

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"

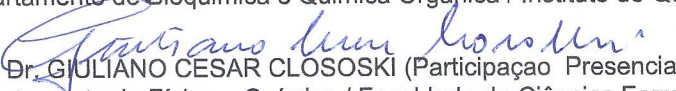
AUTOR: LAERTE GANÉO NETO

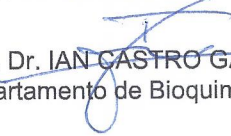
ORIENTADOR: HUMBERTO MÁRCIO SANTOS MILAGRE

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

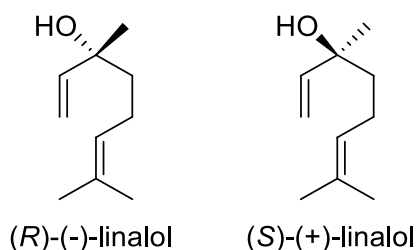
1. INTRODUÇÃO

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

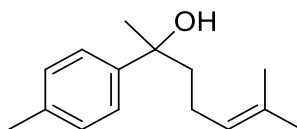


As plantas geralmente produzem uma maior quantidade de um dos enantiômeros do linalol, de modo que o aroma pode ser utilizado como um indicativo do enantiômero presente (BONNLÄNDER *et al.*, 2006). O enantiômero (S), por exemplo, apresenta um aroma doce, herbáceo e floral, sendo encontrado no óleo essencial 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 sesquiterpreno 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

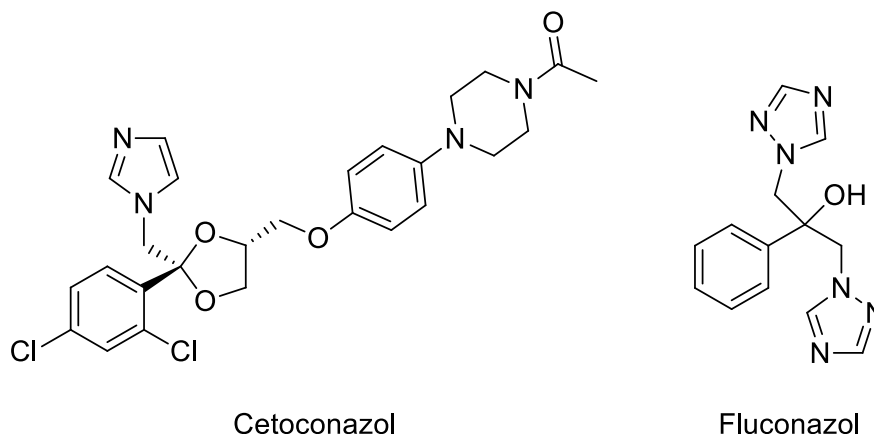


1.1.1. Álcoois terciários propargílicos

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).

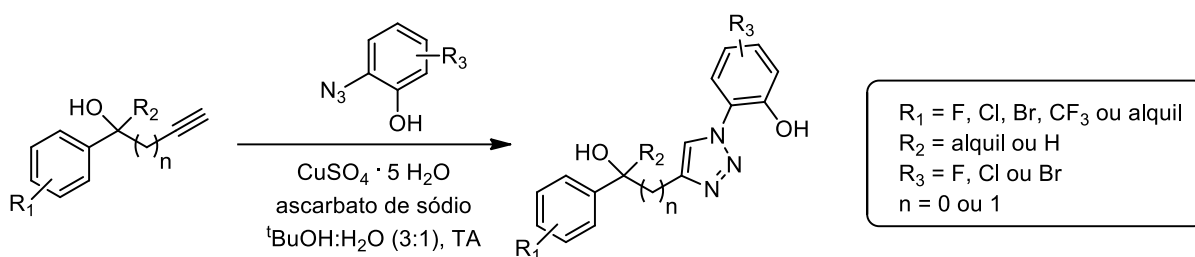
Essa classe de álcoois terciários é utilizada na síntese de *N*-heterocíclicos, como é o caso dos 1,2,3-triazóis, que possuem atividade biológica como: bactericida, antialérgica e anti-HIV (HOSSEINZADEH *et al.*, 2014). Diversos medicamentos utilizados no tratamento antifúngico pertencem à classe dos “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”

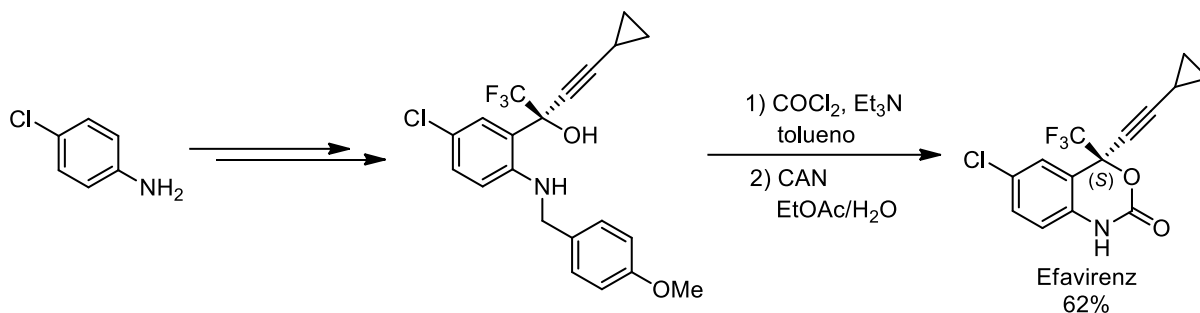


Uma patente registrada em 2015 por Vaithiyanathan e colaboradores reporta uma estratégia verde para a síntese de 1,2,3-triazóis com atividade antifúngica (Figura 4). Os materiais de partida utilizados foram os alcinóis, grupo que inclui álcoois propargílicos e álcoois com tripla ligação em outras posições.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

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

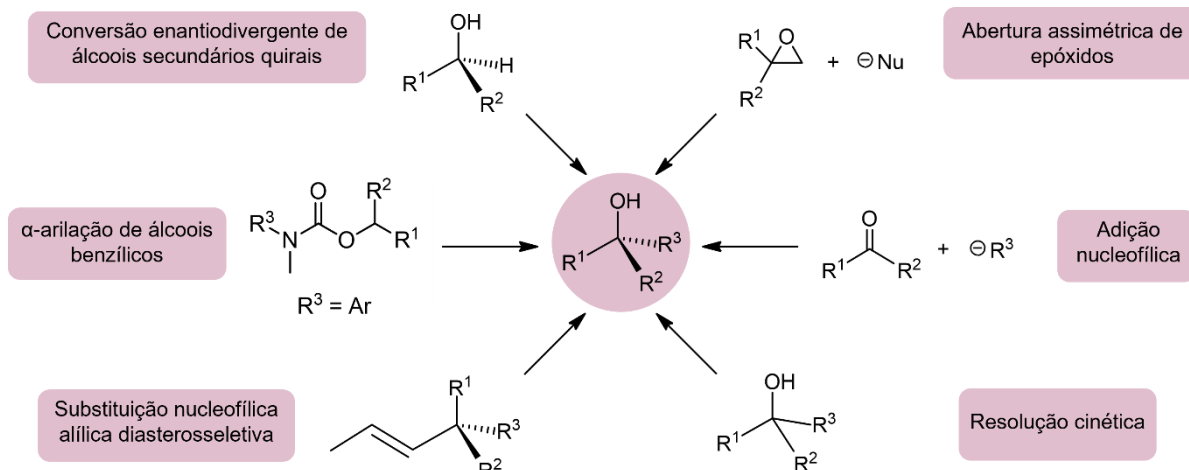


A síntese do Efavirenz (Esquema 1) é outro exemplo, mais específico, da utilização de álcoois terciários propargílicos quirais como blocos construtores de fármacos. Enquanto o enantiômero *R* desse composto não apresenta atividade biológica, o enantiômero *S* atua como inibidor da HIV transcriptase (NODA;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

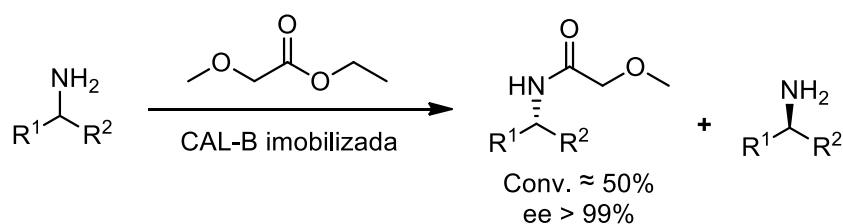
Dentre as subclasses da catálise, a biocatálise destaca-se ainda mais do ponto de vista sustentável, uma vez que não envolve a utilização de recursos não renováveis, ao contrário dos catalisadores organometálicos, por exemplo, que em geral empregam metais preciosos e pouco abundantes na crosta terrestre (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

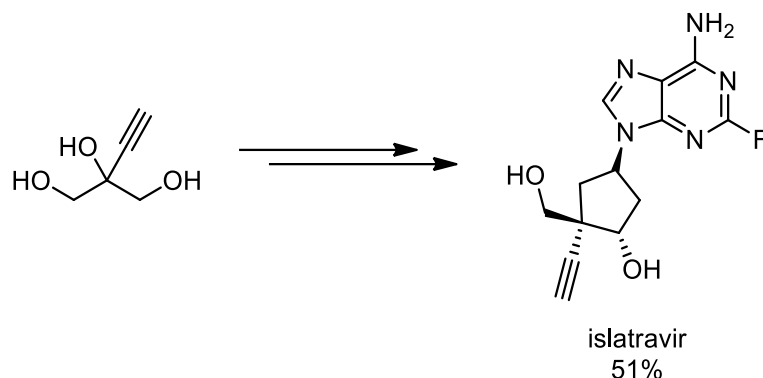
princípios 3, 4 e 10, que são inerentes ao produto, e não ao processo em si. Muito disso se deve à elevada quimio, regio e estereosseletividades das enzimas, propriedades que dificilmente são atingidas utilizando catalisadores químicos. Logo, os biocatalisadores são sustentáveis, seguros, seletivos e 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

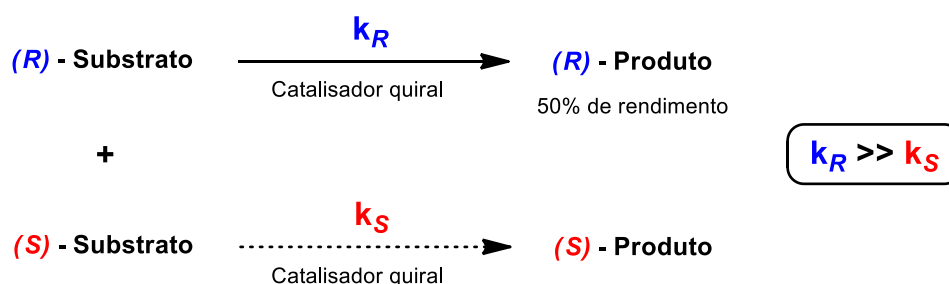


Um exemplo mais atual foi aplicado pela Merck® em parceria com a Codexis® na síntese do fármaco Islatravir, um medicamento utilizado no tratamento do HIV. Trata-se de uma síntese enzimática total, constituída de 5 etapas, nas quais as enzimas envolvidas foram modificadas de modo que as atividades desejadas 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).

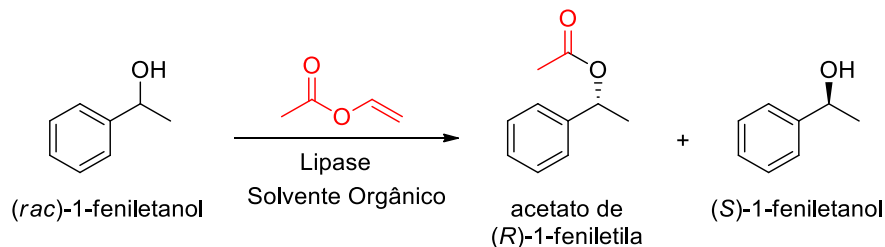
Esquema 5. Esquema gnérico de uma resolução cinética

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

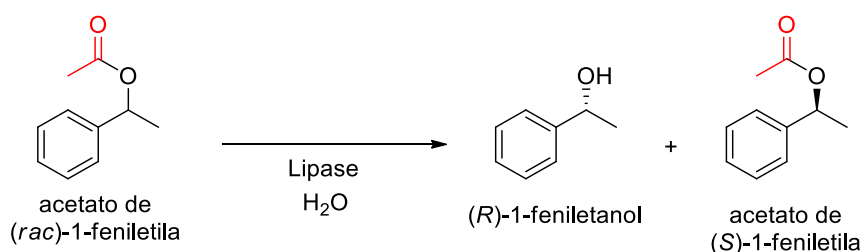
ilustra ambas as reações caso o 1-feniletanol atue como substrato da transesterificação e o acetato de 1-feniletila como substrato da reação de hidrólise.

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).

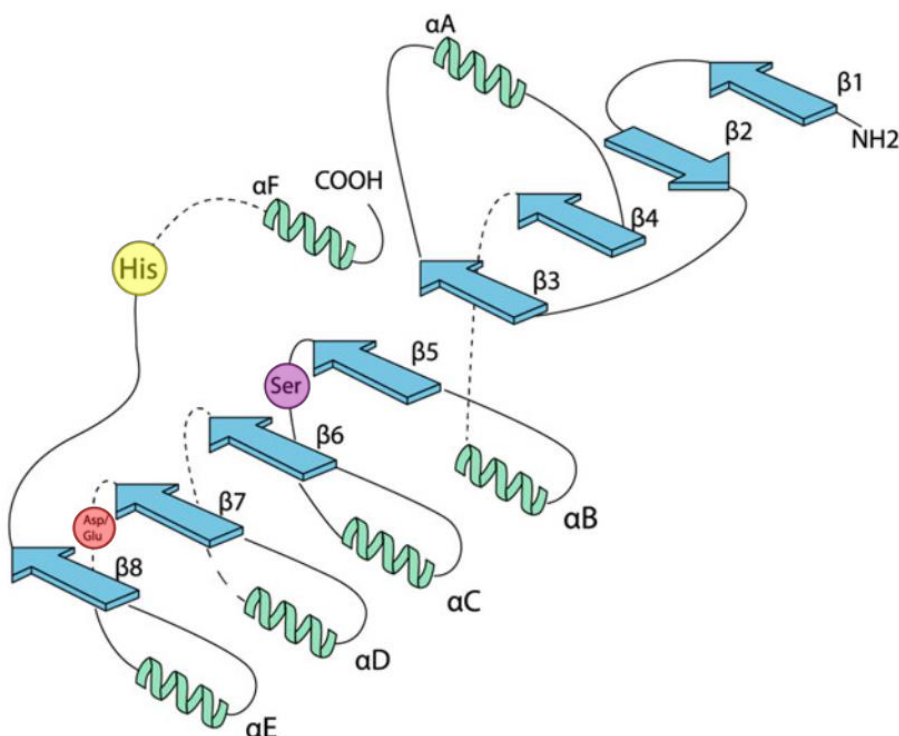
Tabela 1. Classificação das enzimas pela IUBMB

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)

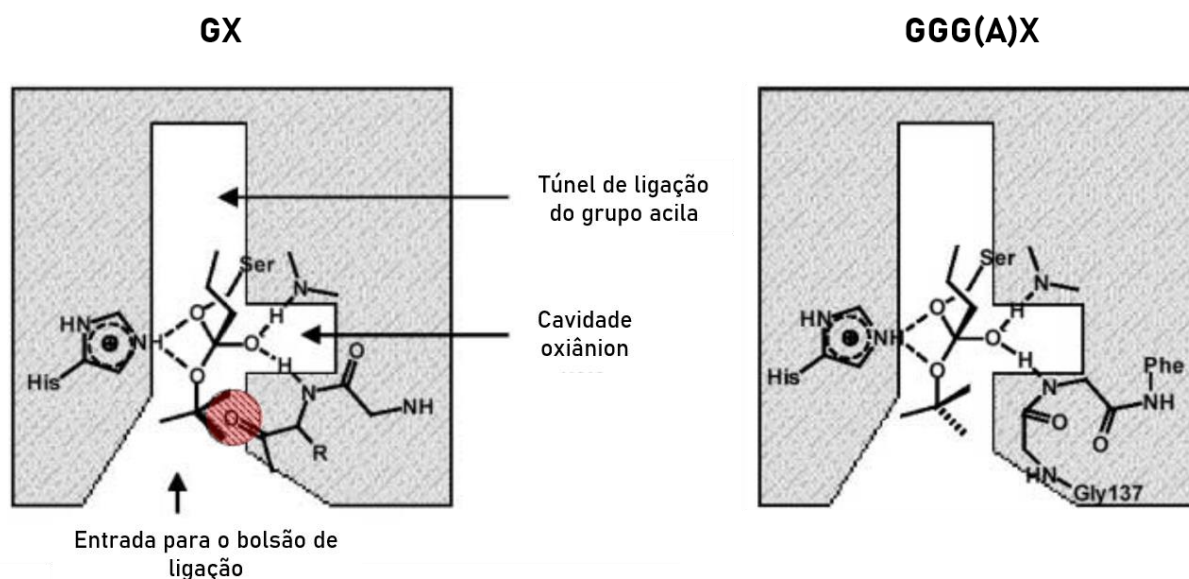
O primeiro resíduo da cavidade oxiânion é aquele que sucede a serina catalítica no pentapeptídeo G-X1-S-X2-G, ou seja, **X2**. O segundo aminoácido, no entanto, difere bastante, sendo responsável por agrupar as lipases em três diferentes classes. Duas delas foram identificadas por Pleiss e colaboradores, 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



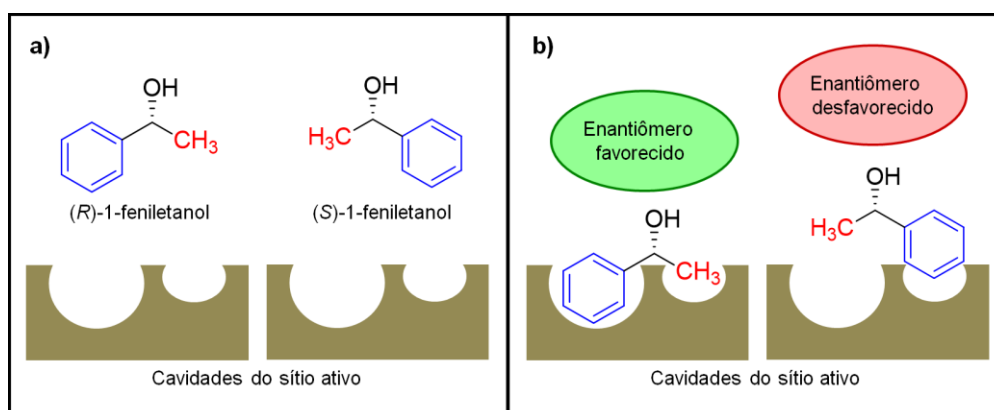
Fonte: Adaptado de (HENKE; PLEISS; BORNSCHEUER, 2002).

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

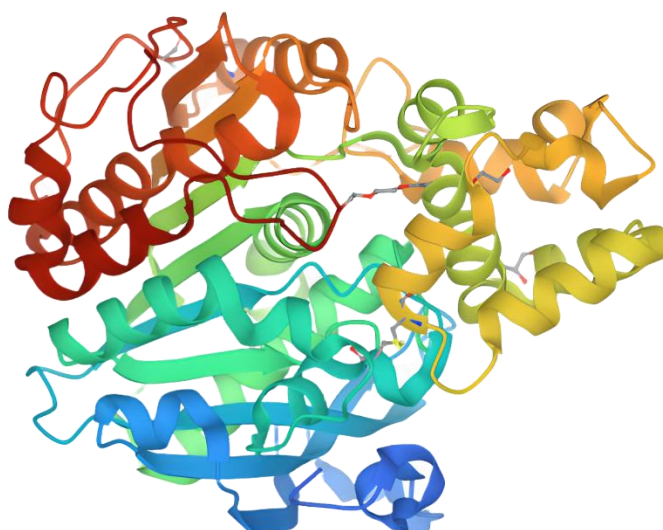


1.4.2. Lipase A de *Candida antarctica* (CAL-A)

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



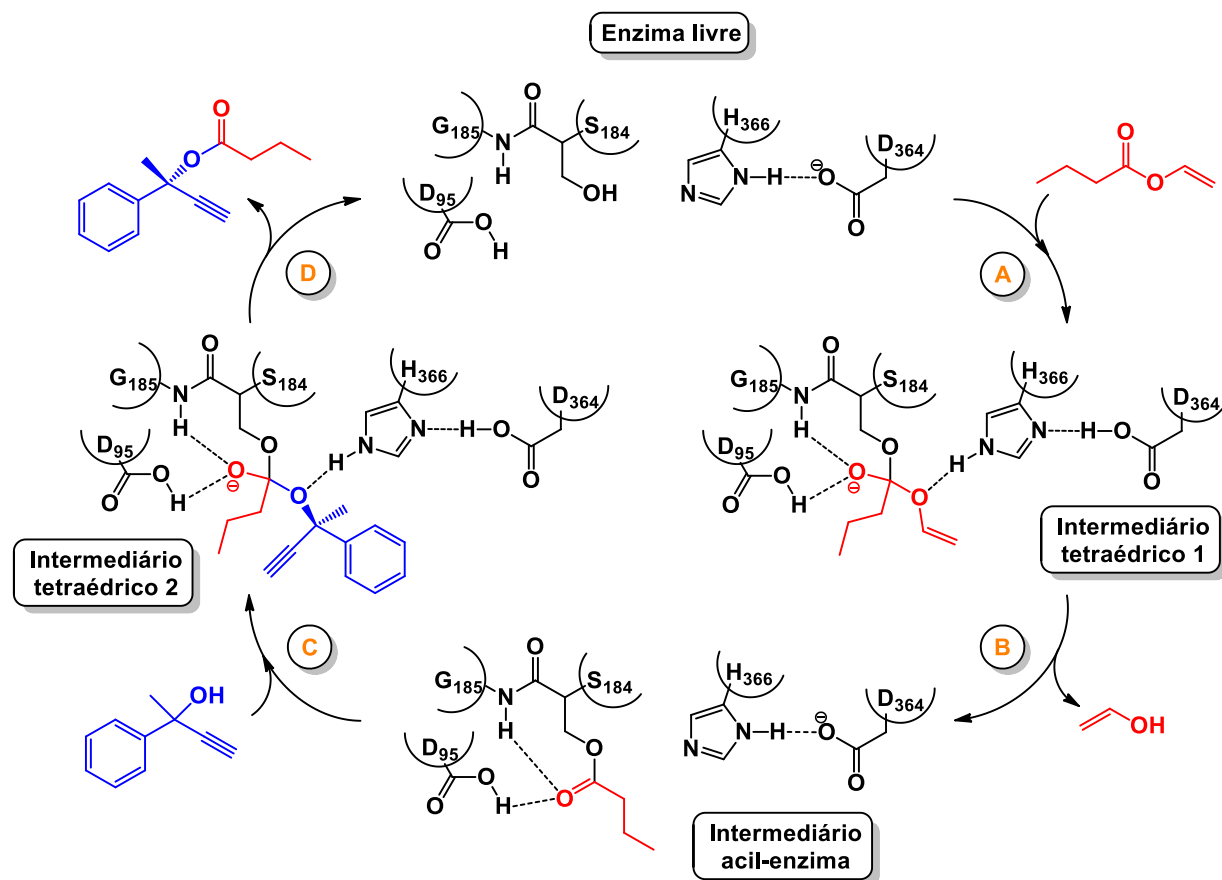
Fonte: PDB ID: 3GUU

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*



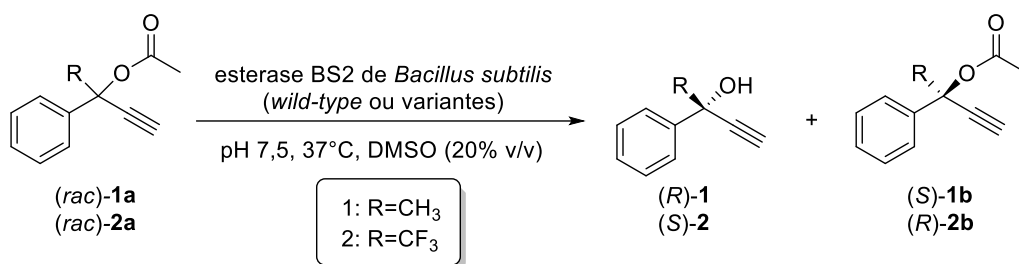
Atualmente, uma das formas comercializadas da CAL-A é a imobilizada em Immobead 150. Este suporte é um copolímero de metacrilato funcionalizado com grupos epóxi, com tamanho médio de partícula variando entre 150 e 300 μm e poro de 2-50 nm. Particularmente, o Immobead é interessante para a imobilização 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

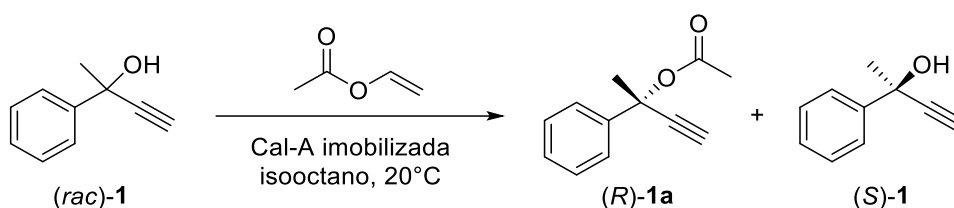


Esterase BS2	Substrato	Conversão (%)	ee (%)
wild-type	(rac)- 1a	48	52
wild-type	(rac)- 2a	33	93
Variante G105A	(rac)- 1a	50	89
Variante G105A	(rac)- 2a	58	96
Variante E188D	(rac)- 1a	40	91

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).

