

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química - Câmpus de Araraquara

Ana Lua Kitagawa Sá

Resolução cinética mediada por lipase de *Burkholderia cepacia*

Araraquara
2023

Ana Lua Kitagawa Sá

Resolução cinética mediada por lipase de *Burkholderia cepacia*

Trabalho de conclusão de curso apresentado a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre
Coorientadora: Msc Laíza Araujo de Almeida

Araraquara

2023

S111r

Sá, Ana Lua Kitagawa

Resolução cinética mediada por lipase de Burkholderia cepacia / Ana
Lua Kitagawa Sá. -- Araraquara, 2023

52 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Química) Universidade
Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química,
Araraquara

Orientador: Humberto Márcio Santos Milagre

Coorientadora: Laíza Araujo de Almeida

1. Biocatálise. 2. Lipase. 3. Cinética de enzimas. 4.
Enantiômeros. 5. Enzimas. 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.

Ana Lua Kitagawa Sá

Resolução cinética mediada por lipase de *Burkholderia cepacia*

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado a Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Bacharel em Química.

Araraquara, 29, novembro, 2023

Banca examinadora

Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Prof. Dr. Ian Castro Gamboa
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Profa. Dra. Lidiane Gaspareto Felipe
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Para minha família, com muito amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre, pela orientação, incentivo, paciência e confiança.

Ao Laerte e à Laíza, por terem contribuído tanto nesse início da minha vida científica.

À professora Cíntia, pelas aulas de Química Orgânica 1, onde tive meu primeiro contato com essa área tão fascinante.

Aos integrantes do Milagre Lab, pela amizade e convivência diária.

À minha família, por todo apoio, amor e carinho recebido que me possibilitou chegar até aqui.

Ao Júlio, pelo amor e companheirismo.

Aos meus amigos, Amanda, Ana Clara, Gabriela, Rômulo e Warley, por tornarem minha trajetória na graduação mais leve e divertida.

Ao Instituto de Química e à Universidade Estadual Paulista, pela infraestrutura e excelência fornecidas no período de graduação.

Aos funcionários do Instituto de Química, especialmente, à Valéria e à Débora da biblioteca.

À FAPESP e ao CNPq, pelo apoio financeiro para a manutenção do grupo de pesquisa.

À CAPES pela manutenção do Portal de Periódicos.

“A ciência é feita com fatos, da mesma forma que uma casa é feita com tijolos. Entretanto um amontoado de fatos não é ciência, da mesma forma que um amontoado de tijolos não é uma casa.”

(POINCARÉ, 1905, p. 141)¹

¹ POINCARÉ, J. H. **A Ciência e a Hipótese**. THE WALTER SCOTT PUBLISHING CO., LTD., 1905.

RESUMO

A obtenção de apenas um dos enantiômeros em uma mistura racêmica tornou-se um desafio importante, visto que há uma relação íntima entre o arranjo tridimensional de uma molécula e sua resposta biológica. Embora existam diversas metodologias descritas na literatura para resolução de racematos, ainda é necessário o desenvolvimento de metodologias mais eficazes, sustentáveis e com menor custo. Neste trabalho, foram avaliadas e otimizadas condições reacionais de uma metodologia de resolução cinética para o *rac*-1-feniletanol utilizando lipase de *Burkholderia cepacia* (BCL) em sua forma livre. A estratégia utilizada para o estudo dessa reação baseia-se na engenharia do meio reacional, ao avaliar o efeito de diferentes doadores de acila (acetato de vinila, butirato de vinila e decanoato de vinila) e solventes (heptano, tolueno e isooctano) na enantiosseletividade da reação. Em 5 horas de reação, os resultados de conversão das triagens do doador de acila e do solvente foram acima de 50% e com os excessos enantioméricos elevados, sendo a maioria >99%. Os resultados de conversão obtidos foram inesperados e a partir deles foi feita uma investigação diante de um possível processo de racemização do (S)-(-)-1-feniletanol sem a adição de um agente de racemização. Para comprovar se uma resolução cinética dinâmica estava realmente ocorrendo, foram feitas duas reações: a primeira utilizando a enzima sem a presença do decanoato de vinila, a segunda utilizando o decanoato de vinila sem a presença da enzima; constatou-se que nenhum componente reacional estava realizando a racemização. Ao analisar o rendimento reacional, observou-se que estava abaixo de 50%, indicando que o álcool foi adsorvido pela enzima, resultado de uma forte interação de caráter polar; contudo, o éster ficava disperso nos solventes utilizados, formando uma interação de caráter apolar, ou seja, o fenômeno de partição entre o substrato (álcool) e o produto (éster) estava mascarando os valores de conversão das reações. Diante destes experimentos realizados para comprovar o processo de racemização, verificamos que a partição ocorreu para os demais ésteres, porém em menor escala. Portanto, como perspectiva futura deste trabalho será explorada a imobilização da BCL em diferentes suportes de modo a eliminar o fenômeno de partição.

Palavras-chave: resolução cinética; lipase de *Burkholderia cepacia*; resolução cinética dinâmica.

ABSTRACT

The achievement of a single enantiomer in a racemate became a significant challenge since there is an intrinsic relation between the molecule's three-dimensional arrangement and biological response. Although there are several methodologies described in the literature for the resolution of racemates, the development of more effective, sustainable, and low-cost methodologies is still needed. In this study, the reaction conditions of kinetic resolution methodology for *rac*-1-phenylethanol using *Burkholderia cepacia* lipase (BCL) in its free form were evaluated and optimized. The strategy used for studying this reaction is based on the reaction medium's engineering when assessing the effect of different acyl donors (vinyl acetate, vinyl butyrate, and vinyl decanoate) and solvents (heptane, toluene, and isooctane) on the reaction's enantioselectivity. In 5 hours of reaction, the conversion results of acyl donor and solvent screenings were above 50% and with high enantiomeric excesses, most of them >99%. These conversion results obtained were unforeseen, and from that, an investigation was carried out into a possible process of (*S*)-(-)-1-phenylethanol's racemization without the addition of a racemization catalyst. To verify whether a dynamic kinetic resolution was occurring, two reactions were carried out: the first using the enzyme without the presence of vinyl decanoate, the second using the vinyl decanoate without the presence of enzyme; it was established that no reaction component was carrying out the racemization. When the reaction yield was analyzed, we observed that it was below 50%, suggesting that the alcohol was adsorbed by the enzyme, resulting from a strong polar interaction. Nevertheless the ester was dispersed in the solvents, forming a non-polar interaction. In other words, the phenomenon of partition between the substrate (alcohol) and the product (ester) was masking the reaction conversion values. Because of these experiments performed to prove the racemization process, we found that the partition occurred for the other esters, however, on a smaller scale. Therefore, as a future perspective of this work, the immobilization of BCL on different supports will be explored to eliminate the phenomenon of partition.

Keywords: kinetic resolution; *Burkholderia cepacia* lipase; dynamic kinetic resolution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Resolução cinética (RC) quimioenzimática.....	17
Figura 2	–	Resolução cinética dinâmica (RCD) quimioenzimática.....	19
Figura 3	–	Comparação dos sítios catalíticos.....	21
Figura 4	–	Estrutura tridimensional da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	22
Figura 5	–	Ativação interfacial da BCL.....	22
Figura 6	–	Regra de Kazlauskas aplicada ao 1-feniletanol.....	23
Figura 7	–	Doadores de acila escolhidos.....	29
Figura 8	–	Solventes escolhidos.....	29
Figura 9	–	Guia de seleção de solventes GSK.....	36
Figura 10	–	Cromatograma da reação na presença do doador de acila.....	38

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	–	Resoluções cinéticas catalisadas por lipase.....	17
Esquema 2	–	Ciclo catalítico da BCL.....	18
Esquema 3	–	Síntese do acetato de 1-feniletila.....	27
Esquema 4	–	Síntese do butirato de 1-feniletila.....	28
Esquema 5	–	Protocolo geral das reações de RC.....	30
Esquema 6	–	RC utilizando decanoato de vinila.....	30
Esquema 7	–	RC utilizando butirato de vinila.....	31
Esquema 8	–	RC utilizando acetato de vinila.....	31
Esquema 9	–	RC envolvendo tolueno e isooctano como solvente em cada reação.....	32
Esquema 10	–	Reação de verificação da racemização utilizando somente um enantiômero.....	32
Esquema 11	–	Representação geral da RC variando o doador de acila.....	33
Esquema 12	–	Representação geral da RC variando o solvente.....	35
Esquema 13	–	Reação na presença da enzima.....	37
Esquema 14	–	Reação na presença do decanoato de vinila.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Triagem do doador de acila.....	34
Tabela 2 –	Triagem do solvente.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

BCL	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>
C ₀	Carbono quaternário
c	Conversão
CAL-B	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>
CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
CG-EM	Cromatógrafo Gasoso acoplado a espectrômetro de massas
CG-DIC	Cromatógrafo Gasoso acoplado a detector por ionização em chama
CRL	Lipase de <i>Candida rugosa</i>
DMAP	4-dimetilaminopiridina
EC	Enzyme Commission
ee	Excesso enantiomérico
EtOAc	Acetato de etila
F.M.	Fórmula molecular
IV	Infravermelho
MM	Massa molar
m/z	Razão massa carga
PCL	Lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>
ppm	Partes por milhão
RC	Resolução Cinética
RCD	Resolução Cinética Dinâmica
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
t _R	Tempo de retenção

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Biocatálise	15
1.2	Resolução cinética catalisada por lipases	16
1.3	Resolução cinética dinâmica quimioenzimática	19
1.4	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	20
1.5	Regra de Kazlauskas	22
2	OBJETIVOS.....	23
3	PARTE EXPERIMENTAL	24
3.1	Reagentes	24
3.2	Equipamentos utilizados.....	24
3.2.1	Cromatógrafo gasoso acoplado a detector por ionização em chama (CG-DIC).....	24
3.2.2	Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM)	26
3.2.3	Espectrômetro de absorção na região do infravermelho (IV)	26
3.2.4	Espectrômetro de ressonância magnética nuclear de Hidrogênio e de Carbono (RMN de ^1H e ^{13}C).....	26
3.3	Síntese dos ésteres racêmicos	27
3.4	Resolução cinética	29
3.4.1	Triagem do doador de acila.....	30
3.4.2	Triagem do solvente	31
3.5	Análise do processo de racemização	32
4	RESULTADOS.....	33
4.1	Resolução cinética	33
4.2	Análise do processo de racemização	37
5	CONCLUSÃO	39
	REFERÊNCIAS.....	40
	APÊNDICE – CARACTERIZAÇÃO DOS ÉSTERES RACÊMICOS	44

1 INTRODUÇÃO

Diante da notável relação entre o arranjo tridimensional das moléculas quirais e suas respectivas respostas biológicas, a obtenção de apenas um dos enantiômeros de uma mistura racêmica tornou-se um desafio importante para os químicos orgânicos sintéticos (Stymiest *et al.*, 2008). A busca por metodologias de síntese enantiosseletivas cresceu fortemente a partir da década de 90, quando normas mais exigentes em relação ao uso de fármacos quirais foram criadas pelas agências reguladoras, como o FDA (Food and Drug Administration). A quiralidade das moléculas tornou-se o foco principal no desenvolvimento e descoberta de novos medicamentos (Agranat; Wainschtein; Zusman, 2012). Nesse contexto, há um interesse contínuo por novas metodologias de síntese para obtenção de álcoois enantiomericamente puros, pelo motivo desses compostos serem importantes blocos construtores utilizados nas indústrias química e farmacêutica para a síntese de aromas, agroquímicos, fármacos, cristais líquidos, entre outros materiais (Chen; De Souza, 2019).

1.1 Biocatálise

Visando o desenvolvimento de metodologias eficientes, seletivas, de menor custo e ambientalmente amigáveis, a biocatálise, que consiste no uso de um catalisador biológico em síntese química, destaca-se por ser uma poderosa ferramenta para a obtenção de álcoois enantiomericamente puros (Chen; De Souza, 2019).

As enzimas são amplamente utilizadas em síntese orgânica devido à características atraentes como biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de apresentarem excelentes quimio-, regio- e estereosseletividades. Geralmente, reações enzimáticas são feitas em condições reacionais brandas: pressão e temperatura ambientes, utilizando água como solvente, sem a necessidade de executar reações de proteção e desproteção, sendo, portanto, ambientalmente amigáveis (De Miranda; Miranda; De Souza, 2015; Faber, 2011, p.5; Sheldon; Woodley, 2018).

Devido à versatilidade catalítica, também denominada promiscuidade, de diversas enzimas para substratos não naturais, a síntese biocatalítica de álcoois enantiopuros

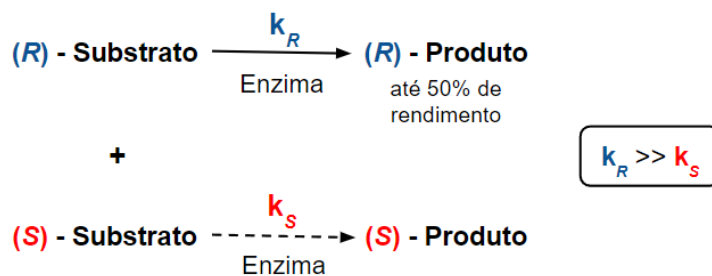
é possível através de resoluções cinéticas de misturas racêmicas, que desempenham um papel essencial na preparação de álcoois enantiomericamente puros (Faber, 2011, p.5; Verho; Bäckvall, 2015). A resolução cinética catalisada por lipases é uma das metodologias biocatalíticas mais aplicadas na indústria para a produção de compostos enantiopuros (Moisă *et al.*, 2018).

1.2 Resolução cinética catalisada por lipases

As lipases são designadas com a numeração 3.1.1.3 de acordo com classificação feita pela Enzyme Commission (EC), da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (da sigla em inglês – IUBMB). Sendo que o primeiro número se refere à classe da enzima (**3** indica classe das Hidrolases); o segundo, à sua subclasse (**3.1** representa que ela atua nas ligações de ésteres); o terceiro, ao tipo de ligação em que ela atua (**3.1.1** indica mais precisamente que ela atua na clivagem de ligações de ésteres carboxílicos) e o quarto, ao substrato natural da enzima (**3.1.1.3** simboliza que essa enzima catalisa a hidrólise de triacilgliceróis) (Buchholz; Kasche; Bornscheuer, 2005, p.29). Por consequência, as lipases apresentam aplicações nas indústrias de alimentos, detergentes, química fina e farmacêutica (Buchholz; Kasche; Bornscheuer, 2005, p.127).

