

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/02/2024.

LAERTE GANÉO NETO

Transesterificação enantiosseletiva de álcoois terciários propargílicos:
estudos de resolução cinética e resolução cinética dinâmica

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

Orientador: Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre

Araraquara
2023

G196t Ganéo Neto, Laerte
Transesterificação enantiosseletiva de álcoois
terciários propargílicos : estudos de resolução cinética e
resolução cinética dinâmica / Laerte Ganéo Neto. --
Araraquara, 2023
106 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual
Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara
Orientador: Humberto Márcio Santos Milagre

1. Biocatálise. 2. Transesterificação. 3. Lipase. 4.
Catalisadores de vanádio. 5. Química verde. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca
do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Transesterificação enantiosseletiva de álcoois terciários propargílicos: estudos de resolução cinética e resolução cinética dinâmica"

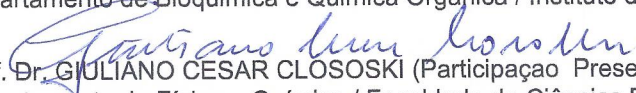
AUTOR: LAERTE GANÉO NETO

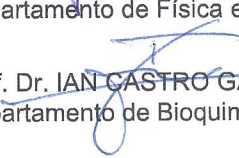
ORIENTADOR: HUMBERTO MÁRCIO SANTOS MILAGRE

COORIENTADOR: HUMBERTO MÁRCIO SANTOS MILAGRE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Química, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. HUMBERTO MÁRCIO SANTOS MILAGRE (Participação Presencial)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. GIULIANO CESAR CLOSOSKI (Participação Presencial)
Departamento de Física e Química / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - Ribeirão Preto


Prof. Dr. IAN CASTRO GAMBOA (Participação Presencial)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Araraquara, 27 de fevereiro de 2023

DADOS CURRICULARES

Dados Pessoais

Nome: Laerte Ganéo Neto

Nome em citações bibliográficas: Neto, L. G.

Filiação: Analice Marchiori Ganéo

Laerte Ganéo Júnior

Data de nascimento: 05 de agosto de 1998

Naturalidade: Leme/SP

Nacionalidade: Brasileira

Formação acadêmica

- Curso de pós-graduação modalidade Mestrado em Química, área de concentração: Química Orgânica, Título: “Resolução cinética dinâmica quimioenzimática de álcoois terciários propargílicos” sob a orientação do Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre, no Instituto de Química - UNESP Araraquara, no período de 2021 a 2023 com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).
- Graduado em Bacharelado em Química pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) de 2017 a 2021.

Formação Complementar

- Curso de curta duração “Química Supramolecular: Aplicações em materiais e dispositivos” (Carga horária: 8h) no Instituto de Química – UNESP Araraquara, 2018.
- Curso de curta duração “Contribuições da Inorgânica e da Orgânica na Química Medicinal” (Carga horária: 8h) no Instituto de Química – UNESP Araraquara, 2018.
- Curso de curta duração “Química Medicinal” (Carga horária: 6h) no Instituto de Química – UNESP Araraquara, 2019.
- Curso de curta duração “Cosmetologia: Emulsões e Análise Sensorial” (Carga horária: 2h) de forma remota, 2020.
- Curso de curta duração “Biocombustíveis: mobilidade sustentável” (Carga horária: 4h) no Instituto de Química – UNESP Araraquara, 2022.

Estágios e Bolsas auxílio

- Bolsa de mestrado no período de 2021 a 2022, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).
- Estágio à docência realizado no segundo semestre de 2021 na disciplina Química Sustentável, disciplina optativa para os cursos de Bacharelado em Química, Bacharelado em Química Tecnológica, Engenharia Química e Licenciatura em Química, sob supervisão da Profa. Dra. Cintia Duarte Freitas Milagre.
- Monitor com bolsa na disciplina de “Físico-Química Geral” sob orientação da Profa. Dra. Hebe de Las Mercedes Villullas, no período de 01/11/2020 a 31/03/2021.
- Estágio de Iniciação Científica sob orientação do Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre no Instituto de Química, UNESP, Araraquara, sem bolsa, em 2019 - 2020.
- Monitor com bolsa na disciplina de “Físico-Química Geral” sob orientação da Profa. Dra. Hebe de Las Mercedes Villullas, no período de 21/08/2018 a 08/12/2018.

Apresentação de trabalhos em congressos

- GANEO NETO, L.; MILAGRE, C. D. F.; MILAGRE, H. M. S. Kinetic resolution of propargyl tertiary alcohols by *Candida antarctica* lipase A. 18th Brazilian Meeting on Organic Synthesis (18th BMOS), Tiradentes – MG, 2022.

Participação em eventos

- 18th Brazilian Meeting on Organic Synthesis (18th) BMOS, Tiradentes, 2022.
- 52^a Semana da Química, Araraquara, 2022.
- 24th Annual Green Chemistry and Engineering Conference (remoto), 2020.
- 49^a Semana da Química, Araraquara, 2019.
- 48^a Semana da Química, Araraquara, 2018.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre, pelos ensinamentos, suporte, confiança, paciência e pela oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa.

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

À Profa. Dra. Cintia Duarte Freitas Milagre, pelos ensinamentos e contribuições a este trabalho.

Aos colegas e amigos do Milagre Lab, em especial à Laíza, Iris, Shirley, Letícia, Pedro, Ana Lua, Maria Eduarda e Victória, pela parceria, suporte e risadas, que tornaram a rotina mais divertida.

Aos técnicos e funcionários do IQ, João, Juliana, Nivaldo, Albertinho, Naira, Márcia, Marquinhos, Rogério, Antônio Carlos.

Aos meus pais, Analice e Júnior, à minha irmã Isis, e demais membros da família, por todo apoio, amor, carinho, incentivo e compreensão nos momentos de ausência.

A todos os meus amigos, pelo apoio, conselhos e momentos de descontração.

Ao Gabriel, pelo companheirismo, carinho, conselhos e todo o suporte, tornando esse período mais leve.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro ao grupo de pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Na natureza nada se cria, nada se perde, tudo se transforma.”

Antoine Lavoisier

RESUMO

Os álcoois terciários propargílicos são importantes blocos construtores de interesse da indústria farmacêutica. No entanto, a síntese enantiosseletiva dos mesmos ainda é um grande desafio para os químicos orgânicos sintéticos. A resolução cinética enzimática desses álcoois, via transesterificação, foi pouco explorada e não existe até o presente momento uma metodologia de resolução cinética dinâmica para tais compostos. Neste contexto, o presente trabalho visou o desenvolvimento de uma metodologia de resolução cinética dinâmica quimioenzimática para a obtenção de álcoois terciários propargílicos enantiomericamente puros utilizando um sistema composto por uma lipase e um catalisador heterogêneo de vanádio. Neste sistema catalítico, a enzima foi responsável pela etapa enantiosseletiva e o catalisador de vanádio pela etapa de racemização. O substrato modelo utilizado foi o 2-fenil-3-butin-2-ol, por ser o mais explorado em trabalhos anteriores. Inicialmente, foi realizada uma triagem com uma série de lipases disponíveis comercialmente, utilizando o acetato de vinila como doador de acila e heptano como solvente. A única enzima que demonstrou atividade perante o substrato, entretanto, foi a lipase A de *Candida antarctica* (CAL-A), o que corrobora com os resultados da literatura. Em seguida, foram investigados os efeitos dos demais componentes envolvidos na resolução cinética: temperatura, solvente, identidade e concentração do doador de acila e carga de enzima. O melhor resultado foi obtido utilizando um sistema composto pelo substrato, CAL-A, butirato de vinila e isooctano a 30 °C, no qual a conversão foi de 33% e o ee de 95% após 48 horas. Outros álcoois terciários com modificações em cada um dos substituintes do substrato modelo foram investigados, embora nenhum deles tenha fornecido resultados promissores. Foram realizadas também tentativas de combinar o protocolo de resolução cinética desenvolvido com o catalisador de vanádio (VOSO₄), mas diversos fatores cooperaram para que o resultado fosse inferior ao anterior. Como conclusão, foi desenvolvido um protocolo inédito para a resolução cinética do 2-fenil-3-butin-2-ol, com melhoria frente ao tempo de reação e utilização da CAL-A disponível comercialmente.

Palavras-chave: álcoois terciários propargílicos; resolução cinética; lipase; catalisador heterogêneo de vanádio.

ABSTRACT

Propargyl tertiary alcohols are essential building blocks for the pharmaceutical industry. However, their enantioselective synthesis is still a great challenge for organic chemists. The enzymatic kinetic resolution of these alcohols via transesterification was little explored, and there is no methodology of dynamic kinetic resolution employing such compounds until now. In this context, the present work aimed to develop a chemoenzymatic dynamic kinetic resolution protocol for obtaining enantiomerically pure propargyl tertiary alcohols using a system composed of a lipase and a heterogeneous vanadium catalyst. In this catalytical system, the enzyme was responsible for the enantioselective step, while the vanadium catalyst was responsible for the racemization step. The model substrate used was 2-phenyl-3-butyn-2-ol, for being the most explored in previous works. Initially, a screening was performed with a series of lipases, using vinyl acetate as the acyl donor and heptane as the solvent. However, the only enzyme that showed activity towards the substrate was lipase A from *Candida antarctica* (CAL-A), which corroborates the literature results. Then, the effects of the other components involved in the kinetic resolution were investigated: temperature, solvent, identity and concentration of acyl donor, and enzyme loading. The best result was obtained using a system composed of the substrate, CAL-A, vinyl butyrate, and isooctane at 30 °C, in which the conversion was 33% and the ee 95% after 48 hours. Other tertiary alcohols with modifications in each of the substituents of the model substrate were investigated, although none provided promising results. Attempts were also made to combine the kinetic resolution protocol with the vanadium catalyst (VOSO₄), but several factors cooperated so that the result was inferior to the previous one. In conclusion, an unprecedented methodology for the kinetic resolution of 2-phenyl-3-butyn-2-ol was developed, with improvements in reaction time and using a commercially available CAL-A.

Keywords: propargyl tertiary alcohols; kinetic resolution; lipase; heterogeneous vanadium catalyst.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas dos enantiômeros do linalol.....	16
Figura 2. Estrutura do gosonorol	17
Figura 3. Medicamentos antifúngicos da classe dos “azóis”	18
Figura 4. Estrutura dos 1,2,3-triazóis com atividade antifúngica	18
Figura 5. Os 12 princípios da química verde	21
Figura 6. Representação esquemática da estrutura das alfa/beta-hidrolases e tríade catalítica	26
Figura 7. Influência do oxigênio carbonílico da cavidade oxianion na ligação do substrato.....	27
Figura 8. Aplicação da Regra de Kazlauskas para o 1-feniletanol	28
Figura 9. Estrutura tridimensional da CAL-A	29
Figura 10. Ancoragem molecular de diferentes doadores de acila no bolsão hidrofóbico da CAL-A	63
Figura 11. Cromatograma (GC-FID) comparando o perfil de 1a formado com diferentes doadores de grupo acetil em coluna Hydrodex® β -3P	65
Figura 12. Sistema para adição do substrato em fluxo ao balão contendo CAL-A...69	69
Figura 13. Estruturas dos álcoois terciários bicíclicos	71
Figura 14. Comparação dos sistemas (a) sem compartimentalização e (b) com compartimentalização dos catalisadores.....	76
Figura 15. Mudança no aspecto da enzima com o passar do tempo	76
Figura 16. Cromatograma da resolução cinética dinâmica com compartimentalização após 72 horas de reação.....	79
Figura 17. Cromatograma indicando a coeluição de um subproduto a (S)- 1b	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das enzimas pela IUBMB.....	25
Tabela 2. Resolução cinética via hidrólise com esterase BS2 de <i>Bacillus subtilis</i> e variantes.....	32
Tabela 3. Transesterificação do 2-fenil-3-butin-2-ol utilizando CAL-A em diferentes suportes de imobilização e acetato de vinila como doador de acila.....	33
Tabela 4. Comparação entre a enzima CAL-A e variante L367G frente à transesterificação do 2-fenil-3-butin-2-ol	34
Tabela 5. RCD quimioenzimática de álcoois secundários aromáticos e heteroaromáticos.....	37
Tabela 6. Condições reacionais da triagem inicial com CAL-A e acetato de vinila na resolução cinética de (rac)- 1	49
Tabela 7. Avaliação de condições reacionais utilizando a lipase A de <i>Candida antarctica</i> na resolução cinética de (rac)- 1	56
Tabela 8. Triagem de lipases para a resolução cinética de (rac)- 1 utilizando as condições da entrada 7 da tabela 7	57
Tabela 9. Efeito da temperatura na resolução cinética de (rac)- 1 em comparação com a literatura.....	59
Tabela 10. Efeito do solvente na resolução cinética de (rac)- 1	61
Tabela 11. Efeito do doador de acila na resolução cinética de (rac)- 1	62
Tabela 12. Efeito da concentração de doador de acila e carga de enzima na resolução cinética de (rac)- 1	65
Tabela 13. Efeito da concentração de doador de acila e carga de enzima na resolução cinética de (rac)- 1 (novas entradas)	67
Tabela 14. Avaliação do escopo de substratos no protocolo de RC desenvolvido para (rac)- 1	73
Tabela 15. Acompanhamento da resolução cinética dinâmica sem compartimentalização	77
Tabela 16. Acompanhamento da resolução cinética dinâmica com compartimentalização	80