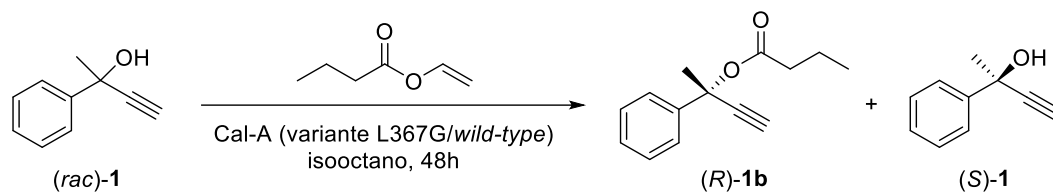
Tabela 3. Transesterificação do 2-fenil-3-butin-2-ol utilizando CAL-A em diferentes suportes de imobilização e acetato de vinila como doador de acila



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).

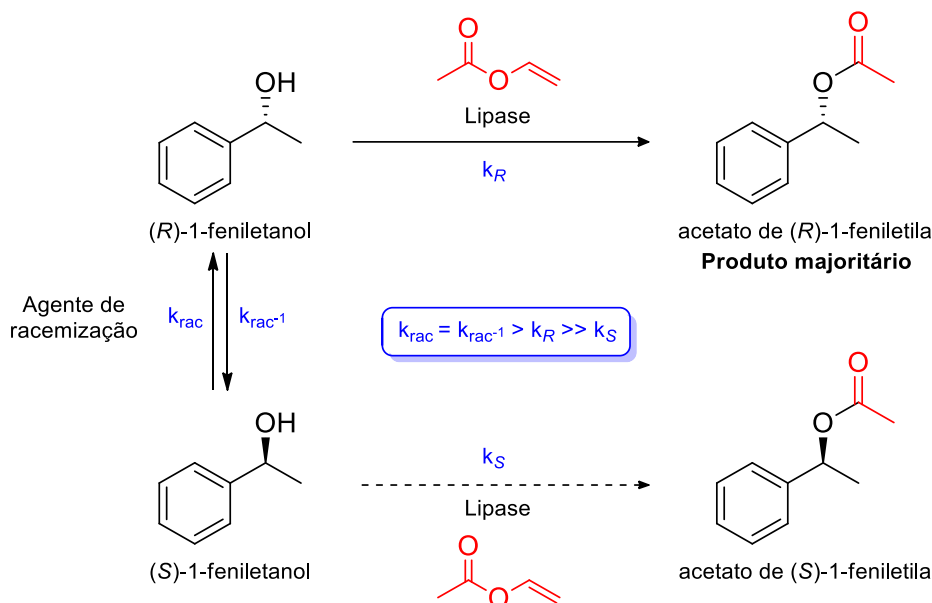
Tabela 4. Comparação entre a enzima CAL-A e variante L367G frente à transesterificação do 2-fenil-3-buten-2-ol



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).

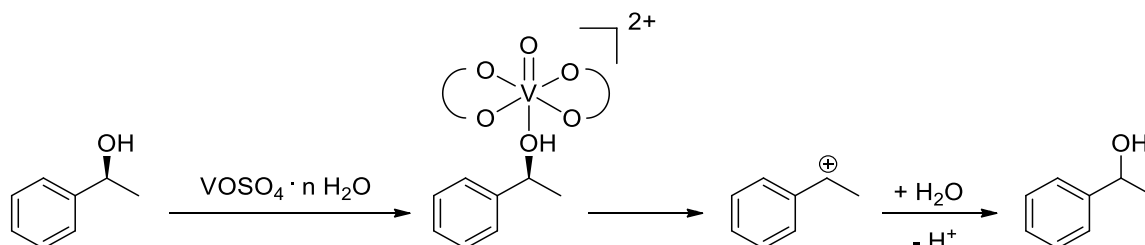
Um processo de racemização pode ocorrer por meio de vários mecanismos, como via catálise enzimática, substituição nucleofílica, reações de oxirredução ou catálise ácido-base. No caso dos álcoois secundários, geralmente são utilizados complexos de metais de transição e a racemização ocorre através de 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).

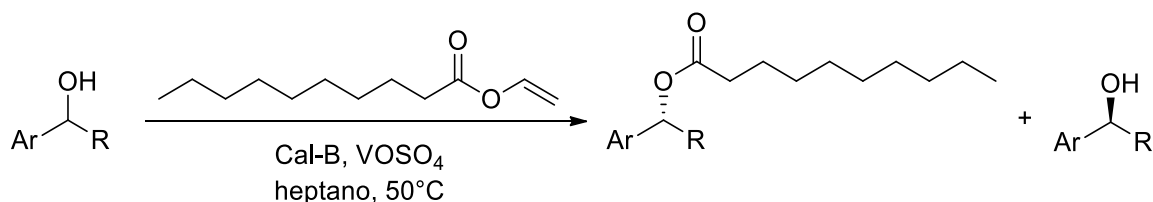
Esquema 9. Mecanismo de racemização do (S)-1-feniletanol via formação de carbocátion



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



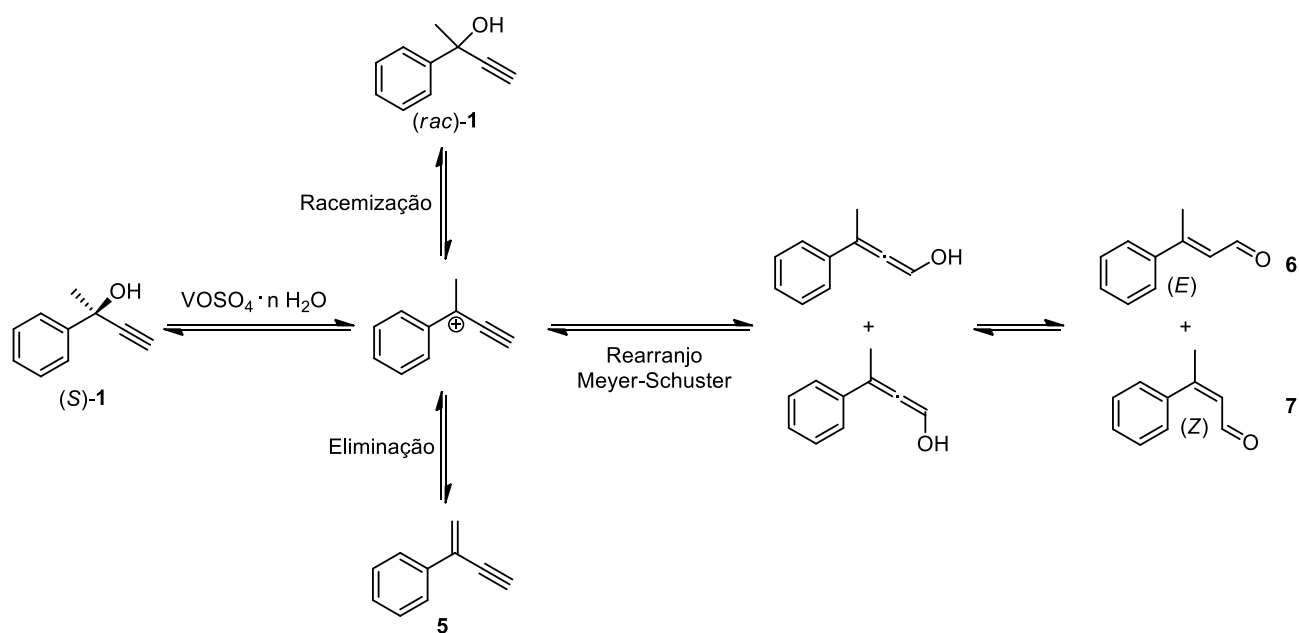
Substrato		Conversão (%)	ee (%)
Ar	R		
Ph	Me	85	>99
<i>p</i> -MePh	Me	87	>99
<i>p</i> -MeOPh	Me	73	>99
<i>p</i> -FPh	Me	79	>99
<i>p</i> -CF ₃ Ph	Me	80	>99
Ph	Et	74	>99
2-furano	Me	88	>99

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**.

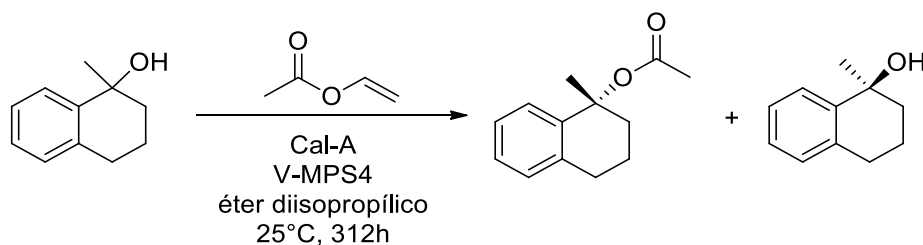
Esquema 10. Competição entre o processo de racemização de racemização de (*S*)-**1** e reações laterais de eliminação e rearranjo Meyer-Schuster



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%.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho consiste no desenvolvimento de uma metodologia de resolução cinética dinâmica quimioenzimática para a síntese enantiosseletiva de álcoois terciários propargílicos.

2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos são:

- a)** Realizar um estudo da engenharia do meio reacional para a resolução cinética enzimática de um álcool terciário propargílico, avaliando a influência dos diferentes fatores envolvidos no processo, como temperatura, solvente, identidade e concentração do doador de acila, e identidade e carga de enzima;
- b)** Estudar a resolução cinética dinâmica quimioenzimática de álcoois terciários propargílicos através da combinação de uma lipase e do sulfato de vanadila hidratado nas condições ótimas da resolução cinética;
- c)** Avaliar o escopo de substratos para a metodologia desenvolvida, observando a influência de cada substituinte do álcool terciário no processo.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes e enzimas

Os reagentes, incluindo os álcoois terciários (2-fenil-3-butin-2-ol e 2-fenil-2-butanol), cetonas (2,2,2-trifluoracetofenona e 4'-acetilpiridina), doadores de acila (butirato de vinila, decanoato de vinila, acetato de isopropenila, metoxiacetato de etila e trifluoracetato de etila), cloretos de acila (cloreto de acetila, cloreto de butirila e cloreto de decanoila) e reagente de Grignard (brometo de etinilmagnésio) foram adquiridos junto à empresa Sigma-Aldrich® (Merck®). O acetato de vinila foi adquirido junto à empresa AlfaAesar®.

Todas as enzimas, incluindo a lipase A de *Candida antarctica* imobilizada em imobead 150, recombinante de *Aspergillus oryzae* (CAL-A), lipase de *Candida rugosa* (CRL), lipase de *Candida rugosa* imobilizada em imobead 150 (CRLim), lipase de pâncreas suíno (PPL), Amano lipase A de *Aspergillus niger* (ANL), Amano lipase de *Pseudomonas fluorescens* (PFL), lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em imobead 150 (TLL), lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em imobead 150 (ROL), lipase de *Rhizopus niveus* (RNL), lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em imobead 150 (RML), Amano lipase M de *Mucor javanicus* (MJL), lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em resina acrílica (CAL-B) e Amano lipase de *Burkholderia cepacia* (BCL) foram também adquiridas junto à empresa Sigma-Aldrich® (Merck®).

3.2. Equipamentos utilizados

3.2.1. Cromatografia gasosa acoplada a detector por ionização em chama (CG-DIC)

As análises por Cromatografia Gasosa Acoplada a Detector por Ionização em Chama (CG-DIC) foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo gasoso da marca Shimadzu – Modelo GC-2010 Plus equipado com injetor automático AOC-20i – acoplado a um detector de ionização de chama, pertencente ao Milagre Lab (Instituto de Química – UNESP Araraquara).

Para as análises de rotina utilizou-se coluna capilar HP-5MS UI (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, 5%-difenil, 95%-dimetilpolisiloxano; marca Agilent). O cromatógrafo operou com fluxo constante de gás H₂ de 1,22 mL min⁻¹, com temperaturas no injetor

e detector de 260°C e 280°C, respectivamente. O volume de injeção das amostras foi de 1,0 µL na concentração de 0,5–1,0 mg mL⁻¹, em modo *split* (100:1). A programação de temperatura utilizada foi de 3 minutos a 80°C, seguida de rampa de aquecimento 80-280°C a 30°C min⁻¹ e mantido em 280°C por 5 minutos (Método A).

As determinações dos excessos enantioméricos (ee) foram realizadas via CG-DIC utilizando a coluna de fase estacionária quiral Hydrodex® β-3P (25 m x 0,25 mm x 0,25 µm, heptakis-(2,6-di-O-metil-3-O-pentil)-β-ciclodextrina) da marca Macherey-Nagel. O cromatógrafo operou com fluxo constante de gás H₂ de 0,69 mL min⁻¹, com temperaturas no injetor e detector de 160°C e 180°C, respectivamente. O volume das injeções foi de 1 µL na concentração de 0,5–1,0 mg mL⁻¹. A programação de temperatura utilizada foi de 60 minutos a 110°C, seguida de rampa de aquecimento 110-180°C a 30°C min⁻¹ e mantido em 180°C por 10 minutos (Método B).

O cálculo das conversões foi baseado nas áreas obtidas para cada composto no cromatograma, da seguinte forma:

$$conv.(%) = [A_{\text{produto}} / (A_{\text{substrato}} + A_{\text{produto}})] \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

Da mesma maneira, o cálculo dos excessos enantioméricos (ee) baseou-se nas áreas obtidas:

$$ee(%) = [(A_{\text{maior}} - A_{\text{menor}}) / (A_{\text{maior}} + A_{\text{menor}})] \times 100 \text{ (Equação 2)}$$

3.2.2. Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM)

As análises em Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM) foram realizadas junto ao Laboratório Multiusuário I de Análises Químicas do Instituto de Química – UNESP Araraquara, em cromatógrafo gasoso da marca Agilent – modelo 7890B, com coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, 5% fenil-metilsiloxano) – acoplado a um espectrômetro de massas Modelo 5977A, com fonte de ionização por elétrons com energia de ionização de 70 eV e operando na faixa de *m/z* 40-500, ou junto ao laboratório Nubbe 2 do Instituto de Química – UNESP Araraquara, em cromatógrafo da marca Shimadzu - Modelo GCMS-QP2020 equipado com injetor automático AOC-20i e fonte de ionização por elétrons com energia de ionização de 70 eV, operando na faixa de *m/z* 40-500 com uma coluna RTX-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; , 5%-difenil, 95%-

dimetilpolisiloxano; Restek). Em ambos os casos, os cromatógrafos operaram com fluxo constante de gás He de 1 mL min^{-1} , temperatura do injetor e da interface a 260°C e 280°C , respectivamente. As injeções das amostras foram de $1 \text{ }\mu\text{L}$ na concentração de $0,5\text{--}1 \text{ mg mL}^{-1}$. A programação de temperatura utilizada foi de 3 minutos a 80°C , seguida de rampa de aquecimento $80\text{--}280^\circ\text{C}$ a $30^\circ\text{C min}^{-1}$ e mantido em 280°C por 5 minutos.

3.2.3. Espectroscopia no infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos no Laboratório Multiusuário I de Análises Químicas do Instituto de Química – UNESP Araraquara, em um espectrômetro da marca Bruker modelo Vertex 70 com transformada de Fourier, absorvendo na região 4000 a 400 cm^{-1} por meio de reflexão total atenuada em cristal diamante (ATR).

3.2.4. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de Hidrogênio e de Carbono (RMN de ^1H e ^{13}C)

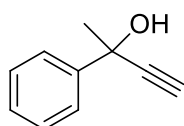
Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram registrados na Plataforma Instrumental de RMN do Instituto de Química UNESP Araraquara, em espectrômetro Bruker Advance III HD 600 (B_0 14,1 T) operando na frequência de 600,13 MHz para o núcleo de hidrogênio e 150,90 MHz para o núcleo de carbono ou Bruker Fourier 300 (B_0 7,1 T) operando na frequência de 300,19 MHz para o núcleo de hidrogênio e 75,48 MHz para o núcleo de carbono. Os sinais de deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm utilizando como padrão interno tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$) e padrão externo CDCl_3 ($\delta_{\text{H}} = 7,24 \text{ ppm}$; $\delta_{\text{C}} = 77,23 \text{ ppm}$). Os sinais foram caracterizados como: simpleto (s), duplete (d), tripleto (t), quarteto (q) e multiplete (m). As interpretações dos espectros de RMN de ^{13}C foram realizadas com auxílio da técnica DEPTQ (*Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer with Retention of Quaternaries*, em inglês), sendo CH_3/CH = sinal positivo (+), CH_2/C_0 (carbono quaternário) = sinal negativo (-).

3.3. Álcoois terciários racêmicos

3.3.1. Álcoois terciários comerciais

- **2-fenil-3-butin-2-ol ((rac)-1)**

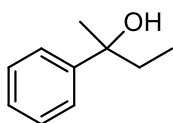
Este álcool terciário é comercial e foi adquirido junto à empresa Sigma-Aldrich® (Merck®).



F.M. C₁₀H₁₀O; **MM** 146,19 g mol⁻¹; cristais brancos; **CG-DIC**: t_R= 5,49 min (HP-5MS UI).

- **2-fenil-2-butanol ((rac)-4)**

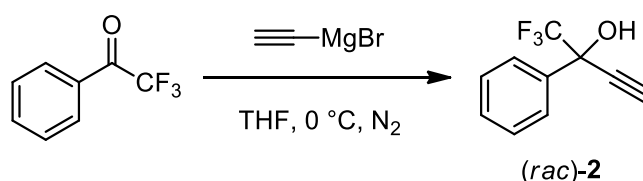
Este álcool terciário é comercial e foi adquirido junto à empresa Sigma-Aldrich® (Merck®).



F.M. C₁₀H₁₄O; **MM** 150,22 g mol⁻¹; líquido incolor; **CG-DIC**: t_R= 5,63 min (HP-5MS UI).

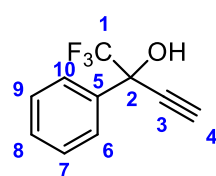
3.3.2. Síntese de álcoois terciários propargílicos

- **1,1,1-trifluor-2-fenil-3-butin-2-ol ((rac)-2)**



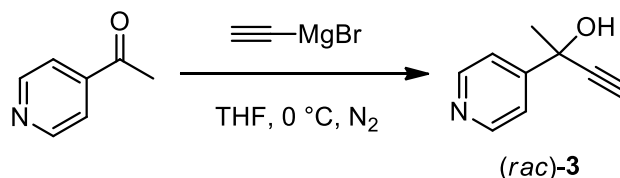
A um balão de fundo redondo de 250 mL em banho de gelo, agitação magnética e atmosfera de nitrogênio, adicionaram-se 30,0 mL (3 eq., 15,0 mmol) de uma solução 0,5 M de brometo de etinilmagnésio em THF. Num balão separado, preparou-se uma solução de 870 mg (5,0 mmol) de 2,2,2-trifluoroacetofenona em 3,0 mL de THF anidro comercial, que foi posteriormente adicionada gota a gota à solução do reagente de Grignard sob agitação. A reação foi deixada por quatro horas em banho de gelo e

então finalizada com 35,0 mL de uma solução saturada de NH_4Cl . A mistura foi extraída 3 vezes com 35,0 mL de acetato de etila, e as fases orgânicas foram combinadas e lavadas com 35,0 mL de salmoura. A fase orgânica foi então seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e rotoevaporada, obtendo 953,7 mg de um óleo castanho.

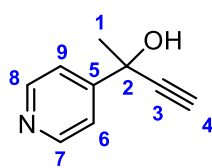


1,1,1-trifluor-2-phenyl-3-butyn-2-ol (2). **F.M.** $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{F}_3\text{O}$; **MM** 200,15 g mol^{-1} ; óleo castanho; **Rendimento:** 95%; **CG-DIC:** $t_R = 5,22$ min (HP-5MS UI); **EM** (IE, 70 eV) m/z (abundância relativa %): 200 (2), 131(100), 103 (10), 77 (17), 53 (89); **IV** (ν_{max}) (cm^{-1}): 3436, 3307, 1453, 1158, 1011, 739, 697, 669; **RMN de ^1H** (600,13 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2,83 (s, 1H, H_4), 3,25 (s, 1H, OH), 7,41-7,44 (m, 3H, H_{7-9}), 7,74-7,76 (m, 2H, H_6 e H_{10}); **RMN de ^{13}C** (150,90 MHz, DETPQ, CDCl_3) δ (ppm): 72,65 (C_0 , C_3), 76,65 (C_0 , C_2), 79,51 (CH, C_4), 122,16 (CH, C_7 e C_9), 124,06 (CH, C_8), 125,95 (CH, C_6 e C_{10}), 128,27 (t, $^2J_{\text{C-F}} = 211$ Hz, C_0 , C_1), 134,57 (C_0 , C_5).

- **2-(piridin-4-il)-3-butin-2-ol ((rac)-3)**



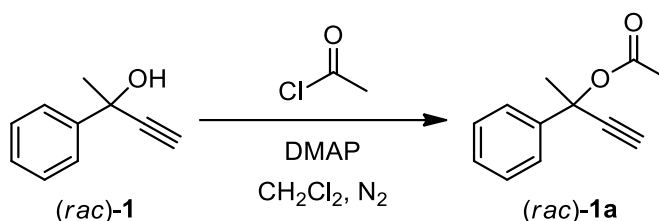
A um balão de fundo redondo de 50 mL em banho de gelo, agitação magnética e atmosfera de nitrogênio, adicionaram-se 10,0 mL (3 eq., 4,95 mmol) de uma solução 0,5 M de brometo de etinilmagnésio em THF. Em outro balão, preparou-se uma solução de 200 mg (1,65 mmol) de 4'-acetilpiridina em 3,0 mL de THF anidro comercial, que foi posteriormente adicionada gota a gota à solução do reagente de Grignard sob agitação. A reação foi deixada por quatro horas em banho de gelo e então finalizada com 10,0 mL de uma solução saturada de NH_4Cl . A mistura foi extraída 3 vezes com 10,0 mL de acetato de etila, e as fases orgânicas foram combinadas e lavadas com 10,0 mL de salmoura. A fase orgânica foi então seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e rotoevaporada, obtendo 217,5 mg do produto puro na forma de um sólido de coloração bege.



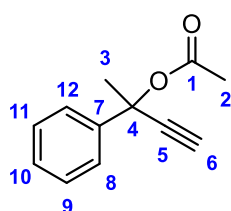
2-(piridin-4-il)-3-butin-2-ol (**3**). **F.M.** C₉H₉NO; **MM** 147,17 g mol⁻¹; sólido bege; **Rendimento:** 87%; **CG-DIC:** t_R = 6,06 min (HP-5MS UI); **EM** (IE, 70 eV) *m/z* (abundância relativa %): 147 (10), 132 (100), 104 (10), 80 (15), 78 (11), 69 (10), 53 (26), 43 (13); **IV** (ν_{max}) (cm⁻¹): 3230, 3085, 2824, 2681, 1604, 820, 708, 615, 586; **RMN de ¹H** (600,13 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,76 (s, 3H, H₁), 2,69 (s, 1H, H₄), 3,53 (s, 1H, OH), 7,55-7,56 (m, 2H, H₇ e H₈), 7,56-7,57 (m, 2H, H₆ e H₉); **RMN de ¹³C** (150,90 MHz, DETPQ, CDCl₃) δ (ppm): 32,97 (CH₃, C₁), 68,75 (C_O, C₂), 73,62 (CH, C₄), 86,08 (C_O, C₃), 119,98 (CH, C₆ e C₉), 149,69 (CH, C₇ e C₈), 154,20 (C_O, C₅).

3.4. Síntese dos ésteres racêmicos

3.4.1. Síntese do acetato de 2-fenil-3-butin-2-ila ((*rac*)-**1a**)



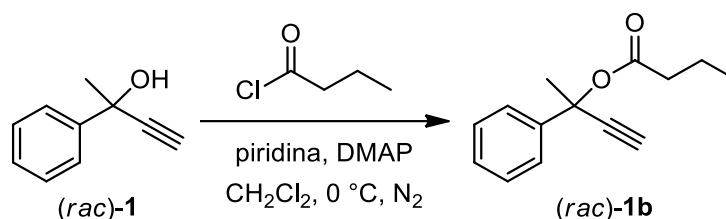
À 100,0 mg (0,684 mmol) de (*rac*)-**1** e 500,0 mg (4,092 mmol) de DMAP em 10,0 mL de CH₂Cl₂ anidro, adicionaram-se 200 µL (2,74 mmol) de cloreto de acetila. A solução formada foi deixada sob agitação magnética por 24 horas, e posteriormente interrompida com a adição de 2,0 mL de água destilada. Em seguida, 20,0 mL de acetato de etila foram adicionados e a mistura foi lavada com uma solução de HCl 1 mol L⁻¹ (3 x 15,0 mL) e água destilada (3 x 15,0 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e evaporada a pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna *flash* utilizando sílica como fase estacionária e fase móvel composta por uma mistura de heptano/acetato de etila na proporção 9:1, obtendo 59,2 mg do éster na forma de um óleo incolor.



