i>	Similares	Biossimilares

Fonte: adaptado de INTERFARMA, 2012; IPEA, 2018.

Atualmente, existe no mercado uma ampla variedade de medicamentos contendo enzimas (HAMMER, 2001; MONTEIRO e SILVA, 2009), deste modo, as lipases, reconhecidas pela sua função fisiológica na digestão (KAZLAUSKAS e BORNSCHEUER, 1998) e na absorção de lipídios (KUMAR e SINGH, 2013), têm sido utilizadas em terapias enzimáticas no tratamento de perturbações gastrointestinais e em manifestações cutâneas de alergias no trato digestivo (MAUVERNAY *et al.*, 1970; KURITA-WATER, 1994). Além da terapia enzimática outros importantes usos terapêuticos são desenvolvidos, tais como: ativação seletiva de pró-fármacos¹, otimização de processos industriais farmacêuticos; desenvolvimento de novas estratégias de formulação (ex. lipossoma); como alvo terapêutico de drogas importantes; como enzimas marcadores em diagnóstico clínico (HASAN *et al.*, 2006; BON *et al.*, 2008).

As lipases, classificadas como hidrolases, são catalisadores biológicos que participam de várias reações bioquímicas, tendo como papel fundamental o controle metabólico (COELHO

¹ Derivado químico e farmacologicamente inativo da molécula matriz que ao sofrer biotransformação libera o fármaco ativo.

et al., 2008). Para o entendimento sobre a aplicação de uma enzima e como esta funciona, deve-se considerá-la tanto como uma proteína quanto um catalisador biológico, ou seja, a lipase pode ser um ingrediente farmacêutico ativo compondo a formulação de um medicamento e, também, atuar como catalisador enzimático na obtenção de uma molécula bioativa. As lipases podem ser aplicadas em uma infinidade de processos, tais como: síntese orgânica, farmacêutica e lipídios funcionais (LIESE *et al.*, 2000; LONG, 2010; JAEGER e EGGERT, 2002).

Neste primeiro Capítulo, introduziu-se o panorama farmacêutico central onde estão inseridas as enzimas, mais adiante a justificativa e os objetivos são apresentados no Capítulo 2. O Capítulo 3, refere-se a revisão bibliográfica sobre as enzimas, as lipases e suas aplicações na Indústria Farmacêutica. A metodologia é tratada no Capítulo 4 desta dissertação, a qual é fundamentada na pesquisa e análise de documentos de patente. No Capítulo 5, expõe-se os resultados obtidos e respectivas discussões. Finalmente, o Capítulo 6 sintetiza o conteúdo deste trabalho, esclarece limitações e sugere temas para trabalhos futuros. E, ainda, completa-se, com as referências bibliográficas e o apêndice.

Capítulo 2

2 *Justificativa e Objetivos*

2.1 Justificativa

O crescimento econômico sustentável tem sido um dos principais desafios para a América Latina. O campo de enzimas industriais está a experimentar grandes iniciativas de Pesquisa e Desenvolvimento. Os processos de fabricação estão sendo reconstruídos, um exemplo é a substituição da via química pelo uso de enzimas que possam ser reutilizáveis (POLITZER e BON, 2006; SILVESTRE, 2007). Nesse sentido, a tecnologia da catálise enzimática se insere e vem ganhando importância no cenário mundial (HAGEN, 2006).

A “Química Farmacêutica Verde ou Sustentável” (TUCKER, 2006) deve ser entendida como a procura de processos sintéticos benignos e eficientes que reduzam o impacto ambiental dentro do contexto de manutenção do nosso atual padrão de vida, o qual inclui, obviamente, a utilização de fármacos. O impacto ambiental provocado pela indústria química-farmacêutica é mundialmente reconhecido, por outro lado, a legislação ambiental tornou-se mais rigorosa, onde os processos químicos, intrinsecamente geradores de resíduos industriais e poluição, evoluíssem no sentido de alternativas ambientalmente mais aceitáveis (CLARCK e MACQUARRIE, 2002; ANASTAS e KIRCHHOFF, 2002). Esta orientação no sentido da Química Verde promove uma mudança do paradigma industrial desde os conceitos de eficiência de processo até o que se refere ao valor econômico (SHELDON, 2000).

A América do Norte e a Europa são os maiores consumidores de enzimas no mundo, embora a região da Ásia-Pacífico esteja passando por um crescimento acentuado devido à demanda gerada pela China, Japão e Índia, refletindo o tamanho da força das economias destes países nos últimos anos (ADRIO e DEMAIN, 2014). Em decorrência disto, é notório o aumento significativo do consumo de enzimas a nível internacional, este cenário é favorável para o Brasil o que confere uma oportunidade de mercado a ser explorada e desenvolvida no país o qual necessita se inserir de forma mais representativa como usuário e provedor de enzimas e tecnologia enzimática (MONTEIRO e SILVA, 2009).

Os requisitos definidos pelos conceitos de economia de átomos (TROST, 1991), economia de etapas (WENDER *et al.*, 2008) e economia redox (BURNS *et al.*, 2009) indicam os desafios persistentes no caso de reagentes sintéticos e catalisadores (KOCIENSKI, 2005; WUTS, 2014).

Na Indústria Farmacêutica, o desenvolvimento de reações enzimáticas em meio orgânico possibilitou a melhor integração entre a catálise enzimática e a química orgânica convencional, ampliando as possibilidades de síntese de novas substâncias de interesse farmacológico. Uma das principais contribuições deste tipo de metodologia biossintética tem sido na obtenção de compostos enantiomericamente puros ou enriquecidos, geralmente intermediários ou produtos finais de rotas sintéticas estereocontroladas (SIH e WU, 1989; SANTANIELLO *et al.*, 1990; THEIL, 1995; STECHER e FABER, 1997).

Observa-se que, as enzimas por apresentarem propriedades de especificidade, estabilidade e seletividade química e estérica, são candidatas naturais ao emprego como catalisadores em reações para a produção de fármacos (BELIVAQUA, 2005). O desenvolvimento de tecnologias alternativas consistentes para utilização de enzimas no setor industrial, como a recombinação genética, engenharia de proteínas e de métodos computacionais combinados com evolução dirigida têm propiciado o desenvolvimento de enzimas com características diferenciadas e mais específicas afim de atender as perspectivas dos processos industriais, promovendo desta forma, uma expansão do mercado de enzimas, em especial as lipases, que respondem por cerca de 5% do mercado mundial de enzimas (CASTRO *et al.*, 2004; KUMAR e KANWAR, 2011; KUMAR e SINGH, 2013; DE SOUSA, 2014), tornando-as cada vez mais disponíveis para comercialização por conta do seu vasto campo de aplicação com uma forte tendência de crescimento (ROZZELL, 1999; LIESE *et al.*, 2000; HASAN *et al.*, 2006). As lipases constituem uma classe de enzimas de grande importância na biocatálise, particularmente, no setor farmacêutico e biotecnológico (PANDEY *et al.*, 1999; BELIVAQUA, 2005).

Em relação ao mercado específico de enzimas, as hidrolases, são as enzimas mais utilizadas na biotransformação industrial, considerando as subclasses de lipases, proteases, amidases e glicosidases (STRAATHOF, 2006). As hidrolases respondem por mais de 95% da produção total de enzimas técnicas (GANDHI, 1997), portanto, as enzimas que serão o foco nesta dissertação são as lipases devido o crescente uso de enzimas hidrolíticas na indústria farmacêutica, sendo bem conhecido a utilização das lipases (BON *et al.*, 1999).

Dentre as enzimas, as serino-hidrolases ganham importância ao catalisarem reações de biotransformação, com destaque para as lipases por serem as mais empregadas na síntese orgânica de processos industriais de substâncias quirais pelas grandes companhias farmacêuticas (SOLANO *et al.*, 2012).

2.2 Objetivo Geral

Apresentar o panorama atual da aplicação das lipases na Indústria Farmacêutica e identificar tendências tecnológicas relacionadas ao uso das lipases na produção de medicamentos, fármacos e seus intermediários.

2.3 Objetivos Específicos

Através de depósitos de patentes, a dissertação tem como propósito explorar o uso das lipases como biocatalisadores ou na síntese dirigida e planejamento de fármacos ou, ainda, como alvo terapêutico na Indústria Farmacêutica. Como objetivos específicos têm-se:

- analisar a aplicação das lipases como biocatalisadores em reações de síntese e resolução racêmica;
- detectar o uso das lipases no planejamento de fármacos e na síntese dirigida;
- identificar as lipases como alvo terapêutico em processos de obtenção de inibidores enzimáticos.

Capítulo 3

3 Revisão bibliográfica

3.1 Enzimas

Enzimas são catalisadores biológicos que participam de várias reações bioquímicas, tendo como papel fundamental o controle metabólico (COELHO *et al.*, 2008). Para o entendimento sobre a estrutura de uma enzima e como esta funciona, deve-se considerá-la tanto como uma proteína quanto um catalisador biológico.

Como uma proteína a enzima é constituída por aminoácidos. As ligações peptídicas que unem cadeias lineares de aminoácidos caracterizam a estrutura primária das proteínas, apresentam uma forma enovelada, evidenciando estruturações complexas, conhecidas como estruturas secundária, terciária e quaternária, que ocorrem em função de interações intrínsecas entre as cadeias de aminoácidos (WIGGERS, 2007). Já como catalisador, o princípio das enzimas é diminuir a energia de ativação de uma reação, desta forma, o substrato se liga a uma região específica da enzima denominada sítio ativo.

As enzimas são biocatalisadores eficientes, cujo potencial de suporte a processos tecnológicos é evidenciado pela diversidade existente dessas moléculas e, por extensão, pela variedade e complexidade de reações químicas que podem ser catalisadas enzimaticamente. Nesse contexto, a *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) reconhece mais de 5.858 diferentes enzimas catalogadas (IUBMB, 2016).

3.1.1 Classificação das Enzimas

As enzimas podem ser classificadas de acordo com as reações que catalisam: as oxidorreduzases catalisam reações de oxidação-redução; as transferases, catalisam reações de transferência de grupos funcionais; hidrolases, que catalisam reações de hidrólise; liases, catalisam quebra de ligações; isomerases, catalisam reações onde um substrato transforma-se em um produto isômero e ligases, catalisam a ligação covalente de moléculas, com simultânea quebra de uma ligação de alta energia (ORLANDELLI *et al.*, 2012). Na Tabela 2 segue a classificação das enzimas de acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular.

Tabela 2. Classificação das enzimas segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB).

GRUPO DE ENZIMAS	TIPO DE REAÇÃO	Nº ENZIMAS LISTADAS NO NC-IUBMB*
OXIRREDUTASES	Catalisam reações de oxidação-redução, envolvendo oxigenação ou remoção de hidrogênio.	1011
TRANSFERASES	Mediam a transferência de grupos acil, açúcares, fosforil e aldeído ou porções de cetonas de uma molécula para outra.	1057
HIDROLASES	Promovem hidrólise e formação de ésteres, glicosídeos, amidas, éteres, peptídeos e outros grupos de contenham C-N.	1041
LIASES	Catalisam reações de adição, usualmente de HX, as duplas ligações como C=C, C=N, e C=O, e também os processos reversos.	312
ISOMERASES	Efetuem várias isomerizações, incluindo migração da ligação C=C, isomerização cis-trans e racemização.	157
LIGASES	Mediam a formação ou clivagem de C-O, C-S, C-N, C-C, e ligações ésteres fosfato, por meio de reações acopladas a quebra de ATP.	129

Fonte: CARVALHO, 2015.

3.1.2 Características das Enzimas

As interações entre fármacos e seus receptores (em muitos casos, enzimas) são denominados efeitos farmacodinâmicos, enquanto os fenômenos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), são denominados efeitos farmacocinéticos. A atividade farmacológica está relacionada com a afinidade entre o fármaco e o receptor, e também com a estabilidade do complexo formado. Existem inúmeros receptores, dentre eles: proteínas de membrana, receptores hormonais, ácido desoxirribonucleico (DNA), enzimas. As enzimas são um tipo especial de receptor, proteínas especializadas em catalisar reações químicas associadas a biomoléculas devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico (LEHNINGER *et al.*, 1995).

Como a seletividade é o ponto crucial da química orgânica moderna, numerosos reagentes seletivos e catalisadores estão sendo desenvolvidos (WANG *et al.*, 2017). As principais vantagens das enzimas quanto a seletividade estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Seletividade das Enzimas.

<i>Quimiosseletividade</i>	Uma vez que o propósito de uma enzima é atuar em um único tipo de grupo funcional, outras funcionalizações sensíveis que deveriam reagir normalmente com um certo grau sobre catálise química são preservadas.
<i>Regiosseletividade e Diastereosseletividade</i>	Devido à estrutura tridimensional complexa, as enzimas conseguem distinguir entre grupos funcionais quimicamente iguais, situados em diferentes regiões da mesma molécula-substrato
<i>Enantiosseletividade</i>	Enzimas são quase todas formadas por aminoácidos, sendo portanto, catalisadores quirais. Como consequência, qualquer tipo de quiralidade ou pró quiralidade presente no substrato é reconhecida durante a formação do complexo enzima-substrato. Desta forma, substratos pró-quirais podem ser transformados em produtos opticamente ativos e ambos os enantiômeros de um substrato racêmico reagem com velocidades diferentes, possibilitando a resolução cinética.

Fonte: adaptado de FABER, 1997.

As enzimas além de apresentarem seletividade (químio, regio e enantio), também atuam em condições brandas de temperatura (30 a 70 °C), pH e pressão, atingindo taxas de reação bastantes elevadas (podem elevar a taxa de uma reação de 10⁸ a 10¹² vezes) (CASTRO *et al.*, 2004). A atividade da maioria das enzimas pode ser modulada. Os moduladores mais conhecidos são o pH, a temperatura e o solvente, logo existem condições ótimas para que a enzima trabalhe em sua velocidade máxima (LIEBERMAN *et al.*, 2009).

3.1.3 Inibidores Enzimáticos

Da mesma forma que o uso de enzimas é importante, muitas vezes, faz-se necessário a inibição específica de alguma enzima. Então, outra maneira de modular a atividade enzimática é através da diminuição da afinidade da enzima pelo substrato (LIEBERMAN *et al.*, 2009). Inibidores são compostos que diminuem a velocidade de uma reação enzimática. Os mecanismos de inibição se baseiam em mimetizar ou participar em uma das etapas da reação catalítica, podendo reagir reversivelmente com grupos funcionais do sítio ativo ou mesmo distante deste sítio, causando, muitas vezes, alteração global da estrutura da enzima. Existem basicamente dois mecanismos de inibição (reversível e irreversível) e dentro destas categorias, diversas ações moleculares de cada inibidor (*apud* LIEBERMAN *et al.*, 2009).

De todas as proteínas alvos para uso terapêutico incluindo alguns hormônios, neurotransmissores e proteínas de membrana, as enzimas são as mais promissoras para o planejamento de fármacos (KNOWLES e GROMO, 2003; SILVERMAN, 2004). Em certas

ocasiões, a inibição das enzimas pode ser utilizada como vantagem terapêutica. Inibidores enzimáticos estão entre os principais produtos de ação farmacêutica, dentre os quais destacam-se as classes terapêuticas dos redutores de colesterol (inibidores da HMG-CoA redutase)², antiulcerantes (inibidores da secreção ácida estomacal), antidepressivos (inibidor seletivo de recaptação da serotonina), antirreumáticos não-esteroidais (AINES), inibidores da ECA (enzima conversora da angiotensina), entre outros. Com destaque para os agentes antilipase, que são inibidores de lipases digestivas, como as gástricas e as pancreáticas. Como a hidrólise dos triacilgliceróis ingeridos na dieta alimentar é essencial para a sua posterior absorção, agentes antilipase agem por meio da redução ou do bloqueio da digestão de gordura. Conseqüentemente, as enzimas envolvidas no metabolismo lipídico são alvos potenciais da descoberta de novos fármacos capazes de inibir a digestão e absorção de lipídios em nível periférico (LUNDER *et al.*, 2005; ELANGBAM, 2009). Esses produtos garantem às empresas que detêm suas patentes, bilhões de dólares anualmente (WTN, 2009).

3.2 Lipases

Comparada com outras hidrolases, as lipases (EC 3.1.1.3, IUBMB Enzyme Nomenclature) constituem um importante grupo de enzimas com grande potencial para aplicação biotecnológica (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; GONÇALVES e MARSAIOLI, 2013) e estão associadas ao metabolismo e à hidrólise de lipídios (REED, 1975). Apresentam uma versatilidade extremamente elevada quanto a especificidade de substratos e às diversas reações que catalisam (GANDHI, 1997; SANGEETHA *et al.*, 2011). A diferença mais importante entre as “verdadeiras” lipases e outras hidrolases, como as esterases, são as interações físico-químicas com seus substratos e, ainda, diferenciam-se quanto o sítio catalítico, presença ou não de tampa hidrofóbica e seletividade do substrato (COSTA e AMORIM, 1999; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

² HMG-CoA redutase (ou 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase ou HMGR) é uma enzima da via do mevalonato, a via metabólica que produz o colesterol e outros isoprenóides. Esta enzima é alvo para inúmeros fármacos disponíveis no mercado com objetivo de reduzir o colesterol, conhecidos coletivamente como estatinas.

3.2.1 Fontes de Lipases

A exploração da biodiversidade na busca de novos catalisadores por técnicas de seleção de microrganismos, de plantas ou células animais representam os métodos tradicionais de descoberta de novas enzimas para o desenvolvimento da biocatálise em escala industrial (DEMIRJIAN et al., 1999). Entretanto, avanços registrados em relação à tecnologia do DNA recombinante associados à facilidade de produção e abundância de microrganismos mudaram este cenário (HASAN et al., 2006).

As lipases são comumente encontradas na natureza e podem ser isoladas a partir de várias fontes: animal (pancreática, hepática e gástrica), vegetal (extraída da soja, do centeio e do algodão) e microbiana (bactérias e fungos) (PAQUES e MACEDO, 2006; CASTRO *et al.*, 2004; SHARMA *et al.*, 2001; COSTA e AMORIM, 1999), sendo que as bactérias representam 45%, os fungos 21%, os animais 18%, as plantas 11%, e as algas 3% (PATIL *et al.*, 2011).

O elevado custo de produção, quando comparadas a outras hidrolases (proteases e carboxilases), bem como o baixo rendimento do processo fermentativo limitou por anos a utilização de lipases microbianas (HASAN *et al.*, 2006). As lipases microbianas são as mais utilizadas e, na sua grande maioria, não são nocivas à saúde humana, sendo reconhecidas como “*Generally Recognized as Safe – GRAS*”, status concedido pela FDA (*Food and Drugs Administration*) (JAEGER, *et al.*, 1994). As Lipases microbianas são estáveis e ativas em pH ácido, algumas são resistentes à proteases digestivas e com atividade na presença de sais biliares, podem representar alternativas terapêuticas superiores e existem patentes sobre este assunto (SVENDSEN *et al.*, 2008). As lipases mais empregadas na indústria farmacêutica são produzidas por (SOLANO *et al.*, 2012);

- origem microbiana: *Pseudomonas fluorescens*, uma das mais empregadas na resolução de compostos racêmicos; *Pseudomonas cepacia*, biocatalisador que tem se mostrado bem seletivo; *Serratia marcescens*, menos conhecida, porém igualmente utilizada por algumas companhias na preparação de intermediários quirais;
- origem fúngica: *Candida rugosa* (também conhecida como *Candida cylindracea*); *Candida antarctica*, uma das enzimas de maior versatilidade no campo da biotransformação com destaque em duas diferentes isoformas, CALA e CALB;

- origem animal: lipase pancreática (suína) provavelmente a mais econômica do mercado.

3.2.2 Características e Propriedades das Lipases

As razões do potencial biotecnológico das lipases incluem fatores como alta estabilidade em solventes orgânicos; não requerem a presença de cofatores; possuem especificidade pelo substrato e, exibem alta enantiosseletividade (VILLENEUVE et al., 2000; HASAN et al., 2006; DALLA-VECCHIA et al., 2004). Algumas lipases se mantêm ativas até uma temperatura de 70 °C (COSTA e AMORIM, 1999), no entanto, em sua maioria, uma atividade ótima pode ser alcançada na faixa de temperatura entre 30 e 40°C (HASAN et al., 2006; CASTRO et al., 2004) e, em um pH compreendido entre 4 e 9. Além disso, estas enzimas não requerem a presença de cofatores (COSTA e AMORIM, 1999). Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando entre 20 e 75 kDa (HASAN et al., 2006; CASTRO et al., 2004). Algumas lipases apresentam isoformas, por exemplo, López et al. (2004) relataram a presença de três tipos de isoenzimas conhecidas (Lip1, Lip2 e Lip3), que exibem diferenças em relação a especificidade pelo substrato (MANCHEÑO et al., 2003).

Como citado por Castro & Anderson (1995) o controle da quantidade de umidade é o principal fator para o sucesso de vários processos catalisados por lipases em meio orgânico, devido a reversibilidade da atividade da lipase. Este conhecimento é muito importante para muitas aplicações industriais. Uma grande quantidade de água é predominante nas reações de hidrólise, enquanto que baixa concentração de água favorece as reações de síntese. Na síntese de ésteres as três principais fontes de água no sistema podem estar relacionadas com solvente, enzima e a água formada durante a reação.

3.2.3 Especificidade das Lipases

O sítio ativo destas enzimas é caracterizado geralmente por uma tríade catalítica constituída pelos resíduos de aminoácidos serina, histidina e aspartato/glutamato, crucial para a realização de todas as reações catalisadas por lipases, sendo portanto, classificadas como serino hidrolases (COSTA e AMORIM, 1999). Apesar das enzimas possuírem centenas de aminoácidos, apenas alguns deles são diretamente responsáveis pela catálise. Porém, resíduos vizinhos podem contribuir para a estabilização de estados intermediários e desta forma auxiliar na catálise (COSTA NETO, 2002).

Muitas enzimas são ativas em interfaces de sistemas biológicos vivos, tais como nos processos de sinalização na superfície das membranas celulares, na digestão dos lipídios na dieta, na degradação do amido e celulose, mas o estudo da enzimologia permanece em grande parte voltada para as interações entre enzimas e substratos solúveis. A caracterização bioquímica e cinética de enzimas lipolíticas abriu novos caminhos de pesquisa na área de enzimologia interfacial (ABDELKAFI *et al.*, 2011).

Vários estudos têm revelado duas diferentes conformações das lipases, mas não é uma regra (SANDSTROM *et al.*, 2012; ERICSSON *et al.*, 2008), a primeira se refere ao acesso do sítio ativo da enzima fechado através de um oligopeptídeo hidrofóbico, chamado de tampa ou “*lid*”, onde a lipase é considerada inativa e, a segunda conformação ocorre quando há ligação do substrato na superfície da enzima; esta tampa desloca-se, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, deixando o sítio ativo acessível ao substrato. Ao mesmo tempo, a enzima expõe uma larga superfície de caráter hidrofóbico, o que facilita sua ligação a interface. Nesta conformação a lipase é considerada ativa (BUCHHOLZ *et al.*, 2005).

A estrutura tridimensional da lipase fornece uma explicação para este fenômeno, conhecido como “ativação interfacial”. Entretanto, uma estrutura em forma de tampa não está necessariamente relacionada com a ativação interfacial (CASTRO *et al.*, 2004). Logo, as lipases atuam, prioritariamente, em substratos emulsionados (interfaces água-óleo ou água-solvente orgânico) onde a “ativação interfacial” está relacionada ao aumento da atividade da lipase em função de substratos insolúveis (SHARMA *et al.*, 2001). Os triglicerídeos são os substratos naturais de algumas lipases e seu modo de ação está relacionado com as propriedades interfaciais nos sistemas bifásicos (BORGSTON e BROCKMAN, 1984).

Quanto a especificidade, as lipases podem ser divididas em três grupos principais, segundo Macrae & Hammond (1985), Sonnet (1988), Castro *et al.* (2004) e Paques & Macedo (2006):

- Lipases não específicas: catalisam a hidrólise completa do triglicérideo em ácidos graxos e glicerol, produzindo mono e diglicérideos como intermediários;
- Lipases 1,3 específicas: hidrolisam os triglicérideos nas ligações C1 e C3 do glicerol produzindo ácidos graxos, 2 monoglicérideos e 1,2 ou 2,3 diglicérideos, sendo que ambos são quimicamente instáveis, ocorrendo a formação de 1,3 diglicérideos e 1 ou 3 monoglicérideos, devido a migração do grupo acil;
- Lipases ácido graxo específicas: são lipases com ação específica na hidrólise de ésteres constituídos de ácidos graxos de cadeia longa insaturada com duplas ligações em *cis*, no carbono 9. Ésteres com ácido graxos saturados ou sem insaturação no carbono 9, são lentamente hidrolisados.

A especificidade das lipases é um fator muito importante para a aplicação industrial, uma vez que a enzima pode ser específica em relação à molécula alcoólica ou ácida do substrato. Algumas lipases possuem estereoespecificidade, ou seja, a capacidade de diferenciar os enantiômeros de uma mistura racêmica. A especificidade estrutural ou regioseletividade é devido à orientação imposta pelas dimensões e estrutura do centro ativo a ser ligado no substrato. A seletividade e a estereoquímica é decorrente da quiralidade da enzima, ou seja, da simetria estrutural, que limita a ação em substratos que não atendam determinadas relações espaciais (CASTRO *et al.*, 2004).

3.2.4 Reações Catalisadas por Lipases

A catálise é uma das ferramentas químicas mais utilizadas em procedimentos químicos na indústria. É estimado que cerca de 90% dos processos químicos utilizem, ao menos em uma etapa de sua produção, um catalisador. Os catalisadores agem diminuindo a energia de ativação necessária para realizar uma reação, tornando-a mais rápida e com menor gasto de energia (LANCASTER, 2002). O desenvolvimento recente de catalisadores altamente seletivos e eficientes em transformações complexas contribui para o avanço da química sintética na direção da chamada “síntese ideal”. O catalisador age combinando-se com os reagentes para gerar

compostos intermediários facilitando assim a sua transformação em produtos. O intermediário catalítico é, na maior parte dos casos, muito reativo e, por isso, difícil de detectar (HAGEN, 2006).

Os grupos funcionais sobre os quais as lipases atuam variam grandemente: álcoois e ésteres carboxílicos quirais ou pró-quirais, cianonidrinas, cloridrinas, dióis, α e β -hidroxi-ácidos, aminas, diaminas e amino-álcoois (JAEGER *et al.*, 1999; JAEGER e EGGERT, 2002). Entre os processos de maior interesse estão as reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídeos por meio das lipases (FALONY *et al.*, 2006; FLEURI *et al.*, 2014), sendo assim, as lipases constituem ferramentas potentes na catálise não apenas de reações de hidrólise mas também de diversas reações ditas "reversas", ou seja, seu uso na síntese de ésteres, interesterificações e resolução de misturas racêmicas para produzir compostos opticamente ativos (MACRAE e HAMMOND, 1985; CASTRO e ANDERSON, 1995). Deste modo, sendo possível controlar o tipo de catálise (hidrólise ou síntese) através do equilíbrio da atividade da água presente na mistura da reação (VILLENEUVE *et al.*, 2000; CARVALHO *et al.*, 2003) e, por se manter ativa em meios contendo solventes orgânicos com elevada seletividade (FERNANDES *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2006; FORESTI *et al.*, 2007).

As três últimas reações são agrupadas frequentemente em um único termo, chamado, transesterificação. As principais reações catalisadas por lipases podem ser classificadas como:

- Hidrólise: $\text{RCOOR}' + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RCOOH} + \text{R}'\text{OH}$
- Esterificação: $\text{RCOOH} + \text{R}'\text{OH} \rightleftharpoons \text{RCOOR}' + \text{H}_2\text{O}$
- Aminólise: $\text{RCOOR}' + \text{HN} \rightleftharpoons \text{R}'\text{CONHR}'' + \text{ROH}$
- Interesterificação: $\text{RCOOR}' + \text{R}''\text{COOR}^* \rightleftharpoons \text{RCOOR}^* + \text{R}''\text{COOR}'$
- Alcoólise: $\text{RCOOR}' + \text{R}''\text{OH} \rightleftharpoons \text{RCOOR}'' + \text{R}'\text{OH}$
- Acidólise: $\text{RCOOR}' + \text{R}''\text{COOH} \Rightarrow \text{R}''\text{COOR}' + \text{RCOOH}$

O desenvolvimento de reações enzimáticas em meio orgânico possibilitou a melhor integração entre a catálise enzimática e a química orgânica convencional, ampliando as possibilidades de síntese de novas substâncias de interesse farmacológico. Desta forma, a catálise enzimática vem sendo empregada como ferramenta complementar das rotas de síntese eliminando algumas das etapas que seriam necessárias para a obtenção do produto através da química orgânica tradicional (*apud* BELIVAQUA, 2005). Com exceção de certos álcoois estericamente impedidos, as lipases catalisam a acilação assimétrica de uma ampla faixa de

substratos cíclicos e acíclicos com enantiosseletividade entre moderada e alta (SCHMID e VERGER, 1998; NORDIN *et al.*, 2000).

Assim, o catalisador “ideal” é considerado bioquimicamente em termos de número de *turnover* (k_{cat})³ ou, para um determinado processo, em termos de especificidade constante máxima (k_{cat}/K_m)⁴. No entanto, do ponto de vista de bioprocessos, cada bioprocessos é limitado por um conjunto de condições ditadas pelas propriedades específicas dos substratos, produtos e a reação de bioconversão (BURTON *et al.*, 2002).

3.2.5 Solventes e Lipases

Geralmente o solvente implica na atividade e na conformação da enzima e na proporção de sítios ativos disponíveis para catálise. Acredita-se que algumas enzimas sejam cataliticamente ativas em meio orgânico porque permanecem na sua conformação original, mas perdem um pouco de sua flexibilidade, tornando-se mais rígidas e alterando sua especificidade. Estas características devem-se, em parte, ao aumento das interações eletrostáticas entre os grupos polares da enzima, à baixa constante dielétrica da maioria dos solventes orgânicos e, também, ao aumento do número de ligações de hidrogênio intramoleculares promovendo, conseqüentemente, uma diminuição da ligação enzima-substrato (KOSKENEN e KLIBANOV, 1996). O solvente pode, ainda, afetar a velocidade de reação da catálise enzimática em sistemas monofásicos ou bifásicos (LIMA e ANGNES, 1999).

Os solventes orgânicos são usados na indústria farmacêutica na purificação de determinados produtos (LANCASTER, 2002). A maioria dos processos reacionais conhecidos requerem a utilização de solventes, promotores de reação, catalisadores, auxiliares quirais, agentes secantes, agentes de separação, soluções aquosas ou salinas, entre outros. Ultimamente, tem-se registrado um esforço considerável no sentido de substituir os solventes orgânicos convencionais por outros ambientalmente mais aceitáveis, como é o caso da água e do etanol (DA SILVA *et al.*, 2005; SPIRO e STILGLIANI, 2009).

Outra maneira na qual os solventes afetam a atividade é por interação direta com a água essencial em torno da molécula enzimática. Solventes altamente polares são capazes de adsorver água avidamente e deslocar a camada de hidratação da enzima, provocando a perda das propriedades catalíticas por inativação ou desnaturação. Reciprocamente, os solventes

³ O turnover number ou k_{cat} é o número máximo de mols de substrato que podem ser convertidos em produto por mol de enzima em uma unidade de tempo.

⁴ Constante de especificidade, definida como k_{cat}/K_m , é uma medida de quão eficientemente uma enzima converte substrato em produto em baixas concentrações de substrato.

hidrofóbicos, por serem menos capazes de deformar a camada de hidratação, podem afetar parcialmente a atividade catalítica, revertendo os domínios hidrofílicos e hidrofóbicos (*apud* KOSKENEN e KLIBANOV, 1996).

No entanto, algumas lipases mantêm suas propriedades catalíticas tanto em solventes orgânicos como em meio aquoso, uma possível explicação para este fato é que essa enzima é capaz de reter a camada de hidratação tão fortemente que mesmo solventes hidrofílicos não conseguem retirar água (LIMA e ANGNES, 1999). As lipases, por exemplo, perdem a mobilidade necessária para acomodar moléculas grandes de substratos no sítio ativo em meio não-aquoso. Além disso, a rigidez estrutural aliada à necessidade de água por parte dos processos covalentes envolvidos na inativação irreversível (deamidação, hidrólise de peptídeos, decomposição da cistina) faz com que as enzimas sejam mais termoestáveis em solvente orgânico do que em meio aquoso (KOSKENEN e KLIBANOV, 1996; *apud* LIMA e ANGNES, 1999).

De uma maneira geral, na indústria farmacêutica, há a preocupação em se ter água como solvente pela sua utilidade em reações biocatalíticas⁵. Apesar da atividade lipásica inicialmente ser considerada como restrita a meios aquosos, as lipases também têm sido empregadas em meios não-aquosos (OLIVEIRA *et al.*, 2006; FORESTI *et al.*, 2007). Para as lipases, alguns meios não-convencionais estão sendo utilizados, como solventes orgânicos (OLIVEIRA *et al.*, 2006; FORESTI *et al.*, 2007) e outras alternativas tecnologicamente mais exigentes, como é caso dos sais e líquidos iônicos à temperatura ambiente, a utilização de fluidos em condições supercríticas e sistemas sem solventes que ocorrem em meios reacionais onde estão presentes somente os reagentes envolvidos, que podem se encontrar em fase líquida ou sólida (DA SILVA *et al.*, 2005; SPIRO e STILGLIANI, 2009).

As lipases são associadas a solvente supercrítico o qual em determinada temperatura e pressão, existe como um fluido num estado intermediário entre líquido e gás. Os fluidos supercríticos mais empregados são o dióxido de carbono (scCO₂) e a água (scH₂O). Os fluidos supercríticos são usados com o intuito de aumentar a solubilidade dos fármacos, na plastificação

⁵ Um exemplo de síntese de fármacos que usa água como solvente é o processo de produção de ziprasidona, um antipsicótico comercialmente chamado de Geodon®. A reação com solventes orgânicos possui um rendimento de 20%, mas quando o solvente é substituído por água a solubilidade dos reagentes melhora, aumentando o rendimento da reação para 90% (CARRILHO, 2001).

de polímeros, na modificação de superfícies de nanocristais e na extração cromatográfica (GIROTRA, 2013). Além disso, são compostos não-inflamáveis, atóxicos, não-poluentes, possuem grande miscibilidade em reagentes gasosos e são fáceis de separar dos produtos (ANASTAS, 2007; SKOUTA, 2009). Esse solvente tem sido aplicado em uma grande variedade de reações de síntese como, por exemplo, hidroformilação de alcenos (oxidação de olefinas), epoxidação e reações de Diels-Alder (ANASTAS, 2007).

Outro exemplo interessante é a hidrogenação catalítica de precursores de vitaminas usando CO₂ supercrítico/H₂ da Hoffman La Roche, onde é conhecido que um reator de batelada de 10.000 L do processo convencional foi substituído por um reator contínuo de apenas 40 L com uma produção de 800 t por ano (POLIAKOFF e HOWDLE, 1995).

Da mesma forma, as lipases têm sido integradas aos líquidos iônicos (LIs) ou sais fundidos compostos por íons (cátions e ânions). As características desses solventes são baixa pressão de vapor, não-volatilidade e estabilidade térmica (SHELDON *et al.*, 2002), além de serem considerados solventes universais, devido sua capacidade de dissolver um grande número de compostos orgânicos e gases e, não se complexarem com metais, também, são recuperáveis e recicláveis. Este tipo de solvente pode ser armazenado por longos períodos de tempo, além disso, em alguns casos, o caráter iônico acelera a velocidade de reação mesmo sob irradiações de micro-ondas (SKOUTA, 2009; SURESH e SANDHU, 2011).

Os LIs são utilizados em diversas aplicações farmacêuticas tais como: uso como solventes alternativos na síntese de alguns fármacos; processos de extração de compostos farmacêuticos de soluções aquosas; processos que envolvam distribuição de fármacos e mais recentemente através do desenvolvimento de LIs farmacêuticos (designados API-ILs). Algumas publicações recentes têm descrito o uso de LIs como meio reacional para a síntese de fármacos antivirais, antiparasitários, antitumorais e anti-inflamatórios não-esteróides (MARRUCHO *et al.*, 2014). A preparação de novos LIs farmacêuticos ou simples dissolução de fármacos em LIs biocompatíveis pode ter no futuro um impacto relevante na indústria farmacêutica no desenvolvimento de processos sintéticos mais sustentáveis (KULACKI e LAMBERTI, 2008) com a respectiva eliminação do polimorfismo bem como um aumento da biodisponibilidade e atividade terapêutica (FERRAZ *et al.*, 2011).

3.2.6 Imobilização de Lipases

O uso de enzimas imobilizadas oferece importantes vantagens quando comparadas ao uso de enzimas livres em processos industriais e tem sido utilizado extensivamente por facilitar o desenvolvimento de processos em escala comercial (*apud* TISCHER e KASCHE, 1999). Os principais benefícios apontados por diversos autores são: facilidade na recuperação do biocatalisador; facilidade na separação dos produtos; processo pode ser operado continuamente; previne a formação de agregados em meio orgânico; minimização de efeitos desnaturantes e maior proteção contra desativação por produtos químicos ou pelo meio reacional; manutenção de microambiente com alta atividade de água; propriedades enzimáticas (como atividade e termoestabilidade) podem ser alteradas favoravelmente; custos com manejo de materiais são minimizados (FREIRE, 1988, ILLANES, 1994; BENJAMIN e PANDEY, 1998; VILLENEUVE *et al.*, 2000; GUISÁN *et al.*, 2001).

No entanto, o processo de imobilização normalmente ocasiona modificações nas propriedades físico-químicas da enzima com consequente alteração na estabilidade e nas propriedades cinéticas da enzima imobilizada. Os principais aspectos a respeito desses efeitos são apresentados: efeitos conformacionais; efeitos estereoquímicos; efeitos de partição; limitações difusionais (*apud* FREIRE, 1988).

Não somente as lipases, mas todas as enzimas, de um modo geral, estão sujeitas à inativação por diversos fatores, para que a catálise seja eficiente em um determinado processo é necessário protegê-las de ações deletérias como a interação com o solvente, meio pelo qual é realizada a reação. Frente a este problema, a técnica da imobilização é utilizada para proporcionar estabilidade às enzimas e facilitar a recuperação e reutilização (VILLENEUVE *et al.*, 2000).

Os métodos de imobilização são frequentemente classificados segundo o tipo de ligação empregada e o suporte (LIMA *et al.*, 2001): separação por membrana; encapsulamento; membranas fibrosas semi-permeáveis; microencapsulamento; entrelaçamento com polímeros; formação de ligações covalentes; adsorção. Já em relação as lipases, muitas técnicas de imobilização têm sido desenvolvidas nos últimos anos as quais podem ser classificadas em quatro tipos: adsorção de materiais à base de polímeros orgânicos ou inorgânicos; encapsulamento; ligação covalente e reticulação. Dentre esses métodos, a adsorção tem sido habitualmente utilizada por ser um processo de produção mais simples, apresentar menor custo,

poucos efeitos deletérios, alta atividade e seletividade (DA RÓS *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2009).

3.2.7 Inibição de Lipases

Com destaque para os agentes antilipase, que são inibidores de lipases digestivas, como as gástricas e as pancreáticas. Como a hidrólise dos triacilgliceróis ingeridos na dieta alimentar é essencial para a sua posterior absorção, agentes antilipase agem por meio da redução ou do bloqueio da digestão de gordura.

Uma das causas da obesidade está associada ao desequilíbrio no metabolismo de lipídios, afetando, assim, a homeostase no organismo (HOFBAUER, 2002; WEIGLE, 2003; SRIVASTAVA e SRIVASTAVA, 2004). Nesse contexto, a intervenção sobre o metabolismo lipídico surge como alternativa intermediária no tratamento dessa doença. Uma importante estratégia inclui o desenvolvimento de inibidores da digestão e absorção de lipídios através de mecanismos gastrointestinais, caracterizando uma intervenção periférica, ao invés de central (SHI e BURN, 2004; FOSTER-SCHUBERT e CUMMINGS, 2006). Essa potencial abordagem terapêutica implica na identificação, cada dia crescente, das enzimas envolvidas nesse metabolismo, entre elas, a lipase pancreática (LP), provavelmente tida como principal alvo terapêutico em potencial (SHI e BURN, 2004; BIRARI e BUTHANI, 2007).