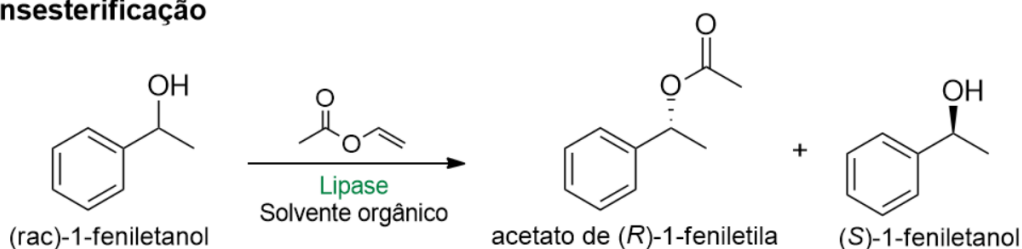
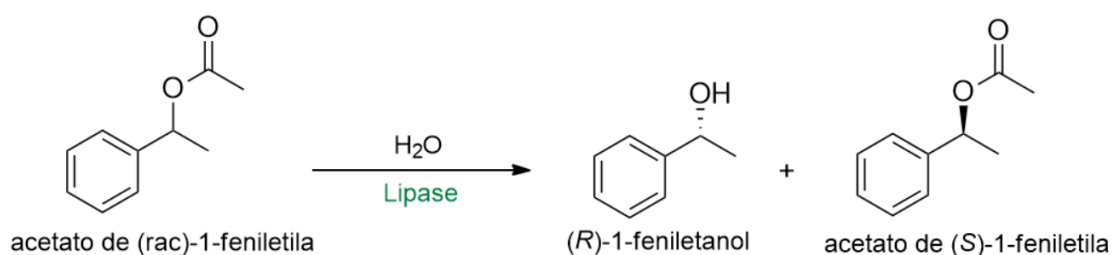
As lipases são enzimas comumente aplicadas em síntese orgânica, uma vez que possuem disponibilidade comercial, tanto na forma livre como imobilizada; custo relativamente baixo, quando comparado com outras enzimas; estabilidade em solventes orgânicos; não dependência de cofatores; e elevada enantiosseletividade e atividade. Sobretudo, a alta enantiosseletividade dessas enzimas permite seu uso em reações de resolução cinética de uma ampla gama de substratos para formação de compostos enantiomericamente puros (Chen *et al.*, 2018; Ghanem; Aboul-Enein, 2005; Neto; Milagre; Milagre, 2023).

Em uma reação de resolução cinética (RC) um dos enantiômeros da mistura racêmica, na presença de um catalisador quiral, é convertido ao produto em uma velocidade maior, gerando uma mistura equimolar de produto e substrato opticamente puros e com configuração absoluta oposta e, portanto, um rendimento máximo de 50% (Figura 1); essa estratégia permite a separação do produto quiral e do enantiômero que não reagiu por técnicas tradicionais de purificação (De Miranda; Miranda; De Souza, 2015; Faber, 2011, p.39; Moisă *et al.*, 2018).

Figura 1 – Resolução cinética (RC) quimioenzimática

Fonte: elaborada pela Autora (2023).

As lipases atuam como catalisadores quirais em protocolos de RC de álcoois secundários e aminas pois catalisam reações enantiosseletivas de transesterificação desses compostos ou hidrólise dos seus relativos ésteres e amidas (Esquema 1) (De Miranda; Miranda; De Souza, 2015).

Esquema 1 – Resoluções cinéticas catalisadas por lipase**Transesterificação****Hidrólise**

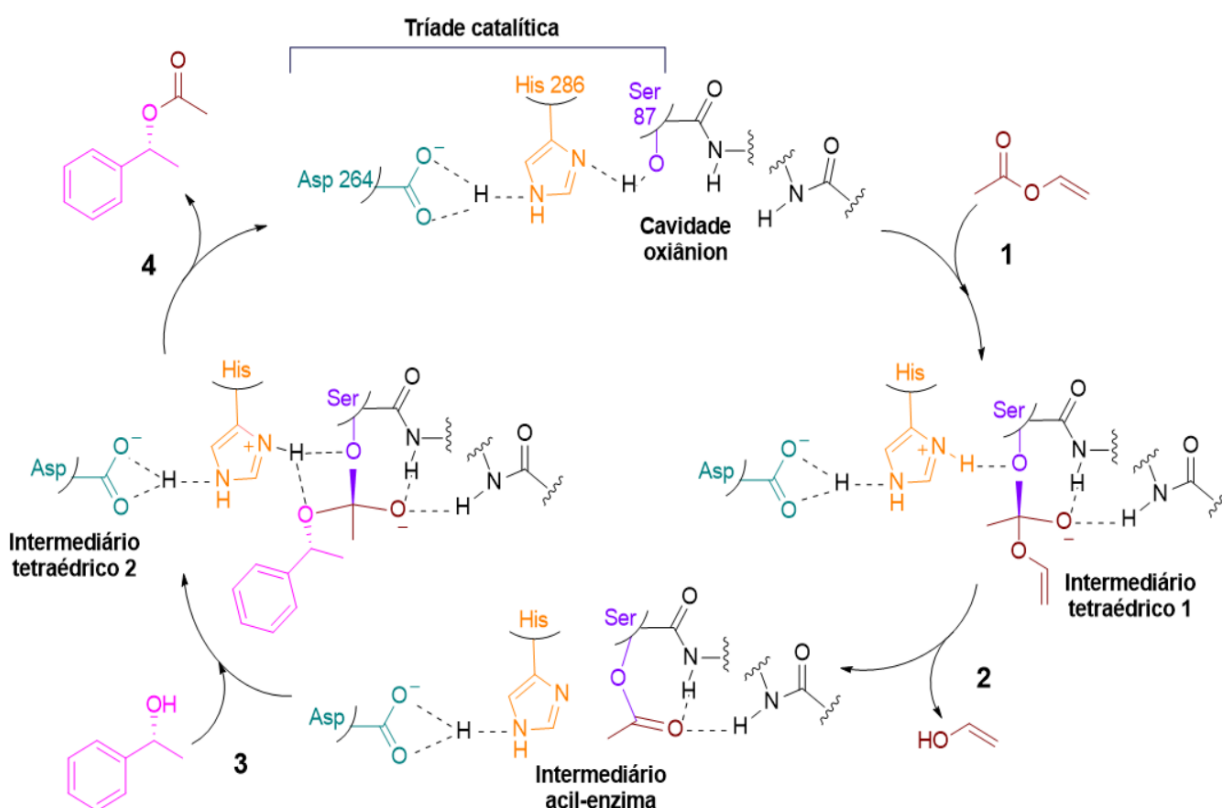
Fonte: Adaptada de (Faber, 2011, p.331).

Essas reações ocorrem no sítio catalítico das lipases, em um mecanismo intermediado por uma tríade catalítica (aspartato (Asp), histidina (His) e serina (Ser)), onde os três resíduos de aminoácidos se arranjam para promover um ataque nucleofílico a um dos enantiômeros do substrato (hidrólise) ou a um doador de grupo acila (transesterificação), formando o intermediário acil-enzima. Esse intermediário

reage com outro nucleófilo (Nu) – uma molécula de água, no caso da hidrólise, ou um dos enantiômeros do substrato, no caso da transesterificação – ocorrendo a formação do produto quiral e a regeneração da enzima (Buchholz; Kasche; Bornscheuer, 2005, p.127; De Miranda; Miranda; De Souza, 2015).

O Esquema 2 representa o ciclo catalítico da lipase de *Burkholderia cepacia* para reação de transesterificação do 1-feniletanol utilizando acetato de vinila como doador de acila. Na primeira etapa, o acetato de vinila liga-se ao sítio ativo da enzima através do ataque nucleofílico do oxigênio presente no resíduo de Serina, formando o intermediário tetraédrico 1; na segunda etapa, há liberação do etenol e forma-se o intermediário acil-enzima; na etapa 3, é gerado um intermediário tetraédrico 2, resultado do ataque nucleofílico realizado pelo (*R*)-1-feniletanol à estrutura do intermediário acil-enzima; no quarto passo, o (*R*)-acetato de 1-feniletila é formado e liberado do sítio ativo, restaurando a tríade catalítica para os próximos ciclos.

Esquema 2 – Ciclo catalítico da BCL

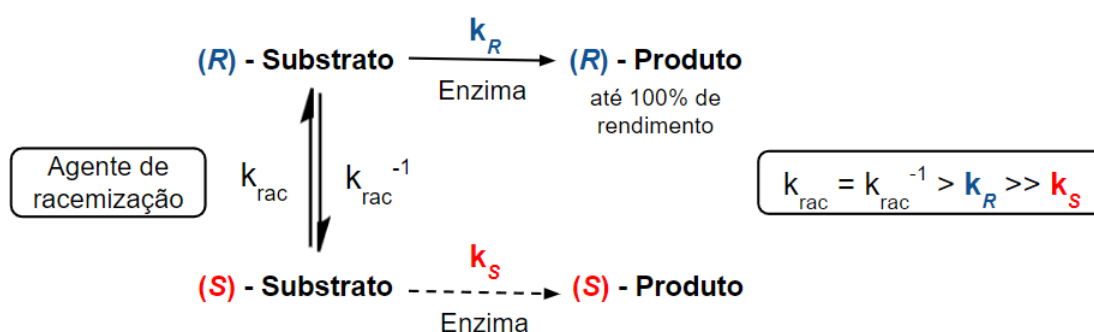


Fonte: elaborada pela Autora (2023).

1.3 Resolução cinética dinâmica quimioenzimática

Uma característica intrínseca da resolução cinética (RC) é obter um rendimento máximo de 50% de cada enantiômero partindo de uma mistura racêmica. Embora, essa limitação possa ser superada através do processo chamado resolução cinética dinâmica (RCD), o qual consiste em uma combinação da resolução cinética catalisada por enzimas com um processo de racemização *in situ* do enantiômero que não reagiu, ou seja, o rendimento máximo de um único enantiômero torna-se 100% (Figura 2). Desse modo, a RCD torna-se um processo atrativo, sendo econômico e ambientalmente favorável para o desenvolvimento de processos industriais na obtenção de compostos enantiomericamente puros a partir de racematos, pelo fato de melhorar consideravelmente a eficiência na síntese do enantiômero desejado e diminuir a geração de resíduos (Bornscheuer; Kazlauskas, 2006, p.9; De Almeida *et al.*, 2020; De Miranda; Miranda; De Souza, 2015; Ebbers *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2010).

Figura 2 – Resolução cinética dinâmica (RCD) quimioenzimática



Fonte: elaborada pela Autora (2023).

Com a aplicação de lipases, para a maioria dos substratos, tanto na RC quanto na RCD a conversão do (R)-Substrato para (R)-Produto ocorre mais rapidamente em comparação ao (S)-Substrato de modo que ($k_R \gg k_S$). A principal diferença entre esses dois processos consiste no fato de que na RCD o (S)-Substrato é continuamente racemizado, ou seja, o (R)- e o (S)-Substrato estão em equilíbrio ($k_{rac} = k_{rac}^{-1}$), permitindo que ocorra uma conversão completa dos materiais de partida (Ghanem; Aboul-Enein, 2005).

Termodinamicamente, a racemização é um processo favorável, visto que a mistura de dois enantiômeros aumenta a entropia da reação (Pàmies; Bäckvall, 2003). Entretanto, a racemização requer algumas condições: a enzima e o agente de

racemização necessitam ter temperatura e pH compatíveis; o catalisador utilizado para racemização não deve interferir na atividade enzimática, além de não interagir com o produto formado; da mesma forma que a enzima não pode diminuir ou inibir o agente de racemização (De Miranda; Miranda; De Souza, 2015; Martín-Matute; Bäckvall, 2007).

As metodologias de racemização em reações de RCD catalisadas por lipases incluem: (i) catálises básica e ácida, apresentam um escopo limitado de substratos e podem apresentar incompatibilidade com a enzima, (ii) diversos complexos metálicos, que apresentam em sua estrutura, Ru, Ir, Pd, Ni, Co, Pt, dentre outros metais, os quais, na maioria das vezes, demandam altas temperaturas e longos tempos reacionais, são ambientalmente prejudiciais e não são de baixo custo, (iii) racemização mediada pela formação de imina, a qual apresenta condição reacional branda, mas é limitada para aminoácidos (De Miranda; Miranda; De Souza, 2015).

Sendo assim, foram desenvolvidos novos agentes de racemização a fim de melhorar a biocompatibilidade com a lipase, além de serem ambientalmente mais amigáveis, como zeólitas (Li *et al.*, 2012; Shimomura *et al.*, 2015), ácidos sólidos (Wu *et al.*, 2014) e compostos contendo vanádio (De Almeida *et al.*, 2020; Takizawa; Gröger; Sasai, 2015).

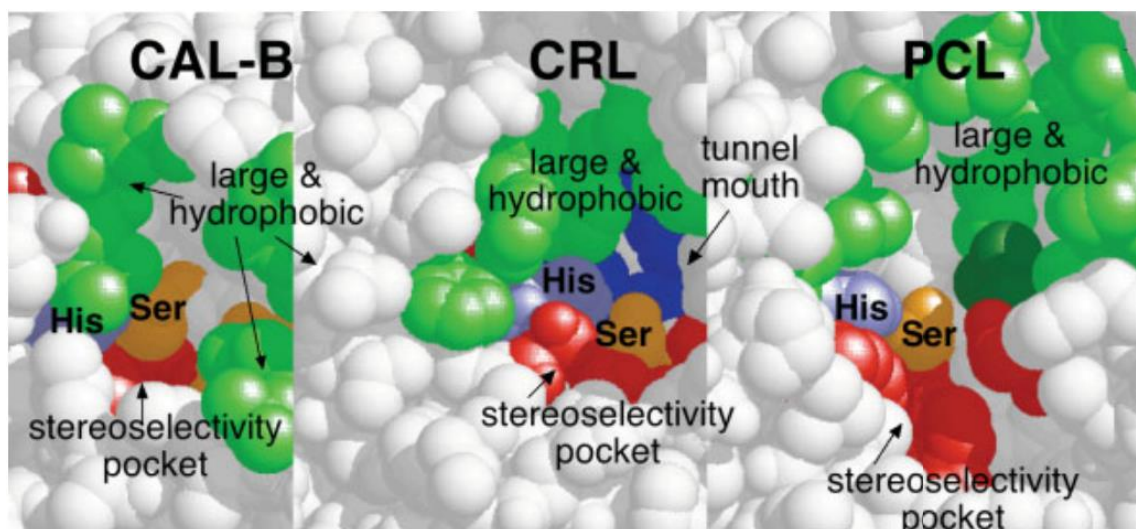
1.4 Lipase de *Burkholderia cepacia*

A lipase de *Burkholderia cepacia* (BCL) (antigamente conhecida como lipase de *Pseudomonas cepacia* - PCL) é uma enzima extracelular amplamente utilizada em processos biocatalíticos devido a sua capacidade de reagir com uma grande variedade de substratos, possuir tolerância a diversos solventes orgânicos, além da sua resistência térmica (Kordel *et al.*, 1991; Sasso *et al.*, 2016). A temperatura ótima para a BCL foi mencionada em 50°C, porém sua atividade é mantida mesmo a 75°C (Sugihara *et al.*, 1992).