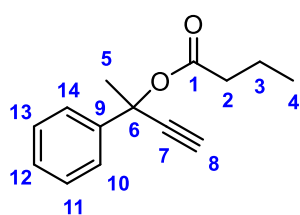
acetato de 2-fenil-3-butin-2-ila (**1a**). **F.M.** C₁₂H₁₂O₂; **MM** 188,08 g mol⁻¹; óleo incolor; **Rendimento:** 46%; **CG-DIC:** t_R = 6,52 min (HP-5MS UI), t_{R-(R)} = 40,59 min (Hydrodex® β-3P), t_{R-(S)} = 43,08 min (Hydrodex® β-3P); **EM** (IE, 70 eV) *m/z* (abundância relativa %): 188 (1), 145 (100), 129 (49), 128 (56), 77 (21), 43 (45); **IV** (ν_{max}) (cm⁻¹):

3281, 1746, 1367, 1228, 1060, 763, 697; **RMN de ^1H** (600,13 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,89 (s, 3H, H_3), 2,08 (s, 3H, H_2), 2,80 (s, 1H, H_6), 7,28-7,30 (m, 1H, H_{10}), 7,34-7,37 (m, 2H, H_9 e H_{11}), 7,57-7,58 (m, 2H, H_8 e H_{12}); **RMN de ^{13}C** (150,90 MHz, DETPQ, CDCl_3) δ (ppm): 21,69 (CH_3 , C_3), 32,00 (CH_3 , C_2), 75,31 (C_0 , C_4), 75,49 (CH , C_6), 82,95 (C_0 , C_5), 124,74 (CH , C_9 e C_{11}), 127,89 (CH , C_{10}), 128,35 (CH , C_8 e C_{12}), 142,10 (C_0 , C_7), 168,60 (C_0 , C_1).

3.4.2. Síntese do butirato de 2-fenil-3-butin-2-ila ((*rac*)-1b)



0,452 mg (4,24 mmol) de cloreto de butirila, 200 μL (0,99 mmol) de piridina e 20,8 mg (0,17 mmol) de DMAP foram dissolvidos em 4,0 mL de CH_2Cl_2 anidro sob atmosfera inerte e mantidos sob agitação a 0°C por 15 minutos. Então, 100,0 mg (0,68 mmol) de (*rac*)-**1** dissolvido em 4,0 mL de CH_2Cl_2 anidro foram adicionados e a reação foi mantida por 24 horas a temperatura ambiente. A mistura reacional foi lavada com água destilada (2 X 12,0 mL), seca com MgSO_4 e rotoevaporada. O produto de foi purificado por cromatografia em coluna *flash* utilizando alumina neutra como fase estacionária e fase móvel composta por uma mistura de heptano/acetato de etila na proporção 9:1, obtendo 16,2 mg do éster na forma de um óleo amarelo.

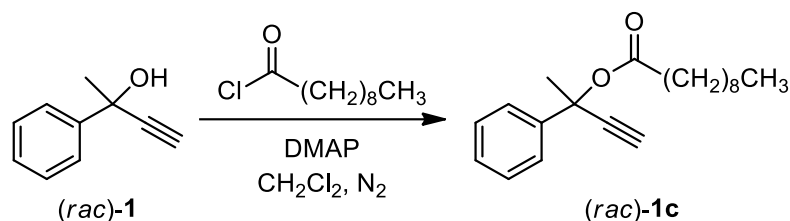


butirato de 2-fenil-3-butin-2-ila (1b). **F.M.** $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_2$; **MM** 216,11 g mol^{-1} ; **Rendimento:** 11%; **CG-DIC:** $t_R = 7,36$ min (HP-5MS UI), $t_{R-(R)} = 63,78$ min (Hydrodex® β -3P), $t_{R-(S)} = 64,04$ min (Hydrodex® β -3P); **EM** (IE, 70 eV) m/z (abundância relativa %): 216 (3), 173 (3), 145 (50), 129 (69), 128 (100), 77 (15), 71 (35)

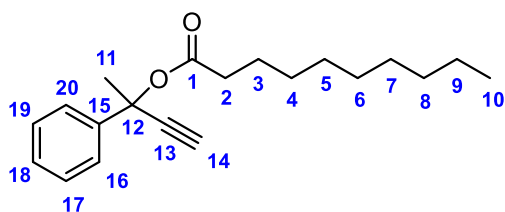
43 (28); **IV** (ν_{max}) (cm^{-1}): 3286, 2963, 1742, 1235, 1153, 1058, 761, 698; **RMN de ^1H** (600,13 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0,93-0,95 (t, 3H, H_4), 1,62-1,68 (m, 2H, H_3), 1,90 (s, 3H, H_5), 2,29-2,35 (m, 2H, H_2), 2,80 (s, 1H, H_8), 7,28-7,31 (m, 1H, H_{12}), 7,34-7,37 (m, 2H, H_{11} e H_{13}), 7,57-7,59 (m, 2H H_{10} e H_{14}); **RMN de ^{13}C** (150,90 MHz, DETPQ, CDCl_3) δ (ppm): 13,61 (CH_3 , C_4), 18,32 (CH_2 , C_3), 32,06 (CH_3 , C_5), 36,71 (CH_2 , C_2), 75,10 (C_0 ,

C₆), 75,47 (C₀, C₇), 83,08 (CH, C₈), 124,78 (CH, C₁₁ e C₁₃), 127,88 (CH, C₁₂), 128,36 (CH, C₁₀ e C₁₄), 142,29 (C₀, C₉), 171,29 (C₀, C₁).

3.4.3. Síntese do decanoato de 2-fenil-3-butin-2-ila ((*rac*)-1c)



À 100,0 mg (0,684 mmol) de (*rac*)-**1** e 500,0 mg (4,09 mmol) de DMAP em 10,0 mL de CH₂Cl₂ anidro, adicionaram-se 570 µL (2,74 mmol) de cloreto de decanoila. A solução formada foi mantida sob agitação magnética por 24 horas, e posteriormente interrompida com a adição de 2,0 mL de água destilada. Em seguida, 20,0 mL de acetato de etila foram adicionados e a mistura foi lavada com uma solução de HCl 1 mol L⁻¹ (3 x 15,0 mL) e água destilada (3 x 15,0 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e evaporada a pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna *flash* utilizando alumina neutra como fase estacionária e fase móvel composta por uma mistura de heptano/acetato de etila na proporção 9:1, obtendo 73,5 mg do éster na forma de um óleo amarelo claro.



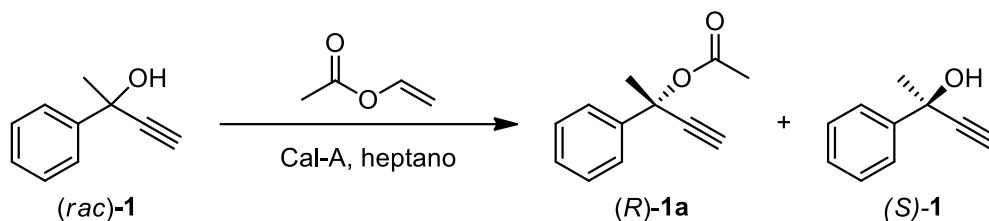
decanoato de 2-fenil-3-butin-2-ila (**1c**). F.M.

$C_{20}H_{28}O_2$; **MM** 300,21 g mol⁻¹; óleo amarelo claro; **Rendimento**: 36%; **CG-DIC**: t_R = 9,59 min (HP-5MS UI); **EM** (IE, 70 eV) m/z (abundância relativa %): 300 (4), 173 (3), 155 (14), 14/5 (55).

129 (100), 128 (52), 85 (13), 71 (20), 57(17), 43 (20); **IR** ν_{max} (cm⁻¹): 3264, 2924, 2854, 1748, 1236, 1148, 1058, 762, 697; **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0,85-0,90 (t, 3H, H₁₀), 1,25-1,37 (m, 14H, H₃₋₉), 1,89 (s, 3H, H₁₁), 2,30-2,35 (m, 2H, H₂), 2,80 (s, 1H, H₁₄), 7,28 -7,38 (m, 3H, H₁₇₋₁₉), 7,56-7,59 (m, 2H, H₁₆ e H₂₀); **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, DETPQ, CDCl₃) δ (ppm): 14,12 (CH₃, C₁₀), 22,67 (CH₂, C₉), 24,77 (CH₃, C₈), 29,04 (CH₂, C₇), 29,25 (CH₂, C₅ e C₆), 29,42 (CH₂, C₄), 31,86 (CH₂, C₃), 32,05 (CH₃, C₁₁), 34,81 (CH₂, C₂), 75,08 (C₀, C₁₂), 75,46 (C₀, C₁₃), 83,06 (CH, C₁₄), 124,77 (CH, C₁₇ e C₁₉), 127,87(CH, C₁₈), 128,35 (CH, C₁₆ e C₂₀), 142,26 (C₀, C₁₅), 171,48 (C₀, C₁).

3.5. Resolução cinética

3.5.1. Triagem inicial com CAL-A

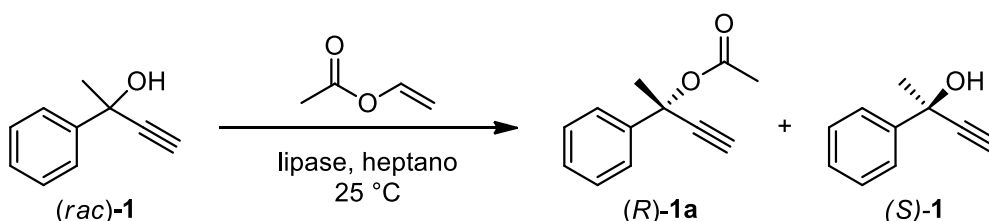


À uma solução de acetato de vinila em heptano (ou acetato de vinila puro), com volume total de 1,5 mL, adicionaram-se 13,7 mg de *(rac)*-**1** e CAL-A. Os tubos eppendorfs foram fechados e levados ao Thermomixer, que manteve uma agitação orbital de 1200 rpm e a temperatura programada por 48 horas. A reação foi monitorada via CG-DIC. As condições reacionais de cada uma das dez entradas encontram-se discriminadas na Tabela 6.

Tabela 6. Condições reacionais da triagem inicial com CAL-A e acetato de vinila na resolução cinética de *(rac)*-**1**

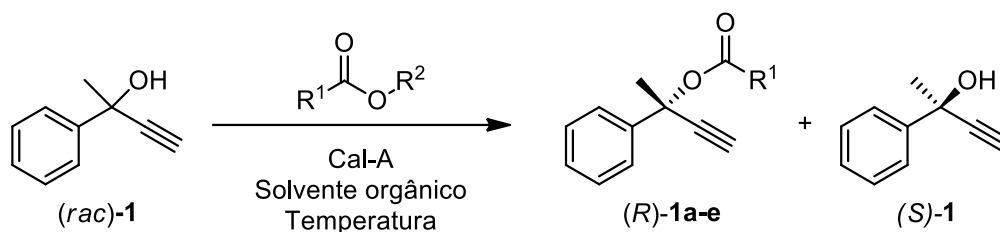
Entrada	CAL-A (mg)	Acetato de vinila (μL)	Temperatura (°C)
1	7,5	17	40
2	75	17	40
3	7,5	690	40
4	75	690	40
5	7,5	1500	40
6	7,5	17	25
7	75	17	25
8	7,5	690	25
9	75	690	25
10	7,5	1500	25

3.5.2. Triagem de lipases



À uma solução de 16,1 mg de acetato de vinila em 1,5 mL de heptano, adicionaram-se 13,7 mg de (*rac*)-**1** e 75 mg de lipase. Os tubos eppendorfs foram fechados e levados ao Thermomixer, que manteve uma agitação orbital de 1000 rpm e uma temperatura de 25°C por 48 horas. A reação foi monitorada via CG-DIC.

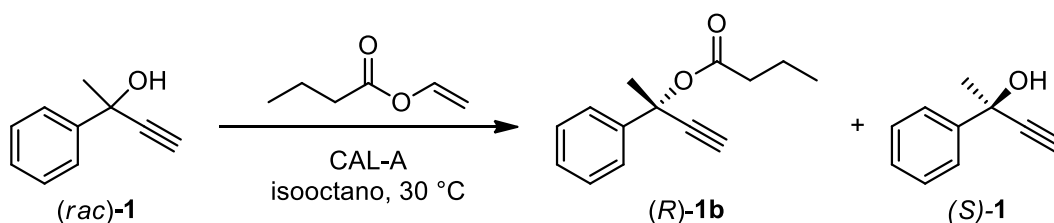
3.5.3. Estudo da engenharia do meio reacional



Condição inicial: Adicionou-se 1,5 mmol de butirato de vinila a uma solução de 73 mg (0,50 mmol) de (*rac*)-**1** em 6,0 mL de isooctano. Em seguida, foram adicionados 156 mg de CAL-A e a mistura foi mantida sob agitação magnética a 30°C (LÖFGREN *et al.*; 2019). Após 48 horas, a reação foi interrompida, o meio reacional filtrado para a remoção das enzimas, que foram “lavadas” com acetato de etila. O solvente foi evaporado a pressão reduzida e o acompanhamento da reação se deu através de CG-DIC.

Foram avaliadas também variações na temperatura (40°C e 60°C), outros solventes (heptano, octano, tolueno, acetonitrila e MTBE), doadores de acila (acetato de vinila, decanoato de vinila, metoxiacetato de etila, trifluoracetato de etila e acetato de isopropenila), além de outras condições reacionais, variando as quantidades de doador de acila e CAL-A utilizadas nas etapas anteriores.

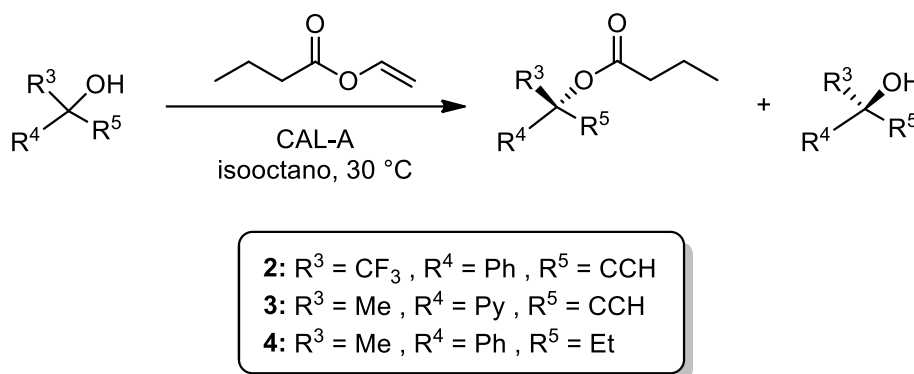
3.5.4. Adição lenta de substrato



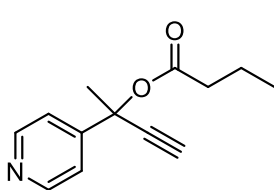
Preparou-se uma solução de 73,0 mg de (*rac*)-**1** em 400 µL de butirato de vinila e 2,0 mL de isooctano. O conteúdo desta solução foi transferido para uma seringa, e, posteriormente, adicionado a um fluxo constante de 0,4 mL h⁻¹ a um balão de 25,0 mL

contendo 312 mg de CAL-A sob agitação em 4,0 mL de isooctano a 30 °C. Após uma hora da completa adição do substrato, uma alíquota foi injetada em CG-DIC para o monitoramento da reação. Depois de 24 horas, a reação foi interrompida, o meio reacional filtrado para a remoção das enzimas, que foram “lavadas” com acetato de etila. O solvente foi evaporado a pressão reduzida e uma segunda alíquota foi injetada.

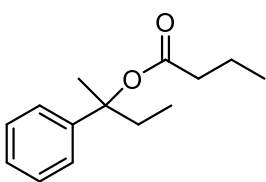
3.6. Avaliação do escopo de substratos no protocolo de resolução cinética



Adicionou-se 3,0 mmol de butirato de vinila a uma solução de 0,50 mmol do substrato em 6,0 mL de isooctano (para o substrato (*rac*)-**3**, excepcionalmente, foi utilizado acetato de etila como solvente). Em seguida, foram adicionados 312 mg de CAL-A e a mistura foi mantida sob agitação magnética a 30°C. Após 48 horas, a reação foi interrompida, o meio reacional filtrado para a remoção das enzimas, que foram “lavadas” com acetato de etila. O solvente foi evaporado a pressão reduzida e o acompanhamento da reação se deu através de CG-DIC. Os produtos, quando formados, foram identificados por espectrometria de massas.

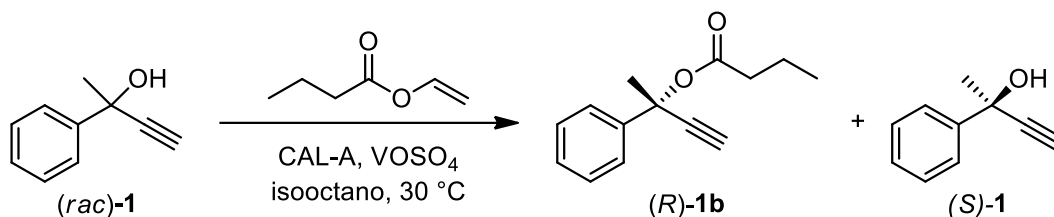


butirato de 2-(piridina-4-il)-3-butin-2-ila (3b). **F.M.** $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_2$; **MM** 217,26 g mol⁻¹; **CG-DIC**: $t_R = 7,69$ min (HP-5MS UI); **EM** (IE, 70 eV) m/z (abundância relativa %): 174 (2), 147 (100), 130 (73), 103 (13), 77 (45), 71 (84), 43 (91).



butirato de 2-fenil-2-butila (4b). **F.M.** $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_2$; **MM** 220,30 g mol⁻¹; **CG-DIC**: $t_R = 7,44$ min (HP-5MS UI); **EM** (IE, 70 eV) m/z (abundância relativa %): 220 (2), 191 (13), 150 (12), 133 (30), 121 (52), 91 (71), 77 (17), 71 (100), 43 (65).

3.7. Protocolo de resolução cinética dinâmica quimioenzimática



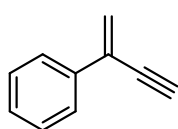
- **Sem compartimentalização**

Adicionou-se 3,0 mmol de butirato de vinila a uma solução de 73 mg (0,50 mmol) de *(rac)*-1 em 6,0 mL de isooctano. Em seguida, foram adicionados 312 mg de CAL-A e 100 mg de sulfato de vanadila hidratado ao balão, mantendo a mistura sob agitação magnética a 30°C. A reação foi monitorada via CG-DIC, recolhendo alíquotas após 1, 2, 24, 48 e 72 horas de reação.

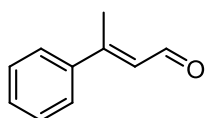
- **Com compartimentalização**

Adicionou-se 3,0 mmol de butirato de vinila a uma solução de 73 mg (0,50 mmol) de *(rac)*-1 em 6,0 mL de isooctano. Em seguida, foram adicionados 312 mg de CAL-A ao balão e 100 mg de sulfato de vanadila hidratado a um tubo de teflon com furos na extremidade inferior, o qual foi mergulhado no sistema reacional formado anteriormente. A reação foi mantida sob agitação magnética a 30°C, e monitorada via CG-DIC, recolhendo alíquotas após 2, 5, 24, 48 e 72 horas de reação.

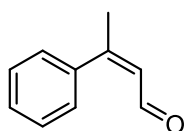
Os subprodutos formados na resolução cinética dinâmica de *(rac)*-1 foram identificados por espectrometria de massas.



2-fenil-1-buten-3-ino (**5**). **F.M.** C₁₀H₈; **MM** 128,16 g mol⁻¹; **CG-DIC**: t_R = 4,98 min (HP-5MS UI); **EM** (IE, 70 eV) *m/z* (abundância relativa %): 128 (100), 102 (36), 51 (17).



(E)-3-fenil-2-butenal (**6**). **F.M.** C₁₀H₁₀O; **MM** 146,18 g mol⁻¹; **CG-DIC**: t_R = 6,46 min (HP-5MS UI); **EM** (IE, 70 eV) *m/z* (abundância relativa %): 146 (29), 145 (100), 131 (19), 117 (30), 115 (48), 103 (20), 91 (24), 77 (15), 44 (32).



(*Z*)-3-*fenil*-2-*butenal* (**7**). **F.M.** C₁₀H₁₀O; **MM** 146,18 g mol⁻¹; **CG-DIC**: t_R = 6,85 min (HP-5MS UI); **EM** (IE, 70 eV) *m/z* (abundância relativa %): 146 (29), 145 (97), 131 (20), 117 (28), 115 (51), 103 (22), 91 (27), 77 (16), 44 (100).

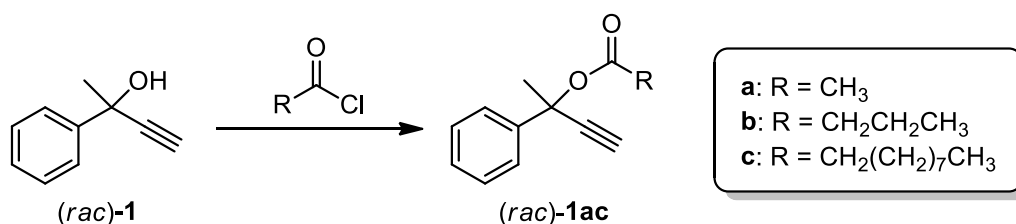
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Resolução Cinética

4.1.1. Síntese dos ésteres racêmicos

As sínteses dos padrões racêmicos dos ésteres foram realizadas utilizando os respectivos cloretos de acila (Esquema 12). O acetato de 2-fenil-3-butin-2-ila ((*rac*)-**1a**) e o decanoato de 2-fenil-3-butin-2-ila ((*rac*)-**1c**), foram sintetizados de acordo com a metodologia descrita por Kourist e colaboradores (KOURIST; BARTSCH; BORNSCHEUER, 2007). O butirato de 2-fenil-3-butin-2-ila ((*rac*)-**1b**), no entanto, foi obtido através de um protocolo alternativo (MILAGRE, 2005), uma vez que a formação de subprodutos estava impossibilitando a purificação deste composto. Este protocolo difere nas proporções de cloreto de acila e DMAP, e na utilização de piridina. As reações foram realizadas em atmosfera de nitrogênio e monitoradas por CG-DIC (Método A). Após atingido o equilíbrio, as reações foram interrompidas com adição de água destilada, extraídas e purificadas por cromatografia em coluna *flash*. Em todos os casos foram utilizadas misturas de solventes verdes (acetato de etila e heptano) para os processos de purificação, que ocorreram a um fluxo constante de 5 cm min⁻¹. Exceto por (*rac*)-**1a**, em que a fase estacionária utilizada foi sílica, nos demais casos foi utilizada alumina neutra, devido à coeluição de outras substâncias junto aos ésteres. Esta alternativa já havia sido descrita na literatura (LÖFGREN *et al.*; 2019).

Esquema 12. Síntese dos ésteres racêmicos (*rac*)-**1ac** com cloretos de acila



A separação cromatográfica dos enantiômeros para a determinação dos excessos enantioméricos nas reações enzimáticas, foi realizada em coluna Hydrodex® β-3P (método B) e o cálculo dos mesmos via Equação 2 (Parte experimental). Tanto para (*rac*)-**1a**, quanto para (*rac*)-**1b**, foram obtidas boas separações. Para (*rac*)-**1c**, entretanto, não foi possível obter uma separação dos

enantiômeros em CG-DIC, em função da difícil eluição do composto, que apresenta uma cadeia de 10 átomos de carbono.

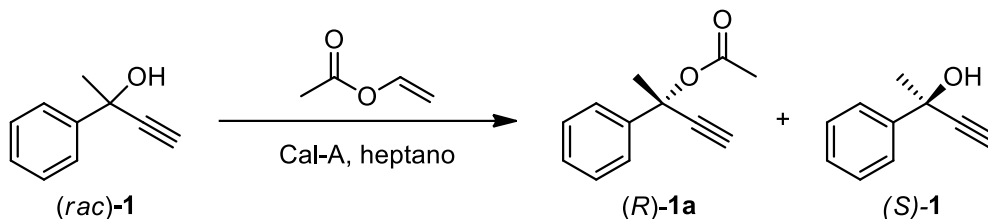
A caracterização dos ésteres ocorreu através da elucidação dos espectros de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , espectros de massas e de absorção na região do infravermelho. Em todos os casos, foram observados os sinais característicos dos compostos nos respectivos espectros, indicando que de fato eles foram sintetizados.

A rotação óptica dos enantiômeros puros, no entanto, não foi determinada devido à ausência de dados de $[\alpha]_D$ na literatura, pois de acordo com o Professor Bornscheuer, tanto os enantiômeros de **1**, quanto dos seus ésteres, apresentam rotação óptica muito próxima a zero (depois da primeira casa decimal). Nesse sentido, tomando como base os trabalhos já realizados para a resolução cinética deste substrato, sabe-se que a CAL-A é (*R*)-seletiva (KRISHNA; PERSSON; BORNSCHEUER, 2002).

