



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DIANA KELLY CASTRO DE ALMEIDA

**EMPREGO DE LIPASES NA RESOLUÇÃO CINÉTICA DE ÉSTERES
ALQUINÍLICOS PARA PRODUÇÃO DE ALQUINILCARBINÓIS QUIRAIS**

FORTALEZA

2021

DIANA KELLY CASTRO DE ALMEIDA

EMPREGO DE LIPASES NA RESOLUÇÃO CINÉTICA DE ÉSTERES
ALQUINÍLICOS PARA PRODUÇÃO DE ALQUINILCARBINÓIS QUIRAIS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Conceição
Ferreira de Oliveira
Coorientador: Prof. Dr. Marcos Carlos de
Mattos

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- A445e Almeida, Diana Kelly Castro de.
Emprego de lipases na resolução cinética de ésteres alquínílicos para produção de alquínilcarbinóis quirais / Diana Kelly Castro de Almeida. – 2021.
117 f. : il.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2021.
Orientação: Prof. Dr. Maria Conceição Ferreira de Oliveira.
Coorientação: Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos.
1. biocatálise. 2. lipase. 3. alquínilcarbinol. 4. resolução cinética enzimática. I. Título.

CDD 540

DIANA KELLY CASTRO DE ALMEIDA

EMPREGO DE LIPASES NA RESOLUÇÃO CINÉTICA DE ÉSTERES
ALQUINÍLICOS PARA PRODUÇÃO DE ALQUINILCARBINÓIS QUIRAIS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovada em: __/__/__.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Maria Conceição Ferreira de Oliveira (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Jefferson Luiz Princival
Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ)

Prof. Francesco Enzo Molinari
Università degli Studi di Milano

Dedico este trabalho a Deus, a minha filha, ao meu esposo, aos meus pais, irmãos, amigos e professores.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar forças para não desistir e que iluminou o meu caminho durante esta caminhada.

A minha filha, Melinda por todos os sorrisos.

Ao meu esposo Reinaldo pelo amor, companheirismo e paciência.

Aos meus pais, Edmilson e Jaqueline, e aos meus irmãos, Fernanda, Jhonathan e Eduarda, pelo apoio e incentivo.

A minha orientadora, professora Maria da Conceição, pela dedicação e empenho na orientação da elaboração deste trabalho.

Ao professor Marcos Carlos, por todos os ensinamentos e apoio.

Um agradecimento especial aos franceses, Yves Génisson, Remi Chauvin e Stéphanie Ballereau pela parceria e colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica (LABS): Bruna, Aquino, Tatiana, Thiago, Daniely, Gledson, Kimberly, Artur, Gabriella, Tell, Yana Letícia, Sabrina, Daniel, Paulo, Lucas, Fábio, Ana Gabriele, Érica, Naara, Jonatas, Dalila e Maria.

Aos meus amigos: Aiêrta, Bruna, Jessica, Tiago, João Evangelista, Alisson e Emerson pelo companheirismo e momentos de descontrações.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química e a Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

RESUMO

Os compostos poliacetilênicos são metabólitos secundários biossintetizados por diferentes organismos dentre os quais se destacam espécies de esponjas marinhas, e que apresentam em suas estruturas uma ou mais unidades alqunilcarbinólicas. Estes compostos chamam a atenção por apresentarem elevada atividade contra células cancerígenas. Neste projeto descrevemos o estudo da resolução cinética enzimática (RCE) de cinco acetatos de alqunilcarbinóis racêmicos, *via* reação de hidrólise catalisada por lipases, para produzir os alqunilcarbinóis (*R* e *S*) enantiomericamente puros ou enantioenriquecidos. Portanto, o acetato *rac*-heptadeca-1,4-di-in-3-ila (*rac*-**2-Ac**) foi utilizado como substrato “modelo” no estudo. Após uma triagem, foi selecionada a lipase de *C. antarctica* B imobilizada em resina acrílica (CAL-B), a qual levou a valor de conversão de 50%, valores de excesso enantiomérico do álcool e do acetilado > 99% e enantiosseletividade (E) > 200 em um tempo reacional de 48 h a 30 °C sem co-solvente. Portanto, a CAL-B foi utilizada para estender o estudo da RCE do acetato *rac*-heptadeca-1,4,6-tri-in-3-ila (*rac*-**3-Ac**), do acetato *rac*-heptadeca-1-en-4-in-3-ila (*rac*-**4-Ac**) e do acetato *rac*-heptadeca-1-in-3-ila (*rac*-**5-Ac**). Em todas as RCEs, a CAL-B foi mais eficiente na presença de acetoneitrila como co-solvente, variando os parâmetros tempo e temperatura para se obter os melhores resultados e assim produzindo álcoois (*R*)- e (*S*) com conversões de 50%, enantiosseletividades (E) = 194->200 e altos valores *e.e.* [(*R*)-**3** e (*S*)-**3-Ac**, *e.e.* 98%, em 7 h e 20 °C; (*R*)-**4**, *e.e.* 97% e (*S*)-**4-Ac**, *e.e.* 95%, em 3 h e 25 °C; (*R*)-**5** e (*S*)-**5-Ac**, *e.e.* 96%, em 5 h e 25 °C). Já o acetato *rac*-(triisopropilsilil)penta-1,4-di-in-3-ila (*rac*-**6-Ac**) é um dialqunilcarbinol (DAC) versátil C5 com cadeia carbônica diferente dos demais *rac*-acetatos (**2**, **3**, **4** e **5**) que apresentavam estruturas com 17 átomos de carbono. Para o substrato *rac*-**6-Ac**, em 24 h a 40 °C, as melhores condições para se obter (*R*)-**6** e (*S*)-**6-Ac**, *e.e.* > 99% incluiu a utilização da lipase *T. lanuginosus* (TLL) na presença de tetraidrofurano como co-solvente. A proporção de enzima:substrato de 2:1 foi utilizada em todas as RCEs dos acetatos de alqunilcarbinol racêmicos supracitados. Os (*S*)-álcoois foram obtidos pela hidrólise mediada por lipase dos compostos (*S*)-acetatos, exceto para *rac*-**2-Ac** (hidrólise química). Os rendimentos dos alqunilcarbinóis (*R* e *S*) puros ou enantioenriquecidos variaram entre 39 a 88%.

Palavras-chave: Biocatálise. Lipase. Alqunilcarbinol. Resolução cinética enzimática.

ABSTRACT

Polyacetylenic compounds are secondary metabolites biosynthesized by different organisms, among which are species of marine sponges, which have in their structures one or more alkynylcarbinolic units. These compounds are noteworthy for their high activity against cancer cells. In this project we describe the study of the enzymatic kinetic resolution (EKR) of five racemic alkynylcarbinols acetates, *via* lipase-catalyzed hydrolysis reaction, to produce the enantiomerically pure or enantioenriched alkynylcarbinols. Therefore, *rac*-heptadeca-1,4-di-in-3-yl acetate (*rac*-2-Ac) was used as a “model” substrate in the study. After screening, the lipase of *C. antarctica* B immobilized on acrylic resin (CAL-B) was selected, which led to a conversion value of 50%, values of enantiomeric excess of alcohol and acetylate >99% and enantioselectivity (E) > 200 in a reaction time of 48 h at 30 °C without co-solvent. Therefore, CAL-B was used to extend the EKR study of *rac*-heptadeca-1,4,6-tri-in-3-yl acetate (*rac*-3-Ac), *rac*-heptadeca-1-en-4-in-3-yl acetate (*rac*-4-Ac) and *rac*-heptadeca-1-in-3-yl acetate (*rac*-5-Ac). In all EKRs, CAL-B was more efficient in the presence of acetonitrile as a co-solvent, varying the time and temperature parameters to obtain the best results and thus producing (*R*)- and (*S*) alcohols with 50% conversions, enantioselectivities (E) 194->200 and high values *e.e.* [(*R*)-3 and (*S*)-3-Ac, *e.e.* 98%, at 7 h and 20 °C; (*R*)-4, *e.e.* 97% and (*S*)-4-Ac, *e.e.* 95%, in 3 h and 25 °C; (*R*)-5 and (*S*)-5-Ac, *e.e.* 96%, in 5 h and 25 °C). The *rac*- (triisopropylsilyl) penta-1,4-di-in-3-yl (*rac*-6-Ac) acetate is a versatile C5 dialkynylcarbinol (DAC) with a different carbon chain from the other *rac*-acetates (2, 3, 4 and 5) that had structures with 17 carbon atoms. For the substrate *rac*-6-Ac, in 24 h at 40 °C, the best conditions to obtain (*R*)-6 and (*S*)-6-Ac, *e.e.* >99% included the use of lipase *T. lanuginosus* (TLL) in the presence of tetrahydrofuran as a co-solvent. The ratio of enzyme: substrate of 2:1 was used in all the EKCs of the racemic alkynylcarbinol acetates mentioned above. The (*S*)-alcohols were obtained by lipase-mediated hydrolysis of the (*S*)-acetate compounds, except for *rac*-2-Ac (chemical hydrolysis). The yields of pure or enantioenriched alkynylcarbinols (*R* and *S*) ranged from 39 to 88%.

Keywords: Biocatalysis. Lipase. Alkynylcarbinol. Enzymatic kinetic resolution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Representação geral dos LACs (1) e estruturas químicas dos compostos bioinspirados sintéticos 2-5.....	20
Figura 2	– Dialquilnilcarbinóis (DACs) sililados quirais "pequenos" (6), que podem ser utilizados como precursores essenciais para a síntese de vários lipídeos alquilnilcarbinóis quirais (LACs).....	20
Figura 3	– Reações catalisadas por lipases.....	26
Figura 4	– Resolução cinética ideal em que apenas um dos enantiômeros é transformado.....	26
Figura 5	– Modelo empírico da regra de Kazlauskas representando os modos favorável e desfavorável na interação enzima-substrato.....	27
Figura 6	– Modelo empírico de Kazlauskas para reações de acilação de álcoois secundários e hidrólise dos correspondentes ésteres, na presença de lipases.....	28
Figura 7	– Mecanismo catalítico da lipase na hidrólise de ésteres.....	29
Figura 8	– Mecanismo catalítico da lipase nas reações de transesterificação.....	29
Figura 9	– Estrutura de lipídeos poliacetilênicos com fragmento de alquilnilcarbinol isolados de diferentes organismos.....	31
Figura 10	– Estruturas dos análogos do produto natural sintetizados por Arfaoui <i>et al.</i> , 2013 e resultados dos ensaios citotóxicos. Valores de CI50 em μM	32
Figura 11	– As duas principais rotas de sínteses de alquilnilcarbinol secundário quiral..	32
Figura 12	– Redução da inona (8) por Murakami <i>et al.</i> , 2001.....	33
Figura 13	– Métodos relatados para a adição enantiosseletiva de alcinos terminais a aldeídos.....	34
Figura 14	– Síntese enantiosseletiva de (S)-9 pelo método de Zhong, Guo's e pelo método de Pu's.....	35
Figura 15	– Síntese dos dialquilnilcarbinóis quirais (S)- e (R)-2.....	36
Figura 16	– Síntese dos alquênil alquilnilcarbinóis (AACs) quirais (S)- e (R)-4.....	36
Figura 17	– Síntese do alquilnilcarbinol quiral (S)-5.....	37
Figura 18	– Síntese dos butadiinil alquilnilcarbinóis quirais (S)- e (R)-3.....	37

Figura 19	– Resolução enzimática mecanoquímica do álcool secundário (<i>rac</i> -20) em um moinho de bola, via reação de acetilação, catalisada pela lipase de <i>Candida antarctica</i> (CAL-B).....	39
Figura 20	– Resolução cinética do <i>rac</i> -22 realizada por Huang <i>et al.</i> (2015).....	39
Figura 21	– Resolução cinética enzimática de (±)-pent-2-in-1,4-diol (24) realizada por Ferreira <i>et al.</i> , 2015.....	40
Figura 22	– Resolução cinética enzimática de (±)-2-hexin-1,4-diol (26) realizada por Princival <i>et al.</i> , 2016.....	40
Figura 23	– Resolução cinética de <i>rac</i> -28 realizada por Kim <i>et al.</i> , 2013.....	41
Figura 24	– Resolução de álcoois propargílicos (<i>rac</i> -29a-h) racêmicos.....	41
Figura 25	– Resolução cinética do (±)-falcarinol mediada por lipase.....	43
Figura 26	– Síntese de aminas propargílicas realizada por Ma <i>et al.</i> , 2005.....	43
Figura 27	– Representação das estruturas dos alquínilcarbinóis 2-6, e parâmetros de síntese.....	47
Figura 28	– Reação de acetilação dos alquínilcarbinóis racêmicos.....	48
Figura 29	– Reação de hidrólise enzimática do éster <i>rac</i> -2-Ac na presença de lipases...	49
Figura 30	– Reação de RCE (<i>via</i> hidrólise) do LAC <i>rac</i> -2-Ac e hidrólise química do (<i>S</i>)-2-Ac.....	51
Figura 31	– Reação de RCE (<i>via</i> hidrólise) do LAC <i>rac</i> -2-Ac sem co-solvente.....	52
Figura 32	– Reação de RCE (<i>via</i> hidrólise) do LAC <i>rac</i> -3-Ac e hidrólise enzimática de (<i>S</i>)-3-Ac utilizando <i>Candida antarctica</i> B.....	53
Figura 33	– Reação de RCE (<i>via</i> hidrólise) do LAC <i>rac</i> -3-Ac nas condições otimizadas.....	55
Figura 34	– Reação de RCE (<i>via</i> hidrólise) do LAC <i>rac</i> -4-Ac.....	57
Figura 35	– Reação de RCE (<i>via</i> hidrólise) do LAC <i>rac</i> -5-Ac e hidrólise enzimática do (<i>S</i>)-5-Ac.....	60
Figura 36	– Resolução cinética enzimática do <i>rac</i> -6-Ac <i>via</i> reação de hidrólise.....	61
Figura 37	– Reação de RCE (<i>via</i> hidrólise) do LAC <i>rac</i> -6-Ac e hidrólise enzimática de (<i>S</i>)-6-Ac.....	66

LISTA DE EQUAÇÃO

Equação 1 - Equação empregada no cálculo de excesso enantiomérico (<i>e.e.</i>).....	74
Equação 2 - Equação empregada no cálculo de conversão (<i>c</i>) para reações de resolução cinética enzimática.....	74
Equação 3 - Equação empregada no cálculo da enantiosseletividade (<i>E</i>).....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Classe de enzimas e suas aplicações em processos.....	25
Tabela 2	– Resultados da resolução cinética do <i>rac</i> -22 realizada por Huang <i>et al.</i> (2015).....	39
Tabela 3	– Resultados da resolução cinética de álcoois propargílicos 29a-h catalisada pela lipase PS-30 por Chen <i>et al.</i> (2013).....	42
Tabela 4	– Resolução cinética de álcoois propargílicos racêmicos (35b-d) catalisados pela Novozym 435.....	44
Tabela 5	– Resolução cinética do 1-octin-3-ol (37) catalisada por lipases.....	45
Tabela 6	– Resolução cinética de álcoois arilpropargílicos racêmicos catalisada por Novozym 435.....	46
Tabela 7	– Rendimentos da reação de acetilação química dos alquínilcarbinóis.....	49
Tabela 8	– Triagem de lipases na RCE de <i>rac</i> -2-Ac <i>via</i> reação de hidrólise.....	50
Tabela 9	– Resultados do estudo de otimização do tempo e temperatura reacionais na RCE do <i>rac</i> -3-Ac, <i>via</i> hidrólise, catalisada pela lipase CAL-B (MeCN como co-solvente e 2:1 enzima:substrato).....	53
Tabela 10	– Resultados do estudo de RCE do <i>rac</i> -3-Ac, <i>via</i> hidrólise, catalisada pela lipase CAL-B a 20 °C (MeCN como co-solvente e 2:1 enzima:substrato)..	54
Tabela 11	– Resultados obtidos na RCE (<i>via</i> hidrólise) do <i>rac</i> -4-Ac, catalisada por lipases (MeCN como co-solvente; 2:1 enzima:substrato, 30 °C; 48h).....	55
Tabela 12	– Resultados da resolução cinética <i>via</i> hidrólise de <i>rac</i> -4-Ac, usando a relação enzima:substrato 2:1 e utilizando a lipase de CAL-B, em MeCN, variando a temperatura e os tempos reacionais.....	56
Tabela 13	– Resultados da RCE (<i>via</i> hidrólise) de <i>rac</i> -5-Ac catalisada pela lipase CAL-B (25 °C, 5 h, 2:1 enzima:substrato) na ausência e presença de co-solventes.....	58
Tabela 14	– Triagem de lipases na RCE (<i>via</i> hidrólise) de <i>rac</i> -6-Ac.....	62
Tabela 15	– Resultados da RCE de <i>rac</i> -6-Ac <i>via</i> hidrólise, usando a relação enzima:substrato (2:1), THF como co-solvente a 40 °C durante 24 h.....	63