A Figura 3 apresenta os sítios catalíticos das lipases de *Candida antarctica* B (CAL-B), *Candida rugosa* (CRL) e *Pseudomonas cepacia* (PCL). Comparando a forma do sítio de ligação das três enzimas, percebe-se que a CAL-B e a PCL apresentam formato de funil, enquanto o sítio de ligação da CRL assemelha-se a um túnel. Essas regiões que se ligam ao grupo acila de ésteres se diferem consideravelmente entre si: para a CRL, essa ligação ocorre no “tunnel mouth” indicado em cinza escuro; para a

CAL-B e PCL, o grupo acila se liga em uma grande porção hidrofóbica mostrada em verde, entretanto, na *Pseudomonas cepacia*, essa porção apresenta uma rede significativamente mais densa de resíduos hidrofóbicos em relação a CAL-B (Bornscheuer; Kazlauskas, 2006, p.72). Ou seja, a arquitetura sofisticada da BCL pode ser considerada um fator importante na sua atividade, eficiência e enantiosseletividade (Guieysse *et al.*, 2003).

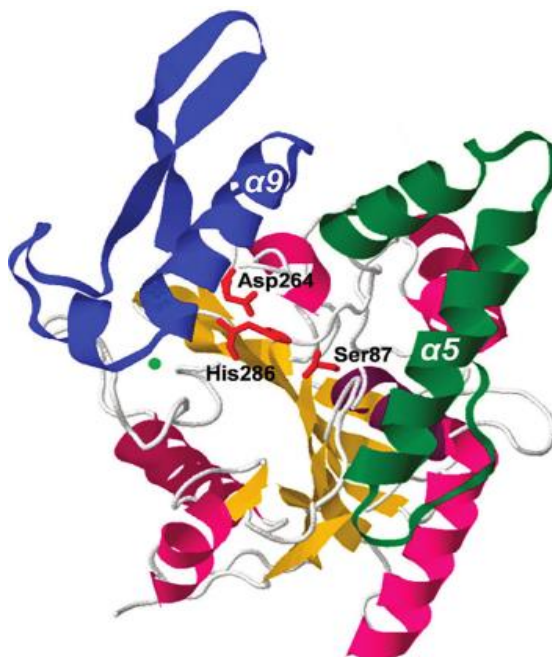
Figura 3 – Comparação dos sítios catalíticos



Fonte: (Bornscheuer; Kazlauskas, 2006, p.72).

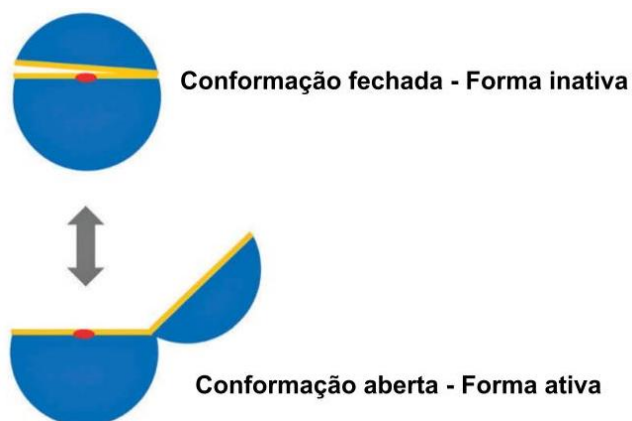
A Figura 4 mostra a estrutura da BCL em sua conformação aberta, seu sítio ativo está representado por bastões vermelhos, o qual consiste em Ser87, His286 e Asp264. As regiões azul ($\alpha 9$) e verde ($\alpha 5$) se deslocam em um movimento abre-fecha, transformando a enzima no seu estado ativo ou inativo e, assim, controlam o acesso ao sítio ativo, esse movimento é chamado de ativação interfacial, esquematizado na Figura 5, onde as partes amarela e azul indicam, respectivamente, áreas hidrofóbicas e hidrofílicas, já a parte vermelha representa o sítio ativo (Liu; Yang; & Li, 2015).

Figura 4 – Estrutura tridimensional da lipase de *Burkholderia cepacia*



Fonte: (Liu; Yang; & Li, 2015).

Figura 5 – Ativação interfacial da BCL



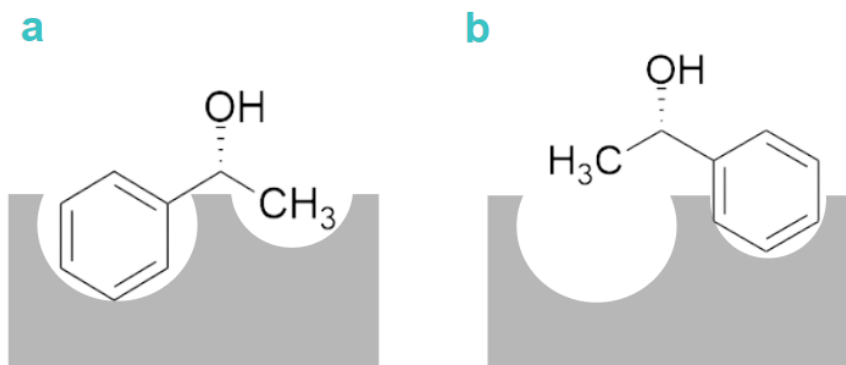
Fonte: Adaptada de (Liu; Yang; & Li, 2015).

1.5 Regra de Kazlauskas

A enantiopreferência das lipases está relacionada à uma regra empírica baseada no volume dos grupos substituintes do carbono estereogênico do substrato e o tamanho das cavidades no sítio catalítico, denominada Regra de Kazlauskas. Neste modelo, entretanto, não é possível mensurar o grau de enantiosseletividade, somente prever qual enantiômero reage mais rapidamente em resoluções cinéticas de álcoois secundários e aminas. Acerca do álcool

secundário, ao orientar a hidroxila para trás do plano, o enantiômero favorecido, em outras palavras, mais reativo, será aquele cuja estrutura melhor se acomoda no sítio catalítico (Ghanem; Aboul-Enein, 2004; Kazlauskas *et al.*, 1991).

Figura 6 – Regra de Kazlauskas aplicada ao 1-feniletanol



Fonte: Adaptada de (Ghanem; Aboul-Enein, 2004).

No caso do 1-feniletanol, o enantiômero *R* (parte **a** da Figura 6) se acomoda de forma mais eficiente no sítio ativo em comparação ao enantiômero *S* (parte **b** da Figura 6), por consequência, a velocidade de conversão do (*R*)-1-feniletanol será expressivamente maior em relação ao (*S*)-1-feniletanol.

2 OBJETIVOS

Neste projeto, foram avaliadas e otimizadas as condições reacionais de uma metodologia de resolução cinética do *rac*-1-feniletanol mediada pela lipase de *Burkholderia cepacia* em sua forma livre. O planejamento utilizado para o estudo dessa reação baseou-se na engenharia do meio reacional avaliando o efeito de diferentes doadores de acila (acetato de vinila, butirato de vinila e decanoato de vinila) e solventes (heptano, tolueno e isooctano) na enantiosseletividade da reação.

3 PARTE EXPERIMENTAL

A parte experimental inclui todos os reagentes e equipamentos utilizados, além dos procedimentos experimentais das reações feitas durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

3.1 Reagentes

A enzima utilizada durante todo o desenvolvimento deste projeto foi a Amano Lipase PS de *Burkholderia cepacia* – BCL – (Sigma-Aldrich®) (≥ 30.000 U/g) em sua forma livre.

Os reagentes, incluindo *rac*-1-feniletanol (98,0%), (*S*)-(-)-1-feniletanol (97,0%), decanoato de vinila ($>99,0\%$), butirato de vinila ($\geq 99,0\%$), isooctano ($\geq 99,0\%$), anidrido butírico (98,0%) e DMAP ($\geq 99,0\%$) foram adquiridos junto à empresa Sigma-Aldrich®. O anidrido acético (grau P.A.) foi obtido junto à empresa Vetec Química fina®, enquanto o acetato de vinila (99,0%) foi adquirido junto à empresa Alfa Aesar®. O heptano e tolueno (ambos com grau P.A.) foram adquiridos, respectivamente, junto à empresa Dinâmica® e Synth®.

3.2 Equipamentos utilizados

A fim de realizar o monitoramento das reações utilizou-se o cromatógrafo gasoso acoplado a detector por ionização em chama; para a caracterização dos produtos sintetizados foram feitas análises de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas, espectroscopia de absorção na região do infravermelho e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de Hidrogênio e de Carbono.

3.2.1 Cromatógrafo gasoso acoplado a detector por ionização em chama (CG-DIC)

As análises por Cromatografia Gasosa acoplada a Detector de Ionização de Chama (CG-DIC) foram realizadas em um cromatógrafo gasoso da marca Shimadzu® – Modelo GC-2010 Plus equipado com injetor automático AOC-20i – acoplado a um detector de ionização de chama.

Para se determinar a conversão utilizou-se a coluna capilar de sílica fundida HP-5MS UI (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) da marca Agilent Technologies®. 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 em modo split. A programação de temperatura utilizada foi de 3 minutos a 80°C, seguida de rampa de aquecimento 80-280°C a uma taxa de 30°C min⁻¹ e mantido por 5 minutos.

Para determinação dos excessos enantioméricos, as análises foram realizadas em colunas de fases estacionárias quirais Hydrodex® β-3P (25 m x 0,25 mm x 0,25 µm; **Coluna A**) da marca Macherey-Nagel® e Chirasil Dex CB® (25 m x 0,32 mm x 0,25 µm; **Coluna B**) da marca Agilent Technologies®. A **Coluna A** foi utilizada especificamente para analisar o excesso enantiomérico das reações envolvendo o decanoato de vinila, enquanto a **Coluna B** foi utilizada para análise das demais reações. Com a **Coluna A**, o cromatógrafo operou com fluxo constante de gás H₂ de 1,10 mL min⁻¹, com temperaturas no injetor e detector de 180°C. O volume de injeção das amostras foi de 1,0 µL em modo split. A programação de temperatura utilizada foi de 2 minutos a 110°C, seguida de rampa de aquecimento 110-140°C a 5°C min⁻¹ e mantido por 2 minutos, após rampa de aquecimento 140-180°C a uma taxa de 30°C min⁻¹ e mantido por 30 minutos. Já com a **Coluna B**, o cromatógrafo operou com fluxo constante de gás H₂ de 1,00 mL min⁻¹, com temperaturas no injetor e detector de 180°C. O volume de injeção das amostras foi de 1,0 µL em modo split. A programação de temperatura utilizada foi de 2 minutos a 110°C, seguida de rampa de aquecimento 110-120°C a 1°C min⁻¹ e mantido por 2 minutos, após rampa de aquecimento 120-180°C a 30°C min⁻¹ e mantido por 15 minutos.

As conversões (*c*) foram calculadas com base nas áreas obtidas para cada composto no cromatograma:

$$c (\%) = [A_{\text{produto}} / (A_{\text{substrato}} + A_{\text{produto}})] \times 100$$

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

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

3.2.2 Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM)

As análises em cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas foram feitas junto ao laboratório Nubbe 2 do Instituto de Química de Araraquara (UNESP), em cromatógrafo da marca Shimadzu® – Modelo GCMS-QP2020 equipado com injetor automático AOC-20i e fonte de ionização por elétrons com energia de ionização igual a 70 eV, cuja operação é na faixa de m/z 40-500; utilizou-se a coluna RTX-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m; Restek®). O cromatógrafo operou com fluxo constante de gás He de 1,0 mL min⁻¹, a temperatura do injetor e da interface são, respectivamente, 260°C e 280°C. A programação de temperatura utilizada foi de 3 minutos a 80°C, seguida de rampa de aquecimento 80°C-280°C a 30°C min⁻¹ e depois mantido por 5 minutos em 280°C.

3.2.3 Espectrômetro de absorção na região do infravermelho (IV)

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

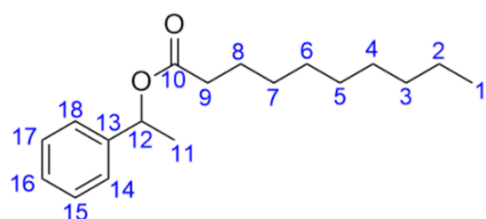
3.2.4 Espectrômetro de ressonância magnética nuclear de Hidrogênio e de Carbono (RMN de ¹H e ¹³C)

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C foram obtidos na Plataforma Instrumental de RMN do Instituto de Química de Araraquara (UNESP), Laboratório de RMN II, em espectrômetro Bruker Avance III HD 600 (14,1 T) operando na frequência de 600,13 MHz para o núcleo de hidrogênio e 150,90 MHz para o núcleo de carbono. Os sinais de deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm utilizando como padrão interno tetrametilsilano (TMS, δ = 0,00), o solvente utilizado foi CDCl₃ (δ_H = 7,24 ppm; δ_C = 77,23 ppm). Os sinais foram caracterizados como: singlete (s), duplete (d), duplo duplo duplete (ddd), tripleto (t), quarteto (q) e multiplete (m).

3.3 Síntese dos ésteres racêmicos

A partir da síntese dos seguintes ésteres racêmicos, foram realizadas as respectivas caracterizações utilizando CG-EM, IV e RMN de ^1H e ^{13}C (APÊNDICE).