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Álcool terciário propargílico precursor na síntese do Efavirenz	19
Esquema 2. Estratégias para a síntese enantiosseletiva de álcoois terciários	19
Esquema 3. Processo BASF para a resolução cinética dinâmica de aminas secundárias com CAL-B.....	22
Esquema 4. Representação reduzida da síntese enzimática total do Islatravir (Merck)	23
Esquema 5. Esquema gnérico de uma resolução cinética	23
Esquema 6. Reações catalisadas por lipases (transesterificação e hidrólise)	24
Esquema 7. Ciclo catalítico da reação de transesterificação catalisada pela lipase A de <i>Candida antarctica</i>	31
Esquema 8. Resolução cinética dinâmica quimioenzimática do 1-feniletanol	35
Esquema 9. Mecanismo de racemização do (S)-1-feniletanol via formação de carbocátion.....	36
Esquema 10. Competição entre o processo de racemização de racemização de (S)-1 e reações laterais de eliminação e rearranjo Meyer-Schuster.....	38
Esquema 11. RCD quimioenzimática de álcoois terciários benzílicos cíclicos	39
Esquema 12. Síntese dos ésteres racêmicos (rac)- 1ac com cloretos de acila.....	54
Esquema 13. Engenharia do meio reacional na resolução cinética de (rac)- 1	58
Esquema 14. Síntese de álcoois terciários propargílicos racêmicos via adição nucleofílica com reagente de Grignard às cetonas precursoras	71
Esquema 15. Escopo de substratos: variação dos substituintes de (rac)- 1	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANL – lipase de *Aspergillus niger*

ATR – reflexão total atenuada

BCL – lipase de *Burkholderia cepacia*

C₀ – carbono quaternário

CAL-A – lipase A de *Candida antarctica*

CAL-B – lipase B de *Candida antarctica*

CG-DIC – cromatógrafo gasoso acoplado a detector por ionização em chama

CG-EM – cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas

CRL – lipase de *Candida rugosa*

CRLim – lipase de *Candida rugosa* imobilizada em imobead 150

DEPTQ – *Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer with Retention of Quaternaries*

DMAP – 4-dimetilaminopiridina

EC – *enzyme commission*

ee – excesso enantiomético

F.M. – fórmula molecular

HIV – vírus da imunodeficiência humana

IUBMB – *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*

IV – infravermelho

m/z – razão massa carga

MJL – lipase M de *Mucor javanicus*

MM – massa molecular

MTBE – metilterc-butil éter

PFL – lipase de *Pseudomonas fluorescens*

PPL – lipase de pâncreas suíno

ppm – partes por milhão

RC – resolução cinética

RCD – resolução cinética dinâmica

RMN de ^{13}C – ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN de ^1H – ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RML – lipase de *Rhizomucor miehei*

RNA – ácido ribonucleico

RNL - lipase de *Rhizopus niveus*

ROL - lipase de *Rhizopus oryzae*

Rpm – rotações por minuto

THF - tetrahidrofurano

TLL – lipase de *Thermomyces lanuginosus*

V-MPS – catalisador de oxovanádio imobilizado em sílica mesoporosa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Álcoois terciários	16
1.1.1. Álcoois terciários propargílicos	17
1.2. Síntese enantiosseletiva de álcoois terciários	19
1.3. Biocatálise e Química Verde	20
1.4. Resolução cinética enzimática	23
1.4.1. Lipases como biocatalisadores	24
1.4.2. Lipase A de <i>Candida antarctica</i> (CAL-A)	28
1.4.3. Resolução cinética de álcoois terciários propargílicos	32
1.5. Resolução cinética dinâmica quimioenzimática	34
1.5.1. Catalisador heterogêneo de vanádio para a racemização de álcoois na resolução cinética dinâmica	36
1.5.2. Resolução cinética dinâmica de álcoois terciários	39
2. OBJETIVOS	40
2.1. Objetivo Geral	40
2.2. Objetivos Específicos	40
3. PARTE EXPERIMENTAL	41
3.1. Reagentes e enzimas	41
3.2. Equipamentos utilizados	41
3.2.1. Cromatografia gasosa acoplada a detector por ionização em chama (CG-DIC)	41
3.2.2. Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM)	42
3.2.3. Espectroscopia no infravermelho (IV)	43
3.2.4. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de Hidrogênio e de Carbono (RMN de ^1H e ^{13}C)	43
3.3. Álcoois terciários racêmicos	44
3.3.1. Álcoois terciários comerciais	44
3.3.2. Síntese de álcoois terciários propargílicos	44
3.4. Síntese dos ésteres racêmicos	46
3.4.1. Síntese do acetato de 2-fenil-3-butin-2-ila ((<i>rac</i>)-1a)	46
3.4.2. Síntese do butirato de 2-fenil-3-butin-2-ila ((<i>rac</i>)-1b)	47
3.4.3. Síntese do decanoato de 2-fenil-3-butin-2-ila ((<i>rac</i>)-1c)	48
3.5. Resolução cinética	49
3.5.1. Triagem inicial com CAL-A	49

3.5.2.	Triagem de lipases	49
3.5.3.	Estudo da engenharia do meio reacional	50
3.5.4.	Adição lenta de substrato	50
3.6.	Avaliação do escopo de substratos no protocolo de resolução cinética	51
3.7.	Protocolo de resolução cinética dinâmica quimioenzimática.....	52
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1.	Resolução Cinética	54
4.1.1.	Síntese dos ésteres racêmicos.....	54
4.1.2.	Triagem inicial com CAL-A	55
4.1.3.	Triagem de lipases	56
4.1.4.	Engenharia do meio reacional	58
4.1.5.	Lipase de <i>Candida rugosa</i>	68
4.1.6.	Adição lenta de substrato	69
4.2.	Escopo de substratos.....	70
4.2.1.	Síntese dos álcoois terciários	70
4.2.2.	Avaliação do escopo de substratos no protocolo de resolução cinética	71
4.3.	Resolução cinética dinâmica.....	75
4.3.1.	Sem compartimentalização	77
4.3.2.	Com compartimentalização	78
5.	CONCLUSÃO.....	83
6.	REFERÊNCIAS	85
7.	APÊNDICE	93

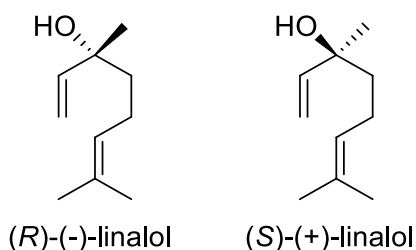
1. INTRODUÇÃO

1.1. Álcoois terciários

Os álcoois terciários são subunidades estruturais presentes em blocos construtores de interesse das indústrias farmacêutica, alimentícia e de química fina. Estes compostos compõem uma ampla variedade de produtos naturais, como óleos essenciais de plantas aromáticas (CHEN; FANG, 1997).

O linalol (3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol) (Figura 1) é um monoterpreno acíclico muito importante para a indústria, uma vez que é utilizado como ingrediente de fragrância ou aromatizante, principalmente na produção de perfumes, cosméticos, shampoos, sabonetes, detergentes e produtos de limpeza em geral (LETIZIA *et al.*, 2003). Além disso, o linalol é um intermediário na síntese da vitamina E e de inseticidas de ectoparasitas de animais domésticos. Tão importante é a importância deste álcool, que seu consumo ao redor do mundo ultrapassa 1000 toneladas por ano (APROTOSOAIE *et al.*, 2014).

Figura 1. Estruturas dos enantiômeros do linalol

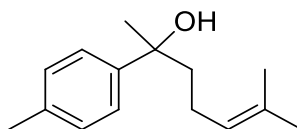


As plantas geralmente produzem uma maior quantidade de um dos enantiômeros do linalol, de modo que o aroma pode ser utilizado como um indicativo do enantiômero presente (BONNLÄNDER *et al.*, 2006). O enantiômero (S), por exemplo, apresenta um aroma doce, herbáceo e floral, sendo encontrado no óleo essencial de coentro (*Coriandrum sativum*), enquanto o enantiômero (R) possui um aroma mais amadeirado e semelhante à lavanda, podendo ser extraído do pau rosa (*Aniba rosaeodora*) (APROTOSOAIE *et al.*, 2014).

Outro importante álcool terciário para a indústria, uma vez que apresenta atividades antifúngica, anticâncer e antioxidante, é o sesquiterpeno gossonorol (Figura 2), primeiramente isolado, em 1984, de algodoeiros (gênero *Gossypium*) e posteriormente encontrado em diversas outras plantas, a exemplo da camomila

(*Chamomilla recutita*) (ABECASSIS; GIBSON, 2010). Diferentemente do linalol, no entanto, o gossonorol sempre foi encontrado na forma de uma mistura racêmica, mesmo sendo tão abundante na natureza. Sua essência é descrita como forte e levemente floral (GONZÁLEZ-LÓPEZ; YUS; RAMÓN, 2012).

Figura 2. Estrutura do gossonorol

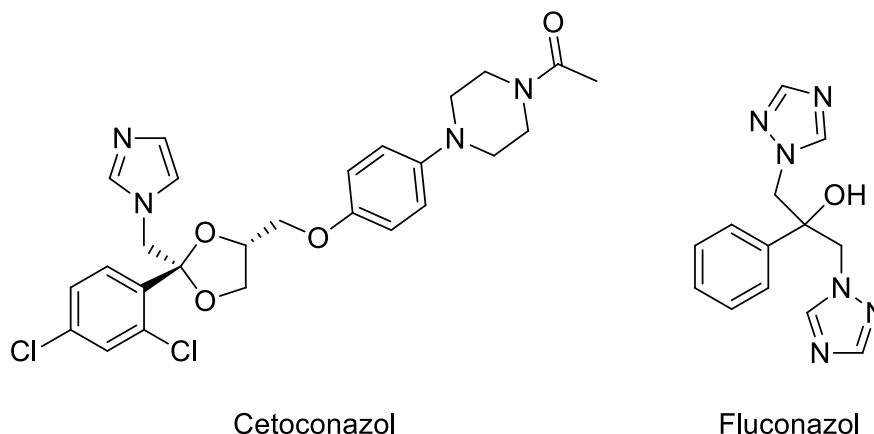


1.1.1. Álcoois terciários propargílicos

Os álcoois terciários propargílicos compõem uma classe de compostos de grande importância, uma vez que eles são utilizados como síntons pelas indústrias farmacêutica e agroquímica, e na síntese de produtos naturais, devido ao número de grupos funcionais nos quais os mesmos podem ser transformados (KOBAYASHI *et al.*, 2019; QIAN *et al.*, 2019).

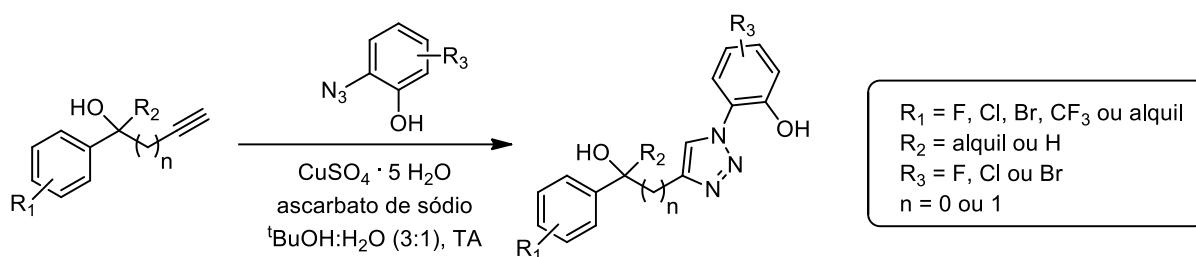
Essa classe de álcoois terciários é utilizada na síntese de *N*-heterocíclicos, como é o caso dos 1,2,3-triazóis, que possuem atividade biológica como: bactericida, antialérgica e anti-HIV (HOSSEINZADEH *et al.*, 2014). Diversos medicamentos utilizados no tratamento antifúngico pertencem à classe dos “azóis” como o cetoconazol, que apresenta um anel imidazólico e contém dois centros estereogênicos, e do fluconazol, o qual possui dois anéis 1,2,4-triazóis, mas não é quiral (Figura 3).

Figura 3. Medicamentos antifúngicos da classe dos “azóis”

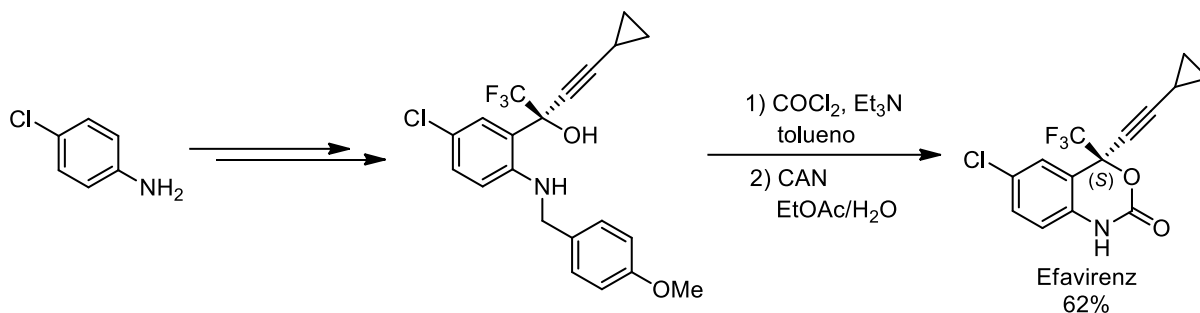


Uma patente registrada em 2015 por Vaithiyanathan e colaboradores reporta uma estratégia verde para a síntese de 1,2,3-triazóis com atividade antifúngica (Figura 4). Os materiais de partida utilizados foram os alcinóis, grupo que inclui álcoois propargílicos e álcoois com tripla ligação em outras posições. (VAITHIYANATHAN; NAGA; ARUMUGAM, 2015).