Tabela 16 – Resultados da RCE de <i>rac</i> -6-Ac <i>via</i> hidrólise, usando a relação enzima:substrato (2:1), a 40 °C, 24 h e utilizando a lipase TLL, na presença e ausência de co-solventes.....	64
Tabela 17 – Resultados da RCE de <i>rac</i> -6-Ac com a lipase TLL <i>via</i> hidrólise em THF como co-solvente variando-se a razão substrato:enzima.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac ₂ O	Anidrido acético
Ac	Grupo acetila
ACs	Alquinilcarbinóis
BACs	Butadiinil alquinilcarbinóis
<i>c</i>	Conversão
CAL-B	Lipase de <i>Candida antarctica</i> tipo B imobilizada em resina acrílica
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG-DIC	Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama
DACs	Dialquinilcarbinóis
DMAP	4-(<i>N,N</i>)-dimetilaminopiridina
E	Enantiosseletividade
<i>e.e.</i>	Excesso enantiomérico
<i>e.e.p</i>	Excesso enantiomérico do produto
<i>e.e.s</i>	Excesso enantiomérico do substrato
h	Horas
iso-AACs	Alquinil-alquenilcarbinóis
LACs	Lipídeos alquinilcarbinóis
MHz	Mega-hertz
pH	Potencial Hidrogeniônico
PS IM	Amano lipase PS de <i>Burkholderia cepacia</i> imobilizada em terra diatomácea
<i>rac</i>	Racêmico
RCE	Resolução Cinética Enzimática
Rf	Fator de retenção
RM IM	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> imobilizada em resina aniônica
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H
RPM	Rotação por minuto
NME	<i>N</i> -metilefedrina
TBAF	Trimetilbutilamônio
TBDMS	<i>tert</i> -butildimetilsilil
TIPS	Tri-isopropilsilil

THF	Tetraidrofurano
TLL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada em imobead-150
TMS	Trimetilsilil

LISTA DE SÍMBOLOS

$[\alpha]_D$ Rotação específica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	OBJETIVOS.....	23
2.1	Objetivo geral.....	23
2.2	Objetivo específicos.....	23
3	LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO.....	24
3.1	Biocatálise.....	24
3.2	Lipases.....	25
3.2.1	<i>Resolução cinética enzimática.....</i>	26
3.4	Lipídeos alqunilcarbinóis quirais.....	30
3.3.1	<i>Ocorrência, estrutura e atividade biológica.....</i>	30
3.3.2	<i>Métodos de obtenção alqunilcarbinóis quirais.....</i>	32
3.3.3	<i>Resolução cinética enzimática de alqunilcarbinóis.....</i>	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1	Reação de acetilação dos racematos dos alqunicarbinóis.....	48
4.2	Triagem de lipases na RCE do acetato de heptadeca-1,4-di-in-3-ila (rac-2-Ac).....	49
4.2.1	<i>Estudo da influência de co-solvente na RCE de rac-2-Ac catalisada pela lipase CAL- B.....</i>	51
4.3	Resolução cinética enzimática do acetato de heptadeca-1,4,6-tri-in-3-ila (rac-3-Ac).....	52
4.3.1	<i>Otimização do tempo e temperatura reacional da RCE de rac-3-Ac.....</i>	52
4.4	Resolução cinética enzimática do acetato de heptadec-1-en-4-in-3-ila (rac-4-Ac).....	55
4.4.1	<i>Estudo da influência de co-solvente na RCE de rac-4-Ac catalisada pela lipase CAL-B.....</i>	57
4.5	Resolução cinética enzimática do acetato de heptadec-1-in-3-ilo (rac-5-Ac)....	57
4.5.1	<i>Estudo da influência de co-solvente na RCE de rac-5-Ac catalisada pela lipase CAL-B.....</i>	58
4.6	Resolução cinética enzimática do acetato de 1-(tri-isopropilsilil) penta-1,4- di-in-3-ila (rac-6-Ac).....	60
4.6.1	<i>Triagem de lipases na RCE do rac-6-Ac.....</i>	61

4.6.2	<i>Estudo da influência de co-solvente na RCE de rac-6-Ac</i>	63
4.6.3	<i>Estudo da influência de co-solvente na RCE de rac-6-Ac catalisada pela lipase T. lanuginosus imobilizada em immovead-150</i>	64
4.6.4	<i>Estudo da razão enzima:substrato na RCE de rac-6-Ac catalisada pela lipase T. lanuginosus imobilizada em immovead-150</i>	65
5	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	67
5.1	Equipamentos	67
5.2	Solventes e reagentes	68
5.3	Biocatalisadores	68
5.4	Adsorventes	69
5.5	Preparações dos acetados racêmicos de alquilcarbinóis	69
5.6	Procedimentos gerais para as resoluções cinéticas enzimáticas	69
5.6.1	<i>Triagem de lipases comerciais na RCE de rac-2-Ac e rac-6-Ac</i>	69
5.6.2	<i>Resolução cinética enzimática do rac-2-Ac</i>	70
5.6.3	<i>Resolução cinética enzimática do rac-3-Ac</i>	70
5.6.4	<i>Resolução cinética enzimática do rac-4-Ac</i>	71
5.6.5	<i>Resolução cinética enzimática de rac-5-Ac</i>	72
5.6.6	<i>Resolução cinética enzimática de rac-6-Ac</i>	73
5.7	Cálculo do excesso enantiomérico, da conversão e da enantiosseletividade	73
5.8	Dados físicos e espectrométricos	74
6	CONCLUSÃO	76
	REFERÊNCIAS	78
	ANEXO A - RMN ¹H DE rac-2-Ac (300 MHz, CDCl₃)	84
	ANEXO B - RMN ¹³C DE rac-2-Ac (75 MHz, CDCl₃)	85
	ANEXO C - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC DO rac-2	86
	ANEXO D - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC DO (R)-2 (e.e. >99%)	87
	ANEXO E - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC DO (S)-2	88
	ANEXO F - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC DO rac-2-Ac ...	8
	ANEXO G - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC DO (S)-2-Ac (e.e. >99%)	90
	ANEXO H - RMN ¹H DE rac-3-Ac (300 MHz, CDCl₃)	91
	ANEXO I - RMN ¹³C DE rac-3-Ac (75 MHz, CDCl₃)	92

ANEXO J - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC DO <i>rac</i>-3.....	93
ANEXO K - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC DO (<i>R</i>)-3	
(<i>e.e.</i> 96%).....	94
ANEXO L - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC DO (<i>R</i>)-3	
(<i>e.e.</i> 98%).....	95
ANEXO M - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC DO (<i>S</i>)-3	
(<i>e.e.</i> 95%).....	96
ANEXO N - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC DO <i>rac</i>-3-Ac....	97
ANEXO O - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC DO (<i>S</i>)-3-Ac	
(<i>e.e.</i> 98%).....	98
ANEXO P - RMN ¹H DE <i>rac</i>-4-Ac (300 MHz, CDCl₃).....	99
ANEXO Q - RMN ¹³C DE <i>rac</i>-4-Ac (75 MHz, CDCl₃).....	100
ANEXO R - MASSA DE ALTA RESOLUÇÃO, MODO POSITIVO DO	
COMPOSTO <i>rac</i>-4-Ac.....	101
ANEXO S - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC DO <i>rac</i>-4-Ac....	102
ANEXO T - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC (<i>S</i>)-4-Ac	
(<i>e.e.</i> 95%).....	103
ANEXO U - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC (<i>R</i>)-4-Ac	
(<i>e.e.</i> 97%).....	104
ANEXO V - RMN ¹H DE <i>rac</i>-5-Ac (300 MHz, CDCl₃).....	105
ANEXO W - RMN ¹³C DE <i>rac</i>-5-Ac (75 MHz, CDCl₃) 92.....	106
ANEXO X - MASSA DE ALTA RESOLUÇÃO, MODO POSITIVO DO	
COMPOSTO <i>rac</i>-5-Ac.....	107
ANEXO Y - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC <i>rac</i>-5.....	108
ANEXO Z - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC (<i>R</i>)-5	
(<i>e.e.</i> 96%).....	109
ANEXO AA - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC (<i>S</i>)-5	
(<i>e.e.</i> 96%) 94.....	110
ANEXO AB - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC <i>rac</i>-5-Ac.....	111
ANEXO AC - RMN ¹H DE <i>rac</i>-6-Ac (300 MHz, CDCl₃).....	112
ANEXO AD - RMN ¹³C DE <i>rac</i>-6-Ac (75 MHz, CDCl₃).....	113
ANEXO AE - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC <i>rac</i>-6.....	114

ANEXO AF - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC (R)-6	
(e.e.>99%).....	115
ANEXO AG - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC (S)-6	
(e.e.> 99%).....	116
ANEXO AH - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC <i>rac</i>-6-Ac.....	117

1 INTRODUÇÃO

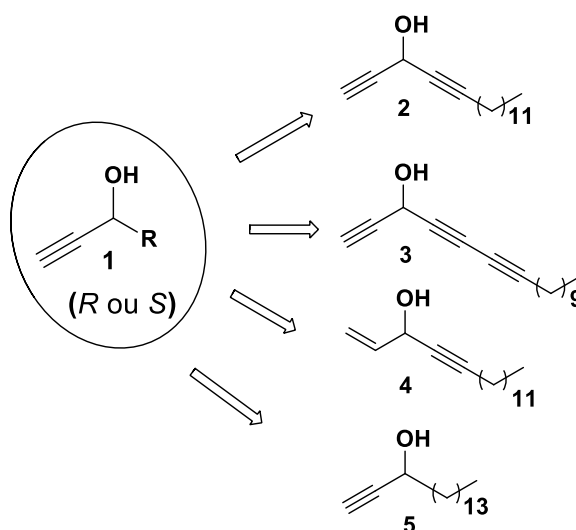
Os lipídeos alquinilcarbinóis (LACs) são produtos naturais acetilênicos bem conhecidos por suas excelentes atividades citotóxicas (LISTUNOV *et al.*, 2015a). Os compostos desta classe são representados por um álcool propargílico secundário quiral contendo uma unidade lipídica ligada ao carbono carbinólico (**1**, **Figura 1**). A fração alquinilcarbinol terminal foi identificada como o farmacóforo quiral que induz a citotoxicidade dos LACs. Estudos da relação estrutura-atividade com um conjunto de compostos bioinspirados sintetizados provaram que a configuração absoluta do centro estereogênico, além do grau de insaturação na posição propargílica interna e o comprimento da cadeia lipídica desempenham um papel fundamental em suas bioatividades (ARFAOUI *et al.*, 2013; LISTUNOV *et al.*, 2018a e LISTUNOV *et al.*, 2018b)

O notável potencial antitumoral de LACs naturais isolados de diferentes fontes motivou a síntese assimétrica de uma variedade de análogos quirais para avaliação biológica (LISTUNOV *et al.*, 2018b). Os compostos heptadeca-1,4-di-in-3-ol (**2**), heptadeca-1,4,6-tri-in-3-ol (**3**), heptadec-1-en-4-in-3-ol (**4**), e heptadec-1-in-3-ol (**5**) exibindo cadeias lipídicas C14, insaturadas ou não, são exemplos de LACs sintéticos que foram projetados e preparados para estudos de citotoxicidade (**Figura 1**). Os lipídeos dialquinilcarbinóis (DACs) enantioenriquecidos (*R*)-**2** (*e.e.* 76%) e (*S*)-**2** (*e.e.* 91%) foram obtidos empregando (-)-*N*-metilefedrina ((-)-NME) como indutor quiral em reações modificadas de Carreira (ARFAOUI *et al.*, 2013).

Posteriormente, usando uma estratégia semelhante sintetizou-se outros LACs específicos, como os butadiinil alquinilcarbinóis (BACs) (*R*)-**3** (*e.e.* 84%) e (*S*)-**3** (*e.e.* 84%), incorporando duas ligações triplas conjugadas na cadeia lipídica, e os alquinil alquenilcarbinóis (AACs) (*R*)-**4** (*e.e.* 76%) e (*S*)-**4** (*e.e.* 91%), incorporando uma ligação dupla e uma ligação tripla (LISTUNOV *et al.*, 2018b). Uma abordagem diferente foi considerada para a síntese enantiosseletiva do LAC (*S*)-**5**, contendo uma cadeia lipídica totalmente saturada (*e.e.* >99%). Este LAC foi preparado através da redução assimétrica da inona correspondente com o catalisador Noyori Ru II, formado um alquino protegido por tri-isopropilsilil (TIPS). Em seguida, após a dessililação obteve o análogo (*S*)-**5** (ARFAOUI *et al.*, 2013).

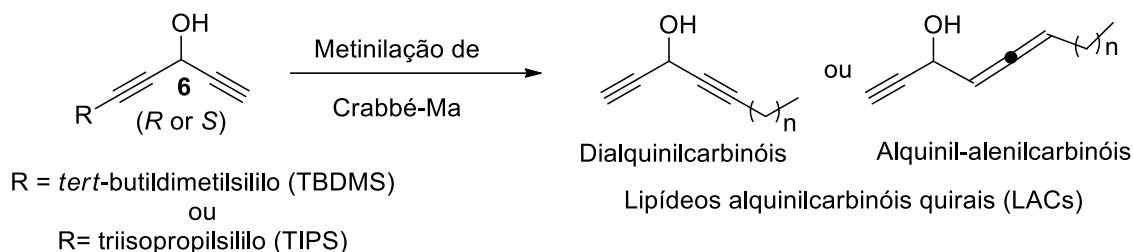
Portanto, as sínteses químicas assimétricas desses três LACs (**2**, **3** e **4**) produziram enantiômeros (*R* e *S*) com excessos enantioméricos (*e.e.*'s) moderados e para **5** sintetizou um único enantiômero com configuração (*S*) com excesso enantiomérico excelente.

Figura 1. Representação geral dos LACs (1) e estruturas químicas dos compostos bioinspirados sintéticos 2-5.



Outra abordagem para obter os lipídeos dialquinilcarbinóis (SHARMA e CHATTOPADHYAY, 1998) e alquinil-alenilcarbinóis (LISTUNOV *et al.*, 2018b) consiste em utilizar como intermediário o DAC (C5) quiral protegido por trialquil-sililo (**6**, **Figura 2**).

Figura 2. Dialquinilcarbinóis (DACs) sililados quirais "pequenos" (6), que podem ser utilizados como precursores essenciais para a síntese de vários lipídeos alquinilcarbinóis quirais (LACs)



É importante ressaltar que segundo a literatura todas as tentativas de preparação do (*R*)- e (*S*)-**6**, enantiomericamente puros falharam através de síntese assimétrica, o que levou os autores a empregarem a resolução cinética enzimática (RCE) *via* acilação como metodologia alternativa (LISTUNOV *et al.*, 2018a).

Tentativas de resolver o derivado protegido com *tert*-butildimetilsililo (TBDMS) (*rac*-**6**-TBDMS) através da RCE mediada por lipases por meio da reação de acilação foram realizadas pela primeira vez usando as lipases de *Pseudomonas fluorescens* e *Candida rugosa*. No entanto, o melhor resultado alcançado com a lipase *Candida rugosa* ainda foi modesto, com valores moderados de conversão ($c = 35\%$) e excessos enantioméricos (*e.e.p* 96%; *e.e.s*

71%) (SHARMA e CHATTOPADHYAY, 1998). O análogo derivado protegido com triisopropilsililo (TIPS), *rac*-**6**-TIPS, também foi submetido à RCE, *via* reação de acilação, usando a lipase CAL-B imobilizada em resina acrílica (LISTUNOV *et al.*, 2018a). Neste caso, a resolução alcançou 31% de conversão, levando ao (*R*)-**6**-TIPS com *e.e.*>99% e ao (*S*)-**6**-TIPS com *e.e.* de apenas 42%. Para elevar o *e.e.* de (*S*)-**6**-TIPS para 95%, os autores repetiram 3 vezes a reação com o referido álcool enantioenriquecido, isolado após cada resolução. Portanto, o desenvolvimento de métodos de RCE do *rac*-**6**-TBDMS e *rac*-**6**-TIPS, considerado um intermediário importante em síntese orgânica, ainda representa um desafio para a área de biocatálise (LISTUNOV *et al.*, 2018a e LISTUNOV *et al.*, 2018b)

Os resultados acima mencionados mostraram que o desenvolvimento de metodologias biocatalíticas para a produção de LACs enantiopuros, além do intermediário dialquilcarbinol de cadeia pequena protegidos por trialkil-sililo (DAC-C5) permanece um desafio sinteticamente relevante. Dessa forma, o principal objetivo do trabalho foi produzir ambos os enantiômeros (*R*) e (*S*) em suas formas enantiopura/enantioenriquecida e, aqui, relatarei os resultados dos estudos de RCE catalisada por lipases (*via* hidrólise) dos acetatos *rac*-LACs (**2**, **3**, **4** e **5**), bem como do precursor protegido por TIPS de alto valor agregado (**6**). Foram utilizadas lipases comercialmente disponíveis (formas livres e imobilizadas).

Assim, a biocatálise (catálise enzimática) demonstra ser uma alternativa verde à catálise química convencional para produzir produtos farmacêuticos e intermediários quirais. A versatilidade das enzimas para catalisar uma variedade de reações para produzir compostos quirais com alto valor agregado é explorada na biocatálise. No contexto da química verde e do desenvolvimento sustentável, o uso do biocatalisador é extremamente atrativo, pois as enzimas são obtidas de recursos renováveis, sendo biocompatíveis e biodegradáveis. Além de sustentáveis, as enzimas catalisam uma ampla gama de reações com altas quimio-, regio- e enantio-seletividades (PATEL, 2018; THANGARAJ e SOLOMON, 2019).

Apesar dessas vantagens, as enzimas evoluíram sob seleção natural, podendo responder sob condições de estresse. Suas propriedades ótimas serão alcançadas apenas em condições fisiológicas (reações e substratos). Como essa característica pode ser um problema nos biocatalisadores industriais, foram desenvolvidas várias maneiras de melhorar essas limitações, como ferramentas metagenômicas, genéticas (mutagênese dirigida ao local, evolução direcionada) e imobilização (ORTIZ *et al.*, 2019).

Dentre as enzimas usadas na biocatálise, as lipases (EC 3.1.1.3) são destacadas por sua enantioseletividade na resolução cinética de alcoóis ou ésteres racêmicos para produzir

álcoois e ésteres enantiopuros sem a necessidade de cofatores. Outra vantagem desses biocatalisadores é a capacidade de serem ativos em solventes orgânicos, favorecendo a solubilidade do substrato orgânico a ser transformado (THANGARAJ e SOLOMON, 2019 e CARVALHO *et al.*, 2015).