4.1.2. Triagem inicial com CAL-A

Inicialmente, uma série de condições reacionais foi testada utilizando a CAL-A, devido aos trabalhos anteriores da literatura para a transesterificação de (*rac*)-**1**, que sempre empregaram esta enzima. Foram avaliados os efeitos da variação da quantidade de enzima, da quantidade de doador de acila e da temperatura. As únicas condições mantidas constantes foram a massa de (*rac*)-**1** adicionado (13,7 mg), o volume total (1,5 mL) e a agitação do Thermomixer, que manteve 1200 rpm. As conversões após 48 horas de reação, para cada um dos casos, encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7. Avaliação de condições reacionais utilizando a lipase A de *Candida antarctica* na resolução cinética de (*rac*)-**1**



Entrada	CAL-A (mg)	Acetato de vinila (μL)	Temperatura (°C)	Conversão (%)
1	7,5	17	40	4
2	75	17	40	8
3	7,5	690	40	3
4	75	690	40	5
5	7,5	1500	40	2
6	7,5	17	25	2
7	75	17	25	6
8	7,5	690	25	2
9	75	690	25	3
10	7,5	1500	25	2

Condições reacionais: 13,7 mg de (*rac*)-**1**, 1200 rpm, 48 h. Valores de conversão determinados por CG-DIC em coluna HP-5MS (Método A).

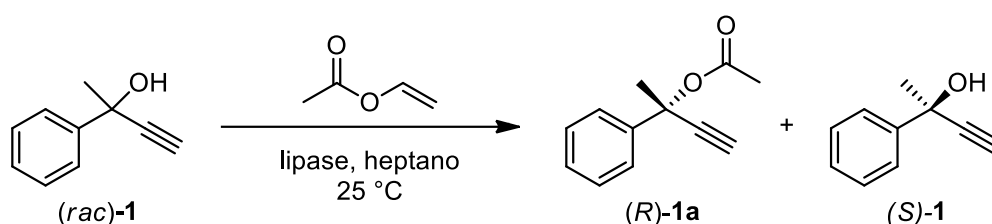
Apesar dos resultados na Tabela 7 apresentarem conversões baixas para a reação, é possível observar algumas tendências. A adição de um carga de enzima 10 vezes maior, por exemplo, foi responsável por um aumento na conversão, ao passo que uma maior concentração do doador de acila (acetato de vinila), seja aumentando em 40 vezes ou utilizando o mesmo como solvente (ausência de heptano), refletiram numa diminuição da conversão ao produto. A temperatura também tem influência sobre a reação, uma vez que foi observada uma maior formação do éster (**1a**) a 40°C, comparando as mesmas condições a 25°C. Com base nessas observações, a entrada 2 foi aquela que apresentou os melhores resultados.

4.1.3. Triagem de lipases

Uma vez finalizados os primeiros experimentos de resolução cinética utilizando a CAL-A, optamos por avaliar outras lipases disponíveis no nosso grupo de pesquisa

que pudessem substituir a CAL-A. Utilizando os dados da Tabela 7 como base, as condições reacionais da entrada 7 foram selecionadas para a triagem de lipases, uma vez que nas reações a 40°C foi observada uma maior evaporação do solvente, variando a concentração dos componentes da resolução cinética. A agitação do Thermomixer para esse segundo estudo foi reduzida para 1000 rpm. A Tabela 8 fornece as conversões obtidas após 48 horas de reação.

Tabela 8. Triagem de lipases para a resolução cinética de (*rac*)-**1** utilizando as condições da entrada 7 da tabela 7



Lipase	Conversão (%)
<i>Candida antarctica</i> A (imobilizada em imobead 150)	8
<i>Candida rugosa</i>	1
<i>Candida rugosa</i> (imobilizada em imobead 150)	0
pâncreas suíno	0
<i>Aspergillus niger</i> A	0
<i>Candida antarctica</i> B (imobilizada em resina acrílica)	0
<i>Burkholderia cepacia</i>	0
<i>Rhizopus oryzae</i> (imobilizada em imobead 150)	0
<i>Rhizopus niveus</i>	0
<i>Rhizomucor miehei</i> (imobilizada em imobead 150)	0
<i>Mucor javanicus</i> M	0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (imobilizada em imobead 150)	0

Condições reacionais: 13,7 mg de (*rac*)-**1**, 17 µL de acetato de vinila, heptano (1,5 mL), 75 mg de lipase, 25°C, 1000 rpm, 48 h. Valores de conversão determinados por CG-DIC em coluna HP-5MS (Método A).

Como é possível observar, a CAL-A apresentou a maior conversão para a resolução cinética de (*rac*)-**1**. Outras lipases que possuem cavidade oxianion do tipo GGG(A)X e que, dessa forma, poderiam aceitar substratos mais impedidos estericamente, como a de *Candida rugosa*, a de pâncreas suíno e a de *Aspergillus niger*, não apresentaram atividade ou apresentaram baixa atividade para (*rac*)-**1**.

Assim, em concordância com os trabalhos anteriores, optamos por utilizar a CAL-A nos experimentos posteriores.

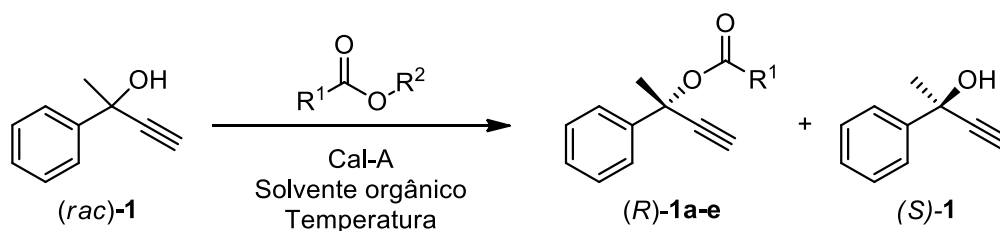
4.1.4. Engenharia do meio reacional

Devido às baixas conversões nos experimentos anteriores, optamos por dar um novo direcionamento ao trabalho, tomando o protocolo de transesterificação mais recente como base (LÖFGREN *et al.*; 2019), cujo objetivo era o desenvolvimento de enzimas mutantes. Ao invés de focar na engenharia de proteínas, decidimos realizar um estudo da engenharia do meio reacional, que além de mais viável economicamente, pode fornecer resultados tão bons quanto o anterior (CASTILLO; CASAS-GODOY; SANDOVAL, 2015).

As condições reacionais iniciais avaliadas foram idênticas àsquelas da referência, e diferem das triagens realizadas anteriormente pela utilização do isooctano como solvente, do butirato de vinila como doador de acila e quanto às proporções de cada reagente. Além disso, ao contrário do reportado no artigo (LÖFGREN *et al.*; 2019) e dos experimentos antecedentes, realizados sob agitação orbital, foi utilizada agitação magnética em balão de fundo redondo, de modo a favorecer o transporte de massa.

Ao longo deste estudo, foram avaliados de forma consecutiva os efeitos da temperatura, do solvente, da identidade e da concentração do doador de acila, e da carga de enzima. Os únicos parâmetros fixos foram a concentração do substrato ((*rac*)-**1**) e o biocatalisador utilizado – a CAL-A. O Esquema 13 sumariza as condições estudadas.

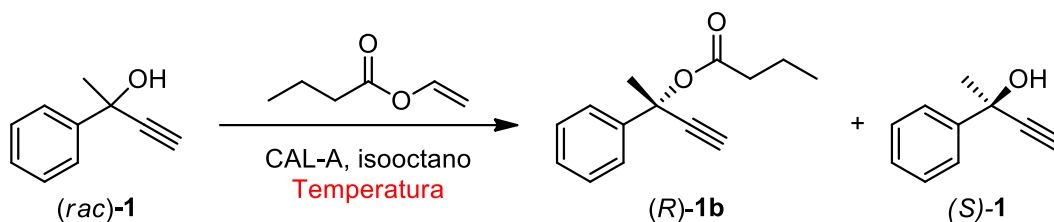
Esquema 13. Engenharia do meio reacional na resolução cinética de (*rac*)-**1**



- **Efeito da temperatura**

Primeiramente, analisamos o efeito da temperatura na resolução cinética de (*rac*)-**1**. Os resultados obtidos no experimento, bem como as conversões informadas na literatura, estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Efeito da temperatura na resolução cinética de (*rac*)-**1** em comparação com a literatura



Temperatura (°C)	Neste trabalho		Literatura*
	Conversão (%)	ee 1b (%)	Conversão (%)
30	26	94	1
40	16	91	2
60	12	88	4

Condições reacionais: 0,50 mmol de (*rac*)-**1**, 1,5 mmol de butirato de vinila, isooctano (6 mL), CAL-A (156 mg), agitação magnética vigorosa, 48 h. Valores de conversão determinados por GC-FID em coluna HP-5MS (Método A) e ee em coluna quiral Hydrodex (Método B). *(LÖFGREN *et al.*; 2019).

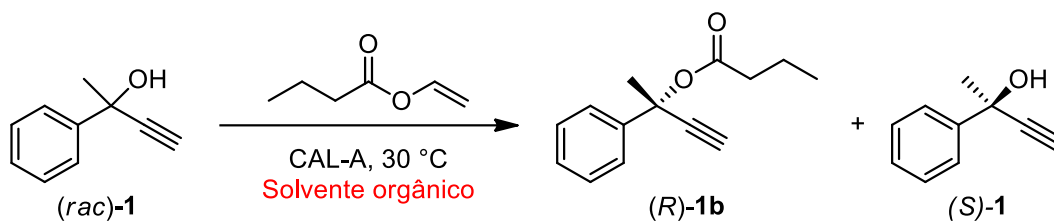
De acordo com a Tabela 9, todas as conversões foram maiores do que as obtidas nos experimentos realizados no Thermomixer, sendo que a 30 °C a conversão atingiu 26%, um valor pelo menos 3 vezes maior que os anteriores, representando um aumento significativo. Os principais fatores que podem ter sido responsáveis por tamanha diferença nos resultados consistem na substituição do acetato de vinila pelo butirato de vinila, e na implementação da agitação magnética, a qual é muito mais vigorosa se comparada à agitação orbital.

Além disso, foi observado que em temperaturas maiores houve uma diminuição na formação do produto **1b**, que pode ser decorrente da perda de atividade da enzima quando exposta a temperaturas elevadas por longos períodos. Esta mesma tendência foi observada na enantiosseletividade do processo, pois os excessos enantioméricos decresceram a medida que a temperatura do sistema foi elevada, o que pode ser consequência da mudança conformacional da enzima, permitindo a entrada e um encaixe mais efetivo do enantiômero (*S*)-**1**.

Quando comparadas às conversões da literatura (LÖFGREN *et al.*; 2019), observa-se que obtivemos resultados superiores em todas as temperaturas. Nesse sentido, partindo do princípio de que as principais diferenças entre os experimentos sejam o suporte de imobilização da enzima e o tipo de agitação, é possível inferir que ambos devem ter grande influência sobre o processo. No caso do trabalho referenciado (LÖFGREN *et al.*; 2019), a CAL-A foi imobilizada em Accurel MP1000, um polímero hidrofóbico macroporoso de polipropileno, ao passo que aquela obtida comercialmente para os experimentos deste trabalho encontra-se imobilizada em imobead 150, um copolímero hidrofóbico de metacrilato funcionalizado com grupos epóxi. Além disso, foram observadas tendências opostas com o aumento da temperatura, ou seja, um decréscimo das conversões para os experimentos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, e um aumento das mesmas na referência em que as condições reacionais foram baseadas.

- **Efeito do solvente**

Após a seleção da melhor temperatura, foi realizada a triagem do solvente mais adequado à reação. Foram selecionados outros cinco solventes como alternativa ao isooctano: heptano (testado anteriormente em condições diferentes), octano, tolueno, metil terc-butil éter (MTBE) e acetonitrila. Os resultados após 48 horas de reação podem ser conferidos na Tabela 10.

Tabela 10. Efeito do solvente na resolução cinética de *(rac)*-**1**

Solvente	Conversão (%)	ee 1b (%)
Isooctano	26	94
Heptano	19	94
Octano	16	93
Tolueno	8	94
MTBE	3	92
Acetonitrila	1	n.d.

Condições reacionais: 0,50 mmol de *(rac)*-**1**, 1,5 mmol de butirato de vinila, solvente (6 mL), CAL-A (156 mg), 30° C, agitação magnética vigorosa, 48 h. Valores de conversão determinados por GC-FID em coluna HP-5MS (Método A) e excessos enantioméricos em coluna quiral Hydrodex (MétodoB).

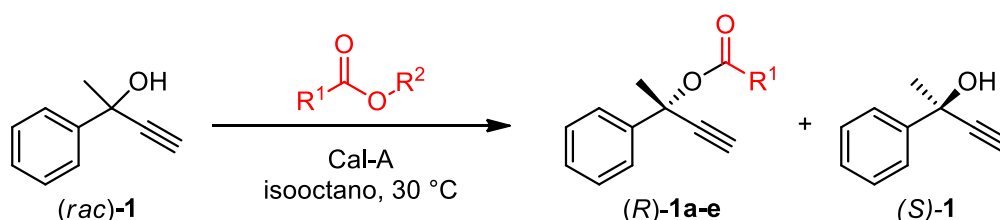
Foi observado, com base no resultados obtidos, que de fato o solvente é um fator preponderante para a resolução cinética. De maneira geral, os hidrocarbonetos alifáticos forneceram as melhores conversões, na ordem: isooctano > heptano > octano. Ainda sim, esses hidrocarbonetos alifáticos apresentaram resultados melhores que o tolueno (hidrocarboneto aromático), que por sua vez, forneceu conversões maiores que solventes de maior polaridade. O MTBE, por ser menos polar que a acetonitrila, ainda proporcionou certa formação do produto. Essa última, no entanto, foi responsável por praticamente inibir a reação de transesterificação, levando a uma conversão próxima de zero. Essas observações são similares àquelas encontradas no trabalho publicado por Bornscheuer e colaboradores (KRISHNA; PERSSON; BORNSCHEUER, 2002), que também obteve seus melhores resultados quando a reação foi realizada em isooctano, em comparação com hexano e MTBE.

Ao contrário do que foi observado com a temperatura, a alteração do solvente, não teve efeito sobre a enantiosseletividade da CAL-A, já que todos os ee se mantiveram na ordem dos 94%, variando sempre dentro do erro do equipamento. Logo, levando em consideração as conversões obtidas, resolvemos continuar utilizando isooctano nas triagens seguintes.

- **Efeito do doador de acila**

Uma vez definido o solvente, foi realizada a seleção do melhor doador de acila. As alternativas ao butirato de vinila elencadas para a triagem foram: acetato de vinila (em condições reacionais diferentes daquelas utilizadas anteriormente), acetato de isopropenila, decanoato de vinila, metoxiacetato de etila e trifluoracetato de etila. Os valores de conversão e ee, após 48 horas de reação, dispõem-se na Tabela 11.

Tabela 11. Efeito do doador de acila na resolução cinética de (*rac*)-**1**



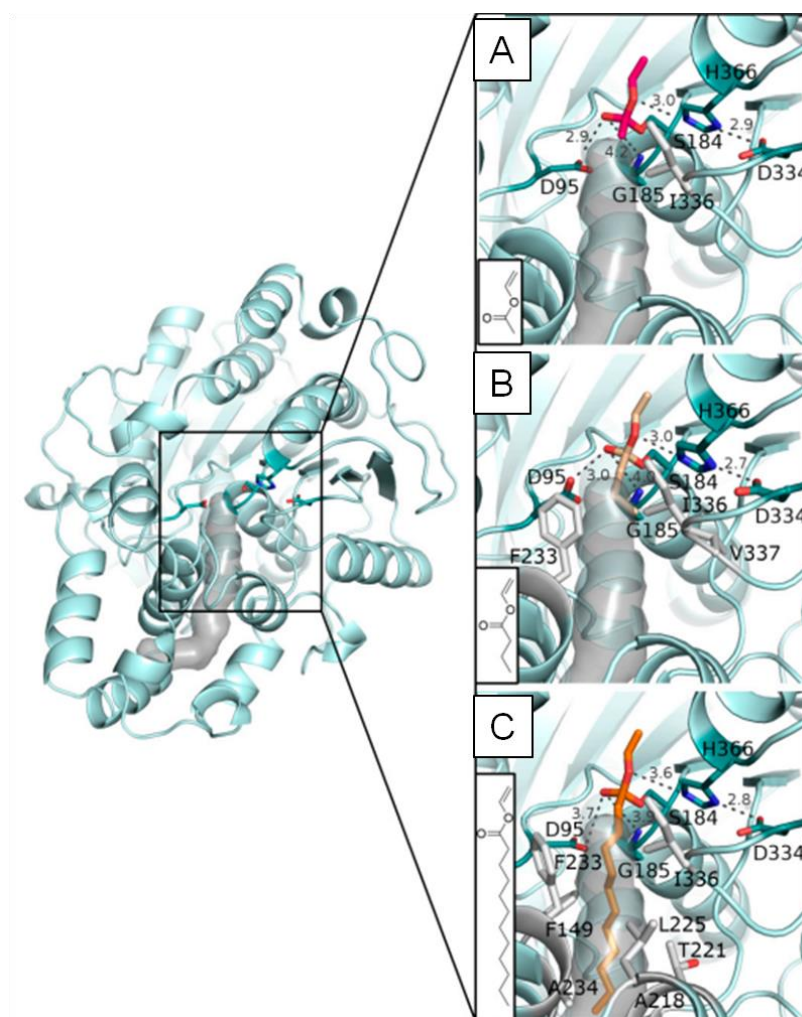
Doadores de acila	Conversão (%)	ee 1b (%)
Butirato de vinila	26	94
Acetato de vinila	4	> 99
Decanoato de vinila	18	n.d.
Acetato de isopropenila	1	n.d.
Trifluoracetato de etila	0	n.d.
Metoxiacetato de etila	0	n.d.

Condições reacionais: 0,50 mmol de (*rac*)-**1**, 1,5 mmol de doador de acila, isooctano (6 mL) CAL-A (156 mg), 30° C, agitação magnética vigorosa, 48 h. Valores de conversão determinados por GC-FID em coluna HP-5MS (Método A) e excessos enantioméricos em quiral Hydrodex (Método B).

Com base na tabela 11, fica evidente que a variação do tamanho da cadeia do doador de acila, comparando a série homóloga dos ésteres vinílicos, tem grande influência sobre a reação, uma vez que a diminuição da mesma em dois metilenos (do butirato de vinila para o acetato de vinila) provocou uma diminuição da conversão em 22%, ao passo que o aumento da cadeia, no caso do decanoato de vinila, também provoca uma diminuição, em cerca de 8%. O principal motivo que justificaria essa observação experimental é a interação do doadores de acila de cadeia longa com o bolsão hidrofóbico no qual os mesmos se acomodam. Esse bolsão é capaz de alojar cadeias com até 25 metilenos e estabelecer interações hidrofóbicas através de diversos resíduos de aminoácidos, que serão responsáveis por estabilizar os intermediários. O butirato de vinila, por exemplo, estabelece interações com os

resíduos F233, I336 e V337. A Figura 10 ilustra a acomodação de alguns doadores de acila (A: acetato de vinila; B: butirato de vinila; e C: laurato de vinila) no bolsão hidrofóbico por meio de ancoragem molecular (SIRÉN *et al.*, 2020).

Figura 10. Ancoragem molecular de diferentes doadores de acila no bolsão hidrofóbico da CAL-A



Fonte: Adaptado de (SIRÉN *et al.*, 2020)

Comparando o acetato de vinila com o acetato de isopropenila, cuja única variação ocorre na cadeia alcóxi do éster, observa-se que a mesma tem influência sobre o processo, já que o aumento de uma metila provocou uma diminuição da conversão, provavelmente devido a fatores estéricos. Após a formação do intermediário tetraédrico 1, ocorre a restauração da carbonila, que é responsável por liberar um co-produto. Quando o acetato de vinila é utilizado, ocorre a liberação do etenol, que por tautomeria forma o acetaldeído. Já para o acetato de isopropenila, no

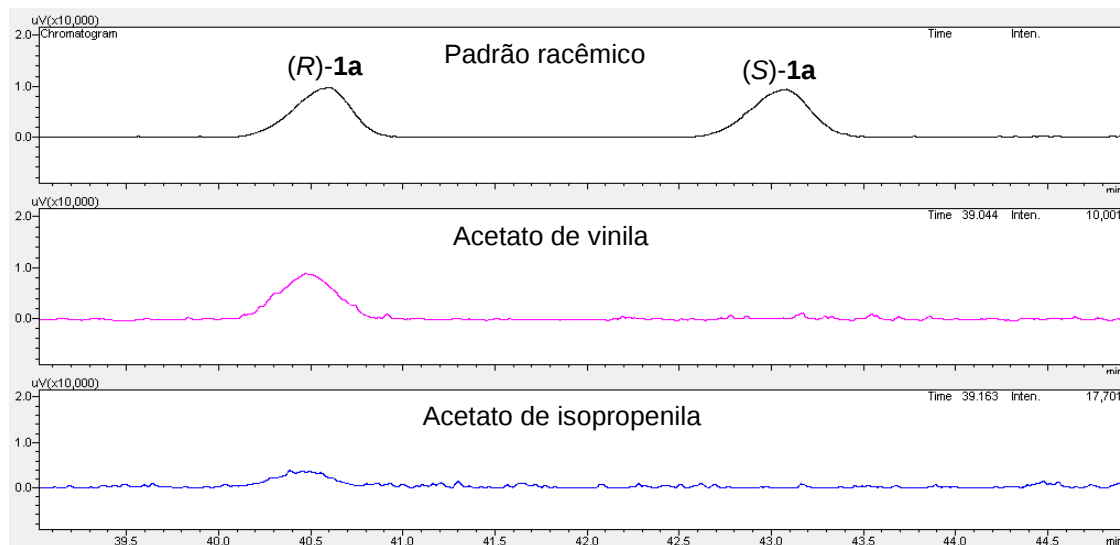
entanto, ocorre a formação do propenol, e consequentemente, da acetona. Ambos os co-produtos são favorecidos por serem bons grupos abandonadores, e também por conta do equilíbrio ceto-enólico, que torna a reação irreversível (BORNSCHEUER; KAZLAUSKAS, 2005).

Por fim, não foram observadas conversões quando o metoxiacetato de etila e o trifluoracetato de etila foram utilizados como doadores de acila. Nesses casos, esperava-se observar a influência dos efeitos eletrônicos na reação, uma vez que o grupo CF_3 do trifluoracetato de etila é responsável por retirar densidade eletrônica da caboxila, tornando-a mais eletrofílica, o que poderia ter facilitado a formação do intermediário tetraédrico 1, enquanto que a metoxila do metoxiacetato de etila pode atuar como um grupo doador de densidade eletrônica para a caboxila, dificultando o ataque nucleofílico da serina para formar esse mesmo intermediário.

Nesses dois casos, o fato de os produtos não terem sido observados pode estar diretamente relacionado à influência da cadeia alcóxi do doador de acila, pois ambos se tratam de ésteres etílicos, e, dessa forma, etanol seria liberado como co-produto, tornando a reação reversível, já que o mesmo não apresenta um equilíbrio ceto-enólico como a acetona e o acetaldeído. Outra justificativa, seria baseada em estudos de ancoragem molecular, os quais indicaram que o metoxiacetato de etila permanece na superfície da CAL-A e não interage com o bolsão hidrofóbico, devido à maior hidrofiliidade desse doador de acila. Analogamente, essa explicação pode ser aplicada ao trifluoracetato de etila, que também apresenta um grupo altamente polar (SIRÉN *et al.*, 2020).

Os excessos enantioméricos, em alguns casos, não puderam ser medidos durante essa triagem, com exceção da resolução cinética com butirato de vinila, que vinha sendo realizada nos experimentos anteriores, e com acetato de vinila, na qual foi observado um ee superior à 99%, o que seria um resultado mais interessante, se não fosse pela baixa conversão. Para acetato de isopropenila a conversão muito baixa aliada ao erro do equipamento impossibilitaram a medida do ee, como pode ser observado no cromatograma (Figura 11). Como mencionado anteriormente, o decanoato (*rac*)-**2c** não foi separado nas colunas quirais disponíveis no nosso laboratório, provavelmente em função da longa cadeia acila, embora a obtenção desse dado fosse muito importante.

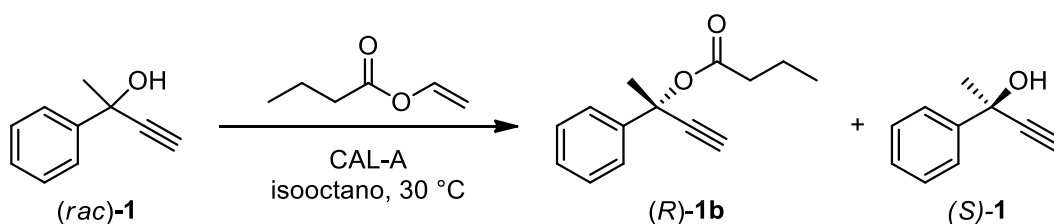
Figura 11. Cromatograma (GC-FID) comparando o perfil de **1a** formado com diferentes doadores de grupo acetil em coluna Hydrodex® β -3P



- Efeito da concentração do doador de acila e carga de enzima**

Após selecionado o butirato de vinila como melhor doador de acila, realizou-se uma última triagem, na qual foram variadas as quantidades de enzima e doador de acila, de modo a observar os impactos na conversão e enantiosseletividade. Ambas as quantidades foram dobradas separada e também simultaneamente. Os resultados, após 48 horas de reação, estão dispostos na Tabela 12.

