

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E QUÍMICA ORGÂNICA

Pedro Franco de Souza

Estudo de Resolução Cinética enzimática do álcool 1-tetralol sob regime
de fluxo contínuo

Monografia apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Bacharel em
Química.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre

ARARAQUARA

2022

Souza, Pedro Franco de.

Estudos de resolução cinética enzimática do
álcool terciário 1-tetralol sob regime de fluxo
contínuo/ Pedro Franco de Souza, 2022

52 f. : il.

Orientador: Humberto Márcio Santos Milagre

Monografia (Graduação)-Universidade Estadual
Paulista (Unesp). Instituto de Química,
Araraquara, 2022

1. Resolução cinética enzimática. 2. Fluxo
contínuo. 3. Álcool terciário. I. Universidade
Estadual Paulista. Instituto de Química. II.
Título.

Estudos de resolução cinética enzimática do álcool terciário 1-tetralol sob regime de fluxo contínuo

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, 18 de janeiro de 2023

Banca examinadora

Documento assinado digitalmente
 HUMBERTO MARCIO SANTOS MILAGRE
Data: 18/01/2023 11:59:55-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

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

Documento assinado digitalmente
 IAN CASTRO GAMBOA
Data: 18/01/2023 12:45:11-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

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

Documento assinado digitalmente
 ISABELE RODRIGUES NASCIMENTO
Data: 18/01/2023 15:12:31-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento
Instituto de Química - UNESP, Araraquara

Para Andrea, Enilson, Edna e Fábio

AGRADECIMENTOS

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

À Profa. Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre, pelo incentivo e confiança.

À Ma. Laíza Araújo de Almeida, pela amizade, paciência e auxílio durante a realização deste trabalho.

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

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

Aos funcionários do Instituto de Química.

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

À CAPES pela manutenção do Portal de Periódicos.

Aos meus familiares, por todo o apoio e incentivo para que eu conseguisse chegar até aqui.

Aos meus grandes amigos e companheiros pelo apoio e confiança: Júlia Pavan, Beatriz Lage, Henrique Pelissari, Arthur Sakai, Júlia Celani e Caio Mortati.

“Dreams shape the world” - Neil Gaiman - Dream Country

RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvido um reator biocatalítico de leito fixo para utilização em uma reação de resolução cinética enzimática em fluxo contínuo de um álcool terciário bicíclico catalisada pela lipase A de *Candida antarctica*. Após o design e montagem do biorreator, foi proposto um protocolo de resolução cinética do substrato 1-tetralol e, juntamente a isso, foram fixados parâmetros (temperatura, concentração de substrato) e modificados outros parâmetros reacionais com a finalidade de otimizar este processo. O primeiro parâmetro analisado foi a escolha do composto atuante como doador de acila, onde foi possível avaliar o comportamento da reação na presença de dois doadores diferentes. Após isso, realizou-se um estudo da influência da taxa de fluxo aplicada ao sistema, o tempo de residência associado e como a variação desse parâmetro altera a cinética da reação. Então, realizou-se também uma análise da influência do solvente utilizado sobre a eficácia do sistema, repetindo a reação de resolução cinética na presença de um escopo de solventes de polaridades distintas. A melhor condição obtida para a realização da resolução foi utilizando butirato de vinila como doador de acila, a uma taxa de fluxo de 3 mL/h e usando isooctano como solvente. Os dados obtidos se mostraram muito promissores e o resultado da condição ótima alcançada é, atualmente, o melhor resultado reportado na literatura de resolução cinética enzimática com o substrato utilizado. Dessa forma, a utilização do reator biocatalítico e das condições reacionais estudadas se mostra como uma excelente estratégia na aplicação de resolução de centros assimétricos em blocos construtores de diversas moléculas.

Palavras chave: resolução cinética enzimática, fluxo contínuo, álcool terciário

ABSTRACT

In this work, a packed-bed biocatalytic reactor was developed for use in an enzymatic kinetic resolution reaction in continuous flow of a tertiary bicyclic alcohol catalyzed by lipase A from *Candida antarctica*. After the design and assembly of the bioreactor, a kinetic resolution protocol of the 1-tetralol substrate was proposed and while some parameters were fixed (temperature, substrate concentration), others were modified to optimize this process. The first parameter analyzed was the choice of the compound acting as an acyl donor, where it was possible to evaluate the behavior of the reaction in the presence of two different donors. After that, a study was carried out of the influence of the flow rate applied to the system, the associated residence time and how the variation of this parameter alters the reaction kinetics. Then, an analysis of the influence of the solvent used on the system was also carried out by repeating the kinetic resolution reactions in the presence of a scope of solvents of different polarities. The best condition obtained to carry out the resolution was using vinyl butyrate as acyl donor, at a flow rate of 3 mL/h and using isooctane as solvent. The data obtained is very promising and the result of the optimal condition achieved is, currently, the best result reported in the literature of enzymatic kinetic resolution of the substrates used. Thus, the use of the biocatalytic reactor and the studied reaction conditions proves to be an excellent strategy in the application of the resolution of asymmetric centers in building blocks of different molecules.

Keywords: enzymatic kinetic resolution, continuous flow, tertiary alcohol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Foto do lago Vanda e sua localização no mapa da Antártica

Figura 2 - A) Estrutura de difração de raios-x da CAL-B (PDB: 1LBT); B) representação de seu sítio ativo

Figura 3 - A) Estrutura de difração de raios-x da CAL-A (PDB: 3GUU); B) Representação de seu sítio ativo

Figura 4 - A) Representação de uma cavidade oxianion de classe GGGX-type em que não há impedimento estérico com o substrato; B) Representação de uma cavidade oxianion de classe GX-type em que há impedimento estérico com o substrato.

Figura 5 - Representação esquemática da regra de Kazlauskas: A) Estrutura do (*R*)-Feniletanol sobreposta à representação do sítio ativo da enzima, demonstrando um encaixe assertivo; B) Estrutura do (*S*)-Feniletanol sobreposta à representação do sítio ativo da enzima, demonstrando um encaixe não assertivo.

Figura 6 - Reação de resolução cinética do (*R/S*)-1-(9H-fluoren-9-yl)ethanol

Figura 7 - *Estrutura da (S)-dapoxetina*

Figura 8 - *Exemplos de moléculas que apresentam álcoois terciários quirais em sua estrutura*

Figura 9 - *Esquema geral de uma resolução cinética enzimática*

Figura 10 - *Representação de um reator de leito fixo*

Figura 11 - *Montagem do sistema de fluxo contínuo utilizado*

Figura 12 - *Representação esquemática da síntese do álcool racêmico*

Figura 13 - *Representação esquemática da síntese dos ésteres derivados*

Figura 14 - *Esquema do estudo da otimização da resolução cinética enzimática*

Figura 15 - *Cromatograma do substrato (rac)-1*

Figura 16 - *Cromatograma do substrato (rac)-1 em fase quiral*

Figura 17 - *Cromatograma do éster (rac)-2*

Figura 18 - *Cromatograma do éster (rac)-2 em fase quiral*

Figura 19 - *Cromatograma do éster (rac)-3*

Figura 20 - *Cromatograma do éster (rac)-3 em fase quiral*

Figura 21 - *Representação esquemática do ciclo catalítico da CAL-A com o substrato de interesse*

Figura 22 - *Representação esquemática da resolução cinética enzimática utilizando acetato de vinila como doador de acila*

Figura 23 - *Cromatograma da reação utilizando o acetato de vinila como doador de acila*

Figura 24 - *Representação esquemática da resolução cinética enzimática utilizando butirato de vinila como doador de acila*

Figura 25 - *Cromatograma da reação utilizando butirato de vinila como doador de acila*

Figura 26 - *Cromatograma da reação sob um fluxo de 3 mL/h*

Figura 27 - *Cromatograma da reação sob um fluxo de 2 mL/h*

Figura 28 - *Cromatograma da reação sob um fluxo de 6 mL/h*

Figura 29 - *Tabela de classificação de solventes da GSK*

Figura 30 - *Cromatograma da resolução cinética enzimática utilizando isooctano como solvente*

Figura 31 - *Cromatograma em fase quiral da resolução cinética enzimática utilizando isooctano como solvente*

Figura 32 - *Cromatograma em fase quiral da resolução cinética enzimática utilizando acetonitrila como solvente*

Figura 33 - *Cromatograma em fase quiral da resolução cinética enzimática utilizando DIPE como solvente*

Figura 34 - *Cromatograma em fase quiral da resolução cinética enzimática utilizando BTF como solvente*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - *Resultados das resoluções cinéticas variando as taxas de fluxo*

Tabela 2 - *Resultado das resoluções cinéticas variando o solvente*

Tabela 3 - *Análise dos resultados de otimização das condições reacionais*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DMAP - Dimetilaminopiridina

THF - Tetrahidrofurano

CG-DIC - Cromatógrafo Gasoso com Detector por Ionização de Chama

MeCN - Acetonitrila

DIPE - Éter di-isopropílico

BTF - Trifluorotolueno

t_R - Tempo de retenção

SUMÁRIO

1) Introdução	15
1.1) Lipases	15
1.2) História das lipases da <i>Candida antarctica</i>	15
1.3) Lipase B de <i>Candida antarctica</i> - CAL-B	16
1.4) Lipase A de <i>Candida antarctica</i> - CAL-A	17
1.5) Impacto da resolução da estrutura cristalina	20
1.6) A regra de Kazlauskas	21
1.7) Aplicações da CAL-A	22
1.8) Álcoois terciários quirais	24
1.9) Resolução cinética enzimática	25
1.10) Química de fluxo de reatores biocatalíticos	26
2) Objetivo	27
3) Parte experimental	27
3.1) Reagentes e solventes	27
3.2) Reator biocatalítico de leito fixo	27
3.3) Métodos cromatográficos	28
3.4) Síntese dos padrões reacionais	29
3.4.1) Síntese do 1-tetralol	29
3.4.2) Síntese dos ésteres derivados do 1-tetralol	30
3.5) Resoluções cinéticas enzimáticas	31
3.5.1) Resolução cinética utilizando acetato de vinila como doador de grupo acila	31
4) Resultados e discussão	32
4.1) Estratégia de trabalho	32
4.2) Análise cromatográfica dos padrões sintetizados	32
4.2.1) Análise cromatográfica do (<i>rac</i>)- 1	32
4.2.2) Análise cromatográfica dos ésteres (<i>rac</i>)- 2 e (<i>rac</i>)- 3	34
4.3) Estudo da variação do grupo doador de acila	36
4.3.1) Acetato de vinila como doador de acila	36
4.3.2) Butirato de vinila como doador de acila	38
4.4) Estudo da variação da taxa de fluxo	39

4.5) Estudo da variação do solvente	41
4.6) Estudo geral das condições reacionais	47
5) Conclusão	48
6) Referências	50

1) INTRODUÇÃO

1.1) Lipases

A utilização de lipases como catalisadores em diversas reações de síntese orgânica tem crescido em grande número nos últimos anos devido, principalmente, à sua elevada estereosseletividade e ao seu baixo custo. Estas vantagens são excepcionalmente interessantes para o avanço da produção acadêmica nas áreas de biocatálise e química verde. (CHEN *et al.*, 2018)

Entre as lipases mais utilizadas, podemos destacar as variantes A e B isoladas da levedura *Candida antarctica*, conhecidas pela sigla CAL-A (*Candida antarctica* lipase-A) e CAL-B (*Candida antarctica* lipase-B), que são excelentes catalisadores para sínteses estereoespecíficas. (CHRISTENSEN *et al.*, 2002)

1.2) História das lipases da *Candida antarctica*

A origem e a descoberta da levedura *Candida antarctica* são fatores que tornam as propriedades de suas lipases ainda mais interessantes, pois esta levedura foi descoberta e isolada no final dos anos 80 sob uma camada de 3 a 5 metros de gelo no fundo do lago Vanda (Figura 1), na Antártica (ALCÁNTARA *et al.*, 2021). No início, este microorganismo recebeu a classificação de *Sporobolomyces antarcticus* e desde então recebeu diversas outras classificações até que fosse adotada a mais recente: *Candida antarctica* (ALCÁNTARA *et al.*, 2021). Esta levedura é uma das 154 espécies do gênero *Candida sp*, carregando o título de ser a produtora de duas α/β hidrolases: a CAL-A e a CAL-B que apresentam propriedades únicas e valiosas para diversos processos químicos industriais. Ambas as lipases A e B foram isoladas, purificadas, caracterizadas e atualmente são produzidas na expressão do fungo *Aspergillus oryzae* (ALCÁNTARA *et al.*, 2021).



Figura 1: Foto do lago Vanda e sua localização no mapa da Antártica. (CHINH *et al.*, 2015)

1.3) Lipase B de *Candida antarctica* - CAL-B

A CAL-B apresenta uma cadeia de 317 aminoácidos, um peso molecular de 33 Da, um ponto isoelétrico igual a 6 ($pI = 6$) e se mostra mais estável em uma faixa de pH alcalino (CHRISTENSEN *et al.*, 2002). O seu sítio ativo (Figura 2) é composto por uma tríade catalítica, composta pelos aminoácidos Asp187, His224 e Ser105 e é, indubitavelmente, a lipase mais utilizada em reações biocatalíticas até os dias de hoje (ALCÁNTARA *et al.*, 2021).

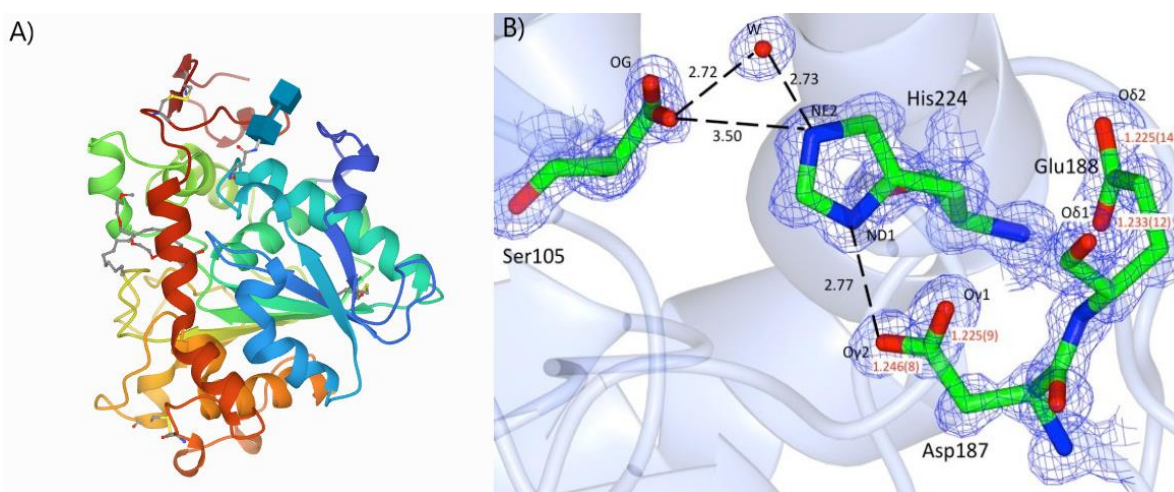


Figura 2: A) Estrutura de difração de raios-x da CAL-B (PDB: 1LBT); B) representação de seu sítio ativo (CIANCI *et al.*, 2015).

Uma das propriedades interessantes a se destacar da CAL-B é a sua termoestabilidade. Esta enzima, em sua forma livre, mantém sua atividade relativa em

cerca de 60% em temperaturas próximas a 55°C, o que reflete uma excelente termoestabilidade dado que sua temperatura ótima (100% de atividade relativa) é em 40°C. Esta termoestabilidade se mostra ainda mais positiva quando se tratando da enzima em sua forma imobilizada em que se observa a manutenção de cerca de 80% em temperaturas próximas a 100°C (CLARSON *et al.*, 2013)

A CAL-B é famosa especialmente na área de biocatálise por sua aplicação em sínteses regioseletivas, sínteses enantiosseletivas e processamento de óleos e gorduras. Ela é comercializada, principalmente, na sua forma imobilizada conhecida como Novozym® 435 em que a imobilização é realizada utilizando uma resina acrílica macroporosa (ALCÁNTARA *et al.*, 2021).