O mecanismo de ativação interfacial é considerado uma característica importante das lipases. As condições para a reação ideal com essa classe de enzima envolvem uma associação entre a atividade da enzima e a solubilidade do substrato. Sabe-se que o local ativo da lipase (tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu) é coberto por uma tampa de cadeia polipeptídica que é aberta na interface água-óleo, um fenômeno conhecido como ativação interfacial. Assim, as lipases imobilizadas com conformações abertas fixas apresentam atividade enzimática aumentada. Além disso, a imobilização pode modular fortemente as propriedades da lipase, uma vez que o centro ativo desse tipo de enzima é muito flexível. Vale ressaltar que as investigações estruturais da *Candida antarctica* B (CAL-B), uma das lipases mais utilizadas, revelaram que esta enzima apresenta uma forma aberta (ativa) e fechada (inativa) e que seu sítio ativo é coberto por uma tampa muito pequena (ORTIZ *et al.*, 2019; PINHEIRO *et al.*, 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Empregar o processo de resolução cinética enzimática mediada por lipases, na preparação de alquilcarbinóis quirais.

2.2 Objetivos específicos

Investigar o uso de lipases na resolução cinética de acetatos de alquilcarbinóis racêmicos para produção de álcoois enantiomericamente puros e/ou enantioenriquecidos;

Verificar a influência de variáveis que afetam a resolução cinética enzimática, tais como, tipo de lipase, temperatura e tempo de reação, proporção enzima:substrato (m:m) e influência de co-solventes.

3 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

3.1. BIOCATÁLISE

A biocatálise consiste no emprego de enzimas como catalisadores em reações químicas. Essa técnica tem sido amplamente empregada em síntese orgânica. A aplicação da biocatálise pode ser feita empregando enzimas isoladas; como células inteiras; preparadas em suas células nativas ou como proteínas recombinantes expressas em células de hospedeiros alternativos (TRUPPO, 2017).

O emprego de processos enzimáticos expandiu-se significativamente nas últimas décadas e impactou a síntese química nas indústrias farmacêutica, agrícola e alimentícia (CHOI *et al.*, 2015). A produção de compostos enantiomericamente puros é de suma importância para essas indústrias, tendo em vista que a quiralidade desses compostos afetam a sua atividade biológica (CHOI *et al.*, 2015). Atualmente, a biocatálise é uma metodologia bem aceita para a produção de substâncias enantiomericamente puras, fornecendo uma alternativa limpa, econômica e sustentável aos processos químicos convencionais (PATEL, 2018).

Segundo Faber 2011, as principais vantagens do uso de biocatalisadores estão relacionadas com as condições reacionais, visto que as enzimas atuam em uma faixa de pH entre 5-8, temperatura entre 20-40 °C, além de serem completamente biodegradáveis, diferente de outros catalisadores que usam os metais pesados. Além disso, podem reduzir a rota sintética, evitando o uso de reagentes tóxicos, com diminuição de subprodutos e resíduos, possibilitando a obtenção de rendimentos altos e com excelentes quimio-, regio- e enantio-seletividades (SUN *et al.*, 2018).

As enzimas são classificadas em seis classes, de acordo com o tipo de reação que podem catalisar (**Tabela 1**) (OLIVEIRA e MANTOVANI, 2009). Dentre as enzimas apresentadas na **Tabela 1**, as lipases (classe das hidrolases) destacam-se como as mais usadas em biocatálise para a obtenção de compostos enantiopuros.

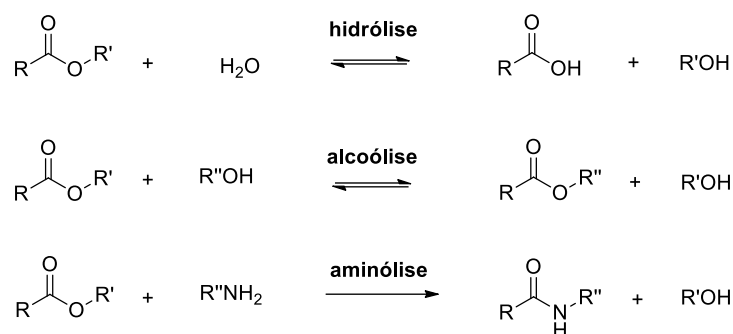
Tabela 1. Classe de enzimas e suas aplicações em processos

Classe	Subclasses mais utilizadas	Tipo de reação catalisada
Hidrolases	esterases, lipases, amidases	Reações de hidrólise, esterificação, transesterificação e outras.
Oxidoreductases	desidrogenases, mono e dioxigenases, peroxidases	Reações de óxido-redução.
Transferases	quinases	Reação de transferência de grupos funcionais: aldeídico, cetônico, acilas, açúcares, fosforilas ou metila.
Liases	carboxilases, amônia-liases, hidrolases	Adição-eliminação de pequenas moléculas em ligações C=C, C=N, C=O.
Isomerases	racemases, epimerases	Isomerizações tais como: racemização, epimerização e rearranjos.
Ligases	aldolases, transaldolases, glicosidases	Clivagem-formação de ligações C-O, C-S, C-N, C-C como concomitantemente clivagens de trifosfato.

3.2. LIPASES

As lipases (E.C.3.1.1.3) são comumente encontradas em microrganismos (fungos e bactérias), plantas e animais. A função natural, dessas enzimas, é a hidrólise de ésteres carboxílicos em meio aquoso (SEDDIGI *et al.*, 2017). Contudo, ao contrário das outras enzimas, as lipases são enzimas que proporcionam níveis consideráveis de atividade e estabilidade em ambientes não-aquosos. Desse modo, dependendo das condições reacionais podem ainda catalisar reações, tais como hidrólise, transesterificação (como exemplo: alcoólise) e aminólise (**Figura 3**) (PAQUES e MACEDO, 2006; ROBIC *et al.*, 2017).

Essas enzimas são empregadas em diversos setores industriais, destacando-se as indústrias de cosméticos, alimentícia e farmacêutica, pois são facilmente manuseadas; dispensam o uso de cofatores, além de serem disponíveis comercialmente. E ainda, podem ser utilizadas tanto em meio aquoso como orgânico, bem como são altamente seletivas (quimio-régio- e enantiosseletivas). São consideradas enzimas versáteis, pela capacidade de atuar em uma ampla gama de substratos e em condições reacionais brandas (temperatura e tempo) (CARVALHO *et al.*, 2015; SEDDIGI *et al.*, 2017).

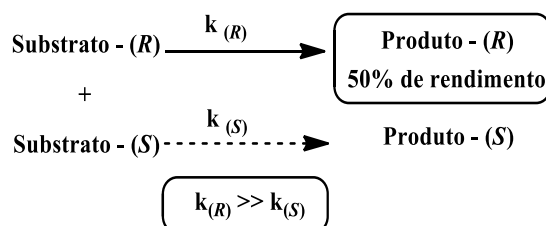
Figura 3. Reações catalisadas por lipases

Fonte: Elaborado pelo autor

3.2.1. RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA

Nos últimos anos, o uso de lipases na síntese de compostos biologicamente ativos aumentou substancialmente, sendo bastante utilizadas na produção de medicamentos quirais (THOMAS *et al.*, 2019). A principal aplicação de lipases na síntese orgânica é através da resolução cinética enzimática (RCE) de racematos de ácidos carboxílicos, ésteres, aminas e álcoois secundários (THOMAS *et al.*, 2019).

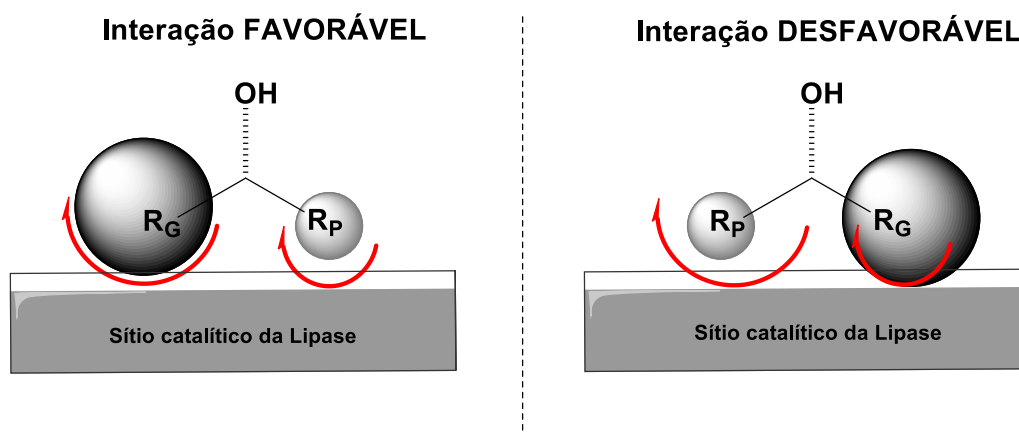
Esse processo está baseado na diferença da velocidade de reação dos enantiômeros na presença do biocatalisador. Na RCE de álcoois secundários, a lipase resolve o racemato através de uma reação de transesterificação enantiosseletiva, resultando no éster e no álcool remanescente quirais, que podem ser separados por técnicas de cromatografia. Da mesma forma, ésteres racêmicos podem ser resolvidos através de uma reação de hidrólise estereoseletiva. Isso ocorre devido a lipase interagir, com taxa de velocidade diferente, com os enantiômeros do racemato. Por exemplo, se a constante de velocidade do enantiômero *R* for muito superior à do enantiômero *S* ($k_R \gg k_S$), apenas o primeiro sofrerá a reação mediada pela enzima, resultando em uma mistura final de 50% do produto de configuração *R* e 50% do reagente inicial de configuração *S* (**Figura 4**) (GHANEM *et al.*, 2005).

Figura 4. Resolução cinética ideal em que apenas um dos enantiômeros é transformado

O modelo empírico que explica o reconhecimento quiral pelas lipases em RCE para álcoois secundários é o de Kazlauskas. Este modelo estabelece que a maioria das lipases

possua a mesma enantio-preferência frente a um determinado substrato, apresentando apenas diferenças no grau de enantiosseletividade. Nesta regra, o modelo do sítio ativo da lipase consiste em duas cavidades de tamanhos diferentes, um grande (R_G) e outro pequeno (R_P) (**Figura 5**) (KAZLAUSKAS *et al.*, 1991). Assim, na RCE de um de álcool secundário, *via* acetilação, a diferença da velocidade de reação entre os enantiômeros será resultado da disposição espacial dos substituintes ligados ao centro estereogênico nos bolsões hidrofóbicos localizados no sítio ativo da enzima. Enquanto um enantiômero realiza uma interação favorável (substituinte mais volumoso-G no bolsão maior e substituinte menos volumoso-P no bolsão menor), favorecendo a reação, o outro enantiômero tem uma interação desfavorável (GOTOR-FERNÁNDEZ *et al.*, 2006).

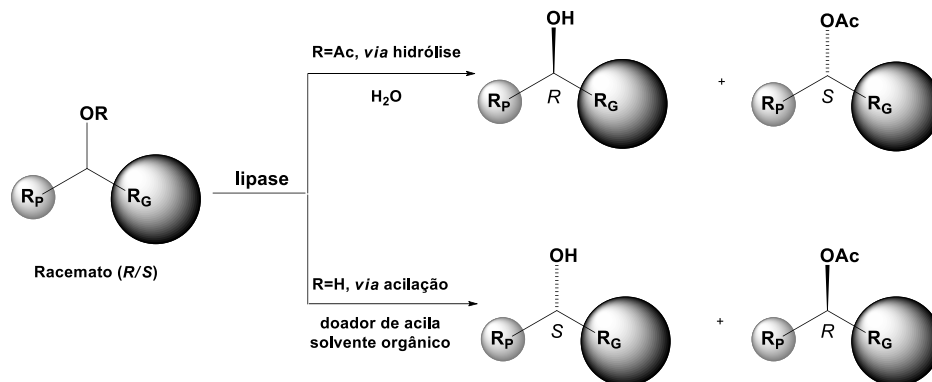
Figura 5. Modelo empírico da regra de Kazlauskas representando os modos favorável e desfavorável na interação enzima-substrato



Fonte: Elaborado pelo autor

Embora o modelo proposto por Kazlauskas e colaboradores tenha sido destinado para a resolução cinética de um éster, *via* hidrólise, esta regra também tem sido extrapolada e bem aceita na resolução cinética de um álcool secundário, *via* acetilação (**Figura 6**).

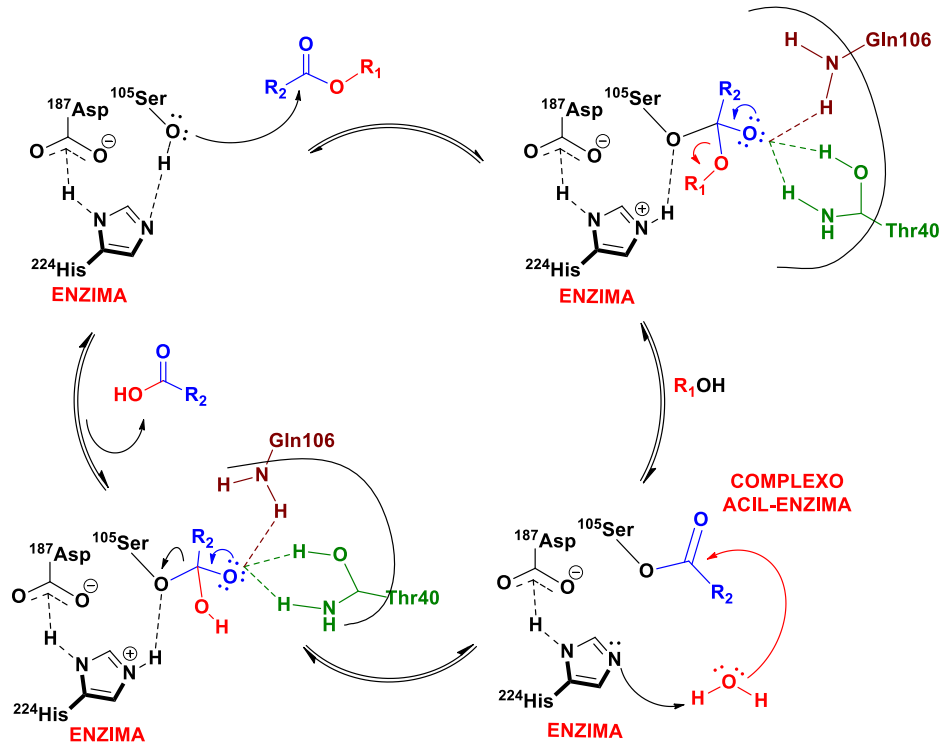
Figura 6. Modelo empírico de Kazlauskas para reações de acilação de álcoois secundários e hidrólise dos correspondentes ésteres, na presença de lipases



Fonte: Elaborado pelo autor

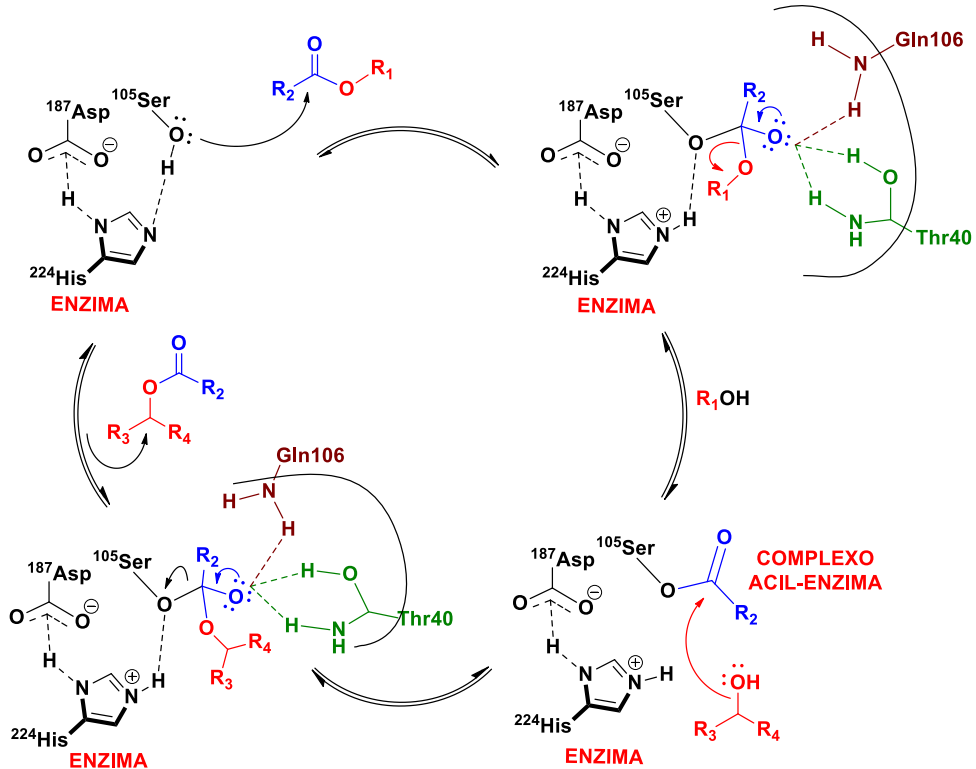
O mecanismo catalítico das lipases ocorre no sítio ativo formado pelos resíduos de aminoácidos serina (Ser), histidina (His) e ácido aspártico (na forma de aspártato) (Asp) ou ácido glutâmico (na forma de glutamato) (Glu). Inicialmente, ocorre uma interação entre estes três resíduos de aminoácidos (tríade catalítica), propiciando o ataque nucleofílico da hidroxila do resíduo Ser ao carbono carbonílico do éster, formando um **intermediário tetraédrico**. Esse por sua vez é estabilizado pela **cavidade oxianiónica** via ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos glutamina (Gln106) e treonina (Thr40), no caso da enzima *Candida antarctica* tipo B (CAL-B). Com a saída de uma molécula de álcool (R₁-OH) forma-se o complexo acil-enzima, que no caso da **hidrólise enzimática (Figura 7)**, sofre um ataque nucleofílico de uma molécula de água e no caso da **transesterificação enzimática (Figura 8)** é atacado por uma molécula de um álcool, formando um **segundo intermediário tetraédrico**, no qual colapsa para formação do produto, regenerando a enzima (BANDEIRA *et al.*, 2017) (STEFANUCCI *et al.*, 2013).

