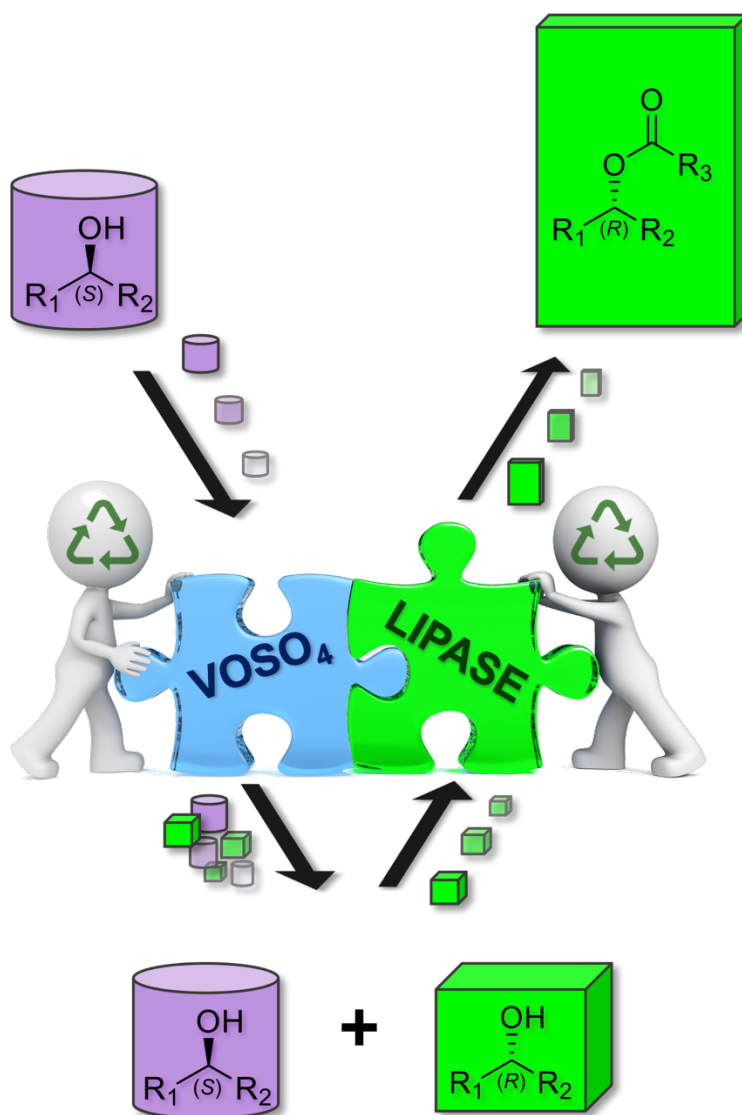


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química

Resolução Cinética Dinâmica Quimioenzimática de Álcoois



Humberto Márcio Santos Milagre

Araraquara - 2023

Universidade Estadual Paulista
Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química

Resolução Cinética Dinâmica Quimioenzimática de Álcoois

Humberto Márcio Santos Milagre

Texto apresentado ao Instituto de Química da
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
Filho – Campus de Araraquara, como parte dos
requisitos para o concurso de Livre Docência em
Química Orgânica.

Fevereiro, 2023

Dedico este trabalho aos meus queridos e amados filhotes felinos Daphne, Abel, Bruce, Tila, Léo, Fredy, Luli, Mia e Cissa.

Chuva

Você não precisa ser Positivo. Não precisa sentir-se culpado pelo medo, pela tristeza ou pela raiva. Não se para a chuva mandando que ela pare. Às vezes, é preciso apenas deixar a chuva cair, ensopar a pele. Nunca chove para sempre. E saiba que, por mais molhado que fique, você não é a chuva. Você não é os sentimentos ruins na sua cabeça. Você é a pessoa *passando* pela tempestade. A tempestade pode derruba-lo. Mas você vai voltar a ficar de pé. Agente firme.

Matt Haig

“O maior ato individual de bravura ou de loucura que alguém pode praticar é o ato de mudar. Eu era alguma coisa. Agora sou uma coisa a mais.”

Matt Haig

"Cada um de nós é, sob uma perspectiva cósmica, precioso. Se um humano discorda de você, deixe-o viver. Em cem bilhões de galáxias, você não vai achar outro como ele."

Carl Sagan

Agradecimentos

A todos os meus Orientadores, Professores e Mentores que me acompanharam nesta jornada. Seus ensinamentos estarão sempre em meu coração.

À FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais), pelos auxílios financeiros, bolsa e oportunidades concedidas.

A todas as universidades que tive oportunidade de fazer parte: Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Universidade Estadual Paulista -UNESP e Louisiana State University – LSU.

À Cíntia pelo amor, amizade, companheirismo e apoio em toda esta jornada.

A toda a comunidade do IQ - UNESP, em especial aos alunos pela convivência e aprendizado que sempre compartilhamos.

A todos os membros do Milagre Lab pela confiança, companheirismo e amizade. *Que a força esteja com vocês sempre!*

À minha Família pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

Ao querido amigo Rochel por ter catalisado a vinda para São Paulo e que sempre esteve presente mesmo que à distância. A D. Dirce e Sr. Roger por nos acolherem em Campinas.

A George Lucas, Dave Filoni, John Fraveu, J. R. R. Tolkien, Lucinda Riley, Carl Sagan, Stephen King, Arthur C. Clarke, Matt Haig por criarem histórias e mundos fantásticos que sempre me acolhem, distraem e descansam.

Sumário

1. Introdução	8
1.1 Biocatálise e a Química Verde	8
1.2 Lipases	10
1.3 Resolução cinética	13
1.4 Resolução cinética dinâmica quimioenzimática	15
1.5 Catalisador heterogêneo de vanádio para a racemização de álcoois na resolução cinética dinâmica.	17
1.6 Resolução cinética de álcoois terciários	19
1.7 Resolução cinética dinâmica de álcoois terciários	23
2. Contribuições para a área	24
2.1 Resolução cinética dinâmica quimioenzimática de álcoois secundários pelo sistema lipase/VOSO₄	24
2.2 Resolução cinética dinâmica (RCD) Quimioenzimática de álcoois terciários bicíclicos	26
2.3 Resolução cinética dinâmica de álcoois terciários em regime de fluxo contínuo.	32
2.4 Resolução cinética dinâmica (RCD) Quimioenzimática de álcoois terciários propargílicos	35
2.5 Avaliação do escopo da metodologia de Resolução cinética enzimática dos álcoois terciários propargílicos.	37
3. Perspectivas	39
4. Referências Bibliográficas	40

1. Introdução

1.1 Biocatálise e a Química Verde

Em meados da década de 1980, havia uma preocupação crescente com a grande quantidade de resíduos gerados pela indústria química. Existia claramente a necessidade de uma mudança de paradigma com relação a eficiência e a seletividade de uma reação, que se baseava principalmente nos rendimentos químicos. Se fazia crucial a avaliação da maximização do uso de matérias-primas, eliminando o desperdício e evitando o uso de produtos tóxicos e/ou perigosos. Era essencial que um processo químico mais limpo, mais eficiente e que produzisse menos resíduos.¹

Como resultado do aumento da consciência ambiental, processos mais verdes e sustentáveis eram necessários, com isto a indústria química passou a concentrar seus esforços no aumento das condições de segurança, qualidade e na minimização dos impactos ambientais de seus processos e produtos, buscando estratégias e tecnologias mais ambientalmente amigáveis sem perder a eficiência econômica.¹

A química verde, termo introduzido na década de 90, visa o uso eficiente de matéria-prima, a eliminação de resíduos e a redução do uso de reagentes e solventes tóxicos nos processos químicos.² Em 1998, Paul Anastas e John Warner publicaram os 12 princípios básicos da química verde (**Figura 1**), estes princípios se difundiram ganhando um grande reconhecimento passando a ser protagonista em diversos setores da indústria química.

A catálise é uma ferramenta que se destaca dentre os princípios da química verde por propiciar menores gastos energéticos, maior seletividade, melhor economia de átomos e redução da produção de resíduos.³ Atualmente, a química orgânica possui a sua disposição muitos catalisadores, tais como: complexos organometálicos, moléculas orgânicas, polímeros inorgânicos, enzimas, etc. Dentre essas opções, uma é atraente para o desenvolvimento de métodos de síntese orgânica mais sustentáveis e econômicos, com vantagens significativas sobre a catálise química clássica e a biocatálise. A biocatálise é definida como a conversão de substratos em um número limitado de etapas usando biocatalisadores (enzimas, microrganismos e, em alguns casos, ácidos nucleicos e anticorpos).³



Figura 1. Os 12 primeiros princípios da química verde

Dentre as opções de biocatalisadores, destacam-se as enzimas que podem ser utilizadas em síntese orgânica, seja na forma de enzimas isoladas (imobilizadas ou não) ou contidas em células (células inteiras ou extratos brutos de enzimas).⁴ As enzimas apresentam características atraentes como: biocompatibilidade e biodegradabilidade; utilizam majoritariamente meios reacionais aquosos; e, por serem compostas por aminoácidos, apresentam excelentes régio-, quimio- e enantiosseletiva e minimizar a geração de resíduos e consumo energético.²

Nas últimas três décadas, avanços extraordinários nas áreas de biologia molecular e engenharia de proteínas permitiram a descoberta e comercialização de uma ampla variedade de enzimas e a otimização de sua atividade, especificidade de substrato, seletividade e estabilidade, tornando assim a aplicação de biocatalisadores possível em várias reações químicas. Assim, a biocatálise surgiu como uma ferramenta eficaz na síntese orgânica e uma técnica economicamente viável para processos mais sustentáveis

em escala industrial, principalmente aqueles que visam a obtenção de compostos enantiomericamente puros.⁵

O uso de enzimas isoladas apresenta, geralmente, maior seletividade e facilidade na recuperação do produto ao final do processo. Dependendo da estabilidade da enzima, as condições reacionais podem ser variadas, permitindo o uso de solventes orgânicos e co-solventes, temperaturas relativamente altas e sistemas multifásicos. Entretanto, a utilização de enzimas isoladas apresenta, em alguns casos, desvantagens como: elevado custo de isolamento e purificação; necessidade de adição e regeneração de cofatores (em enzimas dependentes de cofatores); e impossibilidade de isolar algumas enzimas presentes em células.⁶

Dentre as enzimas as lipases se destacam como biocatalisadores por geralmente apresentarem alta estabilidade em meios hidrofóbicos, estabilidade em temperatura relativamente elevada, baixo custo e por possuir um amplo espectro de substratos.

1.2 Lipases

As enzimas são classificadas pela *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) (<https://enzyme.expasy.org>) de acordo com as reações que catalisam naturalmente, e são divididas em 7 classes: oxidoredutases (1), transferases (2), hidrolases (3), liases (4), isomerases (5), ligases (6) e translocases (7). Essas classes são divididas em subclasses e estas por sua vez em sub-subclasses. As lipases, por exemplo, são classificadas com o número EC 3.1.1.3, o que significa que são hidrolases (3), catalisam hidrólise de ligações de ésteres (3.1) carboxílicos (3.1.1) e são triacilglicerol hidrolases (3.1.1.3).

A reação natural catalisada por estas enzimas é a hidrólise de triglicerídeos produzindo ácidos graxos e glicerol. Devido a sua grande capacidade de hidrolisar óleos e gorduras, as lipases têm sido amplamente utilizadas na indústria de alimentos,⁷ na medicina,⁸ na produção de biocombustíveis,⁹ na indústria de detergentes¹⁰ e na indústria farmacêutica.¹¹ Além da hidrólise de triglicerídeos, as lipases apresentam uma outra característica muito importante: catalisar reações de uma vasta gama estrutural de substratos. Esta característica é denominada de promiscuidade enzimática¹² e pode ser classificada em 3 categorias: (A) promiscuidade catalítica, que é a habilidade da enzima catalisar reações não esperadas; (B) promiscuidade de substrato, que é a habilidade de

uma enzima trabalhar com substratos diferentes de seus substratos naturais e (C) promiscuidade condicional, que é a capacidade de uma enzima de trabalhar sob condições não-convencionais.