Figura 4. Estrutura dos 1,2,3-triazóis com atividade antifúngica

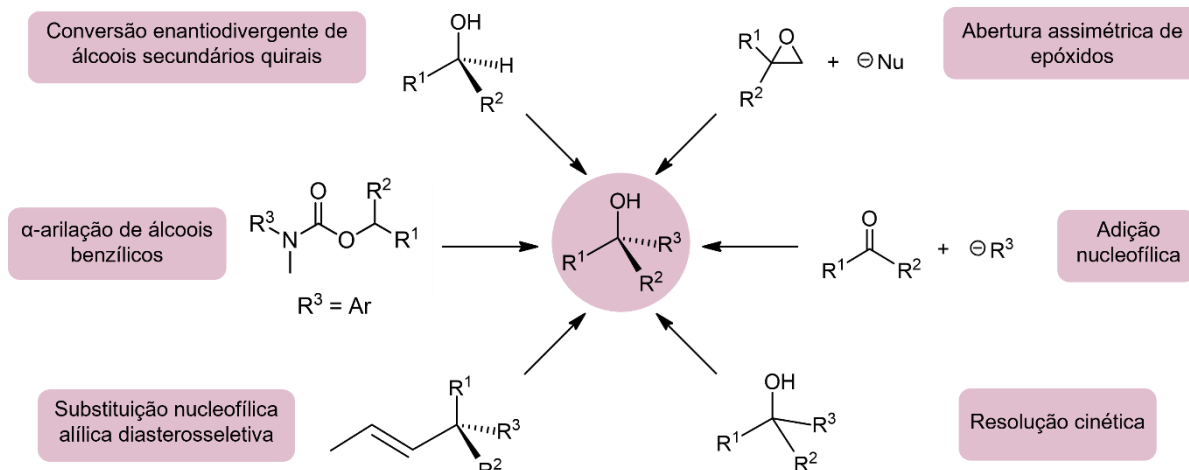


A síntese do Efavirenz (Esquema 1) é outro exemplo, mais específico, da utilização de álcoois terciários propargílicos quirais como blocos construtores de fármacos. Enquanto o enantiômero *R* desse composto não apresenta atividade biológica, o enantiômero *S* atua como inibidor da HIV transcriptase (NODA; KUMAGAI; SHIBASAKI, 2018; PIERCE *et al.*, 1998).

Esquema 1. Álcool terciário propargílico precursor na síntese do Efavirenz

1.2. Síntese enantiosseletiva de álcoois terciários

Apesar da importância dos álcoois terciários opticamente ativos para a produção de fármacos, a síntese assimétrica dos mesmos não é uma tarefa trivial, uma vez que as reduções enantiosseletivas, muito utilizadas na síntese de álcoois secundários, não são opções a serem consideradas. Dessa forma, uma das estratégias mais utilizadas consiste na formação de ligações C–C através de adições nucleofílicas a cetonas pró-quirais (BIESZCZAD; GILHEANY, 2017). Além desse método, existem outros como: conversão enantiodivergente de álcoois secundários quirais (STYMIEST *et al.*, 2008), α -arilação de álcoois benzílicos (CLAYDEN *et al.*, 2009), substituição nucleofílica alílica diastereosseletiva (LEUSER *et al.*, 2005), abertura assimétrica de epóxidos (ELENKOV *et al.*, 2007), resolução cinética (LU *et al.*, 2012) e resolução cinética enzimática (ÖZDEMIRHAN, 2017). O Esquema 2 representa de forma simplificada cada uma destas reações.

Esquema 2. Estratégias para a síntese enantiosseletiva de álcoois terciários

Dentre as metodologias citadas acima, a resolução de racematos, seja ela química ou enzimática, se destaca por ser um dos métodos mais utilizados pela indústria de química fina e farmacêutica para a obtenção de compostos enantiomericamente puros. A resolução de álcoois secundários é uma metodologia muito bem estabelecida, porém a resolução de álcoois terciários ainda é uma área muito incipiente, principalmente a resolução cinética enzimática.

1.3. Biocatálise e Química Verde

Ao longo da história, o processo de industrialização foi um grande catalisador para o desenvolvimento da humanidade, tornando possível o padrão de vida visto atualmente. As indústrias químicas tiveram um papel fundamental para o aumento da qualidade de vida, uma vez que contribuíram (e continuam contribuindo) para o aumento da produção de alimentos, em virtude da fabricação de agrotóxicos e fertilizantes; no setor de transportes, através da produção de combustíveis; na saúde humana, por meio do desenvolvimento de medicamentos; na purificação da água para consumo; entre muitos outros. Apesar de todos esses benefícios, as indústrias também são diretamente responsáveis pelos impactos ambientais e pelo declínio dos recursos do planeta (ACS Sustainable Chem. Eng., 2022).

Nesse sentido, no início da década de 1990, com a crescente a pressão da sociedade e das autoridades sobre as indústrias, surgiu a Química Verde, que pode ser definida como o desenvolvimento de produtos químicos, bem como dos processos pelos quais são produzidos de modo a diminuir ou eliminar o uso e a geração substâncias perigosas (ANASTAS; EGHBALI, 2009). Alguns anos depois, em 1998, foi publicado o livro “Química Verde: teoria e prática”, por Paul Anastas e John C. Warner, conhecidos atualmente como os pais da Química Verde. Neste livro, foram postulados os 12 princípios da Química Verde (Figura 5), que consistem em fatores importantes que devem ser adotados ao planejar um processo, de modo a prevenir impactos ambientais (DE MARCO *et al.*, 2019).

Figura 5. Os 12 princípios da química verde

Os 12 Princípios da Química Verde 	1. Prevenção; 2. Economia atômica; 3. Síntese de produtos menos tóxicos; 4. Desenvolvimento de produtos mais seguros; 5. Solventes e auxiliares mais seguros; 6. Eficiência energética; 7. Fontes renováveis de matéria prima; 8. Evitar processos de derivatização; 9. Catálise; 10. Projetar para degradação; 11. Análise em tempo real; 12. Química segura para a prevenção de acidentes.
--	--

Um dos maiores problemas atrelados à grande formação de resíduos em síntese orgânica são respectivamente a utilização de reagentes estequiométricos e o grande número de etapas necessárias para se obter o produto. Para contornar esta situação, aplicando os princípios da Química Verde, uma das opções seria a utilização da catálise, diminuindo os resíduos gerados, já que os catalisadores são restaurados após uma reação, podendo, em determinados casos, serem utilizados múltiplas vezes, e diminuindo também o número de etapas do processo, pois reações de proteção e desproteção de grupos funcionais acabam se fazendo desnecessárias quando os catalisadores são regioseletivos (SHELDON; WOODLEY, 2018).

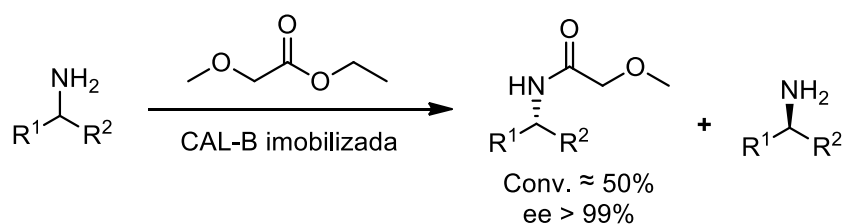
Dentre as subclasses da catálise, a biocatálise destaca-se ainda mais do ponto de vista sustentável, uma vez que não envolve a utilização de recursos não renováveis, ao contrário dos catalisadores organometálicos, por exemplo, que em geral empregam metais preciosos e pouco abundantes na crosta terrestre (PYSER *et al.*, 2021). A biocatálise pode ser definida como a utilização de enzimas isoladas, livres ou imobilizadas, ou ainda no interior de células de microrganismos, para a transformação de substâncias químicas (REGIL; SANDOVAL, 2013).

Além de contemplar o princípio 9 da Química Verde (Catálise), a Biocatálise também está em conformidade com outros 8 princípios, com exceção apenas dos

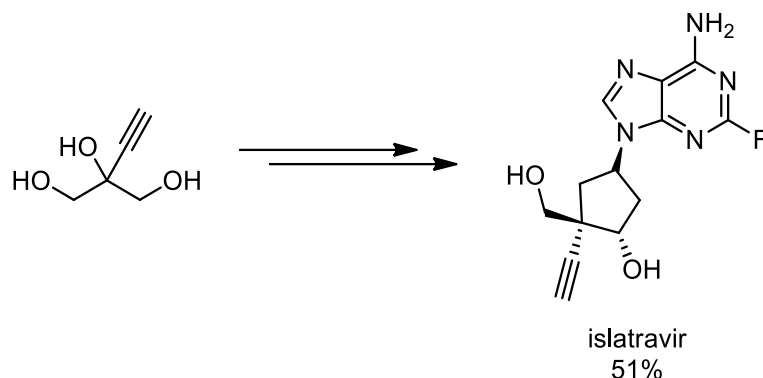
princípios 3, 4 e 10, que são inerentes ao produto, e não ao processo em si. Muito disso se deve à elevada quimio, regio e estereosseletividades das enzimas, propriedades que dificilmente são atingidas utilizando catalisadores químicos. Logo, os biocatalisadores são sustentáveis, seguros, seletivos e economicamente viáveis (SHELDON; BRADY, 2019). Devido a todos estes benefícios, os biocatalisadores vem sendo cada vez mais explorados pelas indústrias. Em 1990, havia 60 processos biocatalíticos em indústrias pelo mundo, e este número vem crescendo desde então. Em 2002 eram 134, e em 2019, atingiu a escala de centenas (HECKMANN; PARADISI, 2020).

Um dos exemplos de maior sucesso, foi aplicado pela BASF, e consiste na utilização da lipase B de *Candida antarctica* em solventes orgânicos, para resoluções cinéticas dinâmicas, a fim de se obter amidas enantiomericamente puras, o qual geralmente é chamado de “Processo BASF” ou “ChiPros Technology” (Esquema 3). A reação é praticamente quantitativa e ainda pode ser realizada sem solvente. Em 2004, a produção de aminas quirais em diversas plantas da BASF superou 1000 toneladas, e tal processo continua ativo até os dias atuais (HECKMANN; PARADISI, 2020).

Esquema 3. Processo BASF para a resolução cinética dinâmica de aminas secundárias com CAL-B

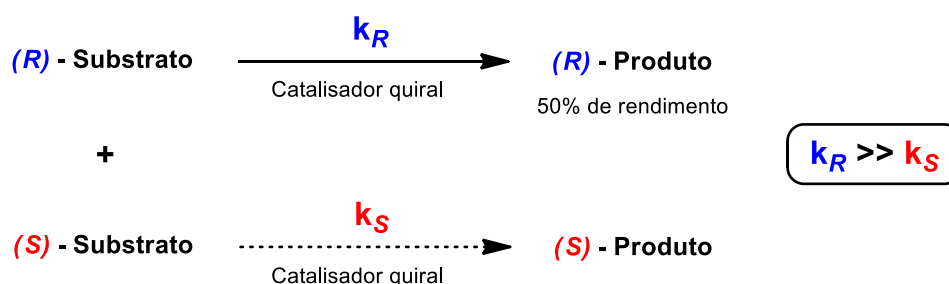


Um exemplo mais atual foi aplicado pela Merck® em parceria com a Codexis® na síntese do fármaco Islatravir, um medicamento utilizado no tratamento do HIV. Trata-se de uma síntese enzimática total, constituída de 5 etapas, nas quais as enzimas envolvidas foram modificadas de modo que as atividades desejadas aos respectivos substratos fossem atingidas (Esquema 4). Este processo mais eficiente substituiu antigas rotas químicas do fármaco, as quais possuíam o dobro de etapas, inclusive com reações de proteção e desproteção (BELL *et al.*, 2021; YI *et al.*, 2021).

Esquema 4. Representação reduzida da síntese enzimática total do Islatravir (Merck)

1.4. Resolução cinética enzimática

A resolução cinética (RC) enzimática é uma estratégia biocatalítica baseada no fato de que os enantiômeros de um determinado composto, sob a ação de um catalisador quiral (enzima), serão convertidos aos respectivos produtos com velocidades diferentes ($k_R \neq k_S$) (Esquema 5). Assim, numa resolução cinética ideal, a velocidade de conversão de um dos enantiômeros deve ser muito maior que a do outro ($k_R \gg k_S$). Então, o produto do enantiômero favorecido e aquele que não reagiu podem ser separados por métodos tradicionais de purificação. Essa metodologia, no entanto, conta com uma limitação: o rendimento máximo atingido será de 50% (GHANEM; ABOUL-ENEIN, 2005).

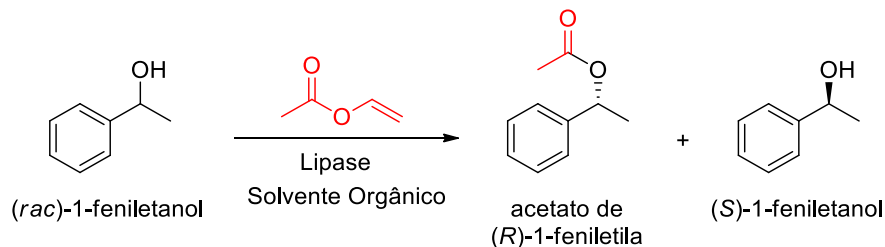
Esquema 5. Esquema gnérico de uma resolução cinética

As lipases são as enzimas mais utilizadas nas resoluções cinéticas enzimáticas de álcoois secundários, podendo catalisar tanto reações de hidrólise quando em meio aquoso, quanto reações de transesterificação na presença de um solvente orgânico e de um doador de acila (de MIRANDA; MIRANDA; de SOUZA, 2015). O esquema 6

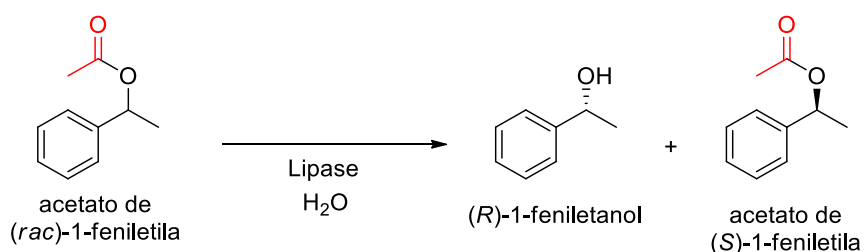
ilustra ambas as reações caso o 1-feniletanol atue como substrato da transesterificação e o acetato de 1-feniletila como substrato da reação de hidrólise.