Figura 7. Mecanismo catalítico da lipase na hidrólise de ésteres



Fonte: Adaptado de Bandeira *et al.*, 2017

Figura 8. Mecanismo catalítico da lipase nas reações de transesterificação



Fonte: Adaptado de Bandeira *et al.*, 2017

3.3 LIPÍDEOS ALQUINILCARBINÓIS QUIRAIS

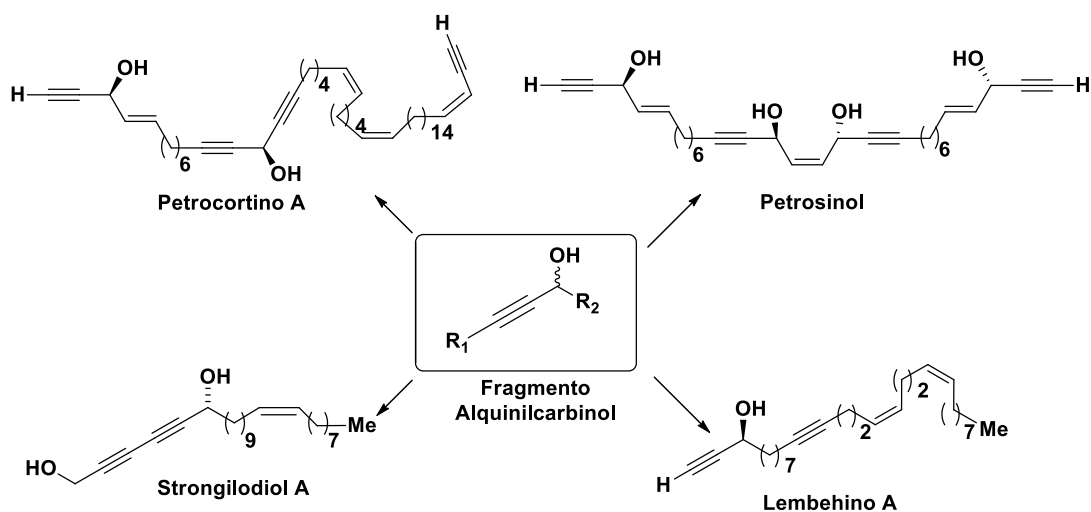
3.3.1 OCORRÊNCIA, ESTRUTURA E ATIVIDADE BIOLÓGICA

Produtos naturais acetilênicos representam uma classe de compostos orgânicos que possuem pelo menos uma ligação tripla carbono-carbono ($C\equiv C$). É relatado na literatura que esses compostos possuem elevada atividade biológica, destacando-se aqueles que possuem uma ligação tripla na posição geminal a um grupo hidroxila (álcool propargílico) pelo alto potencial citotóxico (LISTUNOV *et al.*, 2015a). Deste modo, esses compostos são conhecidos como lipídeos alquinilcarbinóis (LACs) e classificados como álcoois (LISTUNOV *et al.*, 2015b).

Os LACs são vastamente encontrados em organismos marinhos, como nas esponjas *Callyspongia truncata* (NICKEL *et al.*, 2015) e *Petrosia* spp. (ARFAOUI *et al.*, 2013) e no fungo *Chondrostereum* sp (LI *et al.*, 2013), além de organismos terrestres como nas plantas *Platycodon grandiflorum* (CHEN *et al.*, 2017), *Cnidium officinale* (CHOI *et al.*, 2018), *Panax stipuleanatus* (TUYEN *et al.*, 2018), *Notopterygium incisum* (ATANASOV *et al.*, 2013), *Carthamus tinctorius* (LIU *et al.*, 2018), *Ongokea gore* (NTUMBA *et al.*, 2017) e no fungo *Phoma* sp. (ONDEYKA *et al.*, 2006). Nos artigos de revisões de Minto *et al.* (2008) e Negri *et al.* (2006) têm-se diferentes tipos de plantas e de fungos nos quais pode-se encontrar essa classe de produtos naturais e sua biossíntese.

Muitos desses compostos foram relatados por exibirem atividades biológicas, especialmente citotoxicidade (ARFAOUI *et al.*, 2013; NICKEL *et al.*, 2015; TUYEN *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2018), além de atividades antimalárica (NTUMBA *et al.*, 2017), anti-inflamatória (CHOI *et al.*, 2018; VENKATESAN *et al.*, 2018), imunossupressora e antibacteriana (SIDDIQ *et al.*, 2008). Exemplos de compostos desta classe, com atividade citotóxica, estão representados na **Figura 9**.

Figura 9. Estrutura de lipídeos poliacetilênicos com fragmento de alquinilcarbinol isolados de diferentes organismos

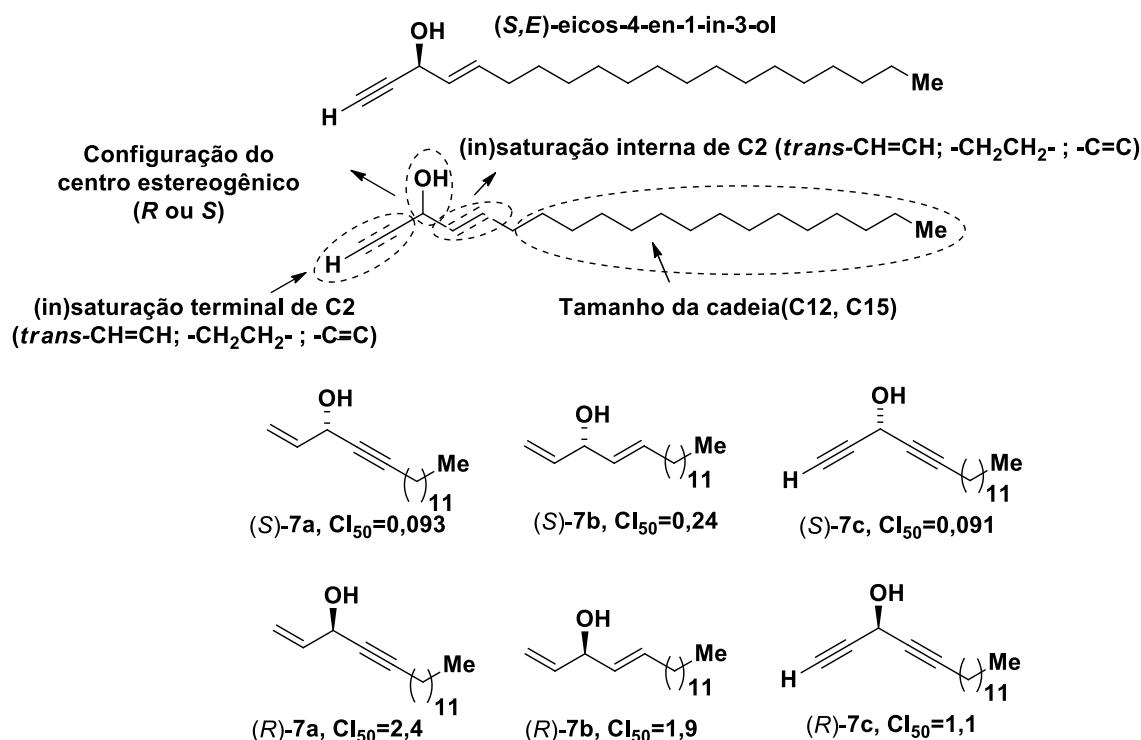


Estudos realizados por Arfaoui *et al.* (2013) e Listunov *et al.* (2015a) sugeriram que o fragmento quiral alquinilcarbinol (**Figura 9**) presente nesses lipídeos poliacetilênicos poderia ser considerado a unidade farmacofórica responsável pela atividade biológica da classe.

Esses autores realizaram a síntese química de uma série de análogos com configurações (*R*) e (*S*)- do produto natural (*S,E*)-eicos-4-en-1-in-3-ol, extraído da esponja marinha *Cribrochalina vasculum*, e testaram a atividade citotóxica dos mesmos contra linhagem celular do carcinoma colorretal humano (HCT-116), (**7a-7c, Figura 10**).

Com base nos resultados obtidos, os autores também relataram que a citotoxicidade desses compostos tinha relação com estrutura química dos compostos, nas quais: a natureza e localização das insaturações, a configuração do centro estereogênico e o tamanho da cadeia lipídica (**Figura 10**) influenciavam na atividade (ARFAOUI *et al.*, 2013; LISTUNOV *et al.*, 2015a).

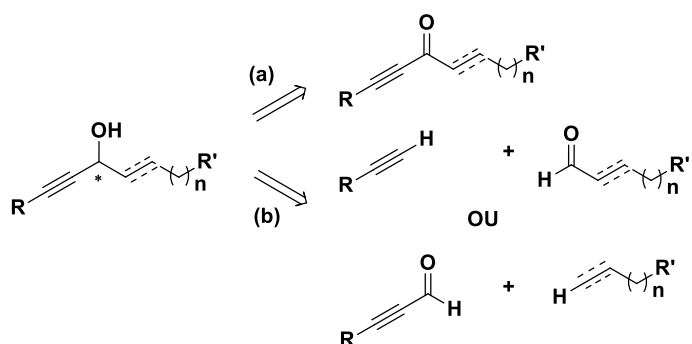
Figura 10. Estruturas dos análogos do produto natural sintetizados por Arfaoui *et al.*, 2013 e resultados dos ensaios citotóxicos. Valores de CI_{50} em μM



3.3.2 MÉTODOS DE OBTENÇÃO ALQUINILCARBINÓIS QUIRAIS

Na literatura existem duas principais rotas sintéticas para a obtenção de alquinilcarbinóis secundários quirais: a primeira é a redução assimétrica de inonas correspondentes (a) e a segunda é baseada na adição nucleofílica assimétrica a aldeídos (b) (**Figura 11**) (LISTUNOV *et al.*, 2015a).

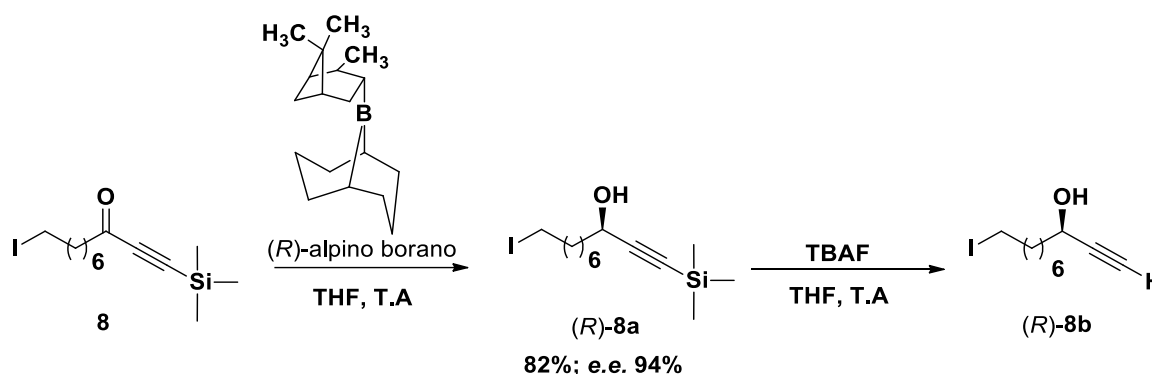
Figura 11. As duas principais rotas de sínteses de alquinilcarbinol secundário quiral



A estratégia por meio da redução de inona pode ser observada no trabalho da síntese total do produto natural lembehino A (**Figura 9**, p. 31) realizada por Murakami *et al.*

2001. Os autores relataram a redução da cetona (**8**) ao seu respectivo álcool (*R*)-**8a** com valores de rendimento e excesso enantiomérico (*e.e.*) bons, utilizando (*R*)-alpino borano como agente redutor quiral. O álcool (*R*)-**8a**, usado como intermediário nessa síntese, foi desprotegido com fluoreto de trimetilbutilamônio (TBAF) em tetraidrofurano (THF), fornecendo (*R*)-**8b** com rendimento quantitativo (**Figura 12**).

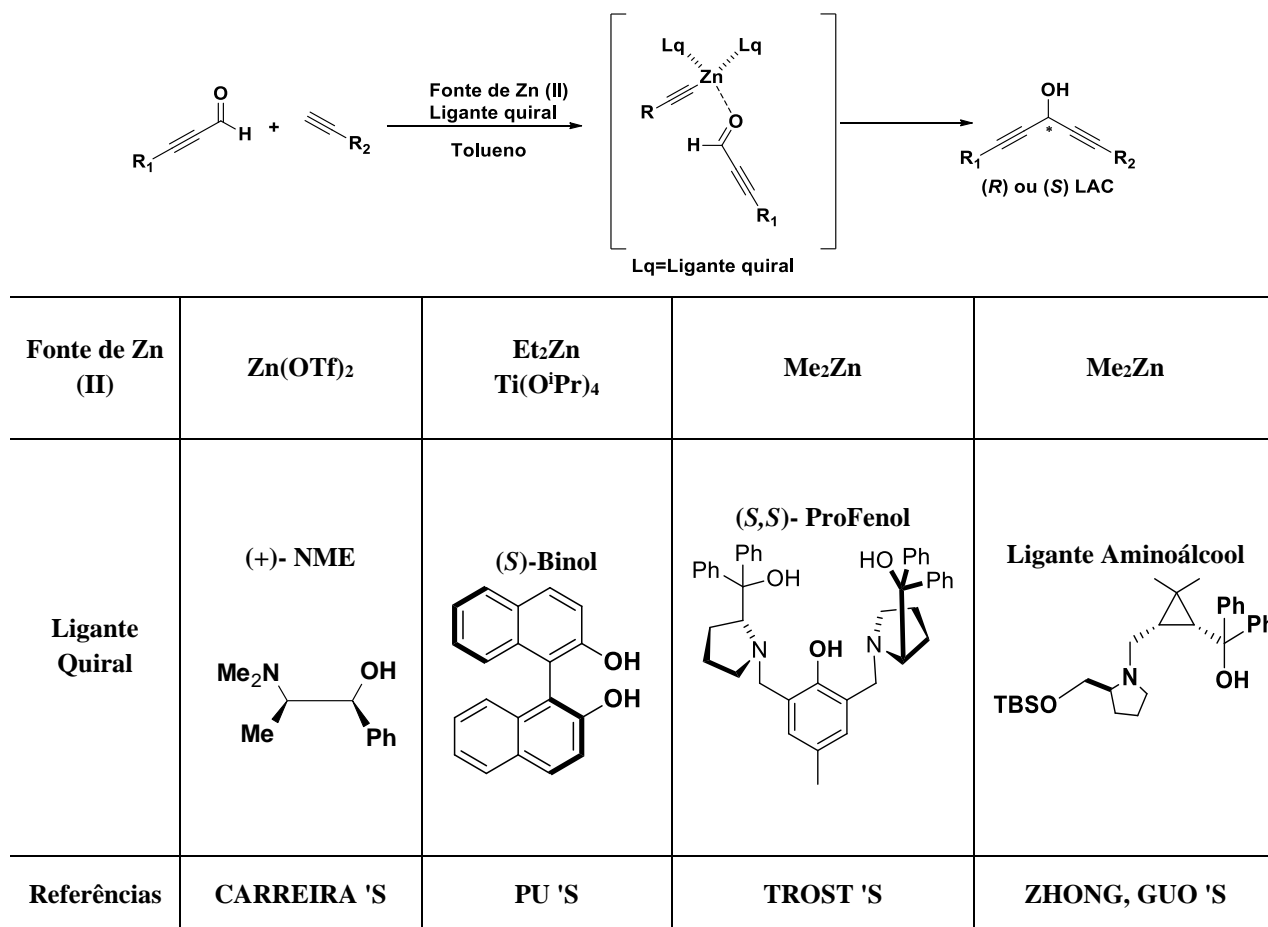
Figura 12. Redução da inona (**8**) por Murakami *et al.*, 2001



A outra estratégia é através de síntese assimétrica, empregando-se a adição enantiosseletiva de alcinos terminais a aldeídos, mediada por catalisadores quirais de zinco (Zn). Os métodos mais conhecidos envolvem a preparação *in situ* do reagente alquinilzinco, que é a fonte disponível de Zn (II), na presença de um ligante quiral. No artigo de revisão de Listunov *et al.* (2018b) há relatos de alguns procedimentos.

A primeira síntese assimétrica de LAC foi descrita por Carreira *et al.* (2000), que empregaram o sal $Zn(OCF_3SO_3)_2$ (triflato de zinco) e (+) ou (-)-*N*-metilefedrina como ligante quiral. Pu *et al.* (2002) relataram um sistema baseado na combinação de (*S*) ou (*R*)-Binol, Et_2Zn (dietilzinco) e $Ti(O^iPr)_4$ (tetra-isopropóxido de titânio), gerando vários substratos com altos valores de *e.e.* Trost *et al.* (2006) propuseram o uso de (*S,S*)-ProFenol e Me_2Zn (dimetilzinco), enquanto Zhong e Guo *et al.* (2011) descreveram o uso alternativo de um derivado quiral do ciclopropano e Me_2Zn (**Figura 13**).