As lipases apresentam os 3 tipos de promiscuidade e alguns fatores são preponderantes para isto, como: i) não necessitam de cofatores; ii) são estáveis e ativas em solventes orgânicos e iii) aceitam uma grande variedade de substratos.¹³ A promiscuidade enzimática das lipases proporciona que ela seja utilizada como catalisador em diversas reações da síntese orgânica¹⁹ como: condensação aldólica,¹⁴ adição de Michael,¹⁵ reação de Baylis-Hillman,¹⁶ oxidação de Baeyer-Villiger,¹⁷ reação de Biginelli,¹⁸ condensação de Knoevenagel,¹⁹ reação de Hantzsch,²⁰ reação de Ugi,²¹ reação de Cannizzaro,²² reação de Mannich²³ e reações multicomponentes.²⁴

A enantiosseletividade das lipases se deve a seu sítio ativo que é formado por uma tríade catalítica composta de 3 aminoácidos: ácido aspártico, histidina e serina (Asp-His-Ser). Além da tríade catalítica, o sítio ativo é formado por uma cavidade oxianion, que ajuda a estabilizar o intermediário tetraédrico através de interações intermoleculares, e um bolsão estereosseletivo responsável pela enantiosseletividade destas enzimas.²⁵ Na **Figura 2** é apresentada, em vermelho, a tríade catalítica da lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) que é composta por Asp187-His224-Ser105. Esta numeração representa a posição dos aminoácidos na estrutura primária desta enzima.²⁵

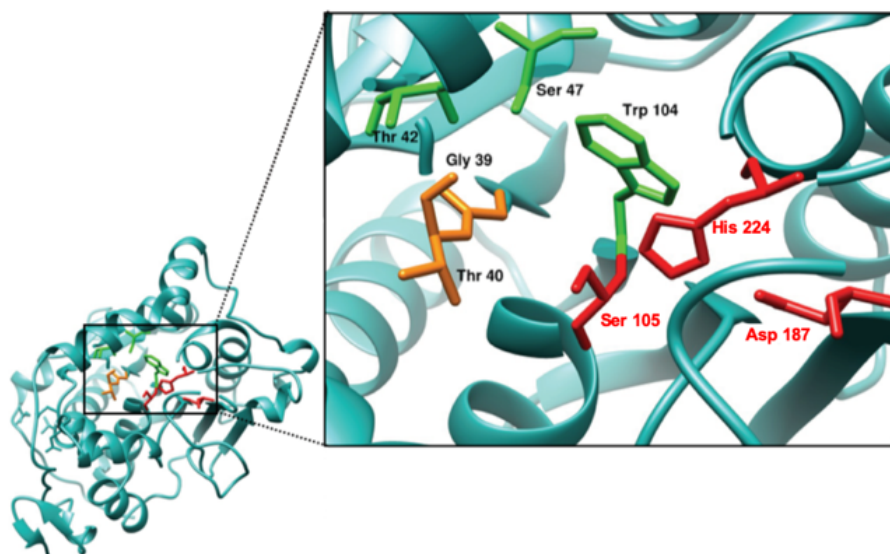


Figura 2. Tríade catalítica da lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B). Adaptado de Fajardo *et al.*²⁶

As cavidades que compõem o bolsão enantiosseletivo das lipases são distintas para cada enzima, mas de uma forma geral, existem como uma cavidade maior e outra menor (ou média). Utilizando os enantiômeros do 1-feniletanol como exemplo, a **Figura 3** apresenta as interações destes enantiômeros com as cavidades do bolsão estereosseletivo.

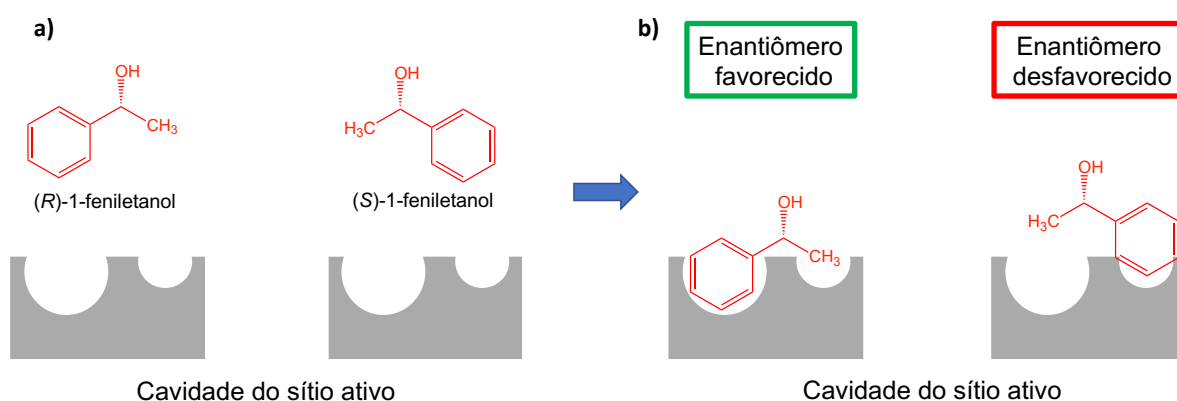
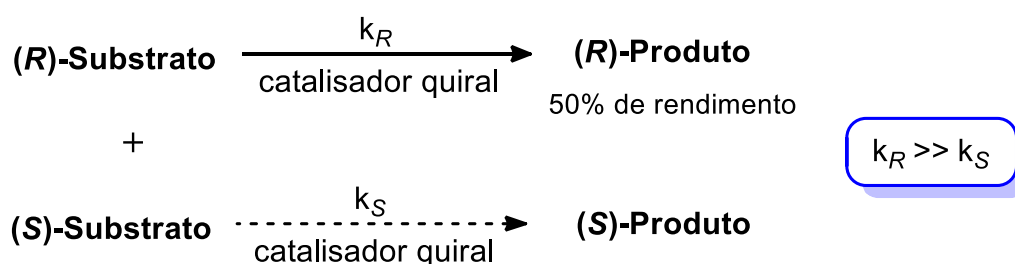


Figura 3. A) Aproximação dos enantiômeros ao bolsão enantiosseletivo do sítio ativo; b) encaixe dos enantiômeros ao bolsão enantiosseletivo do sítio ativo.

O (*R*)-1-feniletanol está representado com a hidroxila projetada para trás do plano, o maior substituinte está orientado para a esquerda (anel benzênico) e o de tamanho médio (metila) está à direita, enquanto o seu enantiômero (*S*) apresenta a disposição espacial contrária (**Figura 3a**). Como resultado, o (*R*)-1-feniletanol se encaixará com maior eficiência ao sítio ativo (**Figura 3b**), e por isso a formação do produto a partir deste substrato será mais favorecida durante a reação, ou seja, a reação com este enantiômero apresentará uma velocidade maior do que a reação com o outro enantiômero. A configuração favorecida é a que está com a hidroxila orientada para trás do plano, o grupo maior está à esquerda e o grupo de tamanho médio (ou menor) está orientado à direita. Esta observação sistemática foi elaborada empiricamente por Kazlauskas, e atualmente é conhecida como de Regra de Kazlauskas.²⁷ Como cada enantiômero reagem em um velocidades distintas, as lipases são muito empregada na resolução de racematos.

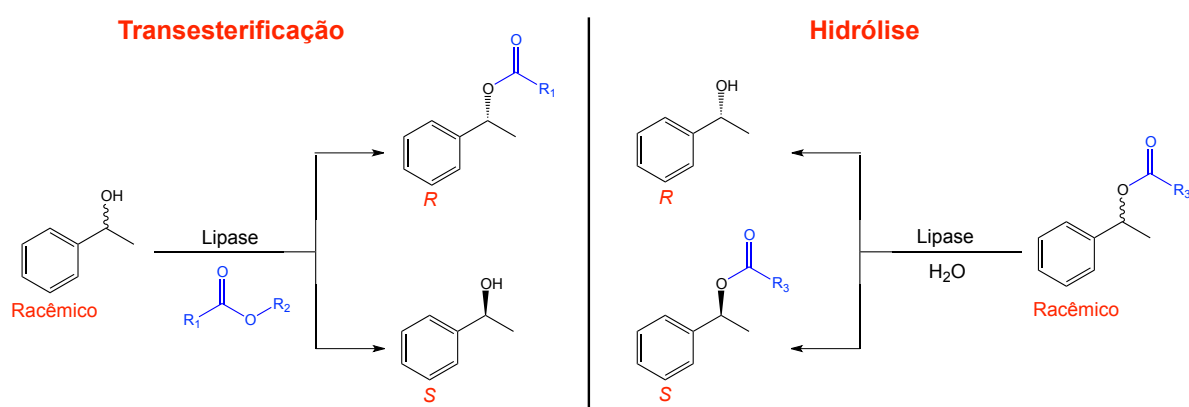
1.3 Resolução cinética

Na resolução cinética (RC), um dos enantiômeros de uma mistura racêmica é convertido ao produto em uma velocidade maior, permitindo a separação do produto quiral e do enantiômero que não reagiu por técnicas tradicionais de purificação (**Esquema 1**).²⁸



Esquema 1. Resolução cinética (RC) de um racemato.

Os métodos mais utilizados para resolução cinética de álcoois secundários são a transesterificação e a hidrólise de ésteres catalisadas enantiosseletivamente pela enzima lipase. No **Esquema 2** estas metodologias são ilustradas utilizando como substrato para a transesterificação o 1-feniletanol e para a hidrólise o seu éster correspondente.



Esquema 2. Enantiocomplementaridade das reações de transesterificação e hidrólise enantiosseletivas catalisadas por lipase.

Analisando o **Esquema 2** verificamos que tanto a transesterificação quanto a hidrólise apresentam uma seletividade com relação ao enantiômero *R*, e isto torna estas reações complementares para a resolução de álcoois secundários. Quando a enantiosseletividade da transesterificação e hidrólise são altas ($E > 100$), os álcoois e os ésteres serão obtidos com alta pureza enantiomérica. Portanto, a aplicação das lipases como catalisadores para a resolução é uma alternativa atraente para a obtenção de álcoois secundários enantiomericamente puros.

Na **Figura 4** é representado o mecanismo da reação de transesterificação do 1-feniletanol utilizando o acetato de vinila como doador de acila e catalisada pela enzima lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B).

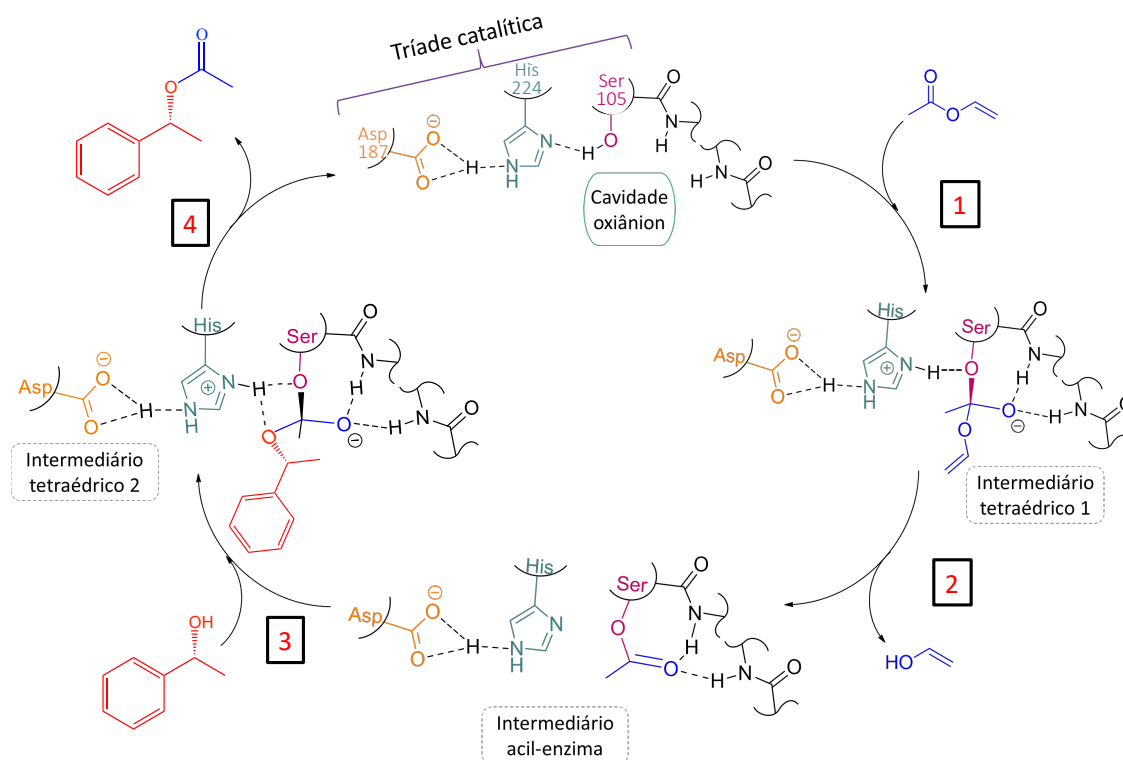


Figura 4. Mecanismo da reação de transesterificação do 1-feniletanol catalisada pela enzima CAL-B.

Na primeira etapa, através de um ataque nucleofílico do oxigênio da cadeia lateral da Ser-105, o acetato de vinila se liga ao sítio ativo da enzima, formando o intermediário tetraédrico 1. Na etapa 2, a carbonila do intermediário tetraédrico é restaurada, gerando assim o intermediário acil-enzima e liberando o etanol. Na etapa 3, o intermediário acil-

enzima sofre um ataque nucleofílico do *R*-1-feniletanol, que resulta na formação do intermediário tetraédrico 2. A **Figura 5** representa o *R*-1-feniletanol ligado ao bolsão estereosseletivo do sítio ativo. Na etapa 4, a carbonila é restaurada liberando a cadeia lateral da Ser-105, que abstrai o próton da His-224 e restaura o catalisador, enquanto o éster formado é liberado do sítio ativo.

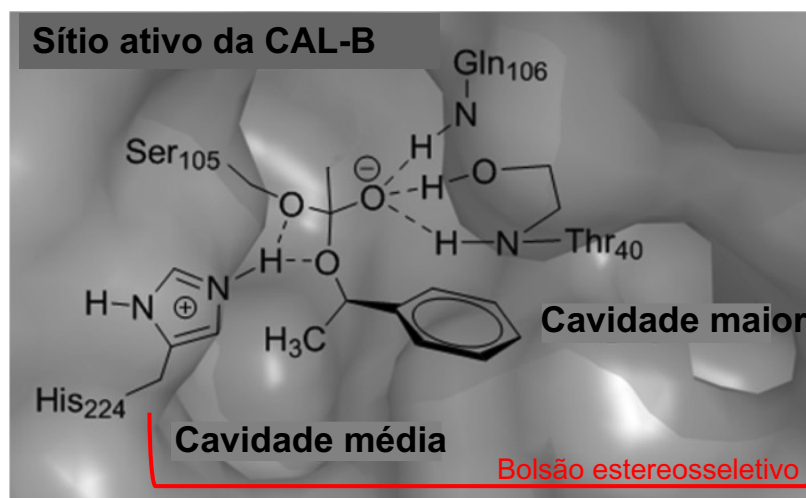


Figura 5. Encaixe do *R*-1-feniletanol no sítio ativo da CAL-B. Adaptado de Park et al.²⁵

O grande interesse na utilização de lipases em síntese orgânica deve-se à sua disponibilidade comercial, a sua alta enantiosseletividade e da sua promiscuidade enzimática. Estas enzimas são disponíveis comercialmente tanto na forma livre como imobilizada e possuem um custo relativamente baixo. A alta enantiosseletividade dessas enzimas permite seu uso em reações de resolução cinética de uma ampla gama de substratos para formação de compostos enantiomericamente puros²⁹.