Um dos primeiros inibidores potentes da lipase pancreática a serem descritos foi a lipstatina, isolada da *Streptomyces toxytricini*, conferindo a ação inibitória da lipstatina a estrutura beta lactona. A Tetrahidrolipstatina ou orlistate (Xenical[®]) é um análogo sintético da lipstatina o qual foi desenvolvido posteriormente e, é utilizada no tratamento da obesidade (Figura 1). O Orlistate exerce sua atividade terapêutica no lúmen do trato gastrintestinal e não tem efeito inibitório significativo sobre outras enzimas digestivas, tais como amilase, tripsina, quimiotripsina e fosfolipase (GUERCIOLINI, 1997). Essa droga, ao inibir a lipase pancreática, provoca uma queda de absorção de cerca de 30% das gorduras de cadeias longas, eliminadas nas fezes, causando esteatorreia (RAO *et al.*, 2001).

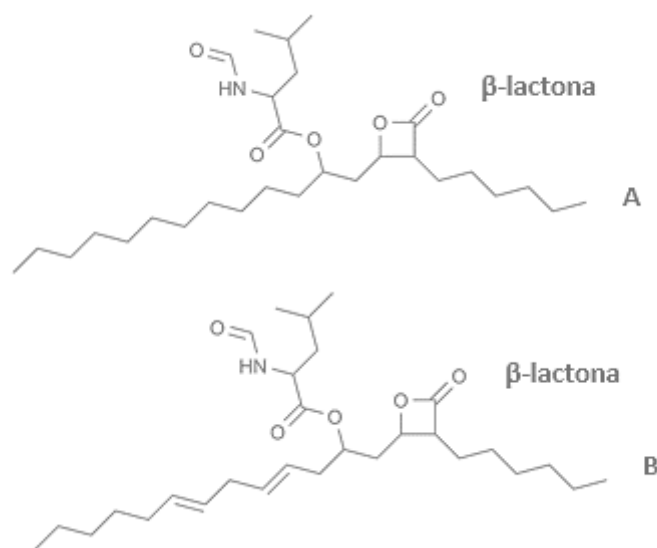


Figura 1. A- estrutura química da Tetrahydrolipstatina (THL). B- estrutura química da Lipstatina.

Fonte: SOUZA, 2009.

Outros inibidores sintéticos da lipase têm sido estudados, análogos de 2-oxo-amida triacilglicerol e α -ceto-amida de cadeia longa (TOPLAK e MARHARDT, 1998; KOTSOVOLOU *et al.*, 2001; CHIOU *et al.*, 2001). A procura por produtos naturais com ação inibitória sobre a lipase, também, têm sido alvo de muitos estudos, por exemplo, moléculas inibidoras encontradas em plantas pertencentes a diversas classes de compostos, como saponinas, polifenóis e terpenos (SHARMA *et al.*, 2005; BIRARI e BHUTANI, 2007).

3.3 Aplicação Das Lipases Na Indústria Farmacêutica

As lipases possuem uma atividade catalítica enantiosseletiva e, por essa razão, são amplamente utilizadas em reações onde há o interesse em sintetizar substâncias opticamente ativas (YUAN *et al.*, 2003). Sem dúvida, o principal aspecto da aplicação de sistemas de bioconversão na área farmacêutica é a obtenção de compostos quirais de interesse, desta forma, a aplicação das lipases vem tendo maior destaque devido suas características peculiares como biocatalisadores e agentes terapêuticos, permitindo sua utilização na síntese de intermediários de fármacos (ex. ibuprofeno e naproxeno, fármacos com atividade anti-inflamatória) e na resolução de compostos racêmicos (ex. síntese de atenolol, fármaco anti-hipertensivo) (LEAL *et al.*, 2002; BARON, 2003; WAKABAYASHI, 2004; POLLARD e WOODLEY, 2006); na otimização de processos farmacêuticos e na formulação de fármacos (MONTEIRO e SILVA, 2009); em processos de biotransformação e bioconversão (STRAATHOF, 2006); na síntese assimétrica de compostos quirais puros ou enriquecidos enantiomericamente; na síntese de alcoóis, amino álcoois, aminoácidos e aminas quirais; síntese assimétrica por condensação

aldólica e condensação aciloínica; hidroxilação e epoxidação enantio e régio seletivas; síntese quimioenzimática de dióis quirais (LOUGHLIN, 2000; FABER, 2000; PATEL, 2001; LACERDA *et al.*, 2006; FESSNER e ANTHONSEN, 2008; FREIRE e CASTILHO, 2008), sendo, ainda, utilizadas em várias aplicações biotecnológicas (KUMAR e SINGH, 2013). As principais aplicações das lipases na indústria farmacêutica concentram-se resumidas na Tabela 4.

Tabela 4. Aplicações industriais da lipase no ramo farmacêutico.

Aplicação da lipase	Produto/ação
Diagnóstico e Tratamento	Auxiliar digestivo, terapia genética, terapia anticâncer, agente anti-inflamatório, terapia de reposição desordens metabólicas, agente anti-obesidade, terapia de doenças metabólicas, terapia de doenças hepáticas Marcador enzimático para diagnóstico de doenças
Síntese Dirigida e Planejamento de Fármacos	Lipossomas, monoglicerídeos, monoésteres, polietilenoglicol, pró-fármacos
Otimização de processos	Isoniazida (inibidor enzimático utilizado no tratamento da tuberculose), Ácido mandélico (precursor dos antibióticos como cefalosporinas e penicilinas, agentes antitumorais e anti-obesidade)
Síntese Assimétrica e Resolução de Racemato	Atenolol, propranolol, (anti-hipertensivo) (R)-4-fenilbutan-2-amina (precursor do divelalol, anti-hipertensivo) Ibuprofeno e Naproxeno (antinflamatórios) Sistano (fungicida sistêmico) Sertralina e Norsertralina (antidepressivo), Nifenalol e Dicloroisoproterenol (beta adrenérgicos) Lamivudine (imunossupressor)
Síntese de Compostos Nitrogenados	(S)-anfetamina Metoxianfetamina (precursor de bronco dilatador) (S)-1-fenil-1-propilamina e (S)-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftilamina (precursores de agente antidepressivo) (R)-4-fenilbutan-2-amina (agente anti-hipertensivo)
Síntese de Ésteres	Surfactantes, antiespumantes, retinol (vitamina A) Ésteres de isoamila de ácidos graxos (flavorizantes e aromatizantes em medicamentos) Intermediários quirais, emulsificantes. Vitamina C Rapamune® (rapamicina-42, imussupressor) Taxol (anticâncer) Lactonas sintéticas
Síntese de lipídeos estruturados e modificação de óleos e gorduras	Hipocolesterolêmicos, anti-inflamatórios, e trombolíticos anti-hipertensivos e vasodilatadores, nutracêuticos (ácidos graxos polinsaturados livres e os seus mono- e diglicerídeos)

	Salatrim® (antidepressivo), Betapol® (substituto de leite materno) Marinol® (THC sintético) Lipídeos estruturados Extração seletiva de ácidos graxos de aplicações médicas
--	--

Fonte: Própria.

3.3.1 Diagnóstico e Tratamento

Atualmente, existe no mercado uma ampla variedade de medicamentos à base de enzimas (HAMMER, 2001) para aplicação como auxiliares digestivos, antiinflamatórios, anti-sépticos, na reposição de enzimas hemostáticas, na inibição da coagulação, na prevenção de lesões de reperfusão, no tratamento da icterícia neonatal, no tratamento de fibrose cística, na terapia de doenças hepáticas, na terapia de reposição de enzimas metabólicas, terapia genética e na terapia do câncer (BYRNE *et al*, 2002; TSUTSUMI, 2003; KUHN *et al*, 2010; PERTWEE, 2014; BARATTA *et al*, 2019; TASKIN e ADSAY, 2019; CEHRELI *et al*, 2019). A alta especificidade e eficiência catalítica das lipases são características importantes na sua aplicação como agente terapêutico, logo, a diversidade de aplicação das lipases vai desde auxiliar digestivo até terapia anticâncer (MONTEIRO e SILVA, 2009; WIERZBICKI E VILJOEN, 2013; AL-BUSTAN *et al*, 2019; BILOUS *et al*, 2019).

Além disso, diversas enzimas com excelente especificidade pelo substrato foram desenvolvidas e são empregadas como catalisadores em diagnósticos, deste modo, as lipases têm sido utilizada como marcador enzimático para diagnóstico de doenças, como por exemplo, dosagem de triacilgliceróis no sangue e avaliação de atividade enzimática (Tabela 4) (BURKE, 2003; *apud* MONTEIRO e SILVA, 2009; HERRERA-LÓPEZ, 2012; XU *et al*, 2018; POHANKA, 2019; CERMINATI *et al*, 2019). Apesar das vantagens propostas pelo uso de enzimas em terapias e diagnósticos algumas limitações como instabilidade dos biocatalisadores ou antigenicidade, no caso das terapias enzimáticas, podem trazer sérios problemas por esta razão planejamento de fármacos, mecanismos e estratégias de formulação têm sido desenvolvidas a fim de contornar estes inconvenientes técnicos (GIUSEPPE *et al*, 2012; BUDNIK *et al*, 2017).

3.3.2 Síntese Dirigida e Planejamento de Fármacos

Conforme exposto, diversas estratégias de formulação utilizando a lipase têm sido desenvolvidas no sentido de contornar limitações, dentre elas podem ser citadas a incorporação da enzima em sistemas liberação controlada e transporte/direcionamento de fármaco, como os lipossomas e a conjugação química com moléculas de baixo peso molecular ou poliméricas, como o polietilenoglicol (BON, *et al.*, 2008; CRUZ *et al.*, 2008). Seguindo com mais exemplos, alguns monoglicerídeos, como a monolaurina, possui propriedades antimicrobianas e, é usada como um dos principais agentes penetrantes para aplicações em membranas mucosas, onde reduz o tempo necessário para o início da ação da droga, aumenta a absorção da droga e causa menor ou nenhum efeito deletério à membrana mucosa. Já a Monooleína, outro monoglicerídeo, é utilizado como sistema de liberação de drogas e carreador farmacêutico (FREITAS *et al.*, 2008). Monoésteres de sacarose também têm utilidade na formulação e liberação de fármacos na indústria farmacêutica. Outro exemplo comum é o éster de cadeia longa, muito utilizado na área farmacêutica, são os ésteres de celulose. Esses compostos são aplicados em formas sólidas de dosagem de fármacos, usados tipicamente para o controle da liberação desses fármacos (Tabela 4) (POLAT, LINHARDT, 2001; SZÜTS; SZABÓ-RÉVÉSZ, 2012).

3.3.3 Otimização de Processos

Outra aplicação da lipase é atuar como catalisador na otimização de processos de síntese de fármacos, como no caso da isoniazida (Tabela 4). Dentre os fármacos usados no primeiro tratamento da tuberculose, a isoniazida ou hidrazida do ácido 4-piridinocarboxílico destaca-se por sua especificidade para o *M. tuberculosis*, apresentando pouca ou nenhuma atividade sobre outras bactérias e também por sua fácil absorção quando administrada por via oral. A INH é considerada como fármaco-base da quimioterapia anti-TB, tanto para infecções ativas quanto para aquelas latentes (ALVES, 2003; VILCHÈZE *et al.*, 2006). Convencionalmente, a isoniazida é preparada através da hidrólise da 4-cianopiridina para a formação de uma amida intermediária e posterior formação da Isoniazida na reação desta amida com hidrato de hidrazina. Este processo geralmente ocorre com grande dispêndio energético uma vez que a primeira etapa acontece sob aquecimento (100 °C) em condições de refluxo. Toda a reação acontece em 7 horas. Além de ser uma reação química com alto custo, também é conduzida com uso de substâncias nocivas como é o caso da 4-cianopiridina. Além de nociva, a 4-cianopiridina é preparada a partir da 4-picolina, que tem um elevado custo (YADAV *et al.*, 2005; SITTING, 1988; GOGTE, 1982). Entretanto, estudos mostraram que processos

catalisados por enzimas como lipases podem ser conduzidos em condições mais amenas para a síntese de moléculas como a isoniazida, tornando-se mais atrativas que os processos convencionais como o descrito para a INH. Os estudos de Yadav e seus colaboradores (2005) mostraram que há possibilidades de se produzir INH através de reações heterogêneas catalisadas por lipases através do mecanismo descrito na Figura 2.

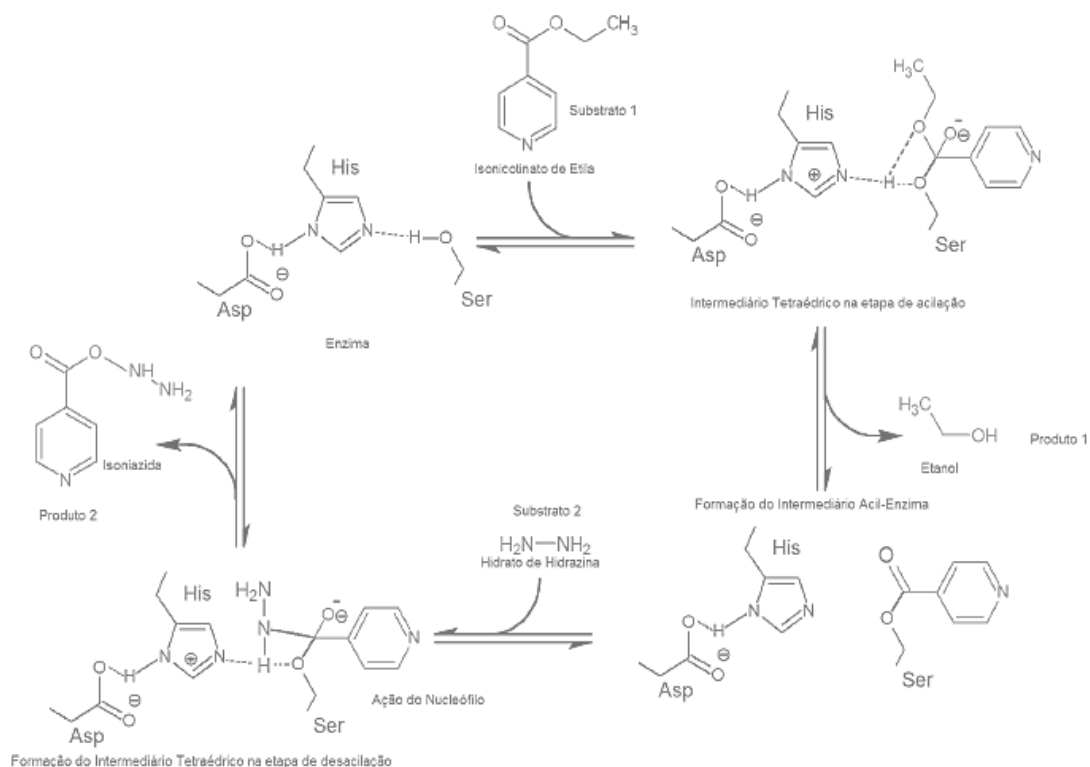


Figura 2. Mecanismo químico de síntese da isoniazida catalisada por lipases.

Fonte: adaptado de HAEFFNER *et al.*, 1999.

Os ácidos alfa-hidroxicarboxílicos aromáticos são uma classe importante de compostos que podem ser produzidos por vias enzimáticas. Sob o ponto de vista comercial, entre os mais importantes, encontra-se o ácido mandélico enantiomericamente puro e seus derivados substituídos (COPPOLA e SCHUSTER, 1997; GRÖGER, 2001; CAMPBELL *et al.*, 2003). O ácido (R)-mandélico (Figura 3) é tanto um precursor para síntese de diversos fármacos, como por exemplo, dos antibióticos penicilina e cefalosporina (WANG e TSAI, 2005), de agentes antitumorais e anti-obesidade (YADAV e SIVAKUMAR, 2004), quanto um agente de resolução em processos quirais. O ácido mandélico enantiomericamente puro e seus derivados são intermediários para a resolução de compostos racêmicos, como alcoóis e amins (HANSEN *et al.*, 2009; SCHRAMM e CHRISTOFFERS, 2009). O interesse pelo ácido mandélico como substrato para reações catalisadas por lipases cresceu devido à presença de um grupo hidroxí e

outro carboxi no centro quiral, sendo possível sua resolução tanto como álcool tanto como ácido carboxílico (MIYAZAWA *et al.*, 2000). A resolução de misturas racêmicas, de álcoois ou ácidos, pode ser alcançada utilizando-se as propriedades enantiosseletiva destas enzimas hidrolíticas (EBERT *et al.*, 1992).

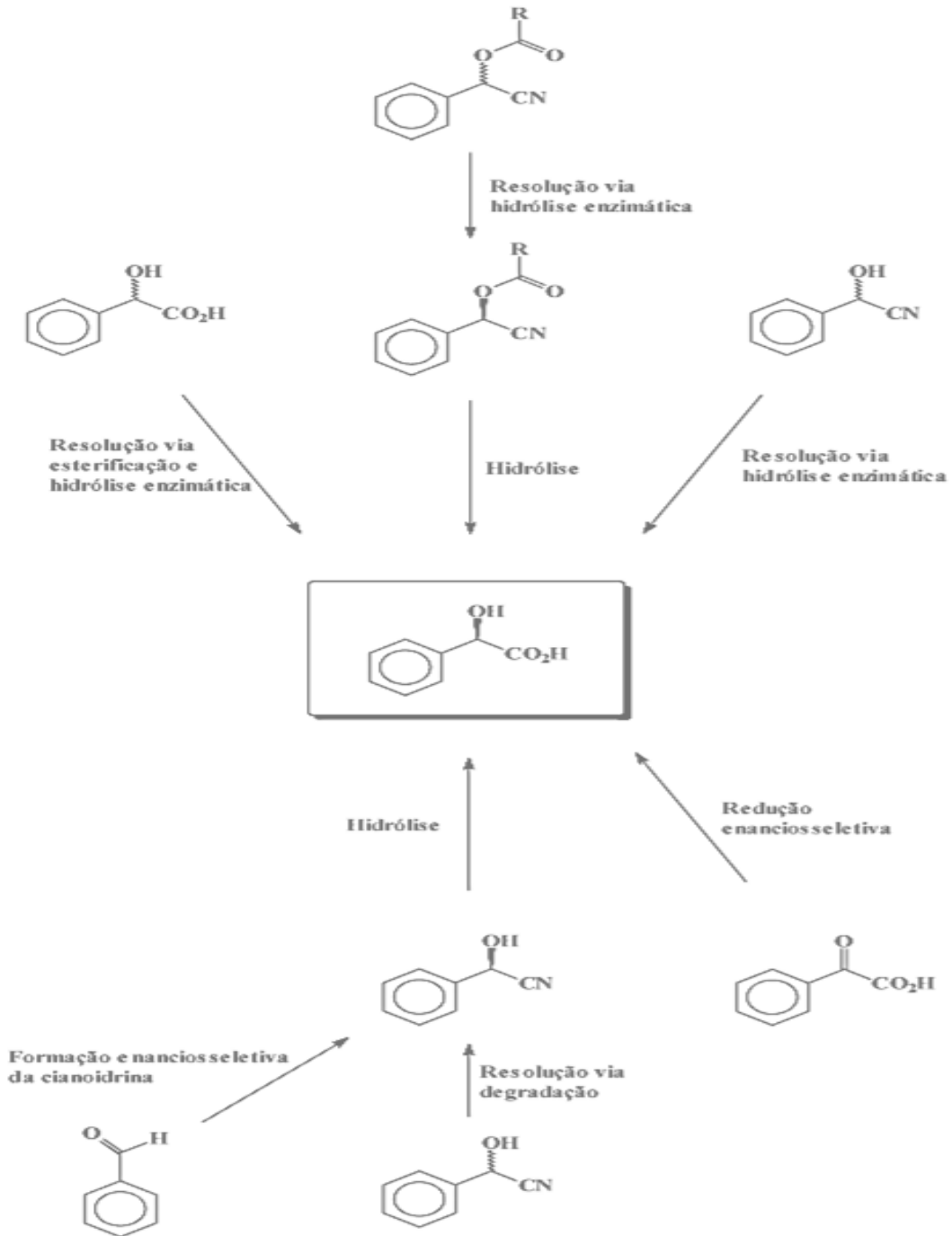


Figura 3. Rotas sintéticas de produção do (R)-ácido mandélico.

Fonte: adaptado de GRÖGER, 2001.

3.3.4 Síntese Orgânica e Resolução de Racemato

Uma aplicação que tem merecido destaque é a utilização de lipases na obtenção destes compostos enantiomericamente puros ou enriquecidos, geralmente intermediários ou produtos finais de rotas sintéticas estereocontroladas, também referenciadas na Tabela 4 (SIH e WU, 1989; SANTANIELLO *et al.*, 1990; THEIL, 1995; STECHER e FABER, 1997), uma das principais contribuições deste tipo de metodologia biossintética, já que estas enzimas são capazes de reconhecer moléculas quirais e atuam, preferencialmente, em um dos isômeros de uma mistura racêmica (CASTRO e ANDERSON, 1995). A síntese de compostos opticamente puros torna-se cada vez mais essencial na obtenção de produtos farmacêuticos, tendo em vista os inconvenientes da utilização de fármacos como mistura racêmica (SANTANIELLO *et al.*, 1990; THEIL, 1995; PANDEY *et al.*, 1999).

A resolução enantiomérica é sempre realizada na etapa biocatalítica. Dependendo da enzima, substrato e condições experimentais utilizadas podem ser obtidos diferentes enantiômeros, portanto, diversos são os parâmetros que controlam a enantiosseletividade das lipases, tais como: meio reacional, solventes orgânicos, atividade da água, concentração e estrutura do substrato (CERNIA *et al.*, 1998; BERGLUND, 2001). Estas hidrolases catalisam reações sobre substratos pró-quirais e resolução cinética de misturas racêmicas. As resoluções cinéticas (RC) têm uma grande utilidade mas apresentam uma limitação intrínseca, conseguem no máximo atingir 50% de conversão do enantiômero desejado (KAMAL *et al.*, 2008). A utilização da resolução cinética dinâmica (RCD) permite ultrapassar este problema através da racemização do enantiômero menos desejado para se tornar um substrato que a enzima consiga aceitar e assim reagir para que mais de 50% de substrato possa ser resolvido (REETZ *et al.*, 2002; SCHNELL *et al.*, 2003). Assim, o enantiômero que não reage é continuamente isomerizado durante o processo de resolução levando potencialmente a uma eficiente conversão de todo o material de partida no produto desejado, esta conversão, do ponto de vista teórico, pode chegar a 100% (AZERAD e BUISSON, 2000; FABER, 2001; BENAÏSSI *et al.*, 2009).

Um exemplo clássico da atuação da lipase na resolução de isômeros é através da reação de hidrólise enzimática de ésteres racêmicos de ibuprofeno, derivados do ácido fenilpropionico (Figura 4) o qual utiliza a enzima lipase da *Candida* sp. Este processo é usado para a obtenção industrial do anti-inflamatório não esteroide (AINE) (S)- Ibuprofeno, espécie responsável pelas atividades analgésica e antitérmica dos medicamentos comumente conhecidos como Alivium, Advil, Buscofem ou Artril (DIAS *et al.*, 2012). Na resolução enzimática, um dos enantiômeros

é quimicamente transformado com maior velocidade que o outro. A formação de estados de transição diastereoisoméricos entre o par de enantiômeros e a enzima é o fenômeno responsável pelas diferenças de velocidades de reação (BARREIRO *et al.*, 1997).

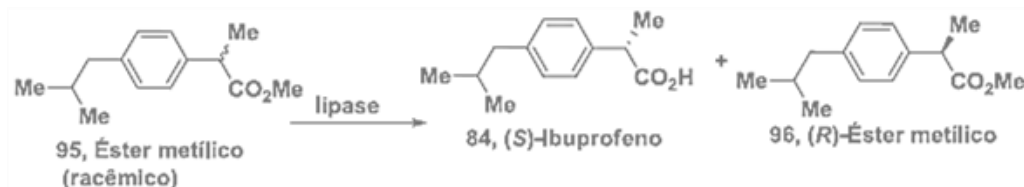


Figura 4. Obtenção do (s)-ibuprofeno 84 via resolução sintética.

Fonte: DIAS, F.R.F. *et al.*, 2012.

Uma maneira bem simples de obter o enantiômero (*S*) presente na mistura racêmica do fármaco ibuprofeno (84), através da reação de esterificação usando lipase, que apresenta enantiosseletividade para a forma (*R*)-ibuprofeno. A enzima catalisa seletivamente a conversão para (*R*)-éster, deixando a forma (*S*)-ativa livre (Figura 5). Posteriormente, o ácido discriminado, (*S*)-ibuprofeno (84), pode ser separado do meio de reação através de extração ácido-base (CARVALHO *et al.*, 2005).

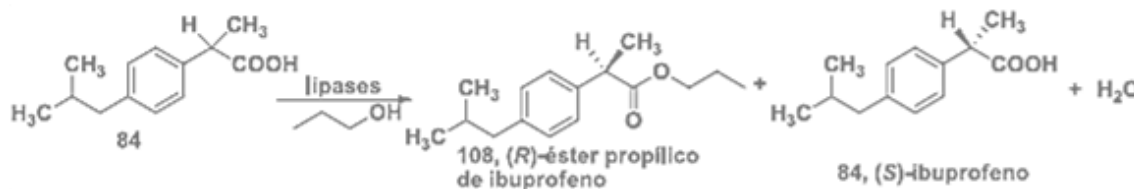


Figura 5. Esterificação enantiosseletiva do (R, S) -ibuprofeno 84 por lipases em meio de propanol, com enantiopreferência para o (R)-enantiômero.

Fonte: DIAS, F.R.F. *et al.*, 2012.

A maioria dos trabalhos estuda a resolução de ácidos 2-arylpropionico, um importante grupo de fármacos anti-inflamatório não esteroidais (DE CRESCENZO *et al.*, 2000; SAKAKI *et al.*, 2001), ou a resolução de ácidos 2-hidroxi carboxílicos, os quais são também importantes blocos de construção (SHELDON, 1993; SUNDHOLM e KANERVA, 1998). Outras aplicações seguem abaixo:

- CHEONG *et al.* (1996) pesquisaram as condições ótimas de reação para a síntese do sistano, um fungicida sistêmico, pela resolução com lipases. Foi selecionado um álcool primário quiral contendo um carbono quaternário como precursor para a resolução. Entre várias condições de reação, a transesterificação apresentou alta seletividade.

Ainda foi verificada uma melhora na seletividade quando a piridina foi utilizada como aditivo;

- A rapamicina, comercialmente disponível como Rapamune® (Wyeth), é um antibiótico que tem atividade antifúngica e antitumoral, além de ser utilizado no tratamento e prevenção de artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, inflamação pulmonar e outras. Neste caso, a lipase de *Pseudomonas* sp. é utilizada como método regioseletivo para obtenção de melhor rendimento do composto (BR PI 0509810-6 A2);
- A empresa americana Celltech Group utilizou a lipase de *Pseudomonas fluorescens* (SOLANO et al., 2012) na síntese de (1S, 4R)-1-acetoxi-4-(trifenilmetoximetil)-ciclopent-2-en-(composto(+)-3 da (Figura 6), um intermediário necessário na síntese do nucleosídeo similar ao Carbovir, um antiviral usado no tratamento da AIDS (EVANS et al., 1992);

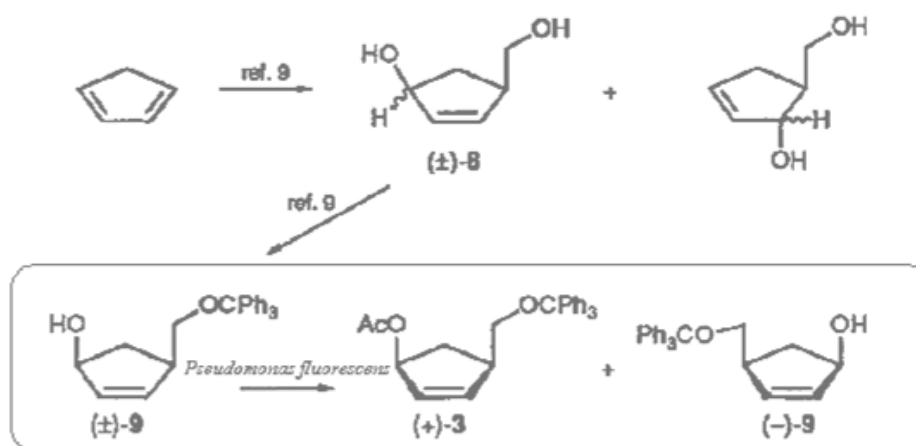


Figura 6. Reação enantiosseletiva de (±)-9 catalisada pela lipase de *Pseudomonas fluorescens*, utilizando acetato de vinila como agente acilante em 75h a temperatura ambiente.

Fonte: EVANS et al., 1992.

- Busto et al., (2012) utilizaram as lipases CALB, CAL-A e PSC (*Pseudomonas cepacia* atual *Burkholderia cepacia*) na resolução cinética de (±)-2,3,4,9-tetrahidro-1H-carbazol-3-ol, um intermediário da síntese de Ramatroban, substância ativa com potencial farmacológico, que é comercializado no Japão para tratamento de rinite alérgica e asma (Figura 7);

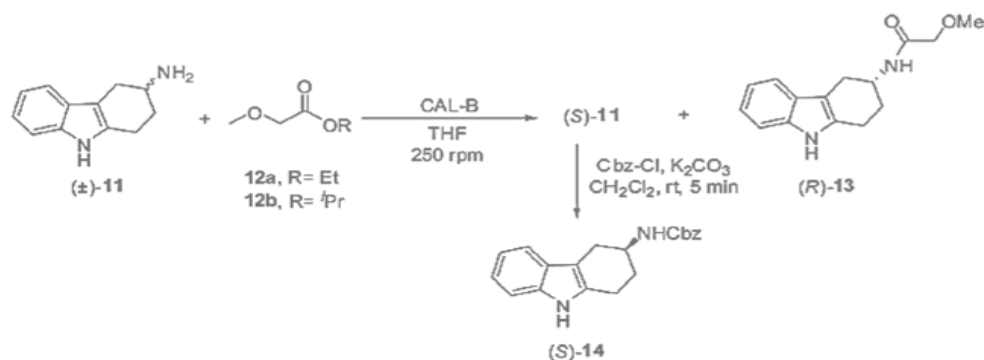


Figura 7. Resolução cinética de (±)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-3-ol catalisado por CALB utilizando acetato de vinila em THF a 250rpm.

Fonte: BUSTO *et al.*, 2012.

- CALB tem sido empregada na dessimetrização do composto proquiral dietil 3-(3', 4'-diclorofenil) glutarato para obter (S)-3-(3,4-diclorofenil)-5-etoxi-5-ácido oxopentanoico, um intermediário quiral na síntese do antagonista dos receptores de taquicinina, NK₁ e NK₂, compostos utilizados no tratamento contra asma, artrite e enxaqueca (HOMANN *et al.*, 2001);
- A resolução racêmica de 1-Ciclopropil-2-metoxietanamina (1) foi estudada por PARKER *et al.*, (2012) igualmente utilizando a CALB. Este intermediário é necessário para a síntese de um fator de libertação do hormônio corticotropina-1, receptor antagonista, mediador de resposta ao stress celular (Figura 8) (BORSODY e WEISS, 1996);

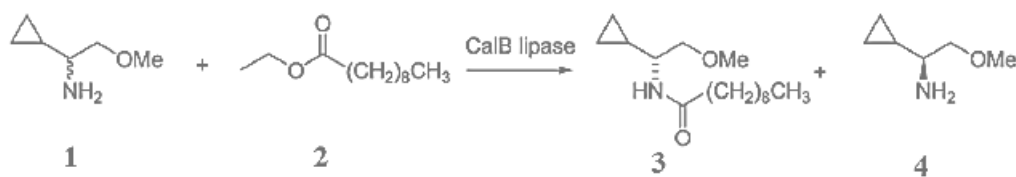


Figura 8. Resolução racêmica de (1) catalisado por CALB após 120h de reação.

Fonte: PARKER *et al.*, 2012.

- β-hidroxinitrilas quirais são comumente utilizados como intermediários utilizados em síntese orgânica. O isômero (R)-3-hidroxipentanitrila, por exemplo, é um importante intermediário na síntese do imunossupressivo inosina 5' monofosfo desidrogenase, no qual um excesso enantiomérico maior que 99% é requerido. A lipase de *Pseudomonas cepacia* tem sido empregada no melhoramento da atividade óptica do isômero ativo de interesse (Figura 9) (KAWANO *et al.*, 2012);

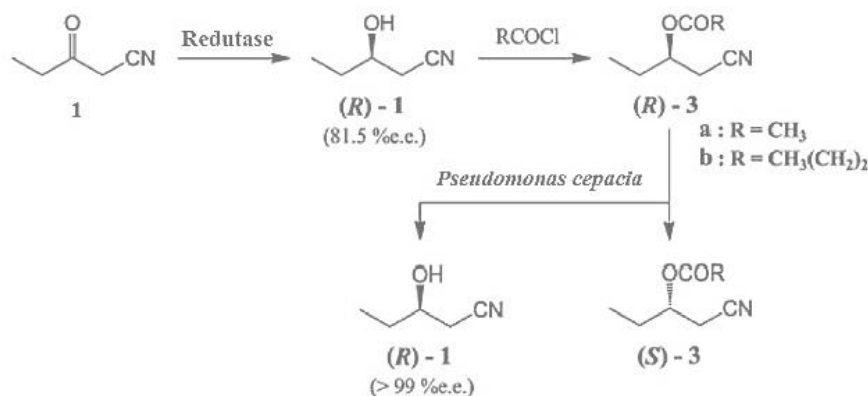


Figura 9. Síntese de (R)-1 e aperfeiçoamento da enantiosseletividade utilizando lipase de *Pseudomonas cepacia*.

Fonte: Modificado por KAWANO et al., 2012.

- A atividade de fármacos quirais como antidepressivos (Sertralina) e b-adrenérgicos (Nifenalol e Dicloroisoproterenol), reside principalmente em um dos enantiômeros (KAPOOR, 2005). Possíveis precursores para estes fármacos são compostos do tipo 2-halo-1-ariletanóis quirais que podem ser obtidos através da resolução cinética enzimática de uma mistura racêmica. Esta é uma das transformações mais comuns catalisadas por lipases sendo muito vantajosa, pois permite uma separação fácil dos dois enantiômeros através de uma única enzima (GHANEM e ABOUL-ENEIN, 2005).
- Os profenos (ácidos 2-aril propiônicos) são um importante grupo de anti-inflamatórios não esteroidais, que apresentam atividade farmacológica, principalmente na forma de (S) enantiômero. O naproxeno é um importante membro desta família, sendo que a forma (S) mostrou-se 28 vezes mais ativa do que o isômero (R). Recentemente, foi demonstrada a resolução enzimática do naproxeno racêmico utilizando lipases (SASAKI, GIORNO & DRIOLI, 2001). A produção do (S)-naproxeno foi realizada através da hidrólise seletiva da mistura racêmica do éster metílico do naproxeno. Para isto, foram utilizados dois tipos de lipases de *Candida rugosa* imobilizadas em um reator de membrana multifásico.

Além das resoluções, as hidrolases são capazes de realizar reações de dessimetriação. Como ocorre com os DKRs, isso é uma estratégia interessante para obtenção do enantiopuro desejado, teoricamente, com 100% de rendimento (GARCÍA-URDIALES *et al.*, 2011). A principal diferença reside no material de partida: um racemato é transformado em DKRs enquanto um composto meso ou pró-quiral é empregado em reações de dessimetriação.

A 2-piperidona é uma estrutura valiosa presente em muitos compostos bioativos, como citisina ou yaequinolona entre outros. Recentemente, a síntese de (R) -1-benzil-5-(hidroximetil) -2-piperidona foi alcançada, encontrando a acilação estereosseletiva de N-benzil-5-hidroxi-4-(hidroximetil) pentanamida como um passo chave na síntese (KHONG *et al.*, 2016). O (R) -monoacetato obtido é um precursor da piperidona desejada e, após o teste CAL-B, PSL, *Candida cylindracea* (CCL) e AK lipase, as últimas levaram às melhores seletividades (Figura 12).

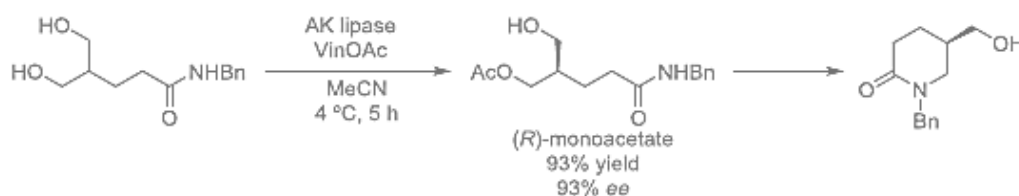


Figura 12. Dessimetriação de N-benzil-5-hidroxi-4-(hidroximetil)pentanamida através de acetilação catalisada por lipase.

Fonte: KHONG *et al.*, 2016.

Pesquisadores industriais desenvolveram a síntese de (R)-alil-[3-amino-2-(2-metilbenzil)propil]carbamato para apoiar estudos pré-clínicos e clínicos em um programa interno de descoberta de drogas utilizando Amano PS nas etapas enzimáticas (Figura 13) (LINDHAGEN *et al.*, 2016).

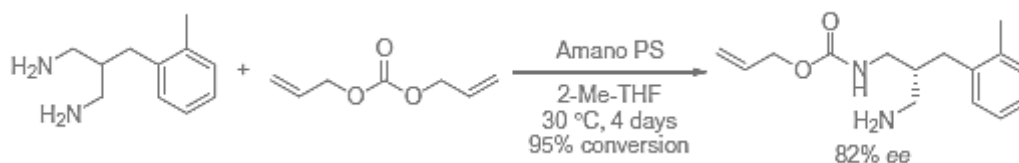


Figura 13. Dessimetriação catalisada por PSL de 2-(2-metilbenzil) propano-1,3-diamina.

Fonte: LINDHAGEN *et al.*, 2016.

3.3.5 Síntese de Compostos Nitrogenados

Lipases merecem destaque no processo de obtenção de compostos nitrogenados quirais e não quirais (Tabela 4) (SKUPINSKA *et al.*, 2003; SÁNCHEZ *et al.*, 2005; GÓTOR-FERNÁNDEZ *et al.*, 2006). Dentre as diversas aplicações de resolução de racemato, tem-se ainda a obtenção de aminas enantiomericamente puras uma vez que são blocos de construção de grande importância na indústria química, principalmente, na síntese assimétrica de compostos bioativos e medicamentos (BREUER *et al.*, 2004; KOSZELEWSKI *et al.*, 2010). A acilação enantiosseletiva catalisada por lipases de aminas quirais é um processo realizado numa escala de toneladas/ano (HIEBER e DITRICH, 2001). O melhor exemplo da aplicação em larga escala de lipases para resolução cinética de aminas tem sido demonstrado pela BASF (empresa

alemã), o qual é capaz de produzir em uma escala de toneladas (equivalente a 3000 toneladas ao ano) de amins quirais usando acilação catalisada por lipase e combinada com uma hidrólise básica da amida resultante (Figura 14) (NUGENT, 2010).

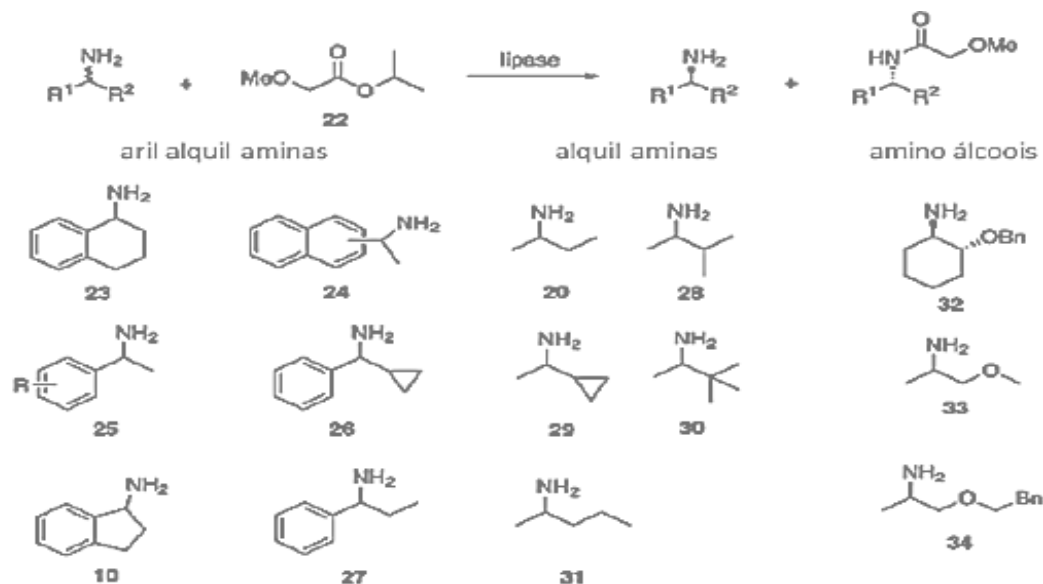


Figura 14. Processo BASF para a obtenção de uma variedade de amins quirais.