Entretanto, apesar dos holofotes na lipase CAL-B serem facilmente justificados por sua alta aplicabilidade e fácil manipulação, a lipase também apresenta suas limitações, sendo a principal delas o tamanho restrito de seu sítio ativo. O fato de a CAL-B apresentar um sítio ativo mais reduzido a torna uma opção muito viável para resoluções cinéticas dinâmicas envolvendo moléculas menores e menos impedidas estericamente, porém, também atua como uma barreira que impede a utilização de substratos mais volumosos e com maior impedimento estérico.

Comparando com a CAL-B, a CAL-A também apresenta propriedades únicas e dignas de destaque e infelizmente não recebe a atenção que lhe é merecida. O próximo item tem como objetivo esclarecer e expor a vasta gama de aplicações que a CAL-A tem a oferecer para as mais diversas aplicações tanto na área acadêmica quanto nos processos industriais.

1.4) Lipase A de *Candida antarctica* - CAL-A

A lipase CAL-A é formada por uma cadeia de 431 aminoácidos, apresenta um peso molecular de 45 kDa, possui ponto isoelétrico igual a 7,5 (pI = 7,5), se apresenta mais estável em uma faixa de pH ácido, e o seu sítio ativo (Figura 3) é composto pela tríade catalítica Asp334, His366 e Ser184 apresentando uma termoestabilidade formidável, o que faz dela uma excelente opção nas mais diversas rotas de síntese orgânica (CHRISTENSEN *et al.*, 2002). A CAL-A, a princípio, foi expressa em *Pichia pastoris* com um rendimento elevado e foi purificada utilizando uma coluna de troca iônica e, após a purificação, apresentou seu pico de atividade na temperatura de 50°C e pH = 7,0 (ALCÁNTARA *et al.*, 2021).

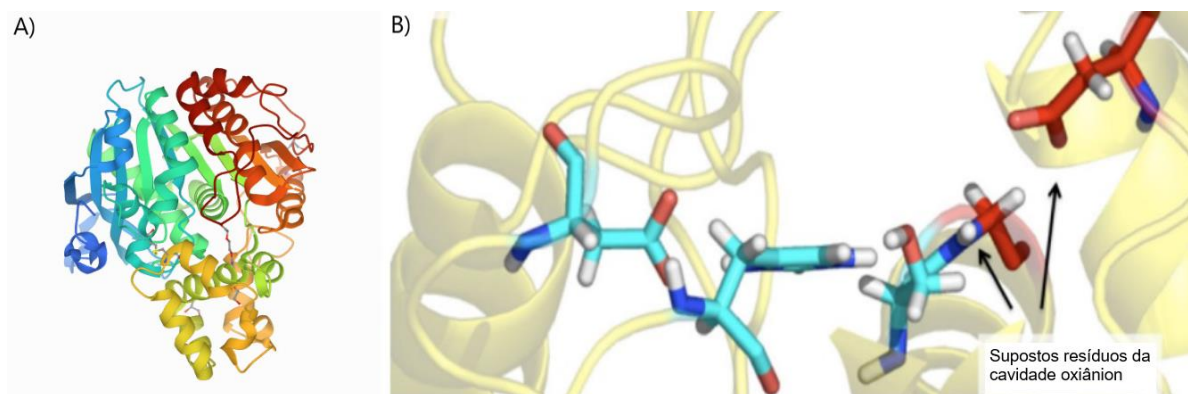


Figura 3: A) Estrutura de difração de raios-x da CAL-A (PDB: 3GUU); B) Representação de seu sítio ativo (BORNSCHEUER *et al.*, 2011)

Posteriormente, outros estudos revelaram que a lipase A poderia ser também expressa nas leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* e *Kluyveromyces lactis* em que, na última, foi detectada a maior termoestabilidade, podendo a lipase manter cerca de 70% de sua atividade em uma incubação à temperatura de 60°C (ALCÁNTARA *et al.*, 2021). A purificação da CAL-A é comumente realizada utilizando cromatografia com hidroxapatita devido ao alto rendimento associado a esta técnica, mas pode ser realizada também através de técnicas de purificação de proteínas mediadas por proteases (ALCÁNTARA *et al.*, 2021).

Entre as várias propriedades interessantes que a CAL-A apresenta, é válido um destaque maior à sua termoestabilidade inigualável em sua forma livre, podendo permanecer ativa e trabalhando com alta eficiência em temperaturas superiores a 90°C, o que faz dela não só mais termoestável que a CAL-B livre, mas também mais termoestável que a grande maioria das lipases selvagens conhecidas (BARGEMAN *et al.*, 2005). Esta termoestabilidade singular da CAL-A faz com que ela seja uma opção incrível de biocatalisador em diversos processos químicos que se mostram mais funcionais em temperaturas elevadas (BARGEMAN *et al.*, 2005).

Além disso, a CAL-A também apresenta a propriedade singular de ser uma das únicas lipases selvagens conhecidas capaz de atuar como catalisador em resoluções cinéticas de aminas e álcoois terciários volumosos e com elevado impedimento estérico devido à sua preferência em catalisar reações de transferência de grupos acila em aminas ou álcoois em relação a reações de hidrólise dos mesmos ainda que se tratando de moléculas volumosas (ALCÁNTARA *et al.*, 2021). Esta propriedade é

devido ao volume do seu sítio ativo, que permite a entrada e acomodação de cadeias volumosas em seu interior. Diferentemente de outras enzimas, que apresentam seu sítio ativo menor e não permite que grupos volumosos se acomodem significativamente, interferindo de modo negativo na cinética da reação.

Uma das regiões do sítio ativo das lipases cujo tamanho apresenta maior influência na acomodação do substrato é a região denominada “cavidade oxianion”. Esta cavidade é formada por resíduos de aminoácidos que possuem grupos N-H disponíveis estericamente e sua função é a de estabilizar a carga negativa do oxigênio durante o intermediário tetraédrico formado no mecanismo enzimático através de ligações de hidrogênio (BRYAN *et al.*, 1986). As cavidades oxianion são classificadas pelo seu tamanho e divididas em 3 classes: GX; GGGX e Y. Cavidades GX apresentam um tamanho reduzido, enquanto as cavidades GGGX e Y apresentam um tamanho mais elevado (Figura 4), sendo as últimas diferenciadas pela sequência de aminoácidos que compõem a região da cavidade (BAUER *et al.*, 2020). A enzima CAL-A possui sua cavidade oxianion classificada como Y, diferentemente da CAL-B, que apresenta sua cavidade oxianion classificada como GX (Fonte: Lipase Engineering Database), ou seja, a CAL-A permite a entrada e acomodação de substratos mais volumosos em relação à CAL-B.

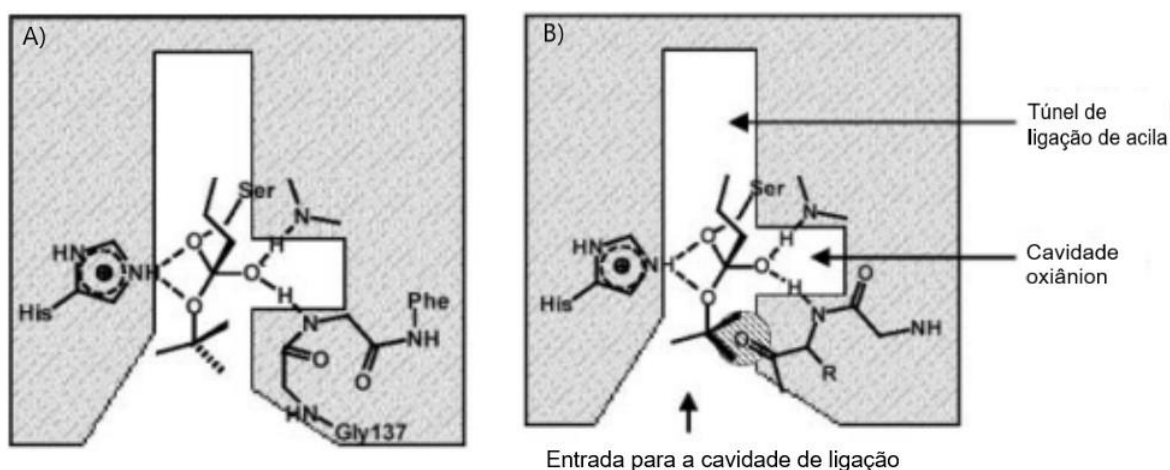


Figura 4: A) Representação de uma cavidade oxianion de classe GGGX-type em que não há impedimento estérico com o substrato; B) Representação de uma cavidade oxianion de classe GX-type em que há impedimento estérico com o substrato. (BORNSCHEUER *et al.*, 2002)

Em reações de processamento de óleos e gorduras, a CAL-A apresenta, também, um diferencial que é sua preferência por reações envolvendo ácidos graxos

de cadeia longa em relação a ácidos graxos de cadeia curta e foi observada uma seletividade em reações de hidrólise de triglicerídeos insaturados em que a enzima demonstra preferir a catálise de reações S_N2 . Esta propriedade de reconhecer ácidos graxos insaturados se mostrou presente após estudos publicados revelarem que, diferentemente das outras lipases, a CAL-A realizou a esterificação do ácido elaídico (trans) cerca de 15 vezes mais rápido do que do ácido oleico (cis) (BARGEMAN *et al.*, 2005).

1.5) Impacto da resolução da estrutura cristalina

Muitas das aplicações biotecnológicas da enzima CAL-A foram descobertas após a resolução de sua estrutura cristalina tridimensional através de técnicas cristalográficas (ALCÁNTARA *et al.*, 2021). Diferentemente de sua isoenzima, CAL-B, cuja estrutura foi resolvida e publicada em 1994, a CAL-A teve sua estrutura cristalina publicada somente em 2008 e, após isso, várias hipóteses e especulações sobre a mesma foram provadas errôneas, como a hipótese de a lipase A não apresentar uma “tampa” que se acopla ao túnel de acesso ao sítio ativo e, portanto, seu sítio ativo se mostrar livre e facilmente acessível, o que seria incomum em relação às demais α/β hidrolases (ALCÁNTARA *et al.*, ORTIZ., 2021). Uma vez resolvida e publicada a estrutura cristalina da CAL-A, foi possível verificar a presença de uma “tampa” bem definida e que se mostra não só importante, mas também crucial para o mecanismo de esterificação proposto pela lipase. Outra hipótese descartada após a resolução foi a possibilidade de a CAL-A se mostrar uma lipase dependente de cálcio para a estabilidade de sua estrutura e ela mostrou não só uma ausência de densidade de cálcio na estrutura de raios-X como também apresentou um efeito de desestabilização na presença de cálcio (ALCÁNTARA *et al.*, 2021).

Por fim, a resolução de sua estrutura tridimensional permitiu o início e a continuidade de estudos sobre mutagenese, engenharia de proteínas e design racional de enzimas de modo a criar enzimas mutantes a partir da estrutura da CAL-A, criando a superfamília “CAL-A like”, que apresenta cerca de 32 enzimas até o momento, de modo a aumentar a aplicabilidade dessa lipase nos mais variados processos e sínteses químicas, provando à comunidade científica o valor não explorado da CAL-A e permitindo o avanço em pesquisas na área de biocatálise e síntese orgânica (ALCÁNTARA *et al.*, 2021).

1.6) A regra de Kazlauskas

Uma vez resolvidas a estrutura tridimensional da enzima, é possível realizar algumas previsões e simulações de reações de síntese utilizando a CAL-A como catalisador. Em se tratando de reações envolvendo álcoois secundários, é utilizada a denominada “regra de Kazlauskas” desenvolvida e aplicada pelo professor Dr. Romas J. Kazlauskas da Universidade de Minnesota nos Estados Unidos.

A regra de Kazlauskas consiste em uma regra empírica para a previsão de qual enantiômero de uma molécula contendo um álcool secundário será favorecido em uma reação catalisada por lipase. Para a aplicação da regra, deve-se primeiramente representar o substrato em sua fórmula estrutural bidimensional centrada no carbono quiral e de modo que o grupo hidroxila se encontre inclinado para trás do plano. Após isso, é necessário representar, também, o sítio ativo da lipase a ser utilizada em um esquema bidimensional de forma que as cavidades da estrutura fiquem em foco. Por fim, basta sobrepor ambas as representações (Figura 5) e analisar o encaixe dos grupos substituintes do álcool nas cavidades da lipase (CHEN *et al.*, 2018).

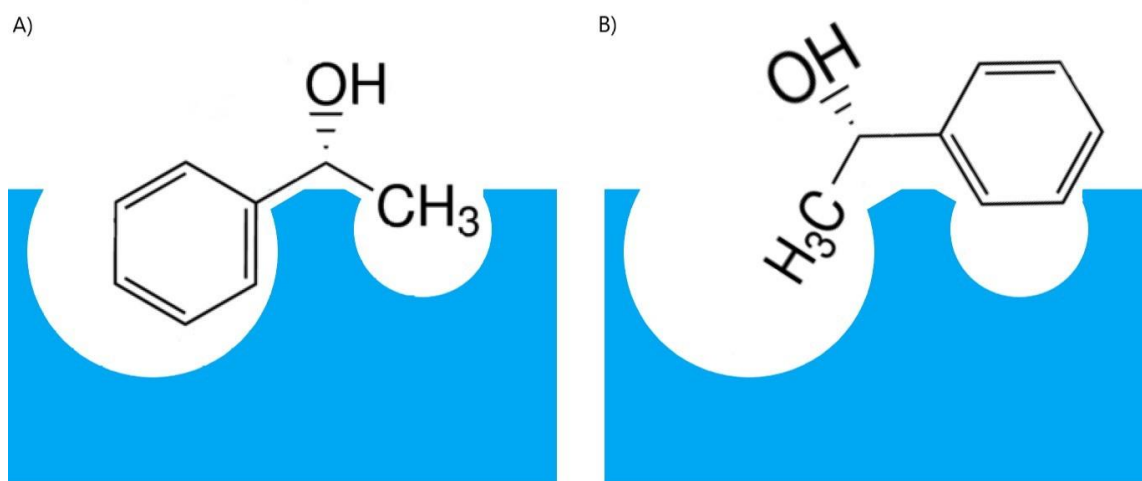


Figura 5: Representação esquemática da regra de Kazlauskas: A) Estrutura do (R)-Feniletanol sobreposta à representação do sítio ativo da enzima, demonstrando um encaixe assertivo; B) Estrutura do (S)-Feniletanol sobreposta à representação do sítio ativo da enzima, demonstrando um encaixe não assertivo. Fonte: autor

Após realizada a sobreposição das representações, a regra dita que o enantiômero cujos grupos substituintes se encaixaram nas cavidades da enzima com

maior assertividade (grupo mais volumoso na cavidade mais volumosa e grupo menos volumoso na cavidade menos volumosa) deve ser o enantiômero mais favorável cineticamente (maior velocidade de reação) e, portanto, o produto formado a partir do mesmo deve se mostrar em excesso ao final da reação (enantiômero da esquerda na figura). Analogamente, o enantiômero cujos grupos substituintes não se encaixaram de maneira tão assertiva deve ser o enantiômero menos favorecido cineticamente e, portanto, o produto formado a partir do mesmo deve se apresentar em menor concentração ao final da reação (enantiômero da direita na figura).

Esta regra tem sido de grande importância na previsão dos enantiômeros favorecidos em diversas reações de resolução cinética de álcoois secundários catalisadas por lipases (CHEN *et al.*, 2018).