1.4 Resolução cinética dinâmica quimioenzimática

A RC possui como característica intrínseca a obtenção do enantiômero de interesse com um rendimento teórico máximo de 50%. Com o objetivo de superar essa limitação, houve uma evolução desta metodologia para a resolução cinética dinâmica (RCD), onde se pode, em princípio, obter um rendimento quantitativo de um dos

enantiômeros através da combinação da etapa de resolução enantiosseletiva com uma etapa de racemização *in situ* do enantiômero menos reativo. A **Figura 6** representa a RCD do 1-feniletanol catalisada pela lipase e um catalisador para a racemização.³⁰

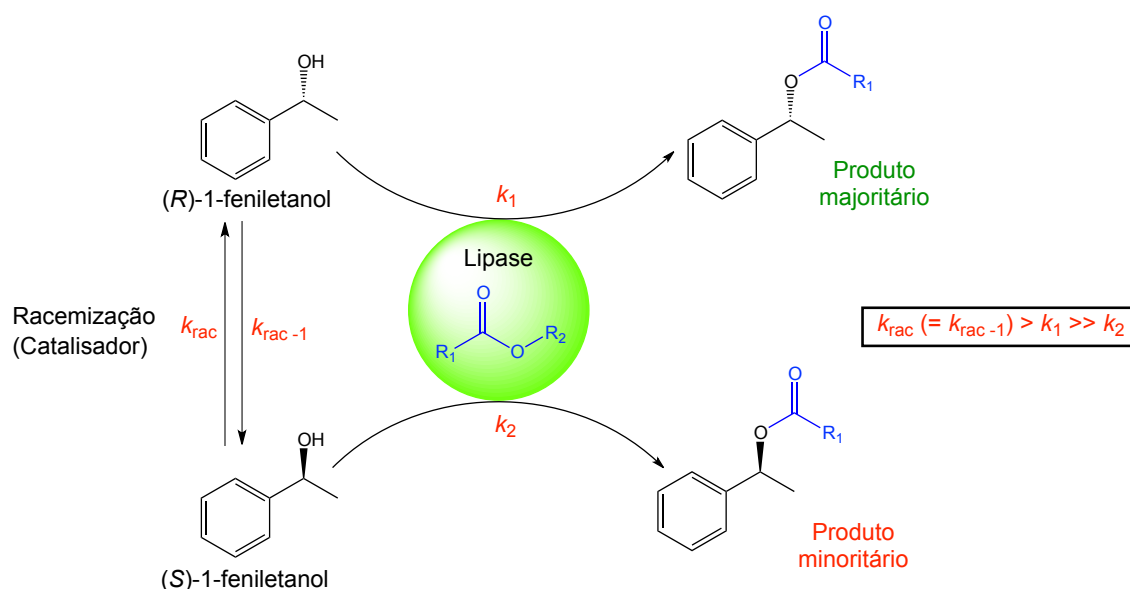


Figura 6. Representação esquemática da resolução cinética dinâmica (RCD).

Um protocolo ideal de RCD necessita que a reação de resolução cinética apresente alta enantiosseletividade, seja irreversível ($k_1 \gg k_2$) e a velocidade da reação de racemização seja igual ou superior à velocidade da reação de resolução cinética ($k_{rac} \geq k_1$). Além disso, os dois processos – resolução e racemização – devem ser compatíveis, ou seja, devem ocorrer nas mesmas condições reacionais e o produto quiral obtido não pode ser racemizado nas condições reacionais.^{28a,31} Quando esses requisitos são alcançados, uma resolução cinética dinâmica pode fornecer o produto com rendimento teórico máximo de 100% e com excesso enantiomérico superior àquele obtido através da resolução cinética convencional.

No desenvolvimento de metodologias de RCD destaca-se o uso de catalisadores de metais de transição como agentes de racemização, em uma estratégia denominada resolução cinética dinâmica quimioenzimática.

A racemização, etapa chave da RCD, pode ser obtida por diversas reações,³² entre elas, podemos citar: i) racemização térmica; ii) catalisada por base ou ácido; iii) via base

de Schiff; iv) via reação redox e vii) via radicais. O grande desafio é combinar a etapa de racemização com uma reação catalisada por enzima que, geralmente, opera sob condições reacionais mais brandas que o catalisador químico.

A racemização de álcoois nestas metodologias ocorre através de uma etapa de desidrogenação-hidrogenação (oxidação-redução). Um protocolo bem-sucedido foi desenvolvido por Backvall e colaboradores utilizando o catalisador de Shvo, combinado com a lipase B imobilizada de *Candida antarctica* (CAL-B, Novozyme 435) para a resolução de 1-feniletanol e outros álcoois benzílicos.³³ Os excelentes resultados desse protocolo evidenciaram o potencial dos complexos metálicos como agentes de racemização em sistemas de RCD enantiosseletiva.

Outra estratégia muito utilizada para a racemização de álcoois é a racemização catalisada por ácido através da formação de um carbocátion. Esta metodologia pode ser realizada utilizando resinas ácidas (Amberlite, Amberlyst e Dowex)³⁴, silicatos (sepiolita³⁵ e zeolita)³⁶ e catalisadores a base de vanádio.³⁷

Em 2018 o grupo do Prof. Bäckvall reportou pela primeira vez a racemização de álcoois terciários via catálise ácida.^{34b} Neste estudo, foram utilizadas resinas ácidas como catalisadores na racemização de (*S*)-álcoois terciários propargílicos em meio aquoso. Entretanto, os melhores resultados foram obtidos quando a reação é realizada em água e este fator impossibilita a aplicação deste protocolo de racemização em metodologias de RCD catalisada por lipase via transesterificação enantiosseletiva.

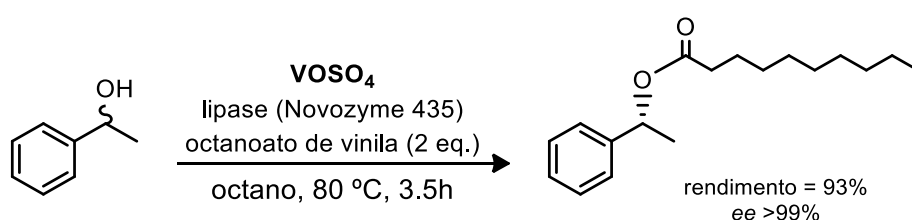
Todas estas metodologias apresentaram resultados promissores para a resolução cinética dinâmica de álcoois secundários.

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

Na última década, foram publicados alguns protocolos de RCD de álcoois benzílicos e alílicos empregando catalisadores a base de vanádio como agentes de racemização. Em estudos de Akai e colaboradores,³⁸ o complexo de oxovanádio VO(OSiPh₃)₃ foi capaz de racemizar álcoois alílicos via transposição-1,3 da hidroxila sob condições reacionais brandas, sendo compatível com as lipases B de *Candida antarctica* (Novozyme 435), *Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas fluorescens*. O complexo de oxovanádio também foi utilizado suportado em sílica mesoporosa de modo a transformá-

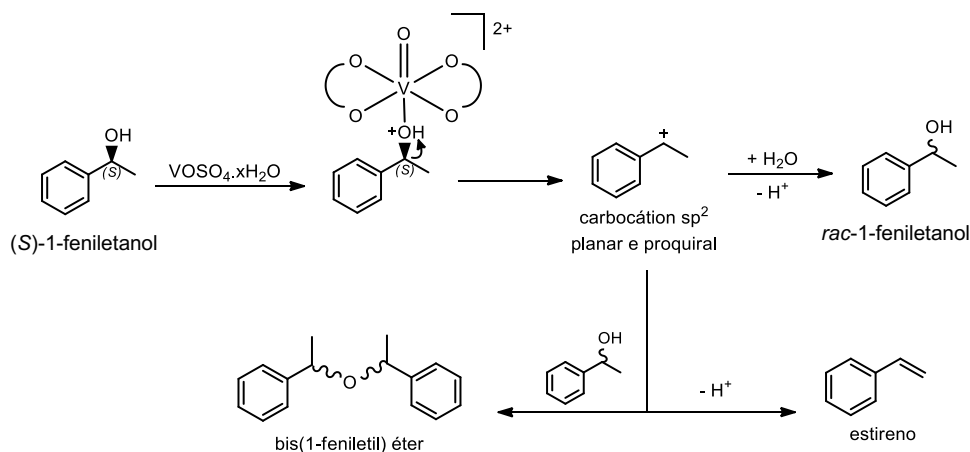
lo em um catalisador heterogêneo, o que permitiu o seu reuso em mais de 6 ciclos reacionais.³⁹

Em 2007, Wuyts e colaboradores reportaram o uso do sulfato de vanadila (VOSO_4) como catalisador heterogêneo na RCD de *rac*-1-feniletanol (**Esquema 3**).⁴⁰ Esse composto, um sólido cristalino de baixo custo, baixa toxicidade e disponível comercialmente,⁴¹ foi capaz de racemizar o substrato em menos de duas horas, em um mecanismo via a formação de um carbocátion. Entretanto, apesar da excelente atividade e custo-benefício deste catalisador e da possibilidade de seu reuso, este sistema requer altas temperaturas, fator limitante para sua aplicabilidade com diferentes lipases.



Esquema 3. RCD de *rac*-1-feniletanol catalisada por Novozyme 435 e VOSO_4 .

A racemização utilizando o sulfato de vanadila (VOSO_4) ocorre via um mecanismo de adição-eliminação (**Esquema 4**) que se inicia pela coordenação do complexo de oxovanádio à hidroxila, seguido de eliminação da hidroxila para formação de carbocátion como intermediário. A adição subsequente de uma molécula água ao carbocátion ocorre sem estereosseletividade, levando à racemização do álcool. Entretanto, o carbocátion também pode reagir com outra molécula de 1-feniletanol, levando a formação do bis(1-feniletil)-éter, ou sofrer desprotonação para formação de estireno.³⁶



Esquema 4. Racemização de (*S*)-1-feniletanol com VOSO_4 via catálise ácida.

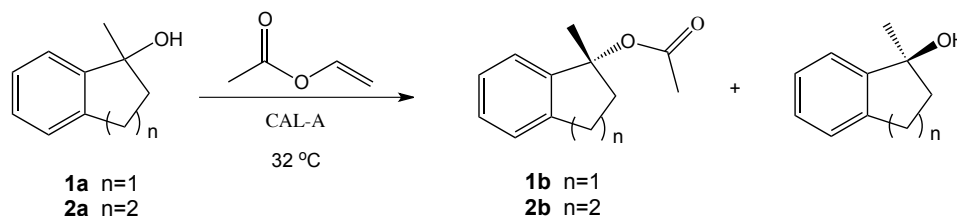
1.6 Resolução cinética de álcoois terciários

A resolução cinética de álcoois terciários pode ser realizada por via química ou enzimática e apenas um seletivo grupo de substratos foi estudado. Com relação as resoluções químicas podemos citar os trabalhos baseados na resolução de 3-hidróxi-3-oxindóis substituídos^{42a,c,d} e álcoois propargílicos terciários.^{42b} As resoluções enzimáticas mais estudadas se baseiam principalmente em álcoois propargílicos^{43b,c,e,f,j} e álcoois benzílicos cíclicos.⁴³ⁿ

A aplicação de hidrolases (lipases e esterases) para a resolução cinética de álcoois terciários se baseia nas reações enantiosseletivas de transesterificação e hidrólise de ésteres. Em 2002, o grupo do Prof. Bornscheuer realizou uma triagem utilizando 25 lipases disponíveis comercialmente e os melhores resultados para a resolução foram obtidos pelas enzimas lipase A de *Candida antarctica* (CAL-A) e lipase de *Candida rugosa* (CRL).⁴⁴ Esta triagem foi realizada através da hidrólise enantiosseletiva de ésteres de álcoois terciários.

Além da hidrólise enantiosseletiva, a enzima CAL-A apresentou bons resultados para a transesterificação enantiosseletiva de álcoois benzílicos cíclicos, **Tabela 1**.⁴³ⁿ Os melhores resultados foram obtidos utilizando a enzima imobilizada na forma de agregados, CLEA (Cross-Linked Enzyme Aggregate). O efeito da imobilização foi bem pronunciado onde a enzima CAL-A CLEA apresentou uma velocidade de reação ~ 3 vezes maior que a enzima livre.

Tabela 1. Resolução cinética de álcoois terciários benzílicos cíclicos através de transesterificação enantiosseletiva mediada pela enzima CAL-A.



Substrato	Enzima	Tempo (h)	Conversão (%)	ee _{produto} (%)	E
1 ^a	CAL-A CLEA	72	20	71	7
2 ^a	CAL-A	144	20	99	253
2 ^a	CAL-A CLEA	48	25	91	29

A lipase CAL-A também apresentou um resultado bem interessante para a resolução cinética de álcoois terciários propargílicos através da transesterificação enantiosseletiva, **Tabela 2**. Neste estudo a lipase foi utilizada na forma imobilizada em 2 suportes: resina aniônica (C1) e polipropileno (Accurel-EP-100).⁴⁵ O produto **4** foi obtido com 35% de conversão, $ee = 94\%$ e $E = 65$, utilizando a CAL-A imobilizada em Accurel-EP-100 em um tempo reacional menor quando comparado com a CAL-A-C1.