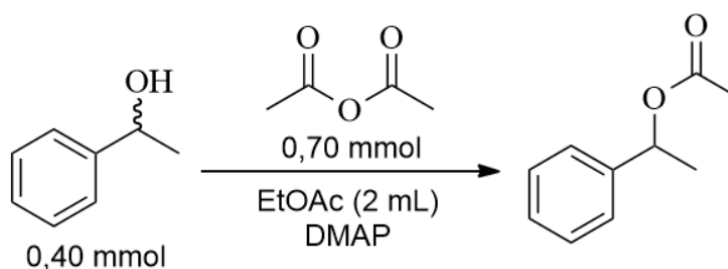
O decanoato de 1-feniletila foi previamente sintetizado pela Laíza Araujo de Almeida, doutoranda do grupo Milagre Lab.



Decanoato de 1-feniletila

F.M. $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{O}_2$; **MM** 276,41 g/mol; óleo incolor; **CG-DIC**: $t_R = 9,288$ min (HP-5MS UI); **IV** ν_{max} (cm^{-1}): 3034, 2957, 2924, 2853, 1735, 1245, 1164, 759, 697; **EM** (IE, 70 eV) m/z (abundância relativa %): 276 (1), 171 (7), 155 (11), 122 (100), 105 (96), 104 (82), 77 (14), 71 (14), 57 (15), 43 (22); **RMN de ^1H** (600,13 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0,88 (t, 3H, H_1), 1,25-1,28 (m, 16H, H_{9-2}), 1,53 (d, 3H, H_{11}), 1,62 (m, 5H, H_8), 2,32 (ddd, 2H, H_9), 5,90 (q, 1H, H_{12}), 7,35 (m, 5H, H_{14-18}); **RMN de ^{13}C** (150,90 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 14,11 (CH_3 , C_1), 22,27 (CH_3 , C_{11}), 22,67 (CH_2 , C_2), 24,99 (CH_2 , C_8), 29,11 (CH_2 , C_7), 29,25 (CH_2 , C_6), 29,42 (CH_2 , C_4), 31,86 (CH_2 , C_3), 34,65 (CH_2 , C_9), 72,01 (CH, C_{12}), 126,06 (CH, C_{14} e C_{18}), 127,78 (CH, C_{16}), 128,47 (CH, C_{15} e C_{17}), 141,88 (C_0 , C_{13}), 173,14 (C_0 , C_{10}).

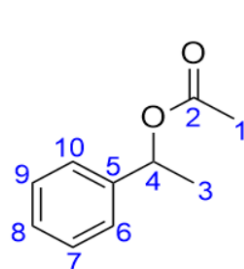
Esquema 3 – Síntese do acetato de 1-feniletila



Fonte: elaborada pela Autora (2023).

A um balão de 5 mL, adicionaram-se 50 mg de 1-feniletanol (0,40 mmol), 2 mL de acetato de etila, 66 μL de anidrido acético (0,70 mmol), 0,0031 g de DMAP. A reação foi mantida em banho de silicone a 30°C e agitação magnética por 2 horas. Após a conclusão da reação, foram adicionados 2 mL de água deionizada ao balão, a mistura foi transferida para um funil de separação e foi realizada a extração líquido-líquido. A fase orgânica recolhida foi lavada com 2 mL de salmoura e foi realizada

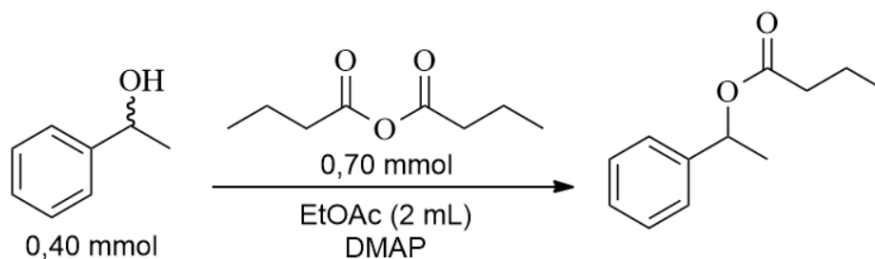
outra extração. As fases orgânicas foram recolhidas em um erlenmeyer e secas com Na_2SO_4 anidro, seguida de filtração e evaporação em rotaevaporador.



Acetato de 1-feniletila

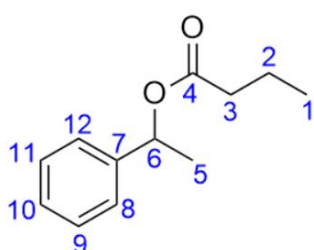
F.M. $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$; **MM** 164,20 g/mol; óleo incolor; **CG-DIC**: t_R = 5,816 min (HP-5MS UI); **IV** ν_{max} (cm^{-1}): 3088, 3064, 3034, 2982, 2933, 1745, 1230, 1207, 697; **EM** (IE, 70 eV) m/z (abundância relativa %): 164 (16), 122 (100), 107 (48), 105 (75), 104 (94), 77 (36), 43 (68); **RMN de ^1H** (600,13 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,54 (d, 3H, H_3), 2,07 (s, 3H, H_1), 5,88 (q, 1H, H_4), 7,35 (m, 5H, H_{6-10}); **RMN de ^{13}C** (150,90 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 21,57 (CH_3 , C_1), 22,41 (CH_3 , C_3), 72,52 (CH, C_4), 126,30 (CH, C_6 e C_{10}), 128,07 (CH, C_8), 128,70 (CH, C_7 e C_9), 141,89 (C_0 , C_5), 170,54 (C_0 , C_2).

Esquema 4 – Síntese do butirato de 1-feniletila



Fonte: elaborada pela Autora (2023).

A um balão de 5 mL, adicionaram-se 50 mg de 1-feniletanol (0,40 mmol), 2 mL de acetato de etila, 115 μL de anidrido butírico (0,70 mmol), 0,0030 g de DMAP. A reação foi mantida em banho de silicone a 30°C e agitação magnética por 2 horas. Após a conclusão da reação, foram adicionados 2 mL de água deionizada ao balão, a mistura foi transferida para um funil de separação e foi realizada a extração líquido-líquido. A fase orgânica recolhida foi lavada com 2 mL de salmoura e foi realizada outra extração. As fases orgânicas foram recolhidas em um erlenmeyer e secas com Na_2SO_4 anidro, seguida de filtração e evaporação em rotaevaporador.



Butirato de 1-feniletila

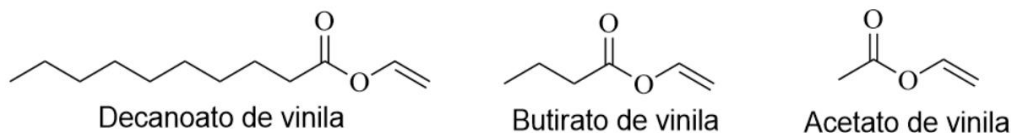
F.M. $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_2$; **MM** 192,25 g/mol; óleo incolor; **CG-DIC**: t_R = 6,846 min (HP-5MS UI); **IV** ν_{max} (cm^{-1}): 3065, 3034, 2964, 2933, 2875, 1731, 1285, 1184, 1172, 1063,

759, 697; **EM** (IE, 70 eV) m/z (abundância relativa %): 192 (12), 122 (100), 105 (96), 104 (90), 77 (25), 71 (44), 43 (37); **RMN de ^1H** (600,13 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0,93 (t, 3H, H_1), 1,54 (d, 3H, H_5), 1,66 (m, 2H, H_2), 2,32 (t, 2H, H_3), 5,90 (q, 1H, H_6), 7,35 (m, 5H, H_{8-12}); **RMN de ^{13}C** (150,90 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 13,64 (CH_3 , C_1), 18,47 (CH_3 , C_5), 22,29 (CH_2 , C_2), 36,53 (CH_2 , C_3), 72,01 (CH , C_6), 126,05 (CH , C_8 e C_{12}), 127,79 (CH , C_{10}), 128,47 (CH , C_9 e C_{11}), 141,87 (C_0 , C_7), 172,94 (C_0 , C_4).

3.4 Resolução cinética

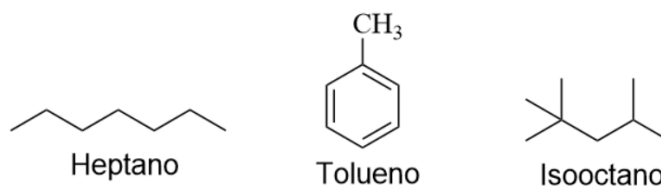
Inicialmente, avaliou-se a influência dos doadores de acila (Figura 7) e dos solventes (Figura 8) na RC do *rac*-1-feniletanol catalisada por BCL livre, partindo de condições reacionais já exploradas pelo nosso grupo de pesquisa (De Almeida *et al.*, 2020), Esquema 5. Para verificar se estava ocorrendo um processo de racemização, diante dos resultados de conversão obtidos, foi feita uma reação utilizando um enantiômero puro do 1-feniletanol.

Figura 7 – Doadores de acila escolhidos

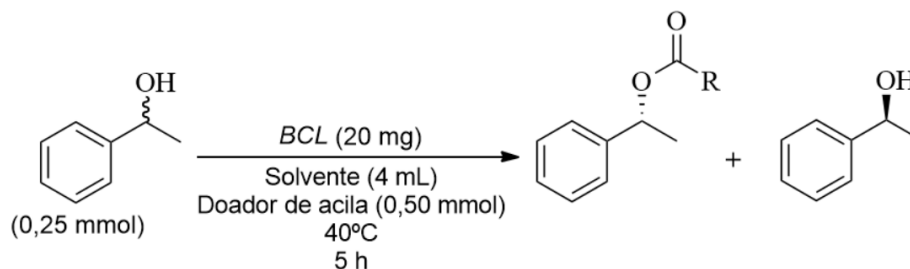


Fonte: elaborada pela Autora (2023).

Figura 8 – Solventes escolhidos



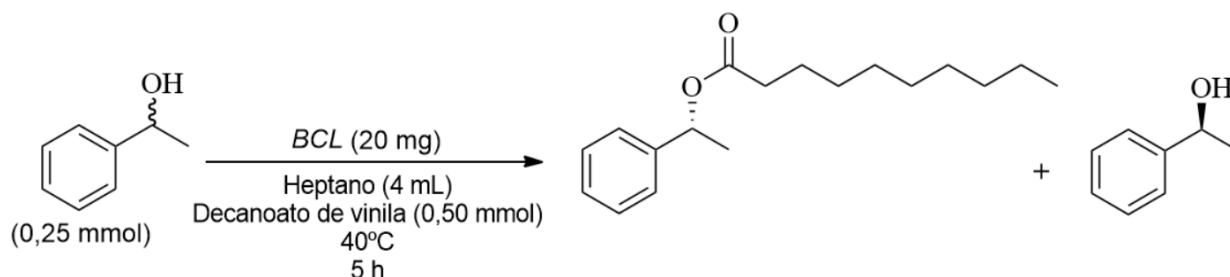
Fonte: elaborada pela Autora (2023).

Esquema 5 – Protocolo geral das reações de RC


Fonte: elaborada pela Autora (2023).

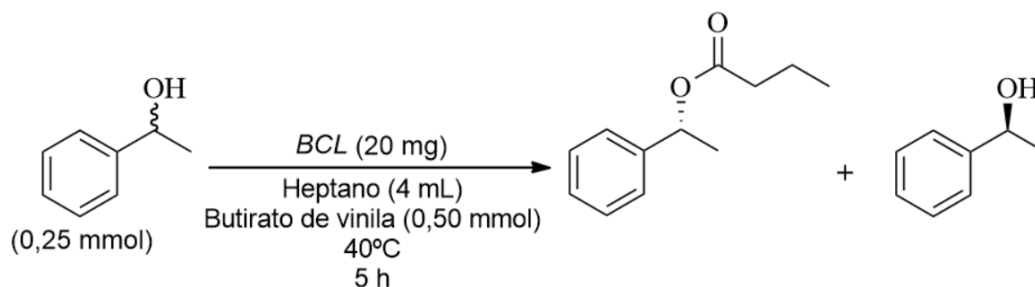
3.4.1 Triagem do doador de acila

Decanoato de vinila, butirato de vinila e acetato de vinila foram os doadores de acila escolhidos para realizar a triagem utilizando heptano como solvente.

Esquema 6 – RC utilizando decanoato de vinila


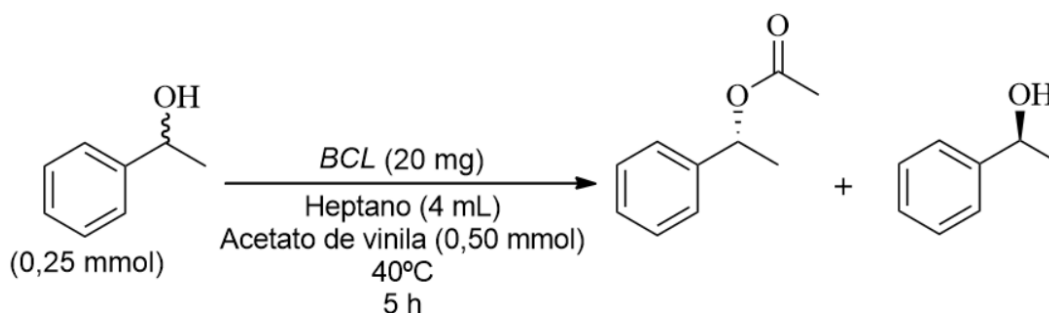
Fonte: elaborada pela Autora (2023).

A um balão de 2 bocas de 25 mL, adicionaram-se 4,0 mL de heptano, 20,0 mg de BCL, 110 μ L de decanoato de vinila (0,50 mmol), 30 μ L de 1-feniletanol (0,25 mmol). A reação foi deixada em banho de silicone a 40°C e agitação magnética por 5 horas. Em seguida, a solução foi filtrada em papel pregueado e rotaevaporada.

Esquema 7 – RC utilizando butirato de vinila

Fonte: elaborada pela Autora (2023).

A um balão de 2 bocas de 25 mL, adicionaram-se 4,0 mL de heptano, 20,0 mg de BCL, 60 μ L de butirato de vinila (0,50 mmol), 30 μ L de 1-feniletanol (0,25 mmol). A reação foi deixada em banho de silicone a 40°C e agitação magnética por 5 horas. Em seguida, a solução foi filtrada em papel pregueado e rotaevaporada.