1.7) Aplicações da CAL-A

A enzima CAL-A apresenta uma grande variedade de aplicações na área de síntese orgânica como catalisador. Entre estas aplicações, é possível destacar sua atuação na catálise de reações de síntese de “blocos de construção” de diversos fármacos que apresentam centro quiral em sua estrutura. A utilização da CAL-A em reações como essas se mostra interessante devido à sua enantiosseletividade em moléculas volumosas como, por exemplo, álcoois secundários com substituintes de elevado impedimento estérico (ANTHONSEN; FUGLSETH; HOFF; 2006). A utilização da CAL-A em sínteses quimioenzimáticas de algumas moléculas como (*R*)- e (*S*)-1-(9H-fluoren-9-yl)ethanol (Figura 6) tem se mostrado interessante devido à sua alta velocidade de reação e sua elevada seletividade enantiomérica durante o processo (BALTER *et al.*, 2013).

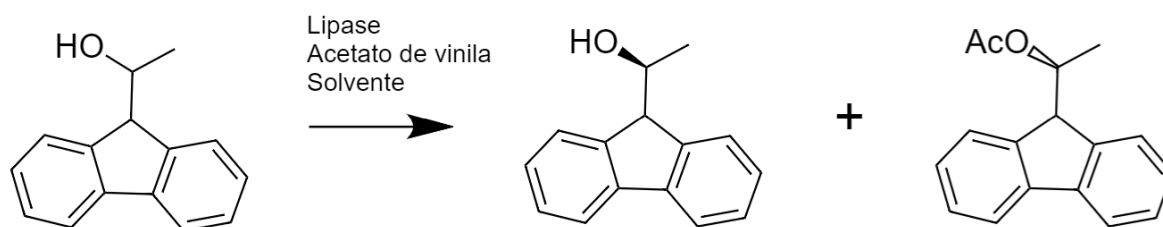


Figura 6: Reação de resolução cinética do (*R/S*)-1-(9H-fluoren-9-yl)ethanol

Além de álcoois secundários volumosos, a CAL-A também se prova uma escolha vantajosa em reações de resolução cinética de amins secundárias e indolinas com centro quiral e substituintes volumosos que, por sua vez, também podem ser utilizados como blocos de construção de uma gama de fármacos. Mais uma vez, a enantiosseletividade da CAL-A e sua capacidade de acomodar grupos de grande volume se mostram peças-chave para uma resolução cinética efetiva de moléculas como estas e obtenção de um rendimento satisfatório da reação (FERNÁNDEZ *et al.*, 2006).

É relatado, também, a utilização da CAL-A na catálise da reação de transesterificação no processo de resolução cinética de amino álcoois quirais e volumosos na síntese de fármacos como a (S)-dapoxetina (Figura 7), um fármaco da classe ISRS (Inibidor Seletivo de Recaptação de Serotonina). A realização da resolução cinética quimioenzimática utilizando a CAL-A como catalisador apresentou um elevado excesso enantiomérico e resultou em uma síntese eficiente (FERNÁNDEZ *et al.*, 2006).

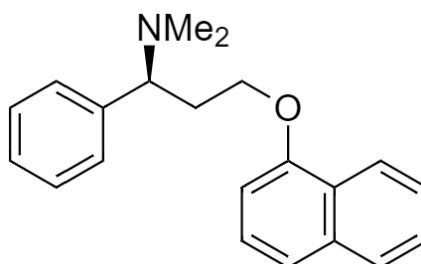


Figura 7: Estrutura da (S)-dapoxetina

Outro processo químico em que a CAL-A pode ser utilizada como catalisador é na reação de desimetrização de meso-1,2-diaminas com substituintes volumosos. Neste processo, a enzima atua na etapa de adição de um grupo dialil carbonato ao nitrogênio da molécula contendo os grupos amina, formando 2 carbonos quirais e desimetizando a molécula (BERNARDO *et al.*, 2014).

As lipases, de modo geral, podem ser utilizadas em reações de esterificação, transesterificação e hidrólise de ácidos graxos. Entretanto, estudos apontam que a CAL-A se mostrou uma escolha particularmente interessante em reações de esterificação de ácidos graxos em meios abundantes em água. No interior do seu sítio ativo, a CAL-A apresentou uma interação particular entre os resíduos de aminoácido

das cavidades e as moléculas de água, permitindo que a reação de esterificação seja favorecida em relação à hidrólise. Esta interação foi observada utilizando o álcool 2-ethyl-1-hexanol como substrato para a esterificação e formação da molécula do éster derivado do ácido 2-ethyl-1-hexyl palmítico que apresentou um rendimento próximo de 100% em um meio com água em excesso (BAECK *et al.*, 2012).

1.8) Álcoois terciários quirais

Os álcoois terciários quirais compõem uma classe de moléculas que existe em uma gama de compostos bioativos naturais e não-naturais e apresenta uma grande variedade de aplicações nas mais diversas áreas da química orgânica. Estes compostos podem ser utilizados como “blocos de construção” na síntese de fármacos ou de produtos naturais (Figura 8) e, portanto, garantir o controle do centro assimétrico dessas moléculas se mostra uma etapa fundamental na síntese das mesmas (YUN-LIN *et al.*, 2022).

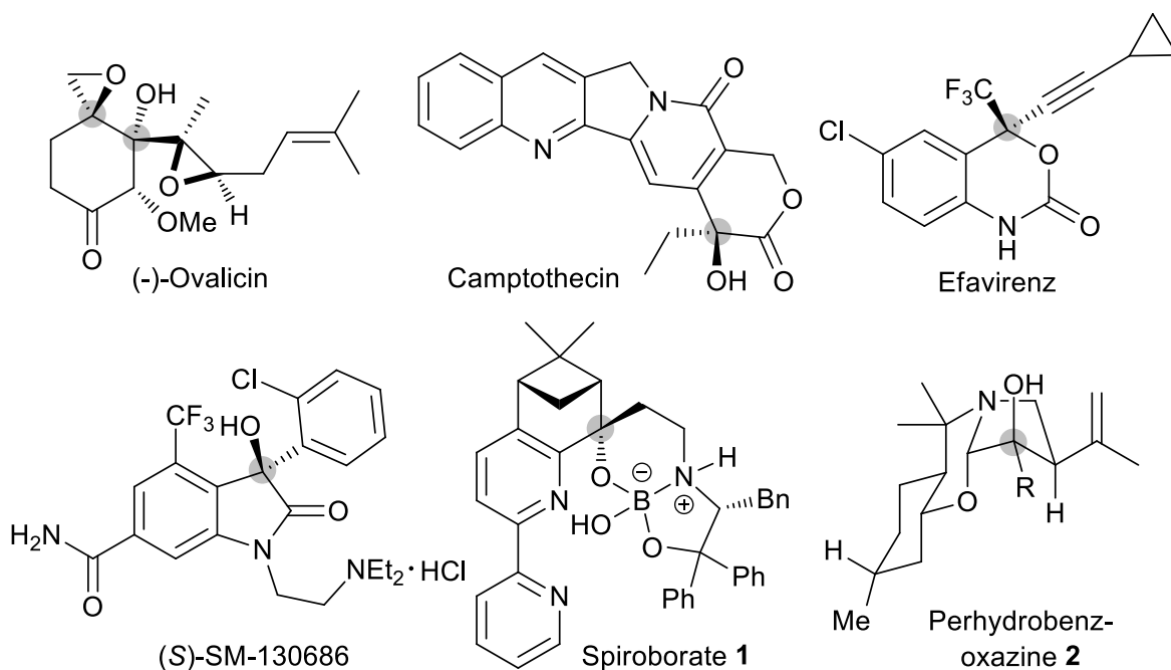


Figura 8: Exemplos de moléculas que apresentam álcoois terciários quirais em sua estrutura (YUN-LIN *et al.*, 2022)

Devido à sua característica de apresentar um elevado impedimento estérico em sua estrutura e forte tendência a formar intermediários carbocatiônicos estáveis, os

álcoois terciários assimétricos se apresentam como um desafio para reações de resolução que visam obter estes compostos com elevada pureza enantiomérica. A quantidade de trabalhos reportados envolvendo a resolução desses substratos é extremamente baixa e, dessa forma, propor rotas sintéticas eficientes para o controle do centro estereogênico de álcoois terciários se prova um estudo interessante para a comunidade acadêmica considerando a escassez de publicações neste campo.

1.9) Resolução Cinética Enzimática

A resolução cinética consiste na separação de dois enantiômeros de uma molécula quiral através de uma reação utilizando um catalisador rigorosamente enantiosseletivo e que se promove devido à diferença da constante de velocidade entre ambos os enantiômeros pelo mecanismo proposto (Figura 9). Deste modo, uma vez que a formação do produto resultante do consumo do enantiômero mais rápido é favorecida, é possível separar as duas moléculas com elevada pureza óptica. Além disso, considerando que em uma resolução cinética bem-sucedida um dos enantiômeros será totalmente consumido enquanto o outro permanece inalterado, conclui-se que o rendimento máximo possível de ser obtido através deste processo é de 50% com um valor de excesso enantiomérico superior a 99% (ALMEIDA *et al.*, 2020).

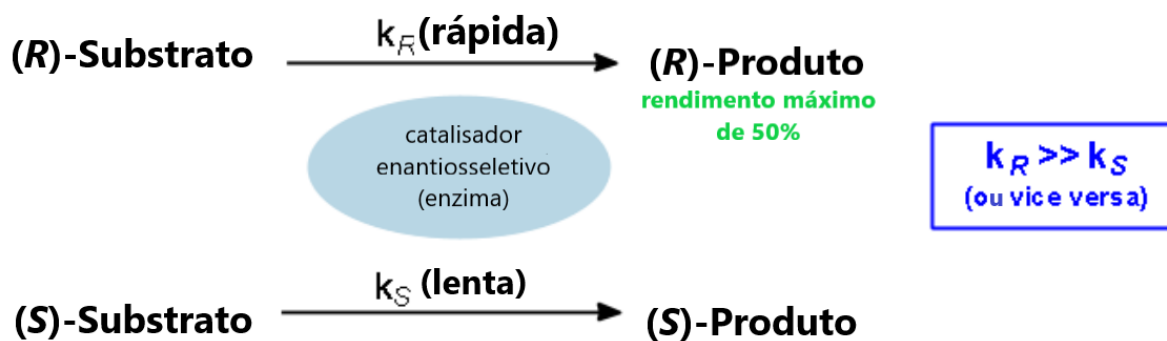


Figura 9: Esquema geral de uma resolução cinética enzimática

A escolha do catalisador é o fator de maior influência na diferenciação entre as diversas resoluções cinéticas. A resolução cinética enzimática mais especificamente, utiliza enzimas (comumente lipases) como catalisador quiral devido à sua propriedade

inata de elevada enantiosseletividade e, portanto, propõe uma rota biocatalítica que se mostra mais verde, mais barata e mais sustentável (ALMEIDA *et al.*, 2020).

1.10) Química de fluxo contínuo e reatores biocatalíticos

Uma das estratégias possíveis de otimização de diversos processos químicos é a implementação de um regime de fluxo contínuo ao sistema de modo a aumentar a produtividade, facilitar o controle das variáveis, automatizar o processo, diminuir o desperdício de solventes e reduzir a formação de resíduos. Além disso, a utilização de reatores de fluxo contínuo em processos químicos industriais ou laboratoriais funciona como uma técnica de otimização ao aumentar a transferência de massa dentro do sistema, aumentar a transferência de calor entre os componentes, aumentar a superfície de contato no reator, possibilitar a implementação de catalisadores homogêneos e heterogêneos, sistemas de análise em tempo real ou até mesmo sistemas multifásicos (MELO *et al.*, 2019).

O design de um sistema de fluxo utilizando um reator biocatalítico se apresenta como uma tática inteligente de otimização de um processo químico visto que a química de fluxo permite uma enorme variedade de adaptações a fim de personalizar ao máximo o sistema reacional para a reação proposta. Mais especificamente, em se tratando de reações que utilizam a técnica de catálise heterogênea, os reatores de leito fixo se provam uma excelente opção para adaptar o sistema a um regime de fluxo contínuo, visto que são reatores simples, de fácil manuseio, eficientes em termos de contato com o catalisador e permitem a utilização de uma gama de catalisadores heterogêneos (Figura 10).

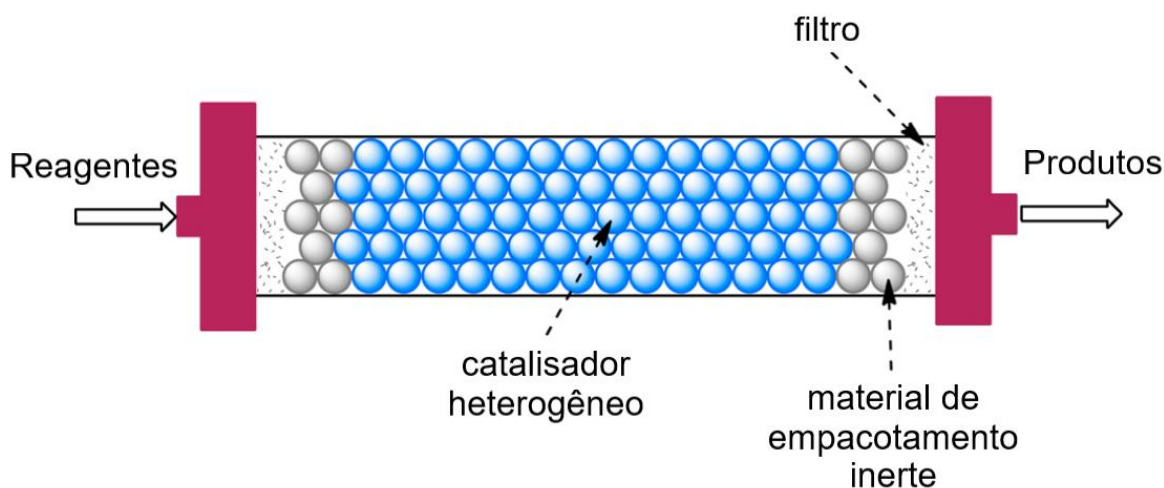


Figura 10: Representação de um reator de leito fixo (SEEBERGER et al., 2017 – adaptado)

2) OBJETIVO:

Este trabalho tem como objetivo realizar a resolução cinética do álcool terciário bicíclico (*rac*)-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydronaphtalen-1-ol utilizando a enzima CAL-A imobilizada como biocatalisador em um regime de fluxo contínuo e avaliar os parâmetros de otimização deste processo tais como doadores de acila, solventes e taxas de fluxo.

3) PARTE EXPERIMENTAL:

3.1) Reagentes e solventes

Para a síntese do substrato, o álcool terciário bicíclico, os reagentes utilizados foram: 1-tetralona, solução de brometo de metilmagnésio (3 mol L^{-1} em éter dietílico), tetrahidrofurano anidro. Enquanto para a síntese do padrão racêmico dos ésteres, os produtos das reações utilizando diferentes doadores de acila, foram utilizados os reagentes: anidrido butanoico (para o éster proveniente do butirato de vinila), anidrido acético (para o éster proveniente do acetato de vinila), dimetilaminopiridina (DMAP) e trietilamina. Para as resoluções cinéticas enzimáticas realizadas, os reagentes utilizados foram: acetato de vinila, butirato de vinila, heptano, isooctano, acetonitrila grau PA (Neon), éter di-isopropílico, trifluorotolueno, acetato de etila grau PA. A lipase utilizada nas resoluções cinéticas foi a *Candida antarctica* lipase A imobilizada em Immobead P150. Todas as extrações realizadas utilizaram acetato de etila grau PA (Neon) e sulfato de magnésio (Vetec) como agente secante. Todas as análises de cromatografia gasosa foram realizadas utilizando acetato de etila grau HPLC (Neon) e todos os reagentes foram utilizados sem pré-tratamento. Os reagentes supracitados de marca não especificada foram obtidos comercialmente junto à empresa Sigma-Aldrich®.