Fonte: NUGENT, 2010.

As lipases de *Candida sp.* e *Pseudomonas sp.* são as mais utilizadas em reações envolvendo amins (FABER, 1997). Na literatura são conhecidos vários procedimentos de resolução enantiomérica de compostos contendo a função orgânica amina, que fazem uso dessas enzimas (GONZÁLEZ-SABÍN *et al.*, 2002; IRIMESCU e KATO, 2004; PAETZOLD e BÄCKVALL, 2005). São apresentados a seguir alguns exemplos de diferentes substratos quirais contendo a função amina, que foram resolvidos utilizando esse tipo de biocatalisador, obtendo-se amins enantiomericamente puras de importância e seus possíveis precursores são:

- a (S)-anfetamina que tem atividade farmacológica mais pronunciada como estimulante e agente hipertérmico que o (R)-enantiômero; (CAMPOS *et al.*, 2000; NECHAB *et al.*, 2007);
- o (R,R)-formoterol, um potente bronco dilatador, tem como precursor a (R)-(p)-m
- etoxianfetamina que pode ser obtida através da resolução cinética enzimática (CAMPOS *et al.*, 2000), ou seja, moléculas isopropil amins β-substituídas podem ser resolvidas utilizando lipases de *Candida antarctica*. Os substratos utilizados foram a anfetamina e seus derivados, *orto*, *meta* e *para*-metóxi-anfetaminas. A existência do grupo metoxila nas posições *orto*, *meta* e *para* do anel aromático promoveu uma melhoria nos parâmetros de conversão e enantiosseletividade desse processo quando

comparado à molécula de anfetamina (GONZÁLEZ-SABÍN *et al.*, 2002), onde c é o percentual de conversão, E é enantiosseletividade e R o radical (Figura 15).

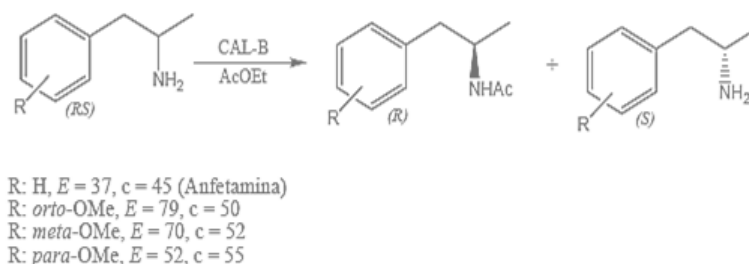


Figura 15. Resolução cinética enzimática de isopropil aminas β -substituídas.

Fonte: GONZÁLEZ-SABÍN *et al.*, 2002.

- a (R)-4-fenilbutan-2-amina é um precursor do anti-hipertensivo, dilevalol (CLIFTON, 1988). A (R)-4-fenilbutan-2-amina pode ser obtida enantiomericamente pura através da resolução cinética com CAL-B (NECHAB *et al.*, 2007);
- a (S)-1-fenil-1-propilamina é precursor de um potente agente antidepressivo (CORBETT, 2007);
- A (S)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naftilamina (amina comercial), utilizada na síntese da norsertalina. A norsertalina é estruturalmente semelhante à sertralina que atua no tratamento da depressão, como um seletivo inibidor da recaptação da serotonina (ISRS) (THALEN *et al.*, 2009).
- Por exemplo, o açúcar (+)-Artabotriol é um bloco de construção farmacêutico para a síntese de diversos produtos naturais enantiomericamente puros. O precursor deste açúcar, o (\pm)-2-hidroxi-3-metilenossuccinato, foi resolvido através de uma reação de acetilação usando o Lipase de *Pseudomonas cepacia* comercializada pela Amano (Amano PS) (Figura16) (BATWAL e ARGADE, 2016).

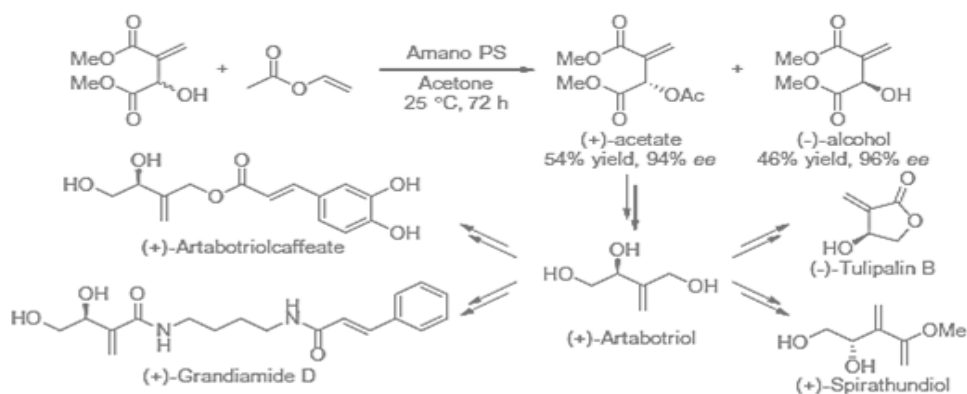


Figura 16. Resolução cinética catalisado por lipase do racemato dimetil-3-metilenossuccinato para a síntese de (+)-artabotriol e outros derivados.

Fonte: ALBARRÁN-VELO *et al.*, 2017.

- Atenolol é um β -bloqueador cardiosseletivo usado no tratamento da hipertensão arterial, angina e miocárdio infecções (Figura 17). Sua síntese estereosseletiva é de importância crucial porque a principal atividade reside no enantiômero (S), enquanto o enantiômero (R) tem efeitos adversos potenciais. *Candida antarctica* lipase B (CAL-B) apresentou excelentes níveis de atividade na resolução de dois precursores do Atenolol, o 2-[4-(3-cloro-2-hidroxipropoxi)fenil] acetamida (E=220) e 2-[4-(3 bromo-2-hidroxipropoxi)fenil] acetamida (E=278) (LUND *et al.*, 2016).

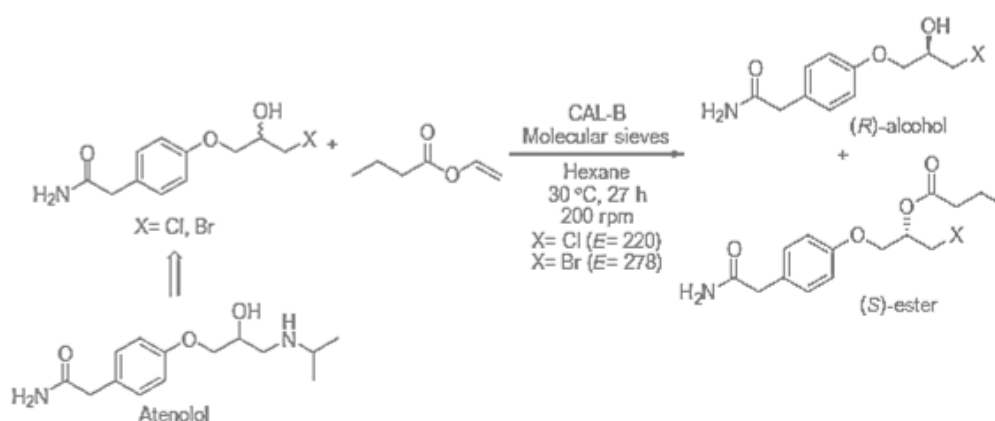


Figura 17. Resolução catalisada por CAL-B de precursores de Atenolol utilizando butanoato de vinilo como doador de acilo.

Fonte: ALBARRÁN-VELO *et al.*, 2017.

- A síntese quimioenzimática da droga antitussígena L-Cloperastina foi descrita, obtendo a resolução cinética do precursor fenil[4-(trimetilsilil)fenil]metanol como ponto chave para a introdução da quiralidade (Figura 18), portanto sendo bem sucedida usando lipase como catalisador (LEE *et al.*, 2015).

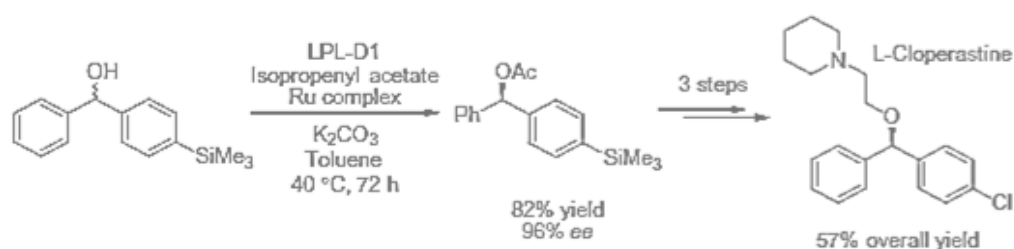


Figura 18. Resolução cinética de fenil [4- (trimetilsilil) fenil] metanol para a síntese quimioenzimática de L-Cloperastina.

Fonte: ALBARRÁN-VELO *et al.*, 2017.

- A moxifloxacina é uma fluoroquinolona que funciona como um agente antibacteriano, especialmente usado em infecções respiratórias como pneumonia, sinusite crônica e bronquite (Figura 19). Um precursor chave da Moxifloxacina foi preparado por resolução hidrolítica da cis-dimetil-1-acetilpiperidina-2,3-dicarboxilato usando CAL-B (RAMESH *et al.*, 2015).

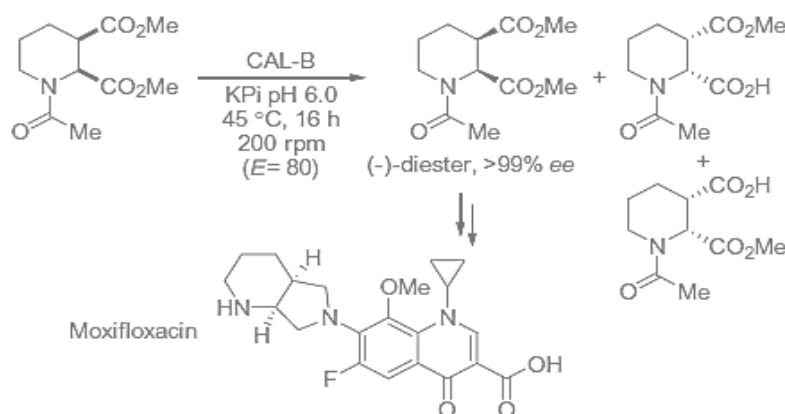


Figura 19. Resolução hidrolítica de cis-dimetil-1-acetilpiperidina 2,3-dicarboxilato para a síntese de Moxifloxacina.

Fonte: ALBARRÁN-VELO *et al.*, 2017.

- Aminoácidos e seus derivados, incluindo β - e γ -lactâmicos, são uma classe muito importante de compostos orgânicos devido às suas múltiplas aplicações em química medicinal. Uma reação chave é a abertura do anel lactâmico que é naturalmente catalisado por lactamases, embora as lipases também tenham sido aplicadas neste tipo de reação devido a excelente seletividade (Figuras 20 e 21) (GAO *et al.*, 2015; GALLA *et al.*, 2016).

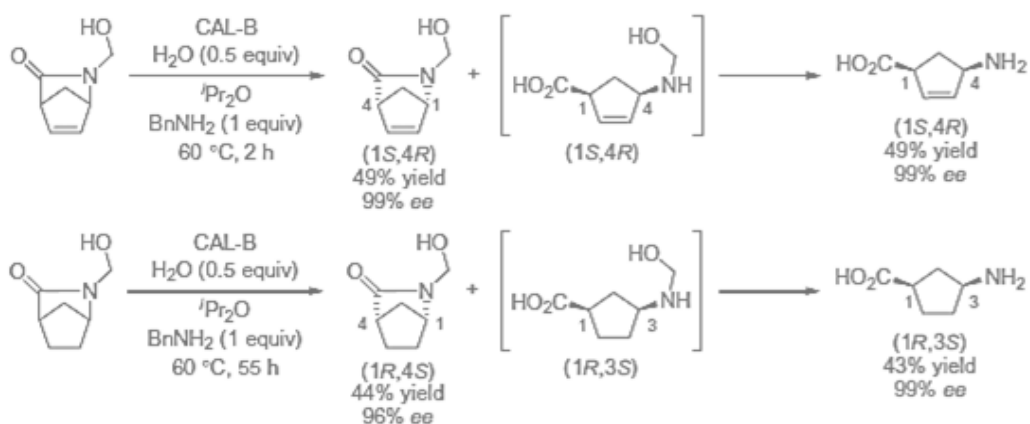


Figura 20. Resolução hidrolítica catalisada por CAL-B de γ -lactâmicos protegidos com o grupo N-hidroximetil com desproteção espontânea do produto aminoácido.

Fonte: ALBARRÁN-VELO *et al.*, 2017.

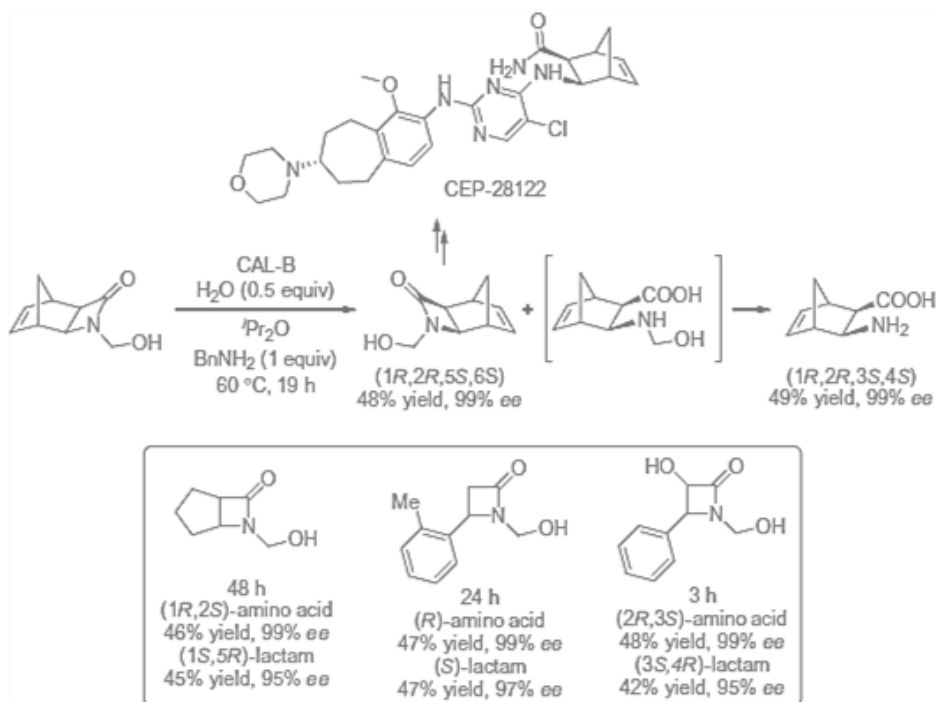


Figura 21. CAL-B catalisou a resolução hidrolítica de precursores β -lactâmicos de compostos farmacologicamente ativos protegidos com o grupo N-hidroximetilo.

Fonte: ALBARRÁN-VELO *et al.*, 2017.

Frente a esses exemplos, inferimos que lipases são excelente biocatalisadores para Resolução Cinética Enzimática (RCE) de aminas com diferentes estruturas químicas. Podemos observar, também, que as lipases de *Candida antarctica* (CAL) ocupam lugar de destaque na preparação de aminas quirais (FERNÁNDEZ, 2006; GÓTOR-FERNÁNDEZ, 2006).

3.3.6 Síntese De Ésteres

As lipases catalisam uma série de diferentes reações. Além de quebrar as ligações de éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ligações éster, a partir de um álcool e um ácido carboxílico (síntese de éster) (FERNANDES *et al.*, 2003; CASTRO *et al.*, 2004). Entre os possíveis processos catalisados pelas lipases em meio não-aquoso, a síntese de ésteres apresenta-se como uma vertente bastante promissora, conforme atestam os processos em fase de implantação industrial (Tabela 4) (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

Os ésteres são importantes compostos orgânicos com um número crescente de aplicações comercial, cuja produção pode ser por síntese química ou enzimática. A produção biotecnológica de ésteres utilizando lipases tem recebido grande atenção devido às condições de reações brandas (temperatura, pH e pressão) envolvidas, o elevado grau de pureza alcançado,

bem como a aceitação destes produtos na indústria de alimentos (MARTÍNEZ-RUIZ *et al.*, 2008). Ésteres de isoamila de ácidos graxos de cadeia curta são importantes componentes de “flavour” e fragrância amplamente utilizados em medicamentos.

Os ésteres de cadeia longa são muito utilizados na área farmacêutica e podem ser aplicados como surfactantes não-iônicos e emulsionantes (LORTIE, 1997; CHAMOULEAU *et al.*, 2001; CASTRO *et al.*, 2004; FERNANDES, 2007). Um dos principais exemplos se refere aos ésteres de ácido graxos de sacarose, por serem muito abundantes e são biodegradáveis. Estes surfactantes são capazes de interações específicas com outras moléculas quirais, tais como proteínas, ácidos nucleicos, e polissacarídeos e a exploração da especificidade quiral de grande importância na área farmacêutica (POLAT e LINHARDT, 2001; SZÜTS e SZABÓ-RÉVÉSZ, 2012). O processo consiste na esterificação de carboidratos (glicose, frutose, sacarose e sorbitol) com ácidos graxos (esteárico, oleico e linoleico) utilizando enzimas lipolíticas de fontes diferentes. Lipases também podem catalisar a síntese de ésteres de poliglicerol (VULFSON, 1994). Esses tipos de ésteres são ingredientes multifuncionais, também sendo usados como emulsificantes, substitutos de gorduras, como por exemplo, como meio de solubilização de vitaminas lipossolúveis para facilitar a incorporação destas em sistemas lipofóbicos (LIMA e NASSU, 1996).

Monoésteres de sacarose são compatíveis com a pele, provocam pouca ou nenhuma irritação, possibilitando sua inserção em preparações para a pele e cabelo, alguns exemplos incluem o estearato, oleato, palmitato, miristato e geralmente contêm 70% de monoésteres e 30% de di-, tri-, ésteres superiores. Esses compostos têm-se mostrado promissores como surfactantes, detergentes e emulsificantes quando comparados com o desempenho de outros compostos tensoativos (POLAT e LINHARDT, 2001; SZÜTS e SZABÓ-RÉVÉSZ, 2012).

Recentemente a síntese de Monoglicerídeos ou monoacilgliceróis (MAG) é catalisada por lipases tem sido estudada intensamente como alternativa ao método convencional (BORNSCHEUER, 1995). MAGs são basicamente monoésteres formados por ácidos graxos e glicerol, surfactantes não-iônicos, que possuem o status GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pela FDA (*Food and Drugs Administration*), sendo amplamente utilizados na indústria farmacêutica (SILVA *et al.*, 2003), por não apresentarem efeitos colaterais quando ingeridos ou irritações na pele, ao contrário dos tensoativos iônicos (MACHADO *et al.*, 2000), sendo utilizados como emolientes para emplastos, liberando lentamente a medicação (KAEWTHONG *et al.*, 2005). Monoglicerídeos como monocaprina possuem propriedades

antimicrobianas e, também, podem ser utilizados em emulsões no caso da monooleína e da monoestearina (FREITAS *et al.*, 2008).

Para minimizar a degradação térmica, o consumo de energia e processo a baixa pressão, o uso de lipase como biocatalisador constitui uma alternativa ao processo químico para a produção de ésteres de ácidos graxos (MERÇON *et al.*, 2000). Além disso, quando preparados por processos enzimáticos podem ser caracterizados como naturais ou idênticos ao natural sendo, portanto, preferidos pelo mercado consumidor (VULFSON, 1994). Aproximadamente 50 ésteres, formadores de aromas, foram sintetizados por reações catalisadas por lipases (LORTIE, 1997; YAHYA *et al.*, 1998). Os produtos resultantes de ácidos e álcoois de cadeia curta (2-8 átomos de carbono) são importantes componentes de aromas e flavorizantes utilizados nas indústrias de alimentos, bebidas, cosméticos e medicamentos. Os ésteres resultantes das reações entre ácidos de cadeia longa com álcoois de cadeia curta (2-8 átomos de carbono) são utilizados nas indústrias como aditivos em alimentos, detergentes, cosméticos e em medicamentos (GATFIELD, 1995; GÜVENÇA *et al.*, 2002). Os ésteres de sacarose, por exemplo, são conhecidos como bons emulsificantes na indústria farmacêutica (JANSSEN e HAAS, 1994; HAZARIKA *et al.*, 2002).

As lipases também podem ser usadas para modificação de antioxidantes, através da catalise seletiva destes compostos. Por exemplo, a vitamina C é um antioxidante, mas devido sua característica hidrofílica não pode ser usada para este fim em compostos hidrofóbicos. Este inconveniente pode ser solucionado através da esterificação dos grupos hidroxilas da vitamina C. A modificação química requer condições drásticas de temperatura e pressão, o que acarreta em uma mistura de produtos. A esterificação catalisada por lipase com ácidos graxos produz ésteres de vitamina C com propriedades antioxidantes promissoras (ADAMCZAK *et al.*, 2005).

A esterificação de ácido 2-cloro-butírico com 1,2-epóxi-5-hexeno catalisada por lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme® IM) foi estudada por Garcia e colaboradores (2000), para a produção de um éster, utilizado como intermediário na síntese de taxol, um fármaco anticâncer, alcançando conversões de até 85% dependendo das condições experimentais utilizadas.

Os ésteres de polietilenoglicol podem ser sintetizados quimicamente à altas temperaturas (140-250°C), com formação de subprodutos indesejáveis e podendo levar a obtenção de produtos com coloração escura e turva. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de processos menos agressivos e mais seguros, utilizando lipases como

catalisador (MAAG, 1984; CASTRO *et al.*, 2004). Os ésteres obtidos da reação de ácidos graxos e poliglicóis de alto peso molecular podem ser utilizados como surfactantes e/ou antiespumantes nas indústrias de alimentos, farmacêuticas e de especialidades químicas (CASTRO *et al.*, 1995).

Na Figura 22 o retinol ou vitamina A 105, uma substância importante para o crescimento e diferenciação das células epiteliais, foi submetido à reação de esterificação com succinato de metila 106, levando ao succinato de metil retinol 107, um carreador de ácido láctico (MAUGARD *et al.*, 2000; SOARES e DE SOUZA 2008). Nessa reação, foram utilizados diferentes tipos de lipases imobilizadas, como as lipases da *Candida antarctica* e do *Rhizomucor miehei* imobilizadas em resinas acrílica e aniônica Duolite 568N, respectivamente.

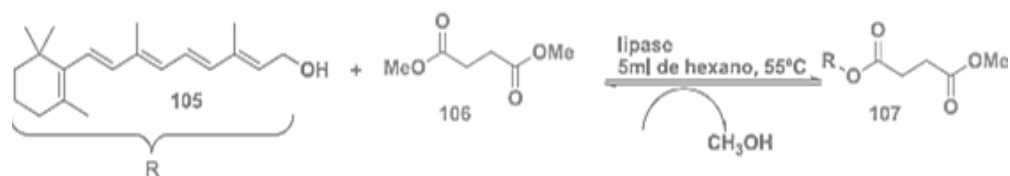


Figura 22. Esterificação do retinol 105 por enzima imobilizada.

Fonte: DIAS *et al.*, 2012.

Dependendo do tipo do doador de acila e do aceptor, as lipases contribuem para formação de lactonas sintéticas (Figura 23) o que constitui outra importante aplicação destas enzimas na indústria farmacêutica (MAKITA *et al.*, 1987; SUGAI *et al.*, 1990). Lactonas naturais (octalactinas), isoladas de *Streptomyces* apresentam atividade citotóxica contra células de melanoma e de tumor de cólon. Outras lactonas (nonanolídeos), isoladas de *Penicillium*, apresentam efeito inibitório sobre a síntese do colesterol (LONGO *et al.*, 2007).

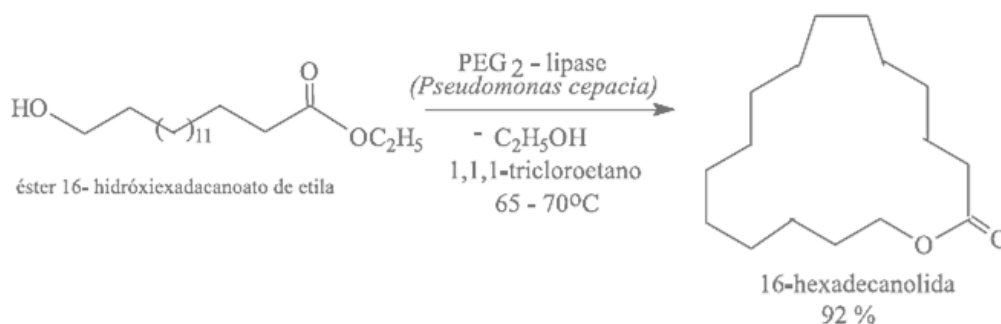


Figura 23. Síntese de lactonas com lipases modificadas.

Fonte: MATSUSHIMA *et al.*, 1996.

Embora o uso de solventes orgânicos na síntese de ésteres catalisada por lipases esteja bem difundida na literatura (SHELDON *et al.*, 2002), a eliminação de solventes é tecnicamente possível e oferece inúmeras vantagens, tais como: Obtenção de produções volumétricas mais elevadas, eliminação do custo adicional com solventes, separação facilitada dos produtos formados e pronto reciclo dos substratos não convertidos. Por outro lado, a ausência de um solvente diminui a viscosidade do sistema o que dificulta o controle e a determinação da influência dos vários parâmetros que afetam o processo (FREITAS, 2006; FORESTI *et al.*, 2007).

3.3.7 Síntese de Lipídeos Estruturados e Modificação de Óleos e Gorduras

As lipases são utilizadas como poderosas ferramentas na síntese de lipídios estruturados (Tabela 4), sendo estes triacilgliceróis contendo resíduos de ácidos graxos em posições específicas (JENNINGS e AKOH, 2001). A estruturação de lipídeos ou modificação de óleos ou gorduras tem sido catalisada por lipases regioespecíficas pela possibilidade de prever a alteração e planejar que tipo de modificação requerida no triacilglicerol, com a finalidade de melhorar as propriedades nutritivas ou reológicas do composto (CASTRO *et al.*, 2004; GHANDI *et al.*, 2000). São realizadas modificações na composição dos ácidos graxos e/ou na distribuição na molécula do glicerol. A obtenção de lipídios estruturados torna possível a melhora de suas propriedades nutritivas e farmacêuticas devido à estrutura molecular dos triacilgliceróis que influencia o metabolismo no organismo, assim como, suas características físicas. Lipases 1,3- específicas são utilizadas como catalisadores nestas reações onde existe a necessidade de modificações específicas na molécula do acilglicerol.

Nas últimas décadas, houve um crescente interesse em relação à tecnologia de modificação de óleos e gorduras, sendo esta tendência atribuída principalmente ao fato desses materiais serem obtidos de fontes naturais e empregados como matérias-primas importantes para as indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias (BARROS *et al.*, 2010; FREIRE e CASTILHO, 2008; CASTRO *et al.*, 2004). A estrutura básica dos óleos e gorduras naturais pode ser redesenhada através da modificação química dos ácidos graxos (hidrogenação), pela reversão da ligação éster (hidrólise) e pela reorganização dos ácidos graxos na cadeia principal do triacilglicerol (interesterificação) (CASTRO *et al.*, 2004).

Nos início do século XXI, surgiu um crescente interesse neste tipo de tecnologia, principalmente pelo fato desses materiais serem obtidos de fontes naturais e empregados como

importantes matérias-primas para as indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias (CARVALHO *et al.*, 2003). Desde então, existem alguns produtos comerciais que correspondem a triacilglicerois modificados por processos enzimáticos utilizando lipases. Por exemplo, o Salatrim®, um substituto de ácidos graxos (de baixa caloria), que é comercializado pela empresa Nabisco nos Estados Unidos e obtido por interesterificação enzimática de óleo de colza ou de soja hidrogenado com triacilglicerois de cadeias curtas como a triacetina ou a tributirina (CASTRO *et al.*, 2004; GHANDI *et al.*, 2000).

Os ácidos graxos polinsaturados são nutrientes essenciais para o desenvolvimento infantil, particularmente do cérebro e da retina. O leite materno se apresenta como a fonte pela qual o lactente ingere estes ácidos graxos poli-insaturados. No entanto, o teor de ácidos graxos essenciais do leite varia de acordo com a dieta materna, sendo assim, se torna importante a suplementação na dieta materna com esses ácidos graxos essenciais, que embora possam ser sintetizados pelo corpo humano apresentam grande eficiência se ingeridos por gestantes e lactantes (INNIS, 2004). Do mesmo modo, a empresa Loders-Croklaan, sucursal da Unilever nos Estados Unidos desenvolveu, baseado em gorduras vegetais, via interesterificação enzimática, com a finalidade de simular a distribuição de ácidos graxos da gordura do leite humano obtido por meio do uso de lipase 1,3 específica, pela reação de tripalmitina com ácidos graxos insaturados, formando um triglicerídeo rico em palmitato, a formulação infantil que é comercializada sob o nome comercial de Betapol® (substituto de leite materno) (GUNSTONE, 1999) e o Marinol®, um óleo enriquecido com ácidos graxos polinsaturados (CASTRO *et al.*, 2004; GHANDI *et al.*, 2000).

Ácidos graxos polinsaturados (AGPI) do tipo ômega-3, considerados essenciais ao organismo humano, os ácidos eicosapentanoico (EPA) e docosahexanoico (DHA) apresentam aplicações terapêuticas no tratamento de enfermidades inflamatórias, alérgicos (WHELAN, 1997; MASUEV, 1997), autoimunes (GANDHI,1997; MASSON *et al.*, 2000) e doenças cardiovasculares (DREVON, 1992; GUALLAR *et al.*, 1999; FREITAS *et al.*, 2008). Já o ácido alfa-linolênico, um importante produto nutricional (MUKHERJEE, 1990) é encontrados em alguns óleos como, por exemplo, óleo de borage, extraído da planta *Borago officinalis*, óleo de *Evening Primrose*, extraído da planta *Oenothera erythrosepala*, e óleo de peixe, entre outros. Os ácidos polinsaturados, presentes nestes óleos precisam ser extraídos seletivamente para serem empregados em aplicações médicas. Esta extração tem sido realizada utilizando lipases através de dois processos: (1) hidrólise seletiva do óleo ou (2) esterificação seletiva da mistura de ácidos graxos (GHANDI *et al.*, 2000). Devido aos efeitos metabólicos, os ácidos graxos

polinsaturados são cada vez mais utilizados como produtos farmacêuticos e nutracêuticos, estes últimos são alimentos ou parte deles que têm capacidade comprovada de trazer benefícios à saúde, como ácido linoléico, é uma das aplicações destes ácidos graxos, pois têm propriedades anticarcinogênicas e antiescleróticas (GILL e VALIVETY, 1997; GARCIA *et al.*, 1998; SEHANPUTRI e HILL, 1999; BELARBI *et al.*, 2000).

Lipases microbianas são utilizadas na obtenção de ácidos graxos polinsaturados a partir de lipídios animais e vegetais tais como óleo de savelha, atum e de borragem (*Borago officinalis L.*). Os ácidos graxos polinsaturados livres e os seus mono- e diglicerídeos são posteriormente utilizados na produção de uma variedade de produtos farmacêuticos, incluindo hipocolesterolêmicos, anti-inflamatórios, trombolíticos, antidepressivo, anti-hipertensivos e vasodilatadores (BELARBI *et al.*, 2000; HASAN *et al.*, 2006). Muitos desses ácidos graxos polinsaturados são essenciais na composição de membranas lipídicas das células de todo o organismo (MAUVERNAY *et al.*, 1970; KURITA-WATER, 1994).

As lipases têm um papel importante nos processos de interesterificação devido ao fato de serem seletivas em relação aos seus substratos e também serem catalisadores muito eficientes. Dessa forma, devido a possibilidade de utilização de enzimas que tenham ação somente nas posições *sn*-1 e *sn*-3 do triacilglicerol, pode-se obter como resultado gorduras com características especiais, pela troca de grupamentos acil somente nestas posições, o que não pode ser alcançado por via química. Adicionalmente, os processos químicos de interesterificação apresentam alto custo operacional, pois, para obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados, há elevado consumo energético (altas temperatura e pressão), geração de resíduos tóxicos e o produto de interesse é escuro e impuro, necessitando-se assim de etapas adicionais de purificação. (CARVALHO, 2003).

A interesterificação catalisada por lipase na síntese de lipídeos estruturados (LEs) é de grande interesse comercial, por ser o processo mais usado para a obtenção de óleos e gorduras, pois não altera a característica física dos ácidos graxos, principalmente devido às reações regioseletivas, produzindo gorduras com baixo teor em isômeros *trans*. LEs são triacilgliceróis reestruturados ou modificados pela mudança na composição de ácidos graxos e/ou sua distribuição na molécula de glicerol (GUNSTONE, 1999; IWASAKI e YAMANE, 2000; NEKLYUDOV e IVANKIN, 2002). Um importante uso destes verdadeiros lipídeos projetados é a ampla aplicação na indústria farmacêutica, sendo fontes de ácidos graxos específicos para fins terapêuticos ou nutricionais. Algumas vantagens medicinais têm sido relacionadas ao uso

de LEs, como aumento da função imunológica, não agressão ao tecido reticuloendotelial, diminuição do risco de câncer, ajuda na prevenção de trombose, diminuição de colesterol e aumento do balanço de nitrogênio (IWASAKI e YAMANE, 2000; NEKLYUDOV e IVANKIN, 2002).

Capítulo 4

4 Metodologia

4.1 Metodologia Proposta

A metodologia eleita para alcançar os objetivos desta dissertação é a análise patentária para a realização de um estudo prospectivo com o intuito de identificar possíveis novos rumos do setor de enzimas terapêuticas ou catalisadores enzimáticos utilizados na indústria farmacêutica. Para o desenvolvimento investigativo, a metodologia utilizada tem caráter exploratório-descritivo e natureza qualitativa (GIL, 2006). Portanto, foi realizada uma pesquisa bibliográfica com a finalidade de obter informações e dados a respeito do tema para compor a revisão de literatura.

Na área farmacêutica, basicamente existem três meios de incidência de direitos patentários, um pela patente de processos químicos, outro pela proteção do produto farmacêuticos *per se* e o terceiro pelas diversas composições e formulações para se chegar ao medicamento das quais estão descritas na Tabela 5. No caso desta dissertação, todas as patentes, independente do meio de incidência, foram consideradas e avaliadas.

Tabela 5. Meios de incidência de direitos patentário no Setor Farmacêutico.

<i>Patente de processo químico/bioquímico</i>	A patente diz respeito a forma de elaboração de um determinado intermediário ou produto, ou seja, as etapas de síntese, podendo estar detalhadas em forma de reações químicas, ou descritas no relatório descritivo, deste modo, podem existir várias patentes de processos para um único produto.
<i>Proteção do produto farmacêutico per se</i>	Neste caso, além do processo, protege-se o produto final do mesmo, ou seja, a fórmula química básica do fármaco (a molécula). Assim, torna-se indiferente a forma de obtenção do produto final, pois sempre será o mesmo, e logo protegido pela patente.
<i>Proteção da composição e/ou formulação</i>	Este tipo de proteção está relacionada ao medicamento, onde estão estabelecidas as faixas de concentração do ingrediente ativo bem como os adjuvantes.

Adaptado: FERNANDES, 2002.

A base de dados selecionada para a busca de informação tecnológica foi a *SciFinder*, disponível via portal CAPES. E, assim, os dados coletados passaram por tratamento quali- e quantitativo para que os resultados fossem analisados. Neste contexto, os documentos de patentes, apresentam-se como as fontes de informações tecnológicas mais completas e padronizadas internacionalmente ao longo do período temporal.

O SciFinder Scholar® utilizado como fonte de informação e captura de patentes neste trabalho, pertence ao CAS (Chemical Abstracts Service, a division of American Chemical Society) e disponibiliza os seguintes recursos:

- Pesquisa por substância química (incluindo reações e subestrutura), assuntos, palavras-chave, nome de autor, número de identificação de documentos e nome de companhias/organizações;
- Recursos para ordenação, análise e refinamento das buscas (tanto de referências quanto de reações);
- Pesquisa por citações (referências citadas) ou por área;
- Acesso ao texto completo dos documentos através do serviço *ChemPort*;
- Capacidade de visualização das estruturas em 3D;
- Acesso ao sumários/resumos de mais 1800 periódicos;
- Possibilidade de desenhar estrutura estereoquímica.

Para seleção das informações, existem filtros capazes de resgatar apenas aquelas constantes nas fontes de interesse. Uma grande vantagem dessa plataforma de busca é a possibilidade de efetuá-la utilizando o CAS RN (Chemical Abstracts Service, a division of American Chemical Society, Register Number) ou qualquer de suas sinónimas. As demais bases não possuem essa função, a busca teria que ser feita por palavra-chave, onde seria necessária a inclusão de todas as sinónimas da molécula associadas a palavras como “síntese”, “produção”, dentre outras (MENDES, 2014).

As informações do CAS estão divididas em 80 seções diferentes, onde cada seção de CAS abrange apenas uma ampla área de investigação científica. Os resumos são atribuídos a uma seção de acordo com a novidade do processo ou substância que está sendo relatada na literatura. Se um resumo pertence a uma seção (s) além daquela já atribuída, uma referência cruzada é estabelecida. Ao pesquisar on-line, você pode usar os códigos da seção (SC) apropriados como um termo de pesquisa para focar ou expandir um conjunto de respostas on-line. A lista das 80 seções individuais é coletada em cinco títulos amplos (biochemistry, organic chemistry, macromolecular chemistry, applied chemistry e physical/inorganic/analytical chemistry) ao acessar um desses títulos amplos, pode-se conhecer as descrições detalhadas de todas as seções contidas nesse tópico.

4.2 Estratégia de Busca de Patentes

A investigação de documentos de patente foi realizada através do endereço <http://scifinder.cas.org.>, apenas utilizando uma sinonímia das inúmeras existentes, isso porque a própria base de busca já seleciona automaticamente as 404 sinonímias, facilitando o processo, desta forma, o termo “lipase” (CAS 9001-62-1) foi adicionado ao campo “substance identifier” no período de 1997 a Junho de 2018, uma vez que, o período de vigência de uma patente de invenção é de 20 anos e, posteriormente, a mesma é lançada a divulgação. Assim, revelou-se características como o número CAS da substância, estrutura, sinônimos, nomenclatura, retornando, também, o número de referências e o número de reações em que a substância está envolvida, seja como produto, reagente ou intermediário. No Apêndice A é apresentado o conjunto de telas de recuperação dos documentos de interesse para análise. A recuperação se deu pelo ícone “get references” retornando 63.834 referências. Para seleção das informações, existem filtros capazes de resgatar apenas aquelas constantes nas fontes de interesse, no caso desta pesquisa, o documento eleito foi a patente. A opção “refine” permite escolher os recursos de refinar os resultados quando se está trabalhando com um conjunto de referências, no caso deste estudo, o refino foi efetuado de acordo com os seguinte critério, *Document Type* seguido de *Patent*, recuperando 16.988 patentes. No entanto, a estratégia elaborada não se restringiu quanto ao tipo de documento de patente, compilou-se dados de patentes de processo, de produto farmacêutico *per se* e de composição e/ou formulação. Já que o objetivo é recuperar documentos onde a lipase é utilizada tanto como catalisador em rotas biotecnológicas ou como proteína em formulações terapêuticas.

Na plataforma, existe a opção análise de referências que pode ser efetuada através dos termos indexados ou através do *CA Section Title* (Chemical Abstracts, a division of American Chemical Society, Section Title), esta última é uma forma mais rápida de refinar os resultados por área e, por esta razão, a *CA Section Title* foi a opção de escolha retornando 5.173 documentos de patente. Dos 98 termos, 19 classes foram selecionados os quais são exibidos na Figura 24 por ordem de frequência.