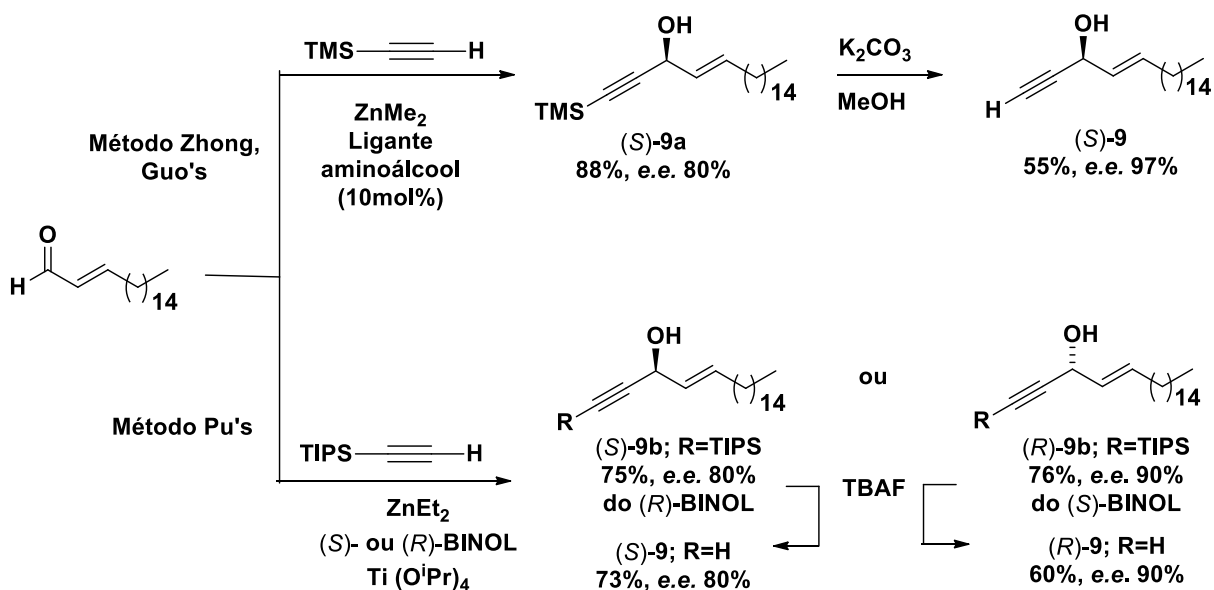
Figura 13. Métodos relacionados para a adição enantiosseletiva de alcinos terminais a aldeídos



A primeira síntese total do lipídeo alquinilcarbinol (*S,E*)-eicos-4-en-1-in-3-ol [(*S*)-**9**], contendo ambos os tipos de insaturação em C2 foi relatado por Zhong, Guo e colaboradores, usando um aminoálcool como ligante quiral. Adição assimétrica de trimetilsililacetileno (TMSA) a (*E*)-octadec-2-enal levou ao intermediário sililado (*S*)-**9a**, isolado com um excesso enantiomérico de 80% (**Figura 14**). O *e.e.* de (*S*)-**9a** foi aumentado para 97% por recristalização, permitindo assim obter (*S*)-**9** com *e.e.* 97%, após protodesililação por tratamento com K₂CO₃ em metanol (Listunov *et al.*, 2018b).

A síntese assimétrica de ambos os enantiômeros (*S*)-**9** e (*R*)-**9** foi realizada utilizando (*S*)- e (*R*)-BINOL/Ti(OⁱPr)₄ (Pu *et al.*, 2002) a partir de tri-isopropilsililacetileno (TIPSA). Foram obtidos ambos os enantiômeros do intermediário sililado (*S*)-**9b** (75% de rendimento e 80% de *e.e.*) e (*R*)-**9b** (76% de rendimento e 90% de *e.e.*). (**Figura 14**). Após desproteção utilizando TBAF, foram obtidos (*S*)- e (*R*)-**9** e os valores de excessos enantioméricos de 80% e 90%, respectivamente. (Listunov *et al.*, 2018b).

Figura 14. Síntese enantiosseletiva de (*S*)-9 pelo método de Zhong, Guo's e pelo método de Pu's



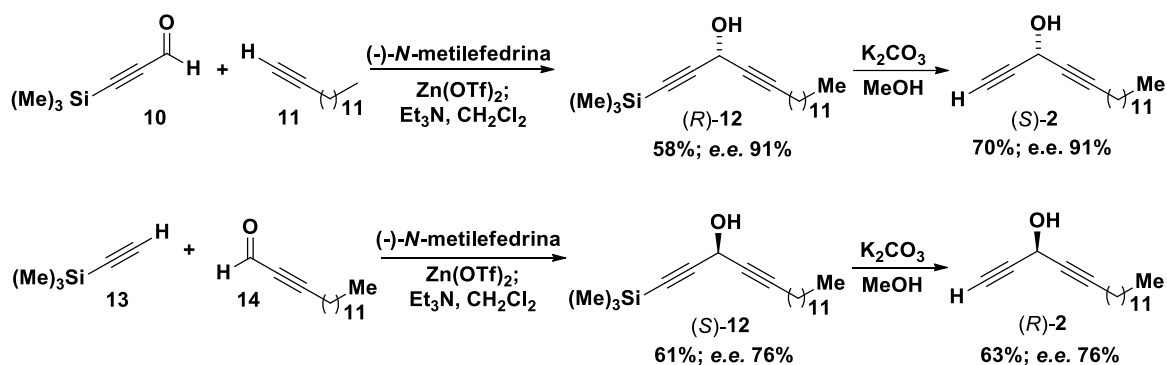
A partir do estudo desses métodos de obtenção de LACs quirais, muitos trabalhos foram desenvolvidos principalmente pelo grupo de pesquisa coordenado pelos professores Yves Génisson e Remi Chauvin, ambos da Universidade Paul Sabatier-Toulouse III (Toulouse, França). Como exemplos, vamos ressaltar nesta revisão bibliográfica a síntese assimétrica de alguns alquínilcarbinóis que foram usados para o desenvolvimento desta tese de doutorado.

Alfaoui *et al.* (2013) relataram a síntese assimétrica dos enantiômeros de dois alquínilcarbinóis, o dialquínilcarbinol (DAC) heptadeca-1,4-di-in-3-ol (**2**) e o alquénil alquínilcarbinol (AAC) heptadec-1-en-4-in-3-ol (**4**), utilizando a metodologia reportada por Carreira e colaboradores. Os autores realizaram duas modificações no método de Carreira, utilizando um excesso de quatro vezes de reagentes em relação ao substrato inal e trocando o solvente tolueno para diclorometano. Assim, produziram os dialquínilcarbinóis (*R*)- e (*S*)-**12** em 58% e 61% de rendimento, respectivamente. Cabe ressaltar que a configuração absoluta dos produtos (*R*)- e (*S*)-**12** deve-se ao uso de (-)-*N*-metilefedrina como indutor quiral (**Figura 15**).

Notavelmente, a adição do alquínil tetradecino (**11**) ao trimetilsililpropiolaldeído (**10**) proporcionou (*R*)-**12** com maior enantiosseletividade (*e.e.* 91%) em relação a adição do trimetilsiliacetileno (**13**) ao pentadec-2-inal (**14**), que levou a (*S*)-**12** com *e.e.* de 76%. A

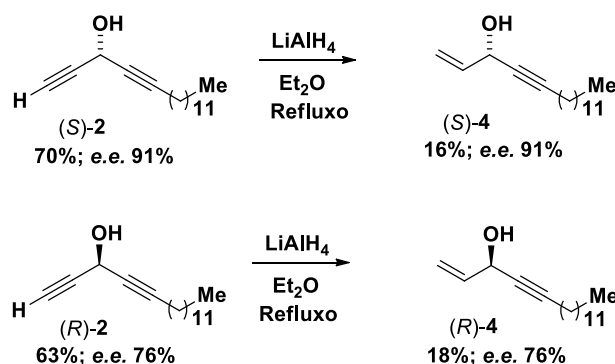
dessilação de ambos, (*R*)- e (*S*)-**12** com carbonato de potássio, em metanol, levou a obtenção dos alcinos terminais (*S*)- e (*R*)-**2** (**Figura 15**).

Figura 15. Síntese dos dialquilnilcarbinóis quirais (*S*)- e (*R*)-**2**



Posteriormente, (*S*)-**2** e (*R*)-**2** foram tratados com hidreto de lítio (LiAlH₄), em éter dietílico, sob refluxo, levando aos AACs (*S*)-**4** e (*R*)-**4** com rendimentos de 16% e 18%, respectivamente (**Figura 16**).

Figura 16. Síntese dos alquênil alquínilcarbinóis (AACs) quirais (*S*)- e (*R*)-**4**

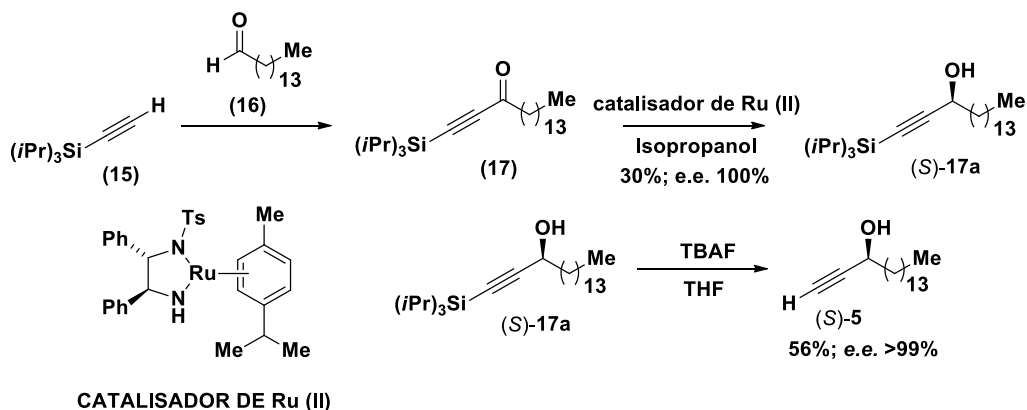


Os mesmos autores [Alfaoui e colaboradores (2013)] sintetizaram um alquínilcarbinol (AC) heptadec-1-in-3-ol simples (**5**) com um substituinte saturado ligado ao centro estereogênico (**Figura 17**). A preparação desse composto foi feita através da redução assimétrica do inona (**17**) correspondente. Esta última foi facilmente preparada a partir da reação do tri-isopropilsililacetileno (**15**) com o pentadecanal (**16**) (**Figura 17**).

A hidrogenação assimétrica da inona **17**, em isopropanol, na presença do catalisador quiral [RuCl(*p*-cimeno)][(*S,S*)-Ts-DPEN], preparado *in situ*, levou ao álcool secundário (*S*)-**17a** (**Figura 17**). A configuração *S* absoluta foi atribuída com base no

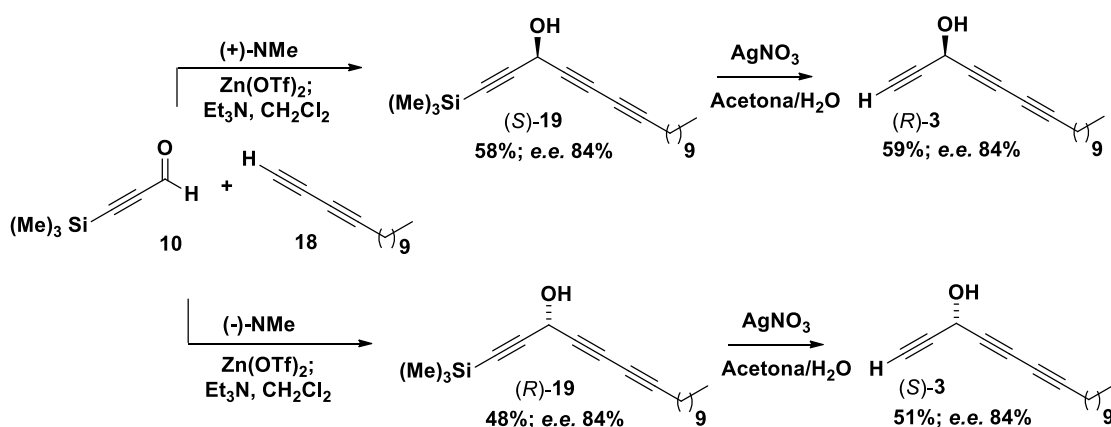
catalisador quiral usado. Em seguida, após a dessililação para obteve-se o alquinilcarbinol (*S*)-5. Não há relatos no trabalho para síntese do enantiômero (*R*)-5.

Figura 17. Síntese do alquinilcarbinol quiral (*S*)-5



Bourkhis *et al.* (2018) relataram a preparação dos enantiômeros (*S*- e *R*-) do butadiinil alquinilcarbinol (BAC) heptadeca-1,4,6-tri-in-3-ol (**3**) e dos DACs (*S*- e *R*-**2**) nas formas enantio-enriquecidas. Nestes casos, tanto a (+)-, como a (-)-NME induziram a formação do (*S*)- e do (*R*)-**19** sililados, durante a adição do alquinil tetradeca-1,3-di-ino (**18**) ao trimetilsililpropionaldeído (**10**). O tratamento com nitrato de prata (AgNO_3) em uma mistura de acetona/ H_2O forneceu os BACs (*S*)- e (*R*)-**3** dessililados (Figura 18).

Figura 18. Síntese dos butadiinil alquinilcarbinóis quirais (*S*)- e (*R*)-**3**



3.3.3 RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA DE ALQUINILCARBINÓIS

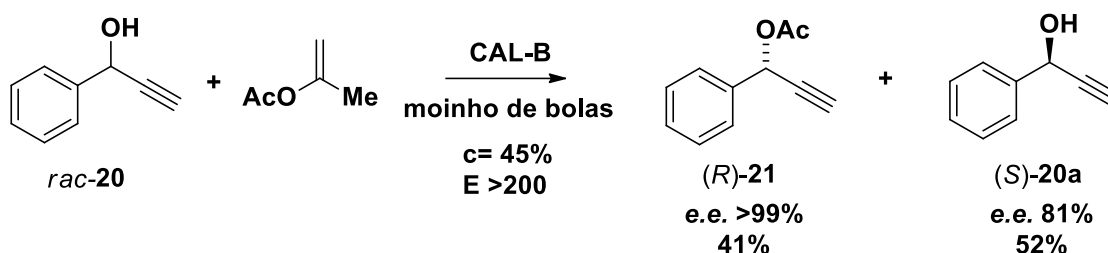
Apesar dos resultados promissores, o uso da catálise química na preparação de LACs quirais apresenta algumas desvantagens causadas pela utilização dos catalisadores e auxiliares quirais, tais como a geração de resíduos tóxicos, a disponibilidade limitada, o custo elevado, as condições reacionais extremas (temperatura e tempo) e as várias etapas reacionais (ROUGF; TANEJA, 2014).

Assim, o emprego da biocatálise na síntese de LACs quirais torna-se uma alternativa viável e atraente. Como ressaltado anteriormente, o uso de enzimas apresenta muitas vantagens quando comparada com a síntese convencional (FABER, 2011). Além disso, um ponto bastante importante é fato de que os processos biocatalíticos podem melhorar os valores de excessos enantioméricos quando comparado com a síntese assimétrica (BOURKHIS *et al.*, 2018).

Os substratos racêmicos avaliados neste trabalho são os correspondentes acetatos dos lipídeos alquinilcabinóis. Portanto, decidimos apresentar uma revisão bibliográfica sobre a resolução cinética de álcoois propargílicos e acetatos na presença de lipases. As bases de dados utilizadas foram “*Scifinder*” e “*Science direct*” cobrindo o período de 2003 a 2020, fazendo uma seleção de dados que contenha RCE de álcoois propargílicos. Em alguns casos, esses compostos são precursores ou intermediários reacionais, com algum tipo de atividade biológica.

Hernández *et al.* (2016) realizaram um estudo de resolução enzimática mecanoquímica do álcool propargílico (*rac*-**20**) com acetato de isopropenila, como doador de acila, catalisado pela lipase *Candida antarctica* tipo B (CAL-B), em um moinho de bolas. O *rac*-**20**, a CAL-B e acetato de isopropenila foram moídos em um misturador de moinho elétrico por 3 h a 25 Hz, usando 10 mL de dióxido de zircônio (ZrO₂) e uma bola de ZrO₂ de 10 mm de diâmetro. Sob tais condições reacionais foram obtidos o substrato remanescente (*S*)-**20a** com *e.e.* de 81% e o produto acetilado (*R*)-**21** com *e.e.* > 99% (**Figura 19**).

Figura 19. Resolução enzimática mecanoquímica do álcool secundário (*rac*-20) em um moinho de bola, via reação de acetilação, catalisada pela lipase de *Candida antarctica* (CAL-B)



Huang *et al.* (2015) relataram a resolução cinética enzimática do álcool acetilênico racêmico (*rac*-22) que é utilizado como precursor na síntese do produto natural isofulvinol com atividade citotóxica (**Figura 20**). Os autores avaliaram três lipases (AK de *Pseudomonas fluorescens*, Novozym 435 e PS de *Burkholderia cepacia*), na presença de tolueno como solvente, com 0,5 h de reação a temperatura ambiente, utilizando como doador de acila o acetato de vinila. Em tais condições, a lipase Novozym 435 foi o melhor biocatalisador, levando a uma conversão de 56% e excessos enantioméricos do substrato (*R*)-22a de 96% e do produto (*S*)-23 de 97%. Os resultados obtidos estão listados na **Tabela 2**.