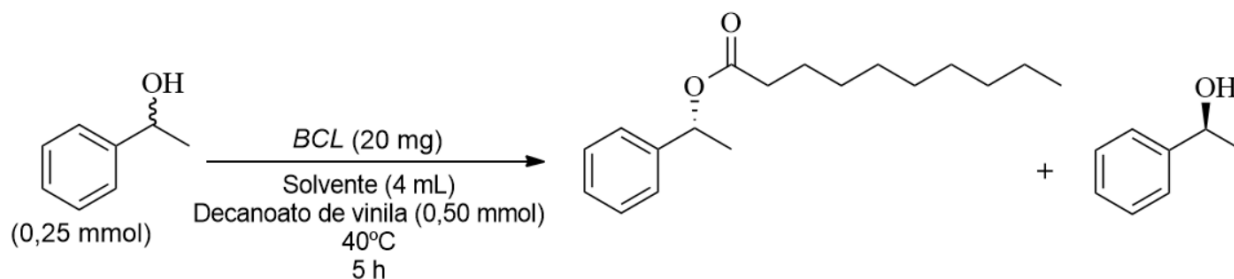
Esquema 8 – RC utilizando acetato de vinila

Fonte: elaborada pela Autora (2023).

A um balão de 2 bocas de 25 mL, adicionaram-se 4,0 mL de heptano, 20,0 mg de BCL, 45 μ L de acetato de vinila (0,50 mmol), 30 μ L de 1-feniletanol (0,25 mmol). A reação foi deixada em banho de silicone a 40°C e agitação magnética por 5 horas. Em seguida, a solução foi filtrada em papel pregueado e rotaevaporada.

3.4.2 Triagem do solvente

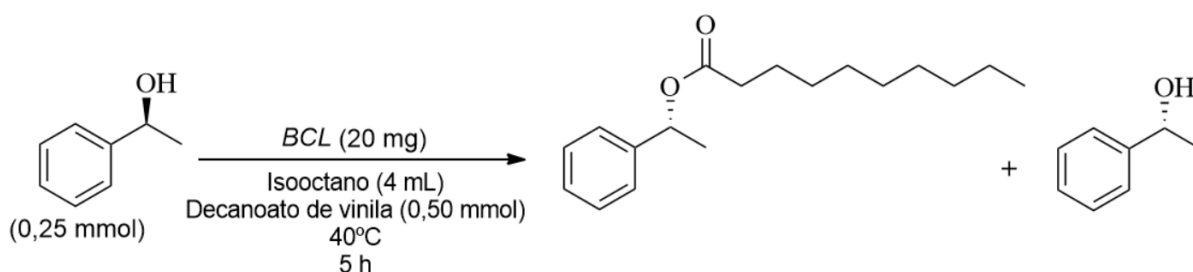
Tolueno e isooctano foram os solventes escolhidos para realizar a triagem utilizando decanoato de vinila como doador de acila.

Esquema 9 – RC envolvendo o tolueno e isooctano como solvente em cada reação

Fonte: elaborada pela Autora (2023).

A um balão de 2 bocas de 25 mL, adicionaram-se 4,0 mL de solvente (tolueno/isooctano), 20,0 mg de BCL, 110 μ L de decanoato de vinila (0,50 mmol), 30 μ L de 1-feniletanol (0,25 mmol). A reação foi deixada em banho de silicone a 40°C e agitação magnética por 5 horas. Em seguida, a solução foi filtrada em papel pregueado e rotaevaporada.

3.5 Análise do processo de racemização

Esquema 10 – Reação de verificação da racemização utilizando somente um enantiômero

Fonte: elaborada pela Autora (2023).

A um balão de 2 bocas de 25 mL, adicionaram-se 4,0 mL de isooctano, 20,0 mg de BCL, 110 μ L de decanoato de vinila (0,50 mmol), 30 μ L de (S)-(-)-1-feniletanol (0,25 mmol). A reação foi deixada em banho de silicone a 40°C e agitação magnética por 5 horas. Em seguida, a solução foi filtrada em papel pregueado e rotaevaporada.

4 RESULTADOS

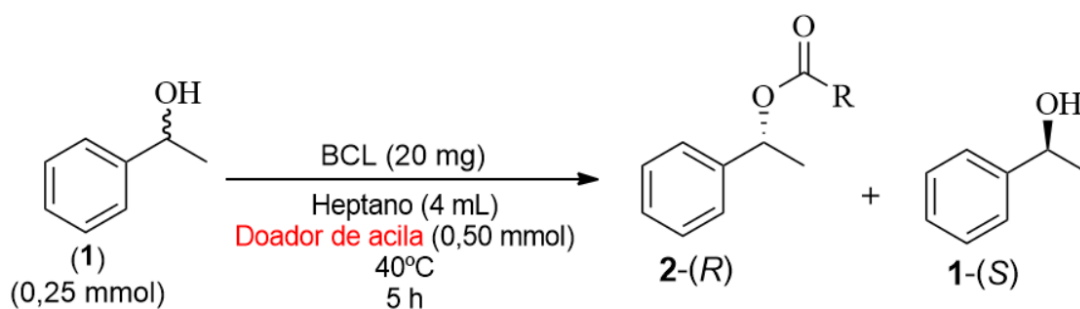
Neste trabalho, foram avaliadas e otimizadas condições reacionais de uma metodologia de resolução cinética para o 1-feniletanol utilizando lipase de *Burkholderia cepacia* em sua forma livre. A estratégia utilizada para o estudo dessa reação baseia-se na engenharia do meio reacional avaliando o efeito de diferentes doadores de acila e solventes na enantiosseletividade da reação.

4.1 Resolução cinética

O álcool escolhido como substrato modelo para estudo das condições reacionais foi o *rac*-1-feniletanol, por ser utilizado em diversos protocolos de RC e RCD realizados com outras lipases.

A princípio, avaliou-se a influência de três diferentes doadores de acila: decanoato de vinila, butirato de vinila e acetato de vinila, Esquema 11 e Tabela 1. Estes três ésteres foram selecionados com o intuito de realizar um estudo da influência do tamanho das cadeias dos grupos acila na enantiosseletividade das reações. Além disso, alguns estudos apontam que há uma relação entre cadeias acila mais longas (como a cadeia presente no decanoato de vinila) e o aumento da enantiosseletividade (Melais; Aribi-Zouiouche; Riant, 2016; Ottosson; Hult, 2001).

Esquema 21 – Representação geral da RC variando o doador de acila



Fonte: elaborada pela Autora (2023).

Tabela 1 – Triagem do doador de acila

Doador de acila	c (%)	ee 2-(R) (%)	ee 1-(S) (%)
Decanoato de vinila	71	92	64
Butirato de vinila	58	>99	>99
Acetato de vinila	55	>99	>99

Fonte: elaborada pela Autora (2023).

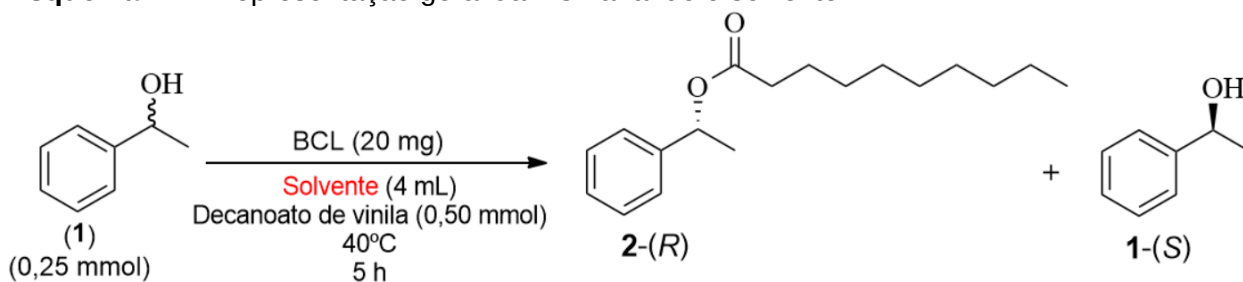
Os valores de conversão acima de 50% apresentados na Tabela 1 foram inesperados, pois em uma resolução cinética o rendimento máximo é de 50%, como apresentado na Figura 1, página 17.

Este resultado pode indicar a ocorrência de uma RCD (Figura 2, página 19) sem a necessidade da adição de um agente de racemização. Este resultado é comumente visto em metodologias de RCD; onde compostos como o sulfato de vanadila (VO_2SO_4) e o óxido de vanádio (V_2O_5) realizam a racemização de álcoois benzílicos sem a necessidade de adicionar co-catalisadores, através de um mecanismo via catálise ácida, ocorrendo a formação de carbocátion (De Almeida *et al.*, 2020; Wuyts *et al.*, 2007).

Consequentemente, esperava-se realizar uma resolução cinética, dessa forma, esperava-se obter uma conversão de até 50% ou próxima desse valor, tendo em vista que nenhum agente de racemização adicionado à reação. Entretanto, o valor da conversão utilizando o decanoato de vinila ultrapassou em 21% do valor esperado.

Com o decanoato de vinila obteve-se a maior conversão (71%) e ee do produto **2-(R)** ((*R*)-decanoato de 1-feniletila) de 92%. Diante deste surpreendente resultado que pode indicar a racemização de **1-(S)** ((*S*)-1-feniletanol), optamos por realizar a otimização das condições reacionais desta reação: avaliando a escolha do melhor solvente.

Portanto, seguimos o estudo com este doador de acila, agora avaliando diferentes solventes (tolueno e isooctano) com o objetivo de aumentar os valores de conversão (c) e excesso enantiomérico (ee) do protocolo (Tabela 2). Na reação representada no Esquema 12, apenas o solvente foi variado.

Esquema 12 – Representação geral da RC variando o solvente

Fonte: elaborada pela Autora (2023).

Tabela 2 – Triagem do solvente

Solvente	c (%)	ee 2-(R) (%)	ee 1-(S) (%)
Tolueno	83	>99	57
Isooctano	93	>99	>99

Fonte: elaborada pela Autora (2023).

Foram avaliados três solventes orgânicos: heptano, tolueno e isooctano. A escolha dos solventes levou em consideração o Guia de seleção de solventes GlaxoSmithKine (GSK), Figura 9, esse guia é apoiado por uma tabela que identifica que indica regiões de alerta nas seguintes categorias: resíduos, impacto ambiental, inflamabilidade e risco de explosão, riscos à saúde, estabilidade/reatividade, pontuação do ciclo de vida e um sinalizador de legislação que indica quaisquer restrições regulatórias. Além desses solventes não apresentarem grandes problemas, também são compatíveis com os substratos e produtos de interesse desse projeto, não são reativos com o sistema quimioenzimático e são facilmente removidos ao final da reação.

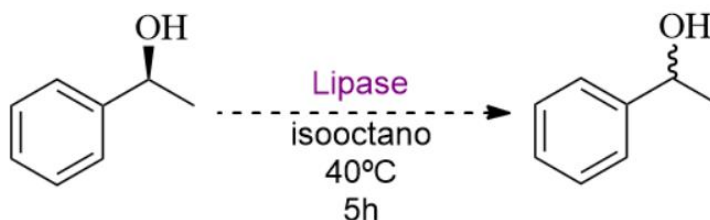
enantiômero (S)-1-feniletanol, o qual pode ser mediado pela própria enzima ou pelo doador de acila.

4.2 Análise do processo de racemização

Este resultado apresentado foi muito intrigante, pois não existe nenhum relato na literatura relativo a uma metodologia de RCD sem a participação de um catalisador de racemização. Então, o nosso grupo de pesquisa realizou um estudo para avaliar se o processo de RCD estava realmente ocorrendo. Este estudo foi coordenado pela doutoranda Laíza Araujo de Almeida, coorientadora deste trabalho.

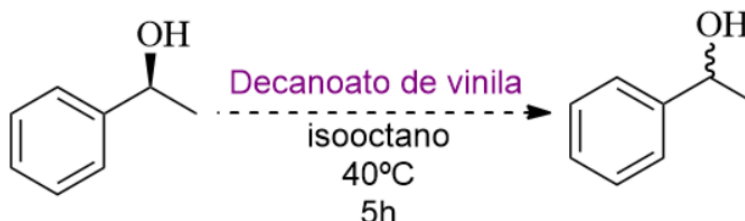
Para comprovar se a RCD estava ocorrendo, precisaríamos avaliar como o processo de racemização poderia estar acontecendo. Para isto, avaliamos a racemização do (S)-(-)-1-feniletanol com os componentes do meio reacional: a enzima e o doador de acila. Realizamos dois experimentos: o primeiro na presença da enzima sem o doador de acila (Esquema 13) e segundo na presença do doador de acila sem a presença da enzima (Esquema 14), como apresentado nos esquemas abaixo.

Esquema 13 – Reação na presença da enzima



Fonte: elaborada pela Autora (2023).

Esquema 14 – Reação na presença do decanoato de vinila

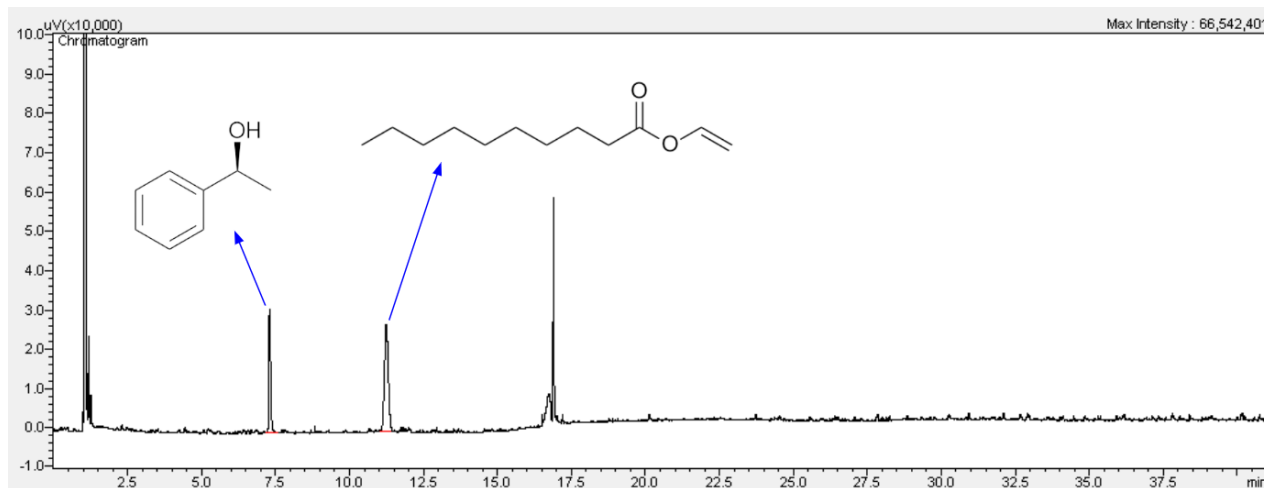


Fonte: elaborada pela Autora (2023).