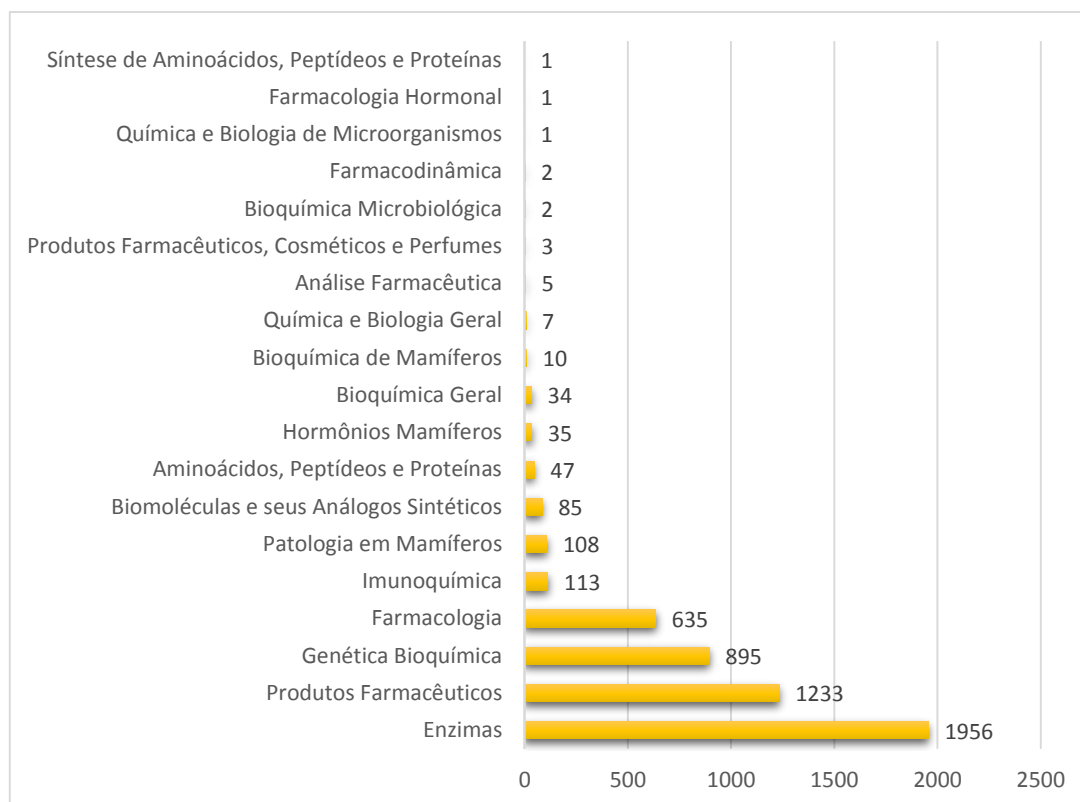


Figura 24. Número de documentos de patente por tópico selecionado através do sistema *CA Section Title* na base *SciFinder*.

Em seguida, a ferramenta “get reactions” foi selecionada para filtrar todas as reações envolvendo a substância alvo (seja como catalisador, reagente, produto), neste caso, a seleção foi realizada com intuito de capturar todas as substâncias onde a molécula alvo é citada, então, apresentou-se 260 documentos os quais foram analisados individualmente. Excluiu-se documentos não pertencentes à área farmacêutica e que não citavam a lipase como objeto de destaque, permanecendo processos em que as lipases são citadas como biocatalisador ou alvo terapêutico, deste modo, 56 processos foram selecionados e analisados integralmente para identificação da aplicação da lipase e das rotas de síntese (Apêndice B). O passo a passo da estratégia de busca realizada, encontra-se resumido na Figura 25 e ilustrada no Apêndice A, enquanto os respectivos resultados desta pesquisa estão compilados na Figura 26.

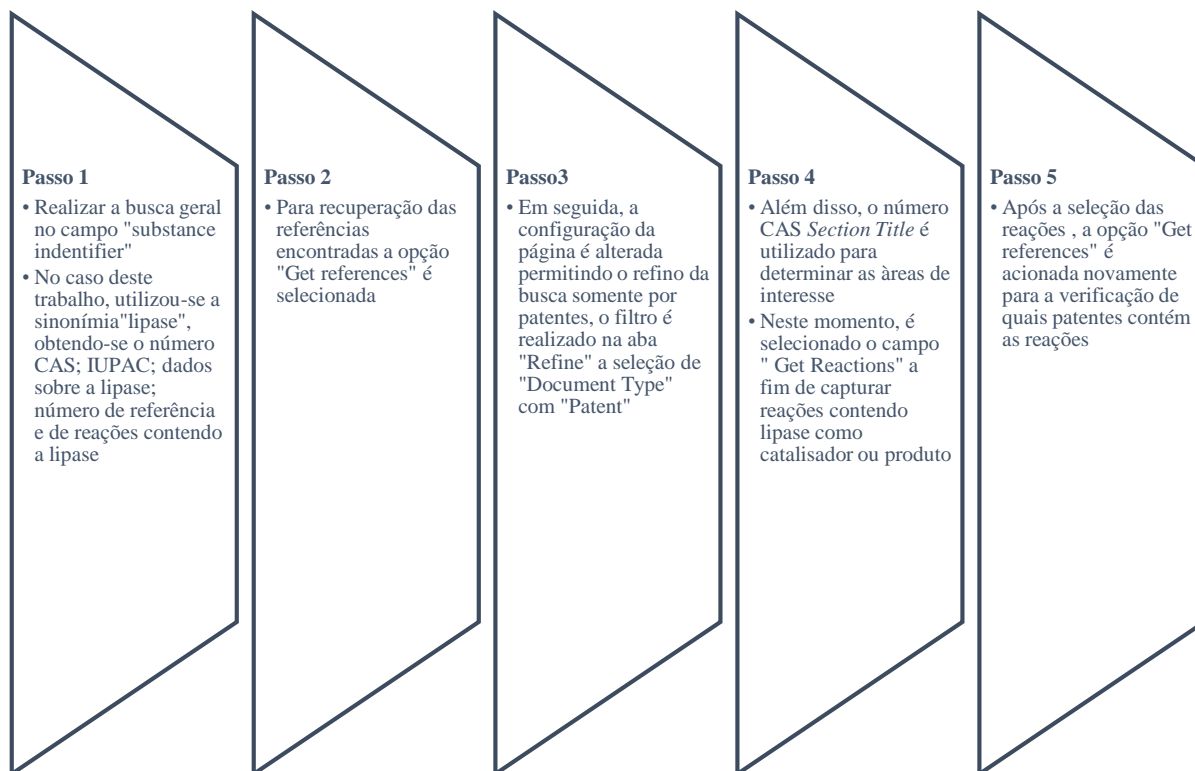


Figura 25. Passo a passo da busca por patentes contendo lipase como catalisador ou em produtos na base de dados SciFinder®.

Fonte: Própria, com base no *SciFinder* (1997-2018).

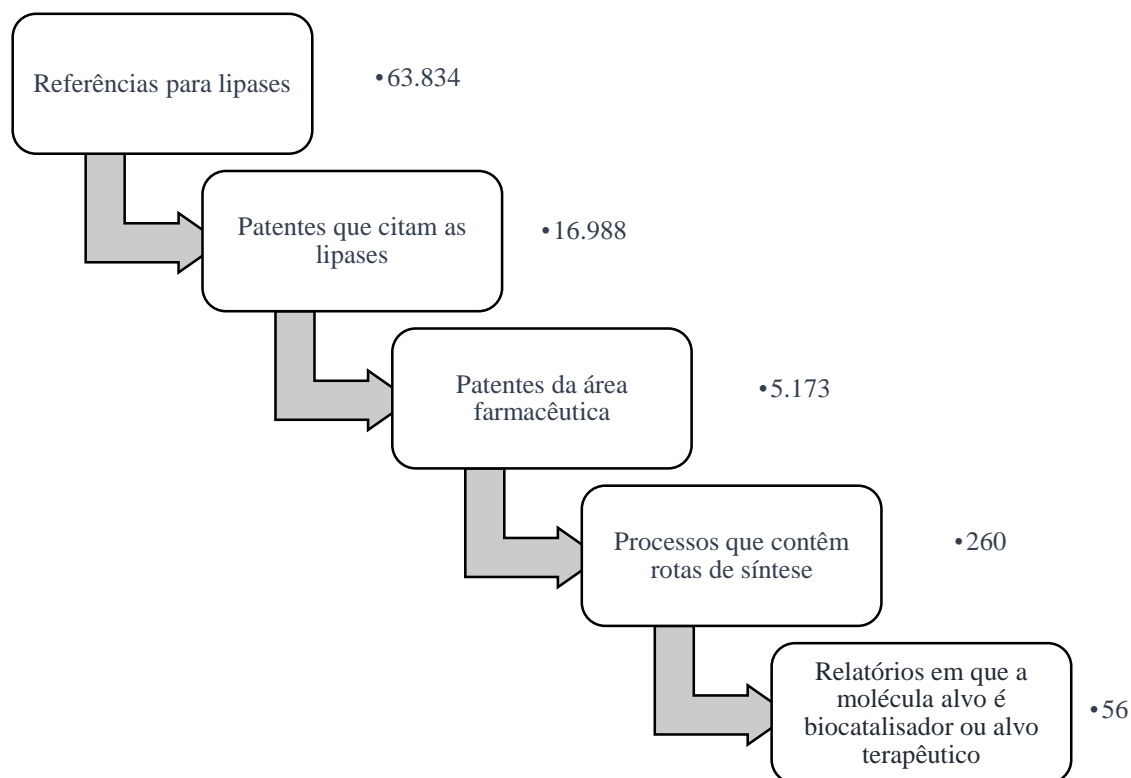


Figura 26. Resumo evolutivo da busca por patentes com rota de síntese contendo lipase.

Fonte: Própria, com base no *SciFinder* (1997-2018).

Capítulo 5

5 Resultados e Discussões

A Figura 27. demonstra a evolução temporal quanto aos depósitos de patentes, com destaque para os períodos de 2001, 2008 e 2012, onde se têm o maior número de processos, em contrapartida, o anos anteriores a 1990 não há documentos relatados e, de Janeiro à Junho de 2018 nenhum documento é descrito.

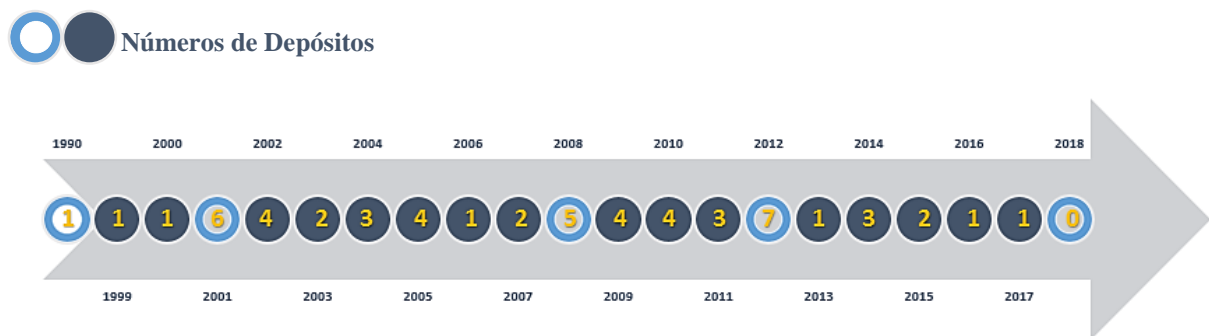


Figura 27. Evolução temporal dos depósitos de patentes.

Fonte: Própria, com base no *SciFinder* (1997-2018).

Após um extenso trabalho de análise do conteúdo dos 56 documentos de patentes selecionados (Apêndice B), observou-se uma clara distinção quanto ao objeto de estudo em relação as lipases, o que possibilitou a elaboração de uma classificação a fim de organizar e pormenorizar as informações coletadas nestes documentos. A classificação se dá através de três tipos de aplicações envolvendo a lipase, seguida de subclasses identificadas de acordo com a utilização específica da lipase relatada na patente, têm-se: lipase como alvo terapêutico, subclasse inibidores enzimáticos; lipase como biocatalisador, subclasses síntese de fármacos e seus intermediários ou na resolução de racematos com potencial farmacológico; lipase na síntese dirigida e planejamento de fármacos, subclasses ativação de pró-fármaco e otimização da formulação, assim, segue-se uma arte com as classes e respectivas subclasses (Figura 28).

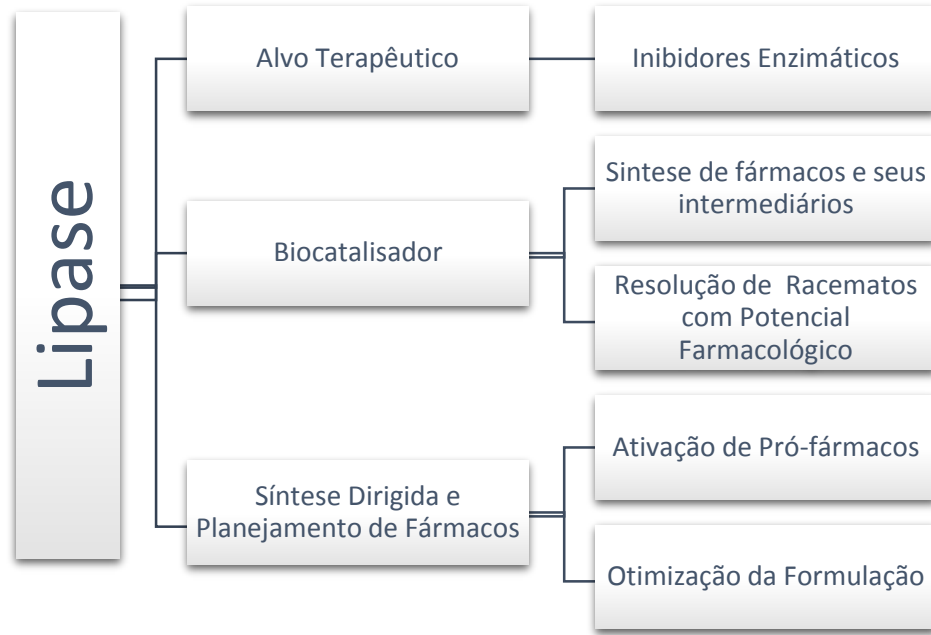


Figura 28. Classificação das patentes de acordo com o uso da lipase.

Fonte: Própria, a partir do *SciFinder*.

No Figura 29. é possível notar que o maior número de processos aborda a lipase como biocatalisador em reações de síntese e resolução de racematos, demonstrando a princípio que, a lipase tem atuado de forma efetiva na obtenção de moléculas bioativas, principalmente, na catálise de reações de síntese e resolução de fármacos e/ou seus intermediários. Outro motivo são as tecnologias alternativas que têm propiciado o surgimento de lipases com características diferenciadas e mais específicas afim de atender as perspectivas dos processos industriais, além disso, a imobilização e a utilização de solventes não aquosos têm facilitado o uso da lipase em processos de escala comercial. Em seguida, o uso da lipase em síntese dirigida se revela em maior número, por permitir o incremento de diversas estratégias no sentido de contornar limitações na formulação de medicamentos. E, das proteínas alvos para uso terapêutico, as enzimas são as mais promissoras para o planejamento de fármacos, com destaque para a lipase, onde a inibição da enzima vem sendo utilizada como vantagem terapêutica. Deste modo, o estudo infere a expansão da aplicação de lipases na área da biocatálise industrial e na produção de fármacos nos próximos anos.

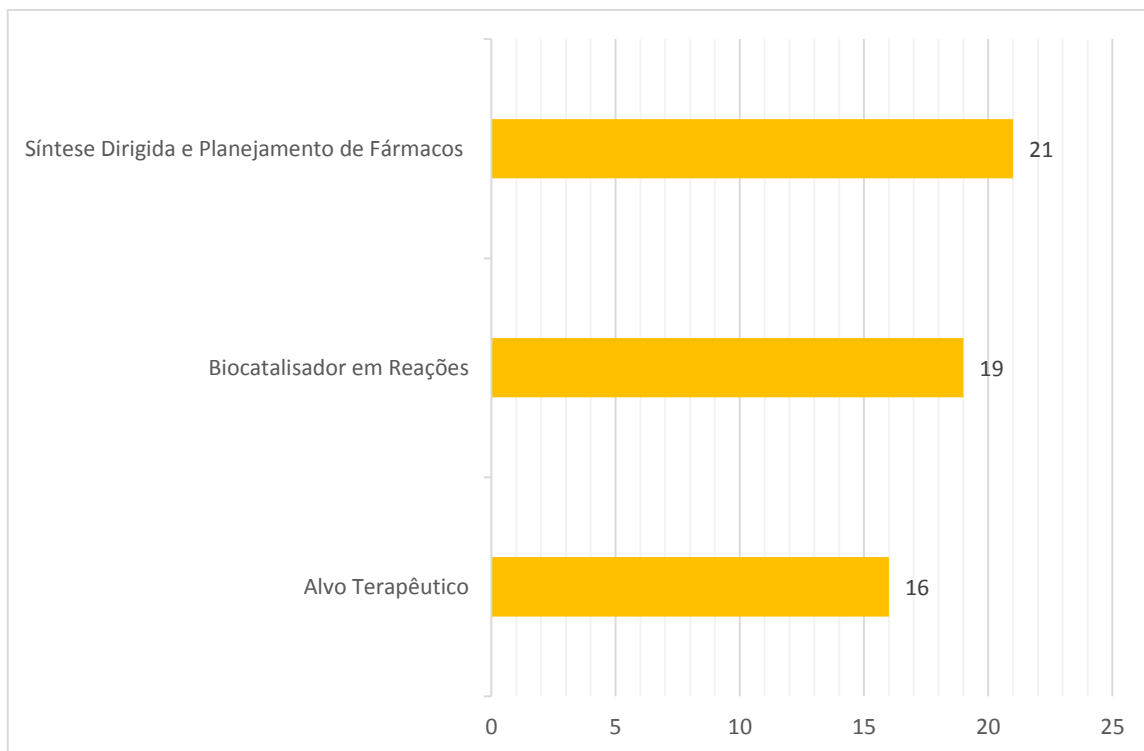


Figura 29. Uso geral da lipase observado em documentos de patente.

Fonte: Própria, com base no *SciFinder* (1997-2018).

A seguir são apresentados os resultados da análise dos depósitos de patentes.

5.1 Lipase como Alvo Terapêutico

De uma maneira geral os processos analisados em que a lipase é o alvo terapêutico, majoritariamente a lipase pancreática, uma enzima chave que faz um importante papel na absorção de gordura (triacilglicerol) têm o propósito de utilizar a enzima no tratamento da obesidade, arteriosclerose, hiperlipidemia, aterosclerose, hiperglicéridemia, dislipidemias. Para isso, o mecanismo abordado é a inibição da lipase pancreática, assim como, a inibição da lipase intestinal como novas estratégias para dificultar a absorção de gordura proveniente da dieta (US9328123 B2). O método de tratamento da obesidade é dividido de acordo com seus diferentes mecanismos como a supressão da lipase, a estimulação de gasto energético e regulação do metabolismo que envolve a absorção e o armazenamento de gordura induzida pela diferenciação do adipócito.

A enzima diacilglicerol lipase (DAGL) passou a ser a uma alternativa enzimática em relação ao controle dos níveis plasmáticos de lipídeos, da saciedade, resistência insulínica, obesidade, inflamação e síndrome metabólica e, por esse motivo, candidatos a fármacos têm sido desenhado para agirem na inibição dessa enzima. Além disso, outros benefícios foram descobertos em pacientes portadores de Alzheimer, Parkinson e obesidade (KOHNZ e NOMURA, 2014; IGLESIAS *et al.*, 2015; WO2013177492A2).

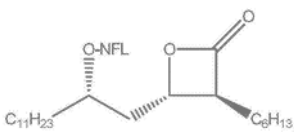
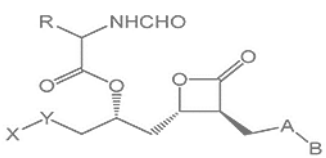
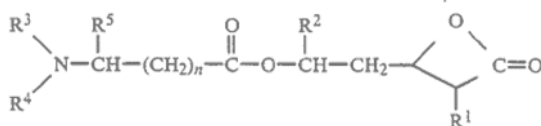
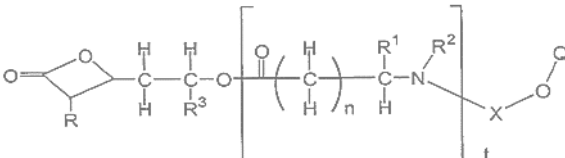
Os métodos farmacológicos para o tratamento da obesidade e outras doenças metabólicas se concentra em drogas que têm como objetivo diminuir a absorção de gordura ingerida, desta forma, o desenvolvimento e a aplicação de inibidores de lipase vem se mostrando eficaz nesse propósito (Tabela 6) (US9328123 B2). Apesar disso, existe uma necessidade de aprimorar os inibidores de lipase não absorvíveis, bem como de composições antiadiposidade e de métodos que não requeira uma dieta com baixo teor de gordura absoluta a fim de diminuir a absorção de gordura dietética como calorias.

As lactonas são excelentes intermediários sintéticos de medicamentos, sendo assim, Orlistat (Xenical®) é um forte agente anti-obesidade não absorvido pelo organismo com boa estabilidade e age como um potente inibidor da lipase pancreática. Este medicamento é um análogo sintético da lipstatina e a inibição da lipase pancreática ocorre devido a estrutura beta lactona contida na molécula. Este composto é clinicamente utilizado para o tratamento da obesidade reduzindo a ingestão de gordura oriunda das refeições. No entanto, gera sintomas intestinais muito intensos, como vômitos, distensão abdominal, diarreia e outras efeitos

colaterais. Portanto, a busca por novos inibidores da lipase pancreática tem implicações importantes para o tratamento da obesidade, diabetes e outras doenças metabólicas. Oxetanonas e seus derivados são conhecidos inibidores de lipase, no entanto, existe a necessidade do aprimoramento dessas moléculas a fim de diminuir a toxicidade e a absorção de gordura e óleos pelo sistema digestivo. No entanto, também são substancialmente ativos por via oral como imunossupressores (WO 2001032670 A1).

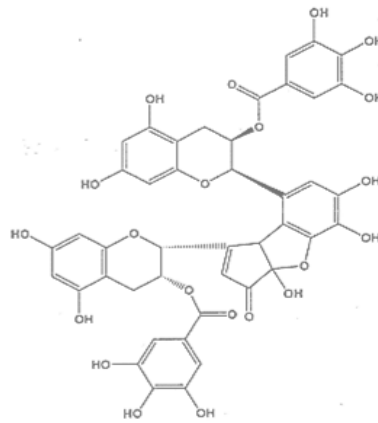
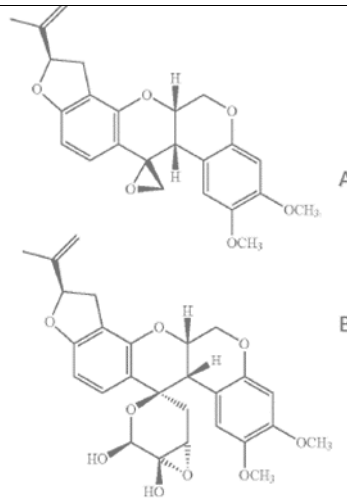
Derivados fenólicos como as catequinas são reconhecidamente inibidores de enzimas não específicos. As catequinas atuam dificultando o metabolismo lipídico através da inibição enzimática e são uma excelente alternativa para o tratamento da obesidade e distúrbios relacionados (CURIEL, 2011). Na forma não oxidada, reagem com proteínas através de ligações de hidrogênio e/ou ligações hidrofóbicas e quando oxidados formam ligações covalentes com alguns grupos funcionais específicos das proteínas inativando-a. Alguns grupos presentes na estrutura dos taninos e catequinas como grupos galato, também permitem estabelecer pontes entre diversas moléculas proteicas, diminuindo a sua flexibilidade estrutural e a capacidade de se movimentarem em solução tornando-as insolúveis podendo inclusive causar a sua precipitação. Esta diminuição de solubilidade pode ser responsável pela diminuição da atividade da lipase (BENEVIDES *et al.*, 2011).

Tabela 6. Inibidores de lipase.

Lactona		
Lipstatina e análogos		Patentes CN105738506A; WO2013177492A2*
		
Oxetanona e derivados		Patentes US6342519 B2; WO2001032616A2
		

Flavonoide

Catequinas

Patente
WO2005123725Derivados de Rotenona
(Rotenoisina A e B)Patente
US9328123B2

Polímero

Bromo
poliacetilenosPatente
CN102850208A

Fonte: Própria, a partir da base SciFinder.

*Única patente que descreve um inibidor da enzima diacilglicerol lipase, os demais descrevem inibição da lipase pancreática e/ou lipase intestinal.

Há um grande interesse em polifenóis que têm atividade inibidora da lipase foram relatadas: taninos derivado da casca de plantas; taninos, flavonoides e glicosídeos proveniente da *Cassia nomame*; alimentos inibidores da absorção de gordura contendo catequinas e epicatequinas, que são componentes principais do chá verde. (US20150038573 A1). Nestas circunstâncias, o desenvolvimento de alimentos saudáveis que são seguros e comprovadamente eficazes em humanos têm se mostrado como outra alternativa. Os materiais alimentares que suprimem a elevação do nível sérico de triglicerídeos após as refeições são comercializadas como alimentos saudáveis especificados: inibição da lipase pancreática, suprime a absorção de gordura pelo intestino; diacilglicerol, por possuir propriedades digestivas e absorptivas diferentes

do triacilglicerol; ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosaheptaenóico (DHA), que são purificados do óleo de peixe; e similar.

Rotenóides são flavonoides com grande variedade de características biológicas, principalmente as rotenonas e, podem ser encontrados na Família *Leguminosae*, que são bem conhecidas como isoflavonóides, especialmente nas espécies dos gêneros *Derris*, *Lonchocarpus*, *Tephrosia* das quais apresentam exemplares no Brasil. Estes metabolitos contêm tetrahidrocromeno, cromenos são metabólitos secundários caracterizados pela presença de um núcleo benzopirano (um anel benzeno fundido a um anel pirano). Essa classe de substâncias é importante do ponto de vista farmacológico por apresentar uma gama de atividades biológicas, incluindo antifúngica, antioxidante, antiparasitária, antibacteriana e antimalárico, além de ser um possível candidato a agente anticâncer, o que vem chamando atenção de pesquisadores. Relatórios recentes provaram que derivados de rotenona isolados e identificados por gama-irradiação não apresenta citotoxicidade, mas têm excelente atividade inibidora da lipase pancreática e da diferenciação de adipócitos, em comparação com o composto de matricial, portanto, derivados da rotenona poderiam ser usados efetivamente para a prevenção e tratamento da obesidade (US9328123 B2).

A partir do desenvolvimento e utilização de recursos biológicos marinhos com o intuito de encontrar produtos naturais marinhos com atividade biológica e perspectivas de processo farmacêutico, descobriu-se o extrato bruto de *Xestospongia testudinaria* o qual tem atividade inibitória significativa contra a lipase pancreática. Mais estudos de acompanhamento da atividade biológica levaram à descoberta de compostos bioativos bromopoliacetilênico. Esses compostos são responsáveis pela inibição da lipase pancreática e, conseqüentemente, a redução da absorção de gordura bem como menores níveis de triglicérides no soro (CN102850208 A).

A combinação de polímeros com inibidores de lipase maximiza a produção de gordura não absorvida e, portanto, aumenta a incorporação de toxinas na gordura não absorvida que é transportada para as fezes. A absorção reduzida e a excreção aumentada de toxinas lipofílicas dependem da presença de gorduras e óleos não absorvidos na luz intestinal. A gordura não absorvida pode ser apresentada ao intestino pela inibição da lipase pancreática. Inibidores de lipase produzem gorduras e óleos não digeridos no intestino que, por sua vez, dissolve e acelera a eliminação de toxinas lipofílicas. Outro benefício da associação de inibidores de lipase com polímeros é a diminuição de efeitos colaterais causados pelos inibidores (WO2002074343 A2).

Como pode-se observar, as lipases têm gerado interesse na indústria farmacêutica e isso não é recente. É uma enzima importante no processo de digestão e absorção de lipídeos e, por esta razão, pesquisas com o objetivo de promover a inibição da lipase, aprimoramento de formulações e até mesmo de moléculas tem ganhado força.

5.2 Lipase, Planejamento de Fármacos e Síntese Dirigida

O sistema de liberação controlada é uma tecnologia chave que proporciona ganhos econômicos incomparáveis ao desenvolvimento de novos medicamentos. O planejamento de fármacos busca o aperfeiçoamento e eficiência dos medicamentos, melhorando a qualidade e adesão do paciente ao tratamento. Numa tentativa de abordar a necessidade de melhorar biodisponibilidade, diversas tecnologias de modulação de liberação de drogas foram desenvolvidas. Revestimentos entéricos têm sido usados como protetor de produtos farmacêuticos no estômago, microcápsulas, microesferas, lipossomas ou polissacarídeos têm sido eficazes na redução da degradação enzimática do agente ativo. Sistemas de liberação controlada podem ser projetados para utilizar porções químicas que são especificamente reconhecidas por transportadores especializados ou induzir a seleção das células alvo através de uma sequência polipeptídica específica. Como exemplo, a técnica de solubilização de fármacos pouco solúveis destinada a promoção da absorção de um fármaco, é uma das principais técnicas do sistema de liberação controlada considerada a maneira mais razoável de reduzir os custos do desenvolvimento de novas drogas ao mesmo tempo que se traduz em uma forma de agregar valor aos medicamentos que já se encontram no mercado.

Outro ponto importante que pode ser alcançado pela síntese dirigida e pelo planejamento de fármacos é o potencial de contornar os efeitos indesejáveis promovidos pela droga, apresentando os agentes terapêuticos como pró-fármacos. Pró-fármacos são moléculas capazes de serem convertidas em drogas (compostos terapêuticos ativos) *in vivo* por certas modificações químicas ou enzimáticas em suas estruturas. Para efeitos de redução da toxicidade, esta conversão deve ser direcionada ao sítio de ação ou ao tecido alvo (US 20020142955 A1). A utilização de pró-fármacos para conferir características como biodisponibilidade ou especificidade aumentada de fármacos é um conceito reconhecido no estado da técnica do desenvolvimento farmacocinético.

Os pró-fármacos são muitas vezes caracterizados por uma baixa estabilidade no sangue e no soro, onde contêm enzimas que degradam ou ativam os pró-fármacos antes que atinjam os locais alvo no organismo. Um dos objetivos específicos das invenções é o aprimoramento de

pró-fármacos para que possam apresentar alta especificidade, toxicidade reduzida e maior estabilidade no sangue e no soro (US 20020142955 A1). Portanto, ainda existe a necessidade de um sistema que permita o uso de novas composições moleculares, que possam reduzir as despesas técnicas, regulamentares e financeiras e os riscos associados aos agentes ativos, melhorando o desempenho do mesmo em termos de absorção e estabilidade. É necessário o desenvolvimento de métodos e formulações que solucionem problemas associados a liberação de agentes terapêuticos, assim como, proteínas com funções terapêuticas, principalmente, com o intuito de manter a atividade catalítica, proteger o agente terapêutico da ação proveniente do ácido gástrico e da degradação causada pela protease, facilitar a absorção do agente terapêutico, além de ser biocompatível e não apresentar toxicidade (WO2015127347 A1).

Um dos maiores desafios é desenvolver um sistema de liberação controlada autônomo o qual possa determinar e garantir a quantidade de droga a ser liberada em resposta a um estímulo biológico em uma concentração terapêuticamente relevante. Além disso, um sistema auto ajustável a flutuações geradas no organismo (geralmente reflexo do processo inflamatório local), variabilidade de paciente para paciente e fatores externos (WO2012040623 A2).

5.2.1 Ativação de pró-fármacos

As enzimas podem promover a hidrólise sem destruir o substrato ou o produto e, por isso, têm-se investido no desenvolvimento de hidrolases para serem utilizadas nos processos de síntese dirigida e planejamento de fármacos de diversas formas. As enzimas candidatas mais utilizadas para promover a ativação de pró-fármacos incluem lipases, proteases ou glicosidases. As lipases geralmente são utilizadas na forma imobilizada, de acordo com a maior parte dos documentos de patente analisados (Figura 30) (US20020142955 A1).

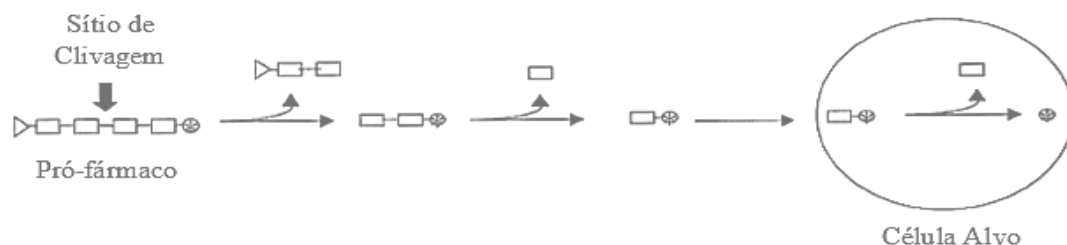


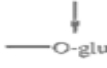
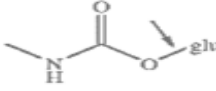
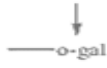
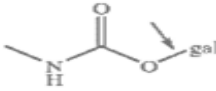
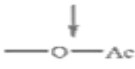
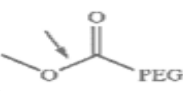
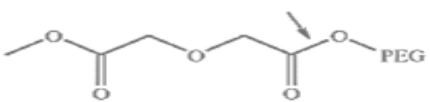
Figura 30. Mecanismo de clivagem pela lipase de um pró-fármaco utilizado no tratamento de tumores.

Adaptado de: Pt.US20020142955A1.

Sítios específicos de clivagem são aqueles os quais podem ser clivados ou reduzidos por uma enzima, então a porção “T” pode compreender qualquer uma das partes desencadeadoras que quando ativados por um agente especificado são capazes de iniciar uma reação de rearranjo

espontânea que promove a fragmentação do composto e, seguidamente, a liberação da fração fluorescente ou da fração hidrofílica. Por exemplo, “T” pode incluir um site de clivagem que é reconhecido e clivado por uma enzima de clivagem, tal como uma lipase (Tabela 7) (US20060003383 A1).

Tabela 7. Locais de clivagem "T", enzimas de clivagem e grupos de ligação.

CLEAVAGE SITE	CLEAVAGE SITE WITH OPTIONAL LINKAGE GROUP	CLEAVING ENZYME
		β -glucuronidase
		β -galactosidase
		lipase/esterase
		lipase/esterase

Fonte: Pt. US20060003383 A1.

Muitos agentes terapêuticos, como antraciclinas e alcalóides de vinca, utilizados no tratamento contra o câncer, frequentemente, acabam por gerar toxicidade aguda na medula óssea e mucosa, bem como toxicidade cardíaca crônica, no caso das antraciclinas e, toxicidade neurológica crônica, no caso dos alcalóides da Vinca. Do mesmo modo, o metotrexato pode ser usado para o tratamento de reações inflamatórias, tais como doenças reumáticas, mas a alta toxicidade limita suas aplicações. Por esse motivo o desenvolvimento de agentes antitumorais e anti-inflamatórios mais específicos e mais seguros é necessário para maior efetividade contra células tumorais e uma diminuição no número e na gravidade dos efeitos colaterais causados por esses medicamentos (toxicidade, destruição de células não tumorais, etc.) (US 20020142955 A1).

Um pró-fármaco utilizado no tratamento de seborreia é preparado com agentes antifúngico e antibacteriano no qual a lipase é um importante componente deste conjugado, ilustrados nas Figuras 31 e 32 (US9907812 B2).

Antifungal Agent-Carrier Conjugates as Prodrugs

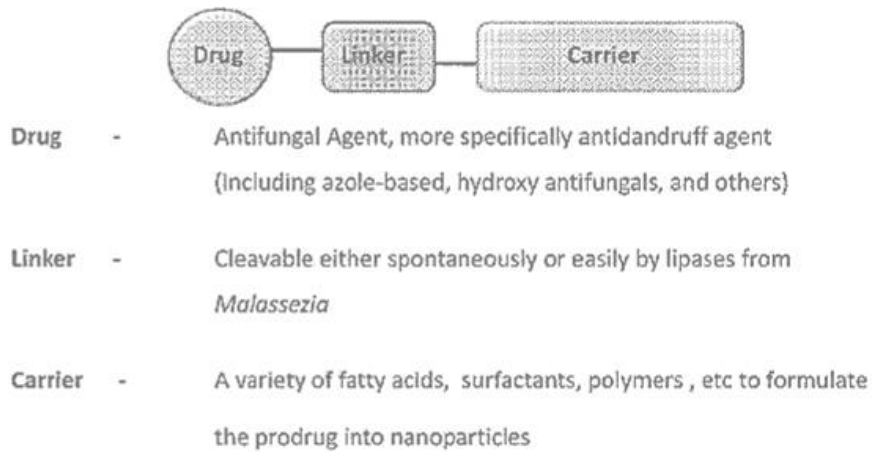


Figura 31. Conjugação de pró-fármacos.

Adaptado de: Pt. US9907812B2.

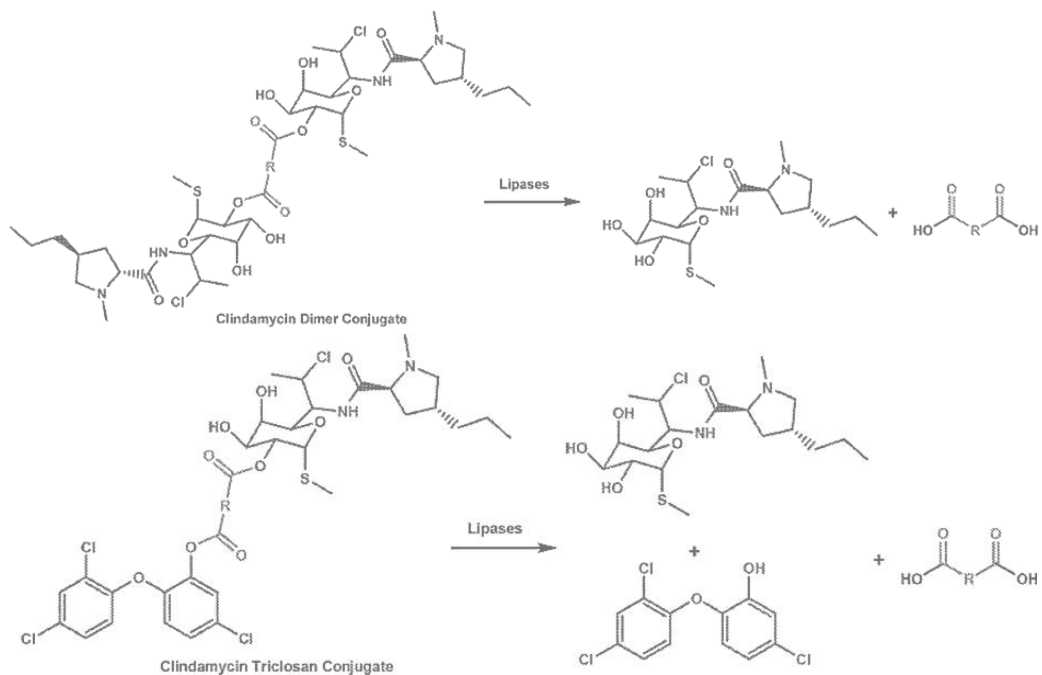


Figura 32. Exemplos da ação da lipase sob conjugados compreendendo um ácido dicarboxílico como ligante são mostrados.

Adaptado de: Pt. US9907812B2.

Acredita-se que muitas das doenças mais prevalentes em humanos, incluindo isquemia, acidente vascular cerebral, epilepsia, asma e alergias, estejam relacionadas com o fenômeno de hiperexcitação celular, um termo aqui utilizado para designar atividade enzimática intracelular supranormal. A inibição enzimática como visto no subtítulo anterior desta dissertação também têm sido usada para impedir a degradação por enzimas. Uma outra forma de ação é selecionar

células doentes caracterizadas por hiperatividade enzimática como alvo, de modo a introduzir uma molécula farmacologicamente ativa na forma de um pró-fármaco na célula e a própria hiperatividade enzimática agir sobre o pró-fármaco promovendo o acúmulo da molécula farmacologicamente ativa no interior das células doentes. Diferentes condições patológicas onde há sistemas enzimáticos significativamente elevados a nível intracelular, podem ser usados para promoção da liberação preferencial do composto ativo dentro das células doentes. E, ainda, tem-se a possibilidade do surgimento de pró-fármacos com potencial de acumulação preferencial do ativo dentro das células alvo, através da ativação de lipases intracelulares. A título de exemplo, em muitas doenças, as membranas celulares são degradadas devido à atividade anormal da lipase intracelular.

Uma outra abordagem mencionada nos documentos de patentes analisados com o objetivo de elaborar um sistema de liberação controlada de fármaco eficaz, fundamenta-se através da resposta inflamatória, mais especificamente, à expressão local de enzimas as quais se correlacionam com o nível de inflamação local. Condições inflamatórias caracterizadas pela geração de enzimas que destroem tecido conjuntivo extracelular, tal como ocorre na artrite reumatoide, na cicatrização de feridas, câncer, doença ocular, doença gastrointestinal e doença cardiovascular conferem aplicabilidade da técnica descrita.