Figura 20. Resolução cinética do *rac*-22 realizada por Huang *et al.* (2015)

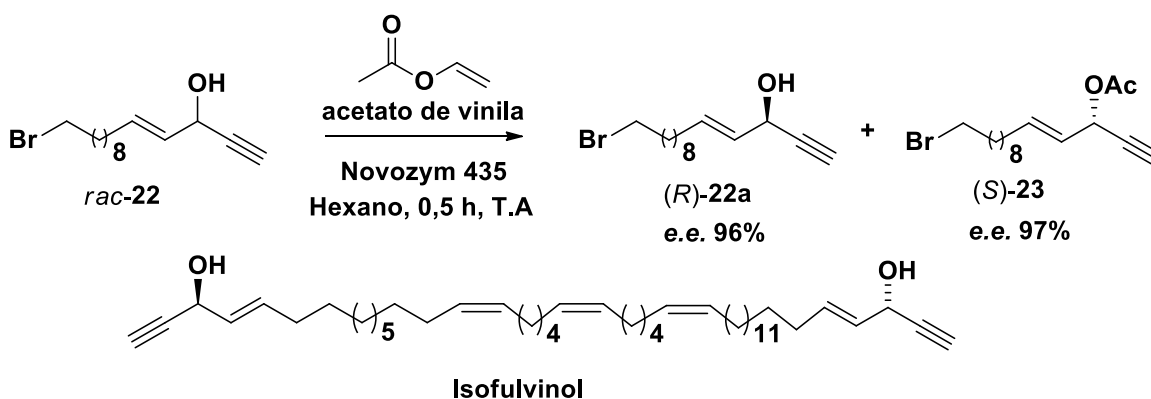


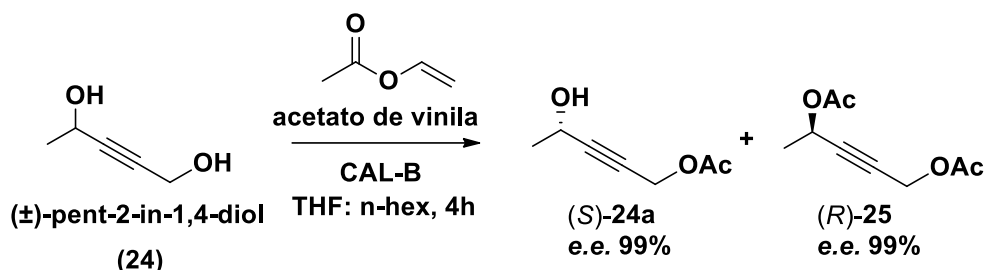
Tabela 2. Resultados da resolução cinética do *rac*-22 realizada por Huang *et al.* (2015)

Biocatalisador	Conversão (%)	e.e. (%) (<i>R</i>)-22a	e.e. (%) (<i>S</i>)-23
Lipase AK	>99	0	0
Novozym 435	56	96	97
Lipase PS	76	98	32

Ferreira *et al.* (2015) investigaram a resolução cinética enzimática do diol propargílico (\pm)-pent-2-in-1,4-diol (**24**), via reação de acetilação. Este composto é um metabólito secundário encontrado na sua forma enantiomericamente pura (com configuração *S*) no fungo *Clitocybe catinus*. Nesse estudo, os autores utilizaram como biocatalisador a

lipase de *Candida antarctica* tipo B (CAL-B), obtendo um valor de excesso enantiomérico de 99% para ambos, produto acetilado (*R*)-**25** e substrato remanescente (*S*)-**24a**, com uma conversão de 50% (**Figura 21**).

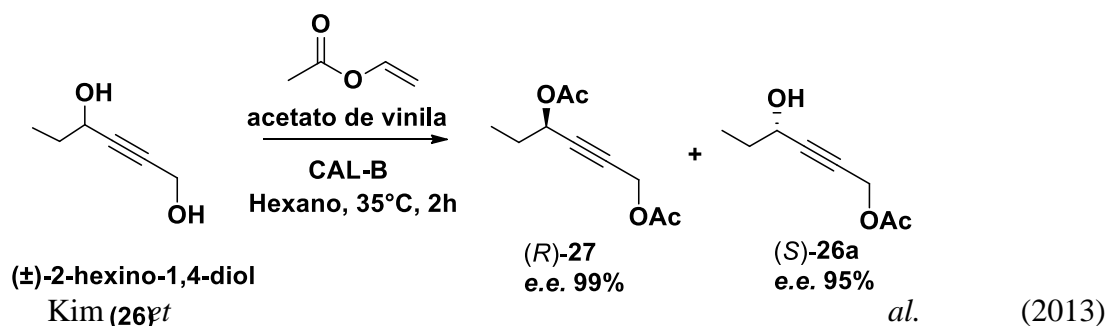
Figura 21. Resolução cinética enzimática de (\pm)-pent-2-in-1,4-diol (**24**) realizada por Ferreira *et al.* 2015



A resolução cinética de outro diol propargílico (\pm)-2-hexino-1,4-diol (**26**), o qual apresenta elevada atividade citotóxica foi investigada por Princival *et al.*, em 2016. Os autores descreveram a RC do diol, utilizando como doador de acila o acetato de vinila, como solvente orgânico hexano e como biocatalisadores cinco lipases. As enzimas testadas foram *Candida antarctica* tipo B (CAL-B) e as enzimas livres Amano Lipase G de *Penicillium camemberti* (PCL-G), Lipase A amano 12 (A12L-A); lipase de *Pseudomonas stutzeri* (AE07) e lipase de *Alcaligenes* spp. (A2AE011).

A lipase CAL-B provou ser o catalisador mais eficiente. Assim, após a resolução cinética enzimática de **26**, os enantiômeros (*R*)-**27** e (*S*)-**26a** foram obtidos com valores de excessos enantioméricos de 99% e 95%, respectivamente, e uma conversão de 50%. Embora outras lipases como AE07 e A2AE011 mostraram grau de conversão semelhante, (*S*)-**26a** foi obtido com seletividade moderada (*e.e.* 78-87%).

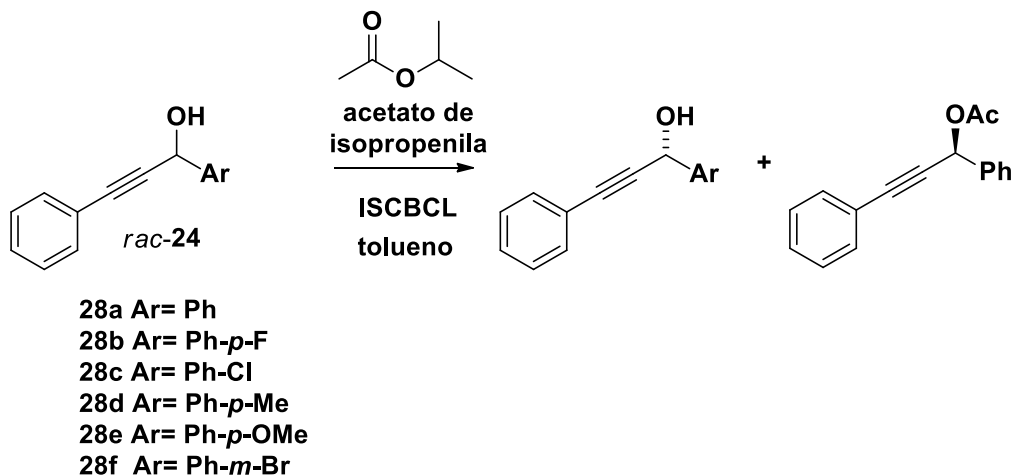
Figura 22. Resolução cinética enzimática de (\pm)-2-hexino-1,4-diol (**26**) realizada por Princival *et al.* 2016



relataram a resolução cinética de álcoois α -arilpropargílicos (*rac*-**28**), usando a lipase de *Burkholderia cepacia* revestida com surfactante iônico (ISCBCL), em acetato de isopropenila a 25 °C, **Figura 23**. Os autores observaram que a enantiosseletividade dos álcoois α -

arilpropargílicos dependia do padrão de substituição do anel α -aromático. Foi alto ($E > 200$) para aqueles que não têm substituinte e para p -substituinte no anel α -aromático, mas inferior para aquele que têm um m -substituinte no anel α -aromático.

Figura 23. Resolução cinética de *rac*-28 realizada por Kim *et al.*, 2013



Chen *et al.* (2013) utilizaram a lipase PS-30 (Sigma-Aldrich) como catalisador, na resolução cinética de uma série de álcoois propargílicos racêmicos, **Figura 24**. Em seguida, fizeram o estudo de estrutura e atividade enzimática desses compostos. Os resultados desse estudo estão na **Tabela 3**.

Figura 24. Resolução de álcoois propargílicos (*rac* 29a-h) racêmicos

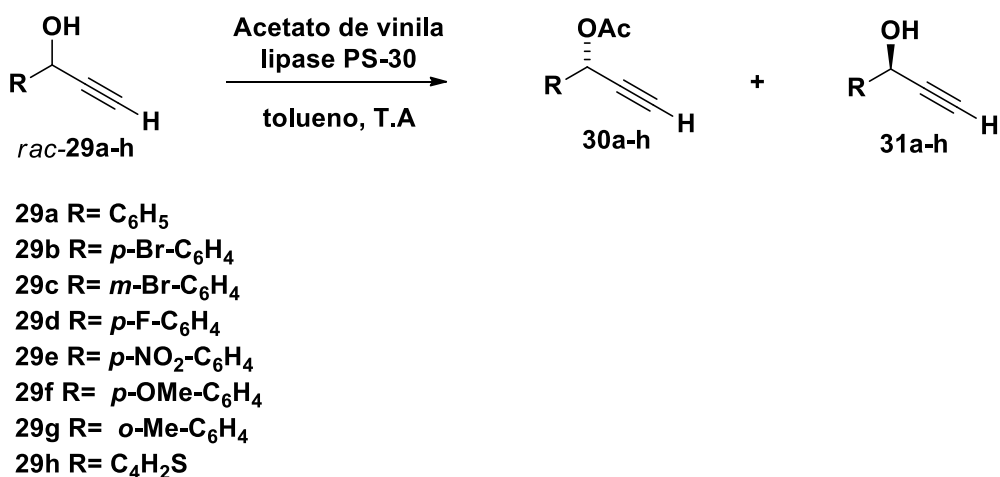


Tabela 3. Resultados da resolução cinética de álcoois propargílicos **29a-h** catalisada pela lipase PS-30 por Chen *et al.* (2013)

Entradas	Álcool	<i>e.e.</i> _p (26) (%)	<i>e.e.</i> _s (27) (%)	E	<i>c</i> (%)	Tempo reacional (h)
1	25a	89,6	83,8	48,6	48,3	24
2	25b	88,2	94,8	58,5	51,8	72
3	25c	94,1	75,4	73,9	44,5	24
4	25d	86,1	98,4	64,4	53,3	24
5	25e	87,4	23,8	19,0	21,4	72
6	25f	90,1	65,5	37,4	42,1	24
7	25g	34,4	79,6	4,6	69,8	24
8	25h	73,8	82,4	16,6	52,8	18

Para a discussão dos dados mostrados na **Tabela 3**, os autores usaram o composto **29a** (entrada 1, E = 48,6) como referência para comparação com os outros. Eles analisaram os resultados da seguinte forma: Os compostos **29b-29d** (entradas 2–4, E = 58,3-73,9), que carrega um substituinte de tamanho moderado na posição *meta* ou *para* do grupo fenil, apresentou valores E altos, enquanto o composto **29e** e **29f** (entrada 5 e 6, E = 19,0 e 37,4, respectivamente), que carregam um substituinte de tamanho maior na posição *para*, deram valores E significativamente baixos. Este fato implica que o tamanho do substituinte, ou seja, o tamanho do grupo R tem influência na interação do substrato com a enzima.

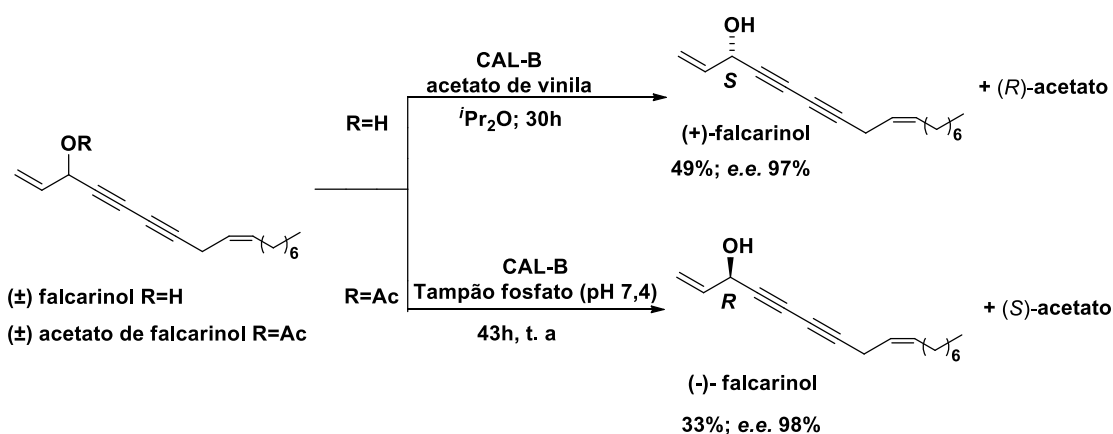
Segundo os autores, quando o tamanho dos substituintes no grupo fenil era pequeno o suficiente, como F e Br (cujo atômico o raio é de apenas 42 e 94 pm, respectivamente, enquanto o de H é 53 pm), a estericindância não seria o fator chave para a combinação dos substratos e a enzima e o efeito de retirada eletrônica faria alguma contribuição positiva para o valores E (entradas 2-4, E = 58,3-73,9, enquanto na entrada 1, E = 48,6).

A substituição na posição *orto* do grupo fenil (entradas 7 e 8, composto **29g** e **29h**, E = 4,6 e 16,6, respectivamente), que causa estéreo impedimento ao grupo alquil, leva à diminuição dramática dos valores de E. Portanto, os autores concluíram que o impedimento estérico ainda é o principal fator nesta resolução enzimática.

McLaughlin *et al.* (2010) propuseram a síntese e posterior resolução enzimática do composto falcarinol, um produto natural que pode ser encontrado na cenoura e que o seu enantiômero *R* é descrito com alta atividade anticâncer. Nesse trabalho, as RCEs do falcarinol racêmico e seu respectivo acetato, *via* acetilação e hidrólise, respectivamente, foram realizadas empregando-se *Candida antarctica* (CAL-B), **Figura 25**.

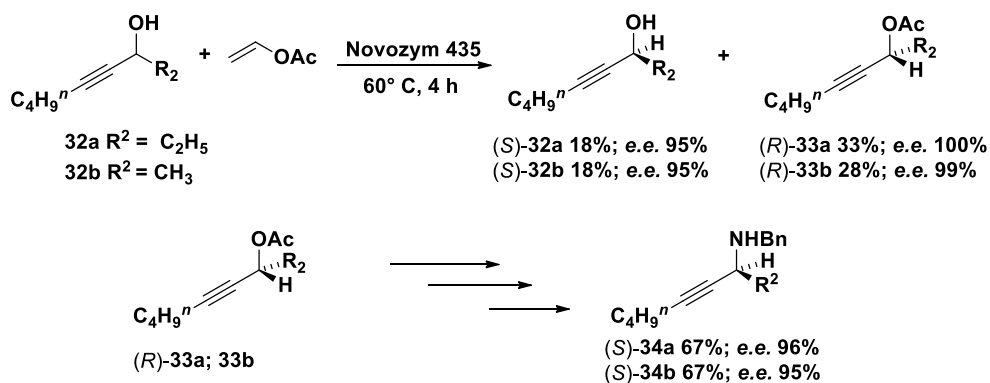
Embora os dois processos, considerados complementares, tenham fornecido os álcoois enantioenriquecidos, o processo *via* hidrólise gerou o (-)-falcarinol com um rendimento de 33%.

Figura 25. Resolução cinética do (±)-falcarinol mediada por lipase



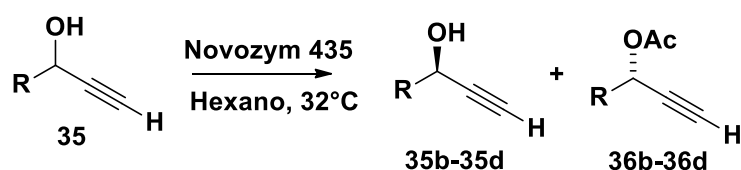
Ma *et al.* (2005) relataram preparação de aminas propargílicas opticamente ativas a partir da resolução cinética dos álcoois propargílicos. A lipase Novozym 435 foi o biocatalisador usado para esta síntese de compostos, e o acetato de vinila foi utilizado como doador de acila em hexano como solvente orgânico (**Figura 26**).

Figura 26. Síntese de aminas propargílicas realizada por Ma *et al.* 2005



Raminelli *et al.* (2004) descreveram a resolução cinética catalisada pela lipase Novozym 435 de vários álcoois propargílicos. Em alguns casos, o excesso enantiomérico foi alto (99%). O estudo mostrou que o uso de hexano como solvente propiciou uma melhor resolução em um menor tempo de reação. Os resultados estão resumidos na **Tabela 4** e indicam que os compostos **35c** e **35d** apresentaram resolução cinética moderada sob as condições reacionais empregadas. Os autores atribuíram que isso era esperado tendo em vista o tamanho dos substituintes, que não são grandes suficientes para garantir uma boa resolução.