Tabela 2. Resolução cinética de álcoois terciários propargílicos através de transesterificação enantiosseletiva mediada pela enzima CAL-A.

Reaction scheme: 3 (1-phenyl-2-methyl-3-butyn-1-ol) reacts with vinyl acetate in the presence of CAL-A in isooctane at 20 °C to produce 4 (a mixture of enantiomers of 1-phenyl-2-methyl-3-butyn-1-yl acetate) and an enantiomer of 3.

Enzima	Tempo (h)	Conversão (%)	ee_{produto} (%)	E
CAL-A-C1	144	9,3	91	22
CAL-A-EP-100	48	35	94	65

Além destas lipases, duas hidrolases extraídas de porco apresentam atividade frente a álcoois terciários. A lipase de pâncreas de porco (PPL) foi utilizada na síntese de precursores de vários fungicidas através da hidrólise enantiosseletiva dos racematos em meio aquoso^{43a} e a esterase de fígado de porco (PLE) foi utilizada na resolução de ésteres quinuclidínicos.^{43a}

Devido ao número reduzido de enzimas ativas, foi realizado um estudo da relação estrutura-função e pôde ser observado que a atividade destas enzimas com relação aos álcoois terciários está associada a região do oxianion do sítio ativo. Esta região é responsável pela estabilização do intermediário tetraédrico na hidrólise de ésteres (**Figura 7^a**).⁴⁴ Na maioria das lipases e esterases, uma glicina altamente conservada seguida de um resíduo hidrofóbico volumoso (denominado de X) está presente nesta região. O grupo carbonílico do esqueleto peptídico desta porção está direcionado para a hidroxila do intermediário tetraédrico (círculo vermelho na **Figura 7^a**) impedindo a ligação de álcoois terciários. Na **Figura 7b** está representado o sítio ativo de enzimas das subclasses da superfamília de α / β -hidrolases, que são denominadas GGG(A)X por possuírem um sítio ativo mais amplo com uma porção contendo três glicinas ou duas glicinas e uma alanina seguido por um resíduo volumoso X.⁴⁶ As lipases e esterases da

classe GGG(A)X são capazes de hidrolisar ésteres de álcoois terciários com atividade moderada a muito boa.⁴⁷

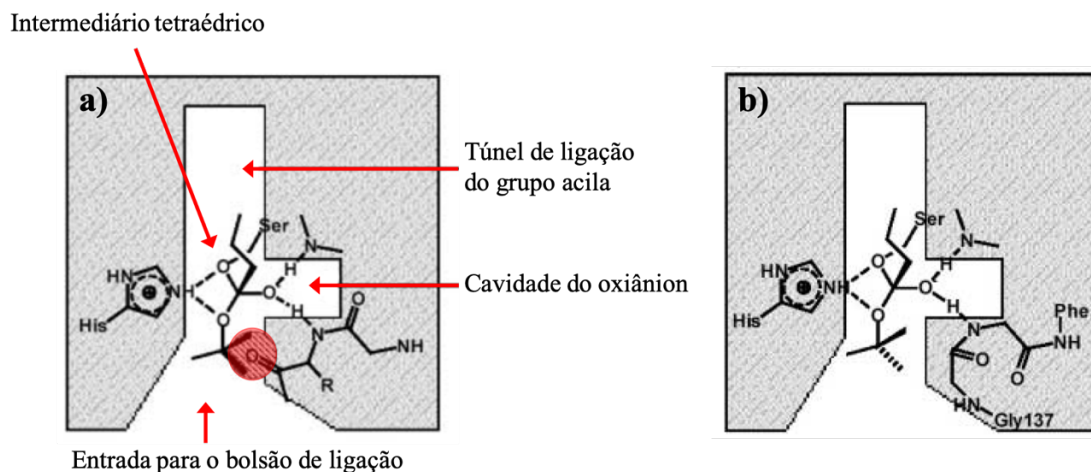


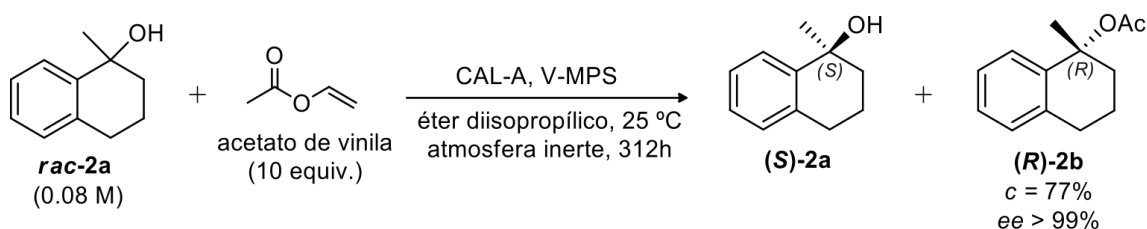
Figura 7. A) Representação esquemática do sítio ativo de hidrolases do tipo GX. b) Representação esquemática do sítio ativo de hidrolases do tipo GGG(A)X. Adaptado de Henke et al.⁴⁴

Com relação às lipases comerciais capazes de realizar a resolução de álcoois terciários, as lipases CRL e a PPL possuem em seu sítio ativo a porção GGGX, porém a CAL-A possui sequência primária e estrutura tridimensional consideravelmente diferentes das outras enzimas α/β -hidrolases conhecidas. Foi sugerido que um resíduo de ácido aspártico contribui para a estabilização do intermediário tetraédrico na cavidade do oxianion e que a enzima não pode ser classificada como pertencente à classe GX ou à GGG(A)X e apresenta uma configuração completamente diferente.⁴⁸ Portanto, estes fatores devem ser avaliados para a triagem de novas lipases e esterases que possam realizar a resolução de álcoois terciários, mas não é um fator de exclusividade para a atividade em álcoois terciários.

O grupo do Prof. Bornscheuer realizou uma modificação nas enzimas com o objetivo de aumentar as propriedades catalíticas frente aos álcoois terciários. O design racional de proteínas foi realizado para a esterase BS2 de *Bacillus subtilis* e apresentou resultados relevantes, **Tabela 3**.⁴⁹

1.7 Resolução cinética dinâmica de álcoois terciários

Em janeiro de 2020, o grupo do Prof. Akai publicou o primeiro artigo de uma RCD quimioenzimática de um álcool terciário utilizando o catalisador $\text{O}=\text{V}(\text{OSiPh}_3)_3$ imobilizado em sílica mesoporosa (V-MPS) como agente de racemização e a lipase CAL-A como biocatalisador.⁵¹ Neste artigo foi avaliado o potencial do complexo de oxovanádio V-MPS na racemização da (*S*)-1-hidroxi-1-metiltetralina utilizando o acetato de vinila como doador de acila, obtendo após 13 dias de reação, o produto acetilado com 77% de rendimento e *ee* acima de 99% (**Esquema 5**). Entretanto, esta conversão só foi obtida com adições sequenciais de novas porções dos catalisadores (CAL-A e V-MPS), devido a desativação da CAL-A durante o processo.⁵¹ Dessa maneira, ainda é necessário maiores esforços no desenvolvimento de um protocolo robusto de RCD de álcool terciário, sendo este o objetivo e o desafio deste projeto de pesquisa.



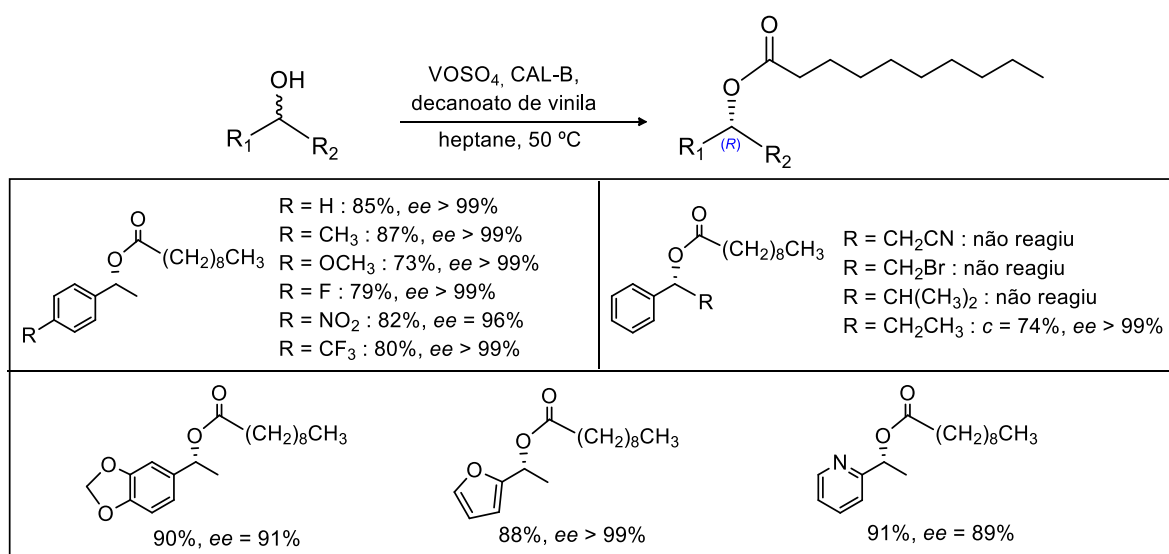
Esquema 5. Primeira RCD quimioenzimática de um álcool terciário.

2. Contribuições para a área

2.1 Resolução cinética dinâmica quimioenzimática de álcoois secundários pelo sistema lipase/VOSO₄

Para que uma RCD quimioenzimático seja eficiente, o sistema deve operar em uma condição reacional onde os dois catalisadores estejam ativos e sejam compatíveis. Porém estes que catalisadores podem exigir condições de reação específicas que não sejam compatíveis. Os Complexos metálicos, como rutênio, irídio, paládio e ferro, são agentes de racemização úteis, no entanto, a maioria destes catalisadores é custo elevado, não são ecologicamente adequados, e em alguns casos requerem condições prejudiciais às enzimas, como altas temperaturas ou presença de bases fortes. Portanto, um esforço substancial tem sido dedicado ao desenvolvimento de catalisadores de racemização biocompatíveis e mais ambientalmente benignos, como resinas ácidas, zeólitas e compostos de vanádio.

O nosso grupo de pesquisa realizou um estudo minucioso sobre a RCD quimioenzimática de álcoois benzílicos e seus derivados utilizando o VOSO₄ para a etapa de racemização e a enzima lipase para a etapa de transesterificação enantiosseletiva.⁵² Neste estudo, foi desenvolvido um protocolo robusto e ambientalmente amigável para a RCD de álcoois secundários aromáticos e heteroaromáticos obtendo-se altas conversões, altos valores de *ee* e, mais importante, alta seletividade, **Esquema 6**.



Esquema 6. Resultados das reações de RCD quimioenzimática dos álcoois secundários.

A reciclabilidade do sistema CAL-B/VOSO₄ foi investigada pela primeira vez, e este sistema catalítico permaneceu ativo por 5 Ciclos de RCD. A diminuição da conversão após o quinto ciclo poderia estar relacionado a uma incompatibilidade entre CAL-B e VOSO₄ devido ao tempo de contato prolongado ou uma incompatibilidade entre o VOSO₄ e o doador de acila.

Para entender melhor essa limitação, avaliamos a reciclabilidade da CAL-B na RC do (*rac*)-1-feniletanol na ausência do catalisador de racemização, sendo que a lipase permaneceu ativa e enantiosseletiva mesmo após 6 ciclos. Além disso, avaliamos o desempenho do VOSO₄ na racemização de (*S*)-1-feniletanol na presença de decanoato de vinila. O catalisador permaneceu altamente ativo na presença do doador de acila mesmo após 5 ciclos de reação, reproduzindo as observações descritas anteriormente. Esses resultados mostraram que a CAL-B e o VOSO₄ são estáveis e permanecem ativos por vários ciclos quando não estão no mesmo sistema de reação. No entanto, durante os ciclos de RCD, os catalisadores perdem gradativamente seu desempenho devido à sua incompatibilidade mútua.

Para aumentar ainda mais a reciclagem do sistema, os catalisadores foram compartimentalizados através da separação física do VOSO₄ da CAL-B, empregando um tubo (de teflon ou polipropileno, **Figura 8**), que permitiu 8 ciclos de reação sem perda de desempenho ou seletividade, na **Figura 9** é apresentada o sistema CAL-B/VOSO₄ para RCD. Além de impedir a perda de desempenho dos catalisadores devido a interação entre eles, o tubo facilitou a remoção dos catalisadores durante a reação e sua reutilização. Além disso, essa metodologia provou ser robusta para um experimento de escalonamento de 20 vezes.

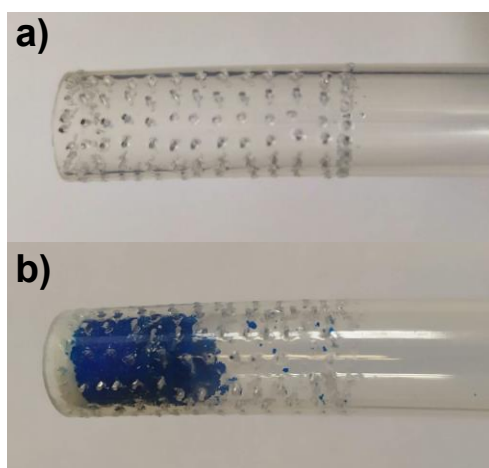


Figura 8. a) O tubo de polipropileno perfurado. b) Dispositivo adaptado (com VOSO₄) para compartimentalização em reações DKR.