Esquema 6. Reações catalisadas por lipases (transesterificação e hidrólise)

Transesterificação



Hidrólise



1.4.1. Lipases como biocatalisadores

As enzimas são, em sua maioria, proteínas que atuam como catalisadores biológicos (com exceção de algumas moléculas de RNA). Elas são responsáveis pelas reações metabólicas, tanto de degradação, quanto de síntese das macromoléculas nutrientes essenciais para os organismos vivos. Além disso, as enzimas são classificadas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (do inglês, *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* - IUBMB), de acordo com o tipo de reação que elas catalisam (Tabela 1). Essa classificação é feita a partir de quatro números, sendo que o primeiro deles refere-se à classe da enzima, o segundo à sua subclasse, o terceiro ao tipo de ligação que ela atua e o quarto ao substrato natural dessa enzima (NELSON; COX, 2014).

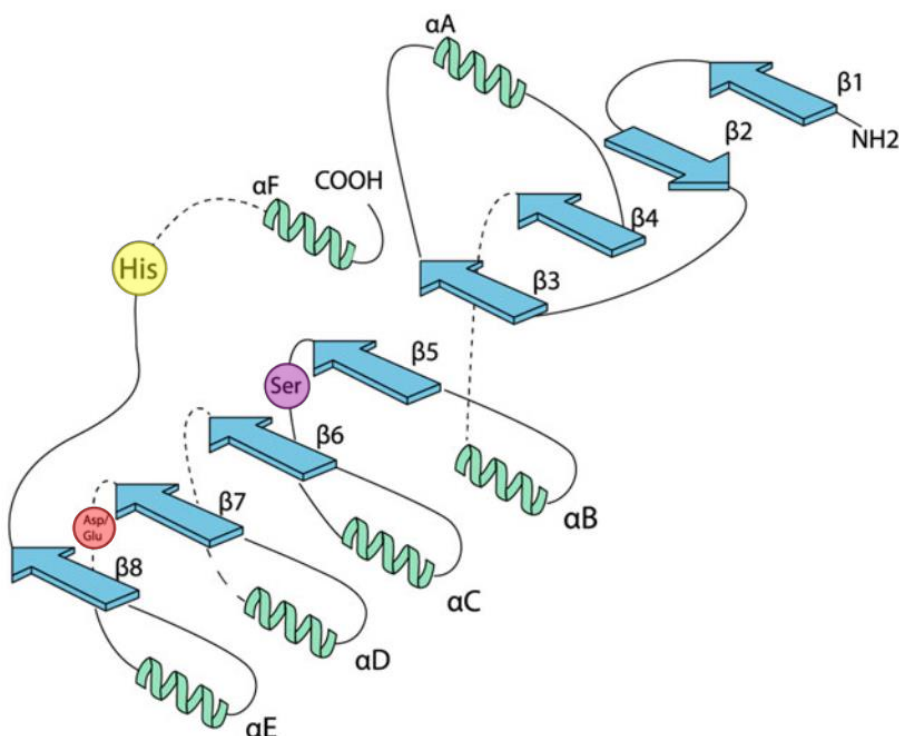
Tabela 1. Classificação das enzimas pela IUBMB

Número	Nome da Classe	Reação Catalisada
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons.
2	Transferases	Transferência de grupos funcionais.
3	Hidrolases	Hidrólise.
4	Liasas	Clivagem de ligações ou adição de grupos à ligações duplas.
5	Isomerases	Transferência de grupos numa mesma molécula produzindo isômeros.
6	Ligases	Formação de ligações.
7	Translocases	Movimentação de moléculas através da membrana celular, por exemplo.

Fonte: Adaptado de Nelson e Cox (NELSON; COX, 2014)

As lipases têm a numeração EC 3.1.1.3. Dessa forma, elas pertencem à classe das Hidrolases (**3**) e atuam nas ligações de ésteres (**3.1**), mais precisamente na clivagem de ligações de ésteres carboxílicos (**3.1.1**). Na sua função natural, elas catalisam a hidrólise de triacilgliceróis (**3.1.1.3**) em ácidos graxos e glicerol, seja em microorganismos, como fungos e bactérias, ou ainda em plantas e animais. Dessa forma, elas apresentam aplicações nas indústrias de detergentes, alimentos e farmacêutica, além de serem utilizadas na produção de biocombustíveis (BORNSCHEUER; KAZLAUSKAS, 2005). As lipases apresentam a estrutura de enzimas que pertencem à família das alfa/beta-hidrolases, que são caracterizadas pela presença de oito folhas β centrais (com apenas a segunda antiparalela), sendo as folhas $\beta 3$ a $\beta 8$ intercaladas por hélices α , apresentando uma tríade catalítica altamente conservada no sítio ativo, a qual é composta por resíduos de serina, histidina e aspartato/glutamato. Nesta estrutura, a serina catalítica fica localizada entre a folha $\beta 5$ e a hélice α seguinte, o resíduo ácido (aspartato ou glutamato) localiza-se após a folha $\beta 7$ e o resíduo de histidina entre a folha $\beta 8$ e a hélice α próxima ao resíduo C-terminal, como pode ser observado na Figura 6. Além disso, outros dois aminoácidos desempenham um papel importante durante o mecanismo catalítico das lipases, sendo responsáveis por estabilizar os intermediários tetraédricos através de ligações de hidrogênio entre o oxigênio da carbonila do doador de acila e, na maioria dos casos, os hidrogênios das amidas presentes no esqueleto proteico. Esses aminoácidos compõem a cavidade oxiânion (CASAS-GODOY *et al.*, 2012).

Figura 6. Representação esquemática da estrutura das alfa/beta-hidrolases e tríade catalítica



Fonte: Adaptado de Casas-Godoy (CASAS-GODOY *et al.*, 2012)

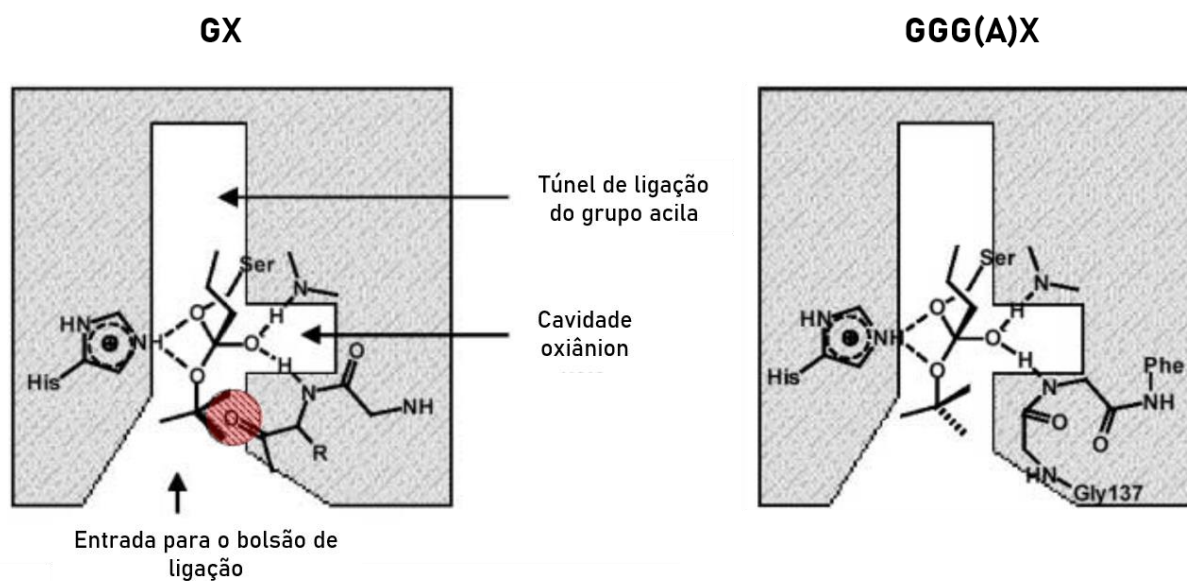
O primeiro resíduo da cavidade oxiânion é aquele que sucede a serina catalítica no pentapeptídeo G-X1-S-X2-G, ou seja, **X2**. O segundo aminoácido, no entanto, difere bastante, sendo responsável por agrupar as lipases em três diferentes classes. Duas delas foram identificadas por Pleiss e colaboradores, e são denominadas **GX** e **GGG(A)X**. No tipo **GX**, uma glicina altamente conservada antecede o resíduo que compõe a cavidade oxiânion, enquanto no tipo **GGG(A)X**, o terceiro resíduo de glicina consecutivo ou um resíduo de alanina que sucede duas glicinas compõe tal cavidade, onde X é um aminoácido hidrofóbico (PLEISS *et al.*, 2000). A terceira classe foi descoberta posteriormente por Fischer e colaboradores e foi denominada **Y**. Nesse caso, a ligação de hidrogênio é estabelecida pela cadeia lateral de um resíduo volumoso, geralmente tirosina ou aspartato (FISCHER *et al.*, 2006).

O tipo de cavidade oxiânion interfere diretamente nos substratos que são aceitos pela lipase: o tipo **GX** converte substratos menos impedidos estericamente, mas com cadeia carbônica longa ou média, e pode ser exemplificado pela lipase B de *Candida antarctica*; o tipo **GGG(A)X**, como é o caso da lipase de *Candida rugosa*, aceita substratos com cadeia carbônica mais curta e estericamente mais impedidos,

como álcoois terciários; o tipo **Y**, encontrado na lipase A de *Candida antarctica*, apresenta um sítio ativo mais largo e capaz de converter substratos mais volumosos, e assim, também aceita álcoois terciários (CASAS-GODOY *et al.*, 2012).

Existe um motivo estrutural para essa diferença de atividade quanto ao substrato. Como observado na Figura 7, na classe **GX**, o oxigênio carbonílico do aminoácido **X** está voltado diretamente para o bolsão de ligação, impedindo estericamente a ligação de carbonos quaternários. No caso de lipases e esterases do tipo **GGG(A)X**, a maior flexibilidade conformacional imposta pelos resíduos de glicina faz com que o oxigênio não fique mais voltado diretamente para o carbono α do substrato, permitindo a sua ligação de forma efetiva (HENKE; PLEISS; BORNSCHEUER, 2002).

Figura 7. Influência do oxigênio carbonílico da cavidade oxianion na ligação do substrato



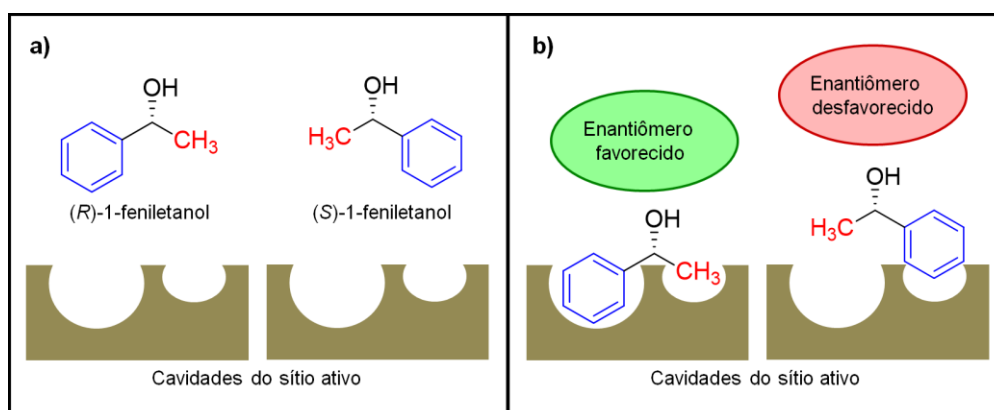
Fonte: Adaptado de (HENKE; PLEISS; BORNSCHEUER, 2002).

Uma das características que atraem tanta atenção para as lipases é a sua capacidade em catalisar reações de extrema relevância em síntese orgânica, como as condensações aldólicas (BIROLI; FONSECA; PORTO, 2017), adições de Michael (FAN *et al.*, 2018), reação de Baylis-Hillman (TIAN; ZHANG; ZHENG, 2016) e oxidação de Baeyer-Villiger (MARKITON *et al.*, 2016). O que torna isso possível é uma propriedade conhecida como promiscuidade enzimática, a qual pode ser definida como a capacidade de uma enzima de apresentar uma atividade inesperada. A

promiscuidade enzimática subdivide-se em três categorias: (i) promiscuidade de substrato, que é a habilidade de uma enzima de aceitar substratos diferentes de seus substratos naturais; (ii) promiscuidade condicional, que se refere à capacidade de uma enzima de trabalhar sob condições não-convencionais; e (iii) promiscuidade catalítica, que consiste na habilidade da enzima em catalisar reações não esperadas. As lipases, por si só, apresentam os três tipos de promiscuidade, e isso se deve, principalmente, à capacidade de elas permanecerem ativas em solventes orgânicos e não necessitarem de cofatores (DWIVEDEE *et al.*, 2018).