Tabela 4. Resolução cinética de álcoois propargílicos racêmicos (35b-d) catalisados pela Novozym 435

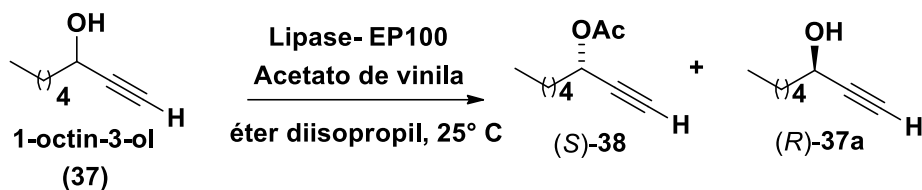


R= *n*-C₆H₁₃ (35b, 36b); *i*-C₃H₇ (35c, 36c); Et (35d, 36d)

t(min)	C %	e.e. % (35b)	e.e.% (36b)	E	c %	e.e. % (35c)	e.e. % (36c)	E	c %	e.e. % (35d)	e.e. % (36d)	E
20	21	27 (R)	99 (S)	259	8	8 (R)	93 (S)	29	50	27 (R)	26 (S)	2,2
40	33	49 (R)	99 (S)	324	14	15(R)	93 (S)	31	73	51 (R)	19 (S)	2,3
70	41	67 (R)	98 (S)	199	21	24 (R)	93 (S)	21	87	75 (R)	11 (S)	2,3
100	46	81 (R)	97 (S)	164	26	33 (R)	92 (S)	33	95	99 (R)	5 (S)	2,3
160	51	98 (R)	95 (S)	179	39	58 (R)	90 (S)	34	98	99 (R)	2 (S)	2,6
220	52	99 (R)	93 (S)	144	44	70 (R)	88 (S)	32	>99	-	0	2,6
280	51	98 (R)	92 (S)	110	46	75 (R)	87 (S)	32	-	-	-	-

Abad *et al.*(2003) relataram a resolução cinética do álcool propargílico 1-octin-3-ol racêmico (**37**) usando doze lipases comercialmente disponíveis, adsorvidas em material de polipropileno poroso (EP100) a fim de aumentar a eficiência catalítica.

Tabela 5. Resolução cinética do 1-octin-3-ol (37) catalisada por lipases



lipase ^a	conversão (%)	e.e. % (S)-38	tempo (h)	E
RML	35	20	72	2
CRL	25	30	24	2
PCL	30	34	2	2
CAL-B	40	90	2	35
RML-IM	20	64	72	5
PPL	-	-	72	-
ANL	14	0	96	1
ROL	45	56	24	6
RAL	40	44	72	3
RNL	36	48	144	4
MJL	20	68	72	6
HLL	35	40	24	2

^a RML: *Mucor miehei*; LCR: *Candida rugosa*; PCL: *Pseudomonas Cepacia*; CAL-B: *Candida antarctica* (Novozyme 435); RMLIM: *Rhizomucor miehei* (Lipozyme IM). PPL: Pâncreas de porco; ANL: *Aspergillus niger* (lipase A, Amano). ROL: *Rhizopus oryzae*; RAL: *Rhizopus arrhizus*; RNL: *Rhizopus niveus*; MJL: *Mucor javanicus*; HLL: *Thermomyces lanuginosus*.

De acordo com os autores (**Tabela 5**), a lipase de *Candida antarctica* (CAL-B) foi a mais eficiente levando a valores de e.e. 90% e E= 35 para o (S)-enantiômero em 2 h de reação. Este resultado concorda com a alta seletividade observada por essa lipase na discriminação de enantiômeros de uma variedade de álcoois secundários insaturados. Já a lipase PCL, em 2 h, não mostrou uma boa resolução enantiomérica para este composto.

As demais enzimas apresentaram resultados de atividade e de selevidade baixos, em tempos reacionais altos. E, não foi observada reação com PPL, embora outros autores tenham relatado sua capacidade de resolver misturas enantioméricas de outros álcoois secundários insaturados.

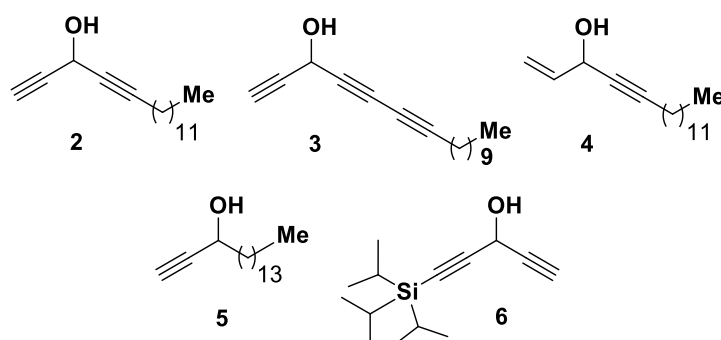
Xu *et al.*(2003) relataram que álcoois propargílicos opticamente ativos são importantes intermediários para a síntese enantiosseletiva de vários produtos naturais e precursores de outras formas de compostos opticamente ativos difíceis de serem produzidos, como o eicosanóide leucotrieno B4.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O emprego da RCE *via* hidrólise catalisada por lipases, na produção de alquínilcarbinóis quirais ainda é incipiente, tendo somente um exemplo descrito na literatura (McLAUGHLIN *et al.*, 2010). De acordo com a revisão bibliográfica, a RCE *via* acetilação para a síntese de alquínilcarbinóis quirais é mais aplicada.

O grupo de pesquisa coordenado pelos professores Yves Génisson e Remi Chauvin, ambos da Universidade Paul Sabatier-Toulouse III (Toulouse, França), sintetizaram os alquínilcarbinóis quirais heptadeca-1,4-di-in-3-ol (**2**), heptadeca-1,4,6-tri-in-3-ol (**3**), heptadec-1-en-4-in-3-ol (**4**), heptadec-1-in-3-ol (**5**) e 1-(tri-isopropilsilil)-penta-1,4-di-in-3-ol (**6**) (**Figura 27**), com rendimentos e enantiosseletividade variados.

Figura 27. Representação das estruturas dos alquínilcarbinóis **2**, **3**, **4**, **6** e **5**, e parâmetros de síntese



LACs	<i>e.e.</i> (%)	Rend. (%)	Método	Referência
2	76 (<i>R</i>)	63 (<i>R</i>)	Síntese assimétrica	ARFAOUI <i>et al.</i> , 2013
	91 (<i>S</i>)	70 (<i>S</i>)		
3	84 (<i>R</i>)	59 (<i>R</i>)	Síntese assimétrica	BOURKHIS <i>et al.</i> , 2018
	84 (<i>S</i>)	51 (<i>S</i>)		
4*	91 (<i>R</i>)	18 (<i>R</i>)	Síntese assimétrica	ARFAOUI <i>et al.</i> , 2013
	76 (<i>S</i>)	16 (<i>S</i>)		
5*	>99 (<i>S</i>)	56 (<i>S</i>)	Síntese assimétrica	ARFAOUI <i>et al.</i> , 2013
6	>99 (<i>R</i>)	15 (<i>R</i>)	RCE <i>via</i> acilação	LISTUNOV <i>et al.</i> , 2018
	42 (<i>S</i>)	31 (<i>S</i>)		

* Composto preparado a partir de um alquínilcarbinol quiral precursor

Como pode ser observado na **Figura 27**, e ainda descrito na revisão bibliográfica, os compostos alquínilcarbinóis quirais foram produzidos *via* síntese assimétrica, com excessos enantioméricos e rendimentos moderados. A exceção é o composto **6** formado *via* RCE. Embora o alquínilcarbinol (*R*)-**6** tenha sido formado com elevada enantiosseletividade (*e.e.* > 99%), este composto foi obtido com baixo rendimento (15%).

Estes resultados nos motivaram a investigar o emprego de RCE, *via* hidrólise catalisada por lipases, dos acetatos dos álcoois racêmicos (**2-6**) preparados pelo grupo de pesquisa francês.

O trabalho foi desenvolvido, empregando-se as seguintes etapas:

- (i) Acetilação dos alquínilcarbinóis racêmicos (**2-6**) para formação dos respectivos acetatos racêmicos;
- (ii) Triagem de lipases na resolução cinética, *via* reação de hidrólise, dos acetatos racêmicos de **2** e **6**;
- (iii) Otimização das condições de resolução cinética enzimática com a(s) lipase(s) selecionada(s);
- (iv) Resolução cinética enzimática dos acetatos racêmicos nas condições otimizadas para produção dos compostos enantiomericamente puros e/ou enantioenriquecidos.

4.1 Reação de acetilação dos racematos dos alquínilcarbinóis

Os alquínilcarbinóis racêmicos **2-6** foram acetilados, empregando-se 4-(*N,N*-dimetilamino)piridina (DMAP) e anidrido acético (Ac_2O), em diclorometano (**Figura 28**). Os respectivos acetatos racêmicos foram obtidos em bons rendimentos (74-90%), **Tabela 7**.

Figura 28. Reação de acetilação dos alquínilcarbinóis racêmicos

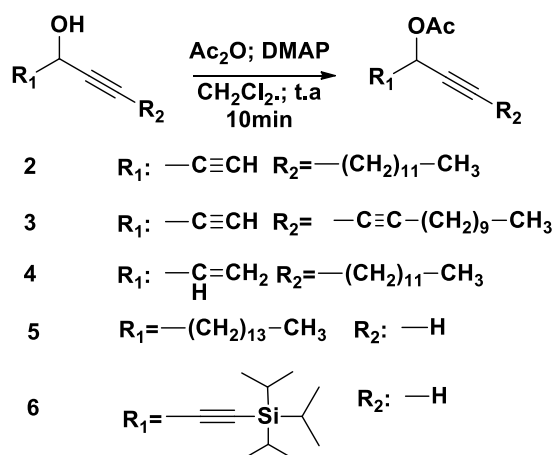


Tabela 8. Triagem de lipases na RCE de *rac*-2-Ac via reação de hidrólise

Entrada	Lipase	<i>e.e.p</i> (%) ^a	<i>e.e.s</i> (%) ^a	<i>c</i> (%) ^b	<i>E</i> ^c
1	Amano lipase PS-IM	65	57	46	8
2	<i>T. lanuginosus</i> imob. em immovead-150	92	84	48	62
3	<i>C. antarctica</i> B imob. em resina acrílica	>99	>99	50	>200
4	Amano lipase de <i>M. javanicus</i>	-	-	-	-
5	<i>R. miehei</i> imob. em resina ânionica	-	-	-	-
6	<i>R. orizae</i> imob. em immovead-150	-	-	-	-
7	Amano lipase de <i>P. fluorescens</i>	-	-	-	-
8	<i>P. camemberti</i>	-	-	-	-
9	Pâncreas de porco	-	-	-	-
10	<i>A. niger</i>	-	-	-	-
11	<i>R. niveus</i>	-	-	-	-
12	<i>C. rugosa</i>	-	-	-	-

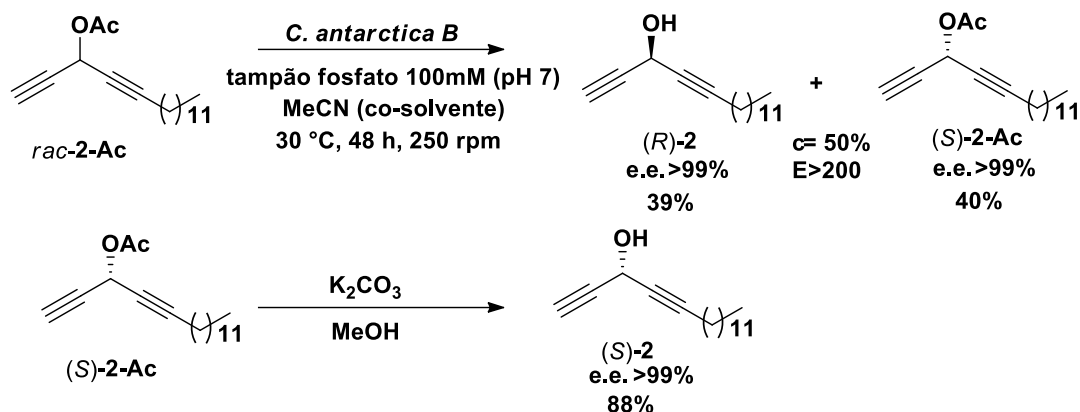
^a Determinado por CG-DIC; ^b Conversão, $c = e.e.s/(e.e.s+e.e.p)$;

^c Razão enantiomérica, $E = \ln[1-c(1+e.e.p)]/\ln[1-c(1-e.e.p)]$.

Dentre as enzimas avaliadas, a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e a lipase de *Candida antarctica* B (CAL-B) foram as que proporcionaram os melhores resultados de atividade enzimática e de seletividade na reação de hidrólise do *rac*-2-Ac, uma vez que os valores de conversão ($c = 48-50\%$), de excesso enantiomérico (84-99%) e de enantiosseletividades ($E = 62-200$) foram de moderados a excelentes (Entradas 2 e 3, **Tabela 8**). Observou-se, também, que a enzima Amano lipase PS-IM nas condições testada não é enantiosseletiva na resolução cinética de *rac*-2-Ac (Entrada 1).

Assim, a partir do estudo de resolução cinética de *rac*-2-Ac, via hidrólise, foi possível estabelecer as condições reacionais para a obtenção do (*S*)-2-Ac e (*R*)-2 fazendo o uso da lipase CAL-B (Rendimento de 40% e de 39%, respectivamente). O composto (*S*)-acetato de 2 enantiomericamente puro foi hidrolisado, via química, e forneceu o respectivo (*S*)-2 com 88% de rendimento (Item 5.6.2.1, p. 70) (**Figura 30**). Os cromatogramas obtidos por CG-DIC referentes a *rac*-2 e *rac*-2-Ac, bem como dos álcoois (*R*)-2 e (*S*)-2, encontram-se nos anexos.

Figura 30. Reação de RCE (via hidrólise) do LAC *rac*-2-Ac e hidrólise química do (*S*)-2-Ac



As análises de polarimetria dos produtos confirmaram o cumprimento da regra empírica de Kazlauskas, em que nas reações de hidrólise, *via* lipases, o álcool formado é de configuração *R* e o acetilado remanescente é de configuração *S* (KAZLAUSKAS *et al.*, 1991).

Portanto, os resultados encontrados de excessos enantioméricos (>99%) para os álcoois *R* e *S* de **2** foram bem superiores aos descritos na literatura (*e.e.* 76% para (*R*)-**2** e *e.e.* 91% para (*S*)-**2** para o mesmo LAC produzido *via* síntese assimétrica (ARFAOUI *et al.*, 2013).

Os resultados da RCE de *rac*-**2-Ac** foram publicados no artigo intitulado “Skeletal Optimization of Cytotoxic Lipidic Dialkynylcarbinols” (BOURKHIS *et al.*, 2018), publicado no periódico *ChemMedChem* (DOI: 10.1002/cmdc.201800118).

4.2.1 Estudo da influência de co-solvente na RCE de *rac*-**2-Ac** catalisada pela lipase CAL-B

O ambiente aquoso é considerado ideal para as reações enzimáticas porque possibilita a manutenção estrutural da enzima. No entanto, a quantidade de substratos orgânicos solúveis em água é limitada, principalmente no caso dos LACs. Assim sendo, em reações hidrolíticas, utilizando lipases, determinadas proporções de co-solventes orgânicos são usadas a fim de alcançar uma solubilidade maior do substrato no meio reacional (FONSECA, 2017).

Porém, o uso de solvente orgânico em laboratórios de pesquisa e em processos industriais tem causado certa preocupação, devido serem agressivos ao meio ambiente. Portanto, com base no conceito da Química Verde buscou-se um processo ainda mais sustentável para produzir os álcoois (*R*) e (*S*)-**2**. Assim, avaliou-se a resolução cinética enzimática de *rac*-**2-Ac** com a lipase CAL-B em meio estritamente aquoso (sem co-solvente), mantendo as demais condições testadas inicialmente (Figura 31). Como resultado, observou-

Tabela 9. Resultados do estudo de otimização do tempo e temperatura reacionais na RCE do *rac*-3-Ac, via hidrólise, catalisada pela lipase CAL-B (MeCN como co-solvente e 2:1 enzima:substrato)

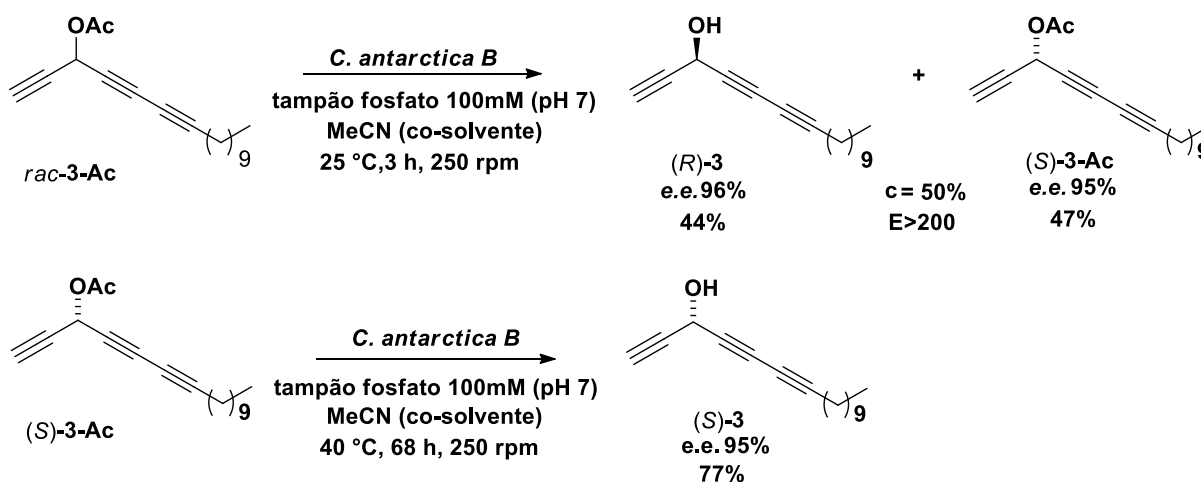
Entrada	Temperatura (°C)	Tempo de Reação (h)	<i>e.e.</i> _p (%) ^a	<i>e.e.</i> _s (%) ^a	<i>c</i> (%) ^b	<i>E</i> ^c
1	30	48	52	93	64	10
2		24	60	98	62	16
3		12	82	98	54	46
4		7	90	90	50	58
5	25	6	98	94	49	>200
6		3	96	95	49	>200
7		1	71	98	42	>200
8 ^d		3	98	95	49	>200

^a Determinado por CG-DIC; ^b Conversão, $c = e.e._s / (e.e._s + e.e._p)$;

^c Razão enantiomérica, $E = \ln [1 - c(1 + e.e._p)] / \ln [1 - c(1 - e.e._p)]$. ^d Sem co-solvente

Vale mencionar que, os resultados da RCE de *rac*-3-Ac apresentados na Entrada 6 da **Tabela 9** também foram publicados no artigo intitulado “Skeletal Optimization of Cytotoxic Lipidic Dialkynylcarbinols” (BOURKHIS *et al.*, 2018), publicado no periódico *ChemMedChem* (DOI: 10.1002/cmdc.201800118), já citado anteriormente. Em seguida, o composto (*S*)-acetato de **3** enantioenriquecido foi hidrolisado, *via* enzimática usando a lipase CAL-B, e forneceu o respectivo (*S*)-álcool com 77% de rendimento, com manutenção do *e.e.* de 95% (Item 5.6.3.1, p. 71) (**Figura 32**).