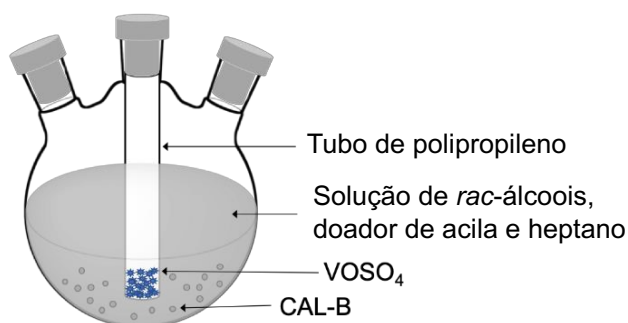
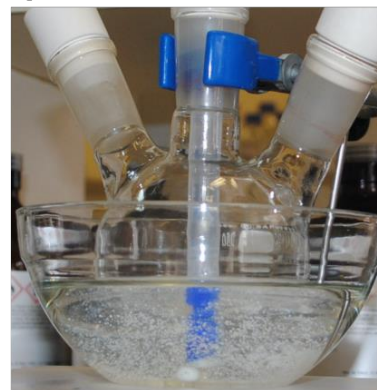
a)**b)**

Figura 9. **A)** Representação esquemática da configuração da reação RCD com compartimentalização dos catalisadores; **b)** Reação RCD: tubo com VOSO₄ em contato com o meio reacional contendo substrato (álcool sec racêmico), decanoato de vinila (doador de acila), CAL-B imobilizado e heptano.

Este trabalho chamou a atenção da empresa sueca SpinChem que nos procurou para desenvolvermos um sistema de compartimentalização em parceria, esta colaboração se iniciou em 2022 e está bem promissora.

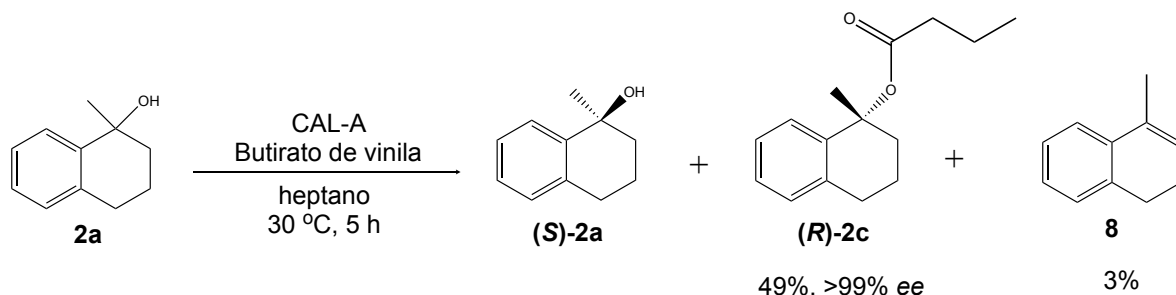
Como fruto deste trabalho em 2020 aprovamos o Projeto FAPESP Regular “Resolução cinética dinâmica quimioenzimática de álcoois terciários.” Onde aplicamos o sistema lipase/VOSO₄ para a RCD Quimioenzimática de álcoois terciários.

2.2 Resolução cinética dinâmica (RCD) Quimioenzimática de álcoois terciários bicíclicos

Iniciamos o estudo da RCD Quimioenzimática de álcoois terciários com o álcool terciário bicíclico 1-metil-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-ol (**2a**). Avaliamos inicialmente as duas etapas separadamente a resolução cinética utilizando a enzima CAL-A e a racemização utilizando o VOSO₄ e posteriormente avaliamos a RCD, combinando as duas reações.

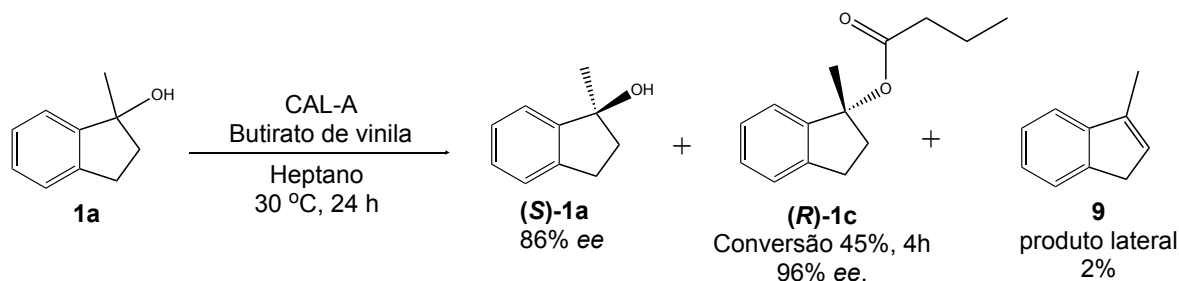
Para a otimização da RC, avaliamos os seguintes parâmetros: solventes orgânicos, doador de acila e a razão enzima/substrato. Assim, fazendo modificações simples dos parâmetros da reacionais (butirato de vinila como doador de acila, heptano ou

isooctano como solvente a 30 °C e 2:1 m/m de enzima), alcançamos um protocolo otimizado da RC para um substrato desafiador em taxas de reação que poderiam ser compatíveis com a rápida racemização catalisada por VOSO₄, **Esquema 7**.



Esquema 7. Resolução cinética enzimática de **8**.

O protocolo desenvolvido de RC também foi testado para outro substrato o 1-metil-2,3-di-hidro-1H-inden-1-ol racêmico (**1a**), que forneceu (*R*)-**1c** com 45% de conversão e 96% de *ee* em apenas 4 horas (**Esquema 8**). Este é o melhor resultado já relatado na literatura para KR de **1a** em termos de taxa de reação, conversão e valores de enantiosseletividade, reforçando a otimização obtida utilizando o butirato de vinila como doador de acila.

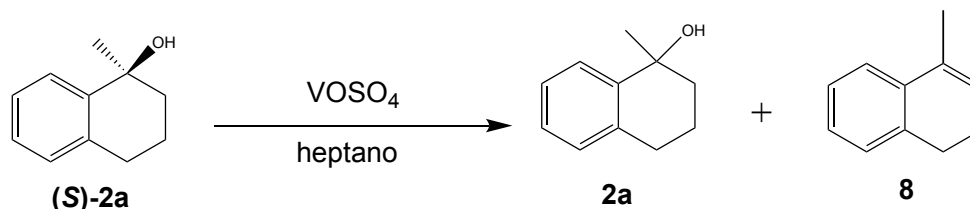


Esquema 8. Resolução cinética enzimática de **1a**.

Realizamos uma reação de RC em larga escala para os substratos **2a** e **1a** com 0,80 mmol de substrato e heptano como solvente. Esses experimentos demonstraram que o protocolo é promissor para dimensionar e permitir o isolamento dos compostos opticamente ativos por cromatografia em coluna.

Depois de estabelecer a condição ótima para a RC, estudamos a etapa de racemização usando VOSO₄ como catalisador. Considerando a possível formação de um carbocátion terciário, vislumbramos que o VOSO₄ pode ser promissor para a racemização de álcoois terciários. Assim, avaliamos pela primeira vez este catalisador para a racemização de (*S*)-**2a**, **Esquema 9**. Até o momento, essa reação foi estudada apenas por

Akai e colaboradores usando o catalisador homogêneo $\text{O}=\text{V}(\text{OSiPh}_3)_3$ imobilizado em sílica mesoporosa (V-MPS4), e os resultados obtidos abriram espaço para o nosso estudo.⁵¹



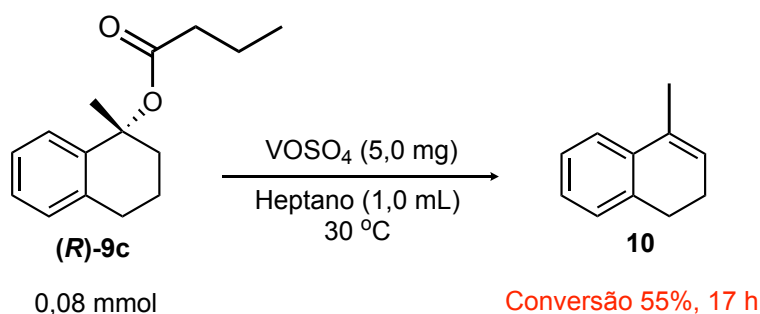
Esquema 9. Racemização de (S)-2a catalisada pelo VOSO_4 .

Testamos diferentes quantidades de VOSO_4 na racemização de (S)-2a usando a condição de reação definida na etapa RC. A racemização rápida foi alcançada a 30 °C em heptano e isooctano como solventes, mas observamos a alta formação do produto de eliminação **8**. Essa reação colateral já era esperada uma vez que a racemização ácida gera um carbocátion terciário, um intermediário altamente reativo que pode levar a vias indesejadas como formação e rearranjo de alcenos. O favorecimento da via de eliminação pode estar relacionado à estabilidade mais excelente do alceno 5a em comparação com álcool terciário estericamente impedido.

Sabendo da incompatibilidade do VOSO_4 com lipases durante o tempo de contato prolongado^{36,53} testamos nosso sistema de compartimentalização previamente aplicado no RCD de álcoois secundários³⁶. As reações de racemização com compartimentalização foram mais lentas devido à má transferência de massa do álcool terciário para o tubo contendo o catalisador. No entanto, isso pode ser uma vantagem, pois a reação lateral também se tornou mais lenta, diminuindo a formação do produto de eliminação **8**. Os primeiros resultados da racemização de (S)-2a catalisada por VOSO_4 indicam que este catalisador heterogêneo pode ser um potencial aliado no desenvolvimento de metodologias RCD aplicáveis para álcoois terciários. Apesar do desafio de superar reações colaterais, esses resultados representaram um ponto de partida para futuras investigações sobre a racemização de álcoois terciários catalisada por VOSO_4 .

Tendo estudado as condições das reações de RC enzimática e de racemização catalisada por vanádio, essas duas reações foram combinadas para realizar a RCD de 2a. Este é o primeiro trabalho a avaliar VOSO_4 e CAL-A imobilizada em Immobead como catalisadores para um RCD de um álcool terciário. Inicialmente, a RCD de 2a foi realizada

utilizando a condição ótima de RC e a quantidade de VOSO_4 que gerou menor quantidade de produto de eliminação: 0,16 mmol de rac-1a, 2:1 m/m de CAL-A, 10 equivalentes de butirato de vinila, 10 mg de VOSO_4 dentro de um tubo de vidro e 2 mL de heptano. Nestas condições, obtivemos apenas 23% de conversão de (*R*)-**2c** (>99% ee) com a formação de 56% do produto de eliminação **10**, indicando uma possível reatividade do VOSO_4 ao éster **2c**. Uma reação de controle foi realizada entre VOSO_4 e o éster (*R*)-**2c** (Esquema 10). Surpreendentemente, o VOSO_4 reagiu com o (*R*)-**9c** formando o alceno **8** com 55% de conversão em 17h.



Esquema 10. Reação de controle com VOSO_4 e éster (*R*)-**2c**.

Com o objetivo de minimizar a reação indesejada entre o catalisador de vanádio e (*R*)-**2c**, uma triagem para a RCD de **2a** foi realizada utilizando diferentes condições de reação, como: diferentes quantidades de VOSO_4 , uso de peneiras moleculares e/ou sistema de compartimentalização e adição sequencial de catalisadores. O melhor resultado foi obtido com a adição de peneiras moleculares, com conversão de 57% de (*R*)-**2c** (ee >99%) e apenas 2% do produto de eliminação **8** em 7 horas. Tempos de reação prolongados favoreceram a via de eliminação.

Os valores de conversão e ee do substrato indicam que o VOSO_4 foi desativado durante a RCD, pois não conseguiu atingir conversões significativamente superiores a 50%. Embora a literatura tenha mencionado uma incompatibilidade entre VOSO_4 e lipases^{7,54}, observamos que a CAL-A permanece ativa e enantiosseletiva mesmo em diferentes sistemas reacionais. Além disso, tínhamos um desafio mais significativo do que a incompatibilidade entre o sistema catalítico quimioenzimático: a reatividade do álcool terciário e do éster. Por exemplo, Özdemirhan e colaboradores citam que os ésteres terciários resultantes da RC de **2a** com acetato de vinila como doador de acila se decompõem facilmente em temperaturas acima de 32 °C.⁵⁵ Os grupos de Akai e Gröger também observaram a decomposição do álcool terciário em produtos de eliminação.⁵¹

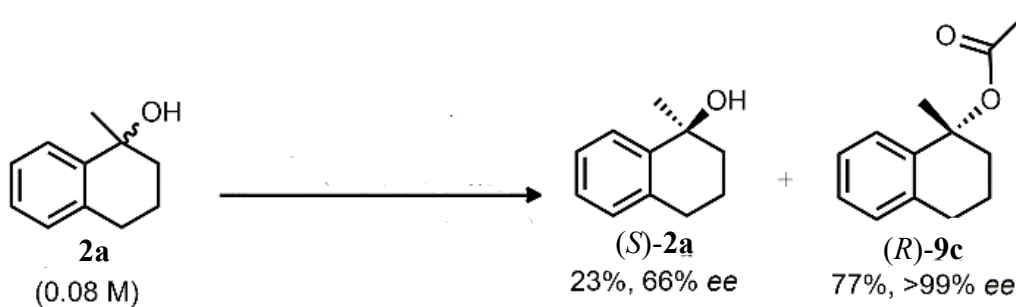
Após nossos esforços, foi possível minimizar a formação do alceno **8** utilizando estratégias práticas como diminuir o grau de hidratação do meio reacional e adição lenta do catalisador de racemização, proporcionando um leve processo DKR de álcool terciário com alta enantiosseletividade e rápida taxa de reação.