As composições em cadeia de hidrogel podem ser realizadas de várias formas físicas, incluindo micropartículas, nanopartículas, revestimentos e filmes. Tais composições são comumente usados na prática clínica e na medicina experimental, incluindo engenharia de tecidual e medicina regenerativa, medicina diagnóstica, imobilização celular, separação de biomoléculas ou células. As composições de hidrogel são de grande interesse devido ao alto teor de água e biocompatibilidade.

A lipase promove a clivagem enzimática que, por conseguinte, desarranja a cadeia de fibras do gel em questão, agenciando a liberação do agente terapêutico bem como o acúmulo do mesmo no local de ação. No entanto, as porções do gel que não são clivadas permanecem estáveis até que outro estímulo inflamatório seja fornecido. Este fenômeno pode ser referido como “liberação sob demanda”, onde o nível de inflamação regula a quantidade e o tempo de liberação de um agente (Figura 33). Em algumas formas de realização, as composições em gel podem ser úteis para libertar agentes terapêuticos que se correlacionam com diferentes estágios de regeneração tecidual.

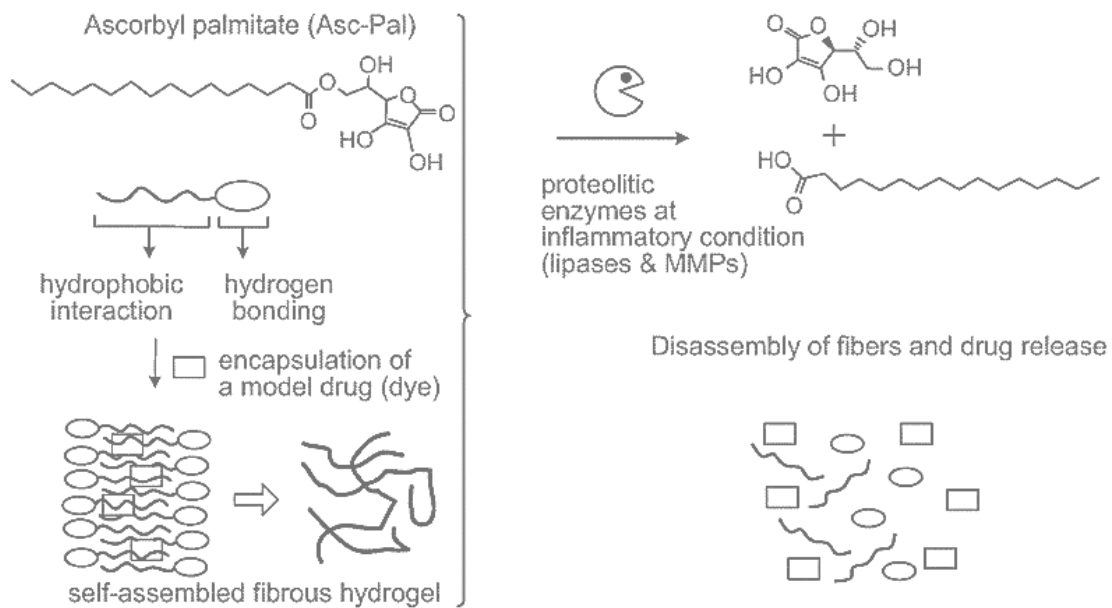


Figura 33. Representação gráfica de uma composição de gel em cadeia para encapsulação de agentes terapêuticos.

Adaptado de: Pt. WO2012040623 A2

Em particular, na área farmacêutica, a nanocápsula tem o potencial de ser variadamente utilizada na terapia dirigida contra o câncer, na administração de medicamentos, na absorção transdérmica e como agente contraste em exames de imagens. Por conseguinte, o involucro proteico pode ser o alvo em si, ou pode ser uma proteína ligada a um outro antígeno, anticorpo, ligante ou receptor alvo. Nesse caso, é possível direcionar o medicamento contido para o local desejado. Além disso, quando utilizado como composição para imagiologia, é desejável que a proteína que compõe o involucro proteico seja a própria proteína alvo ou uma proteína à qual outro antígeno, anticorpo, ligante ou receptor alvo esteja ligado, em para que seja especificamente movido para o tecido a ser fotografado, como um sistema de entrega de drogas.

Porfissomas são nanovesículas biocompatíveis formadas a partir de conjugados de porfirina fosfolipídica multifuncional aplicável em imagiologia e terapia biofotônica (terapias a laser, LED, fototerapia, técnica recentemente utilizada na esterilização de órgãos a serem transplantados).

Fosfolipídios com cadeias laterais de porfirinas formar conjugado de porfirinas fosfolipídica, uma nova classe de opticamente ativa de nanovesículas, no entanto, tal procedimento gera regioisômeros (sn-1 e sn-2) ilustrados na Figura 34. Neste caso, a lipoproteína é isomericamente purificada através de seleção enzimática, onde identificou-se que

a fosfolipase A2 (proveniente do veneno da abelha, PLA2HBV) cliva seletivamente o conjugado lipídico de porfirina sn-1 e a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (uma espécie de fungo termofílico) clivar seletivamente o conjugado lipídico de porfirina sn-2. Ambos os regioisômeros purificados geram nanovesículas de porfisoma. Os porfisomas conjugados com sn-2 agem como agentes fototérmicos eficazes contra tumores *in vivo*.

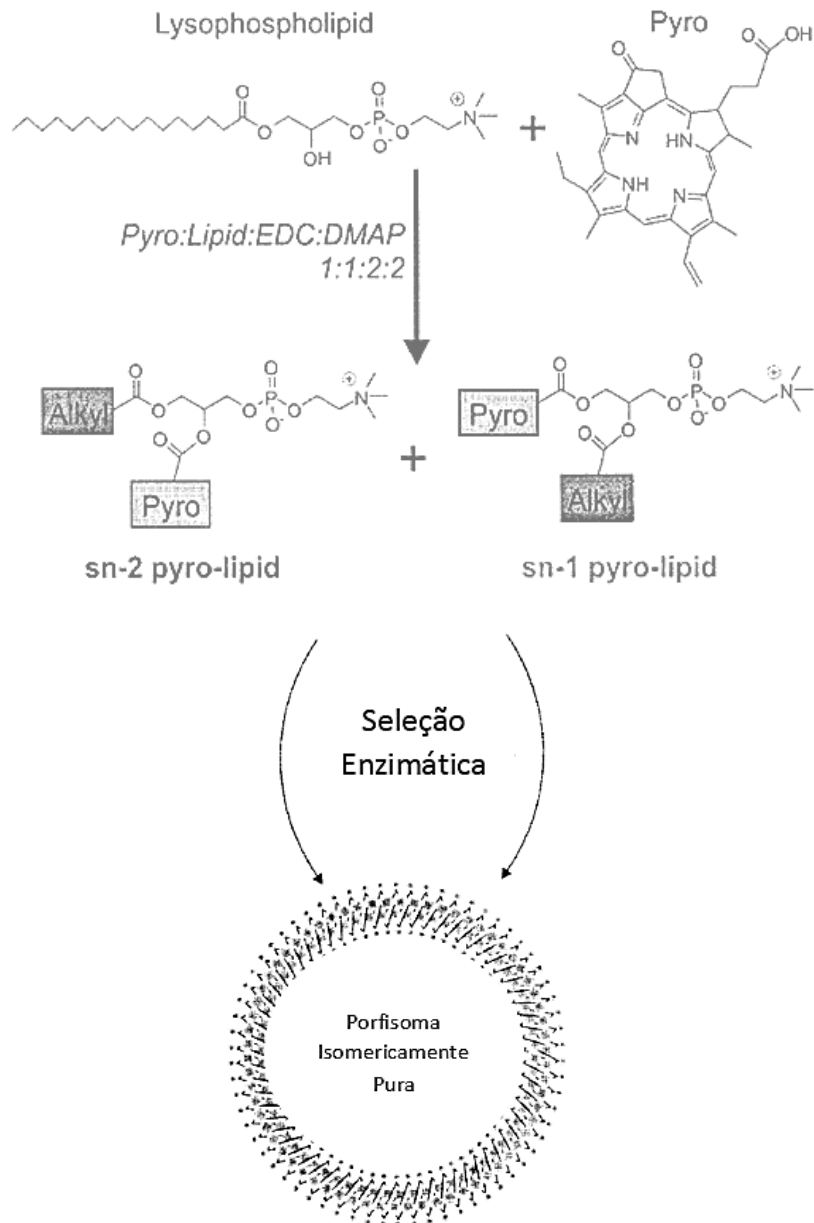


Figura 34. Representação esquemática de um porfisoma a partir dos isômeros conjugados de porfirina-fosfolipídica.

Adaptado de: Pt. WO2012167350 A1

5.2.2 Otimização da Formulação

A estrutura proteica pode tanto desempenhar o papel de um sistema de distribuição como o de uma proteína funcional atuando em ligação específica, catalítica, sensor e outros. Podem atuar em um sistema de distribuição de componentes ativos (componente fisiologicamente ativo, fármaco, enzima e outros) por exemplo, como nanoestruturas proteicas, dependendo da seleção estrutural do carreador proteico (Figura 35).

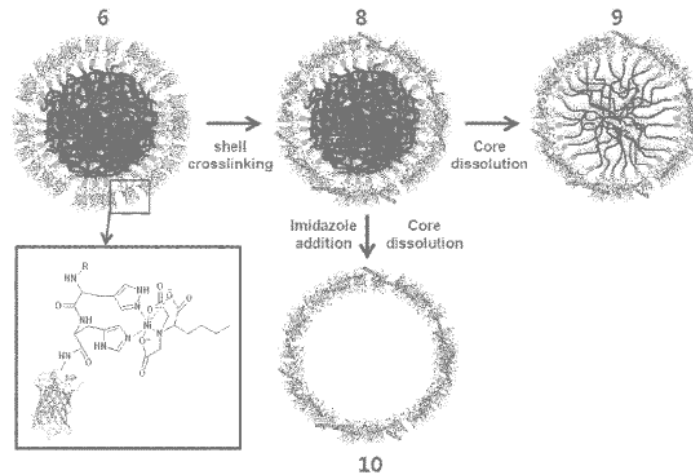


Figura 35. Diagrama esquemático de uma estrutura proteica desenvolvida como sistema dirigido de fármacos, incluindo o transporte de enzimas.

Adaptado de: Pt. WO2014148713 A1

Desenvolvimentos em engenharia genética aumentaram a estabilidade ao ponto de proteínas, peptídeos, enzimas e derivados possam ser utilizados no campo biomédico e terapêutico. A administração dessas moléculas apresenta vários problemas e limitações. A maioria das drogas proteicas é pouco absorvida pelas membranas biológicas devido a uma combinação de fatores como tamanho molecular, natureza hidrofílica, ionicidade, alta carga superficial, instabilidade química e enzimática e baixa permeabilidade através das membranas mucosas. Após a administração intravenosa, as moléculas de proteína apresentam uma depuração sanguínea, e considerável sensibilidade a enzimas proteolíticas, já a administração oral apresenta a desvantagem de baixa biodisponibilidade. Existem várias abordagens para o uso terapêutico, como aumentar a dosagem ou usar promotores de absorção ou utilizar rotas de administração alternativas que podem causar toxicidade. Vários sistemas para transporte de enzimas e proteínas foram desenvolvidos, tais como nano e micropartículas, lipossomas e hidrogéis. O transporte em um sistema de partículas pode proteger as proteínas da quebra, modificar a farmacocinética e melhorar sua estabilidade *in vivo* (US9757342 B2).

A utilização de vários lipídios na preparação de tipos particulares de pró-fármacos é uma técnica muito utilizada. Fosfolipídios modificados, têm-se mostrado úteis em diversas aplicações biotecnológicas, principalmente no direcionamento de ácidos nucleicos (lipídios catiônicos), no diagnóstico por imagem (lipídios radioisótopos quelados), no estudo e rastreamento de fenômenos biológicos (lipídios fluorescentes), na modulação farmacocinética (lipídios PEGilados) e estrutural (lipídeos polimerizados). Nos últimos anos, fosfolipídios modificados com colesterol, ácido retinóico e cadeias laterais de porfirina foram desenvolvidos especificamente para atuar como sistema de liberação controlada em aplicações imunológicas e biofotônicas (WO2012167350 A1). Esta abordagem é exemplificada no caso dos pró-fármacos de fosfolipídios de salicilatos e fármacos anti-inflamatórios não esteroidais divulgados no documento WO 91/16920 que, por via oral, protegem a mucosa gástrica e o ativo é liberado no intestino. Noutros exemplos de pró-fármacos de fosfolipídios, utiliza-se lipossomas ou outras estruturas micelares que possuem a característica de permitir a absorção preferencial, por exemplo por macrófagos, como no caso dos conjugados de fosfolipídios de fármacos antivirais divulgados em WO 90 / 00555 e WO 93/00910 (US6413949 B1)

Há uma necessidade de novas classes de moléculas que não sejam tóxicas, eficientes e que tenham meias-vidas razoáveis dentro das células para terem melhor aplicabilidade. Tais moléculas podem potencialmente ser utilizadas para distribuir agentes tais como ácidos nucleicos, por exemplo, para utilização em terapia química, gênica ou imagiologia. Por isso, novas classes de fosfolipídeos fluorados não tóxicos estão sendo avaliados para serem utilizados em sistemas de transporte de agentes em células vivas. Os compostos de fosfolipídeos fluorados possuem hidrofobicidade e afinidade aumentadas para as membranas em relação aos lipídios não fluorados. Os compostos fosfolipídicos fluorados podem entrar nas células por mecanismos de endocitose. Em algumas formas de realização, os compostos fosfolipídicos fluorados têm propriedades que distribuem agentes para o citoplasma e/ou membranas de células vivas, evitando ou minimizando a distribuição dos agentes nos núcleos das células, em contraste com outros tipos de agentes de distribuição lipofílicos (WO2009042972 A1).

Noutros casos, são utilizados tipos específicos de lipídios polares no direcionamento de pró-fármacos para organelas intracelulares, como no caso dos antivirais e antineoplásicos divulgados nas Patentes U.S. Nos. No. 5,149,794. Foram também utilizados tipos adicionais de lipídios em tipos específicos de pró-fármacos, tais como EP A-325160, que revela ésteres de glicerina como inibidores da ECA (enzima conversora de angiotensina), que formam micelas absorvidas no intestino para o sistema linfático, evitando depuração hepática e absorção não

específica, aumentando o acesso ao sistema nervoso central utilizado no tratamento da hipertensão e disfunção cognitiva. Os inibidores da ECA sofrem clivagem enzimática e exercem efeitos terapêuticos extracelularmente. Outros tipos de veículos lipofílicos que facilitam o transporte intracelular conhecidos no estado da arte é o saliciloil-carnitina para o tratamento da dor. No entanto, é comum que infecções virais não sejam associadas as atividades da fosfolipase supranormal e conjugados de fosfolipídios antivirais não sejam relacionados à ativação de drogas, preferencialmente, nas células doentes ou nas células infectadas, como no caso dos conjugados fosfolipídicos antivirais divulgados em WO 90/00555, WO 90/10448 e em NTIS Technical Notes, no. 9, página 630, Springfield, Va., EUA, 1984 (US 20010007865 A1).

Os lisossomos possuem mais de 50 hidrolases ácidas, enzimas com atividade proteica particular, envolvidas na degradação de macromoléculas das células, entre elas encontra-se a lipase ácida. A maioria das doenças lisossomais é causada pela presença de mutações patogênicas nas hidrolases ácidas. Tais enzimas são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso, transportadas para o complexo de Golgi, onde recebem resíduos manose-6-fosfato (marcadores) que permitem o direcionamento das mesmas até o lisossomo. Algumas enzimas lisossômicas podem ser secretadas e endocitadas por outras células, fenômeno que é a base para algumas estratégias de tratamento deste grupo de doenças como a terapia de reposição enzimática (TRE) e o transplante de medula óssea (TMO) (WO2011034951 A2).

Existem tecnologias atuais para produzir formas de absorção elevadas de enzimas lisossomais que contenha resíduos de manose-6-fosfato, que são reconhecidos pelos receptores de manose-6-fosfato. Este método permite o direcionamento de enzimas aos lisossomos e está sendo usado clinicamente para o tratamento de doenças de armazenamento lisossomal, distúrbios congênitos da glicosilação e distúrbios metabólicos caracterizados pela ausência ou atividade reduzida de enzimas no citoplasma. Outra abordagem, que está em desenvolvimento, é o uso de transportadores peptídicos guanidilados.

Documentos de patente fornecem novas aplicações farmacêuticas de veículos de transporte e direcionamento de enzimas, o que compreende a conjugação da molécula bioativa (lipase ácida) com um ou dois guanidinoglicosídeos (complexo guanidino-neomicina, Figura 36) que, em seguida, é transportada para o interior da célula por meio de receptores proteoglicanos, pois são os receptores mais abundantes localizados na superfície da célula o que garante a eficácia do sistema (WO2011034951 A2).

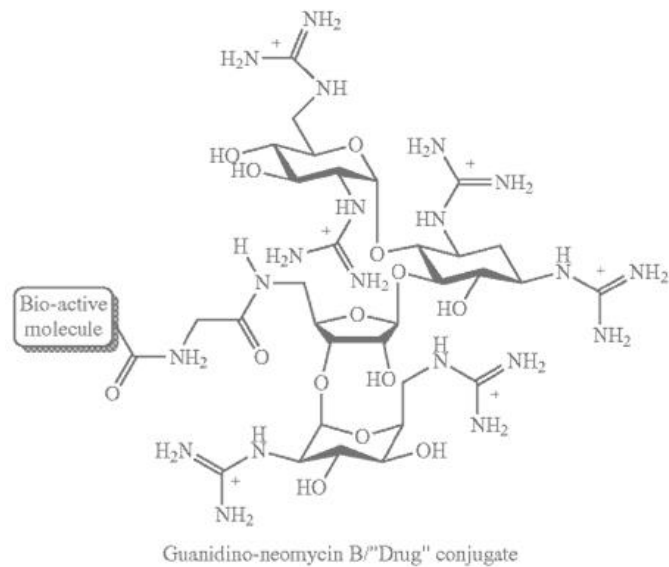


Figura 36. Exemplo de um transportador conjugado com uma enzima.

Adaptado de: Pt. WO2011034951 A2.

As moléculas quiméricas atuam tipicamente de modo "estequiométrico". Isto é, cada molécula quimérica é essencialmente consumida pela interação com o seu "substrato", prejudicando a atividade da molécula em reações subsequentes. Como consequência, as moléculas quiméricas devem ser mantidas a um nível relativamente elevado para terem eficácia terapêutica, o que é um problema recorrente em aplicações *in vivo*, já que há a incapacidade de manter níveis séricos elevados da molécula quimérica durante períodos de tempo terapêuticamente significativos o que gera toxicidade não específica aumentada causada pelas altas dosagens que devem ser utilizadas. As tentativas para resolver estes problemas focaram-se na redução da imunogenicidade da quimera (por exemplo, utilizando anticorpos humanizados, fragmentos de anticorpo, pequenas proteínas de fusão, etc.) ou "mascaramento" da molécula quimérica (por exemplo, lipossomas "furtivos"). Após administração intravenosa, lipossomas convencionais são rapidamente capturados pelo sistema fagocitário mononuclear. Para evitar essa captura, lipossomas furtivos foram desenvolvidos, os quais apresentam a superfície modificada com componentes hidrofílicos. Para permitir a liberação seletiva do fármaco nos sítios alvos, além disso, ligantes de reconhecimento específico são conjugados na superfície do lipossoma (WO200064485 A2).

O uso de proteínas, peptídeos e polinucleotídeos como DNA e RNA na terapia ou na medicina preventiva é limitado porque eles são geralmente impermeáveis através de várias barreiras biológicas (por exemplo, barreira hematoencefálica (BHE) e barreiras de membrana do sistema circulatório, trato intestinal, pele e pulmões) e sensíveis a enzimas proteolíticas, não sobrevivendo assim à passagem do local de administração para o local de ação. Estas limitações

resultam em farmacocinética (PK) insatisfatória, impedindo ou limitando o uso no tratamento de doenças neurológicas e outros tipos de doença. Muitas drogas e moléculas biologicamente ativas não podem penetrar na BHE e, portanto, requerem administração direta no tecido do SNC (sistema nervoso central) ou no líquido cefalorraquidiano (LCR) para se obter um efeito biológico ou terapêutico. Mesmo a administração direta num local particular do SNC é frequentemente limitada devido à fraca difusão do agente ativo devido à absorção/adsorção local na matriz do SNC. Modalidades como administração de fármacos através do BHE implicam na ruptura da própria BHE por meios osmóticos (soluções hiperosmóticas) ou meios bioquímicos (utilização de substâncias vasoativas, tais como bradiquinina), processos com efeitos secundários graves. Não existem, no entanto, sistemas de distribuição eficientes em que todas estas propriedades necessárias estejam combinadas dentro de um sistema de distribuição. Nesse contexto, é descrito por documentos de patentes complexos de macromolécula-lipídica, que promovem o direcionamento e a liberação da droga seletivamente à vários sistemas biológicos (US6358523 B1).

Uma consequência das propriedades de barreira altamente eficazes da BHE é a penetração limitada de agentes terapêuticos no cérebro, o que torna o tratamento de muitas doenças cerebrais extremamente desafiadoras. A persistência do vírus HIV no sistema nervoso central se deve a incapacidade de muitos fármacos não atravessarem a barreira hematoencefálica. Esforços para melhorar a permeação de drogas para o HIV através da BHE têm sido pesquisados, mas não provaram ser terapêuticamente bem sucedidos. Por exemplo, o mais antigo medicamento antirretroviral, o AZT, foi encapsulado em um lipossoma magnetizado para ajudar a cruzar a BHE, mas esse sistema de entrega não proporcionou melhora suficiente na biodisponibilidade para ser usado terapêuticamente. Alguns dos medicamentos antirretrovirais mais utilizados e eficazes (em termos de redução da carga de HIV na circulação) têm a menor classificação CPE (índice de penetração-eficácia), escore da efetividade de penetração no SNC. Por exemplo, o tenofovir, um componente das pílulas combinadas Truvada e Atripla®, é amplamente usado na HAART (sigla do inglês, terapia antirretroviral altamente ativa), mas dificilmente atravessa a BHE. No entanto, não existem sistemas eficientes para o transporte/direcionamento de fármacos para o HIV que atue no SNC após administração sistêmica. Assim, permanece a necessidade de fazer novas composições e de novos métodos para distribuir drogas ativas contra o HIV no cérebro (US20150104502; US8597876 B2; US20040063628 A1).

Convencionalmente, existem inúmeras preparações de absorção percutânea, no entanto, a pele funciona como uma barreira de proteção, o que dificulta a absorção percutânea de formulações terapêuticas, especialmente se o material for um polímero. Por isso já existem estudos e patentes utilizando enzimas como promotoras de absorção percutânea. No caso, a lipase tem atuado na superfície da pele perturbando a regularidade da estrutura do estrato córneo, pois atuam sobre os lipídeos localizados no estrato córneo. Desta forma, associações entre fármaco e promotor de absorção percutâneo (lipase) podem ser feitas, por exemplo, analgésicos, antipiréticos, agentes antiinflamatórios, vasodilatadores, agentes antiarrítmicos, agentes anti-hipertensivos, anestésicos locais, hormônios, anti-histamínicos, anestésicos gerais, drogas antiepilépticas, agentes psicotrópicos, relaxantes musculares esqueléticos, agentes antiparkinsonianos, diuréticos, vasoconstritores e similares. Além disso, de modo a tornar mais eficaz o tratamento, a solução potencializadora de absorção percutânea (lipase) é formulada para formar um filme impermeável (US20010007865 A1).

Apenas pequenas moléculas hidrofóbicas (<1 kDa) passam através da membrana por difusão passiva. Todos os outros tipos de moléculas têm que confrontar a barreira de membrana impermeável e seletiva. Estratégias para o transporte e liberação de macromoléculas em células vivas têm grande potencial de aplicações terapêuticas e de imagem (WO2009042972 A1). Conjugados com polímeros anfipáticos, hidrofóbicos ou catiônicos e nanotubos de carbono foram implantados. Também foram utilizados conjuntos não covalentes de lipídios, macromoléculas catiônicas e lipossomas. Os sistemas de transporte através de lipídios catiônicos existentes são prejudiciais para as membranas celulares, o que causa citotoxicidade celular, e a eficiência da entrega com estes agentes é altamente variável.

Pode-se notar que, a síntese dirigida e o planejamento de fármacos têm buscado o aperfeiçoamento e a eficiência dos medicamentos, bem como a qualidade e adesão do paciente ao tratamento. Mais especificamente, no aprimoramento de parâmetros farmacêuticos, como por exemplo, biodisponibilidade através de diversas tecnologias de modulação de liberação de drogas e, ainda, na tentativa de contornar os efeitos indesejáveis promovidos pela droga. Na Figura 37, encontra-se resumido as aplicações da lipase referente a este tópico adicionado do número de patentes que abarca cada assunto, sendo que um único documento pode ocupar mais de um tema.

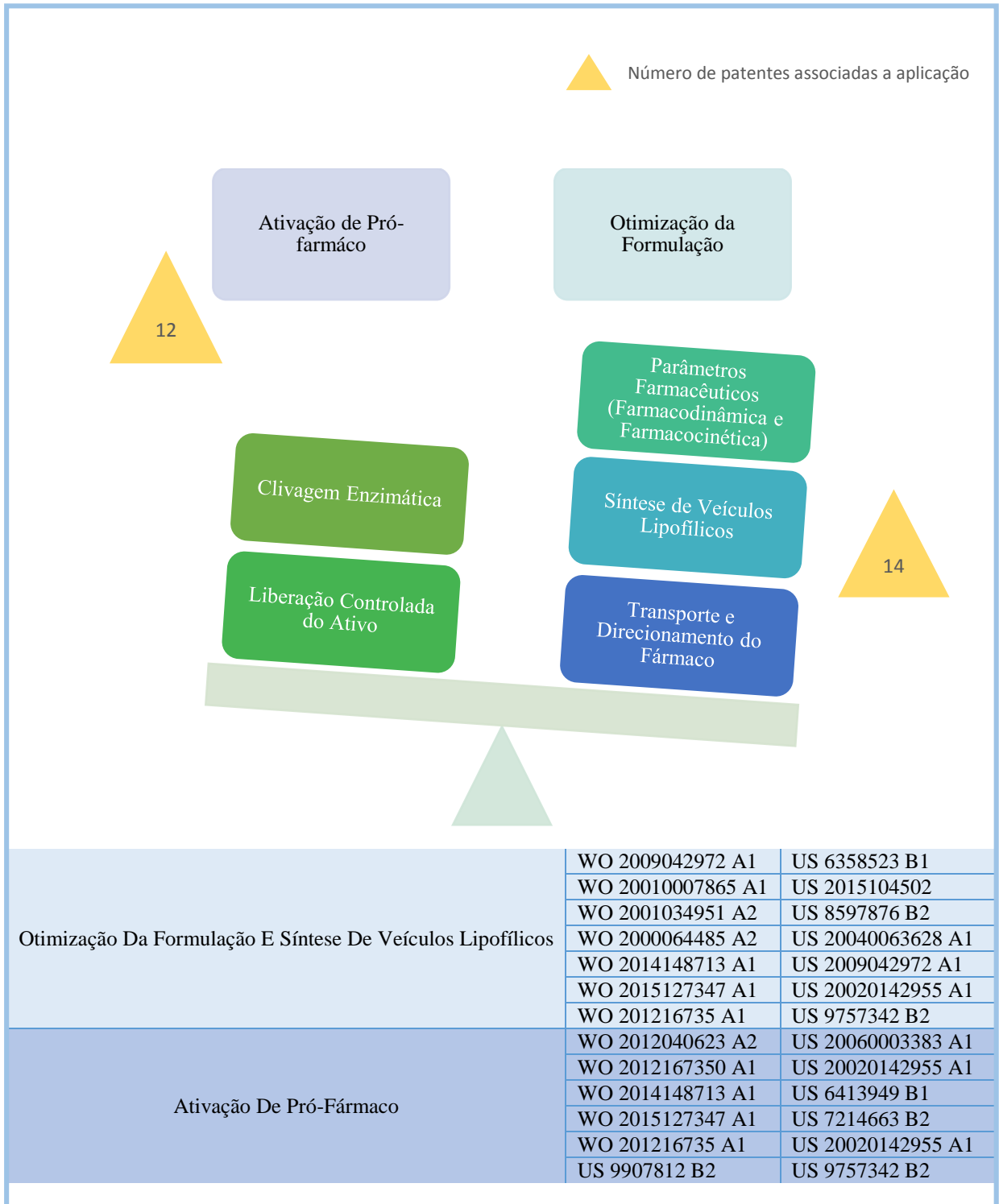


Figura 37. Aplicações da lipase no planejamento de fármacos.

*Único documento de patente pode contemplar uma ou mais características/aplicações.

Fonte: Própria, a partir da base SciFinder.

5.3 Lipase, Síntese Orgânica e Resolução de Racematos

Muitos processos industriais envolvendo transformação química apresentam desvantagens operacionais. Reações não específicas levam a baixos rendimentos, e necessidade frequente de operar em altas temperaturas e pressões requer consumo de grandes quantidades de energia e quantidades muito grandes de água no processo *downstream*. Os reatores devem ser feitos de materiais resistentes a temperatura, pressão, acidez ou alcalinidade drásticas condições de reação, levando a um aumento nos custos de fabricação da planta. Todos esses inconvenientes podem ser eliminados ou consideravelmente reduzidos usando enzimas como biocatalisadores. As enzimas operam sob condições de reação moderadas, têm alta velocidade de reação e são altamente específicos. Em vista de sua eficiência, apenas pequenas quantidades de enzima são necessárias para transformar grandes volumes de reagentes e ainda, têm um efeito benéfico sobre o meio ambiente porque reduz o consumo de energia e a produção de poluentes (WO2009149883 A1; US20060003383 A1). Na Tabela 8, encontra-se resumido a ação da lipase como biocatalisador em processos de síntese e resolução de fármacos e/ou intermediários na Indústria Farmacêutica em que o conteúdo será detalhado mais adiante.

Tabela 8. Lipase na biocatálise de fármacos e/ou intermediários.

<i>Tipo de reação</i>	<i>Molécula</i>	<i>Ação farmacológica</i>	<i>Processos</i>
<i>Síntese assimétrica</i>	Alquil éster de fluoroleucina (Aminoácido fluorado)	Inibidor enzimático e antagonista	US20050234128 A1
<i>Síntese assimétrica</i>	Derivados de rapamicina (Tensirolimus)	Agente antineoplásico	US9018373 B2
<i>Resolução cinética</i>	Derivado do ácido chiquímico 4,5-diamino e seus sais (Tamiflu)	Agente antiviral	US6403824 B2
<i>Resolução cinética</i>	Análogos de Canolídeos (Canolídeo C)	Agente antiviral	US 6277879 B1
<i>Síntese quimioenzimática</i>	Macrolídeo (Pimecrolimus)	Agente antiinflamatório	US8778636 B2
<i>Síntese quimioenzimática</i>	Ácido Miristoleico	Agente antiinflamatório	US8816109 B2
<i>Síntese assimétrica</i>	Derivados de biciclo [3.1.0]hexano e seus sais	Agente antiinflamatório	WO2009142184 A1
<i>Síntese assimétrica</i>	Análogo de GABA, Ácido (S) (+) - 3- (aminometil) - 5- metilhexanóico (Pregabalina)	Agente antiepiléptico e antidepressivo	EP1992609 A1
<i>Resolução cinética dinâmica</i>	Amida (Lacosamida)	Agente anticonvulsivo	WO2012069855 A1

Fonte: Própria, a partir da base *SciFinder*.

Aminoácidos fluorados e seus derivados peptídicos são amplamente empregados como potente agente farmacêutico devido às propriedades biológicas, que incluem inibidores enzimáticos, antagonistas e agentes melhoradores de lipofilicidade. Neste caso, a lipase atua com catalisador promovendo a abertura do anel de azalactona e, em seguida, através da desproteção do grupo alquil amida forma o aminoácido fluorado (Figura 38 e 39).

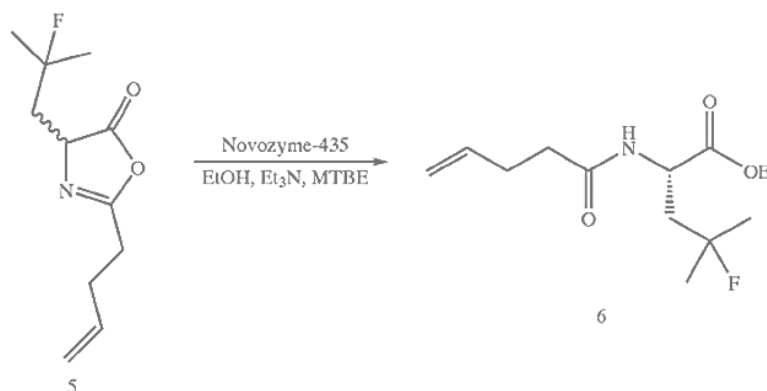


Figura 38. Abertura enzimática da azalactona para formar um alquil amida.

Fonte: Pt. US20050234128 A1

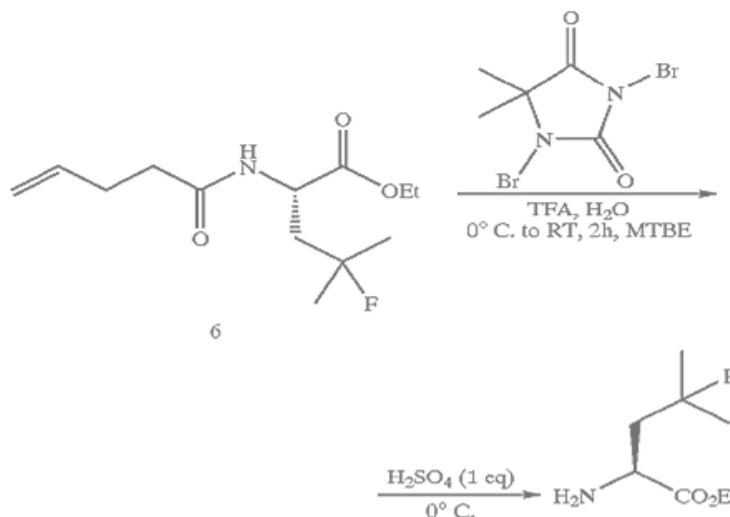


Figura 39. Desproteção da alquil amida com um agente oxidante para produzir alquil éster de fluoroleucina.

Fonte: Pt. US20050234128 A1.

Rapamicina 42-éster 3-hidroxi-2-(hidroximetil)-2-ácido metilpropiónico é um éster de rapamicina, comercialmente conhecido como Temsirolimus, demonstrou efeitos inibidores significativos no crescimento de tumores, atuando na tempo de progressão ou recorrência do tumor. O método de preparação do composto inclui o processo de catálise enzimática da rapamicina, realizando reação entre o radical 42-hidroxila da rapamicina e grupo alquila de proteção 2,2-dimetilol do ácido propiónico, seguido da remoção do grupo protetor para

obtenção de temsirolimus (Figura 40). O método tem alto rendimento, porém alto custo de produção.

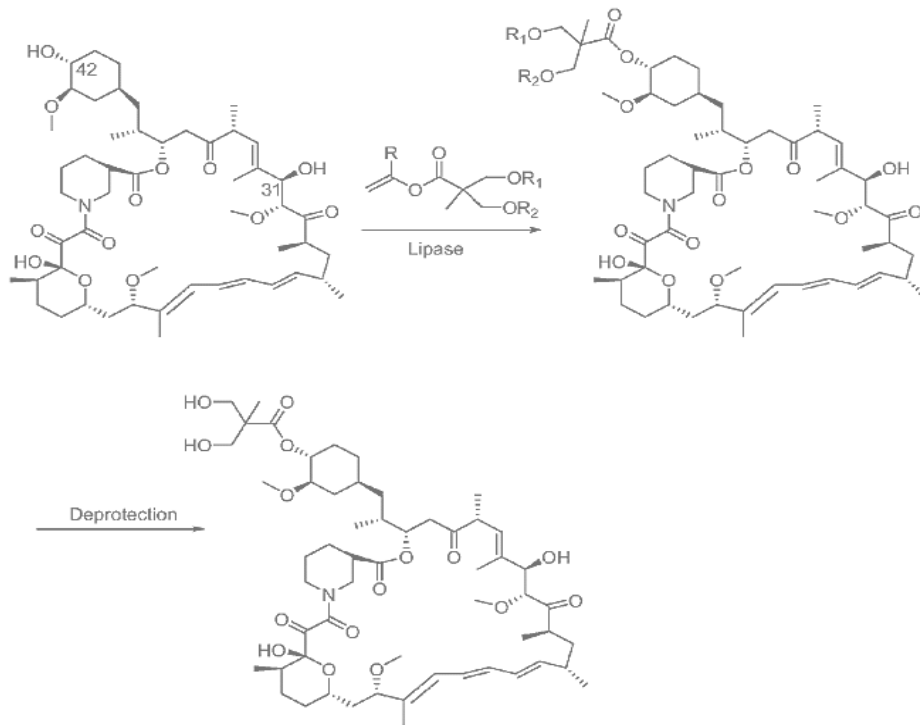


Figura 40. Processo de obtenção de éster de rapamicina utilizando a lipase como catalisador.

Fonte: Pt. US9018373 B2.

As neuraminidases virais são frequentemente usadas como determinantes antigênicos encontrados na superfície do vírus Influenza. Algumas variantes das neuraminidases de influenza conferem maior virulência para o vírus do que outras. A presente invenção refere-se a um processo de preparação de derivados de ácido chiquímico e seus sais, potentes inibidores de neuraminidases virais, bem como novos intermediários específicos (Figura 41).

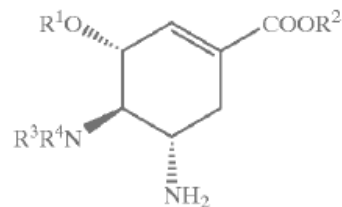


Figura 41. Composto anti-influenza, Tamiflu.

Fonte: Pt. US6403824 B2.

Vírus é um agente etiológico importante na doença infecciosa em humanos e outros mamíferos, são um grupo diversificado de agentes infecciosos que diferem muito em tamanho, forma, composição. Depois de várias décadas de estudo, apenas um número limitado de agentes antivirais estão disponíveis para o tratamento e / ou prevenção de doenças causada por vírus, como HIV, hepatite B, herpes simplex tipo 1 e 2, citomegalovírus, vírus varicela Zoster, Vírus Epstein Barr, influenza A e B, parainfluenza, adenovírus, sarampo e vírus respiratório sincicial (vírus responsável pela maioria dos casos de infecções do trato respiratório inferior em bebês). Devido aos efeitos tóxicos muitos antivirais são limitados a aplicações tópicas. Portanto, há uma necessidade de agentes antivirais seguros e eficazes com um amplo espectro de atividade anti-viral com toxicidade reduzida. Os Canolídeos são produtos naturais oriundos da árvore *Calophyllum lanigerum* e atuam como inibidores específicos da transcriptase reversa do HIV-1, reconhecidos como agentes quimioterápicos anti-HIV. Na Figura 42, o produto racêmico 8b pode ser resolvido por acilação catalisada por lipase o que leva a geração do intermediário 7a que ao ser reduzido produz o Canolídeo C.