3.2) Reator biocatalítico de leito fixo

Para a realização das resoluções cinéticas enzimáticas em regime de fluxo contínuo, foi utilizado como reator uma coluna cromatográfica Omnifit® EZ Solvent

Plus com o diâmetro interno de 6,6 mm e comprimento de 100 mm que foi preenchida com a enzima imobilizada. Esta coluna possui uma extremidade fixa e uma extremidade ajustável (êmbolo) para ajustar o comprimento do leito fixo. O sistema de fluxo foi aquecido em um sistema adaptado utilizando uma fôrma retangular de vidro pirex e um mini termostato de aquário de 10W (Figura 11). O êmbolo móvel do reator (coluna) foi ajustado de modo a permitir o empacotamento da enzima na quantidade utilizada.

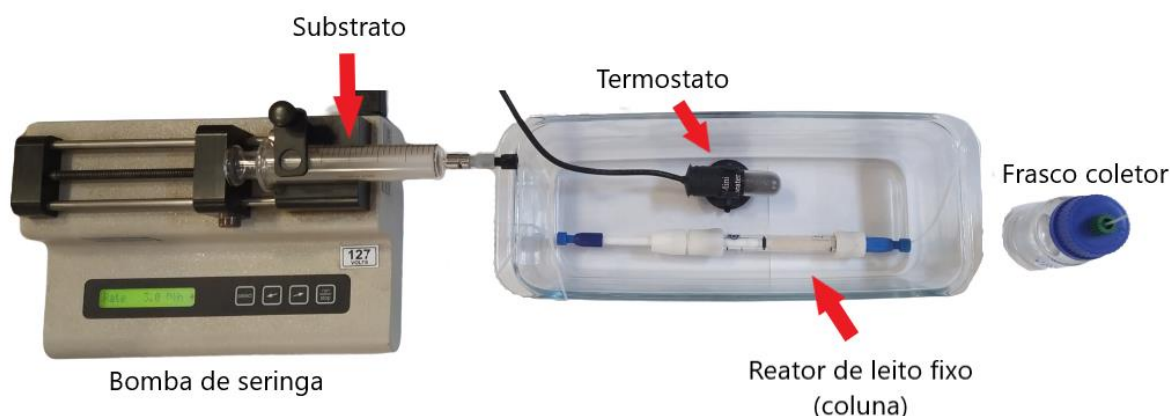


Figura 11: montagem do sistema de fluxo contínuo utilizado

3.3) Métodos cromatográficos

As análises cromatográficas de escolha foi a de Cromatografia Gasosa acoplada a Detector de Ionização de Chama (CG-DIC) e o equipamento utilizado foi um cromatógrafo gasoso SHIMADZU GC-2010 Plus equipado com injetor automático AOC-20i – acoplado a um detector de ionização de chama, que pertence ao Milagre Research Group (Instituto de Química – UNESP Araraquara). Para análises de rotina e cálculo de conversão foi utilizada a coluna HP-5MS UI (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) e o método utilizado foi: temperatura inicial de 80°C (mantida por 3 min), velocidade de aquecimento de 30°C/min, temperatura final de 280°C (mantida por 5 min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 260°C e 280°C, respectivamente. Para a determinação dos excessos enantioméricos (ee) foram utilizadas as colunas de fase estacionária quiral CP-Chirasil-DEX-CB (25 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) e FS-Hydrodex (25 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). O método utilizado na coluna Chirasil foi: temperatura inicial de 110°C (mantida por 3 min), velocidades de aquecimento de 5°C/min até

140°C (mantida por 3 min), 1°C/min até 150°C, e 10°C/min até temperatura final de 180°C (mantida por 5 min). O método utilizado na coluna Hydrodex foi: temperatura inicial de 110°C (mantida por 3 min), velocidade de aquecimento de 5°C/min até 145°C (mantida por 3 min), 5°C/min até 165°C (mantida por 3 min) e 3°C/min até a temperatura final de 180°C (mantida por 10min). O injetor utilizado foi do tipo *Split* de razão 1:100, o gás de arraste foi hidrogênio a 1,22 mL min⁻¹ e o volume das injeções para todas as colunas utilizadas foi de 1 µL em concentração 0,25 a 1,5 mg mL⁻¹.

3.4) Síntese dos padrões reacionais

O substrato (*rac*)-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydronaphtalen-1-ol (1-tetralol) utilizado e os padrões racêmicos dos ésteres derivados foram sintetizados previamente pela aluna de doutorado Laíza Araújo de Almeida, integrante do grupo de pesquisa Milagre Lab, que conduz o segmento em batelada do projeto utilizando os mesmos padrões reacionais utilizados neste trabalho.

3.4.1) Síntese do 1-tetralol

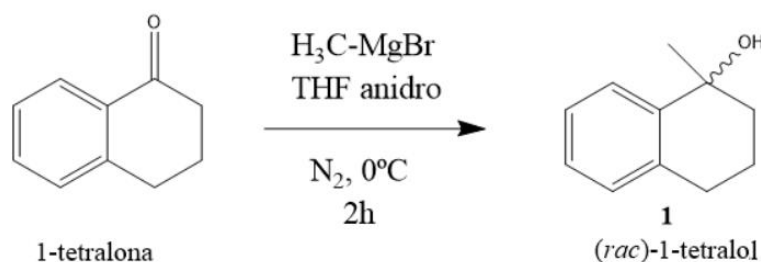


Figura 12: representação esquemática da síntese do álcool racêmico

O padrão racêmico do álcool foi sintetizado através de uma reação de Grignard utilizando a solução de brometo de metilmagnésio em sob condições de atmosfera inerte de N₂ sendo tetrahydrofurano anidro o solvente de escolha (Figura 11). A síntese se procedeu ao se adicionar 5 mmol do reagente 1-indanona e 2,5 mL de THF anidro a um balão de fundo redondo de 25 mL. Após isso, foram adicionados 7,5 mmol de

brometo de metilmagnésio em outro balão de fundo redondo de 25 mL e a adição desta solução à solução da cetona foi realizada lentamente com o auxílio de uma cânula. Por fim, o sistema foi imerso em um banho de gelo a 0°C e a reação foi finalizada após 2h com um rendimento de 86%. A purificação do álcool sintetizado foi realizada por recristalização utilizando algumas gotas de heptano gelado.

3.4.2) Síntese dos ésteres derivados do 1-tetralol

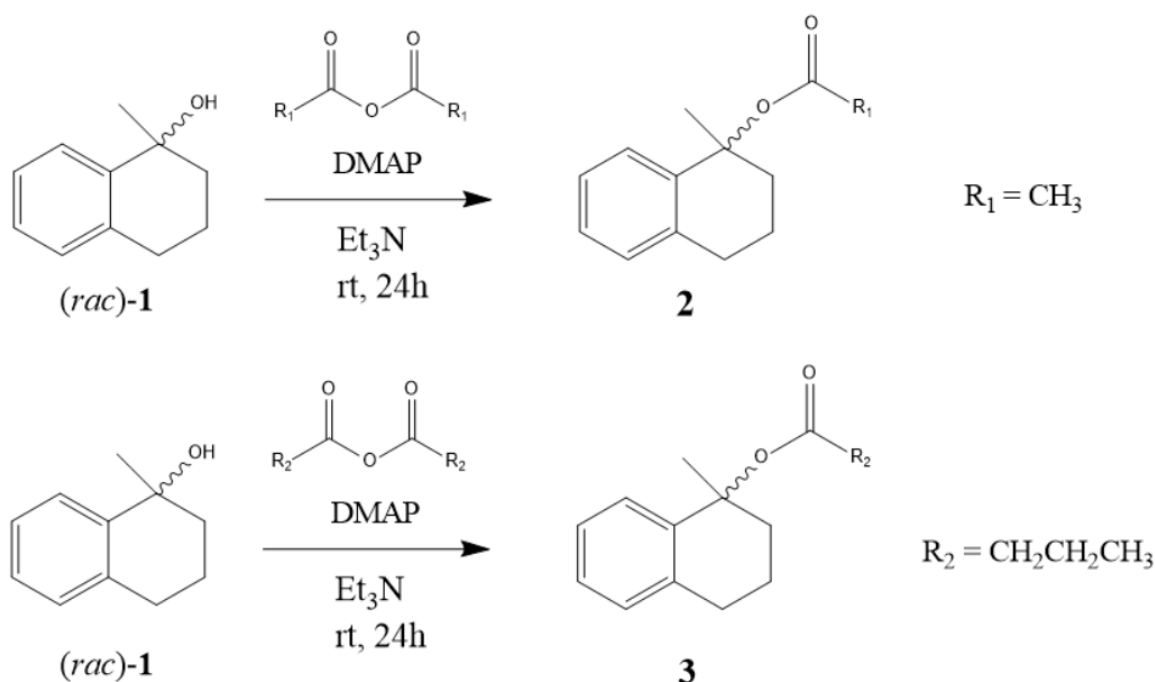


Figura 13: representação esquemática da síntese dos ésteres derivados

Os ésteres racêmicos sintetizados foram os compostos **2** e **3** representados no esquema acima e, os anidridos utilizados para a formação destes produtos foram: anidrido acético e anidrido butanoico, respectivamente.

As sínteses dos compostos **2** e **3** se procederam ao adicionar 0.3 mmol do álcool racêmico **1**, 0,6 mmol de anidrido, 3 mL de trietilamina e 15 mg de DMAP a um balão volumétrico de 25 mL. As reações foram realizadas em temperatura ambiente e finalizadas após 24h obtendo um rendimento de 53% para o produto **(rac)-2** e de 44% para o produto **(rac)-3**. A purificação dos produtos foi realizada através de cromatografia em coluna utilizando alumina neutra como fase estacionária e acetato de etila como fase móvel.

3.5) Resoluções cinéticas enzimáticas

Para a realização de todas as reações de resolução cinética enzimática, foram utilizados 300 mg da enzima CAL-A imobilizada e empacotada na coluna Omnifit®. Além disso, todas as resoluções cinéticas foram conduzidas a uma temperatura fixa de 30°C. Estes parâmetros foram escolhidos e fixados utilizando como base outras publicações da mesma área (AKAI *et al.*, 2020) e dados prévios obtidos pelo grupo em outros trabalhos (ALMEIDA *et al.*, 2020).

3.5.1) Resolução cinética utilizando acetato de vinila como doador de grupo acila

Para a realização desta reação, foram pesados e adicionados 35mg do substrato (*rac*)-**1** a um béquer de 50 mL. O substrato foi, então, solubilizado ao se adicionar 200 mg de acetato de vinila e 10 mL de heptano. A solução foi agitada até a completa solubilização do álcool e foi transferida para uma seringa de vidro de 20 mL que, por sua vez, foi encaixada em uma bomba de seringa e acoplada ao reator biocatalítico de leito fixo. Então, a solução foi bombeada para o reator a um fluxo determinado de 3 mL/h. A solução contendo o produto foi coletada em um frasco Schott adaptado e acoplado ao sistema. Após a passagem completa da solução reacional, passou-se 5 mL de acetato de etila grau PA pelo reator a fim de limpá-lo de qualquer resquício de substrato que possa ter ficado retido no suporte da enzima, arrastando-o consigo até o frasco de coleta.

A solução coletada no final da reação é, então, transferida para um balão de fundo redondo de 50 mL, rotaevaporada e levada à análise por CG-DIC, em que se pode observar o consumo do reagente (*R*)-**1** e a formação do produto (*R*)-**2**. Devido à alta enantiosseletividade da enzima utilizada, o reagente (*S*)-**1** deverá se mostrar inalterado e a formação do produto (*S*)-**2** não deve ser observada (Figura 13).

Este procedimento experimental é, então, repetido na realização das demais reações de resolução cinética em que se avalia os efeitos observados na variação do grupo doador de acila, taxa de fluxo utilizada e solvente utilizado, respectivamente. Os valores de massa de substrato, massa de doador de acila e volume de solvente se mantêm fixos nas demais resoluções a fim de que os outros parâmetros sejam avaliados.

4) Resultados e discussão

4.1) Estratégia de trabalho

Este trabalho tem como objetivo principal avaliar e otimizar as condições reacionais para o desenvolvimento de um biorreator de leito fixo para a realização da resolução cinética enzimática do álcool terciário (*rac*)-1 em um regime de fluxo contínuo. A estratégia utilizada para o estudo dessa reação consiste avaliar o efeito da mudança do agente doador de acila, da taxa de fluxo utilizada e do solvente de escolha, respectivamente (Figura 14).

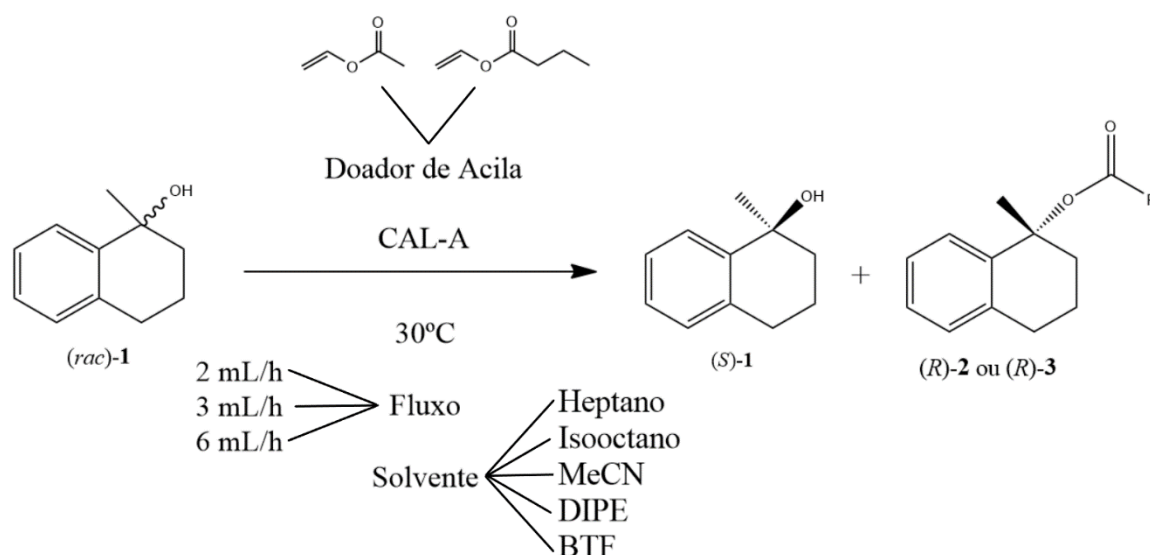


Figura 14: esquema do estudo da otimização da resolução cinética enzimática

4.2) Análise da cromatográfica dos padrões sintetizados

4.2.1) Análise cromatográfica do (*rac*)-1

Tendo em disposição o padrão analítico do (*rac*)-1, foi realizada uma análise de cromatografia gasosa utilizando o CG-DIC, obtendo-se o cromatograma abaixo (Figura 15) com a finalidade de determinar o tempo de retenção (t_R) do substrato na coluna HP5-MS, utilizada para realizar as análises de rotina.