Tabela 12. Efeito da concentração de doador de acila e carga de enzima na resolução cinética de (*rac*)-**1**



Entrada	CAL-A (m/m)	Butirato de vinila (equiv.)	Conversão (%)	ee 1b (%)
1	2	3	26	94
2	4	3	23	91
3	2	6	30	95
4	4	6	33	95

Condições reacionais: 0,50 mmol de (*rac*)-**1**, isooctano (6 mL), 30 °C, agitação magnética vigorosa, 48 h. Valores de conversão determinados por GC-FID em coluna HP-5MS (Método A) e excessos enantioméricos em coluna quiral Hydrodex (Método B).

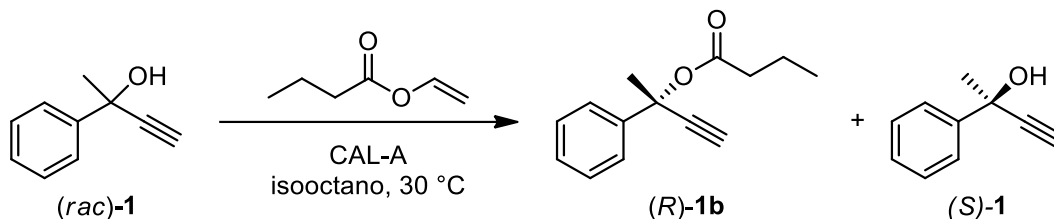
Observou-se com base na Tabela 12, que a variação na quantidade de enzima em duas vezes (entrada 2) implica numa ligeira diminuição da conversão (pouco mais de 2%), ao passo que o ee diminui em cerca de 3%. Logo, uma maior disponibilidade de enzima deve fazer com que o enantiômero desfavorecido tenha uma maior probabilidade de ser convertido ao respectivo éster.

A concentração do butirato de vinila se mostrou uma variável mais importante, uma vez que ao dobrar a quantidade de butirato de vinila (entrada 3), observou-se um aumento da conversão em cerca de 4%, além de um ligeiro aumento do excesso enantiomérico para 95%. Este efeito deve ocorrer devido à maior disponibilidade do intermediário acil-enzima ao substrato, já que a proporção doador de acila/enzima aumentou.

Ao dobrar simultaneamente ambas as quantidades (entrada 4), uma conversão de 33% foi atingida, além de 95% ee. Tal resultado mostra que esses dois elementos da resolução cinética (CAL-A e butirato de vinila) são interdependentes, não bastando apenas alterar uma única concentração. Ou seja, na entrada 3, por exemplo, a conversão poderia ter sido um pouco maior caso um excesso de enzima fosse fornecido, assim como na entrada 2, um excesso de butirato de vinila resolveria o problema.

Com a obtenção deste ótimo resultado, praticamente idêntico aos da literatura, optamos por testar outras condições, utilizando excessos ainda maiores de doador de acila e de enzima. Estes novos resultados, assim como os anteriores (Tabela 12), encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13. Efeito da concentração de doador de acila e carga de enzima na resolução cinética de (*rac*)-**1** (novas entradas)



Entrada	CAL-A (m/m)	Butirato de vinila (eq.)	Conversão (%)
1	2	3	26
2	4	3	23
3	2	6	30
4	4	6	33
5	8	6	17
6	4	12	34
7	8	24	23
8	4	24	30
9	2	45	16

Condições reacionais: (entradas 1 a 4): 0,50 mmol de (*rac*)-**1**, isooctano (6 mL), 30 °C, agitação magnética vigorosa. (entradas 5 a 9): 0,17 mmol de (*rac*)-**1**, isooctano (2 mL), 30 °C, agitação magnética vigorosa, 48 h. Valores de conversão determinados por GC-FID em coluna HP-5MS (Método A).

Na entrada 5, comprovamos a hipótese da entrada 2, de que uma razão doador de acila/enzima pequena desfavorece a reação. Embora a proporção seja a mesma, na entrada 5 a massa de enzima utilizada foi 8 vezes maior que a de substrato, explicando uma queda mais drástica da conversão. Analogamente, a entrada 6 é similar à entrada 3 no que diz respeito à proporção doador de acila/enzima, e como esperado, foi obtido um acréscimo na conversão, que atingiu a marca dos 34%, pois, na prática, a disponibilidade do intermediário acil-enzima para o substrato era ainda maior.

Então, novamente a concentração do doador de acila e carga de enzima foram dobradas na entrada 7, mas nesse caso foi observada uma diminuição nos resultados, o que pensamos, inicialmente, que estaria ligado ao excesso de enzima. Dessa forma, na entrada 8, apenas a carga de enzima foi diminuída pela metade, mantendo o excesso de 24 equivalentes de doador de acila. Foi observado um aumento na conversão para 30%, o que não é melhor resultado, mas ainda sim, melhor que o anterior.

Para finalizar este estudo, foi realizado um experimento com 45 equivalentes de butirato de vinila, o que equivale a metade do volume total. Neste caso, porém, a conversão teve uma queda brusca, ficando na faixa dos 16%, o que pode ser decorrente do aumento da polaridade do sistema, fator que interferiu muito no estudo do efeito do solvente. Concluimos, portanto, deve existir um valor ótimo a ser adionado, tanto de enzima, quanto de doador de acila, e que esgotamos todas as possibilidades, chegando ao limite daquilo que o sistema poderia oferecer.

Ainda que a conversão da entrada 6 tenha sido maior que a da entrada 4, esse valor corresponde a um aumento de apenas 1%, o que não justifica a utilização do dobro de CAL-A e butirato de vinila. Logo, selecionamos as condições da entrada 4 (6 equivalentes de butirato de vinila e 4 vezes a massa da CAL-A com relação à massa do substrato) como sendo as mais adequadas para a resolução cinética de (*rac*)-**1**. Este resultado é inédito para uma reação de 48 horas utilizando enzimas selvagens, uma vez que a maior conversão até então havia sido 35% em 120 horas (KRISHNA; PERSSON; BORNSCHEUER).

4.1.5. Lipase de *Candida rugosa*

Após finalizado o estudo de engenharia do meio reacional utilizando a CAL-A para resolução cinética de (*rac*)-**1**, uma segunda tentativa de utilização da lipase de *Candida rugosa* (CRL) foi realizada, já que ela havia demonstrado uma atividade mais modesta para com este substrato anteriormente. Desta vez, no entanto, a reação foi conduzida num balão de fundo redondo sob agitação magnética, utilizando as condições otimizadas anteriormente. Além disso, o butirato de vinila ainda não havia sido testado com a CRL, e os resultados poderiam ser muito melhores, pois ela tem uma atividade enzimática específica de 700 U/mg, que é maior se comparada a CAL-A imobilizada em Immobead 150, de 500 U/g.

A grande vantagem desta lipase, caso fornecesse resultados superiores à CAL-A, seria a possibilidade de explorar novos suportes de imobilização, uma vez que ela foi adquirida na sua forma livre. A imobilização das enzimas é um fator que tende a influenciar e muito na sua atividade, como reportado no trabalho de Bornscheuer e colaboradores (KRISHNA; PERSSON; BORNSCHEUER, 2002).

A reação foi realizada utilizando as condições da entrada 4 da Tabela 13, ou seja, uma razão m/m de enzima quatro vezes maior que o substrato e 6 equivalentes

de butirato de vinila em isooctano. Mesmo após 120 horas de reação, entretanto, a conversão não superou 3%, indicando que, de fato, esta enzima não é adequada para este substrato em reações de transesterificação enantiosseletiva.

4.1.6. Adição lenta de substrato

Uma última tentativa de otimização da resolução cinética foi realizada utilizando um sistema para adição de substrato em fluxo, de modo que ele permanecesse sempre diluído no meio reacional. Esta metodologia, em teoria, poderia aumentar a conversão ou ainda diminuir o tempo necessário para atingir o máximo de conversão obtido até então, uma vez que uma grande carga de enzima sempre estaria disponível ao substrato, que seria adicionado ao longo de um determinado período. Para isso, além do sistema tradicional de reações em batelada, composto por um balão de fundo redondo, foi utilizada uma bomba de seringa, responsável por dispensar a solução do substrato no fluxo programado, e um borbulhador (Figura 12).

Figura 12. Sistema para adição do substrato em fluxo ao balão contendo CAL-A



No balão, 312 mg de CAL-A foram mantidas sob agitação magnética em 4,0 mL de isooctano a 30 °C, enquanto na seringa, foi adicionada uma solução de 73,0 mg de (*rac*)-**1** e 400 µL de butirato de vinila em 2,0 mL de isooctano. A bomba foi programada para dispensar a solução do substrato num fluxo de 0,4 mL por hora. Dessa forma, a adição do substrato ocorreu lentamente, ao longo de 6 horas. Após uma hora da completa adição do conteúdo da seringa, uma alíquota foi retirada e injetada no CG-DIC. A conversão neste período, atingiu apenas 5%, contradizendo a nossa hipótese de que a diluição do sistema poderia favorecer a transformação do substrato num período menor, diminuindo ao menos o tempo de reação.

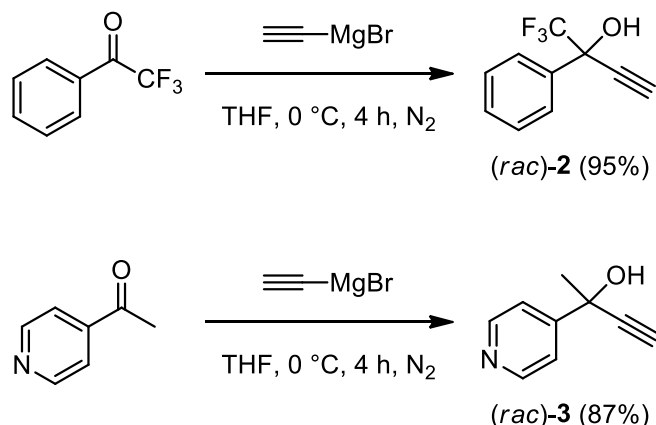
A reação ainda foi mantida, por via das dúvidas, até completar 24 horas do seu início, quando foi interrompida, filtrada e “lavada” com acetato de etila. Uma segunda alíquota foi então injetada, mas a conversão, mesmo assim, não ultrapassou a marca dos 7%. Foi constatado com este experimento, que na verdade o substrato deve ser adicionado desde o início para se obter uma maior conversão. Com isso, os experimentos de resolução cinética foram finalizados, afinal, uma condição inédita já havia sido obtida e, aparentemente, o sistema foi levado ao seu limite.

4.2. Escopo de substratos

4.2.1. Síntese dos álcoois terciários

Outros dois álcoois terciários propargílicos foram sintetizados para avaliação do escopo de substratos: (*rac*)-**2** e (*rac*)-**3**, Esquema 14. Ambos foram obtidos via reação de Grignard, com adição do grupo propargil proveniente do brometo de etinilmagnésio às cetonas precursoras (2,2,2-trifluoracetofenona e 4’acetilpiridina, respectivamente). As reações foram conduzidas sob atmosfera de nitrogênio, banho de gelo e utilizando um excesso de 3 equivalentes do reagente de Grignard, uma vez que a solução do brometo de etinilmagnésio é comercializada apenas na concentração de 0,5 mol/L em THF, e excessos menores que 3 equivalentes não foram suficientes para conversões quantitativas.

Esquema 14. Síntese de álcoois terciários propargílicos racêmicos via adição nucleofílica com reagente de Grignard às cetonas precursoras

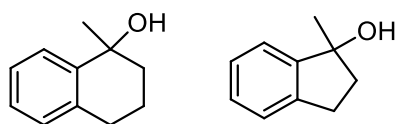


Ambos os álcoois foram caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono, espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier e espectrometria de massas. Nos dois casos, foram observados sinais característicos dos compostos, demonstrando que eles foram realmente sintetizados.

4.2.2. Avaliação do escopo de substratos no protocolo de resolução cinética

Na literatura, poucos foram os álcoois terciários explorados em protocolos de resolução cinética via transesterificação enantiosseletiva catalisada por lipase. Além do substrato modelo deste trabalho, (rac)-1, os principais exemplos reportados são referentes aos álcoois terciários bicíclicos, cujas estruturas estão representadas na Figura 13 (ÖZDEMIRHAN; SEZER; SÖNMEZ, 2008).

Figura 13. Estruturas dos álcoois terciários bicíclicos

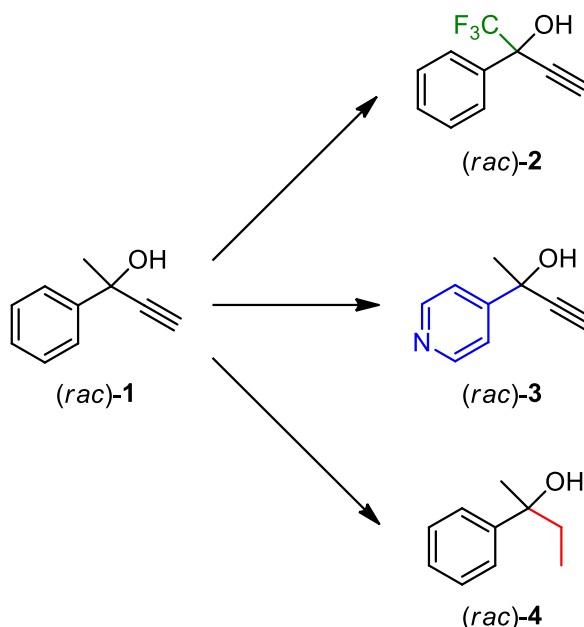


Até onde sabemos, álcoois terciários propargílicos derivados de (rac)-1 só foram avaliados em metodologias de hidrólise. Dessa forma, uma avaliação de escopo no protocolo de transesterificação desenvolvido seria algo inédito. Optamos neste estudo, por variar cada um dos substituintes ligados ao carbono α de (rac)-1

separadamente, e avaliar a influência dos efeitos estéricos e eletrônicos na resolução cinética. Nesse sentido, outros três álcoois foram selecionados (Esquema 15):

- (*rac*)-**2** difere em R³ pela inserção de um grupo eletronegativo, CF₃, mas não varia tanto em tamanho se comparada à metila de (*rac*)-**1**. Este grupo, apesar de retirar densidade eletrônica da molécula, poderia influenciar na formação de ligações de hidrogênio com o sítio ativo da enzima através dos átomos de flúor, um possível fator estabilizador.
- (*rac*)-**3** difere em R⁴ por se tratar de um heterociclo. Assim, não é esperada qualquer influência estérica, mas sim eletrônica, além da possibilidade de formação de ligação de hidrogênio com algum resíduo de aminoácido da enzima através do nitrogênio piridínico;
- (*rac*)-**4** difere em R⁵ na hibridização do carbono. Neste caso, os efeitos eletrônicos seriam menos pronunciados se comparados à inserção de heteroátomos, apesar do carbono sp³ atuar como um melhor grupo doador de densidade eletrônica. A etila também possui maior grau de liberdade se comparada ao grupo propargil, podendo influenciar em efeitos estéricos.

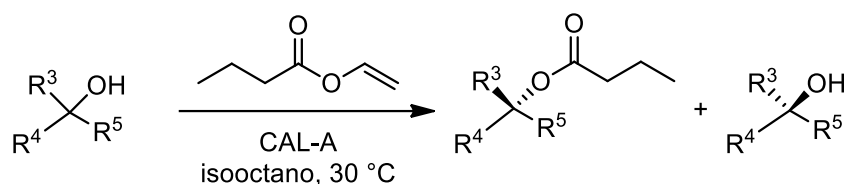
Esquema 15. Escopo de substratos: variação dos substituintes de (*rac*)-**1**



O escopo foi avaliado na condição otimizada para (*rac*)-**1**, utilizando 6 equivalentes de butirato de vinila e 4 vezes a massa de enzima com relação ao substrato. O solvente utilizado foi isooctano, com exceção da resolução cinética de

(*rac*)-**3**, que por motivos de solubilidade, teve de ser realizada em acetato de etila. Apesar de se tratar de um éster, o acetato de etila dificilmente atuaria como doador de acila, uma vez que o etanol não é um bom grupo abandonador em comparação com o enol do butirato de vinila, como observado anteriormente. Os resultados desse estudo, após 48 horas de reação, dispõem-se na Tabela 14.

Tabela 14. Avaliação do escopo de substratos no protocolo de RC desenvolvido para (*rac*)-**1**



Substrato	R ³	R ⁴	R ⁵	Produto	Conversão (%)
(<i>rac</i>)- 1	CH ₃	Ph	CCH	(<i>R</i>)- 1b	33
(<i>rac</i>)- 2	CF ₃	Ph	CCH	(<i>R</i>)- 2b	0
(<i>rac</i>)- 3	CH ₃	Py	CCH	(<i>R</i>)- 3b	2
(<i>rac</i>)- 4	CH ₃	Ph	CH ₂ CH ₃	(<i>R</i>)- 4b	3

Condições reacionais: 0,17 mmol de substrato, 0,5 mmol de doador de acila, isooctano (2 mL) CAL-A (156 mg), 30° C, agitação magnética vigorosa, 48 h. Valores de conversão determinados por GC-FID em coluna HP-5MS (Método A).

Embora os resultados não tenham sido favoráveis, como observado na Tabela 14, este experimento variando consecutivamente os substituintes de (*rac*)-**1** foi bem esclarecedor, demonstrando os diversos fatores estruturais que influenciaram nas conversões até então.

No caso do substrato (*rac*)-**2**, por exemplo, os fatores eletrônicos devem ter imperado para a conversão nula, pois este substrato possui três átomos de flúor, altamente eletronegativos, ligados a um mesmo átomo de carbono. Assim, CF₃ age como um forte grupo retirador de densidade eletrônica por efeito indutivo, tornando a molécula um nucleófilo mais fraco, uma vez os elétrons da hidroxila estarão menos disponíveis para realizar um ataque ao intermediário acil-enzima. Apesar de se tratar de uma reação enzimática, nenhum efeito estabilizador, como uma possível ligação de hidrogênio entre os átomos de flúor e resíduos de aminoácidos no interior do sítio ativo, foram capazes de superar os efeitos eletrônicos desfavoráveis impostos pelo grupo CF₃.

(*rac*)-**3**, por sua vez, foi convertido minimamente pela CAL-A ao respectivo produto, não superando os 2%. Neste caso, entretanto, o maior problema deve estar relacionado à baixa solubilidade do substrato em solventes orgânicos apolares, como isooctano e heptano, que se mostraram as melhores opções para este protocolo. Até mesmo durante o processo de síntese deste álcool, a sua baixa solubilidade foi observada, já que (*rac*)-**3** precipitou-se na forma de um sólido amarelado com a adição do reagente de Grignard. Devido à impossibilidade de utilizar solventes mais polares, como metanol e etanol, uma vez que eles também atuariam como substrato, a melhor opção encontrada foi o acetato de etila. Como explicado anteriormente, a probabilidade dele atuar como doador de acila é baixíssima, devido ao etóxido (etanol) ser um grupo abandonador mais fraco e não estar em equilíbrio com uma espécie mais volátil, como o etenol está em equilíbrio com o acetaldeído, no caso dos ésteres vinílicos.

De acordo com a triagem de solventes realizada anteriormente, os mais apolares se mostraram as opções mais viáveis, pois favoreciam a conversão do substrato. Logo, utilizar acetato de etila pode não ter beneficiado a reação, apesar de ser um dos poucos solventes capazes de dissolver (*rac*)-**3**. De forma resumida, a elevada polaridade do composto, em função do heterociclo, torna este substrato pouco adequado à resolução cinética em meio orgânico (transesterificação enantiosseletiva), que requer substratos mais apolares.

Por fim, foi avaliado o efeito do grupo propargílico na estrutura, através da sua substituição por uma etila. Assim como os demais substratos, no entanto, (*rac*)-**4** também não forneceu bons resultados, formando apenas 3% do respectivo produto. Neste caso, era esperada uma melhoria na conversão por causa da etila ser menos eletronegativa que o grupo etinil, e dessa forma, atuar como um melhor grupo doador de densidade eletrônica por efeito de hiperconjugação. Os efeitos eletrônicos, porém, devem ter sido sobrepostos pelos efeitos estéricos, uma vez que a etila tem livre rotação, ao contrário do propargil, dificultando o encaixe do álcool no sítio ativo para realização do ataque.

A conclusão desta avaliação de escopo, é que (*rac*)-**1** possui diversos fatores colaborando para a sua transformação pela CAL-A, que explicam a escolha deste substrato em trabalhos anteriores. Dentre eles o efeito indutivo doador de densidade eletrônica para a hidroxila, favorecido pela metila; a solubilidade em isooctano,

aumentada pelo anel benzênico; e o baixo grau de liberdade do grupo etinil, que apesar de mais eletronegativo, colabora para a diminuição de efeitos estéricos.

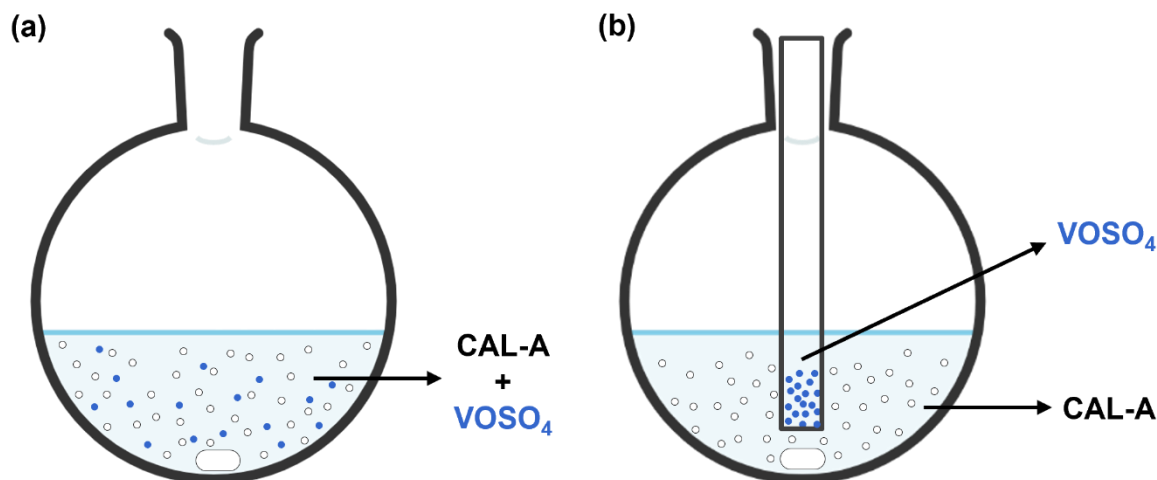
4.3. Resolução cinética dinâmica

Durante o processo de desenvolvimento de uma metodologia de resolução cinética dinâmica, geralmente duas etapas são realizadas separadamente e, em seguida combinadas: o estudo da resolução cinética (clássica) e o estudo do processo de racemização.

Neste trabalho, entretanto, decidimos testar a resolução cinética dinâmica antes de realizar qualquer estudo de racemização. Para isso, foi utilizado um sistema quimioenzimático de catalisadores, composto pela CAL-A, a lipase que forneceu os melhores resultados na resolução cinética de (*rac*)-**1**, e o sulfato de vanadila hidratado, que atua através de um mecanismo ácido-base e conta com a experiência do nosso grupo de pesquisa, que desenvolveu um protocolo de RCD quimioenzimática para álcoois secundários benzílicos, utilizando a combinação deste agente de racemização com a CAL-B (DE ALMEIDA *et al.*, 2020).

Tanto no trabalho citado acima (do nosso grupo de pesquisa), como em outra referência (WUYTS *et al.*, 2007), foi observada certa incompatibilidade entre a CAL-B e o VOSO_4 após longos períodos em contato direto. Tendo isso em mente, uma das estratégias utilizadas pelo nosso grupo para superar esta limitação foi a utilização de um sistema de compartimentalização, responsável por separar fisicamente os catalisadores, embora ambos continuem em contato com a solução do substrato: a enzima permanece livre no balão, enquanto o sulfato de vanadila é confinado no interior de um tubo de teflon com furos de diâmetro suficiente apenas para passagem do líquido. A Figura 14 ilustra a configuração deste sistema.

Figura 14. Comparação dos sistemas (a) sem compartimentalização e (b) com compartimentalização dos catalisadores



Vale destacar neste ponto, que em todos os experimentos realizados até então, independentemente da temperatura, solvente e doador de acila, foi observada a degradação das esferas de CAL-A imobilizada em imobead 150, uma vez que com o passar do tempo, a solução passou a tomar um aspecto turvo, provavelmente em função do atrito provocado pela barra magnética, associado ao solvente orgânico apolar (isooctano). Esse processo ficou ainda mais evidente após a filtração das enzimas, que deixaram de apresentar-se na forma de esferas e formaram uma espécie de placa decorrente da aglomeração de um pó finamente dividido (Figura 15).

Figura 15. Mudança no aspecto da enzima com o passar do tempo



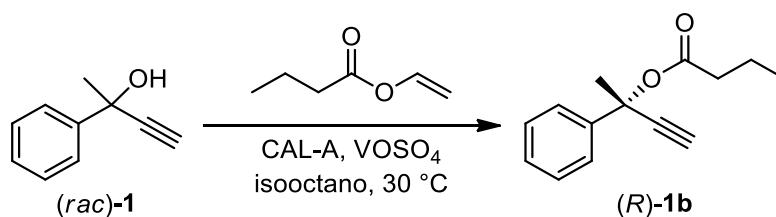
Embora, aparentemente, a degradação das esferas não tenha influenciado a resolução cinética, muito provavelmente este fenômeno poderia vir a interferir na resolução cinética dinâmica, quando a CAL-A fosse combinada ao sulfato de vanadila. A presença de um pó finamente dividido poderia dificultar no processo de compartimentalização, já que partículas menores teriam maior facilidade para adentrar o tubo onde o VOSO_4 estaria isolado.