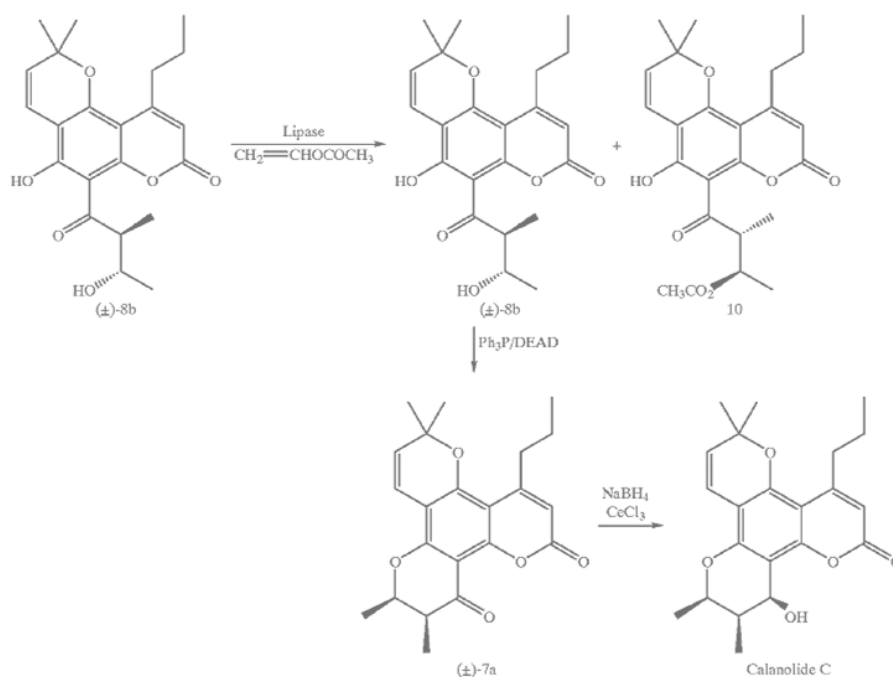
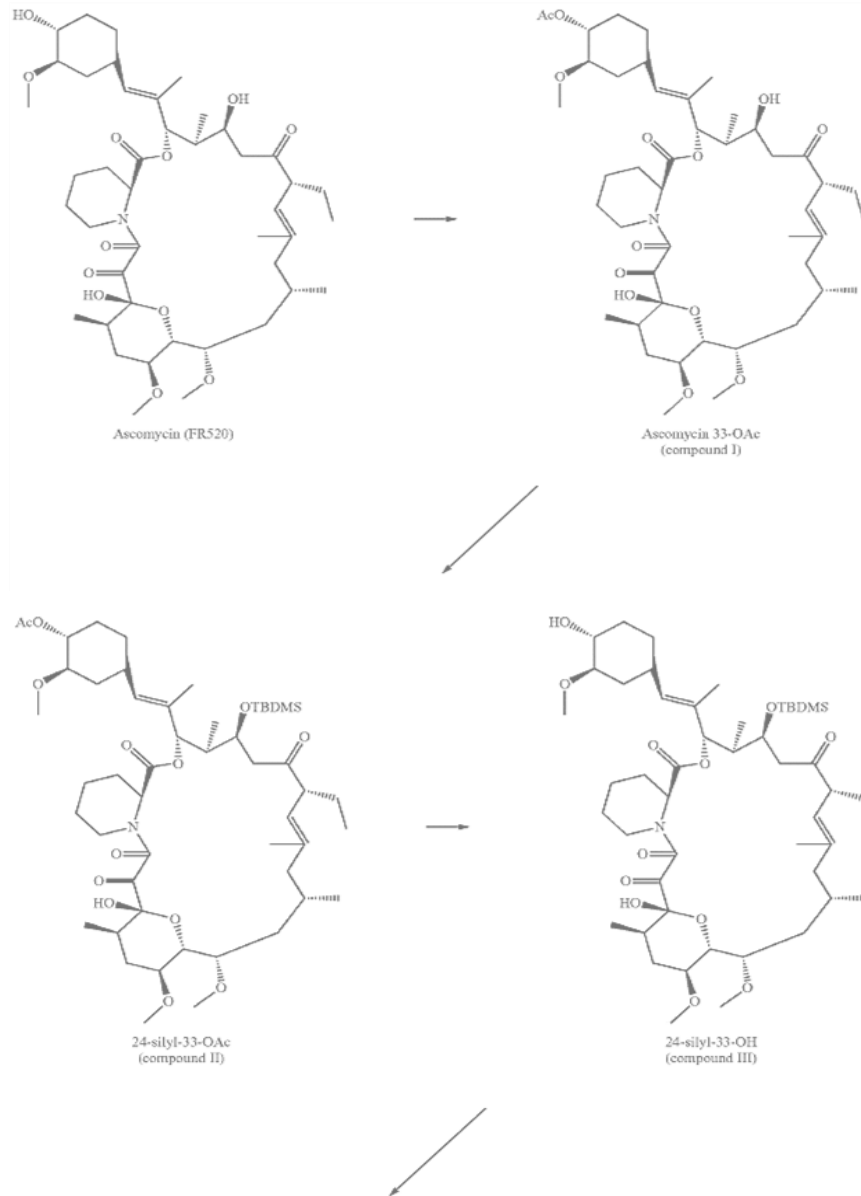


Figura 42. Resolução do intermediário racêmico para produção do Canolídeo C.

Fonte: Pt. US 6277879 B1.

O pimecrolimus é um macrolídeo com propriedades antiinflamatórias, antiproliferativas e imunossupressoras. Esta substância está presente como um ingrediente ativo na droga Elidel® para o tratamento tópico de inflamação na pele, como dermatite atópica. Assim, foi Surpreendentemente descoberto que apenas a lipase de *Candida antarctica* (livres ou

imobilizada) sob condições de transesterificação, é capaz de promover seletivamente a acilação da ascomicina na posição 33 de maneira quantitativa (Figura 43) e, também, operar sob condições de alcoólise conduzir quimiosseletivamente 24,33 diacetato de ascomicina ao correspondente 24-monoacetato de ascomicina, composto VI (Figura 44).



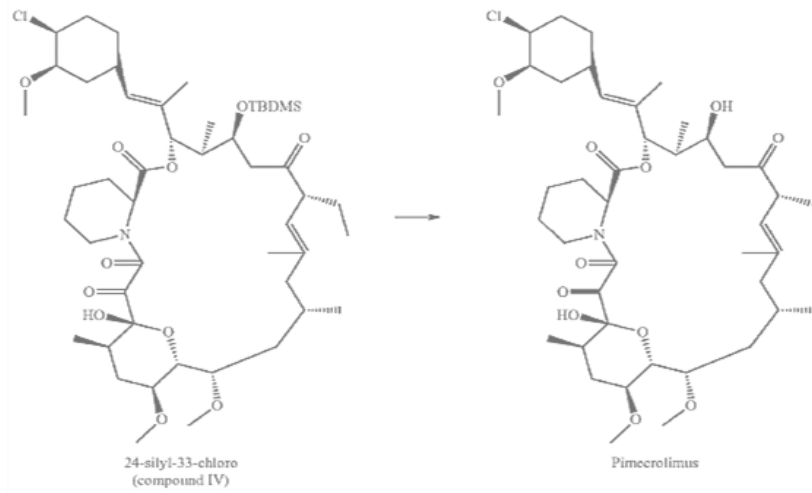
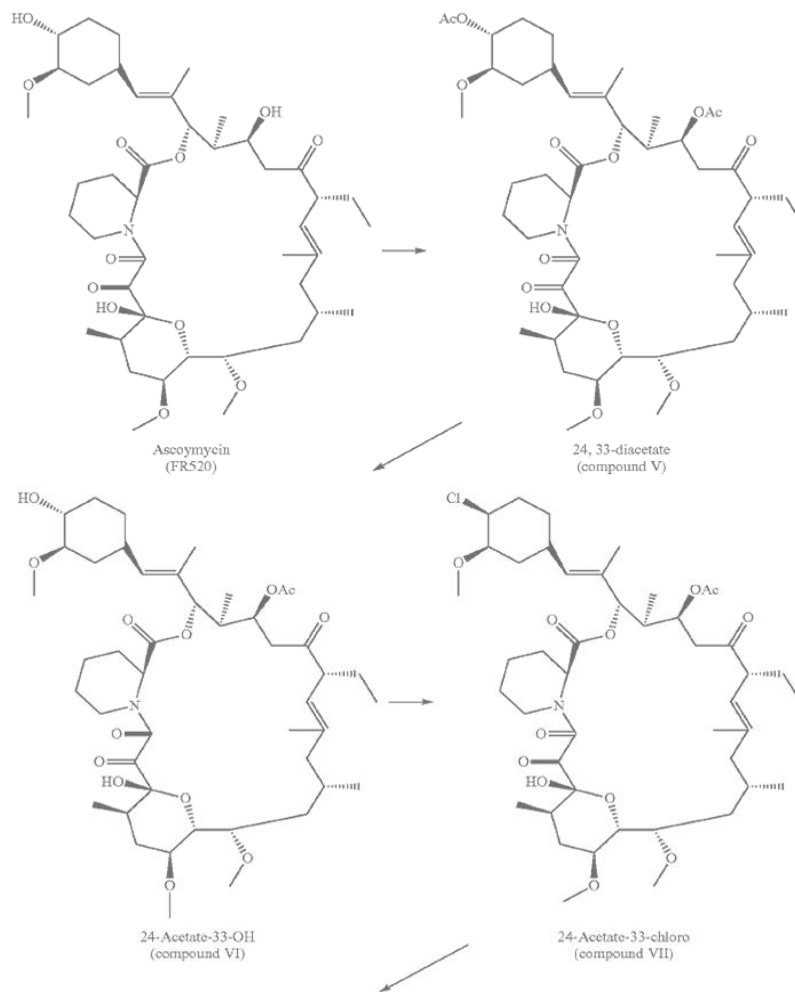


Figura 43. Síntese do pimecrolimus por transesterificação enzimática da ascomicina.

Fonte: Pt. US8778636 B2.



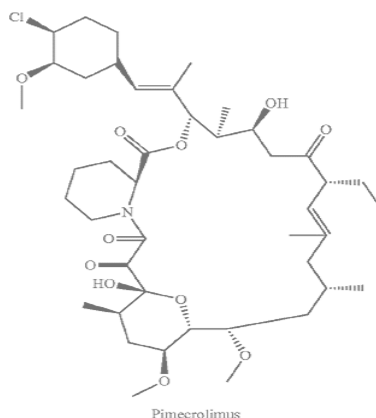


Figura 44. Processo de obtenção dos intermediários do Pimecrolimus através de síntese enzimática.

Fonte: Pt. US8778636 B2.

A lipase também é utilizada como catalisador no processo de preparação de dois isômeros de cetil miristoleato (CMO), hexadecil cis-9-tetradecenoato (Figura 45) e hexadecil-cis-10-tetradecenoato (Figura 46). Compostos com potencial atividade antiinflamatória, utilizados no tratamento de doenças como artrite reumatoide, osteoartrites e doenças musculoesqueléticas, fibromialgia. O isômero ácido miristoleico cis-9 é elaborado a partir de fontes naturais do ácido oleico, no entanto, com custo de produção muito alto. Então, um intermediário alternativo é o 10-ácido undecilênico para a produção de ácido miristoleico cis-10, em que, o 10-ácido undecilênico é um produto de pirólise de ésteres metílicos de ácido graxo de mamona (metil ricinoleato) e está comercialmente disponível em forma pura.

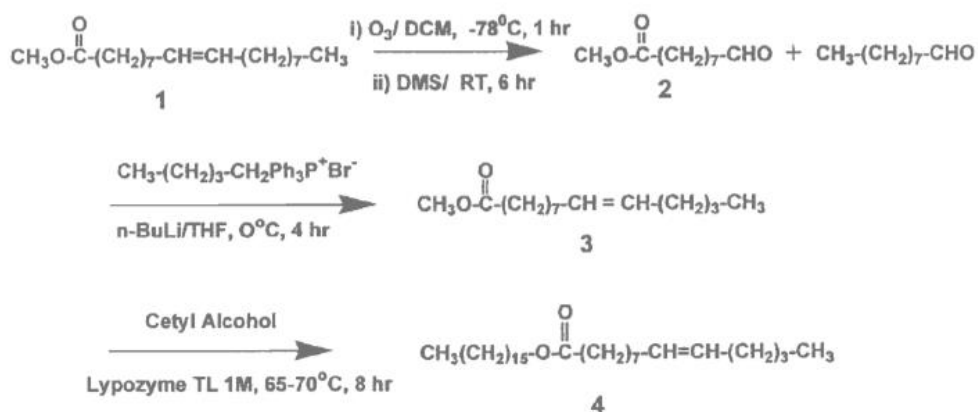


Figura 45. Preparação de Hexadecil cis-9-Tetradecenoato.

Fonte: Pt. US8816109 B2.

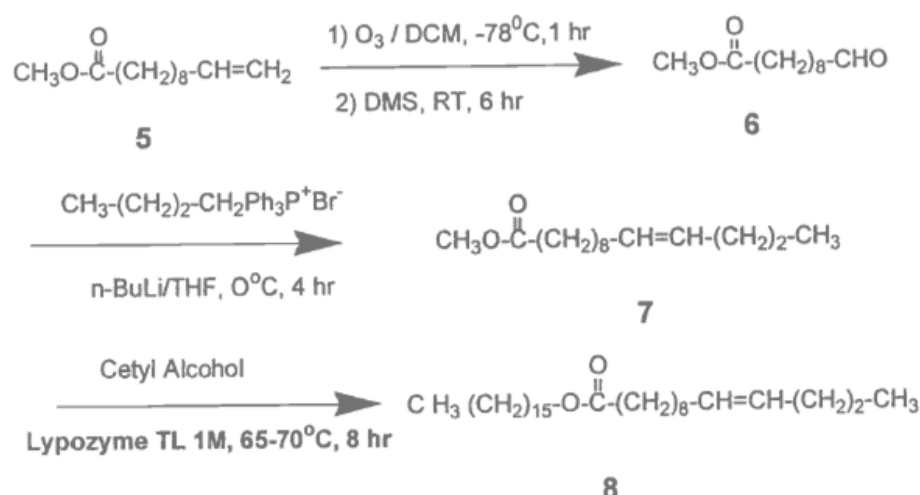


Figura 46. Preparação de Hexadecil cis-10-Tetradecenoato.

Fonte: Pt. US8816109 B2.

O glutamato é o aminoácido mais abundante no sistema nervoso central (SNC) agindo como neurotransmissor excitatório. Além disso, atua no desenvolvimento neural, na plasticidade sináptica, no aprendizado, na memória e possui papel fundamental no mecanismo de algumas doenças neurodegenerativas. O metabolismo cerebral é controlado por meio de receptores presentes nos neurônios pré e pós-sinápticos e em células da glia os quais possuem a função de controlar o tempo que este aminoácido permanece na fenda sináptica. Na membrana pós-sináptica o glutamato promove suas ações através de interações com os receptores específicos classificados como metabotrópicos (mGluRs) ou ionotrópicos (IGluRs). Falhas nesse mecanismo levam ao fenômeno chamado de excitotoxicidade com consequente neurodegeneração de neurônios específicos, culminando em doenças como Alzheimer, Esclerose Lateral Amiotrófica, Parkinson, e Doença de Huntington, esquizofrenia, ansiedade, depressão, depressão maníaca, epilepsia, dependência de drogas, distúrbios cognitivos, isquemias.

Vários compostos derivados de biciclo [3.1.0] hexano foram reconhecidos como moduladores de mGluR, útil para a prevenção ou tratamento de doenças do sistema nervoso. Através do processo de acilação assimétrica catalisada pela lipase derivados de hexano biciclo[3.1.0] e seus sais são produzidos, mais particularmente, de (1R, 2R, 4S, 5S, 6R) -6-fluoro-2,4-di-hidroxi-biciclo [3.1.0] hexano-6-carboxilato (composto 2) em (1R, 2R, 4S, 5S, 6R) -2 - (acetiloxi) -6-fluoro-4-hidroxi-biciclo [3.1.0] hexano-6-carboxilato (composto 3) na presença do solvente acetato de vinila (Figura 47).

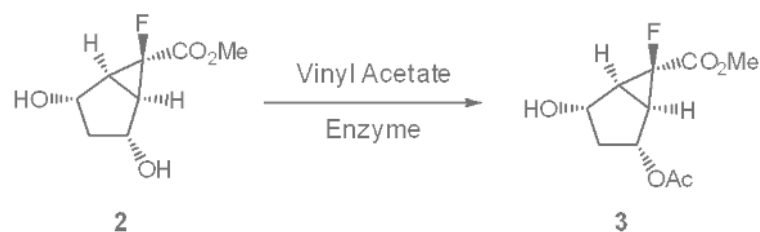


Figura 47. Síntese assimétrica catalisada por lipase para formação do produto alvo.

Fonte: Pt. WO2009142184 A1.

A pregabalina é um análogo do GABA, age regulando a transmissão de mensagens excitatórias entre as células nervosas. utilizada no tratamento da dor neuropática periférica, epilepsia, distúrbio de ansiedade generalizada e fibromialgia. A preparação de pregabalina por resolução quimioenzimática é consolidada (Figura 48), apesar do processo ser comercialmente viável apresenta algumas desvantagens, por exemplo, o enantiômero não-hidrolisado deve ser reciclado através de uma etapa de racemização e outra de hidrogenação, tornando-se custoso. No estado da arte, outro fator é a concentração dos reagentes, que na resolução enzimática é seletiva apenas em baixas concentrações, o que restringe a aplicação em larga escala.

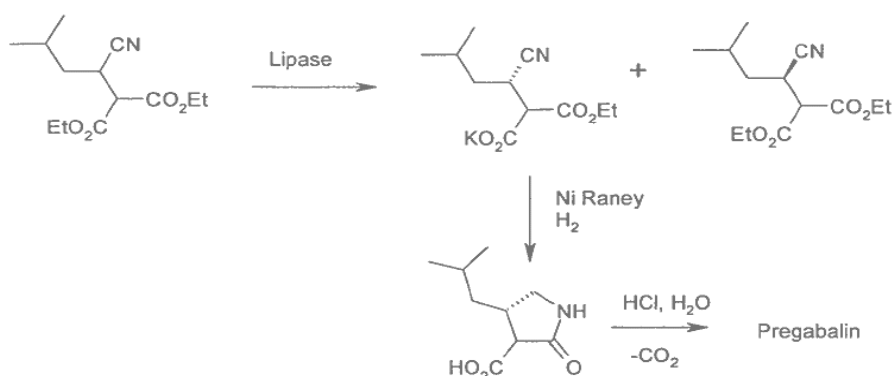


Figura 48. Preparo da pregabalina por resolução quimioenzimática.

Fonte: Pt. EP1992609 A1.

Um processo para a preparação do ácido (S) (+) - 3- (aminometil) - 5-metilhexanóico (pregabalina) de fórmula (I) ou seu sal que supera as desvantagens dos processos anteriores é relatado pela patente EP 1 992 609 A1. Este processo faz uso de um intermediário (III), obtido pela reação de um composto aquiral (II) com um álcool ROH, na presença de lipase, para gerar o éster ou sal do ácido 3-isobutil glutárico (composto III, R- ou S- enantiômero) (Figura 49). O intermediário (III) é transformado em (S) enantiômero das fórmulas (VI) ou (VIII) que passam por hidólise para serem convertidos em pregabalina (I, S-(+)-3-isobutil-GABA) (Figura 50). Além disso, esse processo utiliza reagentes baratos e não requer grandes aparelhagens.

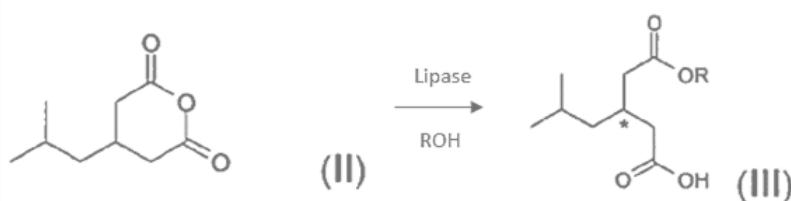


Figura 49. Síntese do intermediário III catalisado pela lipase.

Fonte: Pt. EP1992609 A1.

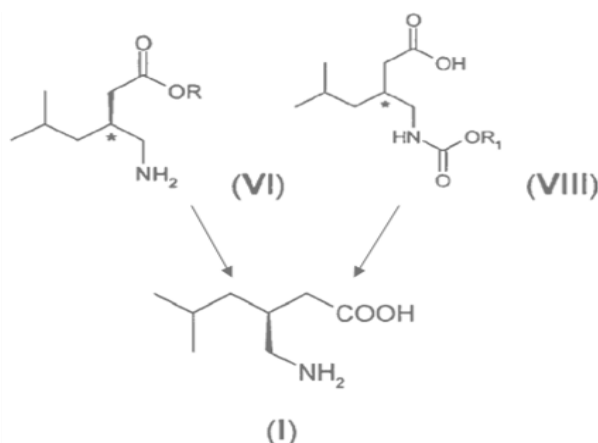


Figura 50. Hidrólise dos compostos VI e VIII em pregabalina (I).

Fonte: Pt. EP1992609 A1.

A lacosamida é um medicamento anticonvulsivo, útil para o tratamento adjuvante de crises parciais e dor neuropática diabética. Um processo de acilação enzimática pela lipase permite a formação substancial de um enantiômero de fórmula 2 (lacosamida, enantiômero R), além disso, o enantiômero de fórmula 3 não reagido (especificamente o enantiômero (S), isto é, (S)-2-amino- / V-benzil-3-metoxipropanamida) sofre racemização retornando a mistura reacional, isto é, a uma mistura de (R) e (S) enantiômeros (Figura 51).

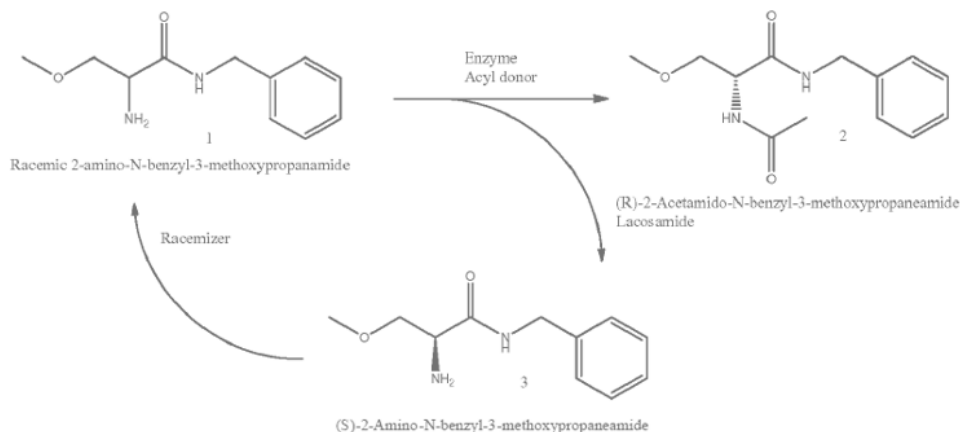


Figura 51. Processo de obtenção de Lacosamida utilizando lipase.

Fonte: Pt. WO2012069855 A1.

Diante do emprego de consideráveis metodologias na síntese e resolução de fármacos e seus intermediários (Figura 52), pode-se entender que o desenvolvimento de substâncias enantiomericamente puras continua sendo um dos principais enfoques da comunidade científica e ocupam atualmente as fronteiras na busca de novas moléculas bioativas. Finalmente, há que se ressaltar que um enorme progresso foi alcançado na síntese industrial de substâncias enantiomericamente puras, com destaque para as lipases como biocatalisador dessas reações.

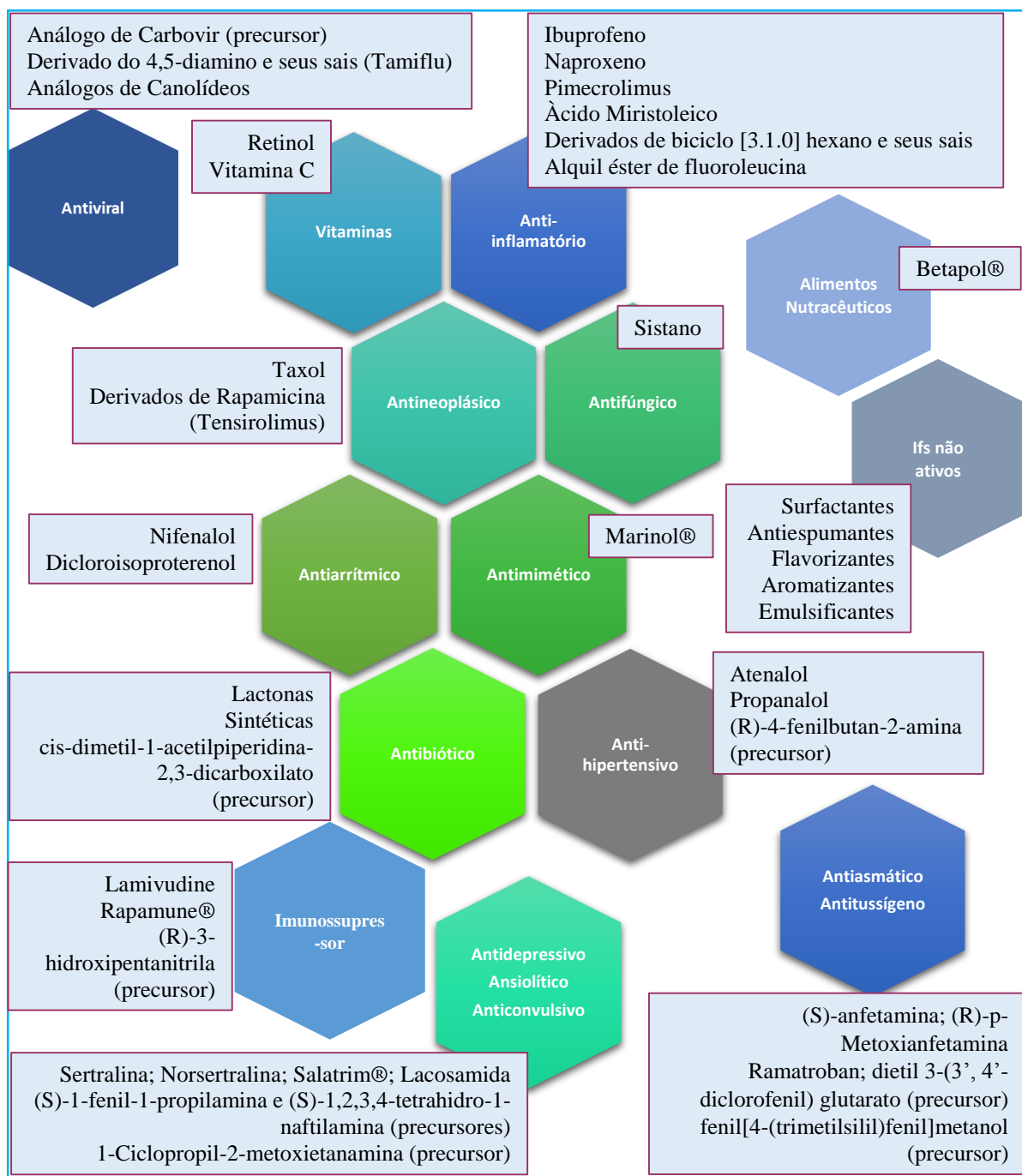


Figura 52. Síntese e resolução de fármacos e/ou intermediários tendo lipases como biocatalisador.

Fonte: Própria, com base no *SciFinder*.

Capítulo 6

6 *Considerações Finais*

Neste capítulo, conclui-se sobre o cumprimento dos objetivos propostos, comentando as capacidades dos componentes desenvolvidos e também as suas limitações. No final são dadas algumas sugestões para trabalhos futuros.

6.1 Conclusão

Sendo assim, a dissertação apresentou o panorama atual da aplicação das lipases na Indústria Farmacêutica e identificou tendências tecnológicas relacionadas ao uso na produção de medicamentos, fármacos e seus intermediários, como biocatalisadores ou na síntese dirigida e planejamento de fármacos ou, ainda, como alvo terapêutico no Setor Industrial Farmacêutico.

A produção seletiva de um único enantiômero é uma característica buscada para inúmeras moléculas de fármacos, que pode ser viabilizada pelo uso de biocatalisadores, neste caso, as lipases se destacam como biocatalisadores muito importantes utilizados para catalisar uma série de reações de grande valor sintético. Diante do exposto, pode-se entender que o desenvolvimento de substâncias enantiomericamente puras continua sendo um dos principais enfoques da comunidade científica e ocupam atualmente as fronteiras na busca de novas moléculas bioativas. Finalmente, há que se ressaltar que um enorme progresso foi alcançado na síntese industrial de substâncias enantiomericamente puras, com destaque para lipase como biocatalisador dessas reações.

Já na síntese dirigida e o planejamento de fármacos as lipases têm atuado no aperfeiçoamento e na eficiência dos medicamentos, bem como a qualidade. Mais especificamente, no aprimoramento de parâmetros farmacêuticos, como por exemplo, biodisponibilidade através de diversas tecnologias de modulação de liberação de drogas e, ainda, na administração de efeitos colaterais promovidos pela droga.

Como pode-se observar, a lipase têm gerado interesse na indústria farmacêutica e isso não é recente. É uma enzima importante no processo de digestão e absorção de lipídeos e, por esta razão, pesquisas com o objetivo de promover a inibição da lipase, otimização de formulações e até mesmo de moléculas tem ganhado força.

Em uma análise comparativa é possível relacionar o conteúdo técnico-científico e o tipo de documento com os tópicos estudados nesta dissertação. Enquanto que, em artigos científicos a questão da resolução racêmica é mais evidente, nos documentos de patente existe um interesse

maior direcionado à síntese assimétrica. Ao passo que os métodos de síntese assimétrica disponíveis até então não eram eficientes e os custos para a resolução dos racematos eram altos e oneravam substancialmente a produção industrial. Neste aspecto, a síntese assimétrica se tornou a fronteira mais proeminente da química orgânica, principalmente na busca de matérias primas quirais mais acessíveis. E, ainda, ao se tratar de planejamento de fármacos e síntese dirigida, os artigos científicos buscam por novas moléculas bioativas, já as patentes se concentram no aperfeiçoamento de parâmetros farmacêuticos das moléculas e formulações já existentes com o objetivo de reduzir efeitos colaterais e melhorar a eficácia do tratamento. Os inibidores de lipase citados em artigos, referem-se em sua maioria, à prevenção e ao tratamento da obesidade, além deste tema, os documentos de patente descrevem a inibição da lipase como útil no tratamento e prevenção de outras doenças metabólicas, cardiovasculares e processos inflamatórios e na otimização de formulação.

Desta forma, pode-se concluir que, tecnologias alternativas têm propiciado o surgimento de lipases com características diferenciadas e mais específicas afim de atender as perspectivas dos processos industriais, além disso, a imobilização e a utilização de solventes não aquosos têm facilitado o uso da lipase em processos de escala comercial. Através da lipase diversas estratégias no sentido de contornar limitações na formulação de medicamentos têm sido desenvolvidas e, das proteínas alvos para uso terapêutico, as enzimas são as mais promissoras para o planejamento de fármacos, com destaque para a lipase, onde a inibição da enzima vem sendo utilizada como vantagem terapêutica. Deste modo, a pesquisa aponta que os próximos anos devem ser promissores quanto à aplicação de lipases na área da biocatálise industrial e na produção de fármacos.

6.2 Limitações

Durante a elaboração da dissertação, alguns problemas atrasaram a coleta e o tratamento de dados. Uma das limitações que mais colaborou para tal fato foi o acesso a própria base de dados, *SciFinder*, o qual foi negado inúmeras vezes, mesmo possuindo um registro na base firmado desde o ingresso no Programa de Pós-graduação EPQB. Outra questão técnica que se tornou um impecilho foi o acesso ao editor de moléculas (ChemDraw) para elaboração de figuras/ esquemas, tanto na elaboração da dissertação quanto do artigo científico.

O documento de patente possui conteúdo técnico-científico de alto valor e abarca diversas áreas de estudo e pesquisa, por essa razão pode ser explorado a respeito do estado da técnica de forma segura e atualizada, pois a concessão da patente permite que a mesma ingresse

em domínio público. No entanto, a patente *per se* é objeto de dificuldade, pois tem uma conformação documental extremamente complexa que tem como objetivo ocultar de forma precisa alguns pontos fundamentais que implica diretamente no desenvolvimento e replicação da invenção. Por não ter uma estrutura didática (como exemplo, artigos científicos, teses, dissertações) o documento de patente torna o processo de captação de dados e informações lento, específico e trabalhoso. Além disso, faz necessário constantes traduções do processos para a língua nativa.

6.3 Sugestões para trabalhos futuros

Ao longo do desenvolvimento deste estudo, identificou-se questões correlatas que permitiriam o desenvolvimento de outros estudos a respeito da lipase. Neste estudo o enfoque foi dado a biocatálise, inibição da enzima, síntese dirigida e planejamento de moléculas bioativas. No entanto foi observado que faltam estudos que compile a atuação da lipase na Indústria Farmacêutica. Como por exemplo, estudos que sumarie e atualize a lipase na:

- aplicação clínica (diagnóstico e tratamento), a título de exemplo o artigo “Clinical applications of amylase: Novel perspectives” realizado por Azzopardi e colaboradores (2016);
- engenharia genética (métodos de análise da estrutura, atividade, sequenciamento, especificidade, seletividade), exemplificado pelo artigo “Current Trends in Protein Engineering: Updates and Progress” por Sinha e Shukla (2019);
- prospecção de nichos mercadológicos e *players* (elaboração de roadmap tecnológico), como no artigo intitulado “Technology roadmap for hyaluronic acid and its derivatives Market” elaborado por Borschiver e colaboradores (2018).

Trabalhos Pulicados

A seguir são apresentados os trabalhos publicados, premiação e concurso durante o período do mestrado:

- Artigo

PINTO, G.B.; MENDES, F.M.L.; ANTUNES, A.M.S. Technological Profile of Lipases in the Pharmaceutical Industry. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 2019, 16.

- Pôster

PINTO, G.B.; MENDES, F.M.L.; ANTUNES, A.M.S. Perfil De Aplicação Da Lipase Na Indústria Farmacêutica E Farmoquímica. *12º Encontro Nacional de Inovação em Fármacos e Medicamentos*. 2018.

- Premiação

5º Colocado na Premiação **Reconhecimento Técnico-Tecnológico** da Sessão de Pôsteres do 12º ENIFarMed 2018, com o trabalho intitulado “Perfil De Aplicação Da Lipase Na Indústria Farmacêutica E Farmoquímica”.

- Folder

PINTO, G.B.; MENDES, F.M.L.; ANTUNES, A.M.S. Folder didático e explicativo sobre o tema da dissertação “Perfil das Lipases na Indústria Farmacêutica”. 2018.

- Concurso

Em virtude do relevante desempenho acadêmico, **Gabrielle Barbosa Pinto**, foi indicada ao **Programa Bolsa Nota 10 FAPERJ 2018** na categoria Mestrado nos termos do Edital FAPERJ01/2018.

Referências Bibliográficas

ABDELKAFI, S.; BAROUH, N.; FOUQUET, B.; FENDRI, I.; PINA, M.; SCHEIRLINCKX, F., VILLENEUVE, P.; CARRIÈRE, F. Carica papaya Lipase: A Naturally Immobilized Enzyme with Interesting Biochemical Properties. **Plant Foods Human Nutrition**, v. 66, p. 34-40, 2011.

ABOURASHED, E. A.; EL-ALFY, A. T.; KHAN, I. A.; WALKER, L. Ephedra in perspective – a current review. **Phytotherapy research**, v. 17, p. 703-712, 2003.

ABRECHT, S.; KARPf, M.; TRUSSARDI, R.; WIRZ, B. Hoffmann-La Roche Inc.(US). Process For The Preparation For 4, 5-Damno Shikimic Acid Dervatives. US6403824 B2, 6 Feb. 2001, 11 Jun. 2002.

ADAMCZAK, M.; BORNSCHEUER, U.T.; BEDNARSKI, W. Synthesis of ascorbylolate by immobilized *Candida antarctica* lipases. *Process Biochem.*, v. 40, n. 10, p. 3177-3180, 2005.

ADRIO, J. L.; ARNOLD L. D. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. **Biomolecules**, v.4, p. 117-139, 2014.

AEHLE, W. **Enzymes in Industry**. 3 ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., 489p., 2007.

AHER, N. G.; PORE, V. S.; MISHRA, N. N.; KUMAR, A.; SHUKLA, P. K.; SHARMA, A.; BHAT, M. K.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 759.

ALBARRÁN-VELO. J.; DANIEL GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, D.; GOTOR-FERNÁNDEZ, V. Stereoselective biocatalysis: A mature technology for the asymmetric synthesis of pharmaceutical building blocks, *Biocatalysis and Biotransformation*, DOI: 10.1080/10242422.2017.1340457 Organic and Inorganic Chemistry Department, Biotechnology Institute of Asturias (IUBA), University of Oviedo, Avenida Juli_an Claver_1a s/n, Oviedo 33006, Spain,2017.

AL-BUSTAN, S.A.; AL-SERRI, A.; ALNAQEEB, M.A.; ANNICE, B.G.; MOJIMINIYI, O. Genetic association of LPL rs1121923 and rs258 with plasma TG and VLDL levels. *Sci. Rep.*, **2019**, 3, 9(1), 5572.

ALVES, G. P. Ampliação de Escala do Processo de Produção de Lipossomas: Estudo de Variáveis e Encapsulamento de Medicamentos de Primeiro Tratamento da Tuberculose, Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2003.

ANASTAS, P. T.; KIRCHHOFF, M. M. Origins, Current Status, and Future Challenges of Green Chemistry, *Acc. Chem. Res.*, 2002, 35, 686-694.

ANTUNES, O. A. C. *Quim. Nova* **2005**, 28, S64.

AZERAD, R.; BUISSON, D. “Dynamic resolution and stereoinversion of secondary alcohols by chemo-enzymatic processes”. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**: 565-571, 2000.

AZZOPARDI, E.; LLOYD, C.; TEIXEIRA, S.R.; CONLAN, S.; WHITAKER, I.S. Clinical applications of amylase: Novel perspectives. *Surgery*, **2016**, 160(1), 26-37.

BAIRD, C.; CANN, M.; *Química Ambiental*, 4^a ed., Bookman: Porto Alegre, 2011.

BAPAT, A.S.; MAHESH, G.; GOKHALE, R.S.; SHAH, S. S.; SENGUPTA, S.; PRASAD, S.; GHOSH, S.; CHAWRAI, S. R.; ARORA, N.; REDDY, D. S.; MISHRA, M.; BAJAJ, K. VYOME. Biosciences PVT. LTD (IN). Conjugate - Based Antifungal And Antibacterial Prodrugs. US9907812 B2, 11 Dec. 2014, 6 Mar. 2018.

BARATTA, F.; PASTORI, D.; TOZZI, G.; D'ERASMO, L.; DI COSTANZO, A.; ARCA, M.; ETTORE, E.; GINANNI CORRADINI, S.; VIOLI, F.; ANGELICO, F.; DEL BEM, M. Lysosomal acid lipase activity and liver fibrosis in the clinical continuum of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.*, **2019**, 1-19.

BARON, A.M., “Biocatálise em ambientes aquo-restritos: comparação de diferentes sistemas reacionais”, tese de mestrado, Universidade federal do Paraná, Curitiba, 2003.

BARROS, M.; FLEURI, L.F.; MACEDO, G.A. Seed lipases: sources, applications and properties – a review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 1, 15-29, 2010.

BARREIRO, E. J.; FERREIRA, V. F.; COSTA, P. R. R. *Quim. Nova* **1997**, 20, 647.

BARREIRO, E. J.; *Quim. Nova* **2002**, 25, 1172.

BASF. Disponível em: <<http://www.basf.com.br/>>. Acesso em: 2 Jan 2018.

BATWAL, R.U.; ARGADE, N.P. 2016. Chemoenzymatic access to (+)-Artabotriol and its application in collective synthesis of (+)-Grandiamide D, (–)-Tulipalin B, (+) -Spirathundiol, and (+)-Artabotriolcaffeate. *Synthesis* 48:2130–2136.

BEBBINGTON, C. R.; DUBOIS V.; GANGWAR, S.; LOBL, T. J.; NIEDER, M. H.; PICKFORD, L. B.; TROUET, A.; YARRANTON, G. T. Corixa Corp (Us). Tripeptide Prodrug Compounds. WO0200263 A2, 14 Jun 2000, 3 Jan 2002.

BELARBI, E. H.; MOLINA, E.; CHISTI, Y. A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, p 516-529, 2000.

BENAISSI, M.K.; POLIAKOFF, N. R. Thomas, *Green Chem.* **2009**, 11, 617.

BENEVIDES, C. M. J., SOUZA, M. V., SOUZA, R. D. B., LOPES, M. V. Fatores antinutricionais em alimentos: revisão. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 18 n.2, p.67-79, 2011.

BENAVIDE, V. G. **Panorama sobre alguns entraves e desafios na produção nacional de biofármacos**. 44f. Dissertação (Pós graduação *latu sensu*, especialista em tecnologias industriais farmacêuticas)- Fiocruz, Rio de Janeiro, 2013.

BENJAMIN, S., PANDEY, A., "Review - *Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology", *Yeast*, v. 14, pp. 1069-1087, 1998.

BERGLUND, P. Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis. *Biomol. Eng.* v. 18, p. 13-22, 2001.

BETHALA, L.A.P.D.; KATKAM, N.G.; KUNKUMA, V.; SISTLA, R.; KUNCHA, M.; PRAKASH, V.D.; RACHAPUDI, N.P. Council Of Scientific & Industrial Research (IN). PROCESS FOR PREPARATION OF HEXADECYL CIS-9-TETRADECENOATE AND HEXADECYL CIS-10-TETRADECENOATE. US8816109 B2, 3 Nov. 2011, 26 Aug. 2014.

BEVILAQUA, J. V. Estudo da catálise enzimática em meio orgânico para a produção de protótipo de fármaco antiasmático. [Rio de Janeiro] 2005 IX, 156 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ, D.Sc., Engenharia Química, 2005) Tese – Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE.

BILOUS, N.; ABRAMENKO, I.; CHUMAK, A.; DYAGIL, I.; MARTINA, Z. Analysis of LPL gene expression in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Exp. Oncol.*, **2019**, 41(1), 39-45.