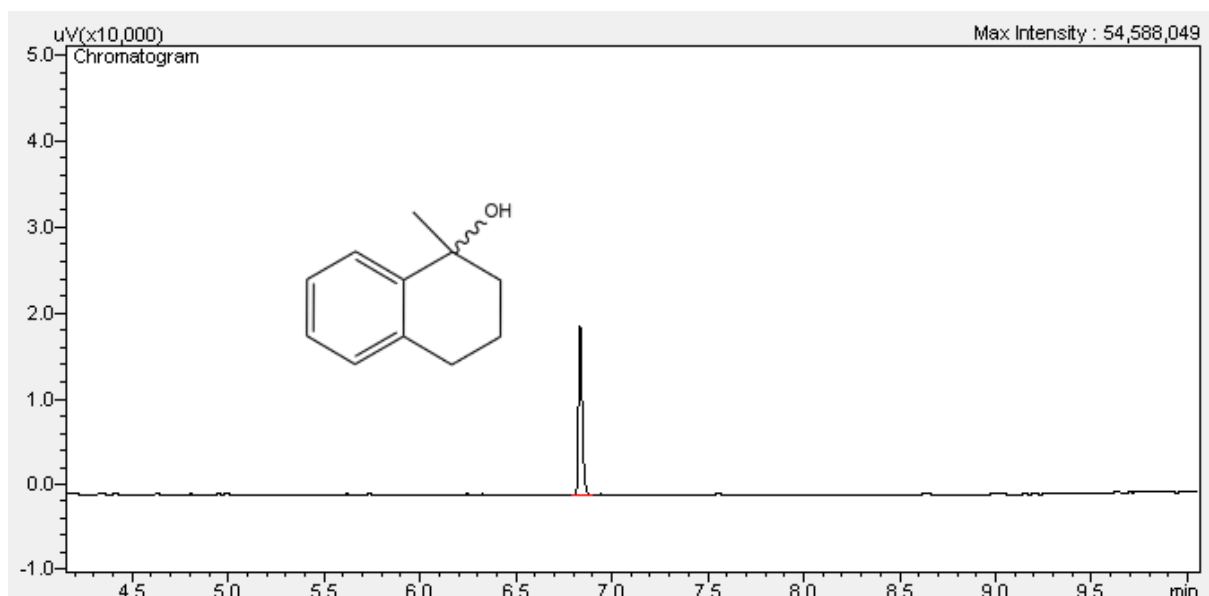


Figura 15: cromatograma do substrato (rac)-1

A figura mostra o cromatograma apresentando um pico único de $t_R = 6,835$ min, demonstrando o alto grau de pureza do substrato.

Além disso, utilizou-se o padrão racêmico do substrato para a análise cromatográfica no CG-DIC utilizando a coluna quiral para separar e determinar os tempos de retenção de cada um dos enantiômeros presentes. O cromatograma obtido é apresentado na Figura 16 e permite a observação da total separação dos enantiômeros *R* e *S* do substrato utilizado.

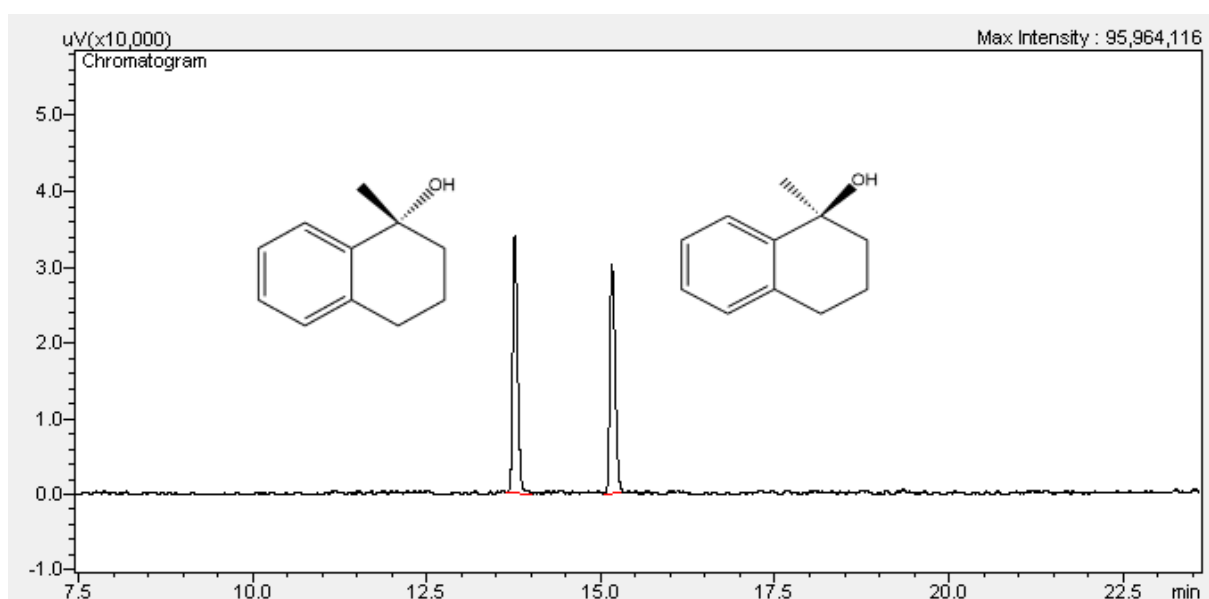


Figura 16: cromatograma do substrato (rac)-1 em fase quiral

4.2.2) Análise cromatográfica dos ésteres (*rac*)-2 e (*rac*)-3

Partindo da mesma estratégia descrita no item acima, os padrões sintetizados dos compostos (*rac*)-2 e (*rac*)-3 foram analisados através da técnica de cromatografia gasosa utilizando CG-DIC com as colunas HP5-MS e Chirasil com o objetivo de obter o tempo de retenção dos ésteres e a separação dos enantiômeros. Os cromatogramas abaixo (Figuras 17 a 20) apresentam os dados obtidos para os compostos **2** e **3**, respectivamente.

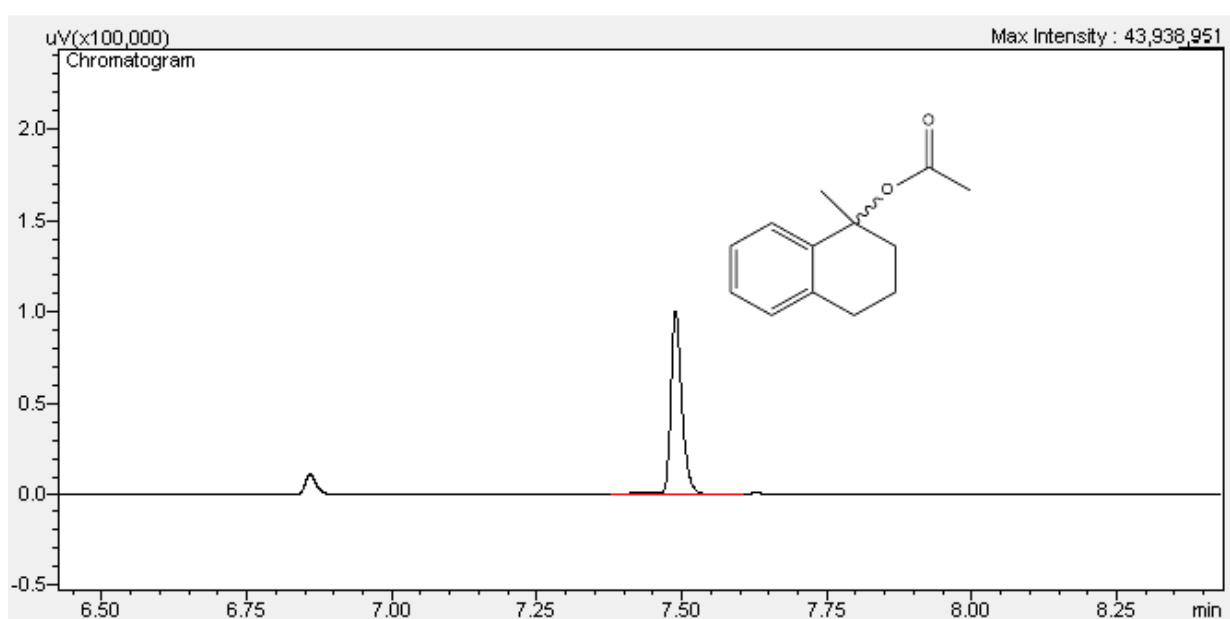


Figura 17: cromatograma do éster (*rac*)-2

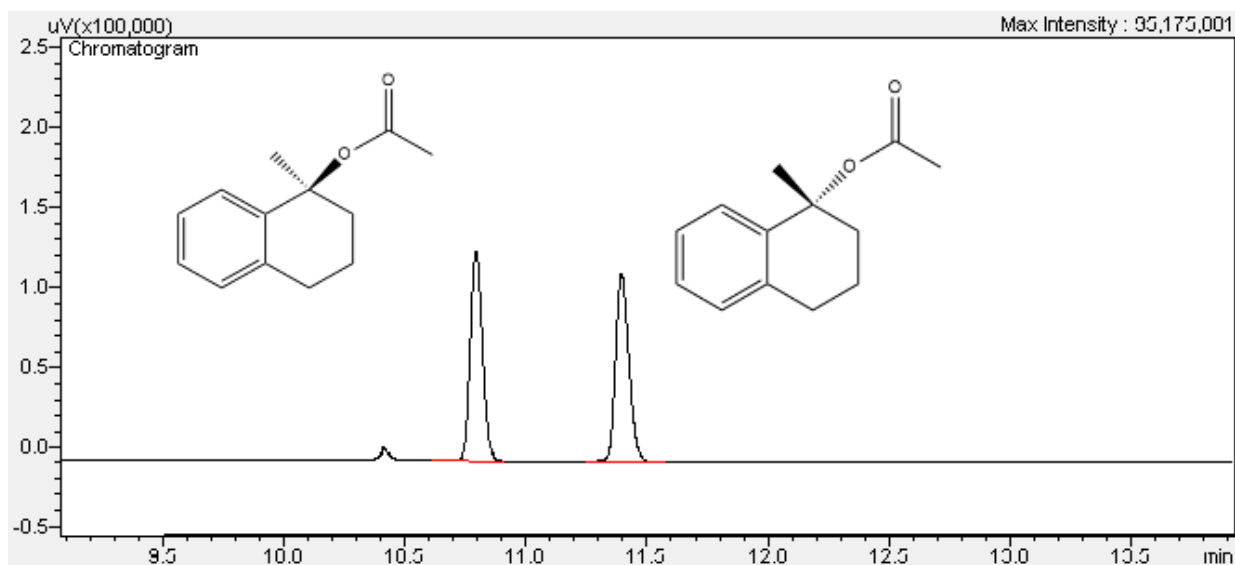


Figura 18: cromatograma do éster (rac)-2 em fase quiral

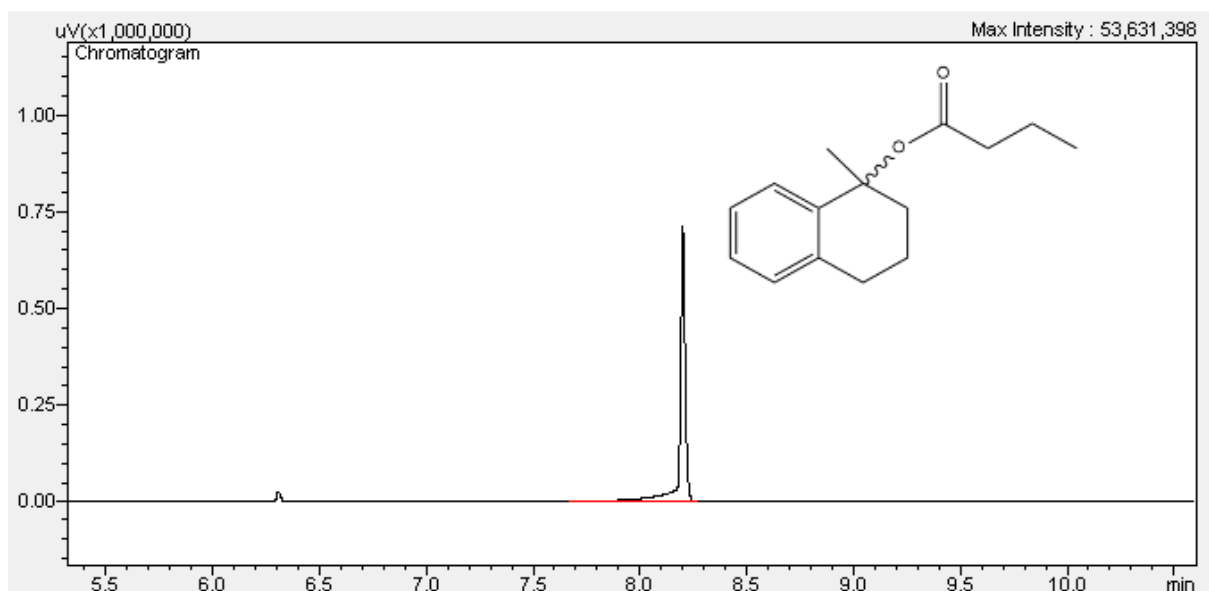


Figura 19: cromatograma do éster (rac)-3

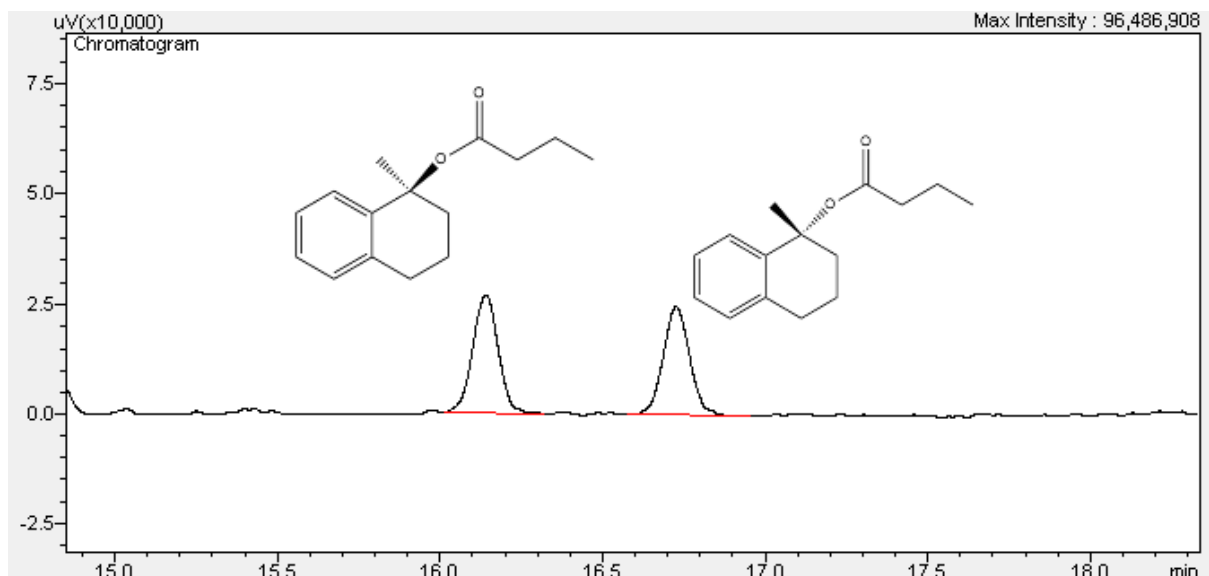


Figura 20: cromatograma do éster (rac)-3 em fase quiral

4.3) Estudo da variação do grupo doador de acila

O primeiro parâmetro a ser avaliado neste trabalho é o efeito da variação do grupo doador de acila na resolução cinética enzimática. O composto escolhido como doador apresenta uma função essencial no mecanismo do ciclo catalítico da CAL-A (Figura 21) e sua estrutura contribui consideravelmente para o andamento da reação. Dessa forma, foram escolhidos os compostos acetato de vinila e butirato de vinila para avaliar a influência da estrutura desses grupos na conversão da reação.