A elevada enantiosseletividade dessas enzimas atrai a atenção dos químicos orgânicos sintéticos. De acordo com uma regra empírica denominada “Regra de Kazlauskas”, a configuração favorecida de um álcool secundário quiral é aquela em que, ao projetarmos a hidroxila orientada para trás do plano, o grupo mais volumoso encontra-se à esquerda e o menos volumoso à direita (KAZLAUSKAS *et al.*, 1990). Dessa forma, no caso do 1-feniletanol, representado no exemplo abaixo (Figura 8), observa-se que o enantiômero *R* se encaixa com maior eficiência ao sítio ativo, de modo que a velocidade de conversão do (*R*)-1-feniletanol será maior que a do enantiômero de configuração *S*.

Figura 8. Aplicação da Regra de Kazlauskas para o 1-feniletanol

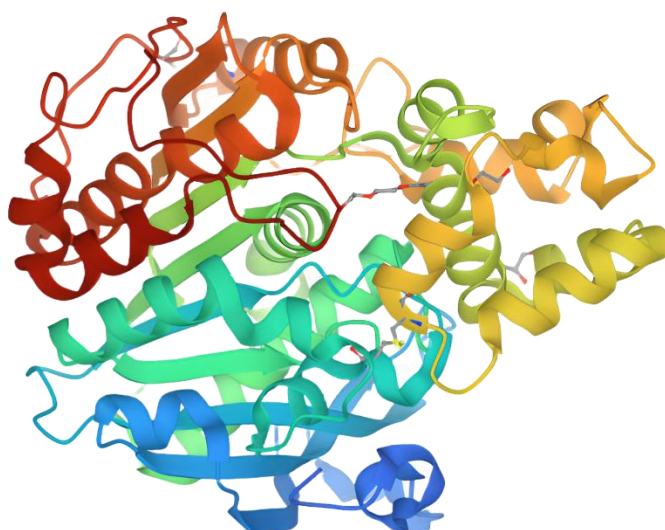


1.4.2. Lipase A de *Candida antarctica* (CAL-A)

Ambas as isoenzimas *Candida antarctica* lipase, denominadas A e B, foram originalmente isoladas da levedura *Candida antarctica*, a qual recebe este nome por ter sido uma espécie primeiramente encontrada em sedimentos coletados a mais de nove metros de profundidade do lago hipersalino Vanda, localizado na Antártica

(MONTEIRO *et al.*, 2021). Desde então, ambas as lipases foram purificadas, clonadas e expressadas no fungo *Aspergillus oryzae*, o que proporcionou um aumento na escala de produção de ambas para utilização como biocatalisadores. Apesar de a CAL-A (Figura 9) não ser tão utilizada em síntese orgânica quanto a CAL-B, que possui um extenso escopo de substratos já explorado, principalmente no que diz respeito à resolução cinética de álcoois secundários, ela ainda apresenta propriedades únicas e que a tornam um biocatalisador interessante (DE MARÍA *et al.*, 2005). Dentre estas propriedades estão a elevada faixa de pH na qual a CAL-A é ativa, podendo atuar tanto em meio ácido (pH 6,0), quanto em meio alcalino (pH 9,0), além da termoestabilidade dessa enzima, que suporta temperaturas acima de 90°C, fato que faz dela a lipase de maior estabilidade térmica já registrada (MORTEN; CHRISTENSEN, 2002).

Figura 9. Estrutura tridimensional da CAL-A



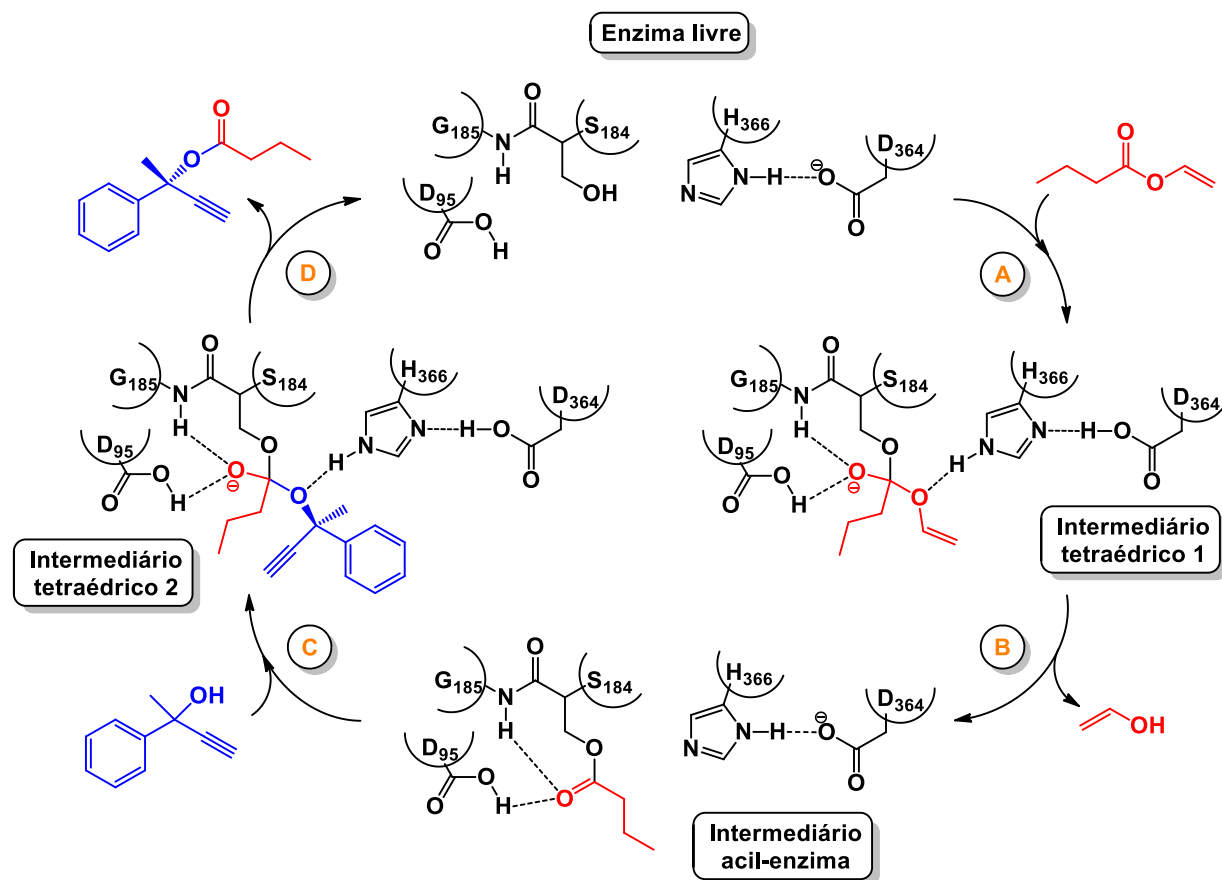
Fonte: PDB ID: 3GUU

Talvez, o fator que tenha atraído mais atenção para a CAL-A, na verdade, seja a sua atividade frente a substratos estericamente impedidos, como os álcoois terciários. Isso se deve principalmente ao sítio ativo desta lipase, que é mais volumoso. A tríade catalítica desta lipase é composta pelos resíduos de serina na posição 184, aspartato 334 e histidina 366. Os outros dois resíduos importantes para o mecanismo reacional – a cavidade oxianion – são, respectivamente, a glicina na

posição 185, adjacente à serina catalítica, responsável por estabilizar os intermediários através da amida presente no esqueleto proteico, e o aspartato 95, que estabelece ligações de hidrogênio com a sua cadeia lateral ao invés do esqueleto proteico, fato pouco comum entre as lipases (ERICSSON *et al.*, 2008).

O ciclo catalítico da reação de transesterificação catalisada pelas lipases é comum para todas as serina hidrolases, sendo composto por quatro etapas. O Esquema 7 ilustra este ciclo utilizando a estrutura da CAL-A, o 2-fenil-3-butin-2-ol como substrato e o butirato de vinila como doador de acila. Neste mecanismo, primeiramente a histidina desprotona a serina catalítica, que vai atuar como nucleófilo e atacar o carbono carboxílico do doador de acila, formando o primeiro intermediário tetraédrico (A). Quando a carboxila é restaurada, ocorre a formação do intermediário acil-enzima e a liberação do enol correspondente à cadeia alcóxi do éster (B). Em seguida, ocorre o ataque nucleofílico do álcool (principalmente aquele de configuração favorecida, o (*R*)-2-fenil-3-butin-2-ol) à carboxila do intermediário acil-enzima, formando um segundo intermediário tetraédrico (C). Por fim, a carboxila é novamente restaurada, mas desta vez, o produto é liberado e a enzima está pronta para um novo ciclo catalítico (D) (ERICSSON *et al.*, 2008).

Esquema 7. Ciclo catalítico da reação de transesterificação catalisada pela lipase A de *Candida antarctica*



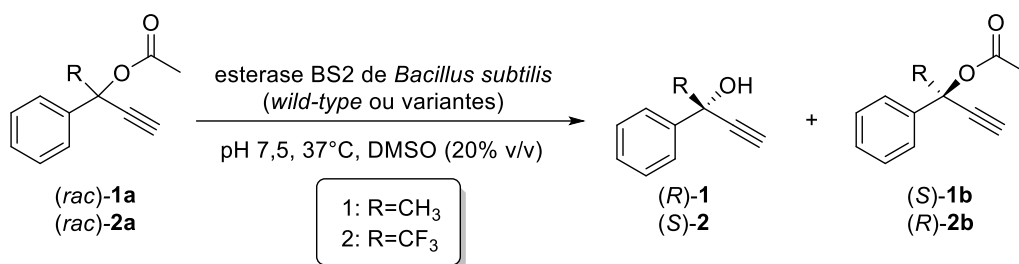
Atualmente, uma das formas comercializadas da CAL-A é a imobilizada em Immobead 150. Este suporte é um copolímero de metacrilato funcionalizado com grupos epóxi, com tamanho médio de partícula variando entre 150 e 300 μm e poro de 2-50 nm. Particularmente, o Immobead é interessante para a imobilização de lipases em função da sua hidrofobicidade, o que facilita o processo, dada a afinidade destas enzimas pelo meio apolar, onde naturalmente atuam. No processo de imobilização, primeiramente a enzima é adsorvida à superfície do suporte, seguido pela formação de ligações covalentes entre grupos epóxi e a cadeia lateral de alguns aminoácidos na superfície da enzima, como tióis presentes em cisteínas, aminas primárias de lisinas, fenóis de tirosinas, imidazóis de histidinas e, em menor proporção, carboxilas de apartatos e glutamatos (MATTE *et al.*, 2017; GENNARI *et al.*, 2018).

1.4.3. Resolução cinética de álcoois terciários propargílicos

A resolução cinética enzimática de álcoois terciários propargílicos ainda é um tema incipiente dentro da química orgânica e embora existam algumas metodologias para a hidrólise de ésteres desses compostos, os exemplos de transesterificação são ainda mais escassos. Na década de 1990, foi publicado um dos artigos pioneiros com a RC via hidrólise de ésteres de álcoois terciários α -acetilênicos (propargílicos), no qual a lipase de *Candida cylindracea* foi utilizada na resolução de racematos para uma série de compostos, obtendo excessos enantioméricos de até 77% (O'HAGAN; ZAIDI, 1994).

Em 2002, Bornscheuer e colaboradores publicaram um estudo comparando a atividade de diversas enzimas na hidrólise de ésteres de álcoois terciários, os quais indicaram que cavidades oxianion do tipo GGG(A)X ou Y são mesmo essenciais para obtenção de álcoois terciários enantioméricamente enriquecidos. Dentre todas as enzimas avaliadas, aquela que forneceu as melhores conversões para o acetato de 2-fenil-3-butin-2-ila (**1a**) foi a esterase e *Bacillus subtilis* (HENKE; PLEISS; BORNSCHEUER, 2002). Ao logo dos anos seguintes, mutantes de outra esterase de *Bacillus subtilis* (BS2) foram muito estudadas, com o objetivo de elevar a enantiosseletividade da enzima, como consta na Tabela 2 (HEINZE *et al.*, 2007).

Tabela 2. Resolução cinética via hidrólise com esterase BS2 de *Bacillus subtilis* e variantes

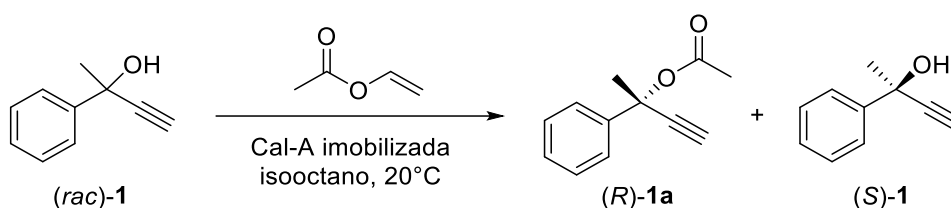


Esterase BS2	Substrato	Conversão (%)	ee (%)
wild-type	(rac)- 1a	48	52
wild-type	(rac)- 2a	33	93
Variante G105A	(rac)- 1a	50	89
Variante G105A	(rac)- 2a	58	96
Variante E188D	(rac)- 1a	40	91

O primeiro protocolo de RC via transesterificação utilizando um álcool terciário propargílico como substrato, mais especificamente o 2-fenil-3-butin-2-ol ((rac)-**1**), foi

também publicado em 2002, por Bornscheuer e colaboradores. Nesse caso, a enzima que apresentou maior a atividade foi lipase A de *Candida antarctica* (CAL-A), num sistema contendo acetato de vinila como doador de acila e isooctano como o solvente. Dois suportes de imobilização foram testados: resina aniônica (C1) e polipropileno poroso (EP-100). Os resultados, a 20°C, para cada um dos casos constam na Tabela 3 (KRISHNA; PERSSON; BORNSCHEUER, 2002).