Embora o RCD de **2a** já tenha sido relatado com valor de conversão acima do obtido por nós (77%),⁵⁵ nosso melhor resultado foi obtido em apenas 7 horas usando um catalisador oxovanádio disponível comercialmente (VOSO₄) – sem necessidade de pré-ativação – e uma quantidade relativamente pequena de enzima (2:1 m/m enzima:substrato, 52 mg), com adição de peneira molecular. O **Esquema 11** resume os resultados de DKR para álcool terciário **2a** relatados até o momento.

Portanto, apresentamos uma resolução cinética enzimática (RC) otimizada para dois álcoois benzílicos terciários (**2a** e **1a**) por meio de otimizações práticas de parâmetros de reação, como doador de acila e quantidade de enzima. A metodologia é uma estratégia de obtenção direta de álcoois terciários enantiomericamente puros, que pode superar alguns desafios enfrentados na síntese assimétrica dessa classe de compostos. Além disso, também estudamos o desenvolvimento de uma resolução cinética dinâmica (RCD) utilizando a CAL-A como catalisador quiral e VOSO₄ como catalisador de racemização, dois catalisadores heterogêneos comercialmente disponíveis.

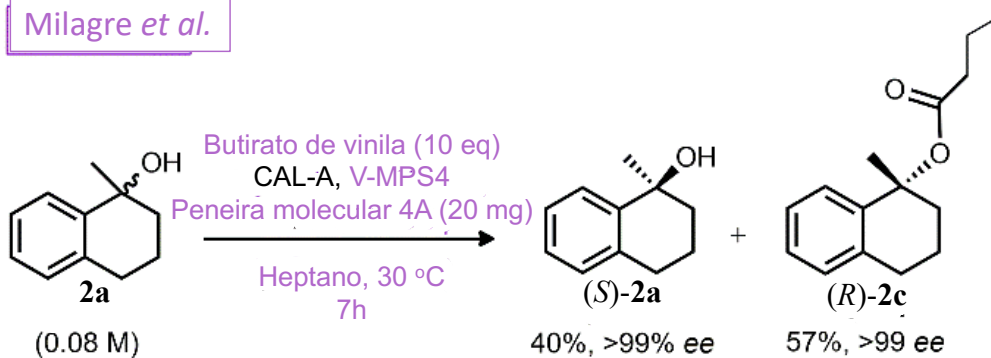
Esta metodologia de RC e RCD de álcoois terciários cíclicos foi submetida ao periódico *Catalysis Science and Technology*.⁵⁶

Akai *et al.*



- ✓ Alta conversão
- ✓ Sem formação de produtos laterais
- ✗ Necessidade de imobilizar o catalisador de vanádio
- ✗ Éter como solvente
- ✗ 13 dias de reação
- ✗ Uso de 281 mg de CAL-A e 40 mg de V-MPS4
(Adicionado em porções durante 23 dias)

Milagre *et al.*



- ✓ Catalisador de V disponível comercialmente
- ✓ Heptano como solvente
- ✓ 7 horas de reação
- ✓ Uso de 52 mg de CAL-A e 10mg de VOSO₄
- ✗ Formação de produtos laterais
- ✗ Pequena contribuição da DKR, causando menor conversão
- ✗ Decomposição de (R)-2c

Esquema 11. Resolução cinética dinâmica do álcool terciário **8**: comparação entre a literatura⁵¹ e este trabalho.

2.3 Resolução cinética dinâmica de álcoois terciários em regime de fluxo contínuo.

Com o objetivo de otimizar a reação de RCD de **2a** realizamos o estudo desta reação em regime de fluxo contínuo. A **Figura 10** apresenta as condições otimizadas para a RC de **2a** após a avaliação de vários parâmetros como: solvente, temperatura, fluxo de alimentação, tempo de residência, doador de acila, quantidade de enzima e concentração de substrato. Comparando com a reação em batelada conseguimos obter uma conversão superior com nenhuma formação de produto lateral.

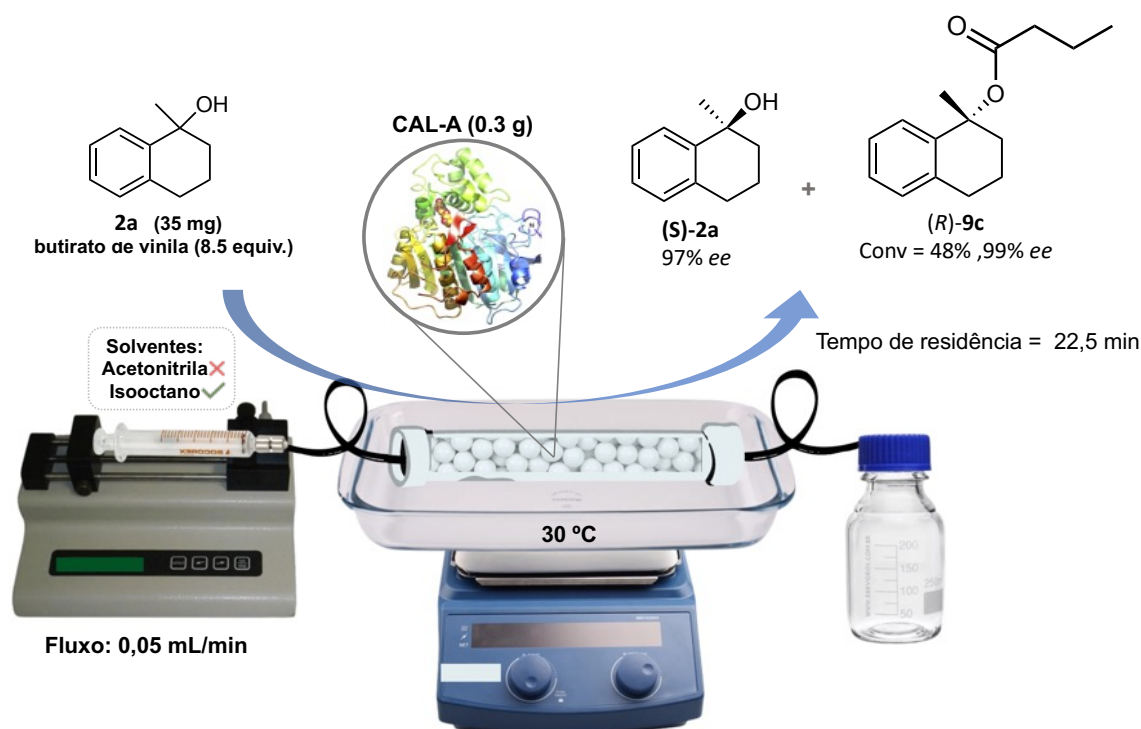


Figura 10. Resolução cinética enzimática do álcool terciário **2a** em fluxo contínuo.

Apesar do resultado obtido ser excelente, esta metodologia possui algumas limitações como a solubilidade do substrato em solvente apolares. Este fator foi minimizado com a adição de excesso de doador de acila (8,5 equivalentes) que aumentou a solubilidade **2a**. Outro ponto importante a se ressaltar é a afinidade de **2a** ao suporte da enzima CAL-A. Com isto, ao final da reação foi necessário passar pela coluna um solvente polar, como o acetato de etila, para verificar que o substrato não ficasse retido na coluna, mascarando o resultado. Este fato poderia ser facilmente contornado com uso de um

solvente polar, porém os solventes polares apresentaram baixas conversões e levaram a formação de produtos laterais ou menor enantiosseletividade.

Depois de estabelecer a condição ótima para a RC em fluxo contínuo, estudamos a etapa de racemização usando $\text{VO}(\text{SO}_4)_3$ como catalisador. Assim, avaliamos pela primeira vez este catalisador para a racemização de (*S*)-**2a**. Utilizamos as mesmas condições otimizadas para a RC enzimática com a coluna preenchida com o $\text{VO}(\text{SO}_4)_3$. Nesta condições conseguimos obter uma racemização de 30% com 3 % de formação de produto lateral, alceno **8**.

Tendo estudado as condições das reações de RC enzimática e de racemização catalisada por vanádio em fluxo contínuo, realizamos a combinação das mesmas para realizarmos a RCD de **2a**. De modo a evitar o contato entre os catalisadores utilizamos a estratégia realizada por Souza et al.⁹ na qual foram intercaladas camadas de enzima e $\text{VO}(\text{SO}_4)_3$ separadas entre si por um “*filler*” como apresentado nas **Figuras 11 e 12**. Testamos 4 materiais diferentes como “*filler*”: microesferas de vidro, celite, sílica gel e algodão.



Figura 11. Coluna Omnifit® EZ Solvent Plus com o diâmetro interno de 6,6 mm e comprimento de 100 mm com camadas alternadas dos catalisadores.

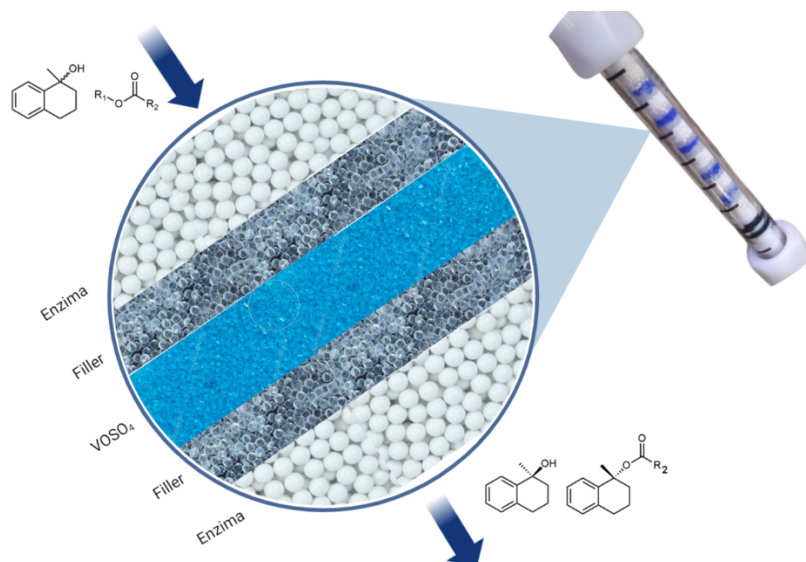
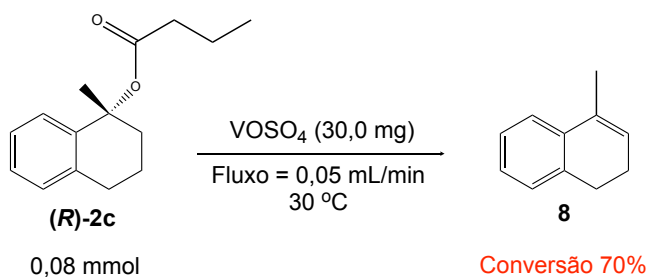


Figura 12. Representação esquemática das camadas dos catalisadores e do “*filler*”.

O resultado mais promissor foi obtido utilizando as microesferas de vidro, porém a melhor conversão obtida foi de 35% com 50% de formação do alceno, produto lateral. Este resultado corrobora com o observado no experimento em batelada, onde o produto pode ser convertido no alceno. Repetimos o experimento de controle utilizando a coluna preenchida com 30 mg de VOSO_4 e passamos por ela apenas o éster (*R*)-**2c** e observamos a formação de 70% do alceno, **Esquema 12**. Aumentamos o fluxo de modo a diminuir o tempo de residência e apenas com o fluxo superior 3 vezes observamos a diminuição na formação do alceno **8**, porém este fluxo não é compatível com a resolução cinética enzimática, pois leva a uma diminuição substancial na conversão ao (*R*)-**2c**.



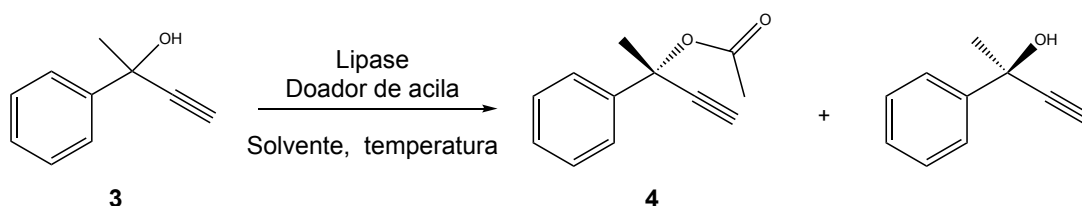
Esquema 12. Reação de controle com VOSO_4 e éster (*R*)-**2c** em fluxo contínuo.

A etapa de racemização em fluxo contínuo está favorecendo a reação paralela levando a formação do alceno **8**, inviabilizando assim o emprego da RCD. Apesar não conseguirmos implementar as RCD, o resultado obtido pela RC em fluxo contínuo é superior a todos relatados na literatura.

Apesar de não obter sucesso na reação de RCD em fluxo contínuo, conseguimos obter a RC praticamente quantitativa, um resultado inédito cujo artigo está em fase de redação.