BIRARI, R. B.; BHUTANI, K. K. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. **Drug Discovery Today**, London, v.12, n.19/20, p.879-889, Oct. 2007.

BON, E. P. S.; PEREIRA J. N. **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro: Fundação Biblioteca Nacional, 1999, p. 113.

BORGSTON. B.; BROCKMAN, H. L. Lipases. 4. ed. Amsterdam, Holland: **Elsevier**, 1984. 654p.

BORNSCHEUER, U. T. Lipase-catalyzed synthesis of monoacylglycerols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 7, p. 578-586, 1995.

BORSODY, M.K. e WEISS, J.M., Influence of corticotropin-releasing hormone on electrophysiological activity of locus coeruleus neurons *Brain Research*, v. 724, p. 149-168, 1996.

BRANDÃO, C. Z. G. S.; SOUZA, J. Biofármacos: da pesquisa ao mercado: uma revisão da literatura. *Saúde & Ciência Em Ação*, v. 1, n. 1, p. 105-118, 2016.

BREUER, M.; DITRICH, K.; HABICHER, T.; HAUER, B.; KESSELER, M.; STÜRMER, R.; ZELINSKI, T. (2004). Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(7):788–824.

BUCHHOLZ, K; KASCHE, V; BORNSCHEUER, U. Biocatalysts and Enzyme Technology. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.

BUDNIK, L.T.; EDWIN, S.; SHERWOOD, P.B.; XAVER, B. Sensitising effects of genetically modified enzymes used in flavour, fragrance, detergent and pharmaceutical production: cross-sectional study. *Occup. Environ. Med.*, **2017**, 74, 39-45.

Borschiver, S.; Vasconcelos, R.C.; Silva, F.C.; Freitas, G.C.; Santos, P.E.; Bomfim, R.O. Technology roadmap for hyaluronic acid and its derivatives market. *Biofuels Bioprod Bioref.*, **2018**, 10, 1-10.

BURKE, B. A. Jokichi Takamine. *Journal of Chemical Education*, Biographical Snapshots, American Chemical Society.

<http://jchemed.chem.wisc.edu/JCEWWW/Features/eChemists/Bios/Takamine.html>, 2003.

BURNS, N. Z.; BARAN, P. S.; ANGEW, R. W. H. *Chem., Int. Ed.*, 2009, 48, 2854–2867.

BURTON, G. S.; COWAN, A D.; WOODLEY, M. J. The search for the ideal biocatalyst. <http://biotech.nature.com> • JANUARY 2002 • VOLUME 20 • nature biotechnology 37-45.

BUSTO, E.; GOTOR-FERNÁNDEZ e GOTOR, V. Asymmetric Chemoenzymatic Synthesis of Ramatroban Using Lipases and Oxidoreductases. *J. Org. Chem.* v. 77, p.4842-4848, 2012.

BYRNE, M.F.; Mitchell, R.M.; Stiffler, H.; Jowell, P.S.; Branch, M.S.; Pappas, T.N. Extensive investigation of patients with mild elevations of serum amylase and/or lipase is 'low yield'. *Can. J. Gastroentero.*, **2002**, 16(12), 849-54.1

BYUNG, Y. C.; TAE H. K.; SEUNG S. L.; HYOUNGWOO B.; SUNGBEOM L.; CHUL H. P. Korea Atomic Energy Research Institute. Rotenone derivatives and a use thereof. US 9328123 B2, 24 Oct 2012, 3 May 2016.

CAMPBELL, R.F.; FITZPATRICK, K.; INGHARDT, T.; KARLSSON, O.; NILSSON, K.; REILLY, J.E.; YET, L. Enzymatic resolution of substituted mandelic acids. *Tetrahedron Lett.* 44, 5477-5481, 2003.

CAMPOS, F.; BOSCH, M.; GUERRERO, A. (2000). An efficient enantioselective synthesis of (r,r)-formoterol, a potent bronchodilator, using lipases. *Tetrahedron: Asymmetry*, 11(13):2705 – 2717.

CARIA, S. J.F. **Medicamentos Biossimilares**. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal, 2014.

CARREIRA, A. C. O.; LEVIN, G.; COELHO, T. M.; BELCHIOR, G. G.; SOGAYAR, M. C. Biofármacos: sua importância e as técnicas utilizadas em sua produção. **Genética na Escola**. São Paulo, vol.8, n. 2, 2013.

CARRILHO, E.; TAVERES, M. C. H.; LANÇAS, F. M.; *Quím. Nova* 2001, 24, 4.

CARVALHO, C. F. Caracterização funcional e estrutural de uma enzima lipolítica encontrada na biblioteca metagenômica de solo de terra preta de índio. 2015. 161 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; DA SILVA, D. M.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R.; MACEDO, G. A. *Quim. Nova* **2005**, 28, 614.

- CARVALHO, P.O., CAMPOS, P.R.B., NOFFS, M.D., OLIVEIRA, J.G., SHIMIZU, M.T., SILVA, D.M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Quím. Nova*, 26(1):75-80, 2003.
- CASTILHO, L.R. "Development of a dynamic filter for integrated perfusion cultivation and purification of recombinant proteins from mammalian cells", *série Fortschritt-Berichte*, VDI-Verlag, Alemanha, 2001.
- CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformations using lipases. *Química Nova*, v. 18, n. 6, p. 544-554, 1995.
- CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C.; AGUIAR, C.L. Modificacao de oleos e gorduras por biotransformacao. *Quim. Nova*, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.
- CEHRELI, R.; YAVUZSEN, T.; ATES, H.; AKMAN, T.; ELLIDOKUZ, H.; OZTOP, I. Can Inflammatory and Nutritional Serum Markers Predict Chemotherapy Outcomes and Survival in Advanced Stage Nonsmall Cell Lung Cancer Patients? *Biomed. Res. Int.*, **2019**, 1-8.
- CERMINATI, S.; PAOLETTI, L.; AGUIRRE, A.; PEIRÚ, S.; MENZELLA, H.G.; CASTELLI, M.E. Industrial uses of phospholipases: current state and future applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, **2019**, 1-12.
- CERNIA, E.; PALOCCI, C.; SORO, S. The role of the reaction medium in lipase-catalyzed esterifications and transesterifications. *Chem. Phys. Lipids*. v. 93, p. 157-168, 1998.
- CHAMOULEAU, F.; COULON, D.; GIRARDIN, M.; GHOUL, M.; *J. Mol. Catal. B: Enzim.* **2001**, 11, 949.
- CHEONG, C. S.; IM, D. S.; KIM, J.; KIM, I. O. "Lipase-catalysed resolution of primary alcohol containing quaternary chiral carbon". *Biotechnol. Lett.* **18**: 1419-1422, 1996.
- CHIOU, A.; VERGER, R.; KOKOTOS, G. Synthetic routes and lipaseinhibitory activity of long chain α -keto amides. *Lipids*, Champaign, v.36, p.535-542, 2001.
- CLARK, J. H.; RHODES, C. N. *Clean synthesis using porous inorganic solid catalysts and supported reagents*; RSC Clean Technology Monographs: Cambridge, 2000. Capítulos 1 e 4.
- CLARK, J. H.; MACQUARRIE, D. J. *Handbook of Green Chemistry & Technology*; Blackwell Science Ltd.: Oxford, 2002.
- CLIFTON, G. G.; POLAND, M.; COOK, M. E.; WALLIN, J. D. (1988). The effects of single dose dilevalol treatment on blood pressure and renal function of normotensive male volunteers. *Curr Ther Res.* 44:86-83.
- COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. *Tecnologia Enzimática*. Rio de Janeiro: Editora EPUB, 2008.

COMISSÃO EUROPEIA. 2013. Disponível em:
<www.anea.org.pt/.../Biosimilars_20Consensus_20Information_20Paper_20FINAL_20PT.pdf
f>. Acesso em: 24 Jan 2018.

COPPOLA, G.; SCHUSTER, H. α -Hydrolytic acids in enantioselective synthesis. Weinheim: Wiley-VCH; 1997.

CORBETT, J.W. *et al.* (2007) Heteroatom-linked indanylpyrazines are corticotropin releasing factor type-1 receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 6250–6256.

COSTA NETO, P. R., *Tese de Doutorado*; UFSC, 2002.

COSTA, V.E.U.; AMORIM, H.L.N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. *Química Nova* **1999**, 22, 863-873.

CURIEL, A. A. Caracterização do efeito inibitório de *Ilex paraguariensis* e *Cammellia sinensis* na atividade de lipase pancreática. Bragança Paulista. 61p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade São Francisco, São Paulo, 2011.

CRESWELL, J. W. (2003). *Research Design*. Sage Publications, London.

CRUZ, M.E.M.; MARTINS, M.B.; CARMO, M.L.; GASPAR, M.M.; OLIVEIRA, E.M.M.; FERRARA, M.A. Enzimas em Medicamentos e Diagnóstico. *In*: BON, E.P.S.; FERRARA, M.; CARMO, M.L. **Enzimas em Biotecnologia**: produção, aplicação e mercado. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008, p. 307-331.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DA RÓS, P. C. M.; SILVA, G. A. M; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. Evaluation of the catalytic properties of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5508-5516, 2010.

DA SILVA, F. M.; LACERDA, P. S. B. DE; JÚNIOR, J. J.; *Quím. Nova* 2005, 28, 1.

DAVIS, B.G.; JONES, J.B.; BOTT, R.R.; SANFORD, K.J.; ESTELL, D.A. Genecor International, INC. (US). Specifically targeted catalytic anatagonists and uses thereof. WO200064485 A2, 28 Apr. 1999, 2 Nov. 2000.

DE CRESCENZO, G.; DUCRET, A.; TRANI, M.; LORTIE, R. Enantioselective esterification of racemic ketoprofen in non-aqueous solvent under reduced pressure. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 2000. **9**: p. 49-56.

DEMIRJIAN, D. C.; SHAH, P. C.; MORIS-VAS, F.; *Biocatalysis- From discovery To Application* **1999**, 200, 1.

- DE SOUSA, S. J. Investigação do Potencial de Aplicação de Lipases Microbianas e Vegetais na Produção de Lipídios de Interesse Nutricional e Farmacêutico. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.
- DEVINE, P. LIMANTO, J.; SHAFIEE, A.; UPADHYAY, V. Merck and CO (US). Application data fluoroleucine alkyl esters. US20050234128 A1, 14 Apr. 2004, 20 Oct. 2005.
- DIAS, F. R. F.; FERREIRA, V. F.; CUNHA, A. C. Uma Visão Geral dos Diferentes Tipos de Catálise em Síntese Orgânica. *Rev. Virtual Quim.*, 2012, 4 (6), 840-871.
- DREVON, A. C. Marine oils and their effects. *Nutr. Rev.*, v. 50, n. 4, p. 38-45, 1992.
- DUBOIS, V.; FERNANDEZ, M. A.; GANGWAR, S.; LEWIS, E.; THOMAS J. LOBL, J. T.; MATTHEW H. NIEDER, H. M.; LESLEY B. PICKFORD, B. L.; TROUET, A.; YARRANTON, T. G. (US). Enzyme-Cleavable Prodrug Compounds. US 20020142955 A1, 11 Jun. 2001, 3 Oct. 2002.
- DUCLOS R. Univ Northeastern. Novel Lipase Inhibitors, Reporter Substrates And Uses Thereof. Wo2013177492 A2, 24 May 2012, 28 Nov. 2013.
- DU, Z.; CHEN J.; SHAO S.; XU X.; PENG W. Zhongshan Wanhan Pharmatech Tech (CN). Method for measuring degraded impurities in orlistat capsules. CN 105738506 A, 2 Nov. 2016, 3 Feb. 2016.
- EBERT, C.; FERLUGA, G.; GARDOSI, L.; GIANFERRARA, T.; LINDA, P. "Improved lipase-mediated resolution of mandelic acid esters by multivariate investigation of experimental factors". *Tetrahedron:Asymmetry* 3: 903-912, 1992.
- ECONOMIST INTELLIGENCE UNIT. Disponível em: <<http://www.eiu.com/home.aspx>>. Acesso em: 22 Mar 2018.
- ELANGBAM, C. S. Review Paper: Current strategies in the development of anti-obesity drugs and their safety concerns. **Veterinary Pathology**, V. 46, p. 10-24, 2009.
- ERICSSON, D.J; KASRAYAN, A; JOHANSSON, P. X-ray structure of Candida Antarctica lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. *Journal of Molecular Biology*, v. 376, p. 109-119, 2008.
- ERICKSON, J.W.; GULNIK, S.V.; MITSUYA, H.; GHOSH, A.K. Department of health and human services, University of Illinois (US). Method of treating HIV infection. US8597876 B2, 10 Apr. 2008, 3 Dec. 2013.
- ERNST & YOUNG. Firepower Index and Growth Gap Report. 2016. Disponível em: <<http://www.ey.com/ch/en/newsroom/news-releases/ey-news-release-firepower-index-growth-gap-report-2016>>. Acesso em 26 Mar 2018.
- ESKO, J. D.; TOR, Y. Univ. California (US). Assisted Enzyme Replacement Therapy. WO2011034951 A2, 15 Oct. 2009, 24 Mar. 2011.

EVANS, C.T.; ROBERTS, S.M.; SHOBERU, K.A.; SUTHERLAND, A.G. Potential use of carbocyclic nucleosides for the treatment of AIDS: chemo-enzymatic syntheses of the enantiomers of carbovir. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* v.1, p.589–592, 1992.

FABER, K.; *Biotransformations in Organic Chemistry*, 3^a ed.; Springer-Verlag, Berlin, 1997.

FABER, K. *Biotransformations*. U.S. Government Printing Office; 2000.

FABER, K., Non-sequential processes for the transformation of a racemate into a single stereoisomeric product: proposal for stereochemical classification, *Chem. Eur. J.*, v.7, p.5004-5010, 2001.

FALONY, G.; ARMAS, J. C.; MENDOZA, J. C. D.; HERNÁNDEZ, J. L. M. Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, p. 235-240, 2006.

FARIAS, L. A.; FÁVARO, D. I. T.; *Quím. Nova* 2011, 34, 6.

FERNANDES, L.R.R.M.V. **A gestão do conhecimento aplicada à biodiversidade com foco em plantas medicinais brasileiras. 2002.** Tese (Doutor em Ciências) Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – Escola de Química/ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

FERNANDES, M. L. M.; **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise.** 2007. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

FERNANDES, P.; AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J.M.S. Biocatálise Aplicada. In: Lima N, Mota M, editors. *Biocatalysis: Fundamentals and Applications*. Lisboa: Lidel; 2003.

FERNÁNDEZ, V. G.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2006**, 40,111.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. DA S.; SCABIO, A.; *Quím. Nova* 2005, 28, 1.

FERRAZ, R.; BRANCO, L.C; PRUDÊNCIO, J.P.;NORONHA, Z.;PETROVSKI, *ChemMedChem*, 2011, 6, 975-985.

FERREIRA, E. I.; *Rev. Virtual Quim.* **2012**, 4, 225.

FESSNER, W. D.; ANTHONSEN, T. *Modern Biocatalysis: Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2008.

FLEURI, L. F.; NOVELLI, P. K. ; DELGADO, C. O. ; PIVETTA, M. R. ; PEREIRA, M. S.; ARCURI, M.; CAPOVILLE, B. L. Biochemical characterization and application of lipases produced by *Aspergillus* sp. on solid-state fermentation using three substrates. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 1, p. 1-7, 2014.

FORESTI, M. L.; PEDERNERA, M.; BUCALÁ, V.; FERREIRA, M. L. Multiple effects of water on solvent-free enzymatic esterifications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 62-70, 2007.

FOSTER-SCHUBERT, K.E.; CUMMINGS, D.E. Emerging therapeutic strategies for obesity. *Endocrine Reviews*, v. 27, p. 779-793, 2006.

FRANÇA, R. O. Patente como fonte de informação tecnológica. *Perspectivas em ciência da informação*, 2(2), 1997.

FREIRE, D.M.G. “Imobilização de amiloglicosidase em quitina – caracterização e testes em reatores contínuos de leite expandido”, Tese de Mestrado, EQ/UFRJ, Rio de Janeiro, 1988.

FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. Lipases em Biocatálise. In: Bon EPS, Ferrara MA, Corvo ML, Vermelho AB, Paiva CLA, Alencastro RB, et al., editors. *Enzimas em Biotecnologia -Produção, Aplicações e Mercado*. Rio de Janeiro: Interciência. cap. 16, p.369-385, 2008.

FREITAS, L. **Seleção de rota enzimática para produção de monoglicerídeos empregando lipase imobilizada em matriz obtida pela técnica sol-gel**. Lorena, 2006. 122 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2006.

FREITAS, L.; BUENO, T.; PEREZ, V. H.; CASTRO, H. F. Monoglicerídeos: Produção por via enzimática e algumas aplicações. *Química Nova*, v. 31, p. 1514-1521, 2008.

GALLA, Z.; FORRÓ, E.; FÜLÖP, F. 2016. Enhanced enzymatic synthesis of the enantiopure intermediate for the blockbuster drug intermediate abacavir through a two-step enzymatic cascade reaction. *Tetrahedron Asymmetry* 27:729–731.

GANDHI, N. N. *Journal Of The American Oil Chemists Society*, **1997**, 74, 621-634.

GANDHI, N.N.; PATIL, N.S.; SAWANT, S.B.; JOSHI, J.B.; WANGIKAR, P.P.; MUKESH, D. Lipase-Catalyzed Esterification. *Catal. Rev.*, v. 42, n. 4, p. 439- 480, 2000.

GANG, Z.; JONATHAN, L. Univ. Health Network (CA). Method For The Synthesis Of Porphyrin-Phospholipid Conjugates. WO2012167350 A1, 6 Jun. 2011,13 Dec. 2012.

GAO, S.; ZHU, S.; HUANG, R.; LU, Y.; ZHENG, G. 2015. Efficient synthesis of the intermediate of abacavir and carbovir using a novel (p)-c-lactamase as a catalyst. *Bioorg Med Chem Lett* 25:3878–3881.

GARCIA, H.; STORKSON, J.; PARIZA, M.; HILL, C. (1998). Enrichment of butteroil with conjugated linoleic acid via enzymatic interesterification (acidolysis) reactions. *Biotechnology letters*, 20(4):393–395.

GARCIA, R.; GARCIA, T.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. (2000). Kinetic modelling of the synthesis of 2-hydroxy-5-hexenyl 2-chlorobutyrate ester by an immobilised lipase. *Biochemical engineering journal*, 5(3):185–190.

GARCIA-URDIALES, E.; ALFONSO, I.; GOTOR, V. 2011. Update 1 of: enantioselective enzymatic desymmetrizations in organic synthesis. *Chem Rev* 111:PR110–PR180.

- GATFIELD, I. L.; *Food Sci. Technol. Today* **1995**, 9, 237.
- GHANEM, A.; ABOUL-ENEIN, H. Y. *Chirality* **2005**, 17, 1.
- GIL, A. C. (2006). *Como elaborar projetos de pesquisa*. 4.a edição, Editora Atlas, São Paulo.
- GILARDI, G.; TROTTA, F.; CAVALLI, R.; FERRUTI, P.; RANUCCI, E.; DI NARDO, G.; ROGGRO, C. M.; TUMIATTI, V. Sea Marconi Technologies Sas Di Vander Tumiatti (IT). Cyclodextrin Nanosponges As A Carrier For Biocatalysts, And In The Delivery And Release Of Enzymes, Proteins, Vaccines And Antibodies. WO2009149883 A1, 10 Jun. 2008, 17 Dec. 2009.
- GILL, I.; VALIVETY, R. Polyunsaturated fatty acids: Part 1. Occurrence, biological activities and applications. *Trends Biotechnol* 1997;15:401–9.
- GIROTRA, P.; Singh, S. K.; Nagpal, K.; *Pharmac. Develop. and Tecno.* 2013, 8, 1.
- GIUSEPPE, M.; MERONE, L.; PORZIO, E.; FENG, Y.; MANDRICH, L. Enzyme Promiscuity in the Hormone-sensitive Lipase Family of Proteins. *Protein & Peptide Letters*, **2012**, 19(2), 144-154.
- GOGTE, V.N. Profiles in drug syntheses. Bombay, India: Gokul Publishers;1982.
- GOMES, M. L. P. C.; DE SOUZA, S. V. C. *Quim. Nova* **2010**, 33, 972.
- GONÇALVES, C.C.S.; MARSAIOLI, A.J. Fatos e tendências da biocatálise. *Química Nova*, v. 36, n. 10, p. 1587-1590, 2013.
- GONÇALVES, L. R. B.; GIORDANO, L. R. C.; GIORDANO, R. C. *Proc. Biochem.* **2005**, 40, 247.
- GHOSH, A.K.; SARKAR, A. 2016. Enantioselective syntheses of (–)-alloyohimbane and (–)-yohimbane by an eficiente enzymatic desymmetrization process. *Eur J Org Chem* 6001–6009.
- GÓTOR-FERNÁNDEZ, V.; BUSTO, E.; GOTOR, V. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, 348, 797.
- GONZÁLEZ-SABÍN, J.; GOTOR, V.; REBOLLEDO, F. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, 13, 1315.
- GRAHAM, R. J. Applera Corporation (CA). Fluorogenic Enzyme Activity Assay Methods And Compositions Using Fragmentable Linkers. US20060003383 A1, 7 Jun. 2005, 5 Jan. 2016.
- GRISENTI, P.; ELAHI, S.R.; VERZA, E. Euticals S.p.A. (IT). A chemo-enzymatic approach to the synthesis of Pimecrolimus. US8778636 B2, 15 Mar. 2012, 15 Jul. 2014.
- GRÖGER, H. “Enzymatic routes to enantiomerically pure aromatic α -hydroxy carboxylic acids: a further example for the diversity of biocatalysis”. *Adv. Synth. Catal.* **343**: 547-588, 2001.

GUALLAR, E.; ARO, A.; JIMÉNEZ, F. J. Omega-3 fatty acids in adipose tissue and risk of myocardial Infarction. The EURAMIC Study *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, v. 19, p. 1111-1118, 1999.

GUERCIOLINI, R. Mode of action of orlistat. **International Journal Of Obesity And Related Metabolic Disorders**, New York, v.21, n.3, p.12-23, 1997.

GUISÁN, J.M., SABUQUILLO, P., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., FERNANDEZ-LORENTE, G., *et al.*, "Preparation of new lipases derivatives with high activity stability in anhydrous media: adsorption on hydrophobic supports plus hydrophilization with polyethyleneimine", *Journal of molecular Catalysis B: enzymatic*, v. 11, pp. 817-824, 2001.

GUNSTONE, F. D.; *J. Sci. Food Agric.* **1999**, 79, 1535.

GÜVENÇA, A.; KAPUCU, N.; MEHMETOGLU, U. The production of isoamyl Acetate using immobilized lipases in a solvent-free system. *Process Biochemistry*. 2002; 38:379-386.

HAEFFNER, F.; NORIN, T.; HULT, K. Molecular modeling of the enantioselectivity in lipase-catalyzed transesterification reactions, *Biophys J.* 1998 March; 74(3): 1251–1262.

HAGEN, J. *Industrial Catalysis: A Practical Approach*, 2nd Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2006. Capítulo 1, pp. 1-13.

HAMMER, J. *Therapeutic use of enzymes.* **Infinity**, 2:1-2, 2001.

HANSEN, M.M.; BORDERS, S.S.K.; CLAYTON, M.T.; HEATH, P.C.; KOLIS, S.P.; LARSEN, S.D.; LINDER, R.J.; REUTZEL-EDENS, S.M.; SMITH, J.C.; TAMEZE, S.L.; WARD, J. A.; WEIGEL, L.O. Development of a practical synthesis of an aminoindanol-derived M1 agonist. *Org. Process Res. Dev.*, 13, 198-208, 2009.

HANSON, J.R. The microbiological transformations of diterpenoids. **Natural Products Reports**, v. 9, n. 2, 139-151, 1992.

HASAN, F.; SHAH, A.A; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HAZARIKA, S.; GOSWAMI, P.; DUTTA, N.N.; HAZARIKA, A.K. Ethyl oleate synthesis by Porcine pancreatic lipase in organic solvents. *Chemical Engineering Journal*. 2002; 85:61-68.

HERRERA-LÓPEZ, E. J. Lipases and Phospholipases: A Review. *Methods Mol. Biol.*, **2012**, 861, 525-543.

HIEBER, G.; DITRICH, K. (2001). Introducing chipros: Biocatalytic production of chiral intermediates on a commercial scale. *Chimica oggi*, 19(6):16–20.

HINZE, J.; SÜSS, P.; STROHMAIER, S.; BORNSCHEUER, U.T.; WARDENGA, R.; VON LANGERMANN, J. 2016. Recombinant pig liver esterase-catalyzed synthesis of (1S,4R)-4-

hydroxy-2-cyclopentenyl acetate combined with subsequent enantioselective crystallization. *Org Process Res Dev* 20:1258–1264.

HIRD, B; JANDACEK, R. J. The Procter & Gamble company (US). The use of non-digestible polymeric foams to sequestre ingested materials thereby inhibiting their absorption by the body. WO 2002074343 A2, 19 Mar. 2001, 26 Sep. 2002.

HOFBAUER, K.G. Molecular pathways to obesity. **International Journal of Obesity**, v. 26, p. S18-S27, 2002.

HOMANN, M.J., VAIL, R., MORGAN, B., SABESAN, V., LEVY, C., DODDS, D.R., ZAKS, A., 2001. Enzymatic hydrolysis of a prochiral 3-substituted glutarate ester, na intermediate in the synthesis of an NK1/NK2 dual antagonist. *Adv. Synth. Catal.* 343 (6–7), 744–749.

IGLESIAS, J. Simplified assays of lipolysis enzymes for drug discovery and specificity assessment of known inhibitors. *Journal of Lipid Research*, v. 57, p. 131-141, 2015.

ILLANES, A. “Biotecnología de enzimas“, Ediciones Universitarias de Valparaíso, Chile, 1994.

IMS Institute for Healthcare Informatics. The Global Use of Medicines: outlook through 2017 [Internet]. 2013. Disponível em: www.imshealth.com. Acesso em: 2 Fev 2018.

INNIS, S.M. Polyunsaturated fatty acids in human milk: na essential role in infant development. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 544, p. 27-43, 2004.

INTERFARMA – Associação da Indústria Farmacêutica de Pesquisa. Entendendo os Medicamentos Biológicos. 2012. Disponível em: <https://www.interfarma.org.br/public/files/biblioteca/34-biologicos-site.pdf>>. Acesso em: 24 Jan 2018.

INTERFARMA. Guia 2019. Disponível em: <https://www.interfarma.org.br/guia/impressora.php>>. Acesso em 21 Jan 2018.

IQVIA INSIGHTS. 2017. <<https://www.iqvia.com> > media > iqvia > pdfs > argentina > iqvia-insights-16>. Acesso em 22 Jan 2019.

IRIMESCU R.; KATO, K. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2004**, 30, 189.

IUBMB – International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Disponível em: <https://iubmb.org/about-iubmb/>>. Acesso em 20 Abr 2018.

IWASAKI, Y.; YAMANE, T.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, 10, 129.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, London, v. 13, p. 390-397, 2002.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalyst: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications in lipases. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K. E.; RANSACK, S.; KOCH, H. B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B. W. **FEMS Microbiol. Rev.** **1994**, *15*, 29.

JANSSEN, G.G., HAAS, M.J. Lipase-catalyzed synthesis of oleic acid esters of polyethylene glycol 400. **Biotechnol. Letters**, *16*(2):163-168, 1994.

JENNINGS, B. H.; AKOH, C. C. "Lipase catalysed modification of fish oil to incorporate capric acid". **Food Chemistry** **72**: 273-278, 2001.

JOB e MEIRA, B. T. Investimentos da indústria farmacêutica. 2011. O Estado de S. Paulo. Disponível em: <<http://economia.estadao.com.br/noticias/geral,investimentos-da-industria-farmaceutica-imp-,774251>>. Acesso em 20 Mar 2018.

KAEWTHONG, W.; SIRISANSANEYAKUL, S.; PRASERTSAN, P. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1525-1530, 2005.

KALSANI, V.; DAFIK, L.; KUMAR, K.; KRISHNAJI, S. T. Univ. Tufts (Us). Fluorinated Lipids And Methods Of Use. WO2009042972 A1, 26 Sep. 2007, 2 Apr. 2009.

KAMAL, M. A. A.; AZHAR, T.; KRISHNAJI, M. S.; MALIK, S. Azeeza, **Coordination Chemistry Reviews** **2008**, *252*, 569.

KAMIYAMA, F.; QUAN, Y.; YAMAMOTO, A. Cosmed Pharmaceutical Co Ltd (Jp). Percutaneous Absorption Promoting Agent And Percutaneous Absorption Preparation Using The Same. WO2007119467 A1, 23 Mar. 2006, 25 Oct. 2007.

KAPOOR, M.; ANAND, N.; AHMAD, K.; KOUL, S.; CHIMNI, S. S.; TANEJA, S. C. QAZI, G. N. **Tetrahedron: Asymmetry** **2005**, *16*, 717.

KARP, J. M.; VEMULA, P. V. K.; CAMPBELL, N. R.; SYED, A. M.; ZHANG, S.; FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. S. Nanostructured Gels Capable Of Controlled Release Of Encapsulated Agents. WO2012040623 A2, 24 Oct. 2010, 29 Mar. 2012.

KAWANO, S.; HASEGAWA J.; YASOHARA Y.; Efficient Preparation of (R)-3-Hydroxypentanitrile with High Enantiomeric Excess by Enzymatic Reduction with subsequent enhancement of the optical purity by lipase-catalysed ester hydrolysis. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 76, n. 9, p. 1796-1798, 2012.

KAZLAUSKAS R. J., BORNSCHEUER U. T. "Biotransformation with Lipases". A Multi Volume Comprehensive Treatise in Biotechnology, (ed.) Rehm, H.J., Pihler G., Stadler, A., Kelly, P. J.W. New York: Wiley VCH Verlag, v. 8, pp. 37-192, 1998.

KILIKIAN, B.V.; PESSOA, J. A. Purificação de produtos biotecnológicos. In: LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W (Coord.). **Biociencia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001, v. 2, p. 493-521.

KHONG, D.T.; PAMARTHY, V.S.; GALLAGHER, T.; JUDEH, Z.M.A. 2016. Chemoenzymatic synthesis of chiral 1-benzyl-5-(hydroxymethyl)-2-piperidone enabled by

lipase AK-mediated desymmetrization of prochiral 1,3-diol and its diacetate. *Eur J Org Chem* 3084–3089.

KNOWLES, J.; GROMO, G. Target selection in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 63-69, 2003.

KOCIENSKI, P. J. *Protecting Groups*, Thieme, 3rd edn, 2005.

KOHNZ, R. A.; NOMURA, D. K. Chemical approaches to therapeutically target the metabolism and signaling of the endocannabinoid 2-aracdono glycerol and eicosanoids. *Chemical Society Reviews*, v. 43, p. 6859-6869, 2014.

KOSKINEN, A. M. P.; KLIBANOV, A. M. **Enzymatic Reactions in Organic Media**. 1 ed. Great Britain : Blackie academic and professional, 1996. 314 p.

KOSZELEWSKI, D.; TAUBER, K.; FABER, K.; KROUTIL, W. (2010). ω -Transaminases for the synthesis of non-racemic α -chiral primary amines. *Trends in biotechnology*, 28(6), 324-332.

KOTSOVOLOU, S.; CHIOU, A.; VERGER, R.; KOKOTOS, G. Bis-2-oxo amide triacylglycerol analogues: a novel class of potent human gastric lipase inhibitors. **Journal of Organic Chemistry**, Manchester, v.66, p.962–967, 2001.

KOZAK, A. D-Pharma, Ltd.(IL). Prodrugs with enhanced penetration into cells. US6413949 B1, 7 Jun. 1995, 2 Jul. 2002.

KOZAK, A. D-Pharma, Ltd.(IL). Prodrugs with enhanced penetration into cells. US20010007865 A1, 6 Feb.. 2001, 12 Jul. 2001

KUHN, R.J.; GELRUD, A.; MUNCK, A.; CARAS, S. CREON: Pancrelipase Delayed-Release Capsules for the Treatment of Exocrine Pancreatic Insufficiency. *Adv. Ther*, **2010**, 27(12), 895-916.

KULACKI, K.J.; LAMBERTI, G.A. *Green Chem.* 10 (2008) 104-110.

KUMAR A.; KANWAR S.S. "Synthesis of isopropyl ferulate using silica-immobilized lipase in an organic medium. **Enzyme Research**, 2011; Vol. 2011: 1- 8.

KUMAR, A.; SINGH, S. Directed evolution: Tailoring biocatalysis for industrial application. *Crit. Rev.Biotechnol.* 2013, 33, 365–378.

KURITA-WATER. Patente japonesa n^o. 06246295, 1994.

KVARNSTROM, B C.; EEK, M. Cambrex Karlskoga Ab (SE). Process For The Preparation Of Lacosamide. WO 2012/069855 A1, 25 Nov. 2011, 31 Mai. 2012.

LACERDA, P. S. B.; RIBEIRO, J. B.; LEITE, S. G. F.; FERRARA, M. A.; COELHO, R. B.; BON, E. P. S., *et al.* Microbial reduction of ethyl 2-oxo-4-phenylbutyrate. Searching for R-enantioselectivity. New access to the enalapril like ACE inhibitors. *Tetrahedron: Asymmetry*. 2006;17(8):1186-8.

LANCASTER, M. Catalysis and Green Chemistry. In: _____. Green Chemistry, an introductory text. 1. Ed. New York: RSC Paperbacks, 2002. cap. 4, p. 84-129.

LAYER, P.; KELLER J.; LANKISCH P. G. Pancreatic enzyme replacement therapy. *Current Gastroenterology Reports*, New York, v. 3, p. 101-8, 2001.

LAYER, P.; KELLER, J. Lipase supplementation therapy: standards, alternatives, and perspectives. *Pancreas*, New York, v. 26, n. 1, p. 1-7, 2003.

LEAL, M.C.M.R., CAMMAROTA, M.C., FREIRE, D.M.G., SANT'ANNA JR, G.L.. "Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters" *Brazilian Journal of Chemical Engineering* , v. 19, n. 2, pp. 175 - 180, 2002.

LEE, J.; OH, Y.; CHOI, YK.; CHOI, E.; KIM, K.; PARK, J.; KIM, M-J. 2015. Dynamic kinetic resolution of diarylmethanols with an activated lipoprotein lipase. *ACS Catal* 5:683–689.

LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F.; SILVEIRA, C. C.; *Quím. Nova* 2003, 26, 1.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995. 839p.

LIEBERMAN, M.; MARKS, A.D.; SMITH, C.M., 2009. Marks' basic medical biochemistry : a clinical approach, 3rd ed. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

LIESE, A.; SEELBACH, K.; WANDREY, C. editors. Industrial biotransformations Weinheim: Wiley-VCH, 2000.

LIMA, A. W. O.; ANGNES, L. Biocatálise em meios aquo-restritos: fundamentos e aplicações em química analítica. **Química Nova**, v. 22, n. 2, 1999.

LIMA, J. R.; NASSU, R. T.; *Quim. Nova* **1996**, 19, 127.

LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W., "Biotecnologia Industrial", v. 1, 1ª ed., 2001.

LINDER, C.; GRINBERG, S.; HELDMAN, E. Univ Ben Gurion (Il). Nano-Sized Particles Comprising Multi-Headed Amphiphiles For Targeted Drug Delivery. WO2010128504 A2, 4 May 2009, 11 Nov. 2010.

_____. Lauren Sciences LLC (US). Bolaamphiphilic Compounds, Compositions And Uses Thereof. US20150104502, 10 Jul. 2014, 16 Apr. 2015.

LINDHAGEN, M.; KLINGSTEDT, T.; ANDERSEN, S.M.; MULHOLLAND, K.R.; TINKLER, L.; MCPHEATORS, G.; CHUBB, R. 2016. Development of a chemoenzymatic route to (R)-allyl-(3-amino-2-(2-methylbenzyl)propyl)carbamate. *Org Process Res Dev* 20:65–69.

LONGO JÚNIOR, L. S.; BOMBONATO, F. I.; FERRAZ, H. M. C. Métodos de preparação de lactonas de anel médio. *Química Nova*, São Paulo, v. 30, p. 415-424, 2007.

LONG, K. Unlocking the Miracle of Lipases. Malaysian Agricultural Research and Development Institute (MARDI). Kuala Lumpur, Malaysia. 1-46. 2010.

LÓPEZ, M.L.; REDRUELLO, B.; VALDÉS, E.; MORENO, F.; HEINISCH J.J.; RODICIO, R. Isocitrate lyase of the yeast *Kluyveromyces lactis* is subject to glucose repression but not to catabolite inactivation. *Curr. Genet.* 44(6):305-16. 2004.

LORTIE, R.; *Biotechnol. Adv.* **1997**, 15, 1.

LOUGHLIN, W. A. Biotransformations in organic synthesis. *Bioresource Technology*. 2000;74(1):49-62.

LUNDER, M.; BRATKOVIC, T.; KREFT, S.; STRUKELJ, B. Peptide inhibitor of pancreatic lipase selected by phage display using different elution strategies. **Journal of Lipid Research**, v. 46, p. 1512-1515, 2005.

LUND, I.T.; BØCKMANN, P.L.; JACOBSEN, E.E. 2016. Highly enantioselective CALB-catalyzed kinetic resolution of building blocks for b-blocker Atenolol. *Tetrahedron* 72:7288–7292.

MAAG, H. Fatty acid derivatives: important surfactants for household, cosmetic and industrial purposes. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61(2):259-267, 1984.

MACHADO, M. D.; PEREZ-PARIENTE, J.; SASTRE E., CARDOSO D., GUERENE, A. M. Selective synthesis of glycerol monolaurate with zeolitic molecular sieves. **Applied Catalysis A: General**, v. 203, n. 2, p. 321-328, 2000.

MACRAE, A.R., HAMMOND, R.C. *Present and Future Applications of Lipases. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.*, 3:193-217, 1985.

MAKITA, A.; NIHIRA, T.; YAMADA, Y. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 805.

MANCHEÑO, J.; MARTÍN-BENITO, M.; MARTÍNEZ-RIPOLL, J.G.; GAVILANES, J.A. **Crystal and electron microscopy structures of sticholysin II actinoporin reveal insights into the mechanism of membrane pore formation.** *Structure*, 11(2003), pp. 1319-1328.

MARRUCHO, I.M.; BRANCO, L.C.; REBELO, L.P.N. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 8 (2014) 527-546.

MARTÍNEZ-RUIZ, A.; GARCÍA, H. S.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; FAVELATORRES, E. Organic Phase Synthesis of Ethyl Oleate Using Lipases Produced by Solid-state Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2008;151:393-401.

MASSON, W.; LOFTSSON, T.; HARALDSSON, G. G.; *Pharmazie* **2000**, 55, 172.

MASUEV, K. A. The effect of polyunsaturated fatty acids of the omega-3 class on the late phase of the allergic reaction in bronchial asthma patients. *Ter. Arkh.*, v. 69, n. 3, p. 31-33, 1997.

MATSUSHIMA, A.; KODERA, Y.; HIROTO, M.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1996**, 2, 1.

MAUGARD, T.; LEGOY, M. D. *J. Mol. Catal.* **2000**,8, 275.

MAUVERNAY, R.Y.; LABOREUR, P.; LABROUSSE, M. Composition and its products, United States Patent 3,513,073 (1970).

MENDES, F. M.L. **Metodologia prospectiva para identificação de intermediários chave de princípios ativos sintéticos. Estudo de caso: antirretrovirais para tratamento da AIDS.** Orientadora: Adelaide Maria de Souza Antunes. Rio de Janeiro: UFRJ: EQ, 2014. Tese (doutorado em Tecnologia de processo químicos e petroquímicos).

MERCADO FARMACÊUTICO BRASILEIRO. PUC Rio. 2016. Disponível em: <http://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/4789/4789_4.PDF>. Acesso em: 04 Jun de 2017.

MERÇON, F.; SANTÁNNA, G.L.; NOBREGA, R. Enzymatic hydrolysis of babassu oil in a membrane bioreactor. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77(10):1043-1045, 2000.

MIYAZAWA, T.; KURITA, S.; UEJI, S.; YAMADA, T. "Resolution of mandelic acids by lipase-catalyzed transesterifications in organic media". *Biocat. Biotrans.* **17**: 459-473, 2000.

MONI, L.; BANFI, L.; BASSO, A.; CARCONE, L.; RASPARINI, M.; RIVA, R. 2015. Ugi and Passerini reactions of biocatalytically derived chiral aldehydes: application to the synthesis of bicyclic pyrrolidines and of antiviral agent telaprevir. *J Org Chem* 80:3411–3428.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. *Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. Revista Processos Químicos*, v. 3, n. 5, p.9-23, 2009.