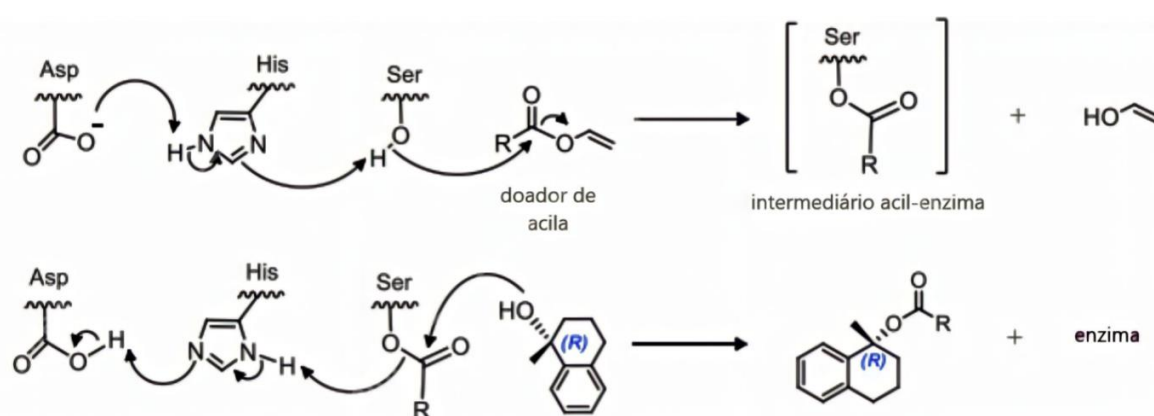


Figura 21: representação esquemática do ciclo catalítico da CAL-A com o substrato de interesse

4.3.1) Acetato de vinila como doador de acila

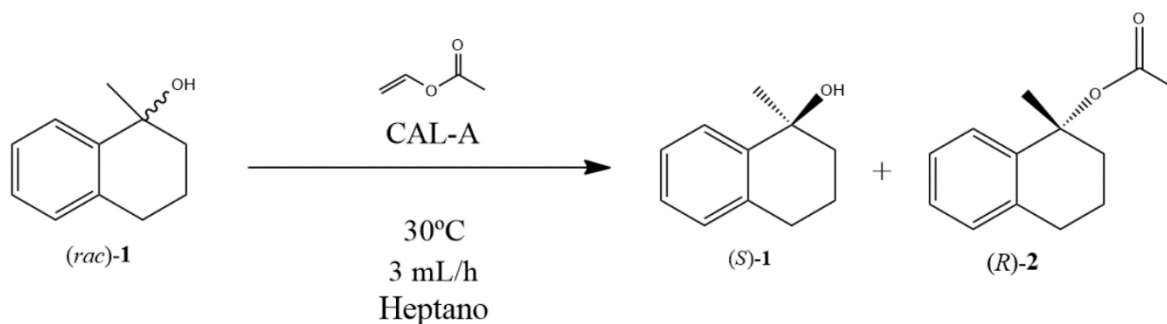


Figura 22: representação esquemática da resolução cinética enzimática utilizando acetato de vinila como doador de acila

A primeira resolução cinética realizada se procedeu utilizando o acetato de vinila como grupo doador de acila e partindo do substrato racêmico **1**. A solução contendo o substrato e o doador de acila foi inserida no reator e, após decorrido o tempo da reação (3h de reação, com tempo de residência de 22,3 min), foi coletada, rotaevaporada e analisada no CG-DIC. O cromatograma proveniente da reação é representado pela Figura 23.

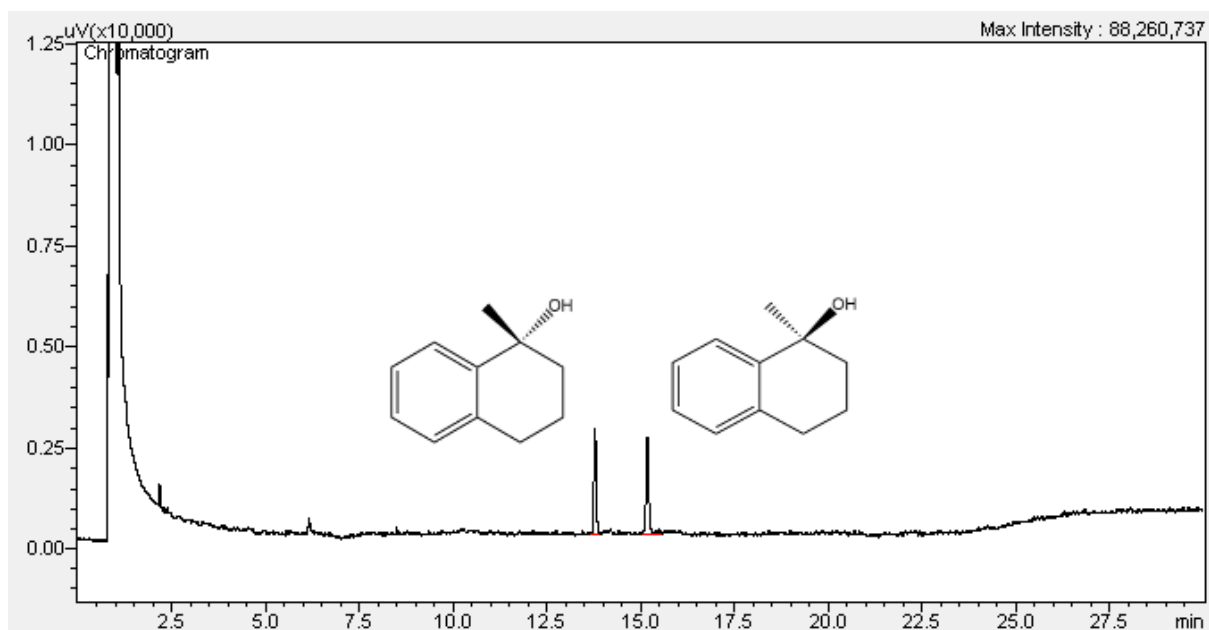


Figura 23: cromatograma da reação utilizando o acetato de vinila como doador de acila

Através do cromatograma obtido é possível concluir que a reação não ocorreu, uma vez que a presença do éster **2** não foi observada. Este resultado pressupõe que, nas condições reacionais propostas, a enzima utilizada não apresenta atividade catalítica com o acetato de vinila presente no meio, de forma a proporcionar a não formação do produto.

Dessa forma, fez-se necessária a avaliação de outro doador de acila de estrutura semelhante.

4.3.2) Butirato de vinila como doador de acila

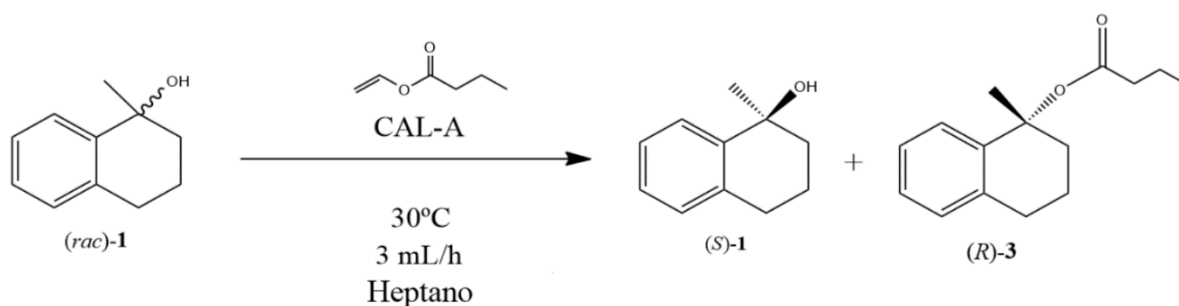


Figura 24: representação esquemática da resolução cinética enzimática utilizando butirato de vinila como doador de acila

Para a resolução cinética enzimática utilizando o butirato de vinila como doador de acila foi utilizado o mesmo procedimento descrito no subitem acima e o cromatograma obtido é representado pela Figura 25.

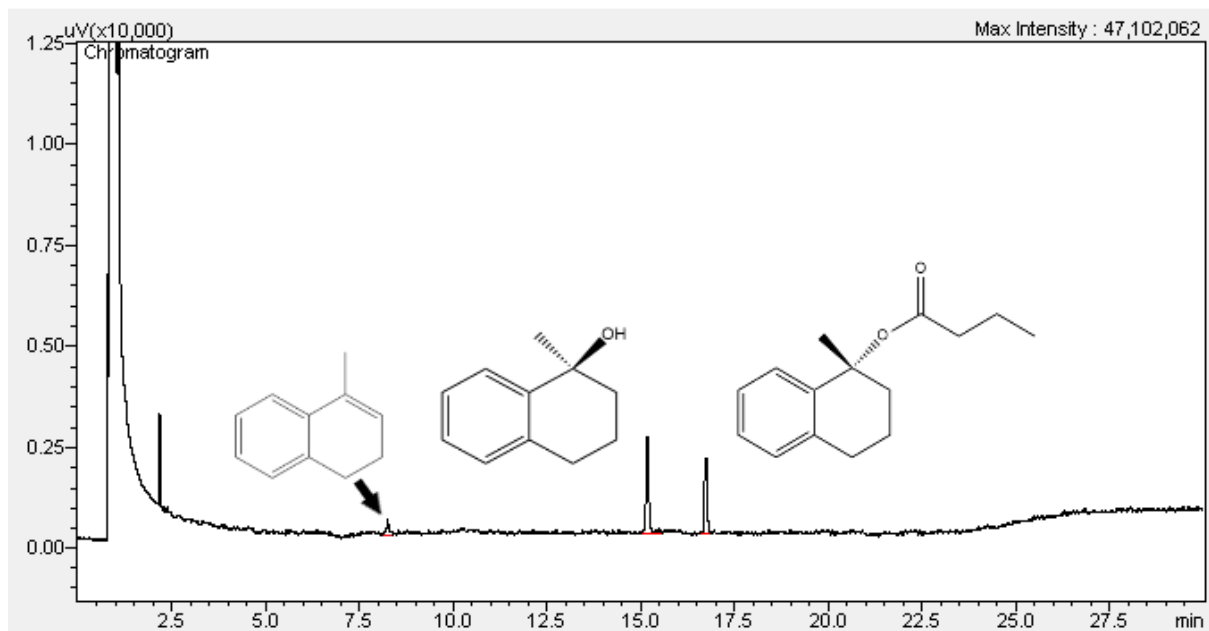


Figura 25: cromatograma da reação utilizando butirato de vinila como doador de acila

Através do cromatograma obtido é possível observar a formação não só do produto (*R*)-**3**, mas também de um subproduto alceno formado a partir de uma reação de eliminação. As conversões calculadas foram de 40% para o produto (*R*)-**3** com excesso enantiomérico de 99% e de 5% para o subproduto formado.

Considerando a análise dos dados coletados das resoluções cinéticas enzimáticas com variação do grupo doador de acila, foi possível observar que a utilização do butirato de vinila se mostrou extremamente eficiente em relação ao acetato de vinila e, portanto, seu uso foi fixado para as subseqüentes reações de resolução cinética.

4.4) Estudo da variação da taxa de fluxo

A taxa de fluxo escolhida para reações em fluxo contínuo de faz uma variável de grande influência no sistema uma vez que a mesma dita a velocidade em que a solução passa pelo reator e permanece em contato com o catalisador. O tempo medido em que o substrato se apresenta no interior do reator é denominado "tempo de residência" e é determinado de maneira inversamente proporcional à taxa de fluxo

aplicada. Dessa forma, foram realizadas resoluções cinéticas utilizando as mesmas condições descritas no subitem anterior, mas em diferentes fluxos a fim de determinar o tempo de residência associado a cada um e sua influência nas taxas de conversão. Os cromatogramas obtidos foram apresentados nas Figuras 26, 27 e 28 e os dados foram compilados na Tabela 1.