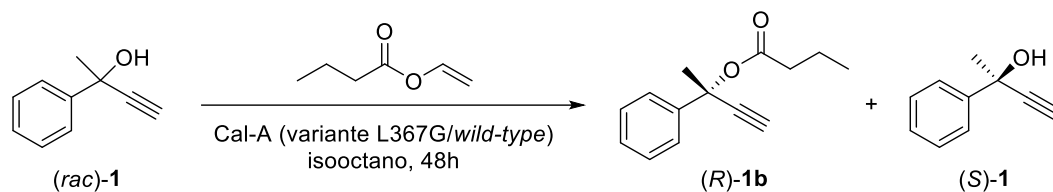
Tabela 3. Transesterificação do 2-fenil-3-butin-2-ol utilizando CAL-A em diferentes suportes de imobilização e acetato de vinila como doador de acila



Enzima	Tempo (h)	Conversão (%)	ee 1a (%)
CAL-A-C1	48	21	95
CAL-A-EP-100	120	35	94

Em 2019, foi publicado por Bäckvall e colaboradores, outro protocolo de transesterificação para o substrato (rac)-1, com enfoque para o engenheiramento da enzima CAL-A. A variante L367G, na qual o resíduo de leucina 367 foi substituído por uma glicina, apresentou a maior atividade para com o substrato, sendo então aplicada no protocolo de resolução cinética utilizando isooctano como solvente e butirato de vinila como doador de acila. Os resultados são apresentados na Tabela 4 (LÖFGREN *et al.*; 2019).

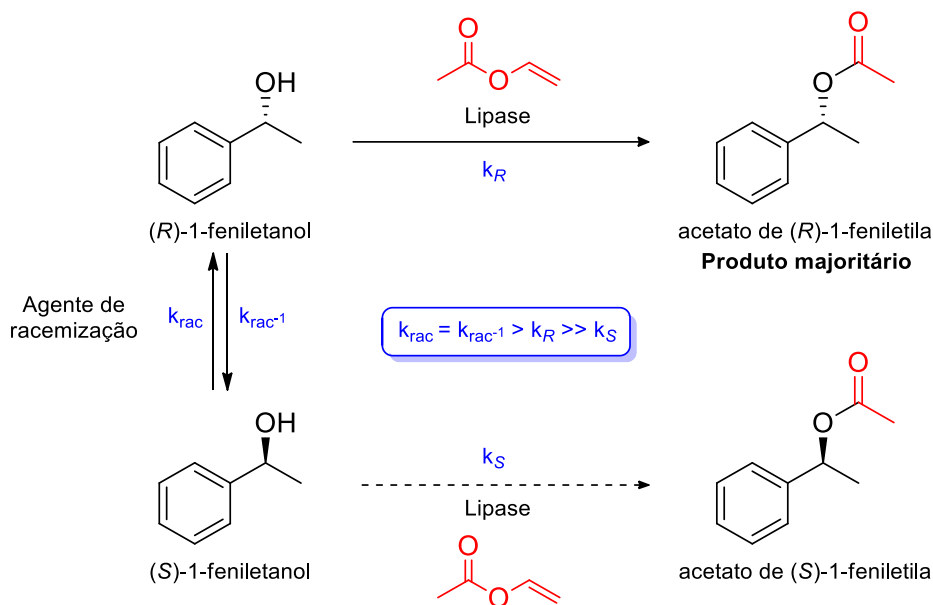
Tabela 4. Comparação entre a enzima CAL-A e variante L367G frente à transesterificação do 2-fenil-3-buten-2-ol



Enzima	Temperatura (°C)	Conversão (%)	ee 1b (%)
CAL-A (<i>wild-type</i>)	30	1	n.d.
CAL-A (<i>wild-type</i>)	40	2	n.d.
CAL-A (<i>wild-type</i>)	60	4	n.d.
Variante L367G	30	11	n.d.
Variante L367G	40	18	96
Variante L367G	60	35	93

1.5. Resolução cinética dinâmica quimioenzimática

Com o objetivo de superar a limitação quanto ao rendimento máximo de 50% na RC e obter um rendimento quantitativo, foram desenvolvidos protocolos combinando a RC clássica com um processo de racemização *in situ*, dando origem à resolução cinética dinâmica (RCD). Para uma metodologia de RCD ter êxito são necessários alguns pré-requisitos, sendo eles: (i) a resolução cinética deve ser suficientemente enantiosseletiva ($E = k_{\text{rápida}}/k_{\text{lenta}} \geq 20$); (ii) deve haver compatibilidade entre o agente de racemização e a enzima; (iii) a velocidade de racemização precisa ser ao menos dez vezes maior que a velocidade da reação enzimática; (iv) não pode haver reação entre o produto de resolução cinética e o agente de racemização (VERHO; BÄCKVALL, 2015). O Esquema 8 ilustra um exemplo de resolução cinética dinâmica utilizando o 1-feniletanol como substrato.

Esquema 8. Resolução cinética dinâmica quimioenzimática do 1-feniletanol

Complexos de rutênio, paládio e irídio são muito utilizados como agentes de racemização, embora tenham um custo elevado, sejam pouco ambientalmente amigáveis e provenientes de fontes não renováveis. Dessa forma, ao longo dos últimos anos, vêm-se desenvolvendo catalisadores mais sustentáveis, como é o caso das zeólitas (WUYTS *et al.*, 2003), das resinas ácidas (MÉNDEZ-SANCHEZ *et al.*, 2015) e dos compostos de vanádio (TAKIZAWA; GRÖGER; SASAI, 2015). O sulfato de vanadila hidratado, por exemplo, é amplamente disponível, de menor custo e ambientalmente mais benéfico se comparado aos complexos de metais de transição (DE ALMEIDA *et al.*, 2020).

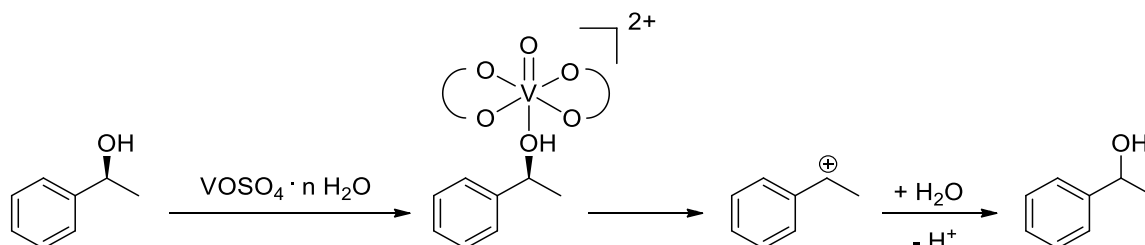
Um processo de racemização pode ocorrer por meio de vários mecanismos, como via catálise enzimática, substituição nucleofílica, reações de oxirredução ou catálise ácido-base. No caso dos álcoois secundários, geralmente são utilizados complexos de metais de transição e a racemização ocorre através de reações de oxirredução, onde ocorre primeiramente a oxidação do álcool a uma cetona pró-quiral e em seguida a sua redução. Para álcoois terciários, porém, esse mecanismo é inviável, de modo que a única possibilidade seria através da clivagem da ligação C-O. Nesse sentido, a reação poderia se proceder através da eliminação da hidroxila e formação de um carbocátion, seguido pela adição de uma molécula de água a este intermediário, a qual ocorre sem estereosseletividade e leva à racemização do álcool (GÖRBE; LIHAMMAR; BÄCKVALL, 2018).

1.5.1. Catalisador heterogêneo de vanádio para a racemização de álcoois na resolução cinética dinâmica

A literatura reporta exemplos de resolução cinética dinâmica quimioenzimática que combinam a lipase (catalisador quiral) com um catalisador a base de vanádio (agente de racemização). Akai e colaboradores primeiramente reportaram a utilização do complexo $\text{VO}(\text{OSiPh}_3)_3$ para a racemização de álcoois alílicos via transposição-1,3 da hidroxila (AKAI *et al.*, 2006). Por se tratar de um catalisador homogêneo, o $\text{VO}(\text{OSiPh}_3)_3$ foi posteriormente imobilizado no interior dos poros da sílica mesoporosa (3 nm), formando o catalisador V-MPS. Esta estratégia, além de possibilitar o reuso do catalisador de oxovanádio, proporcionou um aumento da compatibilidade com as lipases (EGI *et al.*, 2013).

Uma alternativa mais barata e amplamente disponível ao V-MPS é o sulfato de vanadila (VOSO_4), outro catalisador heterogêneo (na forma de um sólido cristalino) que já foi utilizado como agente da racemização de álcoois secundários benzílicos em protocolos de resolução cinética dinâmica (WUYTS *et al.*, 2007; DE MIRANDA *et al.*, 2017; DE ALMEIDA *et al.*, 2020). A reação se processa por um mecanismo via formação de carbocátion (Esquema 9), onde ocorre primeiramente a coordenação da hidroxila do álcool ao átomo de vanádio, seguido pela eliminação do grupo OH e consequente formação de um carbocátion. Esse último, devido à geometria trigonal planar, pode sofrer ataque nucleofílico por uma molécula de água em ambas as faces, culminando na racemização do álcool (WUYTS *et al.*, 2007).

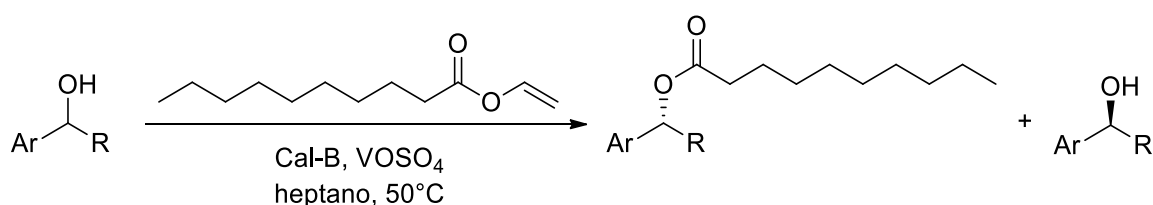
Esquema 9. Mecanismo de racemização do (S)-1-feniletanol via formação de carbocátion



Motivado pelos resultados promissores desses trabalhos, o nosso grupo de pesquisa estudou a RCD quimioenzimática de álcoois secundários benzílicos utilizando a combinação de dois catalisadores heterogêneos: o sulfato de vanadila e a lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em resina acrílica (Novozyme 435). Os

melhores resultados encontram-se na Tabela 5 (DE ALMEIDA *et al.*, 2020). Esta metodologia foi aplicada a um escopo de álcoois secundários aromáticos e heteroaromáticos, onde foram obtidos excelentes valores de conversão e excesso enantiomérico, além do reuso dos catalisadores por 4 ciclos reacionais. Posteriormente, o sistema ainda foi aprimorado através da compartimentalização dos catalisadores utilizando um simples tubo de teflon com microfuros, que permitiu 8 ciclos de reação sem perda de atividade e seletividade. Essa estratégia foi empregada em função da observação de certa incompatibilidade entre a CAL-B e o VOSO_4 após longos períodos em contato mútuo (DE ALMEIDA *et al.*, 2020).

Tabela 5. RCD quimioenzimática de álcoois secundários aromáticos e heteroaromáticos



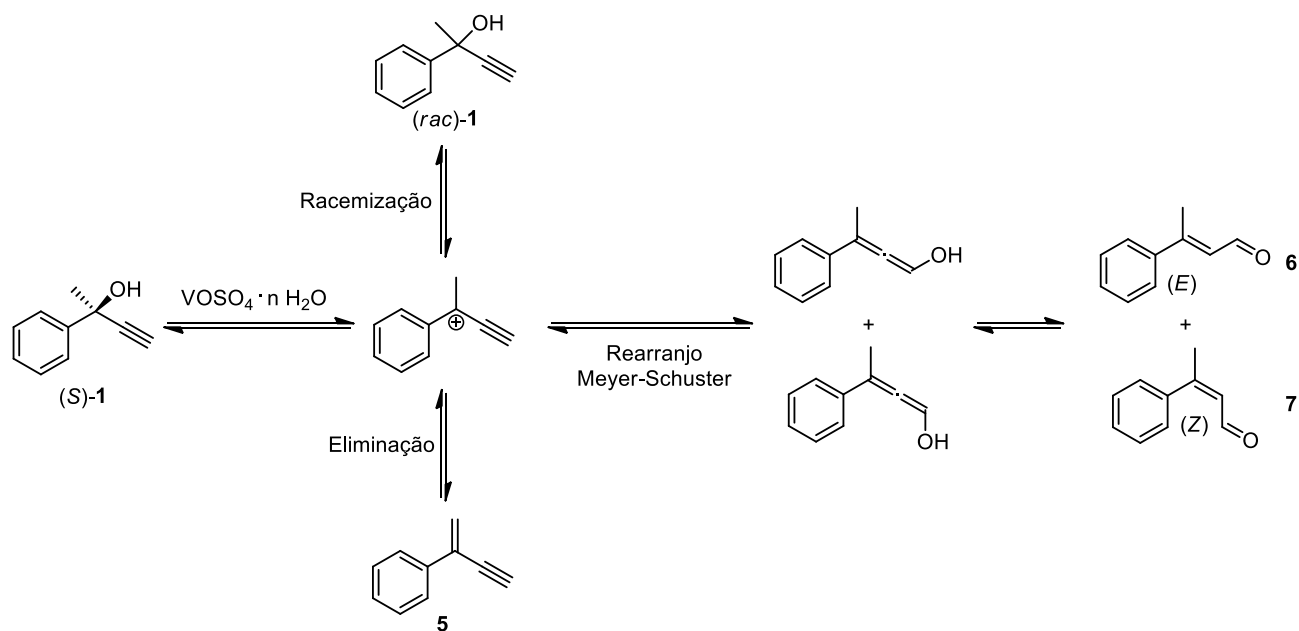
Substrato		Conversão (%)	ee (%)
Ar	R		
Ph	Me	85	>99
<i>p</i> -MePh	Me	87	>99
<i>p</i> -MeOPh	Me	73	>99
<i>p</i> -FPh	Me	79	>99
<i>p</i> -CF ₃ Ph	Me	80	>99
Ph	Et	74	>99
2-furano	Me	88	>99

Outro obstáculo imposto pelos catalisadores de oxovanádio e que já foi observado no caso de álcoois secundários propargílicos é a competição entre o processo de racemização e o rearranjo Meyer-Schuster, que resulta na formação de aldeídos α,β -insaturado devido ao mecanismo de transposição-1,3 da hidroxila. Isso ocorre porque, quando o grupo OH se complexa ao vanádio e é removido, formando o carbocátion, o ataque de uma molécula de água pode ocorrer tanto no carbono anteriormente ligado à hidroxila, de modo a racemizar o álcool, quanto no carbono terminal do alcino, formando um alenol, que por tautomeria, dará origem ao aldeído. Para favorecer a racemização sobre o rearranjo, Akai e colaboradores realizaram um estudo e identificaram que solvente tem forte influência no processo, já que a

utilização do trifluormetilbenzeno foi responsável por suprimir a reação indesejada e acelerar a racemização, ao passo que o diclorometano beneficiou a formação do produto lateral (KAWANISHI *et al*, 2019).