MUKHERJEE, K. D.; *Biocatalysis* **1990**, 3, 277.

MULLINS J. J. G. Oxetanone Derivatives. WO2001032616 A2, 21 Oct. 2000, 10 Apr. 2001. NAKAI, M.; YUKO, F; SUMIO, A. Novel Compound Having Lipase Inhibitory Activity. Suntory Ltd (JP). WO2005123725, 21 Jun. 2004, 29 Dec. 2005.

NECHAB, M.; AZZI, N.; VANTHUYNE, N.; BERTRAND, M.; GASTALDI, S.; GIL, G. (2007). Highly selective enzymatic kinetic resolution of primary amines at 80 c: a comparative study of carboxylic acids and their ethyl esters as acyl donors. *The Journal of Organic Chemistry*, 72(18):6918–6923.

NEKLYUDOV, A. D.; IVANKIN, A. N.; *Appl. Biochem. Microbiol.* **2002**, 38, 399.

NETO, J.A. Purificação de enzimas. In: LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001, v. 3, p. 405-408.

NORDIN, O.; NGUYEN, Ba-Vu; VÖRDE, C.; HEDENDTRÖM, E.; HÖGBERG, Hans-Erik. Kinetic resolution of primary 2-methyl-substituted alcohols *via Pseudomonas cepacia* lipase-catalyzed enantioselective acylation. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.** p. 367-376, 2000.

NOVARETTI, M. C. Z.; AQUINO, S.; PISCOPO, M. R. Controle de vendas de antibióticos no Brasil: Análise do efeito dos atos regulatórios no uso abusivo pelos consumidores. Revista Acadêmica São Marcos, Alvorada, v. 4, n. 2, p. 25-39, 2014. Disponível em: <<http://www.saomarcos.br/ojs/index.php/rasm/article/view/72>>. Acesso em: 14 set. 2016.

NOVO, J. B. **Clonagem e expressão da glucocerebrosidase humana em células de ovário de hamster chinês (CHO)**. 28f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo, 2010.

NUGENT, T. (2010). Chiral Amine Synthesis. Editora John Wiley & Sons, p.436-437, 2010.

OLIVEIRA, D.; FEIHRMANN, A. C.; DARIVA, C.; BEVILAQUA, J. V.; DESTAIN, J.; CUNHA, A. G.; OLIVEIRA, J. V.; FREIRE, D. M. G. Influence of compressed fluids treatment on the activity of *Yarrowia lipolytica* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 117-123, 2006.

OLIVEIRA, G. L.; MANTOVANI, M. S. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. *Quím. Nova*, vol.32, n.3, São Paulo, 2009.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. *Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações*. **SaBios: Revista Saúde e Biologia**, v.7, n.3, p.97-109, 2012.

PAETZOLD, J.; BÄCKVALL, J. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 17620.

PAIK, H.J.; SONG, J.K.; LEE, C.Y.; JEONG, J.H.; KADIR, M.A.; LEE, T.H. Pusan National University Industry, Korea Research Institute of Chemical Technology (KR). Method For Preparing Protein Cage, And In Situ Method For Preparing Hydrophobic Additive - Supported Core – Shell Structured Polymer – Protein Particles. US 9757342 B2, 5 May 2016, 12 Sep. 2017.

PANDEY, A.; BENJANMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAN, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. T. “The realm of microbial lipases in biotechnology”. *Applied Biotechnology biochemistry*, v.29, p. 119-131, 1999.

PAQUES, F. W., MACEDO, G.A. “Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais”. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PARKER, W.L.; HANSON, R.L.; GOLDBERG, S.L.; TULLY, T.P. e GOSWAMI, A. Preparation of (*S*)-1-Cyclopropyl-2-methoxyethanamine by a Chemoenzymatic route using leucine dehydrogenase. *Org. Process Res. Dev.* v. 16, p. 464–469, 2012.

PATEL, R. N. Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002;31(6):804-26.

PATHAK, T.; WALDMANN, H. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1998, 2, 112–120.

PATIL, K.J.; CHOPDA, M.Z.; MAHAJAN, R.T. Lipase biodiversity, *Indian J. Sci. Technol.* 4 (2011) 971–982.

PEREIRA, L. L. S., SOUZA, S. P., SILVA, M. C., CARVALHO, G. A., SANTOS, C. D., CORRÊA, A. D., ABREU, C. M. P. Atividade das glicosidases na presença de chá verde e de chá preto. **Rev. Bras. Pl. Med. Botucatu.** v. 12. n. 4. p. 516-518, 2010.

PERTWEE, R.G. Elevating endocannabinoid levels: pharmacological strategies and potential therapeutic applications. *Proc. Nutr. Soc.*, **2014**, 73(1), 96-105.

PHIZER. Industria Farmacêutica. **Manual de Medicamentos: Medicamentos biológicos e biossimilares**, 2013. Disponível em: <http://static.labnetwork.com.br.s3.amazonaws.com/wordpress/wpcontent/uploads/2014/07/Manual-Medicamentos-Biol%C3%B3gicos-e-Biossimilares.pdf>. Acesso em 21 Jan 2018.

PICCARIELLO, T.; KIRK, R.J.; OLON, L.P. New River Pharmaceuticals Inc.(US). Active Agent Delivery Systems And Methods For Protecting And Administering Active Agents.US 20040063628 A1, 29 May 2002, 1 Apr. 2004.

POHANKA, M. Biosensors and Bioassays Based on Lipases, Principles and Applications, a Review. *Molecules*, **2019**, 24, 616.

POLAT, T.; LINHARDT, R. J. Syntheses and applications of sucrose-based esters. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 4, p. 415-421, 2001.

POLIAKOFF, M.; HOWDLE, S.; *Chem. Brit.* 1995, 31, 118.

POLITZER, K.; BON, E. P. S. Enzimas Industriais e Especiais. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, Ciência, Tecnologia e Inovação, IQ/UFRJ, Rio de Janeiro, mai. 2006.

POLLARD, D. J.; WOODLEY, J. M. *TRENDS in Biotechnology* **2006**, 25, 66.

QUINTILESIMS. Empresa Especialista em Coletar e Analisar Dados do Setor Farmacêutico Com Presença Em Mais De 100 Países. 2017. Disponível em: <http://www.imshealth.com.br/pt_br>. Acesso em 20 nov. 2017.

RAO, C.V.; HIROSE, Y.; INDRANIE, C.; REDDY, B.S. Modulation of experimental colon tumorigenesis by types and amounts of dietary fatty acids. **Cancer Research**, Heidelberg, v.61, n.5, p.1927-1933, 2001.

RAMESH, P.; HARINI, T.; FADNAVIS, N.W. 2015. Efficient resolution of cis-(±)-dimethyl 1-acetylpiperidine-2,3-dicarboxylate with soluble *Candida antarctica* lipase B (CAL B). *Org Process Res Dev* 19:296–301.

REED, G. *Enzymes in food processing*. 2. ed. Wisconsin: Academic Press, 1975. 573 p.

REETZ, M.T.; “Lipases as practical biocatalysts”. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 6, n. 2, p. 145-150, 2002.

REIS, C.; CAPANEMA, L. X. L.; FILHO, P. L. P.; PIERONI, J. P.; BARROS, J. O.; SILVA, L. G. **Biotecnologia para saúde humana: Tecnologias, aplicações e inserção na indústria farmacêutica**. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em:

https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/2641/1/BS%2029_Biotecnologia%20para%20sa%C3%BAde%20humana_P.pdf. Acesso em 21 Jan 2018.

RIVA, S.; ALLEGRINI, P.; SERAFINI, E.; RAZZETTI, G.; MANTEGAZZA, S.; PASTORELLO, D. DIPHARMA FRANCIS S.R.L. (IT). Process for the preparation of a (S)₊-3-(aminomethyl)-5-methylhexanoic acid. EP 1992609 A, 05 Mai. 2008, 19 Nov. 2008.

ROZZEL, D. Commercial Scale Biocatalysis: Myths and Realities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 7(10):2253-61,1999.

SAFINYA, C.R.; RAEDLER, J.O.; KOLTOVER, I. The Regents Of The University Of California (US). Macromolecule-Lipid Complexes And Methods For Making And Regulating. US 6358523 B1, 26 Jun. 1998, 19 Mar. 2002.

SALERNO, M.S.; MATSUMOTO, C.; FERRAZ, I. Texto Para Discussão - Biofármacos No Brasil: Características, Importância E Delineamento De Políticas Públicas Para Seu Desenvolvimento. Instituto De Pesquisa Econômica Aplicada.- Brasília : Rio De Janeiro : Ipea, 2018.

SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa. 2004; 1-9.

SAKAKI, K.; GIORNO, L.; DRIOLI, E. Lipase catalyzed optical resolution of racemic naproxen in biphasic enzyme membrane reactor. *J. Membr. Sci.*, 2001. **184**: p. 27-38.

SÁNCHEZ, V. M.; REBOLLEDO, F.; GOTOR, V. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 3070.

SANDSTROM, A. G.; WIKMARK, Y.; ENGSTROM, K.; NYHLÉN, J.; BACKVALL, JAN-E. Combinatorial reshaping of the *Candida antarctica* lipase A substrate pocket for enantioselectivity using an extremely condensed library. PNAS - Exploring Copper Compounds, v. 3, p. 78-83, 2012.

SANGEETHA, R.; ARULPANDI, I.; GEETHA, A. Bacterial lipases as potencial industrial biocatalysts: An overview. **Res. J. Microbiol.**, v. 6, p. 1-24, 2011.

SANTANIELLO, E.; FERRABOSCHI, P.; GRISENTI, P.; MANZOCCHI, A.; *Chem. Rev.* **1990**, *92*, 1071.

SANTANIELLO, E.; FERRABOSCHI, P.; GRISENTI, P.; MANZOCCHI, A.; The biocatalytic approach to the preparation of enantiomerically pure chiral building blocks. **Chem. Rev.** v. 92, n. 5, p. 1071-1140, 1992.

SASAKI, K.; GIORNO, L.; DRIOLI, E. "Lipase-catalyzed resolution of racemic naproxen in biphasic enzyme membrane reactors". *J. Memb. Sci.* **184**: 27-38, 2001.

SHELLEKENS, H. Biosimilar therapeutics – what do we need to consider? *NDT Plus*. p. 27-36, 2009.

SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* v. 37, p. 1608-1633, 1998.

SCHNELL, B., FABER, K., KROUTIL, W., Enzymatic racemization and its application to synthetic biotransformations, *Adv. Synth. Catal.* v.345, p.653-666, 2003.

SCHRAMM, H.; CHRISTOFFERS, J. Synthesis, resolution and absolute configuration of 4-amino-3-phenylpiperidine. *Tetrahedron: Asymmetry*, 20, 2724-2727, 2009.

SEHANPUTRI, P. S.; HILL, C. G. (1999). Biotechnology for the production of nutraceuticals enriched in conjugated linoleic acid: I. uniresponse kinetics of the hydrolysis of corn oil by a pseudomonas sp. lipase immobilized in a hollow fiber reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 64(5).

SHARMA, R; CHISTI, Y; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHARMA, N.; SHARMA, V. K.; SEO, S. Y. Screening of some medicinal plants for anti-lipase activity. *Journal of Ethnopharmacology*, Amsterdam, v.97, p.453–456, 2005.

SHELDON, R.A. Chirotechnology. Marcel Dekker Inc., New York. 1993.

SHELDON, R.A., LAU, R.M., SORGEDRAGER, M.J., RANTWIJK, F., SEDDON, K.R.. Biocatalysis in ionic liquids. *Green Chemistry*, 4:147-151, 2002.

SHELDON, R. A. Atom utilisation, *E* factors and the catalytic solution, *C. R. Acad. Sci.Paris, Série IIc, Chimie: Chemistry*, 2000, 3, 541-551.

SHI, Y.; BURN, P. Lipid metabolic enzymes: Emerging drug targets for the treatment of obesity. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 3, p. 695-710, 2004.

SIH, C. J.; WU, S -H. *Topics Stereochem.* **1989**, 19, 63.

SILVA, M. A. M.; MEDEIROS, V. C.; LANGONE, M. A.P.; FREIRE, D. M. G. Synthesis of monocaprin catalyzed by lipase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 105, p. 757-767, 2003.

SILVERMAN, R. B. **The organic chemistry of drug design and drug action**. Califórnia: Elsevier, 2004. 617p.

SILVESTRE, S.M. *Novos processos de oxidação ambientalmente aceitáveis usando esteroides como substratos*, Dissertação de Doutoramento apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2007. <http://hdl.handle.net/10316/215>.

SINHA, R.; SHUKLA, P. Current Trends in Protein Engineering: Updates and Progress". *Curr Protein Pept Sci*, **2019**, 20(5), 398-407.

SITTIG, M. Pharmaceutical manufacturing encyclopedia. 2nd ed. New Jersey, USA: Noyes Publications; 1988.

SKOUTA, R.; *Green Chem. Lett. and Rev.* 2009, 2, 3.

SKUPINSKA, K. A.; MCEACHERN, E. J.; BAIRD, I. R.; SKERLJ, R. T.; BRIDGER, G. J. *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 3546.

SOARES, F. B.; DE SOUZA, J. M.; Dimenstein, M. *Quim. Nova* **2008**, 31, 268.

SOLANO, D.M.; HOYOS, P.; HERNAIZ, M.J.; ALCANTARA, A.R. e SANCHEZ-MONTERO, J.M., Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs *Bioresource Technology* v. 115, p.196–207, 2012.

SONG, H.; TANG, L.; CHEN, W.; LI, J.; SUN, Z. FENG, J. Tianjin Weijie Technology Co., Ltd (CN). Method For Preparing Temsirolimus. US9018373 B2, 3 Jul. 2013, 28 Apr. 2015.

SONNET, P.E. Lipases Selectivities. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65(6):900-904, 1988.

SOUZA, S. P. **Ação inibitória de extratos de plantas sobre lipase pancreática com ênfase em *Baccharis trimera* (less.) DC.** 2009. 84p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) — Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SPIRO, T. G.; STILGLIANI, W. M.; *Química Ambiental*, 2ª ed., Pearson Prentice Hall: São Paulo, 2009.

SRIVASTAVA, R.K.; SRIVASTAVA, N. Search for obesity drugs: Targeting central and peripheral pathways. **Current Medicinal Chemistry - Immunology, Endocrine & Metabolic Agents**, v. 4, p. 75–90, 2004.

STECHER, H.; FABER, K.; *Synthesis* **1997**, 1.

STRAATHOF, A. J. J. Quantitative Analysis of Industrial Biotransformation. In: Liese A, Seelbach K, Wandrey C, editors. *Industrial Biotransformations*. Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2006.

SUGAI, T.; OHSAWA, S.; YAMADA, H. OHTA, H.; *Synthesis*. **1990**, 1112.

SUNDHOLM, O.; KANERVA, T. Enantioselectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase for the acetylation of 2-hydroxy carboxylic acid esters. *Models Chem.*, 1998. **135**: p. 625-640.

SURESH; SANDHU, J. S.; *Green Chem. Lett. and Rev.* 2011, 4, 4.

SVENDSEN, A.; SKJOET, M.; YAVER, D.; CHRISTENSEN, L. L. H.; LARSEN, S. E.; LUNDIN, N.; LAMSA M; GREGORY P. C. New lipase, useful for manufacturing a pharmaceutical composition for treating digestive disorders, pancreatic exocrine

insufficiency, pancreatitis, cystic fibrosis, or diabetes type I or II. Patent Number(s): WO2008079685-A2, 2008.

SZÜTS, A.; SZABÓ-RÉVÉSZ, P. Sucrose esters as natural surfactants in drug delivery systems – A mini-review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 334, p. 1-9, 2012.

TAISHO PHARMACEUTICAL Co., Ltd. (JP). Method of producing bicycle [3.1.0] hexane derivative using microbial enzymes. WO2009142184 A1, 21 Jun. 2008, 26 Nov. 2009.

TASKIN, O.C.; ADSAY, V. Lipase hypersecretion syndrome: A distinct form of paraneoplastic syndrome specific to pancreatic acinar carcinomas. *Semin. Diagn Pathol.*, **2019**, 36(4), 240-245.

TAVEL, J. A.; *Exp. Opin. Invest. Drugs* **2000**, 9, 917.

THALÉN, L. K.; ZHAO, D.; SORTAIS, J. B.; PAETZOLD, J.; HOBEN, C.; BÄCKVALL, J. E. (2009). A chemoenzymatic approach to enantiomerically pure amines using dynamic kinetic resolution: application to the synthesis of norsertaline. *Chemistry—A European Journal*, 15(14), 3403-3410.

THEIL, F.; *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2203.

TINCOM T. T. S.; “Otimização de parâmetros para a obtenção de ácido mandélico a partir de mandelato de etila utilizando lipases”. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêutica - Universidade Federal do Rio de Janeiro, pp. 85, 2003.

TISCHER, W., KASCHE, V., "Immobilized enzymes: crystal or carriers?", *Trends in Biotechnology*, v. 17, pp. 326-335, 1999.

TOPLAK, H.; MARHARDT, K. Reduction of obesity and improvement in metabolic parameters by inhibition of intestinal lipases: current results with Orlistat. **Acta Medical Australian**, v.25, p.142–145, 1998.

TRIPATHI, C. M.; AGARWAL, S. C.; BASU, S. K. *J. Ferm. Bioeng.* **1997**, 84, 487.

TROST, B. M. *Science*, 1991, 254, 1471–1477.

TSUTSUMI, K. Lipoprotein Lipase and Atherosclerosis. *Current Vascular Pharmacology*, **2003**, 1(1), 11-17.

TUCKER, J. L. Green Chemistry, a Pharmaceutical Perspective, *Org. Proc. Res. Dev.*, 2006, 10, 315-319.

VILCHÈZE, C.; WANG, F.; ARAI, M.; HAZBON, M.H.; COLANGELI, R.; KREMER, L.; WEISBROD, T.R.; ALLAND, D.; SACCHETTINI, J.C.; JACOBS, W.R. JR. Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis inhA* resolves the target of isoniazid. *Nat. Med.*, v.12, p.1027-1029, 2006.

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

VULFSON, E. N. Em *Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application*; Woolley, P.; Petersen, S. B., eds.; Cambridge University Press: Great Britain, 1994, p. 271.

WAKABAYASHI, H, “Enzyme-catalyzed transformations of sulfur-containing flavor precursors”, *Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation*, Lehrstuhl für Allgemeine Lebensmitteltechnologie der Technischen Universität München, München, 2004.

WANG, J.; LIAB, G.; REETZ, M. T. Enzymatic site-selectivity enabled by structureguided directed evolution. *Chem. Commun.*, 2017, 53, 3916-3928.

WANG H.; GUO Y.; WANG T.; CAI Y.; SUN P. Shanghai Inst. Materia Medica (CN). Enyne bromide compounds and preparation method and use thereof. CN 102850208 A, 29 Jun. 2011, 2 Jan. 2013.

WANG, P-Y.; TSAI, S-W. Hydrolytic resolution of (*R,S*)-ethyl mandelate in biphasic media via *Klebsiella oxytoca* hydrolase. *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 266-271, 2005.

WEIGLE, D.S. Pharmacological therapy of obesity: Past, present, and future. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, p. 2462-2469, 2003.

WENDER, P. A.; VERMA, V. A.; PAXTON, T. J.; PILLOW T. H. *Acc. Chem. Res.*, 2008, 41, 40–49.

WIERZBICKI, A.S.; VILJOEN, A. Alipogene tiparvovec: gene therapy for lipoprotein lipase deficiency. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2013**, 13(1), 7-10.

WIGGERS, H. J. Planejamento de inibidores da enzima gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* por biocalorimetria.2007.Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos.São Carlos, 2007.

WHELAN, J. Antagonistic effects of dietary arachidonic acid and n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Nutr.* , v. 126, n. 4 Suppl, p. 1086S-1091S, 1997.

WTN. Wisconsin Technology Network. Disponível em:
<<http://wistechnology.com/articles/4924/>> Acesso em 20 de Jan de 2018.

WUTS, P. G. M. *Greene’s Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, 5th edn, 2014.

WYETH. GU, J.; CAI, P.; RUPPEN, M.E. **Métodos para a síntese de 42-hemiésteres de rapamicina regioespecíficas e 32-ésteres de FK506 regioespecíficos com ácidos dicarboxílicos são descritos. Os métodos envolvem catalisar a reação entre uma rapamicina ou um FK-506 e um anidrido dicarboxílico ou um éster bifuncional ativado de ácido dicarboxílico com uma lipase.** BR n. PI 0509810-6 A2,12 Abr. 2005, 18 Set 2007.

XU, T.; CHI, B.; CHU, M.; ZHANG, Q.; ZHAN, S.; SHI, R.; XU, H.; MAO, C. Hemocompatible ϵ -polylysine-heparin microparticles: A platform for detecting triglycerides in whole blood. *Biosens. Bioelectron.*, **2018**, *15*, 99, 571-577.

XU, Z.; FLAVIN, M.T; ZEMBOWER, D. Sarawak Medichem Pharmaceuticals Inc. (Us). Calanolide Analogues And Methods Of Their Use. US 6277879 B1, 15 Oct. 1998, 21 Aug. 2001.

YADAV, G.D.; SIVAKUMAR, P. Enzyme-catalyzed optical resolution of mandelic acid via (R,S)-methyl mandelate in non-aqueous media. *Biochem. Eng. J.* 19, 101-107, 2004.

YADAV, G. D.; JOSHI, S. S.; LATHI, P.S. Enzymatic synthesis of isoniazid in non-aqueous medium. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 36, p. 217–222, 2005.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M.; *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *23*, 438.

YANG, G.; WU, J.; XU, G.; YANG, L. Enhancement of the activity and enantioselectivity of lipase in organic systems by immobilization onto low-cost support. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 57, p. 96-103, 2009.

YUAN, C.; XU, C.; ZHANG, Y. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 6095.

YUKO, F.; SUMIO, A.; MITSURU, M. Suntory Ltd (JP). Anti-obesity agent comprising compound containing benzotropolone ring. (JP).US 20150038573 A1, 20 Oct. 2014, 5 Feb. 20

Apêndices

APÊNDICE A – ILUSTRAÇÃO DA BUSCA POR PATENTES NA BASE SCIFINDER UTILIZANDO O TERMO “LIPASE”.

The image shows a sequence of three screenshots from the SciFinder web application, illustrating the search process for patents related to 'lipase'.

Top Screenshot: The user is on the 'Substance Identifier' page. The search term 'lipase' is entered into the search box and circled in red. The interface includes navigation tabs for 'Explore', 'Saved Searches', and 'SciPlanner'. The breadcrumb trail shows: Substance Identifier "lipase" > substances (1) > get references (63834) > refine "Patents only" (16988).

Middle Screenshot: The search results are displayed. The 'SUBSTANCES: SUBSTANCE IDENTIFIER' section shows a list of results. The first result, '9001-62-1', is highlighted with a red box and labeled 'Lipase Register Number'. The 'Analyze' and 'Refine' tabs are visible on the left. The breadcrumb trail is: Substance Identifier "lipase" > substances (1).

Bottom Screenshot: The user has clicked on 'get references (63834)', which is circled in red. The 'REFERENCES' section is active, showing a list of 63834 references. The first two references are visible:

- Synthesis of L-menthol oleate catalyzed by lipase immobilized on modified macroporous resins**
By Li, Xue-yu; Zhou, Hai-yan; Zhou, Hua; W ei, Ping
From Gaixiao Huaxue Gongcheng Xuebao (2018), 32(5), 1134-1139. | Language: Chinese, Database: CAPLUS
L-menthol oleate is usually synthesized with menthol and fatty acid, and it is an efficient mint with fresh odor, which has important applications in cosmetics, medicine and food industry. Enzymic methods are usually the optimal synthetic method. The esterification of L-menthol oleate was studied in solvent-free system using lipase immobilized on macroporous resin as the catalyst, and the optimal reaction conditions for enzymic synthesis of L-menthol oleate were studied. The best esterification rates were 91% (NKA) and 89.8% (HA) under conditions of 1 mol·L⁻² L-menthol, molar ratio of acid ...
- The modification of polyacrylonitrile hollow membrane by polyethyleneimine to immobilize lipase**
By Lu, Jia-wei; Li, You-ran; Shi, Gui-yang
From Fenzhi Cuhua (2018), 32(1), 79-89. | Language: Chinese, Database: CAPLUS
Polyacrylonitrile is a nitrile-rich polymer and easy to be surface modified, and it has been widely applied in membrane separations. In this study, polyacrylonitrile hollow membrane was used as a support of enzyme immobilization by chem. crosslinking polyethyleneimine. Sodium alginate was added during immobilization, and the immobilized lipase was post-treated by CaCl₂. The ...

CAS Solutions **SCIFINDER** A CAS SOLUTION Preferences | SciFinder Help Sign Out
Welcome Adede Antunes

Explore Saved Searches **SciPlanner** Save Print Export

Substance Identifier "lipase" > substances (1) > get references (63834) > **refine "Patents only" (16988)**

REFERENCES **Analyze Refine Categorize** Sort by: Accession Number ↓ 0 of 16988 References Selected Page: 1 of 850

Analyze by: CA Section Title

Fermentation and Bioindustrial Chemistry	3300
Food and Feed Chemistry	2034
Enzymes	1999
Surface Active Agents and Detergents	1758

1. **A process for preparation of cereal fractions**
 Quick View PATENTPAK
 By Kvist, Sten
 From Swed. Pat. Appl. (2018), SE 2017050661 A1 20181130. | Language: Swedish, Database: CAPLUS
 A process for prepn. of cereal fractions. Oat grains or barley grains are subjected to a dry process followed by a wet process. The dry process comprises the following steps: (a) subjecting the grains to a dry heat treatment reducing lipase activity; and (b) subjecting the heat treated grains to milling substantially sepg. endosperm from bran, and isolating an endosperm enriched fraction from a bran enriched fraction. The wet process comprises the following steps: (c) subjecting the endosperm enriched fraction to wet fractionation substantially sepg. starch from protein, optionally followed...

2. **Coated controlled-release insecticide dedica ted to peanuts and preparation method thereof**
 Quick View PATENTPAK
 By Zhang, Jiale; Guo, Feng; Wan, Shubo; Li, Xinguo; Liu, Yiyang; Yang, Sha; Meng, Jingjing; Geng, Yun; Zhang, Zheng
 From PCT Int. Appl. (2019), WO 2019015659 A1 20190124. | Language: Chinese, Database: CAPLUS

CAS Solutions **SCIFINDER** A CAS SOLUTION Preferences | SciFinder Help Sign Out
Welcome Adede Antunes

Explore Saved Searches **SciPlanner** Save Print Export

Substance Identifier "lipase" > substances (1) > get references (63834) > refine "Patents only" (16988) > **keep analysis "CA Section Title" (5173)**

REFERENCES **Analyze Refine Categorize** Sort by: Accession Number ↓ 0 of 5173 References Selected Page: 1 of 259

Analyze by: CA Section Title

Enzymes	1999
Pharmaceuticals	1233
Biochemical Genetics	909
Pharmacology	641
Immunochimistry	114
Mammalian Biochemical	

1. **Pross optimized enzymes**
 Quick View PATENTPAK
 By Zimmerman, Lior; Baran, Dror
 From PCT Int. Appl. (2019), WO 2019014118 A1 20190117. | Language: English, Database: CAPLUS
 The present invention provides enzymes that have been optimized by implementation of Protein Repair One Stop Shop (PROSS), an algorithm that generates protein design(s) for enhanced stability without changing either enzymic properties or enzyme active site conformation of the resp. enzyme. The protein design(s) generated by PROSS introduce mutations to the amino acid sequence of a wild-type protein, resulting in a mutated amino acid sequence that encodes a variant of the wild-type enzyme, i.e., an enzyme variant, which has an enhanced stability, core packing, surface polarity and backbone rig...

2. **Application of polyinosinic: polycytidylic acid in prevention and treatment of pancreatitis and related disease**
 Quick View PATENTPAK
 By Ma, Feng; Huang, Chaohao; Chen, Shengchuan; Huang, Zhonglin
 From Faming Zhuanli Shenqing (2019), CN 109200056 A 20190115. | Language: Chinese, Database: CAPLUS

APÊNDICE B – ILUSTRAÇÃO DO RESULTADO DA BUSCA POR PATENTES NA BASE SCIFINDER UTILIZANDO O TERMO “LIPASE”.

Nº	TÍTULO DA PATENTE	DEPOSITANTE	INFORMAÇÃO DA PATENTE	APLICAÇÃO
1	Preparation of N-formylleucine 1-(oxetanonylmethyl)alkyl esters and analogs as pancreas lipase inhibitors	Hoffmann-La Roche, Inc., USA	Jun 05, 1990, US 4931463, A	Alvo Terapêutico
2	Lipase-inhibiting polymers for treatment of obesity, and preparation thereof	Geltex Pharmaceuticals, Inc., USA	Jul 15, 1999, WO 9934786, A2	Alvo Terapêutico
3	Oxetanone derivatives	Pro Chemical, USA	Aug 09, 2001, US 20010012852, A1	Alvo Terapêutico
4	Lipase-inhibiting polymers, their preparation, and their use for the treatment of obesity	GelTex Pharmaceuticals, Inc., USA	Jul 31, 2001, US 6267952, B1	Alvo Terapêutico
5	Fat-binding polymers for treatment of obesity and hypertriglyceridemia	Geltex Pharmaceuticals, Inc., USA	Jul 24, 2001, US 6264937, B1	Alvo Terapêutico
6	Use of oxetanone derivatives as lipase inhibitors	USA	May 10, 2001, WO 2001032616, A2	Alvo Terapêutico
7	Lipase-inhibiting polymers for treatment of obesity	Geltex Pharmaceuticals, Inc., USA	Mar 05, 2002, US 6352692, B1	Alvo Terapêutico
8	Methods and therapeutic combinations for the treatment of obesity using sterol absorption inhibitors	Schering Corporation, USA	Jun 26, 2003, US 20030119428, A1	Alvo Terapêutico
9	Use of non-digestible polymeric foams to sequester ingested materials thereby inhibiting their absorption by the body	The Procter & Gamble Company, USA	May 15, 2003, US 20030091610, A1	Alvo Terapêutico
10	Combination therapy using an appetite suppressant and/or a metabolic rate enhancer and/or a nutrient absorption inhibitor for the treatment of obesity and obesity-related disorders	USA	Jun 24, 2004, US 20040122033, A1	Alvo Terapêutico
11	Preparation of oolongtheanin-3'-O-gallate as lipase inhibitor	Suntory Limited, Japan	Dec 29, 2005, WO 2005123725, A1	Alvo Terapêutico
12	Epigallocatechin gallate dimer and trimer having lipase and antioxidative activity	Suntory Limited, Japan	Dec 08, 2005, WO 2005116005, A1	Alvo Terapêutico
13	Anti-obesity agent comprising compound containing benzotropolone ring	Suntory Holdings Limited, Japan	Nov 25, 2010, WO 2010134595, A1	Alvo Terapêutico
14	Enyne bromide compounds as pancreatic lipase inhibitor and their preparation	Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Peop. Rep. China	Jan 02, 2013, CN 102850208, A	Alvo Terapêutico
15	Preparation of novel rotenone derivatives and a use thereof	Korea Atomic Energy Research Institute, S. Korea	May 01, 2014, WO 2014065510, A1	Alvo Terapêutico
16	Amylin analogues and use thereof in treatment of disorders including obesity, excess food	Zealand Pharma A/S, Den.; Boehringer	Sep 22, 2016, WO 2016146739, A1	Alvo Terapêutico

	intake and assocd. metabolic diseases such as diabetes	Ingelheim International GmbH		
17	Process for the preparation of Tamiflu and related 4,5-diaminoshikimic acid derivatives via Diels-Alder cycloaddition	F. Hoffmann-La Roche A.-G., Switz.	Aug 29, 2001, EP 1127872, A1	Síntese Orgânica e/ou Resolução de Racemato
18	Preparation of calanolide A analogues as antiviral agents	Sarawak Medichem Pharmaceuticals, Inc., USA	Aug 21, 2001, US 6277879, B1	Síntese Orgânica e/ou Resolução de Racemato
19	Process for preparing fluoroleucine alkyl esters	USA	Oct 20, 2005, US 20050234128, A1	Síntese Orgânica e/ou Resolução de Racemato
20	Production of rapamycin 42-ester with 2,2-bis(hydroxymethyl)propionic acid (CCI-779) and its proline analog	Wyeth, USA	Oct 20, 2005, US 20050234086, A1	Síntese Orgânica e/ou Resolução de Racemato
21	41-Methoxy isotope labeled rapamycin 42-ester	Wyeth, John, and Brother Ltd., USA	May 10, 2007, US 20070105888, A1	Síntese Orgânica e/ou Resolução de Racemato
22	Process for the preparation of (S)-(+)-3-(aminomethyl)-5-methylhexanoic acid	Dipharma Francis S.r.l., Italy	Nov 19, 2008, EP 1992609, A1	Síntese Orgânica e/ou Resolução de Racemato
23	Preparation and application of 4-acylated shikimic acid and its lower alcoholic ester	Jiangnan University, Peop. Rep. China	Oct 15, 2008, CN 101284781, A	Síntese Orgânica e/ou Resolução de Racemato
24	Glyceride esters of acetoacetate and/or 3-hydroxybutyrate for the treatment of diseases associated with reduced neuronal metabolism of glucose	Stepan Company, USA	Jan 10, 2008, WO 2008005818, A1	Síntese Orgânica e/ou Resolução de Racemato
25	Method of producing bicyclo[3.1.0]hexane derivative using microbial enzymes	Taisho Pharmaceutical Co.,Ltd., Japan	Nov 26, 2009, WO 2009142184, A1	Síntese Orgânica e/ou Resolução de Racemato
26	Crystalline form of a (S)-aminomethyl-5-methyl-hexanoic acid prodrug and methods of use	Xenoport, Inc., USA	Jul 30, 2009, WO 2009094563, A2	Síntese Orgânica e/ou Resolução de Racemato
27	A novel process for synthesis of a substituted cyclopropane intermediate and a process for synthesis of pregabalin from same	Pharmed Medicare Pvt. Ltd., India	Jun 05, 2009, IN 2007MU02055, A	Síntese Orgânica e/ou Resolução de Racemato
28	A chemo-enzymatic approach to the synthesis of pimecrolimus	Poli Industria Chimica SpA, Italy	Nov 25, 2010, WO 2010134027, A1	Síntese Orgânica e/ou Resolução de Racemato
29	A process for preparation of hexadecyl cis-9-tetradecenoate and hexadecyl cis-10-tetradecenoate	Council of Scientific & Industrial Research, India	Jul 15, 2010, WO 2010079514, A1	Síntese Orgânica e/ou Resolução de Racemato
30	Epigallocatechin gallate dimer and trimer having lipase and antioxidative activity	Suntory Holdings Ltd., Japan	Apr 13, 2011, JP 4668553, B2	Síntese Orgânica e/ou Resolução de Racemato

31	Method for the preparation of pregabalin	Lipotec S.A., Spain	Oct 04, 2012, WO 2012130775, A1	Síntese Orgânica e/ou Resolução de Racemato
32	A chemo-enzymatic approach to the synthesis of pimecrolimus	Poli Industria Chimica SpA, Italy	Jun 06, 2012, IT 1394309, B1	Síntese Orgânica e/ou Resolução de Racemato
33	Process for the preparation of lacosamide	Cambrex Karlskoga AB, Swed.; Snodin, Michael	May 31, 2012, WO 2012069855, A1	Síntese Orgânica e/ou Resolução de Racemato
34	Bioactive 4-vinylcatechol polymerized product, its manufacture, and uses	Uha Mikakuto Co., Ltd., Japan	Mar 29, 2012, JP 2012062293, A	Síntese Orgânica e/ou Resolução de Racemato
35	An improved green process for the preparation of pregabalin from isovaleraldehyde via enzymatic enantioselective hydrolysis of alkyl 3-cyano-5-methylhexanoate	Hikal Limited, India	May 15, 2014, WO 2014072785, A2	Síntese Orgânica e/ou Resolução de Racemato
36	Specifically targeted catalytic antagonists and uses thereof	Genencor International, Inc., USA; The University of Toronto	Nov 02, 2000, WO 2000064485, A2	Síntese Dirigida e Planejamento de Fármaco
37	Enzyme-cleavable prodrug compounds	Belg.	Oct 03, 2002, US 20020142955, A1	Síntese Dirigida e Planejamento de Fármaco
38	Enzyme-sensitive prodrugs with enhanced penetration into cells	D-Pharm Ltd., Israel	Jul 02, 2002, US 6413949, B1	Síntese Dirigida e Planejamento de Fármaco
39	Tripeptide prodrug compounds	Corixa Corporation, USA	Jan 03, 2002, WO 2002000263, A2	Síntese Dirigida e Planejamento de Fármaco
40	Selective protein degradation by ligand-targeted enzymes: catalytic antagonists	UK	Sep 02, 2004, US 20040170618, A1	Síntese Dirigida e Planejamento de Fármaco
41	Amino acid and peptide carriers for oral delivery of active agent	New River Pharmaceuticals Inc., USA	Apr 01, 2004, US 20040063628, A1	Síntese Dirigida e Planejamento de Fármaco
42	Fluorogenic enzyme activity assay using substrates containing fragmentable linkers	Applera Corporation, USA	Jan 05, 2006, US 20060003383, A1	Síntese Dirigida e Planejamento de Fármaco
43	Percutaneous absorption promoting agent and percutaneous absorption preparation using the same	Cosmed Pharmaceutical Co., Ltd., Japan	Oct 25, 2007, WO 2007119467, A1	Síntese Dirigida e Planejamento de Fármaco
44	Cyclodextrin nanosponges as carriers for biocatalysts and in the delivery and release of enzymes, proteins, vaccines, and antibodies	Sea Marconi Technologies S.A.S. di Vander Tumiatti, Italy	Sep 10, 2008, IT 2008MI1056, A1	Síntese Dirigida e Planejamento de Fármaco
45	Compositions comprising polyunsaturated fatty acid monoglycerides or derivatives thereof and uses thereof as cancer chemopreventive agents	Centre de Recherche sur les biotechnologies marines, Can.	Sep 25, 2008, WO 2008113177, A1	Síntese Dirigida e Planejamento de Fármaco

46	Fluorinated lipids and methods of use as delivery agents to cells	Tufts University, USA	Apr 02, 2009, WO 2009042972, A1	Síntese Dirigida e Planejamento de Fármaco
47	Nano-sized particles comprising multi-headed amphiphiles for targeted drug delivery	Ben-Gurion University of the Negev Research and Development Authority, Israel	Nov 11, 2010, WO 2010128504, A2	Síntese Dirigida e Planejamento de Fármaco
48	Manufacture of lipase polymer biocatalytic nanoparticle	Tsinghua University, Peop. Rep. China; PetroChina Co., Ltd.	Nov 02, 2011, CN 102229923, A	Síntese Dirigida e Planejamento de Fármaco
49	Assisted enzyme replacement therapy	The University of California, USA	Mar 24, 2011, WO 2011034951, A2	Síntese Dirigida e Planejamento de Fármaco
50	Conjugate-based antifungal and antibacterial prodrugs	Vyome Biosciences, India	Dec 27, 2012, WO 2012177986, A2	Síntese Dirigida e Planejamento de Fármaco
51	Method for the synthesis of porphyrin-phospholipid conjugates	University Health Network, Can.	Dec 13, 2012, WO 2012167350, A1	Síntese Dirigida e Planejamento de Fármaco
52	Nanostructured gels capable of controlled release of encapsulated agents	The Brigham and Women's Hospital, Inc., USA; Massachusetts Institute of Technology	Mar 29, 2012, WO 2012040623, A2	Síntese Dirigida e Planejamento de Fármaco
53	Method for preparing protein cage, in situ method for preparing hydrophobic additive-contg. core-shell structured polymer-protein particles, and its use	Pusan National University Industry-University Cooperation Foundation, S. Korea; Korea Research Institute of Chemical Technology; Gachon University of Industry-Academic Cooperation Foundation	Sep 25, 2014, WO 2014148713, A1	Síntese Dirigida e Planejamento de Fármaco
54	Therapeutic hyperbranched polyglycerol encapsulated biomolecules	University of California, USA	Aug 27, 2015, WO 2015127347, A1	Síntese Dirigida e Planejamento de Fármaco
55	Bolaamphiphilic compounds, compositions and uses thereof for delivering HIV drugs	Israel	Apr 16, 2015, US 20150104502, A1	Síntese Dirigida e Planejamento de Fármaco
56	Preparation of dopamine and its derivatives fast cross-linked surfactant-enzyme nano composite catalyst	Nanjing Tech University, Peop. Rep. China	Sep 15, 2017, CN 107164358, A	Síntese Dirigida e Planejamento de Fármaco