Com os experimentos realizados verificamos que nenhum dos componentes reacionais, enzima ou doador de acila, estavam realizando a etapa de racemização.

Utilizou-se a coluna quiral Chirasil Dex CB® para determinar se de fato ocorreu um processo de racemização do (S)-(-)-1-feniletanol na presença do doador de acila sem a enzima, através de uma análise de conversão.

Figura 10 – Cromatograma da reação na presença do doador de acila



Fonte: elaborada pela Autora (2023).

O cromatograma apresenta um pico com $t_R = 7,298$ min que corresponde ao (S)-(-)-1-feniletanol, o outro pico com $t_R = 11,243$ min representa o decanoato de vinila. Portanto, não houve um processo de racemização do (S)-(-)-1-feniletanol, porque o resultado do cromatograma não apresenta a formação do (R)-decanoato de 1-feniletila.

Este resultado nos deixou intrigados e fomos analisar o rendimento reacional e não apenas a conversão analisada pelo cromatograma por CG-DIC. E esta análise nos levou a observação muito importante: o rendimento estava abaixo de 50% e apenas o éster era recuperado e o perfil do produto bruto era o mesmo da alíquota reacional.

Como estávamos sintetizando um éster de cadeia longa e o solvente utilizado era apolar, fomos verificar se estava ocorrendo o fenômeno de partição, onde o substrato que era polar (um álcool) estava sendo adsorvido pela enzima e o produto (um éster de cadeia longa) estava ficando disperso no meio reacional. Então adicionamos o éster e o álcool com o isooctano e a BCL e verificamos que o éster ficava dissolvido no meio reacional. Filtramos a enzima e adicionamos acetato de etila sob agitação por 2 horas e verificamos a presença do álcool.

O processo de partição entre o substrato e o produto estava mascarando o valor de conversão da reação. Este processo ocorreu pelo fato de estarmos utilizando a BCL em sua forma livre. As lipases de *Candida antarctica* CAL-A e CAL-B já foram utilizadas em nosso grupo de pesquisa imobilizadas em diferentes suportes e o processo de partição não foi observado mesmo para ésteres de cadeia longa (De Almeida *et al.*, 2020).

Analisando a Tabela 1 novamente, à luz destes novos experimentos, verificamos que a partição ocorreu para os demais ésteres, porém em menor escala.

Portanto, como perspectiva futura deste trabalho será explorada a imobilização da BCL em diferentes suportes de modo a eliminar o fenômeno de partição.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, realizou-se uma investigação diante de um possível processo de racemização do (S)-(-)-1-feniletanol sem a adição de um catalisador. A fim de comprovar se a RCD estava realmente ocorrendo, foram feitas duas reações: a primeira utilizando a enzima sem a presença do decanoato de vinila, a segunda utilizando o decanoato de vinila sem a presença da enzima; constatou-se que nenhum componente reacional estava realizando a racemização.

Ao analisar o rendimento reacional, observou-se que estava abaixo de 50%, indicando que o álcool, caráter polar, foi adsorvido pela enzima, cujos aminoácidos são majoritariamente polares; já o éster, (*R*)-decanoato de 1-feniletila, de caráter apolar ficava disperso nos solventes utilizados (heptano, tolueno e isooctano), todos apolares, ou seja, o fenômeno de partição entre o substrato (álcool) e o produto (éster) estava eclipsando os valores de conversão dos experimentos.

É necessário destacar que os valores de excessos enantioméricos obtidos foram excelentes, sendo a maioria deles >99%, além disso, o decanoato de vinila e o isooctano foram, respectivamente, os melhores doador de acila e solvente para a metodologia desenvolvida neste trabalho de RC para o 1-feniletanol utilizando lipase de *Burkholderia cepacia* em sua forma livre.

REFERÊNCIAS

AGRANAT, I.; WAINSCHEIN, S. R.; ZUSMAN, E. Z. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, p. 972–973, 2012.

ALDER, C. M.; HAYLER, J. D.; HENDERSON, R. K.; REDMAN, A. M.; SHUKLA, L.; SHUSTER, L. E.; SNEDDON, H. F. Updating and further expanding GSK's solvent sustainability guide. **Green Chemistry**, v. 18, p. 3879–3890, 2016.

BORNSCHEUER, U. T.; KAZLAUSKAS, R. J. **Hydrolases in Organic Synthesis Regio- and Stereoselective Biotransformations**. Weinheim: Wiley-VCH, 2006. p. 9, 72.

BUCHHOLTZ, K.; KASHE, V.; BORNSCHEUER, U. T. **Biocatalysts and Enzyme Technology**. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. p. 29, 127.

CHEN, B.-S.; De SOUZA, F. Z. R. Enzymatic synthesis of enantiopure alcohols: current state and perspectives. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 9, p. 2102–2115, 2019.

CHEN, H.; MENG, X.; XU, X.; LIU, W.; LI, S. The molecular basis for lipase stereoselectivity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 3487–3495, 2018.

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 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.

EBBERS, E. J.; ARIAANS, G. J. A.; HOUBIERS, J. P. M.; BRUGGINK, A.; ZWANENBURG, B. Controlled Racemization of Optically Active Organic Compounds: Prospects for Asymmetric Transformation. **Tetrahedron**, v. 53, p. 9417–9476, 1997.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2011. p. 5, 39, 331.

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

GHANEM, A.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 15, p. 3331–3351, 2004.

GUIEYSSE, D.; SALAGNAD, C.; MONSAN, P.; -SIMEON, M. R.; TRAN, V. Towards a novel explanation of *Pseudomonas cepacia* lipase enantioselectivity via molecular modelling of the enantiomer trajectory into the active site. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, p. 1807–1817, 2003.

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*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 56, p. 2656–2665, 1991.

KORDEL, M.; HOFMANN, B.; SCHOMBURG, D.; SCHMID, R. D. Extracellular Lipase of *Pseudomonas* sp. Strain ATCC 21808: Purification, Characterization, Crystallization, and Preliminary X-Ray Diffraction Data. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 4836–4841, 1991.

LEE, J. H.; HAN, K.; KIM, M. -J.; PARK, J. Chemoenzymatic Dynamic Kinetic Resolution of Alcohols and Amines. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2010, p. 999–1015, 2010.

LI, X.; SHI, Y.; WANG, Z.; ZHANG, Y.; TANG, Y. Catalytic performance of H- β nanozeolite microspheres in one-pot dynamic kinetic resolution of aromatic secondary alcohols. **Journal of Catalysis**, v. 288, p. 24–32, 2012.

LIU, J.; YANG, Q.; LI, C. Towards efficient chemical synthesis via engineering catalysis in biomimetic nanoreactors. **Chemical Communications**, v. 51, p. 13713–13856, 2015.

MARTÍN-MATUTE, B.; BÄCKVALL, J. -E. Dynamic kinetic resolution catalyzed by enzymes and metals. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, p. 226–232, 2007.

MELAIS, N.; ARIBI-ZOUIOUECHE, L.; RIAANT, O. The effect of the migrating group structure on enantioselectivity in lipase-catalyzed kinetic resolution of 1-phenylethanol. **Comptes Rendus Chimie**, v. 19, p. 971–977, 2016.

MOISĂ, M. E.; POPPE, L.; GAL, C. A.; BENCZE, L. C.; IRIMIE, F. D.; PAIZS, C.; PETER, F.; TOȘA, M. I. Click reaction-aided enzymatic kinetic resolution of secondary alcohols. **Reaction Chemistry & Engineering**, v. 3, p. 790–798, 2018.

NETO, L. G.; MILAGRE, C. D. F.; MILAGRE, H. M. S. Enantioselective transesterification of a propargyl tertiary alcohol by *Candida antarctica* lipase A: A reaction medium engineering approach. **Results in Chemistry**, v. 5, p. 1–6, 2023.

OTTOSSON, J.; HULT, K. Influence of acyl chain length on the enantioselectivity of *Candida antarctica* lipase B and its thermodynamic components in kinetic resolution of sec-alcohols. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 1025–1028, 2001.

PÀMIES, O.; BÄCKVALL, J. -E. Combination of enzymes and metal catalysts. A powerful approach in asymmetric catalysis. **Chemicals Reviews**, v. 103, p. 3247–3261, 2003.

SASSO, F.; NATALELLO, A.; CASTOLDI, S.; LOTTI, M.; SANTAMBROGIO, C.; GRANDORI, R. *Burkholderia cepacia* lipase is a promising biocatalyst for biofuel production. **Biotechnology Journal**, v. 11, p. 954–960, 2016.

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

SHIMOMURA, K. -I.; HARAMI, H.; MATSUBARA, Y.; NOKAMI, T.; KATADA, N.; ITOH, T. Lipase-mediated dynamic kinetic resolution (DKR) of secondary alcohols in the presence of zeolite using an ionic liquid solvent system. **Catalysis Today**, v. 255, p. 41–48, 2015.

STYMIEST, J. L.; BAGUTSKI, V.; FRENCH, R. M.; AGGARWAL, V. K. Enantiodivergent conversion of chiral secondary alcohols into tertiary alcohols. **Nature**, v. 456, p. 778–782, 2008.

SUGIHARA, A.; UESHIMA, M.; SHIMADA, Y.; TSUNASAWA, S.; & TOMINAGA, Y. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Pseudomonas cepacia*. **Journal of Biochemistry**, v. 112, p. 598–603, 1992.

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

VERHO, O.; BÄCKVALL, J. -E. Chemoenzymatic Dynamic 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.

WU, J. -P; MENG, X.; WANG, L.; XU, G.; YANG, L. -R. Highly efficient dynamic kinetic resolution of secondary aromatic alcohols at low temperature using a low-cost sulfonated sepiolite as racemization catalyst. **Tetrahedron Letters**, v. 55, p. 5129–5132, 2014.

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.

APÊNDICE – CARACTERIZAÇÃO DOS ÉSTERES RACÊMICOS

Figura 1A – Espectro de absorção na região do infravermelho do acetato de 1-feniletila

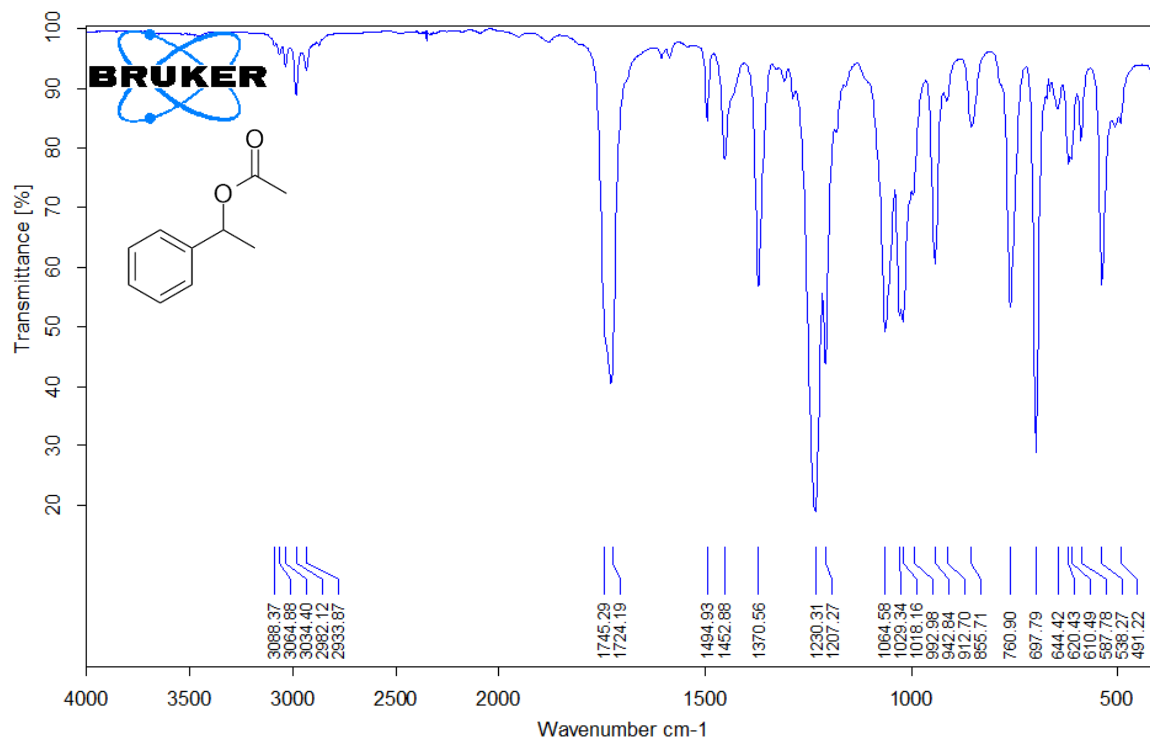


Figura 2A – Espectro de massas (IE, 70 eV) do acetato de 1-feniletila

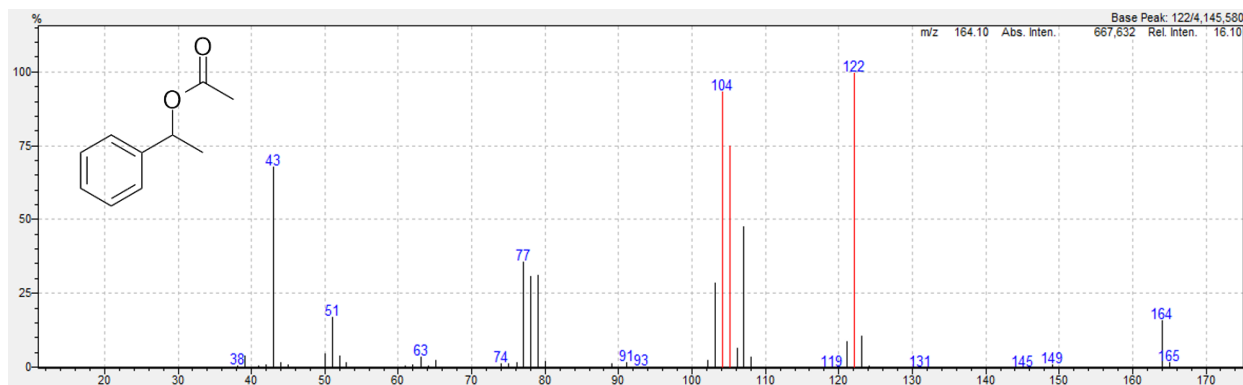


Figura 3A – Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, CDCl_3) do acetato de 1-feniletila