Além deste subproduto, o mecanismo ácido-base pelo qual ocorre a racemização na presença de catalisadores a base vanádio, favorece reações de eliminação unimolecular, nas quais um próton é abstraído do carbono adjacente ao carbocátion, formando um alceno. Ambos os subprodutos foram identificados num trabalho focado na racemização de álcoois terciários propargílicos utilizando resinas ácidas em meio aquoso, embora não haja evidência de que os mesmos subprodutos sejam formados no caso dos álcoois terciários propargílicos com catalisadores de oxovanádio (GÖRBE; LIHAMMAR; BÄCKVALL, 2018). O Esquema 10 apresenta o mecanismo de formação dos produtos de eliminação (**5**) e rearranjo (**6** e **7**) que podem vir a competir com a racemização do substrato (*rac*)-**1**.

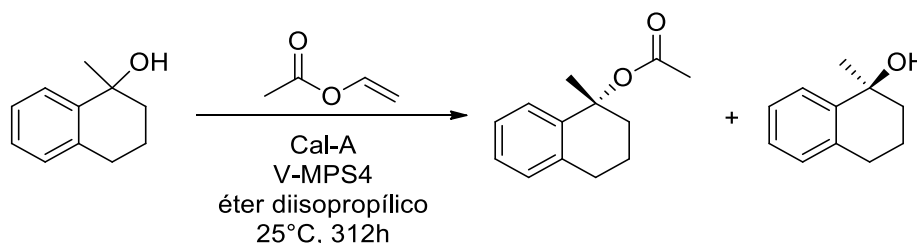
Esquema 10. Competição entre o processo de racemização de racemização de (*S*)-**1** e reações laterais de eliminação e rearranjo Meyer-Schuster



1.5.2. Resolução cinética dinâmica de álcoois terciários

A resolução cinética dinâmica quimioenzimática de álcoois terciários é ainda mais incipiente que a resolução cinética clássica. O primeiro protocolo foi publicado em 2020, pelo grupo de pesquisa do Professor Akai e trata-se de uma metodologia de RCD quimioenzimática voltada para um álcool terciário benzílico cíclico, utilizando um sistema composto pela CAL-A e um catalisador heterogêneo de oxovanádio (V-MPS4). A estratégia utilizada no trabalho consistiu em adicionar, inicialmente, apenas a enzima, e após 48 horas, adicionar o agente de racemização e uma nova carga de enzima. Depois de mais 24 horas, ainda mais CAL-A foi adicionada, e o sistema foi mantido sob agitação por 72 horas. Em seguida, os catalisadores foram filtrados, o solvente evaporado a pressão reduzida e um novo ciclo se iniciou, repetindo todos os passos realizados anteriormente, contabilizando um total de 312 horas de reação. Esta estratégia, embora pouco viável, foi essencial para driblar a perda de atividade da lipase e maximizar o rendimento do éster até a faixa dos 77%, com ee superior a 99% (Esquema 11) (KÜHN *et al.*, 2020).

Esquema 11. RCD quimioenzimática de álcoois terciários benzílicos cíclicos



Neste sentido, dada a escassez de dados na literatura, o presente trabalho propôs o desenvolvimento uma metodologia de resolução cinética dinâmica quimioenzimática visando a obtenção de álcoois terciários propargílicos enantiomericamente puros através da combinação de dois catalisadores heterogêneos disponíveis comercialmente: a lipase A de *Candida antarctica* imobilizada em *immobead* 150, recombinante de *Aspergillus oryzae*, que atuará como catalisador quiral, e o sulfato de vanadila hidratado, cujo papel é racemizar o enantiômero menos favorecido e elevar o rendimento para valores superiores a 50%.

5. CONCLUSÃO

A primeira etapa deste trabalho se concentrou no estudo da resolução cinética de um único álcool terciário propargílico, onde foram realizadas diversas triagens, incluindo um estudo da engenharia do meio reacional, no qual foram fixadas apenas a concentração de substrato (*rac*)-**1** e a enzima responsável pela reação de transesterificação enantiosseletiva, a lipase A de *Candida antarctica* (CAL-A), ao passo que todos os demais parâmetros foram sucessivamente variados: temperatura, solvente, identidade do doador de acila, carga de enzima e concentração do doador de acila. Na melhor condição, foi utilizado isooctano, seis equivalentes de butirato de vinila, uma massa de enzima quatro vezes maior que a do substrato e temperatura de 30 °C. Após 48 horas de reação, (*R*)-**1b** foi obtido com 33% de conversão e 95% de ee.

Este resultado representa avanços frente a trabalhos anteriores da literatura, apesar de todos se limitarem a conversões próximas a 35% e ee na ordem dos 94%. Em comparação a metodologia desenvolvida por Bornscheuer e colaboradores (KRISHNA; PERSSON; BORNSCHEUER, 2002), as vantagens se concentram principalmente na eficiência do sistema, uma vez que obtivemos uma conversão praticamente idêntica em menos da metade do tempo, utilizando uma razão enzima/substrato 32 vezes menor, ou seja, uma quantidade de enzima bem menor foi suficiente para converter a mesma quantidade de substrato ao respectivo produto de interesse. Com relação ao artigo publicado mais recentemente por Bäckvall e colaboradores (LÖFGREN *et al.*; 2019), cujo foco era o desenvolvimento e aplicação de uma CAL-A mutante (variante L367G) na resolução cinética de (*rac*)-**1**, os maiores benefícios do nosso trabalho correspondem à utilização de enzimas selvagens e disponíveis comercialmente, que são economicamente mais viáveis, além de temperaturas menores para obtenção de resultados similares.

Na etapa seguinte, foi avaliado um pequeno escopo de substratos, variando separadamente cada um dos substituintes do substrato modelo e observando os respectivos efeitos estéricos e eletrônicos. No caso de (*rac*)-**2**, a substituição da metila por um grupo CF₃ apresentou conversão nula, indicando que um grupo retirador de densidade eletrônica próximo à hidroxila influencia diretamente na nucleofilicidade da molécula, pois o álcool precisa de um par de elétrons prontamente disponível para atacar o intermediário acil-enzima. A limitação de (*rac*)-**3**, que possui um anel

piridínico, diz respeito à solubilidade da molécula em solventes apolares, já que foi necessária a utilização de acetato de etila como solvente e o sistema, como observado anteriormente, não responde bem a solventes polares, levando a uma conversão de 2% para este substrato. Por fim, a substituição do grupo etinil pela etila de (*rac*)-**4**, reduziu a conversão para 3%, o que deve ser decorrente da livre rotação da etila, que impõe um fator estérico adicional ao sistema. Logo, cada substituinte de (*rac*)-**1** tem um efeito benéfico ao sistema, tornando-o um substrato ideal para a CAL-A e explicando o porquê de ele ser o mais utilizado em trabalhos anteriores.

Por fim, foram realizadas duas tentativas inéditas de desenvolvimento de metodologia para a resolução cinética dinâmica de um álcool terciário propargílico, utilizando um sistema quimioenzimático composto pela CAL-A e pelo sulfato de vanadila. Na ausência de compartimentalização, ambos os catalisadores tiveram suas atividades diminuídas devido ao contato físico, resultando numa conversão de apenas 13%. Quando uma barreira física foi colocada entre os dois, a conversão aumentou para 18%, mas foram observados subprodutos de eliminação e de rearranjo Meyer-Schuster, favorecidos pelo carbocátion terciário formado como intermediário no processo de racemização.

6. REFERÊNCIAS

ABECASSIS, K.; GIBSON, S. E. Synthesis of (+)- and (–)-gossonorol and cyclisation to boivinianin B. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 2938-2944, 2010.

AKAI, S.; TANIMOTO, K.; KANAO, Y.; EGI, M.; YAMAMOTO, T.; KITA, Y. A Dynamic Kinetic Resolution of Allyl Alcohols by the Combined Use of Lipases and [VO(OSiPh₃)₃]. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, p. 2592-2595, 2006.

ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green chemistry: Principles and practice. **Chemical Society Reviews**, v. 39, p. 301-312, 2010.

APROTOSOAIE, A. C.; HANCIANU, M.; COSTACHE, I.; MIRON, A. Linalool: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties. **Flavour and Fragrance Journal**. v. 29, p. 193-219, 2014.

BELL, E. L.; FINNIGAN, W.; FRANCE, S. P.; GREEN, A. P.; HAYES, M. A.; HEPWORTH, L. J.; LOVELOCK, S. L.; NIIKURA, H.; OSUNA, S.; ROMERO, E.; RYAN, K. S.; TURNER, N. J.; FLITSCH, S. L. Biocatalysis. **Nature Reviews**, v. 1, p. 1-21, 2021.

BIESZCZAD, B.; GILHEANY, D. G. Asymmetric Grignard Synthesis of Tertiary Alcohols through Rational Ligand Design. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 56, p. 4272-4276, 2017.

BIROLI, W. G.; FONSECA, L. P.; PORTO, A. L. M. Aldol Reactions by Lipase From *Rhizopus niveus*, an Example of Unspecific Protein Catalysis. **Catalysis Letters**, v. 147, p. 1977-1987, 2017.

BONNLÄNDER, B.; CAPPUCCIO, R.; LIVERANI, F. S.; WINTERHALTER, P. Analysis of enantiomeric linalool ratio in green and roasted coffee. **Flavour and Fragrance Journal**. v. 21, p. 637-641, 2006.

BORNSCHEUER, U. T.; KAZLAUSKAS, R. J. **Hydrolases in Organic Synthesis**. Regio- and Stereoselective Biotransformations. 2. ed. Wiley-VCH, 2006.

CADIERNO, V.; GARCÍA-GARRIDO, S. E.; GIMENO, J. Isomerization of Propargylic Alcohols into α,β -Unsaturated Carbonyl Compounds Catalyzed by the Sixteen-

ElectronAllyl-Ruthenium(II) Complex $[\text{Ru}(\eta^3\text{-2-C}_3\text{H}_4\text{Me})(\text{CO})(\text{dppf})][\text{SbF}_6]$. **Advanced Synthesis Catalisys**, v. 348, p. 101–110, 2006.

CASAS-GODOY, L.; GASTEAZORO, F.; DUQUESNE, S.; BORDES, F.; MARTY, A.; SANDOVAL, G. **Lipases: An Overview**. 2018. cap. 1, p. 3-38.

CASTILLO, E.; CASAS-GODOY, L.; SANDOVAL, G. Medium-engineering: a useful tool for modulating lipase activity and selectivity. **Biocatalysis**, v. 1, p. 178-188, 2015.

CHEN, S.; FANG, J. Preparation of optically active tertiary alcohols by enzymatic methods. Application to the synthesis of drugs and natural products. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 62, p. 4349-4357, 1997.

CLAYDEN, J.; FARNABY, W.; GRAINGER, D. M.; HENNECKE, U.; MANCINELLI, M.; TETLOW, D. J.; HILLIER, I. H.; VINCENT, M. A. N to C Aryl Migration in Lithiated Carbamates: r-Arylation of Benzylic Alcohols. *Journal of American Chemical Society*, v. 131, p. 3410-3411, 2009.

DE ALMEIDA, L. A.; MARCONDES, T. H.; MILAGRE, C. D. F.; MILAGRE, H. M. S. Lipase-oxovanadium heterogeneous catalysis system: a robust protocol for the dynamic kinetic resolution of sec-alcohols. **ChemCatChem**, v. 12, p. 2849-2858, 2020.

DE MARCO, B. A.; RECHELO, B. S.; TÓTOLI, E. G.; KOGAWA, A. C.; SALGADO, H. R. N. Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, p. 1-8, 2019.

DE MARÍA, P. D.; CARBONI-OERLEMANS, C.; YUIN, B.; BARGEMAN, G.; VAN DER MEER, A. VAN GEMERT, R. Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: State-of-the-art. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 37, p. 36–46, 2005.

DE MIRANDA, A. S.; MIRANDA, L. S. M.; de SOUZA, R. O. M. A. Lipases: Valuable catalysts for dynamic kinetic resolutions. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 372–393, 2015.