Independentemente desta hipótese, a RCD foi realizada de duas formas para efeito de comparação: com e sem compartimentalização. As condições reacionais utilizadas em ambos os experimentos foram idênticas, sendo a separação física dos catalisadores a única variação. A condição ótima da etapa de resolução cinética foi também aplicada neste estudo, enquanto o trabalho anterior do nosso grupo serviu de base para a escolha da quantidade de VOSO_4 que seria usada (100 mg do catalisador para 0,50 mmol de substrato).

4.3.1. Sem compartimentalização

Primeiramente, a reação foi conduzida sem a utilização de um separador físico para os catalisadores. O avanço da reação foi acompanhado durante o experimento, coletando alíquotas após 1, 2, 24, 48 e 72 horas de reação (Tabela 15).

Tabela 15. Acompanhamento da resolução cinética dinâmica sem compartimentalização



Tempo (h)	Conversão (%)
1	2
2	3
24	5
48	13
72	13

Condições reacionais: 0,50 mmol de (*rac*)-**1**, 3,0 mmol de butirato de vinila, isooctano (6 mL), CAL-A (312 mg), VOSO_4 (100 mg), 30 °C, agitação magnética vigorosa, 48 h. Valores de conversão determinados por GC-FID em coluna HP-5MS (Método A).

Analisando os dados da Tabela 15, é possível notar que a reação prosseguiu de forma lenta por 48 horas, e a partir deste ponto atingiu o equilíbrio, pois a alíquota de 72 horas apresentou a mesma conversão da anterior. Em comparação com o mesmo sistema sem o sulfato de vanadila (entrada 4, Tabela 13), a conversão foi muito menor, caindo de 33% na RC clássica para 13% na RCD. Este resultado insatisfatório pode ser um indício da incompatibilidade entre a CAL-A e o agente de racemização, assim como observado em trabalhos anteriores, uma vez que ambos permaneceram em contato físico por um longo período. Dessa forma, é possível dizer que o VOSO_4 interage de alguma forma com a CAL-A, diminuindo a sua atividade.

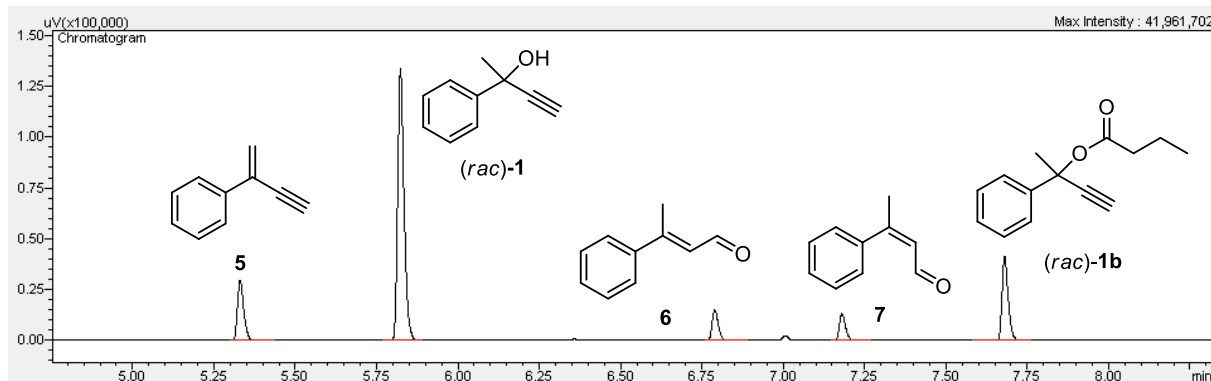
A enantiosseletividade da CAL-A, por sua vez, não foi muito afetada pela presença do sulfato de vanadila. A alíquota de 72 horas foi injetada no CG-DIC (Método B) e resultou em 93% de ee, praticamente mantendo os excessos obtidos no estudo de engenharia do meio reacional em reações com butirato de vinila.

4.3.2. Com compartimentalização

Após constatada a perda de atividade da CAL-A na presença do catalisador de oxovanádio, o mesmo experimento foi realizado com a inserção de uma barreira física entre os catalisadores. Para isso, foi utilizado um tubo de teflon com foros na extremidade inferior, permitindo apenas a passagem da solução. Dentro do tubo foi colocado o VOSO_4 , enquanto a enzima permaneceu livre e sob agitação. Neste experimento, também foi observada a degradação do suporte de imobilização da CAL-A, embora as partículas menores não tenham entrado no tubo através dos furos, provando a efetividade da compartimentalização.

A maior surpresa, neste caso, foi a observação de novos sinais nos cromatogramas de acompanhamento da reação (Figura 16), referentes à formação de produtos laterais pela ação do sulfato de vanadila, que mesmo após 72 horas, não haviam sido observados no experimento sem o sistema de compartimentalização. Isso pode ser um indício de que a lipase também limita a atividade do VOSO_4 , e não apenas o contrário.

Figura 16. Cromatograma da resolução cinética dinâmica com compartimentalização após 72 horas de reação



Estes produtos laterais não foram isolados, apenas caracterizados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Assim, levando em conta tanto estes espectros de massas (íon molecular e principais fragmentos), quanto o trabalho de Bäckvall e colaboradores (GÖRBE; LIHAMMAR; BÄCKVALL, 2018) que já reportou a formação destes compostos na presença de um agente de racemização que atua por mecanismos ácido-base, assim como o VOSO_4 , fizemos uma proposta das possíveis estruturas dos subprodutos formados na reação.

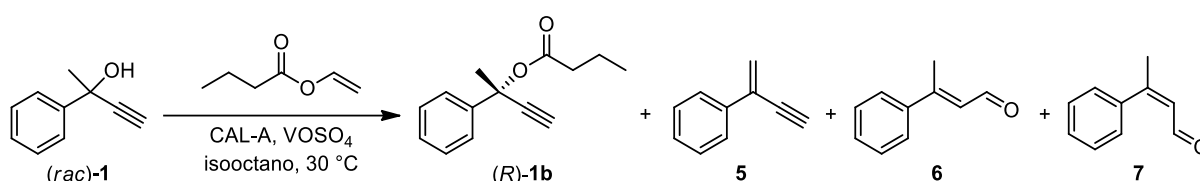
O composto 5, trata-se do produto de eliminação (2-fenil-1-buten-3-ino), formado quando um próton é abstraído da metila do intermediário carbocátion, o qual é gerado no processo de racemização. Neste caso, não há dúvidas de quanto à estrutura, uma vez que o espectro de massas apresentou poucos fragmentos (dada a estabilidade do composto), com íon molecular de razão m/z 128, condizendo com a massa molecular, e com espectro da literatura (CADIerno; GARCÍA-GARRIDO; GIMENO, 2005).

Os outros dois, provavelmente referem-se a um par de diastereoisômeros (3-fenil-2-butenal), provenientes do rearranjo Meyer-Schuster, quando o ataque da molécula de água ocorre no carbono terminal do alcino, ao invés do carbocátion. Estes compostos são aldeídos α,β -insaturados de configuração *E* e *Z*. Não é possível afirmar qual sinal pertence a qual aldeído, uma vez que eles não foram isolados e caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear, mas vamos assumir que o diastereoisômero *E* foi formado em maior quantidade por ser termodinamicamente mais estável. Ambos os espectros de massas apresentaram o sinal do íon molecular, com m/z 146, e o sinal M-1 com elevada abundância relativa,

o que é comum em aldeídos. Além disso, os espectros são muito parecidos e estão de acordo com a literatura (FRONZA; FUGANTI; SERRA, 2009), justificando um par de isômeros.

Foi possível observar o avanço na formação do produto de interesse, (*R*)-**1b**, bem como dos subprodutos (**5**, **6** e **7**), uma vez que a reação foi acompanhada via CG-DIC, com alíquotas retiradas após 2, 5, 24, 48 e 72 horas. A Tabela 16 traz estes valores de conversão.

Tabela 16. Acompanhamento da resolução cinética dinâmica com compartimentalização

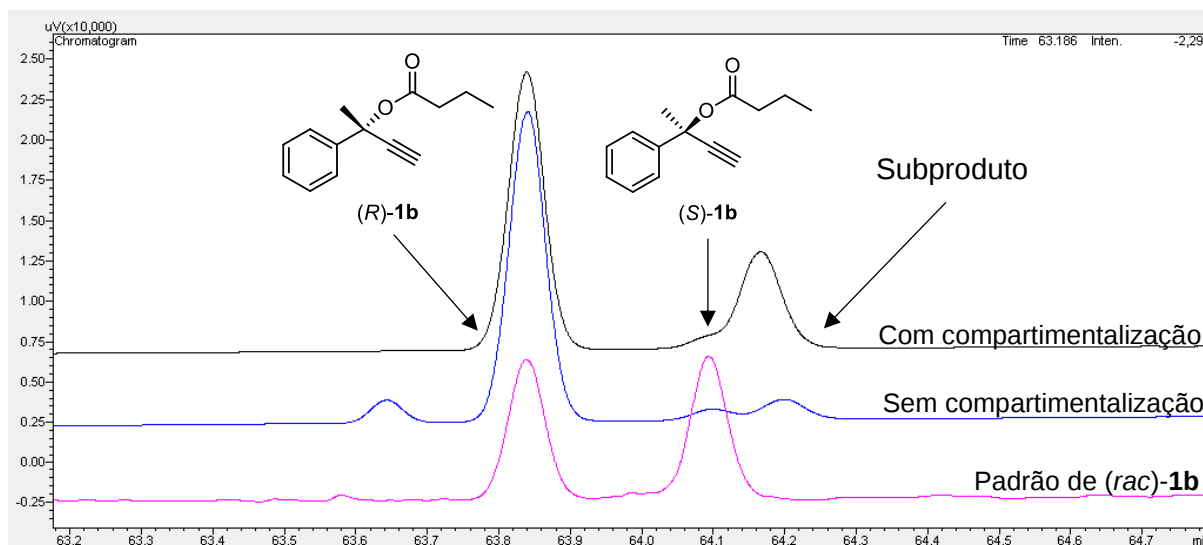


Tempo (h)	Conversão (%)			
	(<i>R</i>)- 1b	5	6	7
2	5	1	0	0
5	11	4	1	1
24	18	6	4	3
48	18	11	6	5
72	17	13	7	6

Condições reacionais: 0,50 mmol de (*rac*)-**1**, 3,0 mmol de butirato de vinila, isooctano (6 mL), CAL-A (312 mg), VOSO_4 (100 mg dentro do tubo de teflon), 30 °C, agitação magnética vigorosa. Valores de conversão determinados por GC-FID em coluna HP-5MS (Método A).

Apesar da formação de outros compostos, o produto majoritário ainda foi o de transesterificação. A conversão máxima para (*R*)-**1b** foi de 18%, e a sua obtenção cessou após 24 horas de reação, o que indica uma possível perda de atividade da CAL-A. Logo, o resultado foi melhor com o sistema de compartimentalização, uma vez que foi obtida uma conversão maior num menor período. Os excessos enantioméricos, porém, não foram obtidos devido à eluição de um dos subprodutos junto ao enantiômero S (minoritário), como mostra o cromatograma da Figura 17.

Figura 17. Cromatograma indicando a coeluição de um subproduto a (S)-1b



Dentre os subprodutos, o de eliminação (**5**) foi formado em maior quantidade, enquanto os produtos de rearranjo (**6** e **7**) sempre apresentavam conversões muito próximas entre si, com cerca de 1% de diferença. Em comparação com o éster, os subprodutos continuaram sendo formados após 24 horas de reação, com **5** praticamente dobrando a sua concentração de 24 para 48 horas. A partir das 72 horas de reação, no entanto, as taxas de conversões diminuíram, indicando a perda de atividade do sulfato de vanadila.

No trabalho desenvolvido por Akai e colaboradores (KAWANISHI *et al*, 2019), o solvente se mostrou o fator determinante para diminuir a formação dos subprodutos. Dentre as opções triadas, o mais eficaz em inibir a formação dos aldeídos, entretanto, foi a acetonitrila, o solvente que forneceu os piores resultados durante o estudo da engenharia do meio reacional. O segundo melhor foi o éter isopropílico, uma alternativa que não foi testada neste trabalho, mas que se seguir a tendência do MTBE, também não seria uma boa opção.

Levando em conta todos os desafios observados nessas duas reações de resolução cinética dinâmica, tanto com relação a inativação dos catalisadores devido à exposição mútua por longos períodos, quanto em função da formação de uma grande quantidade de subprodutos quando o sulfato de vanadila foi fisicamente separado da CAL-A, optamos por encerrar o estudo de RCD deste substrato, uma vez que seria extremamente complicado conciliar uma condição reacional que fosse adequada para ambos os catalisadores. Além disso, a CAL-A se mostrou durante o

desenvolvimento do protocolo de resolução cinética, ter uma cinética muito lenta na conversão de (*rac*)-**1**, o que é incompatível com a rápido processo de racemização catalisado pelo VO_2SO_4 , que levaria a um aumento na produção dos subprodutos. Nesse sentido, apesar das dificuldades impostas pela RCD, foram obtidos avanços na resolução cinética clássica de álcoois terciários propargílicos, inclusive com um resultado inédito para uma reação com CAL-A sem a necessidade de mutantes provenientes de engenharia genética.

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 $[\text{VO}(\text{OSiPh}_3)_3]$. **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.; FERNADEZ-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.

7. APÊNDICE

Figura A1. Espectro de massas (IE, 70 eV) do acetato de 2-fenil-3-butin-2-ila (**1a**)

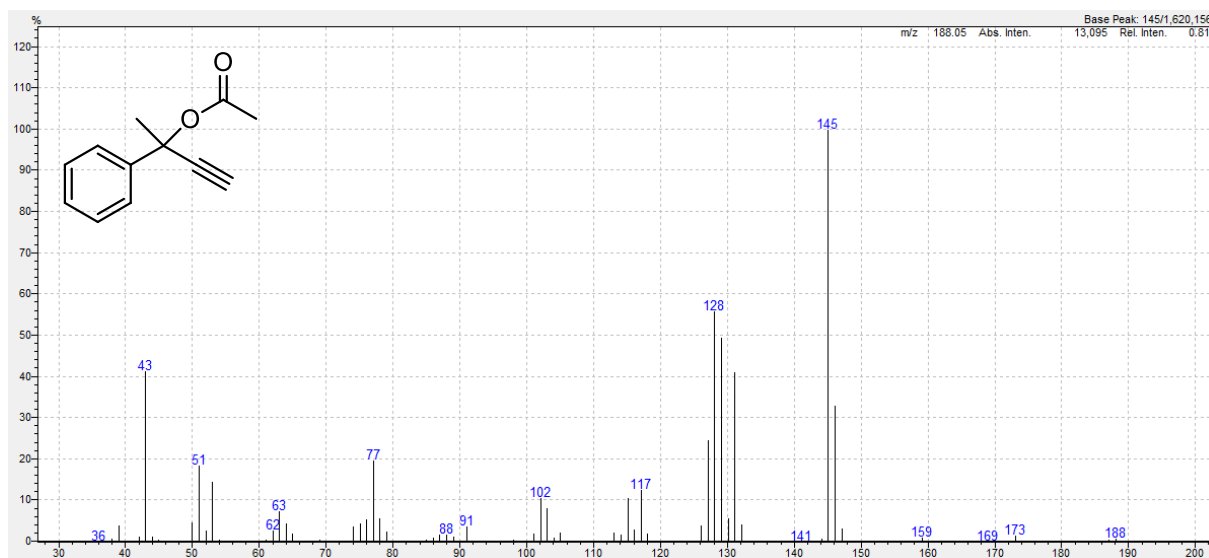


Figura A2. Espectro de absorção na região do infravermelho (ATR) do acetato de 2-fenil-3-butin-2-ila (**1a**)

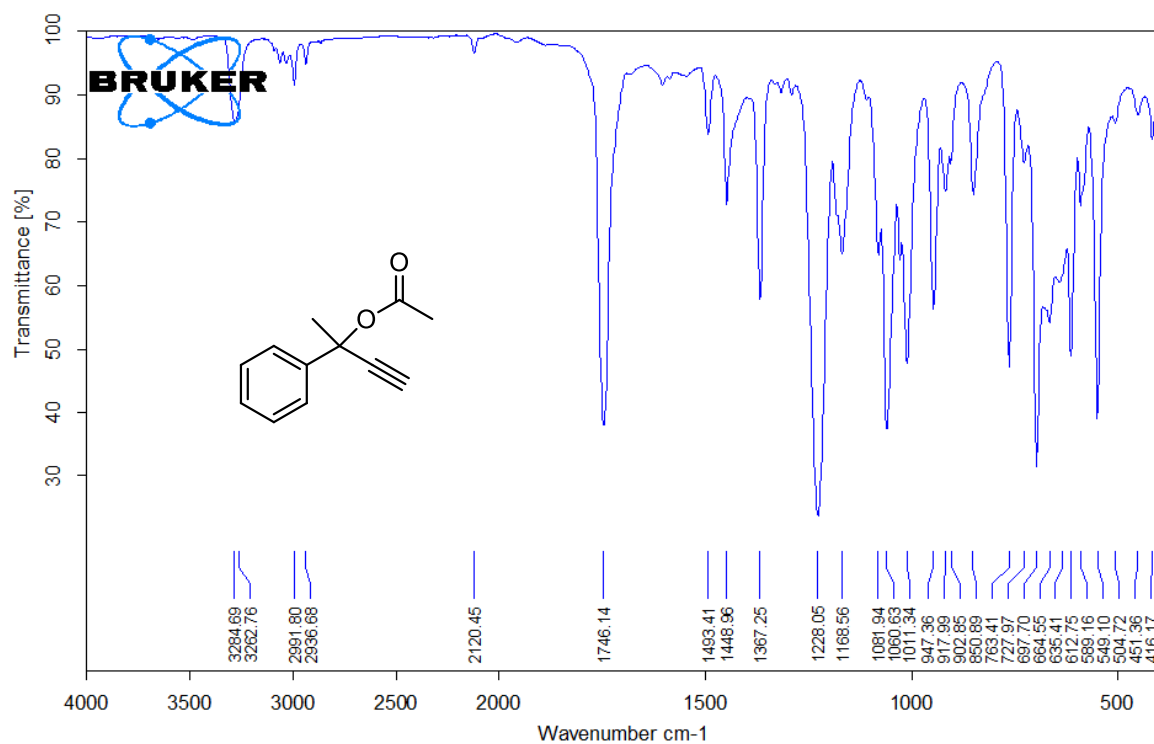


Figura A3. Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, CDCl_3) do acetato de 2-fenil-3-butin-2-ila (1a)

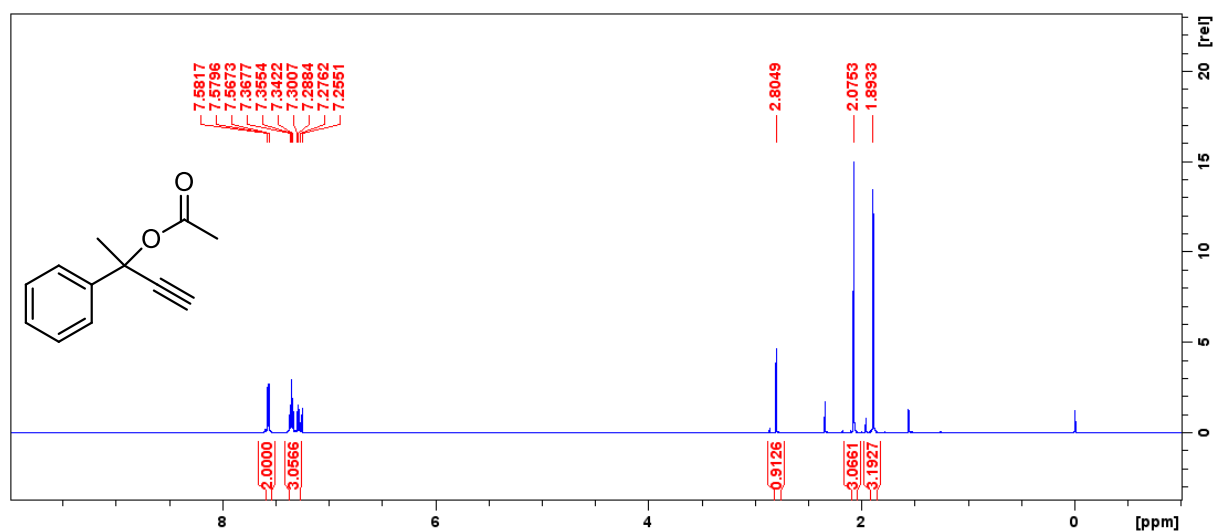


Figura A4. Espectro de RMN de ^{13}C (150,90 MHz, CDCl_3) do acetato de 2-fenil-3-butin-2-ila (1a)

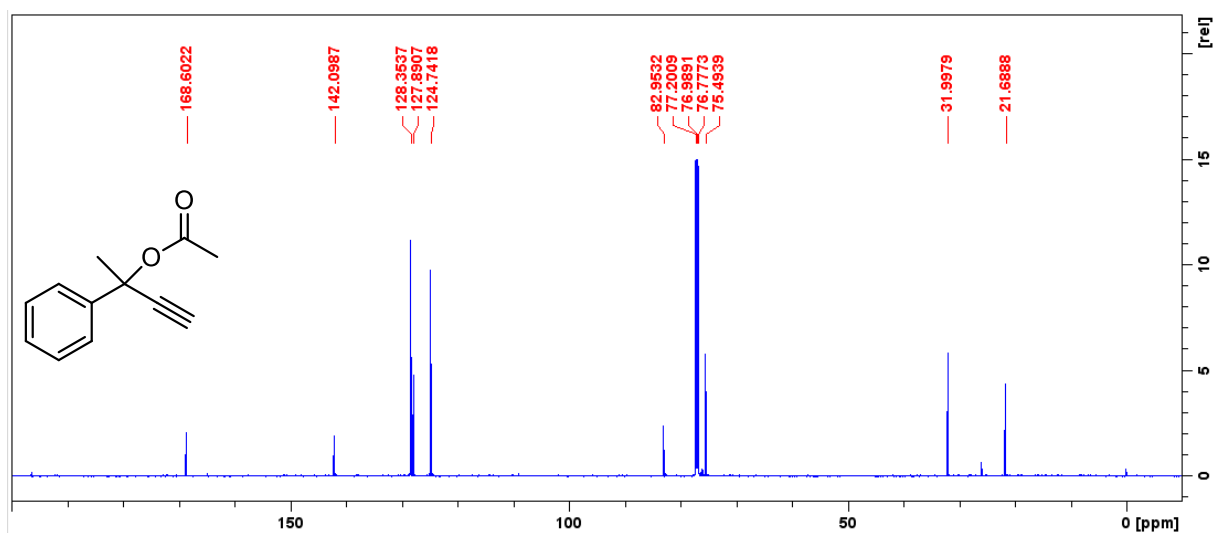


Figura A5. Espectro de massas (IE, 70 eV) do butirato de 2-fenil-3-butin-2-ila (**1b**)

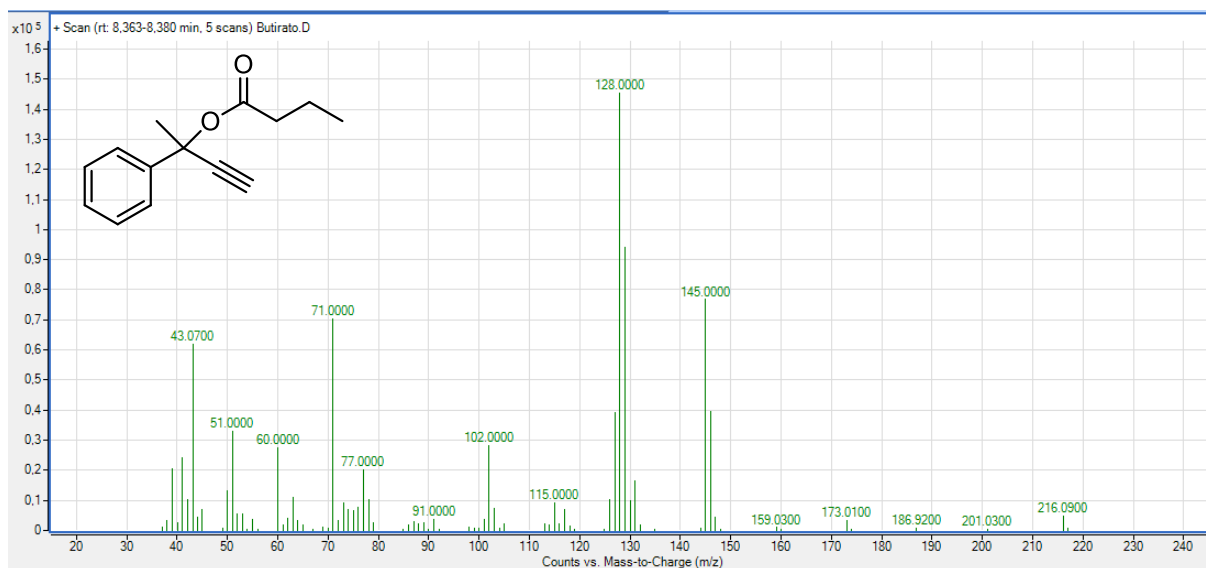


Figura A6. Espectro de absorção na região do infravermelho (ATR) do butirato de 2-fenil-3-butin-2-ila (**1b**)