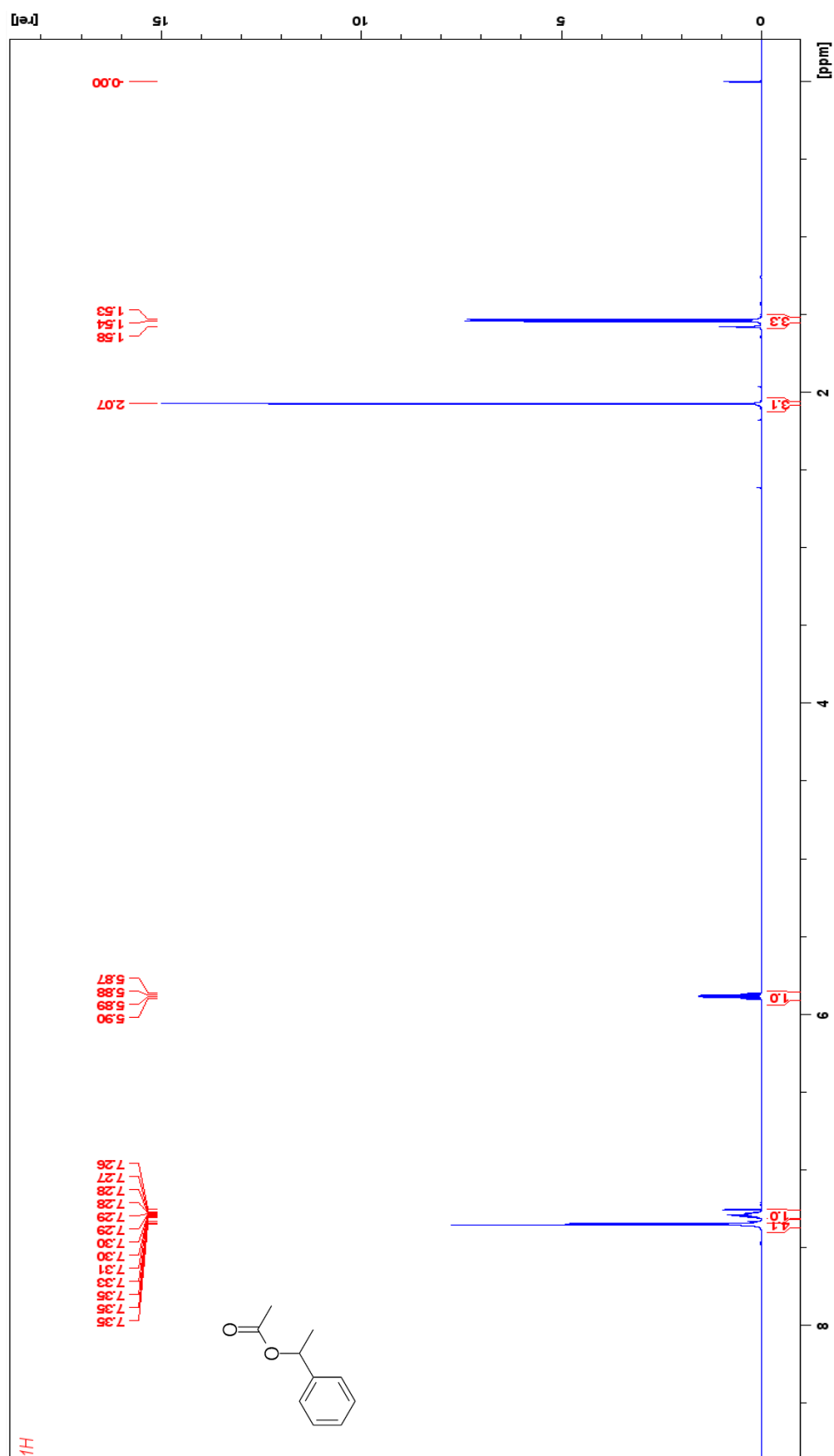


Figura 4A – Espectro de RMN de ^{13}C (600,13 MHz, CDCl_3) do acetato de 1-feniletila

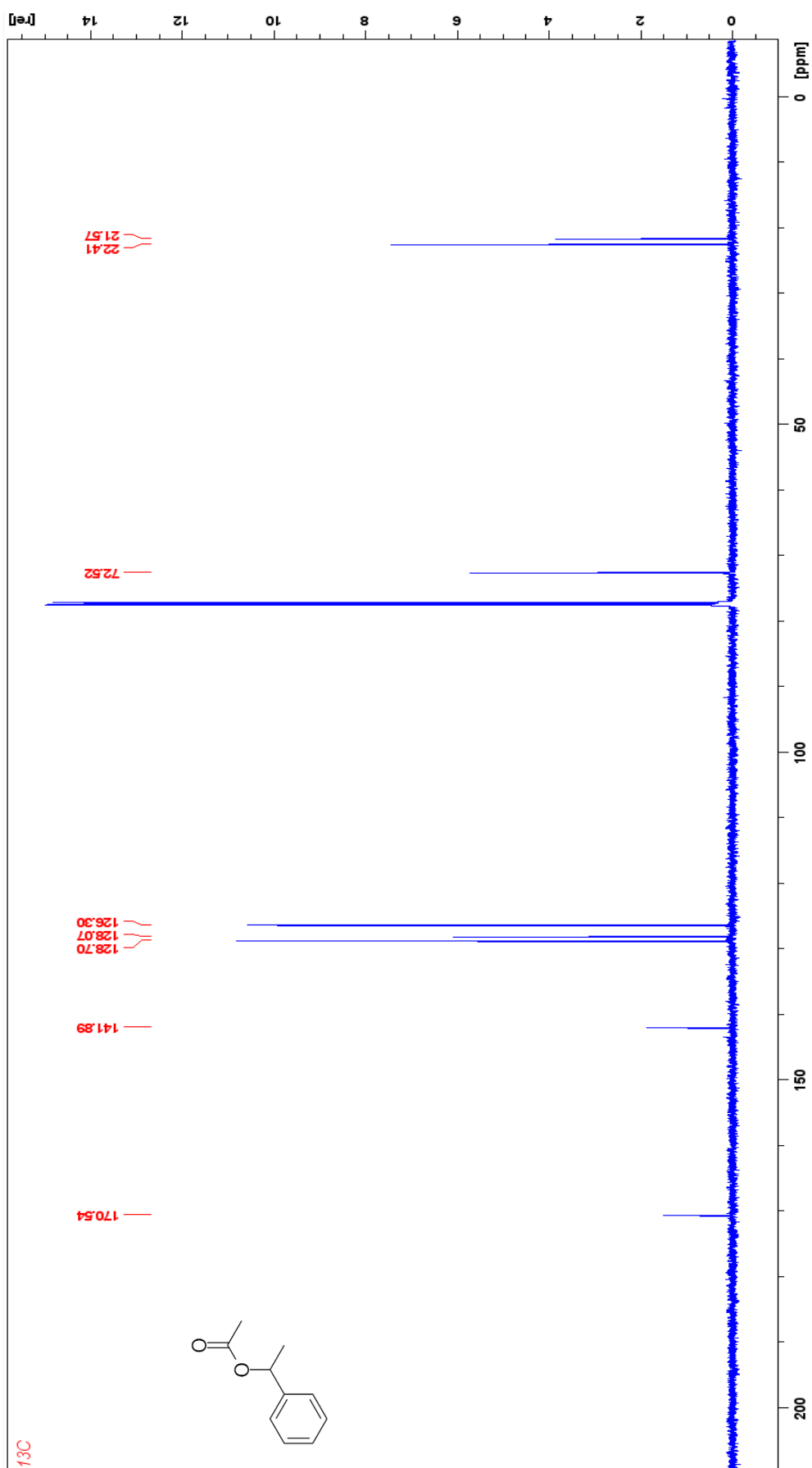


Figura 5A – Espectro de absorção na região do infravermelho do butirato de 1-feniletila

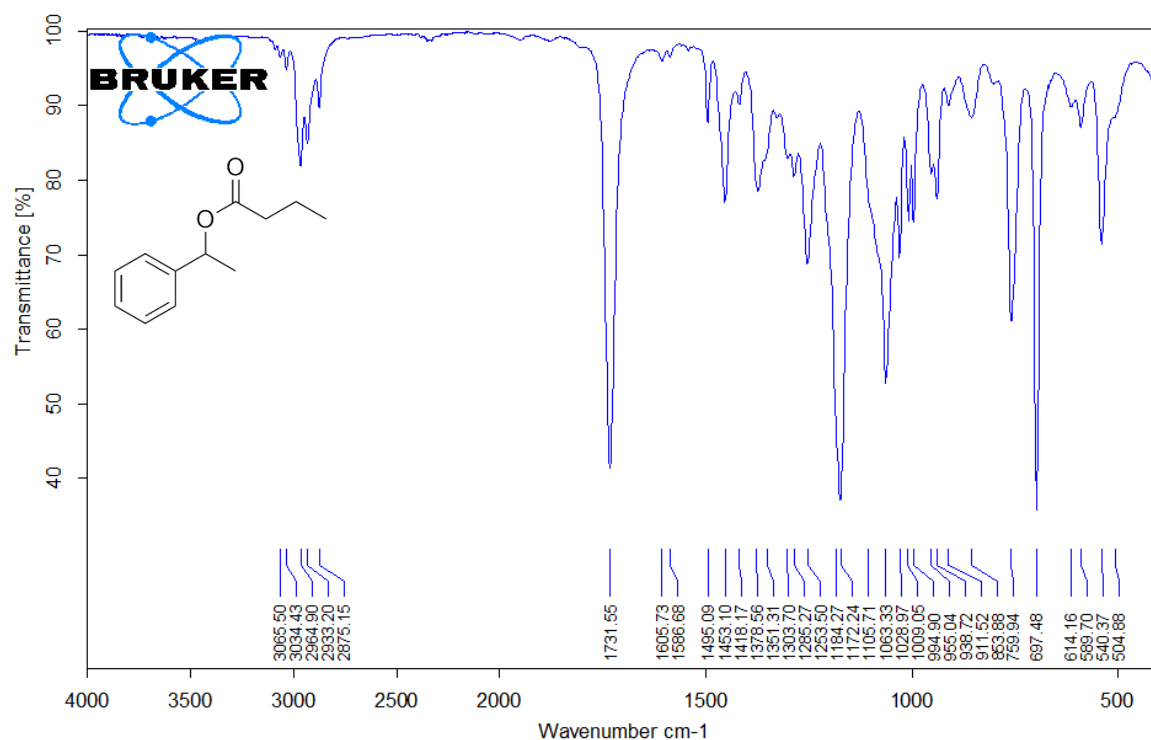


Figura 6A – Espectro de massas (IE, 70 eV) do butirato de 1-feniletila

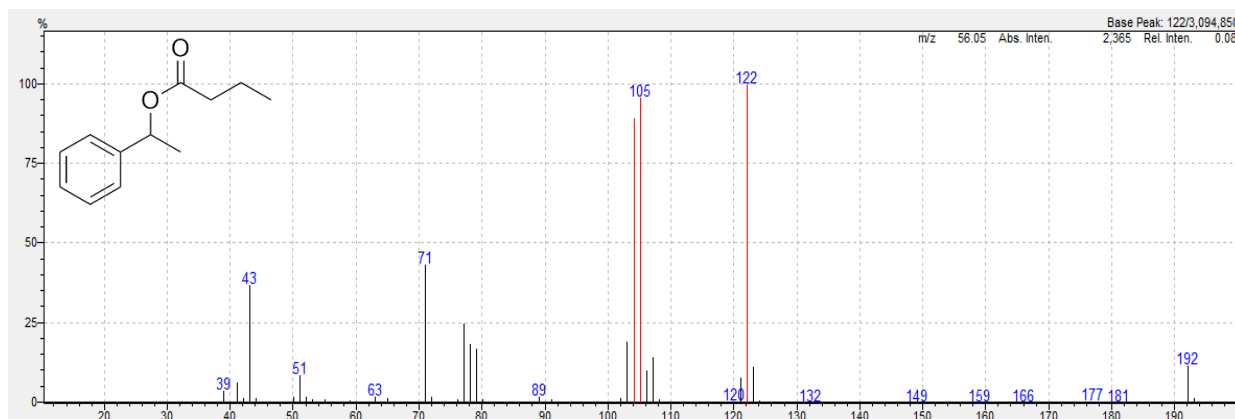


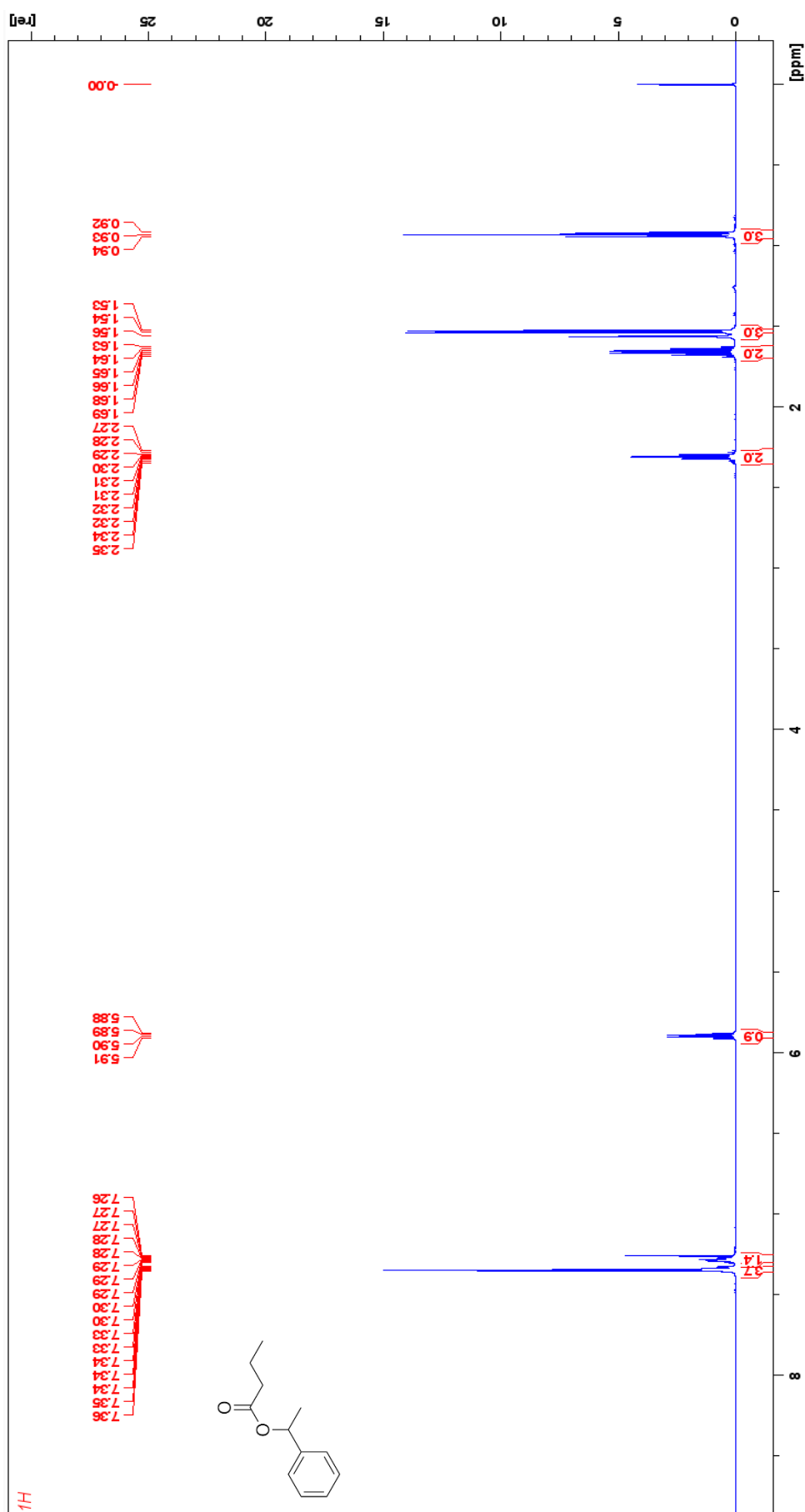
Figura 7A – Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, CDCl_3) do butirato de 1-feniletila