DE MIRANDA, A. S.; SILVA, M. V. M.; DIAS, F. C.; DE SOUZA, S. P.; LEÃO, R. A. C.; DE SOUZA, R. O. M. A. Continuous flow dynamic kinetic resolution of rac-1-phenylethanol using a single packed-bed containing immobilized CAL-B lipase and

VOSO₄ as racemization catalysts. **Reaction Chemistry and Engineering**, v. 2, p. 375-381, 2017.

DWIVEDEE, B. P.; SONI, S.; SHARMA, M.; BHAUMIK, J.; LAHA, J. K.; BANERJEE, U. C. Promiscuity of Lipase-Catalyzed Reactions for Organic Synthesis: A Recent Update. **ChemistrySelect**, v. 3, p. 2441-2466, 2018.

EGI, M.; SUGIYAMA, K.; SANETO, M.; HANADA, R.; KATO, K.; AKAI, S. A Mesoporous-Silica-Immobilized Oxovanadium Cocatalyst for the Lipase-Catalyzed Dynamic Kinetic Resolution of Racemic Alcohols. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, p. 3654-3658, 2013.

ELENKOV, M. M.; HOEFFKEN, H. W.; TANG, L.; HAUER, B.; JANSSEN, D. B. Enzyme-Catalyzed Nucleophilic Ring Opening of Epoxides for the Preparation of Enantiopure Tertiary Alcohols. **Advanced Synthesis Catalysis**, v. 349, p. 2279-2285, 2007.

ERICSSON, D. J.; KASRAYAN, A.; JOHANSSON, P.; BERGFORS, T.; SANDSTRÖN, A. G.; BÄCKVALL, J. E.; MOWBRAY, S. L. 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.

FAN, Y.; CAI, D.; WANG, X.; YANG, L. Ionic Liquids: Efficient Media for the Lipase-Catalyzed Michael Addition. **Molecules**, v. 23, p. 2154-2165, 2018.

FISCHER, M.; THAI, Q. K.; GRIEB, M.; PLEISS, J. DWARF – a data warehouse system for analyzing protein families. **BMC Bioinformatics**, v. 7, p. 495-504, 2006.

FRONZA, G.; FUGANTI, C.; SERRA, S. Stereochemical Course of Baker's Yeast Mediated Reduction of the Tri- and Tetrasubstituted Double Bonds of Substituted Cinnamaldehydes. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 6160–6171, 2009.

GENNARI, A.; MOBAYED, F. H.; RAFAEL, R. S.; RODRIGUES, R. C.; SPEROTTO, R. A.; VOLPATO, G.; DE SOUZA, C. F. V. Modification of Immobead 150 Support for Protein Immobilization: Effects on the Properties of Immobilized Aspergillus oryzae β -Galactosidase. **Biotechnology Progress**, v. 34, p. 934-943, 2018.

GHANEM, A.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Application of Lipases in Kinetic Resolution of Racemates. **Chirality**, v. 17, p. 1-15, 2005.

GONZÁLEZ-LÓPEZ, S.; YUS, M.; RÁMON, D. J. Enantioselective synthesis of (+)-gossonorol and related systems using organozinc reagents. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 23, p. 611-615, 2012.

GÖRBE, T.; LIHAMAR, R.; BÄCKVAL, J. Heterogeneous Acid-Catalyzed Racemization of Tertiary Alcohols. **Chemistry – A European Journal**, v. 24, p. 77-80, 2018.

HECKMANN, C. M.; PARADISI, F. Looking Back: A Short History of the Discovery of Enzymes and How They Became Powerful Chemical Tools. **ChemCatChem**, v. 12, p. 6082-6102, 2020.

HEINZE, B.; KOURIST, R.; FRANSSON, L.; HULT, K.; BORNSCHEUER, U. T. Highly enantioselective kinetic resolution of two tertiary alcohols using mutants of an esterase from *Bacillus subtilis*. **Protein Engineering, Design & Selection**, v. 20, p. 125–131, 2007.

HENKE, E.; PLEISS, J.; BORNSCHEUER, U. T. Activity of Lipases and Esterases towards Tertiary Alcohols: Insights into Structure-Function Relationships. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, p. 3211-3213, 2002.

HOSSEINZADEH, R.; ABOLFAZLI, M. K.; MOHSENI, M.; MOHADJERANI, M.; LASEMI, Z. Efficient Synthesis and Antibacterial Activities of Some Novel 1,2,3-Triazoles Prepared from Propargylic Alcohols and Benzyl Azides. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 51, p. 1298-1305, 2014.

Importance of Green and Sustainable Chemistry in the Chemical Industry. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 10, p. 8239–8241, 2022.

KAZLAUSKAS, R. J.; WEISSFLOCH, A. N. E.; RAPPAPORT, A. T.; CUCCIA, L. A. A Rule To Predict Which Enantiomer of a Secondary Alcohol Reacts Faster in Reactions Catalyzed by Cholesterol Esterase, Lipase from *Pseudomonas cepacia*, and Lipase from *Candida rugosa*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 56, p. 2656-2665, 1991.

KAWANISHI, S.; OKI, S.; KUNDU, D.; AKAI, S. Lipase/Oxovanadium Co-Catalyzed Dynamic Kinetic Resolution of Propargyl Alcohols: Competition between Racemization and Rearrangement. **Organic Letters**, v. 21, p. 2978-2982, 2019.

KIRK, O.; CHRISTENSEN, M. W. Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin. **Organic Process Research & Development**, v. 6, p. 446–451, 2002.

KOBAYASHI, D.; MIURA, M.; TORIYAMA, M.; MOTOHASHI, S. Stereoselective synthesis of secondary and tertiary propargylic alcohols induced by a chiral sulfoxide auxiliary. **Tetrahedron Letters**, v. 60, p. 120-123, 2019.

KOURIST, R.; BARTSCH, S.; BORNSCHEUER, U. T. Highly enantioselective synthesis of arylaliphatic tertiary alcohols using mutants of an esterase from *Bacillus subtilis*. **Advanced Synthesis Catalysis**, v. 349, p. 1393-1348, 2007.

KRISHNA, S. H.; PERSSON, M.; BORNSCHEUER, U. T. Enantioselective transesterification of a tertiary alcohol by lipase A from *Candida antarctica*. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 13, p. 2693-2696, 2002.

KÜHN, F.; KATSURAGI, S.; OKI, Y.; SCHOLZ, C.; AKAI, S.; GRÖGER, H. Dynamic kinetic resolution of a tertiary alcohol. *Chemical Communications*, v. 56, p. 2885-2888, 2020.

LEUSER, H.; PERRONE, S.; LIRON, F.; KNEISEL, F. F.; KNOCHEL, P. Highly Enantioselective Preparation of Tertiary Alcohols and Amines by Copper-Mediated Diastereoselective Allylic SN2' Substitutions. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, p. 4627-4631, 2005.

LETIZIA, C. S.; COCCHIARA, J.; LALKO, J.; API, A. M. Fragrance material review on linalool. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 943-964, 2003.

LÖFGREN, J.; GÖRBE, T.; OSCHMANN, M.; HUMBLE, M. S.; BÄCKVALL, J. Transesterification of a tertiary alcohol by engineered *Candida antarctica* lipase A. **ChemBioChem**, v. 20, p. 1438-1443, 2019.

LU, S.; POH, S. B.; SIAU, W.; ZHAO, Y. Kinetic Resolution of Tertiary Alcohols: Highly Enantioselective Access to 3-Hydroxy-3-Substituted Oxindoles. **Angewandte Chemie**, v. 125, p. 1775-1778, 2013.

MARKITON, M.; BONCEL, S.; JANAS, D.; CHROBOK, A. Highly Active Nanobiocatalyst from Lipase Noncovalently Immobilized on Multiwalled Carbon

Nanotubes for Baeyer–Villiger Synthesis of Lactones. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 5, p. 1685–1691, 2017.

MATTE, C. R.; BORDINHÃO, C.; POPPE, J. K.; BENVENUTTI, E. V.; COSTA, T. M. H.; RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Physical-Chemical Properties of the Support Immobead 150 Before and After the Immobilization Process of Lipase. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 1430-1439, 2017.

MÉNDEZ-SÁNCHEZ, D.; MANGAS-SÁNCHEZ, J.; BUSTO, E.; GOTOR, V.; GOTOR-FERNADÉZ, V. Dynamic Reductive Kinetic Resolution of Benzyl Ketones using Alcohol Dehydrogenases and Anion Exchange Resins. **Advanced Synthesis Catalysis**, v. 358, p. 122-131, 2016.

MONTEIRO, R. R. C.; VIRGEN-ORTIZ, J. J.; BERENGUER-MURCIA, A.; DA ROCHA, T. N.; DOS SANTOS, J. C. S.; ALCÁNTARA, A. R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Biotechnological relevance of the lipase A from *Candida antarctica*. **Catalysis Today**, v. 362, p. 141–154, 2021.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2011.

NODA, H.; KUMAGAI, N.; SHIBASAKI, M. Catalytic Asymmetric Synthesis of α -Trifluoromethylated Carbinols: A Case Study of Tertiary Propargylic Alcohols. **Asian Journal of Organic Chemistry**, v. 7, p. 599-612, 2018.

O'HAGAN, D.; ZAIDI, N. A. The Resolution of Tertiary α -Acetylene- Acetate Esters by the Lipase from *Candida Cylindracea*. **Tetrahedron: Assymetry**, v. 5, p. 1111-1118, 1994.

ÖZDEMIRHAN, D. Optically active tertiary alcohols by biocatalysis. **Synthetic Communications**, v. 47, p. 629-645, 2017.

ÖZDEMIRHAN, D.; SEZER, S.; SÖNMEZ, Y. Enzyme-catalyzed resolution of aromatic ring fused cyclic tertiary alcohols. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.19, p. 2717-2720, 2008.

PIERCE, M. E.; PARSONS, R. L.; RADESCA, L. A.; LO, Y. S.; SILVERMAN, S.; MOORE, J. R.; ISLAN, Q.; CHOUDHURY, S.; FORTUNAK, J. M. D.; NGUYEN, D.; LUO, C.; MORGAN, S. J.; DAVIS, W. P.; CONFALONE, P. N. Practical Asymmetric

Synthesis of Efavirenz (DMP 266), an HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitor. **Journal of Organic Chemistry**, v. 63, p. 8536-8543, 1998.

PLEISS, J.; FISCHER, M.; PEIKER, M.; THIELE, C.; SCHIMID, R. D. Lipase engineering database Understanding and exploiting sequence–structure–function relationships. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, p. 491–508, 2000.

PYSER, J. B.; CHAKRABARTY, S.; ROMERO, E. O.; NARAYAN, A. R. H. State-of-the-Art Biocatalysis. **ACS Central Science**, v. 7, p. 1105–1116, 2021.

QIAN, H.; HUANG, D.; BI, Y.; YAN, G. 2-Propargyl Alcohols in Organic Synthesis. **Advanced Synthesis Catalysis**, v. 361, p. 3240-3280, 2019.

REGIL, R.; SANDOVAL, G. Biocatalysis for Biobased Chemicals. **Biomolecules**, v. 3, p. 812-847, 2013.

SHELDON, R. A.; BRADY, D. Broadening the Scope of Biocatalysis in Sustainable Organic Synthesis. **ChemSusChem**, v. 12, p. 2859-2881, 2019.

SHELDON, R. A.; WOODLEY, J. M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 118, p. 801-838, 2018.

SIRÉN, S.; DAHLSTRÖM, K. M.; PUTTREDDY, R.; RISSANEN, K.; SALMINEN, T. A.; SCHEININ, M.; LI, X.; LILJEBLAD, A. Candida antarctica Lipase A-Based Enantiorecognition of a Highly Strained 4-Dibenzocyclooctynol (DIBO) Used for PET Imaging. **Molecules**, v. 25, p. 879-890, 2020.

STYMIEST, J. L.; BAGUTSKI, V.; FRENCH, R. M.; AGGARWAL, V. K. Enantiodivergent conversion of chiral secondary alcohols into tertiary alcohols. **Nature**, v. 456, p. 778-783, 2008.

TAKIZAWA, S.; GRÖGER, H.; SASAI, H. Vanadiumin Asymmetric Synthesis: Emerging Concepts in Catalyst Design and Applications. **Chemistry-A European Journal**, v. 21, p. 8992-8997, 2015.

TIAN, X.; ZHANG, S.; ZHENG, L.; First Novozym 435 lipase-catalyzed Morita–Baylis–Hillman reaction in the presence of amides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 84, p.32–40, 2016.

VAITHIANATHAN, V.; NAGA, C.; ARUMUGAN, S. **Novel 1,2,3-triazole antifungal agents and preparation thereof**. Depositante: Council of scientific and industrial research. WO2015/193915 A1. Depósito: 18 jun. 2015. Concessão: 23 dez. 2015.

VERHO, O.; BACKVALL, J.-E. Chemoenzymatic Dynamic Kinetic Resolution: A Powerful Tool for the Preparation of Enantiomerically Pure Alcohols and Amines. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, p. 3996-4009, 2015.

WUYTS, S.; TEMMERMAN, K.; DE VOS, D.; JACOBS, P. A zeolite–enzyme combination for biphasic dynamic kinetic resolution of benzylic alcohols. **Chemical Communications**, v. 15, p. 1928-1929, 2003.

WUYTS, S.; WAHLEN, J.; JACOBS, P. A.; DE VOS, D. E. Heterogeneous vanadium catalysts for racemization and chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of benzylic alcohols. **Green Chemistry**, v. 9, p. 1104–1108, 2007.

YI, D.; BAYER, T.; BADENHORST, C. P. S.; WU, S.; DOERR, M.; HÖHNE, M.; BORNSCHEUER, U. T. Recent trends in biocatalysis. **Chemical Society Reviews**, v. 50, p. 8003-8049, 2021.