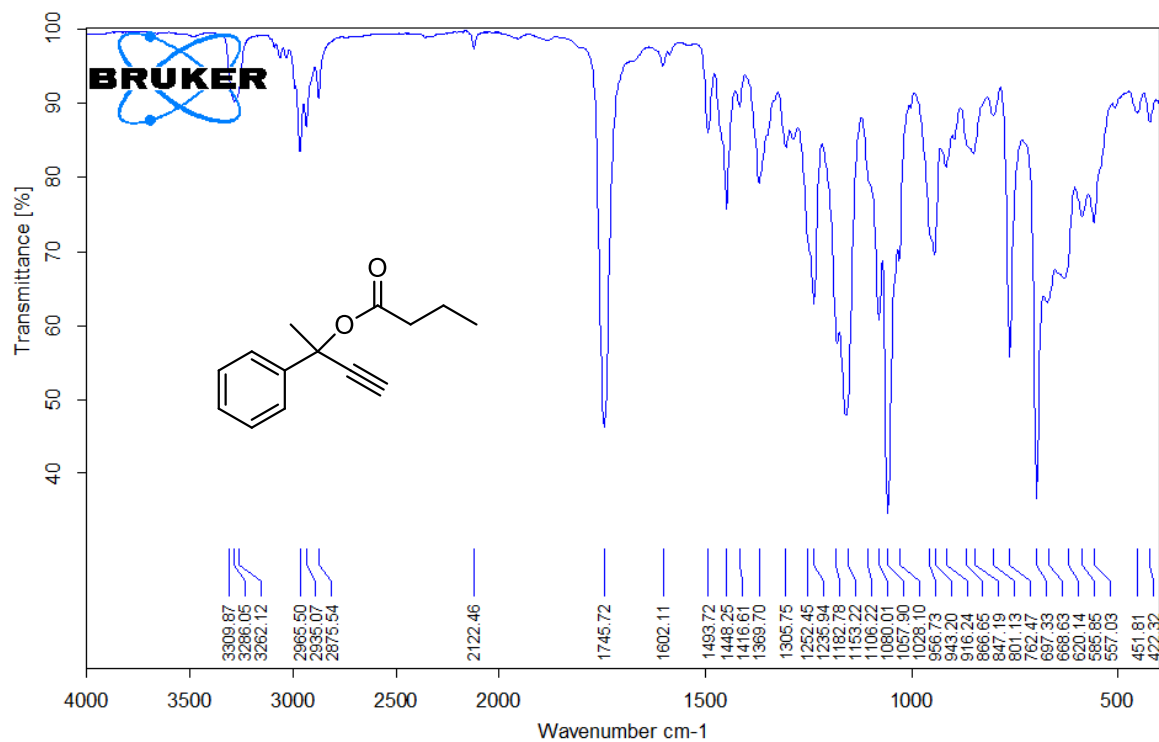


Figura A7. Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, CDCl_3) do butirato de 2-fenil-3-butin-2-ila (1b)

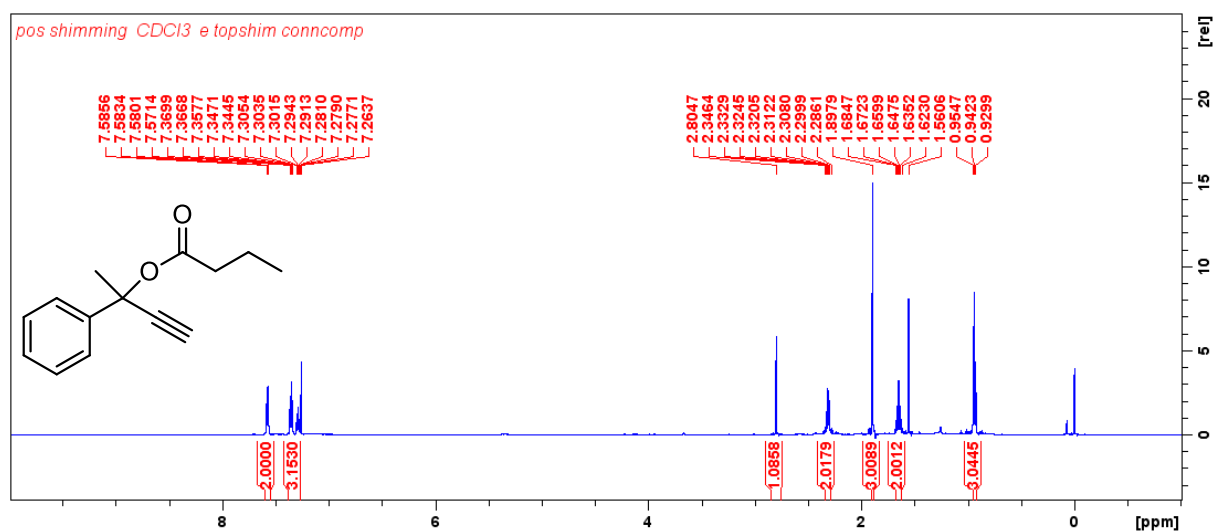


Figura A8. Espectro de RMN de ^{13}C (150,90 MHz, CDCl_3) do butirato de 2-fenil-3-butin-2-ila (1b)

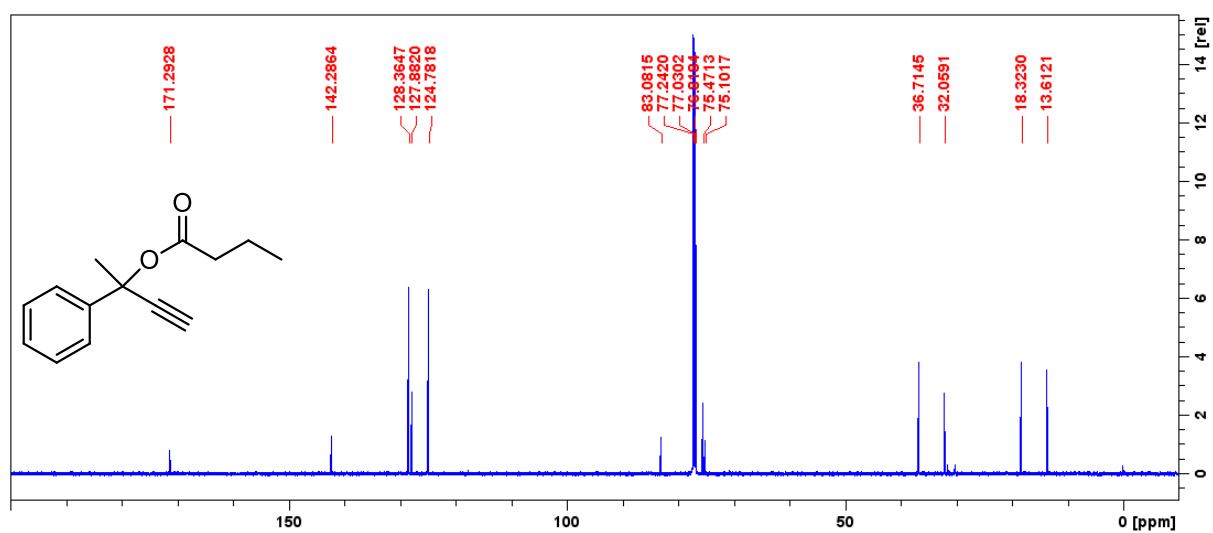


Figura A9. Espectro de massas (IE, 70 eV) do decanoato de 2-fenil-3-butin-2-ila (**1c**)

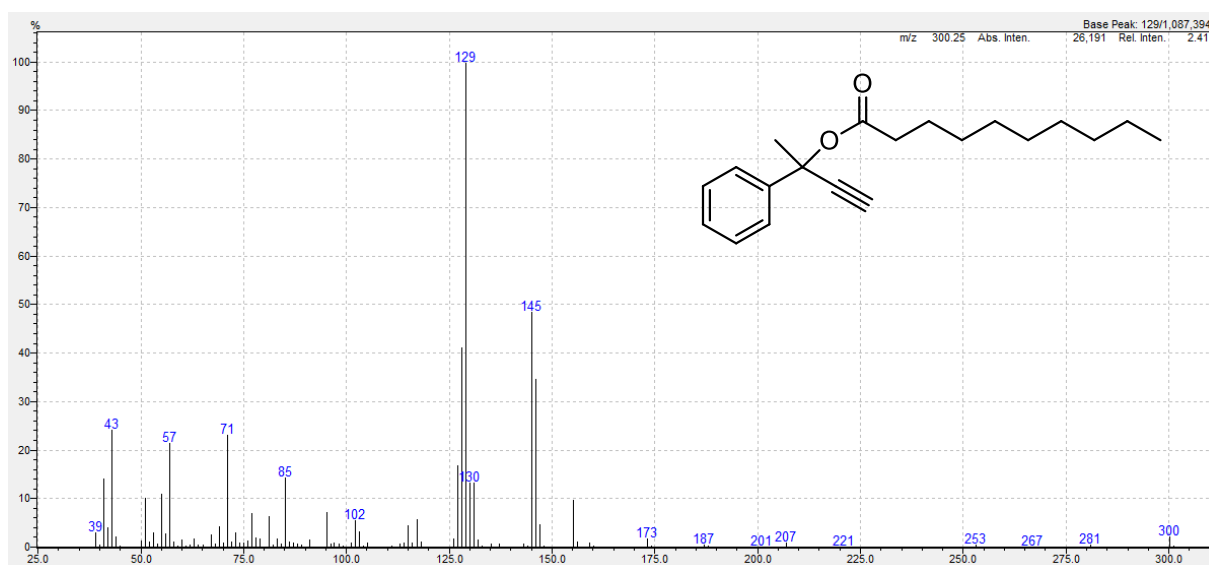


Figura A10. Espectro de absorção na região do infravermelho (ATR) do decanoato de 2-fenil-3-buten-2-ila (**1c**)

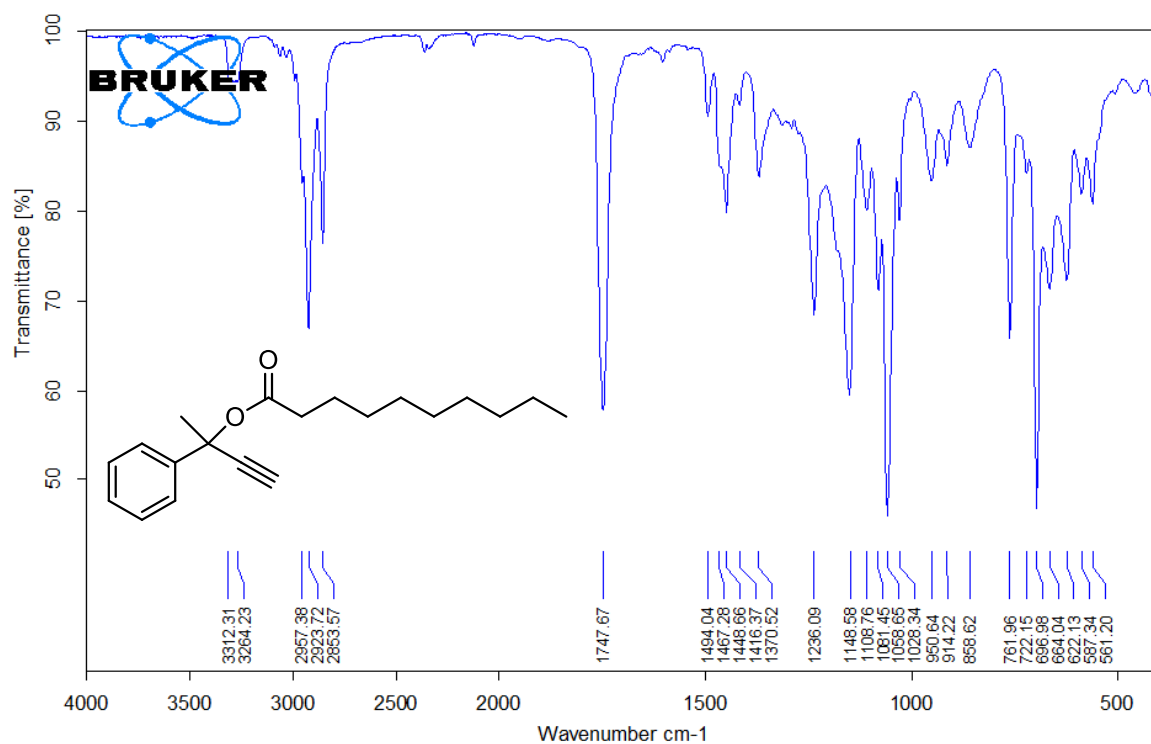


Figura A11. Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do decanoato de 2-fenil-3-butin-2-ila (**1c**)

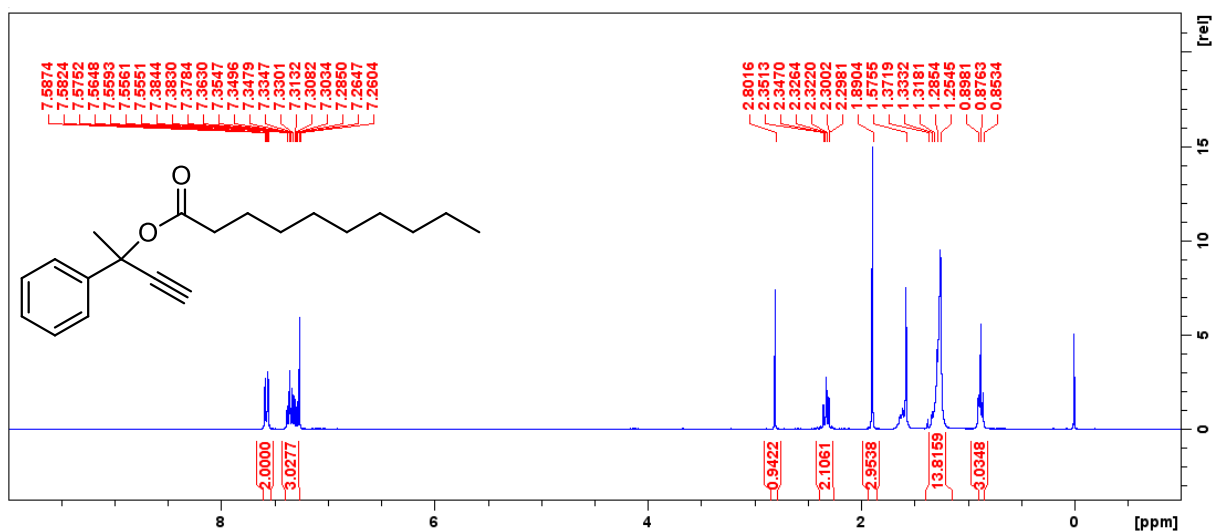


Figura A12. Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) do decanoato de 2-fenil-3-butin-2-ila (**1c**)

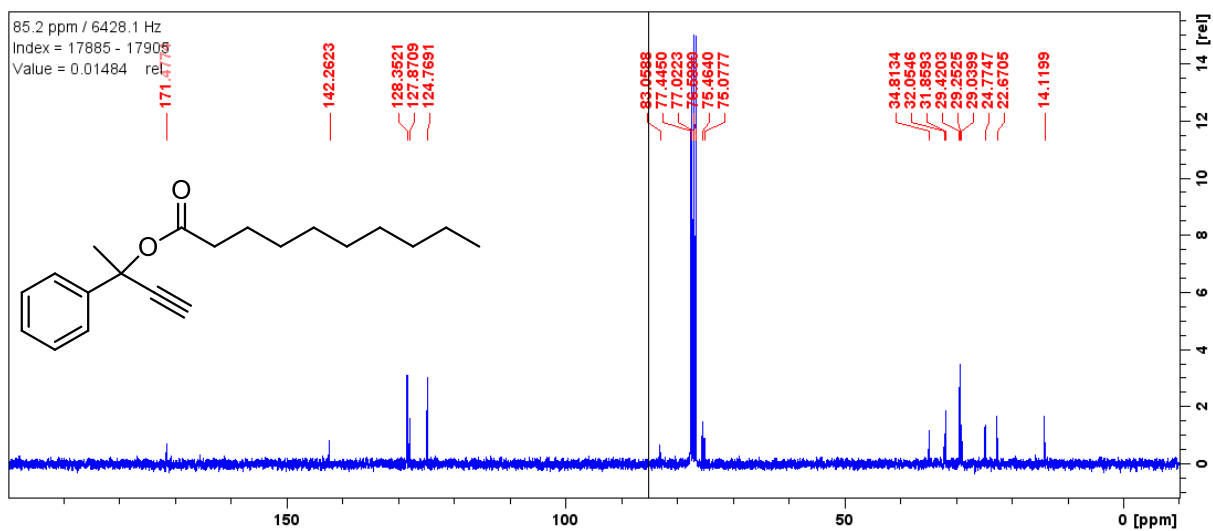


Figura A13. Espectro de massas (IE, 70 eV) do 1,1,1-trifluor-2-fenil-3-buten-2-ol (**2**)

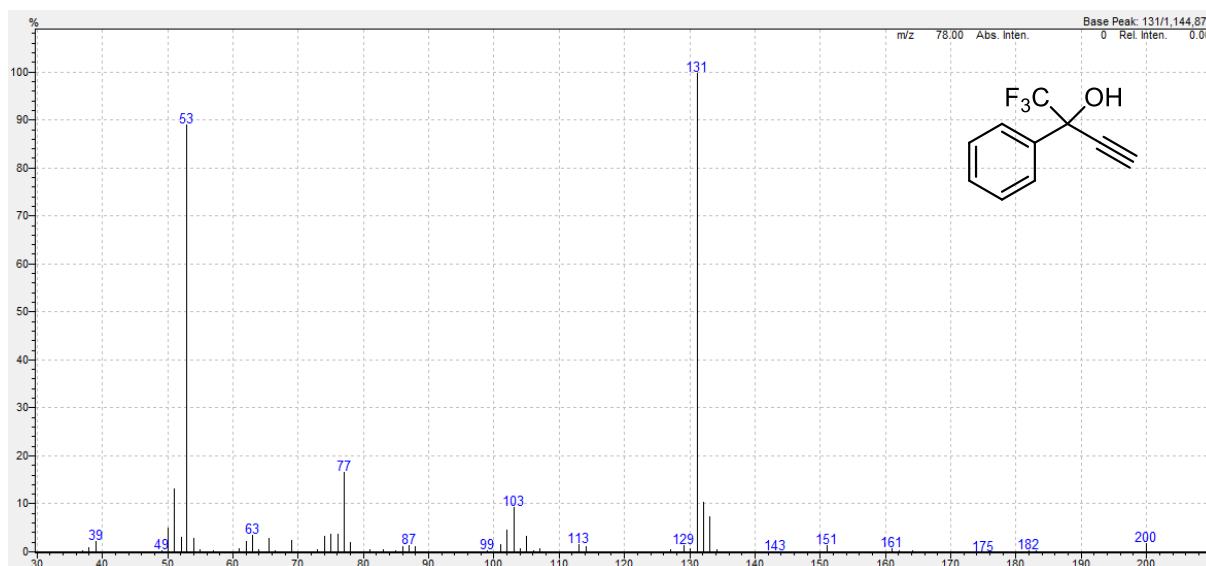


Figura A14. Espectro de absorção na região do infravermelho (ATR) do 1,1,1-trifluor-2-fenil-3-buten-2-ol (**2**)

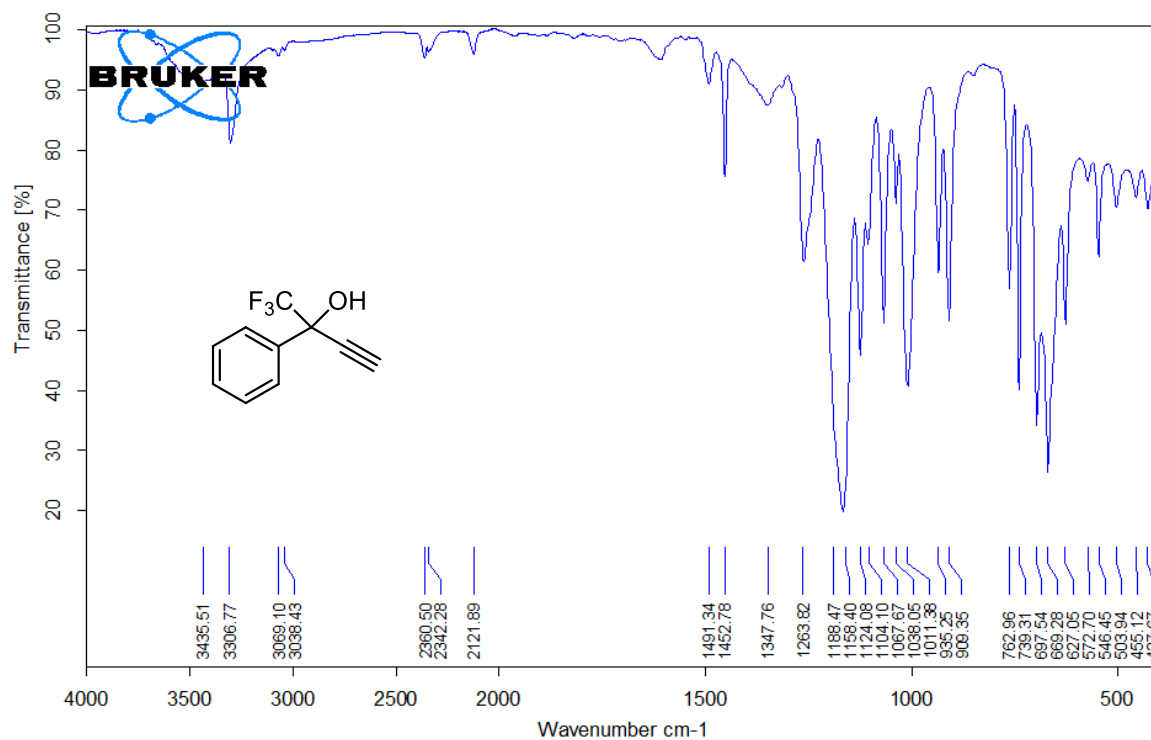


Figura A15. Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, CDCl_3) do 1,1,1-triflúor-2-fenil-3-butin-2-ol (2)

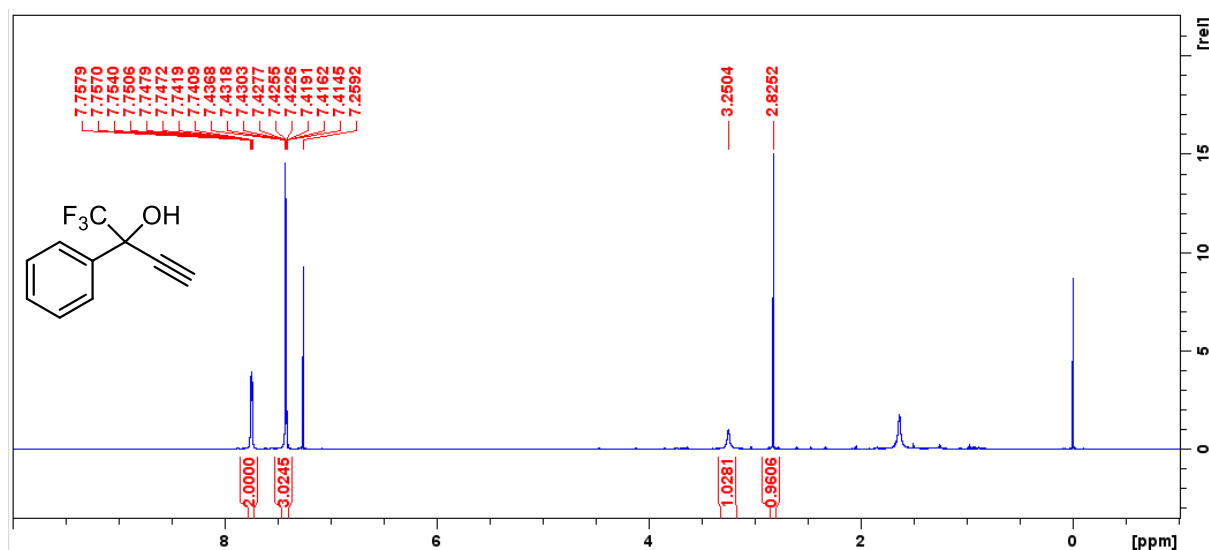


Figura A16. Espectro de RMN de ^{13}C (150,90 MHz, CDCl_3) do 1,1,1-triflúor-2-fenil-3-butin-2-ol (2)