Figura 8A – Espectro de RMN de ^{13}C (600,13 MHz, CDCl_3) do butirato de 1-feniletila

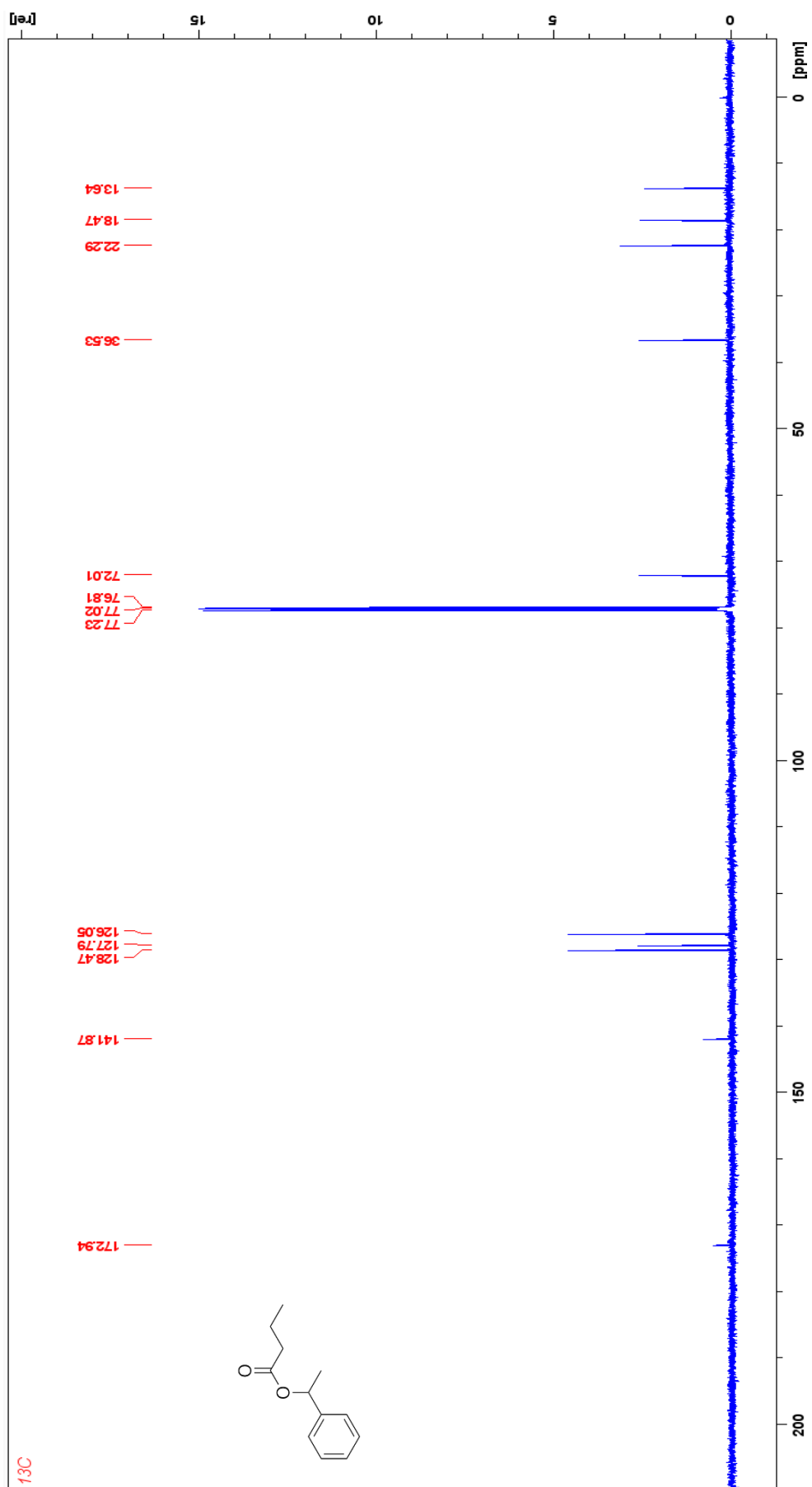


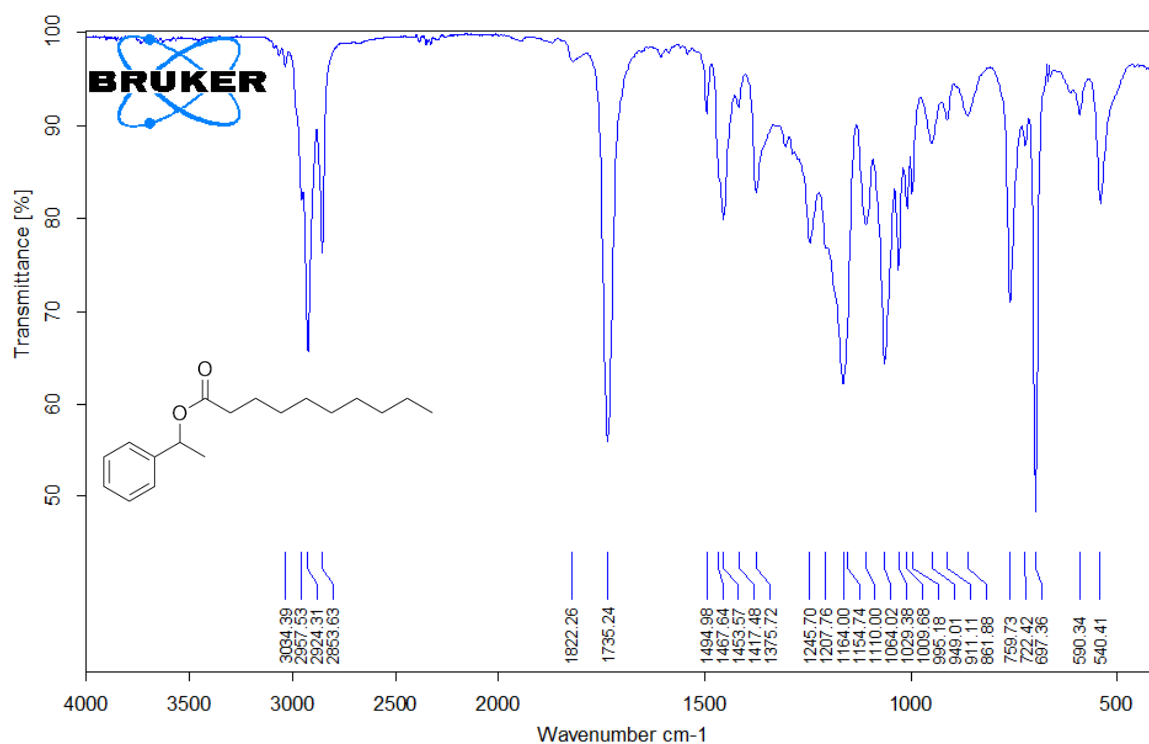
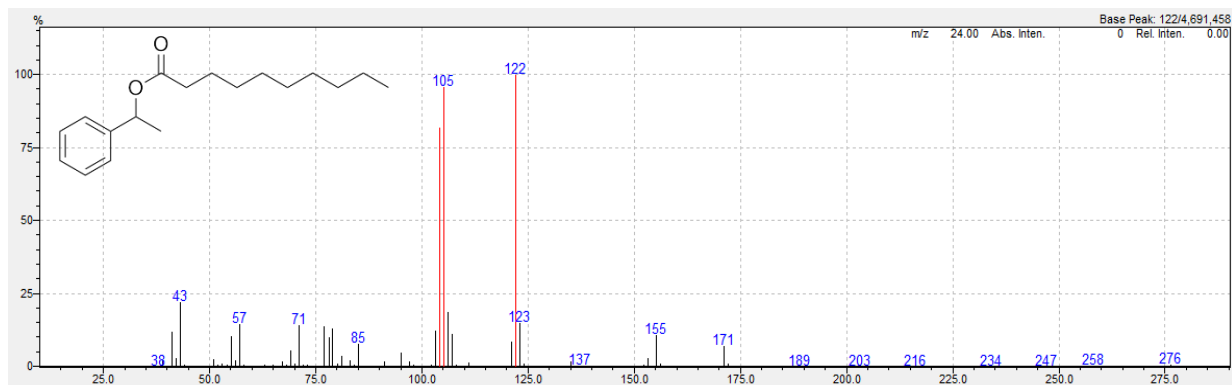
Figura 9A – Espectro de absorção na região do infravermelho do decanoato de 1-feniletila**Figura 10A** – Espectro de massas (IE, 70 eV) do decanoato de 1-feniletila

Figura 11A – Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, CDCl_3) do decanoato de 1-feniletila

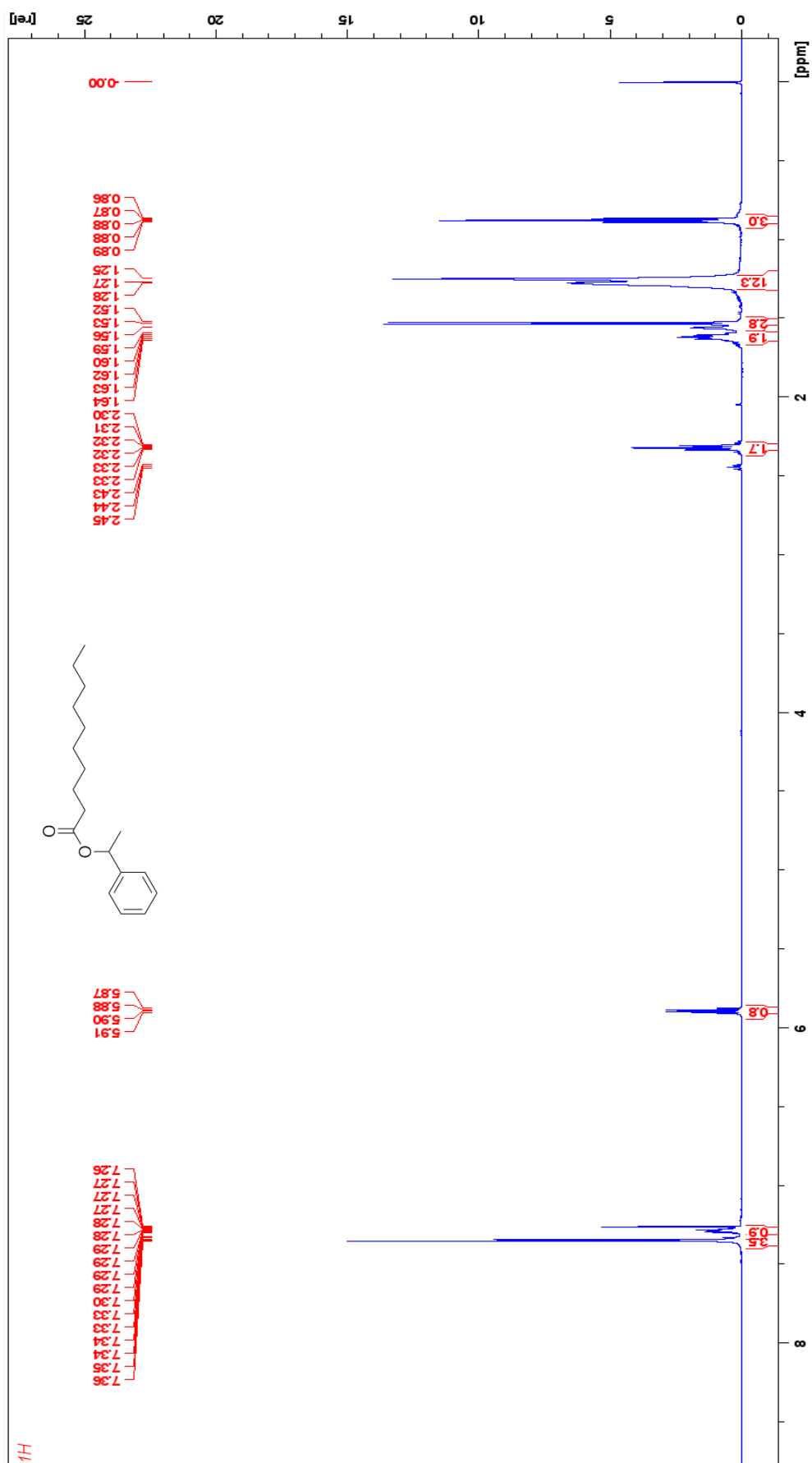


Figura 12A – Espectro de RMN de ^{13}C (600,13 MHz, CDCl_3) do decanoato de 1-feniletila