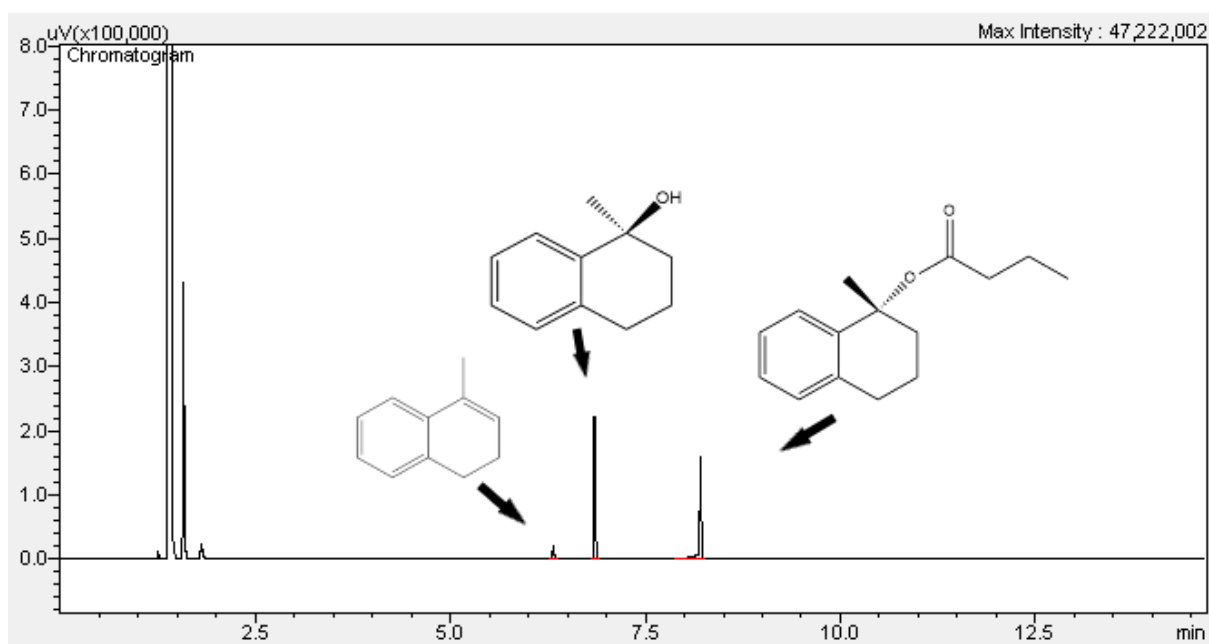


Figura 26: cromatograma da reação sob um fluxo de 3 mL/h

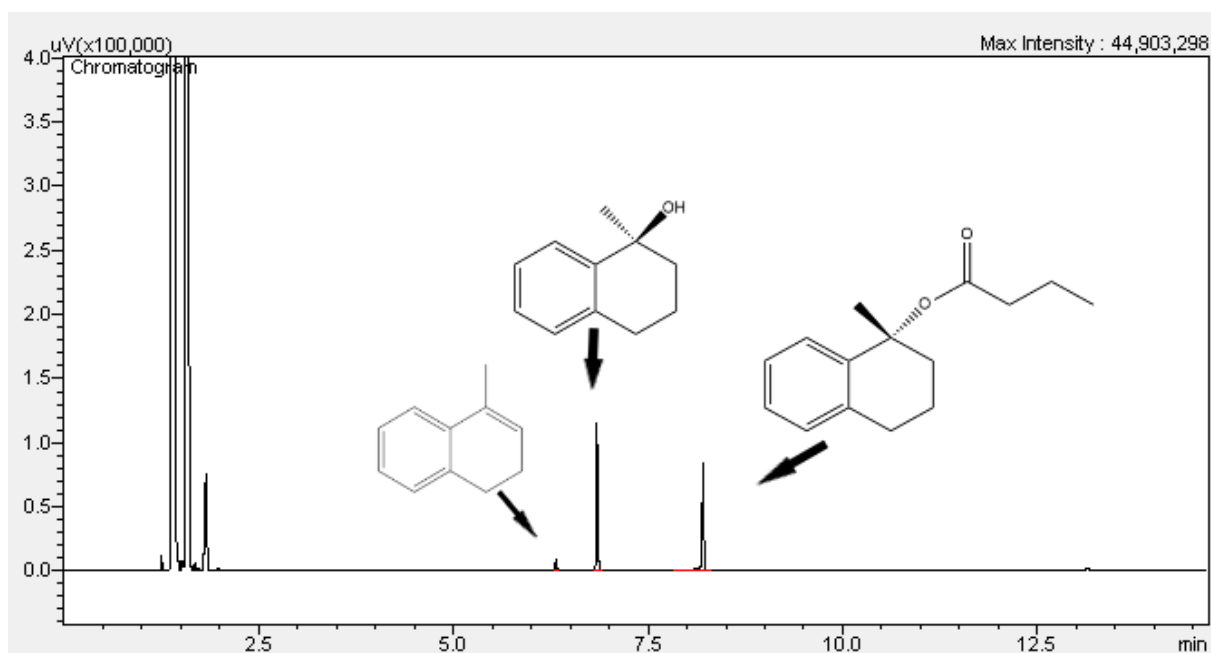


Figura 27: cromatograma da reação sob um fluxo de 2 mL/h

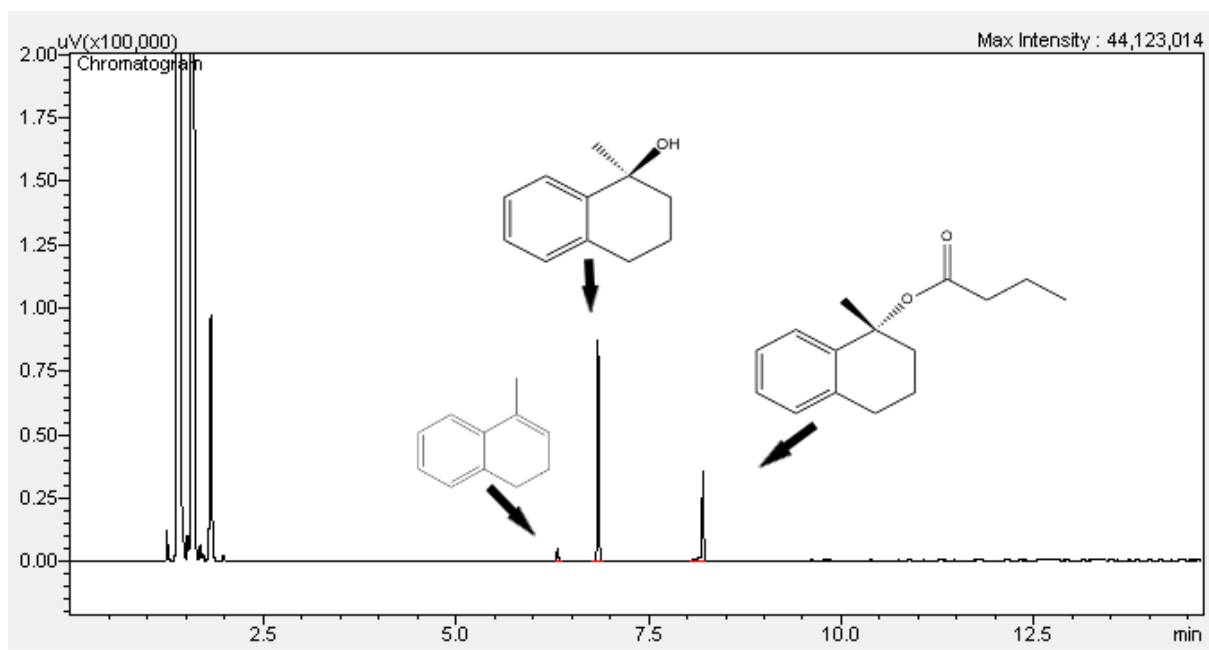


Figura 28: cromatograma da reação sob um fluxo de 6 mL/h

Tabela 1 – Resultados das resoluções cinéticas variando as taxas de fluxo

Entrada	Fluxo (mL/h)	Tempo de residência (min)	Conversão de (R)-3	Conversão de subproduto
1	3	22,3	40%	5%
2	2	24,3	42%	4%
3	6	11,2	27%	4%

Considerando os dados apresentados na Tabela 1, observou-se que a taxa de fluxo mais otimizada para a realização do processo é a de 3 mL/h visto que a conversão associada a este valor é proporcionalmente maior em relação aos demais fluxos testados e, portanto, foi a taxa fixada para os demais experimentos.

4.5) Estudo da variação do solvente

Para a escolha dos solventes a serem utilizados na análise, foram considerados os critérios de polaridade e posição no guia de sustentabilidade de solventes fornecido pela GlaxoSmithKline (GSK) apresentado abaixo.

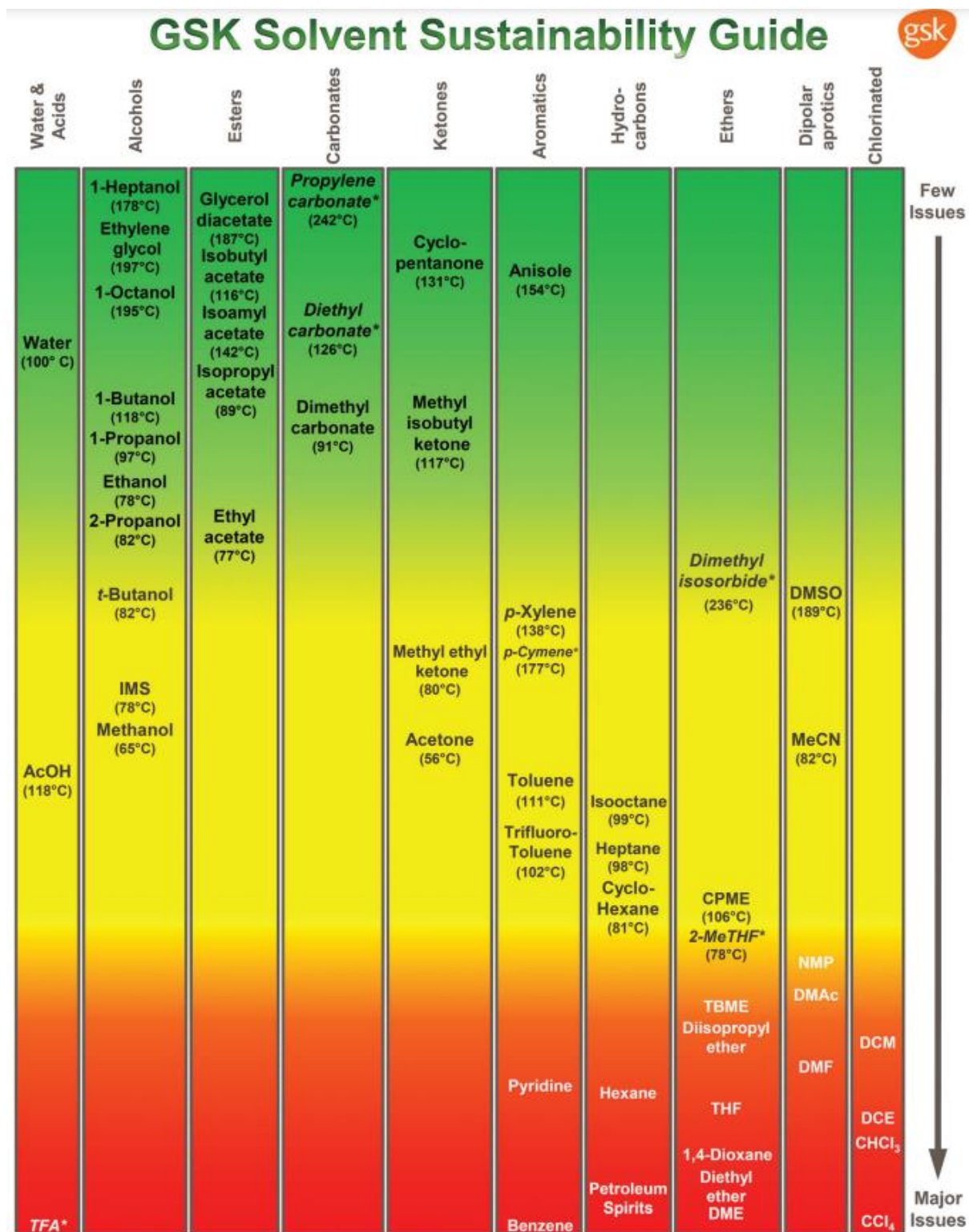


Figura 29: tabela de classificação de solventes da GSK (ALDER et al., 2016)

Os solventes utilizados neste estudo foram escolhidos de modo a não serem compostos classificados abaixo da linha alaranjada da tabela a fim de que a reação proposta seja o mais verde na medida do possível.

A polaridade dos solventes também se apresenta como uma propriedade considerada importante para a otimização da reação uma vez que influencia na solubilidade do substrato no solvente e nas interações eletrônicas com o suporte de imobilização da enzima. Considerando estudos prévios do grupo de pesquisa (ALMEIDA *et al.*, 2020), solventes apolares tendem a permitir um bom funcionamento das resoluções de álcoois secundários utilizando a enzima CAL-B e, portanto, foi o ponto de partida para as análises deste trabalho.

A reação utilizando heptano como solvente se procedeu de maneira satisfatória, como mostrado nos itens 4.3.2 e 4.4, apresentando uma conversão alta, com elevado enantiosseletividade e baixa formação do subproduto.

O solvente escolhido em seguida foi o isooctano e sua escolha parte do princípio de que a utilização de um solvente apolar de maior cadeia e com maior número de ramificações (maior volume) possa influenciar positivamente no andamento da reação. Entretanto, durante a realização do experimento, foi observada uma menor solubilização do substrato em isooctano, sendo a mesma possível somente após a adição do doador de acila (butirato de vinila) à solução e, além disso, quando retiradas alíquotas da reação para o acompanhamento, foi detectada a presença do substrato retido no reator após a passagem da solução. De modo a facilitar a remoção dos resíduos de substrato retidos, foram realizadas limpezas na coluna utilizando acetato de etila com o objetivo de retornar o álcool residual ao frasco de coleta e permitir que os resultados obtidos sejam confiáveis. Os cromatogramas obtidos após a limpeza e análise da reação são apresentados pelas Figuras 30 e 31.

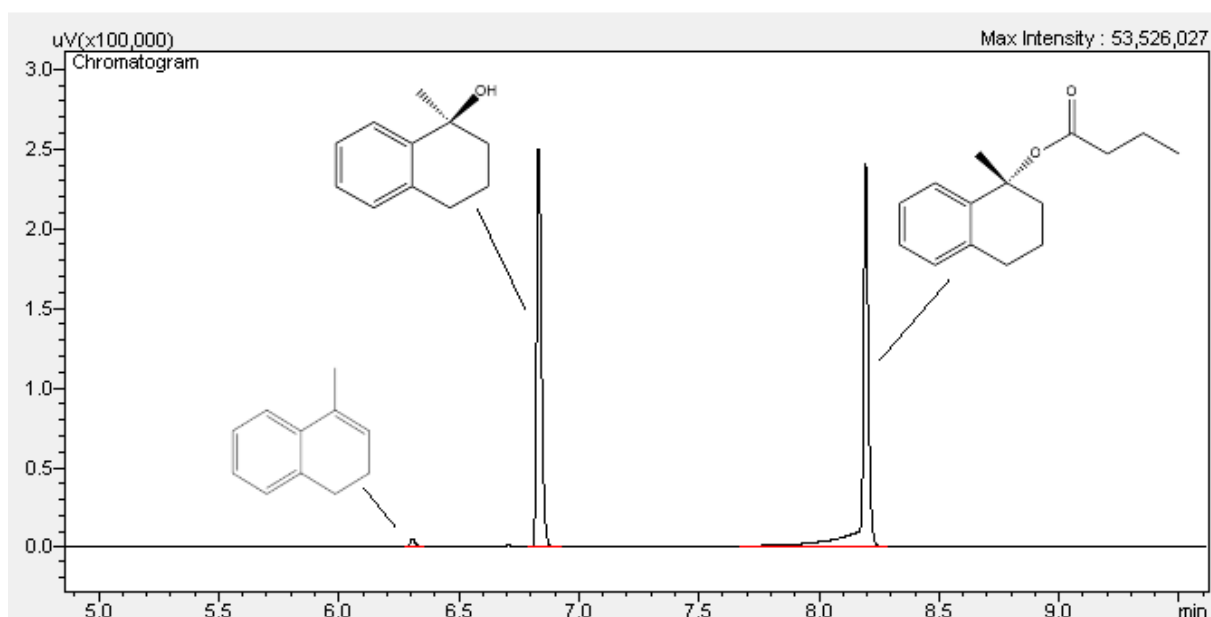


Figura 30: cromatograma da resolução cinética enzimática utilizando isooctano como solvente

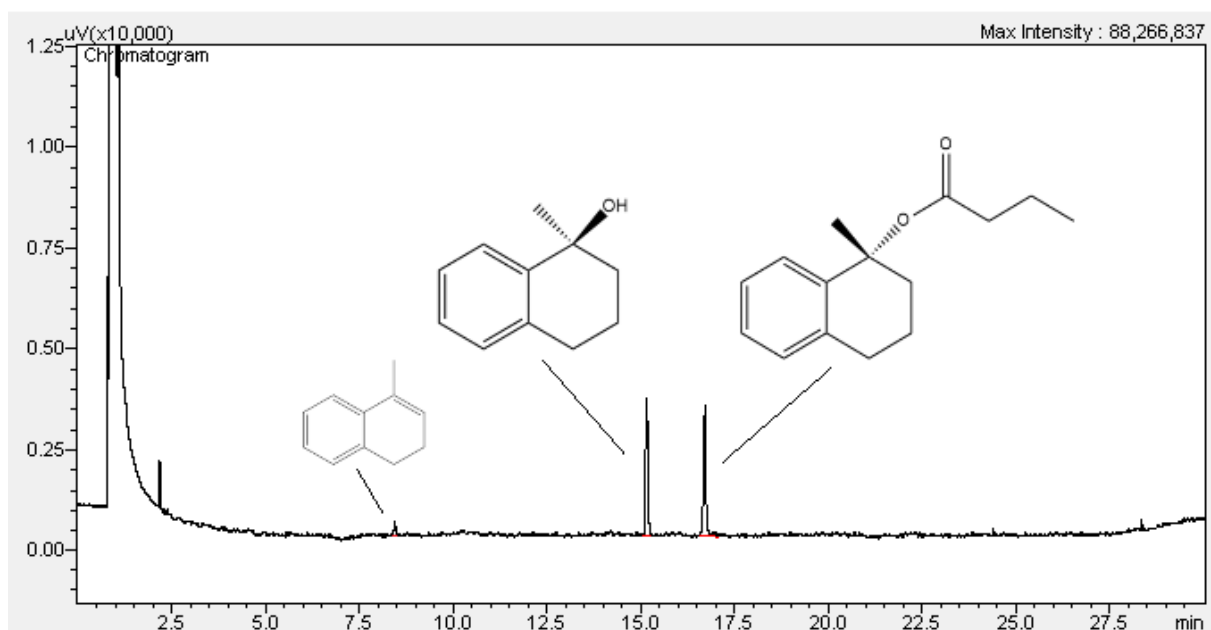


Figura 31: cromatograma em fase quiral da resolução cinética enzimática utilizando isooctano como solvente

A partir dos cromatogramas acima, foi possível calcular uma conversão de 48% do produto (*R*)-**3** com excesso enantiomérico superior a 99% e com formação de 1% do subproduto. Considerando que o valor de conversão máximo de uma resolução cinética é de 50%, é possível afirmar que a conversão obtida nesta reação é

extremamente próxima do ideal e, portanto, trata-se de uma resolução cinética enzimática otimizada.