2.4 Resolução cinética dinâmica (RCD) Quimioenzimática de álcoois terciários propargílicos

Inicialmente, uma série de condições reacionais foram avaliadas utilizando a enzima CAL-A para a RC do álcool terciário propargílico 2-fenil-3-butil-2-ol (**3**). Esta enzima foi selecionada por ser enantiosseletiva para as reações de RC de álcoois terciários propargílicos⁵⁷ e por ser disponível comercialmente. Foram avaliados os efeitos da variação da quantidade de enzima, da quantidade de doador de acila e da temperatura, **Esquema 13**. Os resultados obtidos foram insatisfatórios e optamos por realizar uma triagem de outras lipases.



Esquema 13. Reação de controle com VOSO₄ e éster (*R*)-**2c** em fluxo contínuo.

Realizamos a triagem com as seguintes lipases: **1**) Lipase A de *Candida antarctica* imobilizada em imobead 150, recombinante de *Aspergillus oryzae* (CAL-A); **2**) Lipase de *Candida rugosa* (CRL); **3**) Lipase de *Candida rugosa* imobilizada em imobead 150 (CRLim); **4**) Lipase de pâncreas de porco (PPL); **5**) Amano lipase A de *Aspergillus niger* (ANL); **6**) Amano lipase de *Pseudomonas fluorescens* (PFL); **7**) Lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em imobead 150 (TLL); **8**) Lipase de

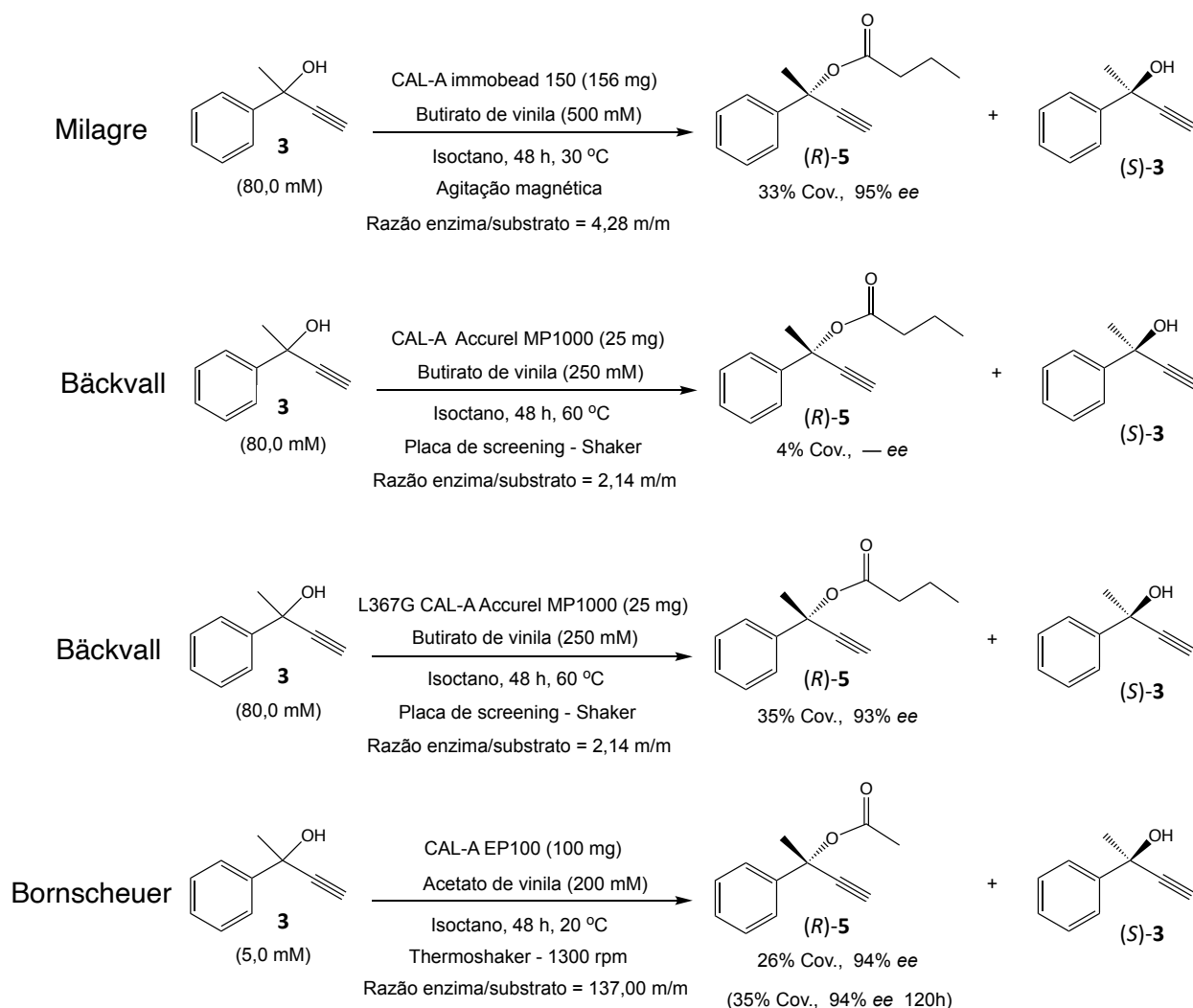
Rhizopus oryzae imobilizada em imobead 150 (ROL); **9)** Lipase de *Rhizopus niveus* (RNL); **10)** Lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em imobead 150 (RML); **11)** Amano lipase M de *Mucor javanicus*; **12)** Lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em resina acrílica (CALB); **13)** Amano lipase de *Burkholderia cepacia* (BCL).

Dentre as lipases testadas nenhuma apresentou um resultado melhor que o obtido pela CAL-A. Então, optamos por continuar utilizando a enzima CAL-A. Devido às baixas conversões nos experimentos anteriores, optamos por dar um novo direcionamento ao trabalho, utilizando o protocolo de transesterificação desenvolvido por Bäckvall *et al.*⁵⁸, apesar do foco do trabalho de Bäckvall ser a aplicação de variantes engenheiradas da enzima CAL-A. No nosso caso, ao invés de focar na engenharia de proteínas, decidimos realizar um estudo da engenharia do meio reacional, avaliando os efeitos da temperatura, do solvente, do doador de acila e da concentração do doador de acila e da quantidade de enzima.

O emprego da engenharia do meio reacional foi fundamental para a obtenção de uma condição reacional otimizada e competitiva com as já desenvolvidas utilizando a CAL-A. Com isto, otimizamos um novo protocolo para a transesterificação enantiosseletiva de **3** catalisada pela CAL-A imobilizada em Imobead 150 em isooctano a 30 °C, com butirato de vinila como doador de acila, obtendo uma conversão de 33% e 95% *ee* em 48 h.

O **Esquema 14** faz uma comparação dos resultados que obtivemos com os da literatura. Em relação ao trabalho publicado Bornscheuer *et al.*,^{57a} desenvolvemos um sistema mais eficiente, com menor relação enzima/substrato (4,28 m/m ao invés de 137 m/m) e um doador de acila diferente; adicionalmente, uma conversão semelhante foi alcançada em 48 h de reação ao invés de 120 h. Nosso resultado foi semelhante ao relatado por Bäckvall *et al.*,⁵⁸ com a vantagem de utilizar uma temperatura menor e uma enzima selvagem disponível comercialmente. Além disto, o processo desenvolvido neste trabalho é economicamente mais viável do que todo o processo de obtenção de variantes engenheiradas da enzima CAL-A.

Este estudo de engenharia do meio reacional está descrito com mais detalhes no artigo que submetemos ao periódico *Results in Chemistry* e na dissertação de mestrado do aluno Laerte Ganeo Neto.⁵⁹

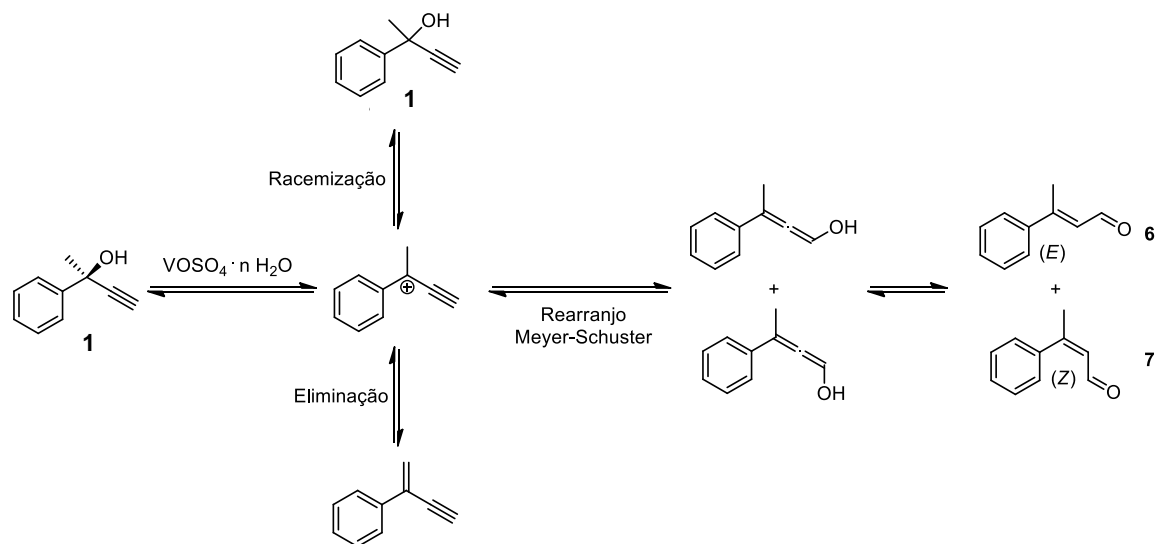


Esquema 14. Comparação de protocolos de resolução cinética enzimática de **3**.

2.5 Avaliação do escopo da metodologia de Resolução cinética enzimática dos álcoois terciários propargílicos.

A RC foi desenvolvida com sucesso, então fomos realizar a reação de racemização utilizando o sulfato de vanadila (VOSO_4) como catalisador, para posteriormente combinar as duas reações de modo a obtermos a RCD de **3**. Durante o desenvolvimento da etapa de racemização foi observado a formação de produtos laterais. Estes produtos podem ser formados via reação de eliminação ou pelo rearranjo de Meyer-Schuster como é apresentado no **Esquema 15**. Os mesmos produtos laterais foram observados por Bäckvall *et al.* ao utilizarem resinas ácidas para a racemização do mesmo substrato.⁶⁰ Realizamos uma avaliação das melhores condições reacionais, porém não conseguimos evitar a

formação dos subprodutos, os quais eram formados em cerca de 30% relativo à concentração do substrato.



Esquema 15. Proposta de formação de produtos laterais para a reação de racemização de **3**.

Levando em consideração 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 **3**, o que é incompatível com a rápido processo de racemização catalisado pelo VOSO_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 utilizando a enzima CAL-A.

3. Perspectivas

A linha de pesquisa em Resolução Cinética Dinâmica de álcoois secundários e terciários utilizando o sistema lipase/VOSO₄ vem obtendo sucesso e pretendemos aumentar o escopo de aplicação em outras classes de álcoois secundários.

Temos também como objetivo a busca por outro catalisador para a racemização de amins secundárias, uma vez que o VOSO₄ não é compatível para esta reação. As lipases e principalmente a CAL-B apresenta uma excelente atividade frente as amins secundárias, então estamos pretendendo desenvolver um processo de RCD quimioenzimática para amins secundárias com um catalisador de baixo custo, baixa toxicidade e disponível comercialmente.

4. Referências Bibliográficas

- ¹ Sheldon, R. A. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1437–1451.
- ² Sheldon, R. A.; Woodley, J. M. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 801–838.
- ³ Erythropel, H. C.; Zimmerman, J. B.; De Winter, T. M.; Petitjean, L.; Melnikov, F.; Lam, C. H.; Lounsbury, A. W.; Mellor, K. C.; Janković, N. Z.; Tu, Q.; Pincus, L. N.; Falinski, M. M.; Shi, W.; Coish, P.; Plataab, D. L.; Anastas, P. T. *Green Chemistry*, **2018**, *20*, 1929–1961.
- ⁴ Buchholtz, K.; Kashe, V.; Bornscheuer, U. T. *Enzymes in Organic Chemistry. In: Biocatalysts and Enzyme Technology*. 2^o ed. Wiley-Blackwell, p. 2, 2012a.
- ⁵ Sheldon, R. A.; Pereira, P. C. *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, *46*, 2678–2691.
- ⁶ Hollmann, F.; Arends, I. W. C. E.; Holtmann, *Green Chemistry*, **2011**, *13*, 2217–2588.
- ⁷ a) Kataki, F. M.; Salehi, E. A. *Int. J. ChemTech Res.* **2016**, *9*, 305-312. b) Guerrand, D. OCL, **2017**, *24*, D403. c) Schmidt, R. D.; Verger, R. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, *37*, 1608-1633.
- ⁸ Loli, H.; Narwal, S. K.; Saun, N. K.; Gupta, R. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2015**, *15*, 1209-1216.
- ⁹ a) Salic, A.; Tusec, A. J.; Sander, A.; Zelic, B. *New Biotechnol.* **2018**, *47*, 80-88. b) Tan, T.; Lu, J.; Nie, K.; Deng, L.; Wang, F. *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 628-634.
- ¹⁰ a) Hasan, F.; Shah, A. A.; Javed, S.; Hameed, A. *Afr. J. Biotechnol.* **2010**, *9*, 4836-4844. b) Wang, H.; Zhong, S.; Ma, H.; Zhang, J.; Qi, W. *Braz. J. Microbiol.* **2012**, *43*, 148-156.
- ¹¹ Carvalho, A. C. L. M.; Fonseca, T. S.; Mattos, M. C.; Oliveira, M. C. F.; Lemos, T. L. C.; Molinari, F.; Romano, D.; Serra, I. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 29682-29716.
- ¹² a) Dwivedee, B. P.; Soni, S.; Sharma, M.; Bhaumik, J.; Laha, J. K.; Banerjee, U. C. *ChemistrySelect* **2018**, *3*, 2441-2466. b) Piedrafita, G.; Keller, M. A.; Ralser, M. *Biomolecules* **2015**, *5*, 2101-2122.
- ¹³ Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R. L. *Hydrolases in Organic Synthesis. Regio- and Stereoselective Biotransformations*, Wiley-VCH, **2006**, Cap. 5, 61-65.
- ¹⁴ a) Birolli, W. G.; Fonseca, L. P.; Porto, A. L. M. *Catal. Lett.* **2017**, *147*, 1977-1987. b) Xie, Z. B.; Wang, N.; Jiang, G. F.; Yu, X. Q. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 945-948.
- ¹⁵ a) Fan, Y.; Cai, D.; Wang, X.; Yang, L. *Molecules* **2018**, *23*, 2154. b) Torre, O.; Alfonso, I.; Gotor, V. *Chem. Commun.* **2004**, 435, 1724-1735.