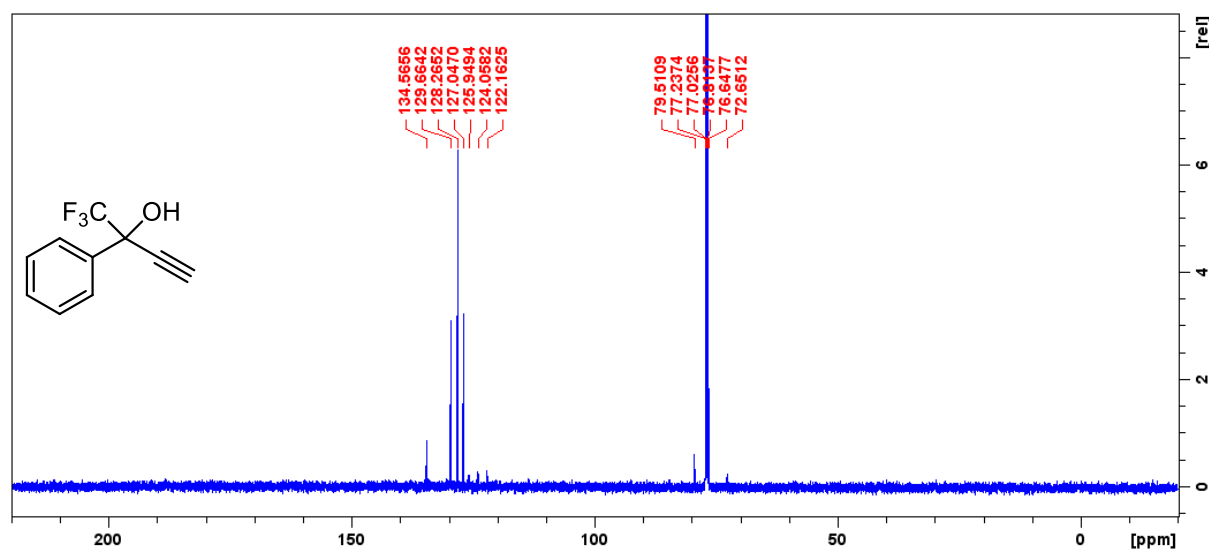


Figura A17. Espectro de massas (IE, 70 eV) do 2-(piridin-4-il)-3-butin-2-ol (**3**)

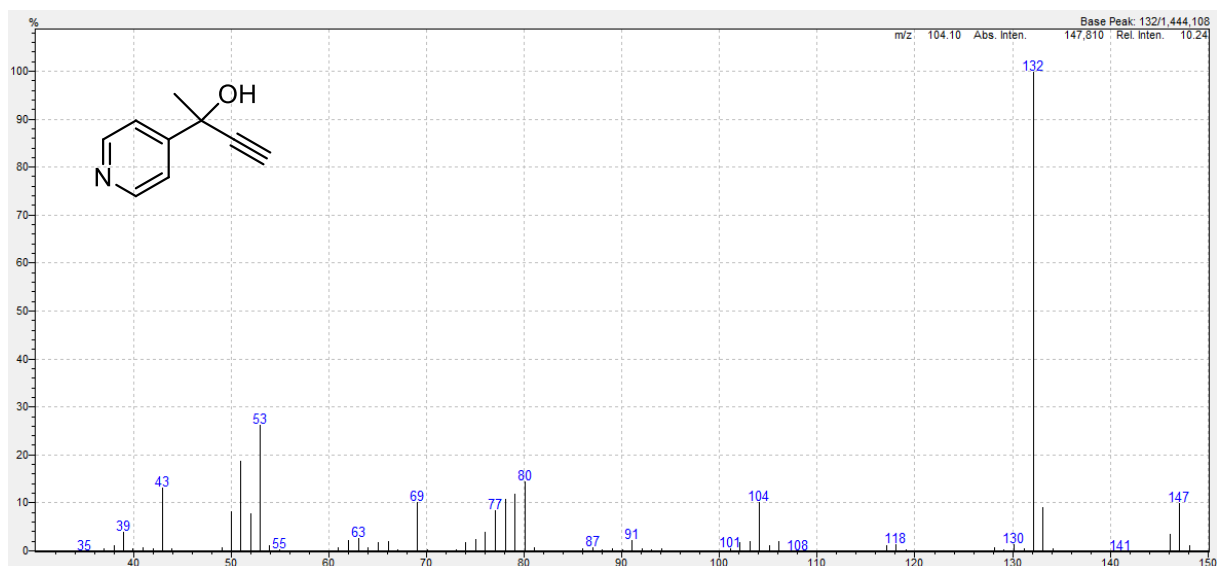


Figura A18. Espectro de absorção na região do infravermelho (ATR) do 2-(piridin-4-il)-3-butin-2-ol (**3**)

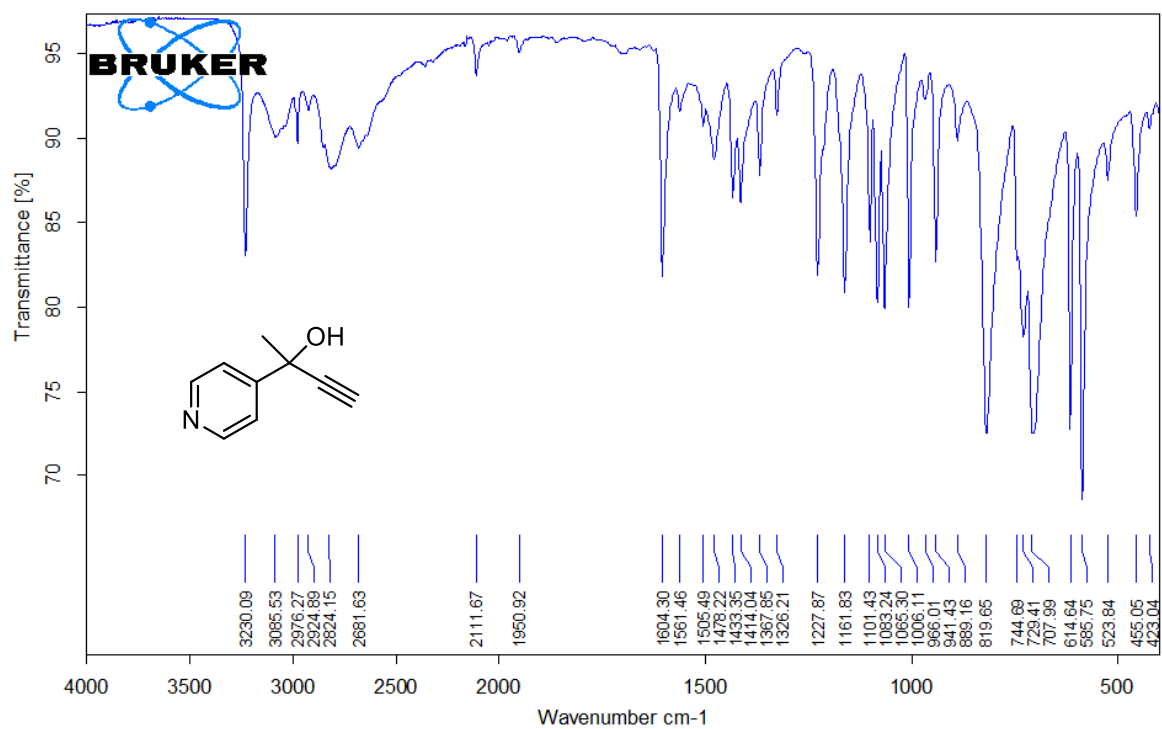


Figura A19. Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, CDCl_3) do 2-(piridin-4-il)-3-butin-2-ol (**3**)

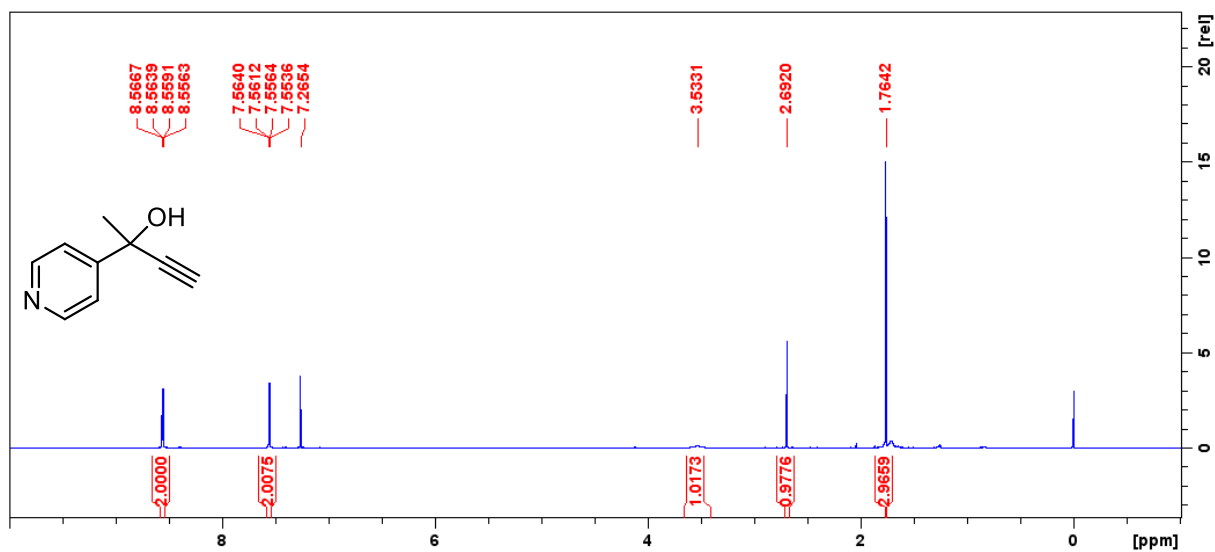


Figura A20. Espectro de RMN de ^{13}C (150,90 MHz, CDCl_3) do 2-(piridin-4-il)-3-butin-2-ol (**3**)

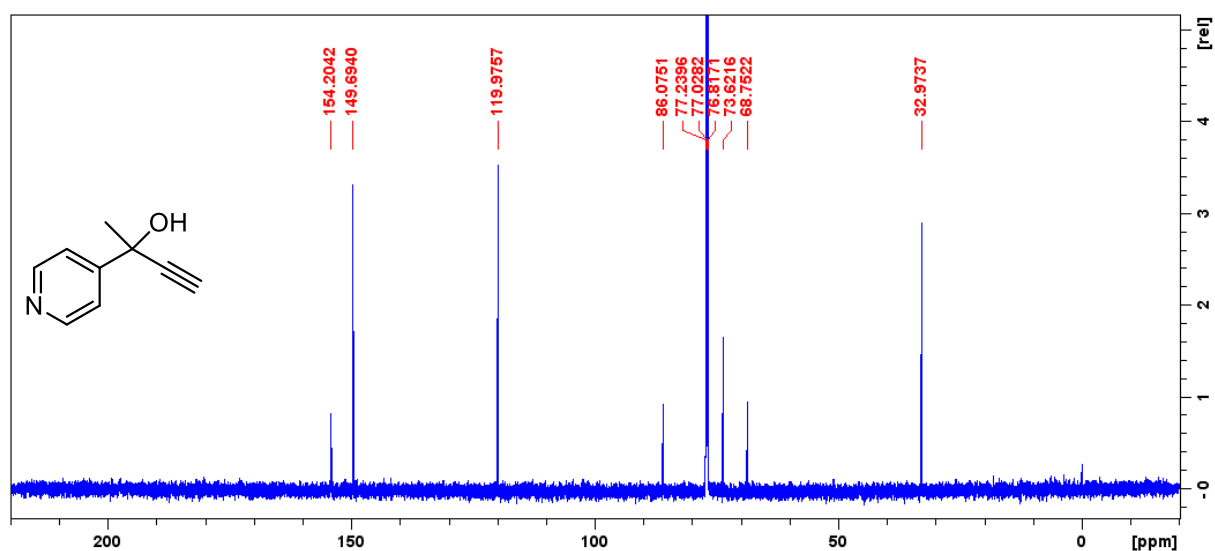


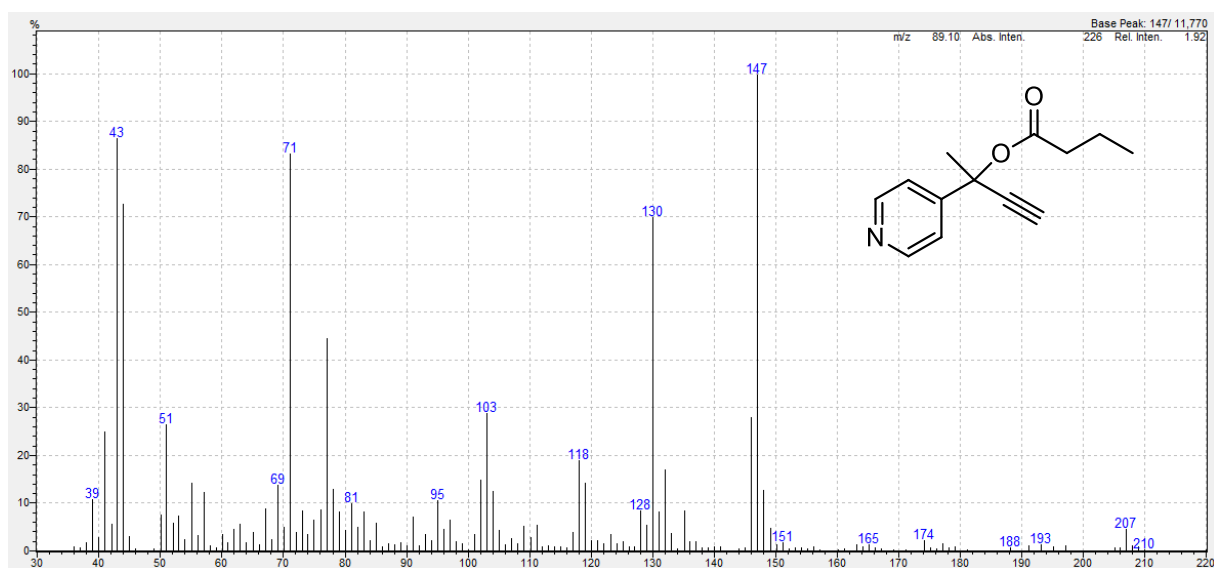
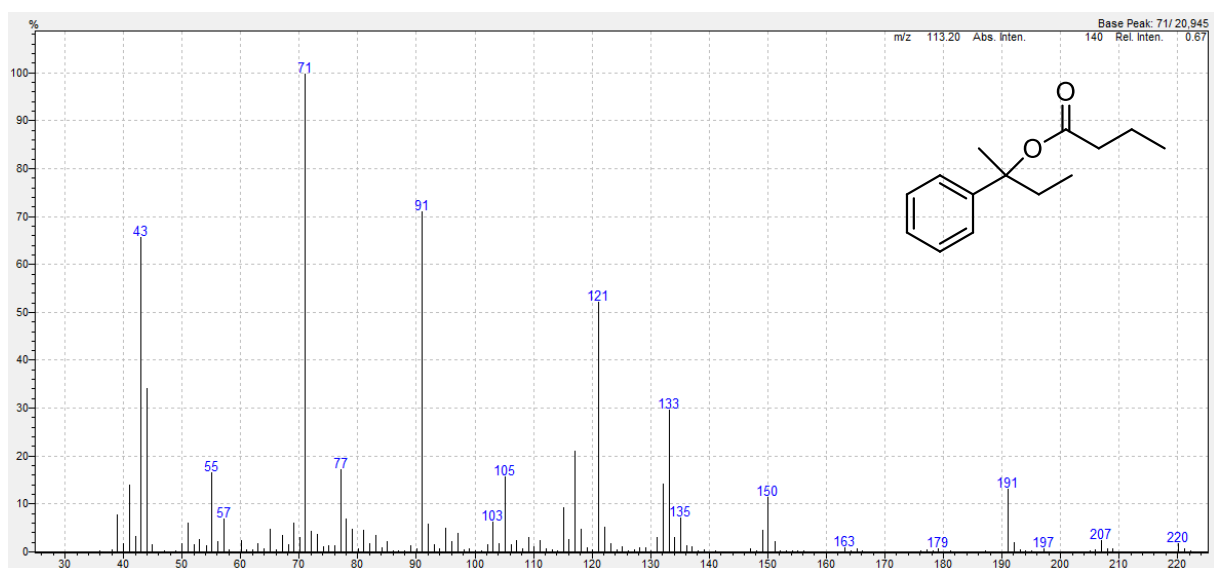
Figura A21. Espectro de massas (IE, 70 eV) do butirato de 2-(piridin-4-il)-3-butin-2-ila (**3b**)**Figura A22.** Espectro de massas (IE, 70 eV) do butirato de 2-fenil-2-butila (**4b**)

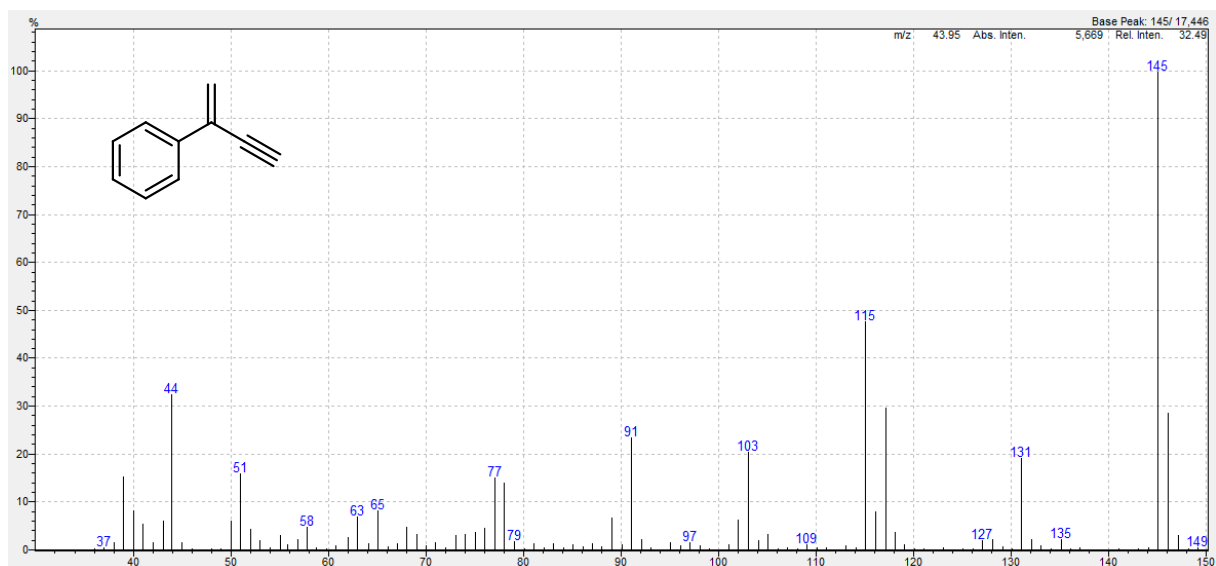
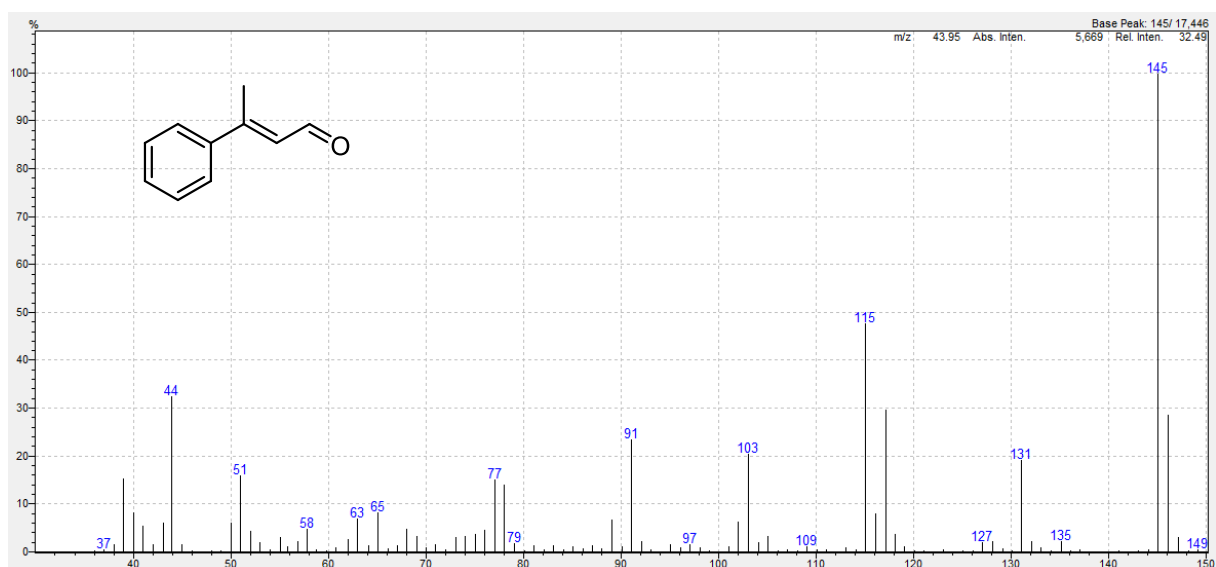
Figura A23. Espectro de massas (IE, 70 eV) do 2-fenil-1-buten-3-ino (5)**Figura A24.** Espectro de massas (IE, 70 eV) do (E)-3-fenil-2-butenal (6)

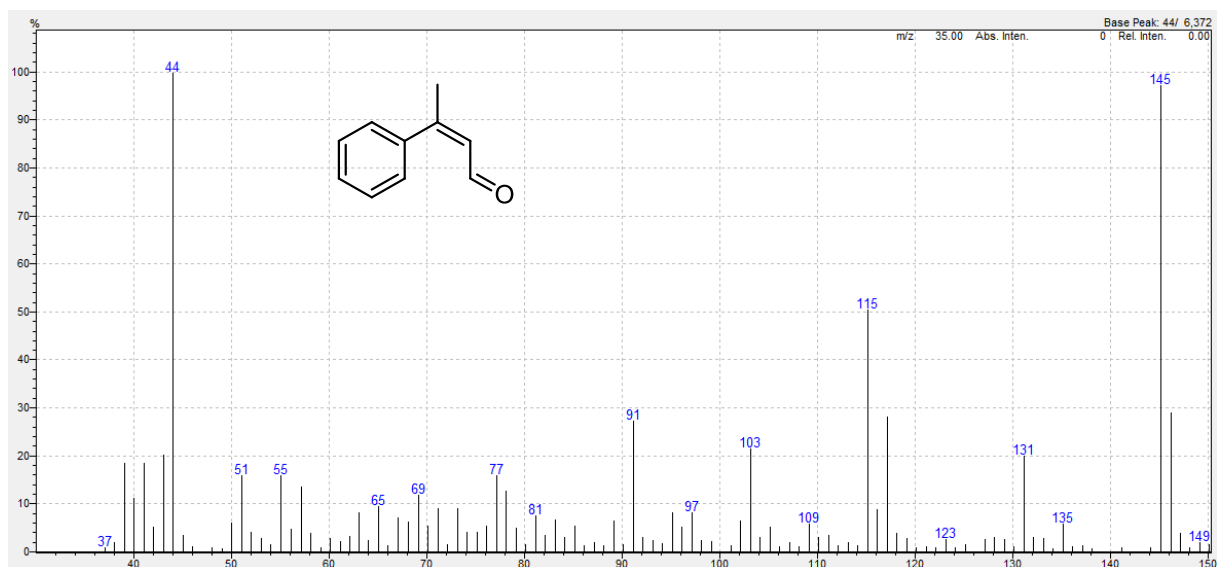
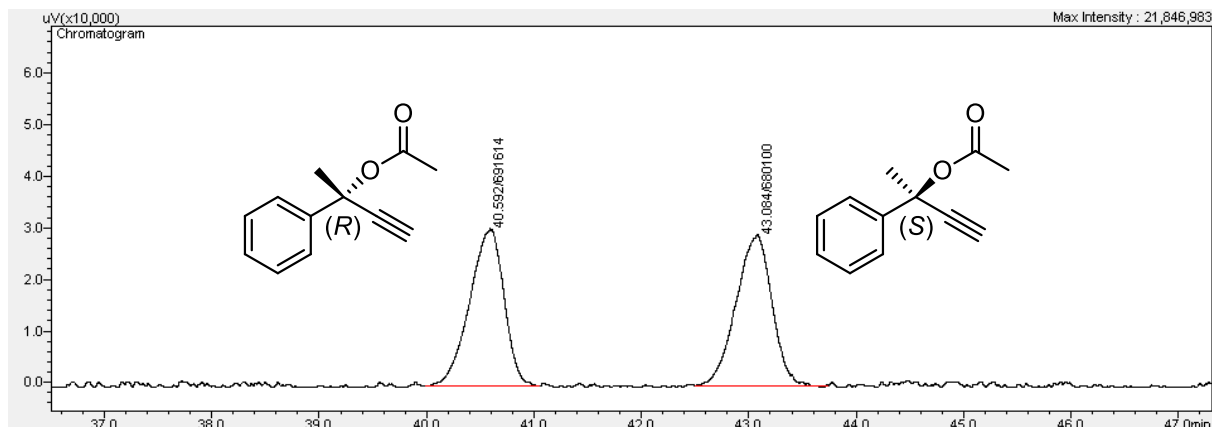
Figura A25. Espectro de massas (IE, 70 eV) do (Z)-3-fenil-2-butenal (7)**Figura A26.** Perfil de separação do par de enantiômeros do acetato de 2-fenil-3-butin-2-ila (1a)

Figura A27. Perfil de separação do par de enantiômeros do butirato de 2-fenil-3-butin-2-ila (1b)