A fim de contornar as problemática de solubilidade e retenção de substrato supracitadas, foi proposta a realização de resoluções utilizando um escopo de solventes polares e seu comportamento na reação. Seguindo as opções propostas no guia de solventes da GSK (Figura 30), foram escolhidos para teste os solventes polares: Acetonitrila, éter di-isopropílico e trifluorotolueno. Os cromatogramas das reações são apresentados nas figuras 32, 33 e 34.

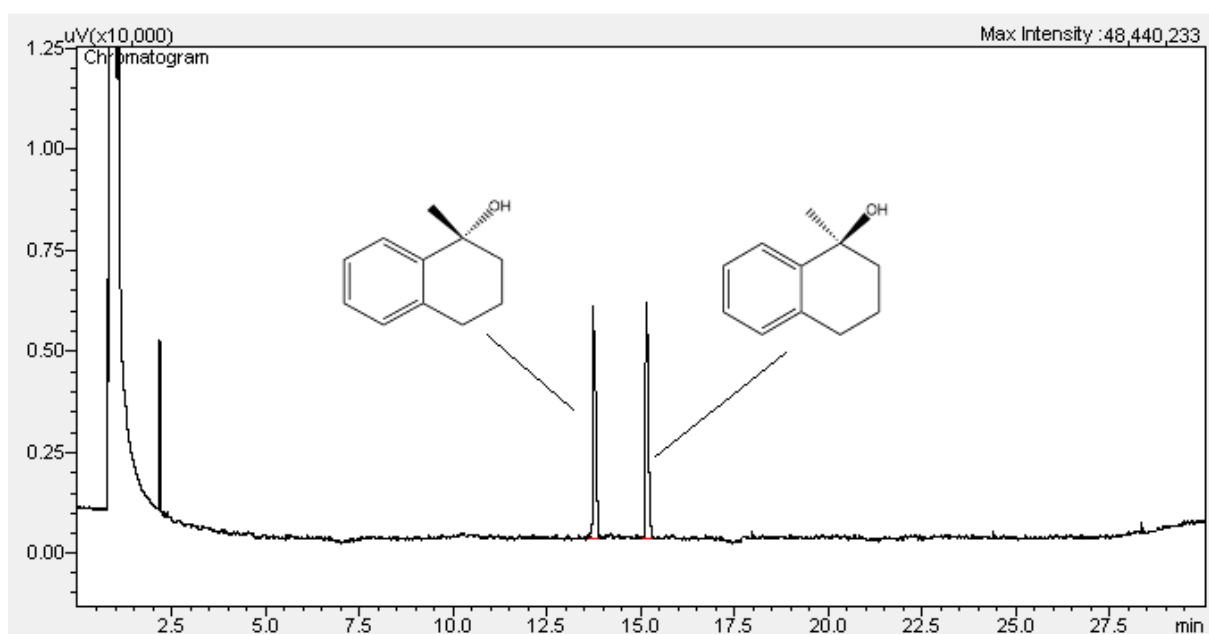


Figura 32: cromatograma em fase quiral da resolução cinética enzimática utilizando acetonitrila como solvente

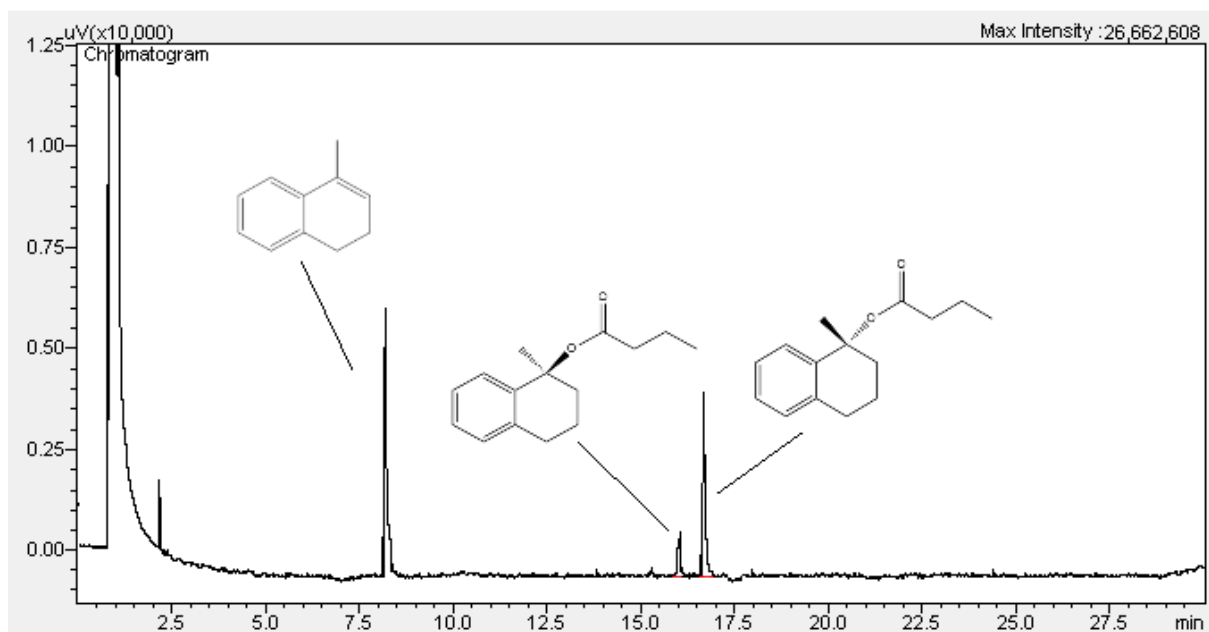


Figura 33: cromatograma em fase quiral da resolução cinética enzimática utilizando DIPE como solvente

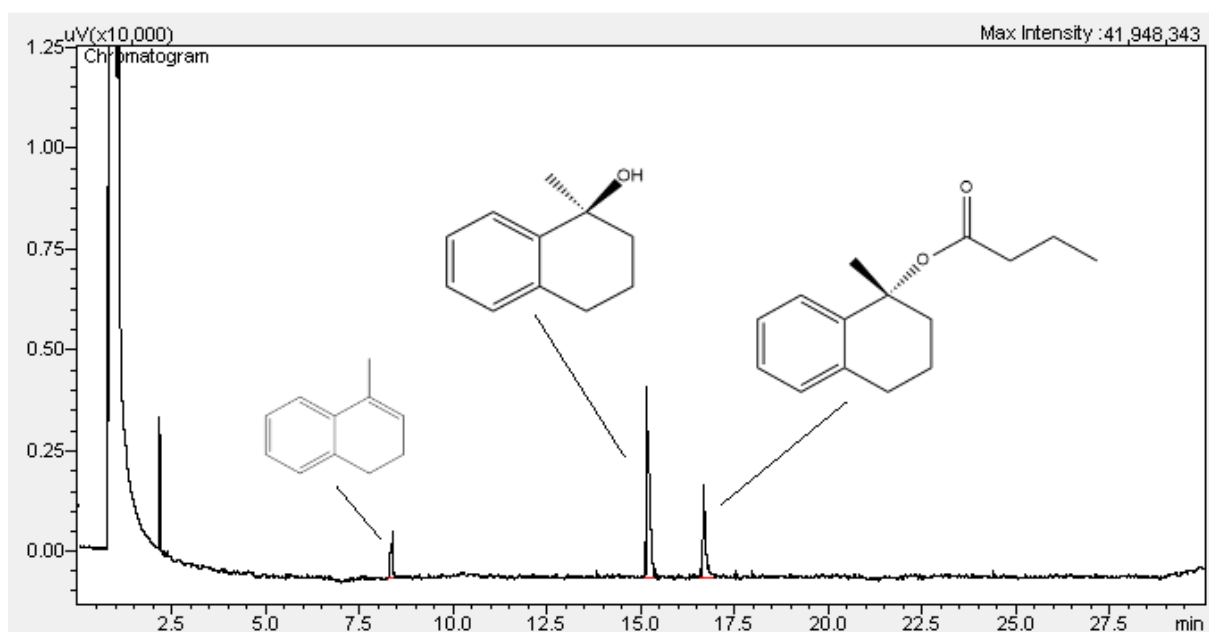


Figura 34: cromatograma em fase quiral da resolução cinética enzimática utilizando BTF como solvente

A partir dos cromatogramas acima, foi possível obter dos valores de conversão e excesso enantiomérico que foram compilados e apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultado das resoluções cinéticas variando o solvente

Entrada	Solvente	Conversão (R)-3 (%)	Conversão subproduto (%)	ee (%)
1	Heptano	40	5	>99
2	Isooctano	48	1	>99
3	MeCN	<1	<1	n.d.
4	DIPE	31	46	73
5	BTF	18	6	>99

De acordo com os valores de conversão e excesso enantiomérico, é possível observar que as reações utilizando solventes apolares (heptano, isooctano) se mostraram muito mais eficientes e otimizadas em relação às reações utilizando solventes polares (MeCN, DIPE, BTF). Dessa forma, a estratégia de utilizar um solvente polar para melhor solubilização do substrato e minimizar a retenção do mesmo no reator foi descartada, mantendo-se as técnicas de solubilização do substrato no doador de acila e limpeza da coluna utilizando-se acetato de etila.

4.6) Estudo geral das condições reacionais

De modo a expor de maneira clara e objetiva os dados obtidos pelo estudo da resolução cinética enzimática nas condições propostas, montou-se a Tabela 3 a fim de permitir a melhor visualização das análises e otimização das condições reacionais.

Tabela 3 – Análise dos resultados de otimização das condições reacionais

Entrada	Solvente	Fluxo (mL/h)	Tempo de residência (min)	Conversão (R)-3 (%)	Conversão subproduto (%)	ee (%)
1	Heptano	2	24,3	42	4	>99
2	Heptano	6	11,2	27	4	>99
3	Heptano	3	22,3	40	5	>99
4	Isooctano	3	22,3	48	1	>99
5	MeCN	3	22,3	<1	<1	n.d.
6	DIPE	3	22,3	31	46	73
7	TFT	3	22,3	18	6	>99

A entrada destacada na tabela (Entrada 4) representa as condições reacionais otimizadas da resolução cinética enzimática em regime de fluxo contínuo em que se obteve uma conversão próxima da conversão máxima possível pelo protocolo de resolução cinética, com mínima formação de subproduto e com um baixo tempo de residência. Este resultado se mostra atualmente o melhor resultado reportado para reações de resolução cinética enzimática de álcoois terciários, onde o último resultado publicado foi de uma conversão de 32% com excesso enantiomérico superior a 99% em 48h de reação em um sistema de batelada utilizando DIPE como solvente de escolha (AKAI *et al.*, 2020).

5) Conclusão

A partir das reações de resolução cinética realizadas nesse trabalho, foram avaliados diversos parâmetros reacionais, dentre eles o grupo doador de acila, a taxa de fluxo mais apropriada e o solvente utilizado. A reação utilizando acetato de vinila não se apresentou viável uma vez que não foi observada formação do produto, enquanto a reação com o butirato de vinila apresentou um alto valor de conversão.

Entre as taxas de fluxo avaliadas, o melhor fluxo utilizado foi o de 3 mL/h visto que os demais fluxos apresentaram valores de conversão proporcionalmente menores. Além disso, entre os solventes aplicados, os solventes apolares (heptano, isooctano) apresentaram altos valores de conversão e baixa formação de subproduto sendo o

isooctano o solvente mais adequado, enquanto os solventes polares (MeCN, DIPE e BTF) apresentaram baixos valores de conversão e elevada formação de subproduto.

Visto isso, as condições otimizadas para a realização do protocolo de resolução cinética enzimática foram utilizando o butirato de vinila como doador de acila, uma taxa de fluxo de 3 mL/h e isooctano como solvente e, portanto, o uso do biorreator de fluxo contínuo e das condições reacionais estabelecidas se prova como válido e aplicável à resolução de centros quirais de blocos construtores. Além disso, este trabalho se apresenta como o primeiro exemplo de uma resolução cinética de álcoois terciários em regime de fluxo contínuo e, com os resultados promissores obtidos, deve contribuir significativamente para a comunidade científica.

6) REFERÊNCIAS:

CHINN, T.; MASON, P.; The first 25 years of the hydrology of the Onyx River, Wright Valley, Dry Valleys, Antarctica. **Polar Record**, v. 52, p. 16-65, 2016.

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

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

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

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

CLARSON, S. J.; POOJARI, Y.; Thermal Stability of *Candida antarctica* lipase B immobilized on macroporous acrylic resin particles in organic media. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 7-11, 2013.

CIANCI, M.; FISHER, S. J.; STAUCH, B.; Open and closed states of *Candida antarctica* lipase B: protonation and the mechanism of interfacial activation. **Journal of Lipid Research**, v. 56, issue 12, p. 2348-2358, 2015.

BORNSCHEUER, U. T.; KOURIST, R.; Biocatalytic synthesis of optically active tertiary alcohols. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 505-517, 2011.

BORNSCHEUER, U. T.; HENKE, E.; PLEISS, J.; Activity of Lipases and Esterases towards Tertiary Alcohols: Insights into Structure-Function Relationships. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, No. 17, p. 3211-3213, 2002.

BRYAN, P.; HSIAO, H. Y.; PANTOLIANO, M. W.; POULOS, T.; QUILL, S. G.; Site-directed mutagenesis and the role of the oxyanion hole in subtilisin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, p.3743-3745, 1986.

BAUER, T. L.; BUCHHOLZ, P. C. F.; PLEISS, J.; The modular structure of α/β -hydrolases. **The FEBS Journal**, v. 287, issue 5, p. 1035-1053, 2020.
(BAUER; BUCHHOLZ; PLEISS; 2020)

ANTHONSEN, T.; FUGLSETH, E.; HOFF, H. B.; New chiral building blocks from acetovanillone using Lipase A and B from *Candida antarctica*. **Tetrahedron: Assymetry**, v. 17, p. 1290-1295, 2006.

BALTER, S.; BOROWIECKI, P.; JUSTYNIAK, I.; OCHAL, Z.; First chemoenzymatic synthesis of (*R*)- and (*S*)-1-(9H-fluoren-9-yl)ethanol. **Tetrahedron: Assymetry**, v. 24, p. 1120-1126, 2013.

FERNÁNDEZ, G. V.; GOTOR, V.; TORRES, F. P.; Chemoenzymatic preparation of optically active secondary amines: a new efficient route to enantiomerically pure indolines. **Tetrahedron: Assymetry**, v. 17, p. 2558-2564, 2006.

FERNÁNDEZ, G. V.; GOTOR, V.; TORRE, O.; Lipase catalyzed resolution of chiral 1,3-amino alcohols: application in the asymmetric synthesis of (*S*)-dapoxetine. **Tetrahedron: Assymetry**, v. 17, p. 860-866, 2006.

BERNARDO, M. J.; FERNÁNDEZ, G. V.; GRANDA, G. S; GONZÁLEZ, F. A.; GOTOR, V.; LOMBARDÍA, R. N.; SÁNCHEZ, M. D.; Lipase-catalyzed desymmetrization of meso-1,2-diaryl-1,2-diaminoethanes. **Tetrahedron: Assymetry**, v. 25, p. 381-386, 2014.

BAECK, B.; BRENNEIS, R.; Esterification of fatty acids using *Candida antarctica* lipase A in water-abundant systems. **Biotechnology Letters**, v. 34, p. 1459-1463, 2012.

YUN-LIN, Liu.; XIAO-TONG, Liu.; Recent Advances in Catalytic Asymmetric Synthesis of Tertiary Alcohols via Nucleophilic Addition to Ketones. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 361, p. 876-918, 2022.

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

MELO, T.; BRANDÃO, P.; PINEIRO, M.; Flow Chemistry: towards a more sustainable heterocyclic synthesis. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 7188-7217, 2019.

SEEBERGER, P.; GILMORE, K.; PLUTSCHACK, M.; PIEBER, B.; The hitchhiker's guide to flow chemistry. **Chemical Reviews**, v. 117, p. 11796-11893, 2017.

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

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