-
- ¹⁶ a) Tian, X.; Zhang, S.; Zheng, L. *Enzyme Microb. Technol.* **2016**, *84*, 32-40. b) Reetz, M. T.; Mondière, R.; Carballeira, J. D. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1679-1681.
- ¹⁷ a) Björkling, F.; Godtfredsen, S. E.; Kirk, O. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, *0*, 1301-1303. b) Markiton, M.; Boncel, S.; Jonas, D.; Chrobok, A. *Sustainable Chem. Eng.* **2017**, *5*, 1685-1691.
- ¹⁸ a) Zhang, W.; Zhang, W.; Wang, N.; Yang, Z.; Li, Y.; Yu, Y.; Pu, X.; Yu, X. *Adv. Synth. Catal.* **2017**, *359*, 3397-3406. b) Wu, Q.; Soni, P.; Reetz, M. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1872-1881.
- ¹⁹ a) Ding, Y.; Xiang, X.; Gu, M.; Huang, H.; Hu, Y. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2016**, *39*, 125-131. b) Lai, Y. F.; Zheng, H.; Chai, S. J.; Zhang, P. F.; Chen, X. Z. *Green Chem.* **2010**, *12*, 1917-1918.
- ²⁰ Wang, J. L.; Liu, B. K.; Yin, C.; Wu, Q.; Lin, X. F. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 2689-2692.
- ²¹ Klossowski, S.; Wiraska, B.; Berlozecki, S.; Ostaszewski, R. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 566-569.
- ²² Arora, B.; Pandey, P. S.; Gupta, M. N. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 3920-3922.
- ²³ Li, K.; He, T.; Li, C.; Feng, X. W.; Wang, N.; Yu, X. Q. *Green Chem.* **2009**, *11*, 777-789.
- ²⁴ a) Mohommadi, M.; Ashjari, M.; Garinroodi, M.; Yousefi, M.; Karkhane, A. A. *RSC Adv.* **2016**, *76*, 72275-72285. b) Wang, J. L.; Chen, X. Y.; Wu, Q.; Lin, X. F. *Adv. Synth. Catal.* **2014**, *356*, 999-1005. c) Liang, Y. R.; Hu, Y. J.; Zhou, X. H.; Wu, Q.; Lin, X. F. *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58*, 2923-2926.
- ²⁵ Park, A.; Kim, S.; Park, J.; Joe, S.; Min, B.; Oh, J.; Song, J.; Park, S.; Park, S.; Lee, H. *ACS Catal.* **2016**, *6*, 7458-7465.
- ²⁶ Fajardo, Y. L. C. *Protein engineering of the calb lipase to synthesize fragrance compounds.* **2017**, Université du Québec – France.
- ²⁷ Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, A. N. E.; Rappaport, A. T.; Cuccia, L. A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656-2665.
- ²⁸ a) Verho, O.; Bäckvall, J.-E. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3996-4009. b) Miranda, A. S.; Miranda, L. S. M.; de Souza, R. O. M. A. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 372-393. c) Seddigi, Z. S.; Malik, M. S.; Ahmed, S. A.; Babalghith, A. O.; Kamal, A. *Coord. Chem. Rev.* **2017**, *348*, 54-70.
- ²⁹ Chen, H.; Meng, X.; Xu, X.; Liu, W.; Li, S. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* **2018**, *102*, 3487-3495.
- ³⁰ Pellissier, H. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 3769-3802.

-
- ³¹ Pàmies, O.; Bäckvall, J.-E. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3247–3262.
- ³² Ebbbers, E. J.; Arisans, G. J. A.; Houbiers, J. P. M.; Bruggink, A.; Zwanenburg, B. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 9417–9476.
- ³³ Larsson, A.L.E.; Persson, B.A.; Bäckvall, J.-E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 1211–1212.
- ³⁴ a) Méndez-Sánchez, D.; Mangas-Sánchez, J.; Busto, E.; Gotor, V.; Gotor-Fernández, V. *Adv. Synth. Catal.* **2016**, *358*, 122–131. b) Görbe, T.; Lihammar, R.; Bäckvall, J.-E. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 77–80.
- ³⁵ Wu, J.; Meng, X.; Wang, L.; Xu, G.; Yang, L. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 5129–5132.
- ³⁶ Wuyts, S.; Temmerman, K.; Vos, D.; Jacobs, P. *Chem Commun.* **2003**, *15*, 1928–1929.
- ³⁷ Takizawa, S.; Gröger, H.; Sasai, H. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 8992–8997.
- ³⁸ Akai, S.; Hanada, R.; Fujiwara, N.; Kita, Y.; Egi, M. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4900–4903.
- ³⁹ a) Egi, M.; Sugiyama, K.; Saneto, M.; Hanada, R.; Kato, K.; Akai, S. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*, 3654–3658. b) Sugiyama, K.; Oki, Y.; Kawanishi, S.; Kato, K.; Ikawa, T.; Egi, M.; Akai, S. *Catal. Sci. Technol.* **2016**, *6*, 5023–5030.
- ⁴⁰ Wuyts, S.; Wahlen, J.; Jacobs, P. A.; De Vos, D. E. *Green Chem.* **2007**, *9*, 1104–1108.
- ⁴¹ Tracey, A. S.; Crans, D. C. *Vanadium compounds: Biochemistry; chemistry, and therapeutic application*, 1 ed., ACS Symposium Series, 1998.
- ⁴² a) Lu, S.; Poh, S. B.; Siau, W.; Zhao, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1731–1734. b) Zhang, W.; Ma, S. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 6064–6067. c) Guha, N. R.; Neyyappadath, R. M.; Greenhalgh, M. D.; Chisholm, R.; Smith, S. M.; McEvoy, M. L.; Young, C. M.; Rodriguez-Escrich, C.; Pericàs, M. A.; Hähner, G.; Smith, A. D. *Green Chem.* **2018**, *20*, 4537–4546. d) Greenhalgh, M. D.; Smith, S. M.; Walden, D. M.; Taylor, J. E.; Brice, Z.; Robinson, E. R. T.; Fallan, C.; Cordes, D. B.; Slawin,
- ⁴³ a) Özdemirhan D. *Synth. Commun.* **2017**, *47*, 629–645. b) Dun, D.; Yun, Z.; Aijun, S.; Ke, S.; Yunfeng, H. *Chin. J. Org. Chem.* **2018**, *38*, 1185–1192. c) Fillat, A.; Romea, P.; Pastor, F. I. J.; Urpí, F.; Diaz, P. *Catal. Today* **2015**, *255*, 16–20. d) Fillat, A.; Romea, P.; Urpí, F.; Pastor, F. I. J.; Diaz, P. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 4479–4490. e) Oh, K.; Nguyen, G.; Kim, E.; Kourist, R.; Bornscheuer, U.; Oh, T.; Yoon, J. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2012**, *80*, 67–73. f) Rehdorf, J.; Behrens, G. A.; Nguyen, G.; Kourist, R.; Bornscheuer, U. T. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *93*, 1119–1126. g) Wang, S.; Wu, J.; Xu, G.; Yang, L. *Biochem. Eng. J.* **2012**, *65*, 57–62. h) Herter, S.; Nguyen, G.; Thompson, M. L.; Steffen-Munsberg, F.; Schauer, F.; Bornscheuer, U. T.; Kourist, R. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *90*, 929–939. i) Nguyen, G.; Kourist, R.; Paravidino,

M.; Hummel, A.; Rehdorf, J.; Orru, R. V. A.; Hanefeld, U.; Bornscheuer, U. T. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *14*, 2753-2758. j) Bassegoda, A.; Nguyen, G.; Schmidt, M.; Kourist, R.; Diaz, P.; Bornscheuer, U. T. *ChemCatChem* **2010**, *2*, 962-967. l) Wiggers, M.; Holt, J.; Kourist, R.; Barstsch, S.; Arends, I. W. C. E.; Minnaard, A. J.; Bornscheuer, U. T.; Hanefeld, U. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2009**, *60*, 82-86. m) Gall, M.; Kourist, R.; Schmidt, M.; Bornscheuer, U. T. *Biocatal. Biotransformation* **2010**, *28*, 201-208. n) Özdemirhan, D.; Sezer, S.; Sönmez, Y. *Tetrahedron Asymm.* **2008**, *19*, 2717-2720. o) Kourist, R.; Maria, P. D.; Bornscheuer, U. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 491-498. p) Kourist, R.; Bartsch, S.; Bornscheuer, U. T. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1393-1398. q) Henke, E.; Pleiss, J.; Bornscheuer, U. T. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4349-4357. r) Chen, S.; Fang, J. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 434-4357. s) Osprian, I.; Steinreiber, A.; Mischitz, M.; Faber, K. *Biotechnol. Lett.* **1996**, *18*, 1331-1334. t) O'Hagan, D.; Zaidi, N. A. *Tetrahedron Asymm.* **1994**, *5*, 1111-1118.

⁴⁴ Henke, E.; Pleiss, J.; Bornscheuer, U. T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3211-3213.

⁴⁵ Krishna, S. R.; Persson, M.; Bornscheuer, U. T. *Tetrahedron: Asymm.* **2002**, *13*, 2693-2696.

⁴⁶ Pleiss, J.; Fischer, M.; Peiker, M.; Thiele, C.; Schmid, R. D. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2000**, *10*, 491-508.

⁴⁷ Holt, J.; Arends, I. W. C. E.; Minnaard, A.; Hanefeld, U. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1341-1344.

⁴⁸ Kourist, R.; Bornscheuer, U. T. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *91*, 505-517.

⁴⁹ a) Henke, E.; Bornscheuer, U. T.; Schmid, R. D.; Pleiss, J. *ChemBiochem* **2003**, *4*, 485-493. b) Heinze, B.; Kourist, R.; Fransson, L.; Hult, K.; Bornscheuer, U. T. *Prot. Eng. Des. Sel.* **2007**, *20*, 125-131.

⁵⁰ Nguyen, G.; Thompson, M. L.; Grogan, G.; Bornscheuer, U. T.; Kourist, R. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2011**, *70*, 88-94.

⁵¹ Kühn, F.; Katsuragi, S.; Oki, Y.; Scholz, C.; Akai, S.; Gröber, H. *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 2885-2888.

⁵² a) Almeida, L. A.; Marcondes, T. H.; Milagre, C. D. F.; Milagre, H. M. S. *ChemCatChem* **2020**, *12*, 2849-2858. b) Almeida, L. A. Tese: *Síntese de álcoois secundários quirais via resolução cinética dinâmica quimioenzimática*. **2019**, Instituto de Química, UNESP, Araraquara, SP.

⁵³ Wuyts, S.; Wahlen, J.; Jacobs, P. A.; De Vos, D. E. *Green Chem.*, **2007**, *9*, 1104.

-
- ⁵⁴ Akai, S.; Tanimoto, K.; Kanao, Y.; Egi, M.; Yamamoto, T.; Kita, Y. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **2006**, *45*, 2592–2595
- ⁵⁵ Özdemirhan, D.; Sezer, S.; Sönmez, Y. *Tetrahedron Asymm.* **2008**, *19*, 2717-2720.
- ⁵⁶) Almeida, L. A.; Milagre, C. D. F.; Milagre, H. M. S. *Catal. Sci. Technol* **2023**, *Submetido*.
- ⁵⁷ a) Krishna, S. R.; Persson, M.; Bornscheuer, U. T. *Tetrahedron: Asymm.* **2002**, *13*, 2693-2696. b) Henke, E.; Pleiss, J.; Bornscheuer, U. T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3211-3213. c) Özdemirhan, D.; Sezer, S.; Sönmez, Y. *Tetrahedron Asymm.* **2008**, *19*, 2717-2720. d) Kourist, R.; Bornscheuer, U. T. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *91*, 505-517.
- ⁵⁸ Löfgren, J.; Görbe, T.; Oschmann, M.; Humble, M. S.; Bäckvall, J. *ChemBioChem* **2019**, *20*, 1438-1443.
- ⁵⁹ a) Ganeo, L.; Milagre, C. D. F.; Milagre, H. M. S. *Results in Chemistry*. **2023**, *Submetido*. b) Ganeo, L. A. *Transesterificação enantiosseletiva de álcoois terciários propargílicos: estudos de resolução cinética e resolução cinética dinâmica*. **2023**, Instituto de Química, UNESP, Araraquara, SP.
- ⁶⁰ Görbe, T.; Lihamar, R.; Bäckval, J. *Chemistry – A European Journal* **2018**, *24*, 77-80.