Figura 32. Reação de RCE (via hidrólise) do LAC *rac*-3-Ac e hidrólise enzimática de (*S*)-3-Ac utilizando *Candida antarctica* B



Posteriormente, tendo como referência o resultado obtido na hidrólise do acetato dialquilcarbinol *rac*-**2-Ac** com CAL-B sem co-solvente (ver a Seção 4.2.1), decidiu-se estender essa abordagem enzimática para o acetato butadiinil alquilcarbinol *rac*-**3-Ac**. Portanto, a reação de RCE do *rac*-**3-Ac** foi realizada sem co-solvente, mantendo inalteradas todas as outras condições de reação (CAL-B, 25 °C e 3 h), **Tabela 9** (Entrada 6). Neste caso, foi observada um ligeiro aumento no valor de *e.e.*_p de 96% para 98%, com conversão de 49%, *e.e.*_s de 95% e enantioseletividade (E) > 200 **Tabela 9** (Entrada 8). Este resultado indica que a reação ocorre na interfase do sistema meio hidrolítico/meio orgânico, sem a necessidade da adição de um co-solvente (ALMEIDA *et al.*, 2020).

Os resultados discutidos até o momento mostraram, claramente, que a diminuição da temperatura (30→25 °C) melhorou os valores de enantioseletividade e conversão. No entanto, os excessos enantioméricos obtidos para os compostos (*S*)-**3-Ac** (*e.e.*_s) e (*R*)-**3** (*e.e.*_p) ainda precisavam ser melhorados. Assim, a RCE do referido LAC foi realizada a 20 °C, sendo a transformação monitorada até 50% de conversão (Entradas 1 a 3, respectivamente), **Tabela 10**. A esta temperatura mais baixa, o melhor resultado (*c*= 50%, E > 200, *e.e.*_s e *e.e.*_p 98%) foi obtido após 7 h de reação **Tabela 10** (Entrada 1) (ALMEIDA *et al.*, 2020).

Tabela 10. Resultados do estudo de RCE do *rac*-3-Ac, via hidrólise, catalisada pela lipase CAL-B a 20 °C (MeCN como co-solvente e 2:1 enzima:substrato)

Entrada	Tempo de Reação (h)	<i>e.e.</i> _p (%) ^a	<i>e.e.</i> _s (%) ^a	<i>c</i> (%) ^b	E ^c
1	7	98	98	50	>200
2	5	98	91	45	>200
3	3	97	77	44	154

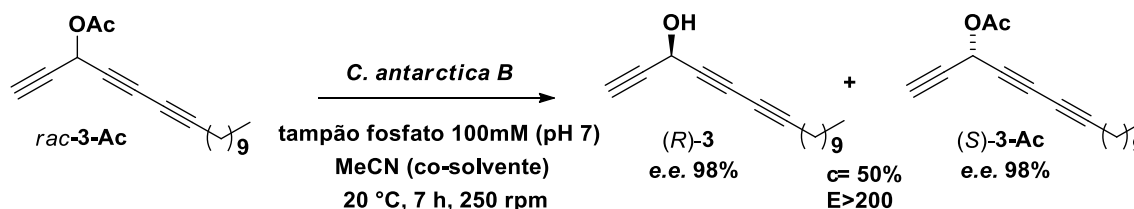
^a Determinado por CG-DIC; ^b Conversão, $c = e.e._s / (e.e._s + e.e._p)$;

^c Razão enantiomérica, $E = \ln [1 - c(1 + e.e._p)] / \ln [1 - c(1 - e.e._p)]$.

Em suma, o estudo de otimização do tempo e temperatura reacionais na RCE do *rac*-**3-Ac**, via hidrólise, catalisada pela lipase CAL-B (MeCN como co-solvente e 2:1 enzima:substrato (m:m)) foi realizado empregando-se as temperaturas de 30, 25 e 20°C e os tempos variaram de 1 a 48 h, dependendo da temperatura investigada. Os resultados mostraram a influência direta das duas variáveis (tempo e temperatura) nos parâmetros medidos (*e.e.*_s, *e.e.*_p, *c* e E). A condição reacional mais satisfatória (*e.e.* 98%, *c*= 50% e E > 200) para a obtenção dos compostos (*S*)-**3-Ac** e (*R*)-**3** foi seguinte: enzima CAL-B, MeCN como co-solvente, 2:1 enzima:substrato (m:m), 20 °C e 7 h de reação (**Figura 33**).

Os resultados encontrados nas condições otimizadas foram consideravelmente melhores aos descritos na literatura (*e.e.* 84% para (*R*)-**3** e (*S*)-**3**) quando o mesmo LAC foi produzido *via* síntese assimétrica (BOURKHIS *et al.*, 2018).

Figura 33. Reação de RCE (*via* hidrólise) do LAC *rac*-**3**-Ac nas condições otimizadas



4.4 Resolução cinética enzimática do acetato de heptadec-1-en-4-in-3-ila (*rac*-**4**-Ac)

O estudo da resolução cinética enzimática do alquinilcarbinol *rac*-**4**-Ac foi iniciado empregando-se as lipases PS IM, TLL e CAL-B e as condições 30 °C; relação enzima:substrato (m:m) de 2:1; MeCN como co-solvente; tempo reacional de 48 h, utilizadas no estudo com o LAC padrão *rac*-**2**-Ac (Tabela 8, p. 50). Os resultados obtidos estão sumariados na Tabela 11.

Tabela 11. Resultados obtidos na RCE (*via* hidrólise) do *rac*-**4**-Ac, catalisada por lipases (MeCN como co-solvente; 2:1 enzima:substrato, 30 °C; 48h)

Entrada	Lipase	<i>e.e._p</i> (%) ^a	<i>e.e._s</i> (%) ^a	<i>c</i> (%) ^b	<i>E</i> ^c
1	CAL-B	92	98	52	110
2	TLL	75	86	53	19
3	PS IM	47	95	67	9

^a Determinado por CG-DIC; ^b Conversão, $c = e.e._s / (e.e._s + e.e._p)$;

^c Razão enantiomérica, $E = \ln[1 - c(1 + e.e._p)] / \ln[1 - c(1 - e.e._p)]$.

Novamente, a CAL-B foi a lipase que apresentou os melhores resultados na hidrólise do acetato racêmico (Entrada 1), mas ainda com enantiosseletividade moderada ($E = 110$). Assim, a reação foi refeita empregando-se a lipase CAL-B, o co-solvente MeCN e as condições (tempo e temperatura) apresentadas na Tabela 12, as quais foram satisfatórias na RCE de *rac*-**2**-Ac (Entrada 1), porém em um menor tempo reacional, e *rac*-**3**-Ac (Entrada 2).

Tabela 12. Resultados da resolução cinética *via* hidrólise de *rac*-**4-Ac**, usando a relação enzima:substrato 2:1 e utilizando a lipase de CAL-B, em MeCN, variando a temperatura e os tempos reacionais

Entrada	Tempo	T(°C)	<i>e.e.</i> _p (%) ^a	<i>e.e.</i> _s (%) ^a	<i>c</i> (%) ^b	E ^c
1	24h	30	94	91	49	103
2	3h	25	97	95	49	>200

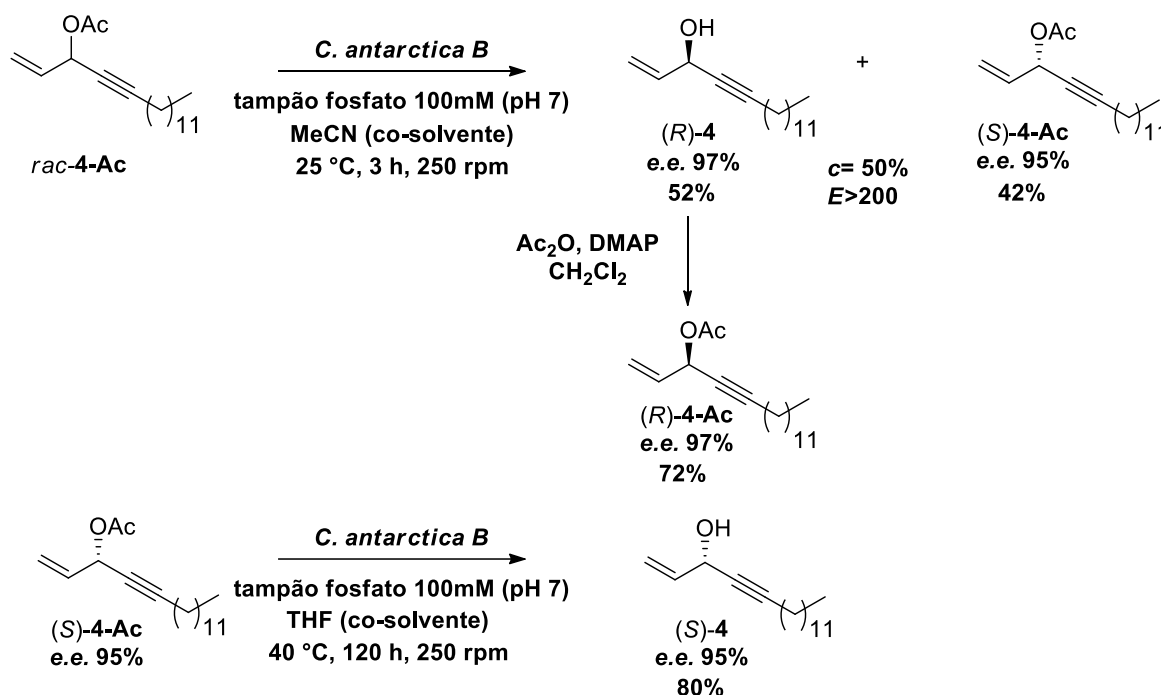
^a Determinado por CG-DIC; ^b Conversão, $c = e.e._s / (e.e._s + e.e._p)$;

^c Razão enantiomérica, $E = \ln[1 - c(1 + e.e._p)] / \ln[1 - c(1 - e.e._p)]$.

Dentre os dois testes realizados, é perceptível que a RCE do *rac*-**4-Ac** forneceu melhores resultados quando foram usados os parâmetros do alquilcarbinol *rac*-**3** (Tabela 12, Entrada 2). Vale ressaltar que o excesso enantiomérico do produto (*R*)-**4** foi determinado a partir do seu acetato ((*R*)-**4-Ac**), este último obtido após a acetilação química do álcool (Figura 34). A referida acetilação foi necessária, uma vez que não foi possível separar os enantiômeros de *rac*-**4** por CG-DIC.

Portanto, na RCE (*via* hidrólise) do *rac*-**4-Ac**, os melhores resultados foram alcançados quando a reação foi catalisada pela lipase CAL-B nas condições de MeCN como co-solvente; 2:1 enzima:substrato (m:m); 25 °C e 3 h de reação (Figura 34). O composto (*S*)-acetato de **4** enantioenriquecido foi hidrolisado, *via* enzimática usando a lipase CAL-B, e forneceu o respectivo (*S*)-álcool com 80% de rendimento, com manutenção do *e.e.* de 95% (Item 5.6.4.2, p. 72) (Figura 34). Novamente, esses resultados foram superiores aos descritos na literatura (*e.e.* 91% para (*R*)-**4** e *e.e.* 76% para (*S*)-**4**) na síntese assimétrica desse LAC (ARFAOUI *et al.*, 2013).

Figura 34. Reação de RCE (via hidrólise) do LAC *rac*-4-Ac



4.4.1 Estudo da influência de co-solvente na RCE de *rac*-4-Ac catalisada pela lipase CAL-B

Da mesma forma como foi realizado para *rac*-2-Ac e para *rac*-3-Ac, verificou-se a necessidade da adição de co-solvente na RCE (via hidrólise) de *rac*-4-Ac catalisada pela enzima lipase CAL-B. A reação foi repetida na ausência de co-solvente, nas condições de 3 h, 25 °C e relação enzima:substrato (m:m), 2:1. Nesse caso, os resultados foram inferiores aos obtidos com o uso de MeCN como co-solvente, principalmente no que se refere à enantiosseletividade da reação ($E = 35$). Foram obtidos valores de *e.e.* menores [(*R*)-4: *e.e.* 84%; (*S*)-4-Ac: *e.e.* 89%] e conversão de 51%. Portanto, para este LAC, faz-se necessário o uso do co-solvente MeCN.

4.5 Resolução cinética enzimática do acetato de heptadec-1-in-3-ilo (*rac*-5-Ac)

Em virtude de nos estudos das RCEs dos alquilcarbinóis *rac*-2-Ac, *rac*-3-Ac e *rac*-4-Ac os melhores resultados terem sido obtidos com a enzima CAL-B, resolveu-se investigar somente essa lipase na RCE do *rac*-5-Ac (Figura 35). As condições inicialmente testadas foram: 25 °C, relação enzima:substrato (m:m) de 2:1, MeCN como co-solvente e tempo reacional de 3 h. Os resultados encontrados foram $c = 48\%$, $E > 200$, *e.e._p* > 99% [(*R*)-5] e *e.e._s* 94% [(*S*)-5-Ac].

A partir dos resultados obtidos decidiu-se aumentar o tempo de reação para 5 h com o objetivo de obter valor de conversão de 50%. De fato, nesse tempo reacional, a conversão ideal de $c=50\%$ foi alcançada. Contudo, levou a uma redução no valor de E de >200 para 194 e variação nos excessos enantioméricos ($e.e.p$ 96% (*R*)-**5** e $e.e.s$ 96% [(*S*)-**5-Ac**]). Com base nesses resultados, resolveu-se investigar a influência do co-solvente na reação.

4.5.1 Estudo da influência de co-solvente na RCE de *rac*-**5-Ac** catalisada pela lipase CAL-B

Dentre os parâmetros para análise da eficiência do solvente em uma RCE, destaca-se o $\log P$ (constante de partição octan-1-ol/água) que é uma medida quantitativa da polaridade de um solvente. Em geral, a atividade enzimática em reações catalisadas por lipase aumenta com o aumento dos valores de $\log P$ dos solventes. Solventes polares ($\log P$ negativo) tendem a retirar parte da água que constitui a camada de hidratação essencial da superfície da lipase, causando a inativação enzimática. Por outro lado, solventes apolares ($\log P$ positivo) preservam a fase micro aquosa ao redor da lipase, retendo a atividade enzimática (CARVALHO *et al.*, 2015).

Assim, a influência do co-solvente foi avaliada realizando-se experimentos somente em solução tampão pH 7 (sem co-solvente) e na presença de solventes orgânicos com diferentes valores de $\log P$. As reações foram realizadas 25 °C, 5 h, tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7 e enzima:substrato (m:m) 2:1, com os seguintes co-solventes: THF, *n*-butanol, heptano e acetona. Os resultados obtidos encontram-se listados na **Tabela 13**.

Tabela 13. Resultados da RCE (via hidrólise) de *rac*-5-Ac** catalisada pela lipase CAL-B (25 °C, 5 h, 2:1 enzima:substrato) na ausência e presença de co-solventes**

Entrada	Co-solvente	Log <i>P</i>	$e.e.p$ (%) ^a	$e.e.s$ (%) ^a	c (%) ^b	E ^c
1	-	-				
2	THF	0,50	95	88	48	114
3	<i>n</i> -butanol	0,80	81	51	39	16
4	Heptano	4,00	90	97	52	78
5	Acetona	-0,23	97	67	41	129
6	MeCN ^d	-0,33	96	96	50	194

^a Determinado por CG-DIC; ^b Conversão, $c = e.e.s/(e.e.s+e.e.p)$;

^c Razão enantiomérica, $E = \ln[1-c(1+e.e.p)]/\ln[1-c(1-e.e.p)]$; ^d resultado descrito no Item 4.5

Na ausência de co-solvente (Entrada 1) não houve formação do produto esperado e os resultados dos experimentos contendo co-solventes (Entradas 2-5) foram todos inferiores aos anteriormente obtidos com MeCN (Entrada 6). Dessa forma, observou-se variações significativas de conversão e de seletividade dependendo do co-solvente utilizado. No entanto, percebe-se que nenhuma correlação é evidenciada com o correspondente índice de lipofilicidade $\log P$, apesar de sua relevância, tanto do ponto de vista do reagente/catalisador (a eficiência de uma enzima depende diretamente de sua compatibilidade com solventes orgânicos versus meios biológicos aquosos) quanto substratos (os LACs são ligeiramente anfifílicos, mas principalmente lipídicos).

Por exemplo, quando realizou-se a reação com acetona ($\log P = -0,23$) como co-solvente, tendo uma polaridade semelhante à do MeCN ($\log P = -0,33$), a conversão foi menor ($c = 41\%$), embora com seletividade semelhante (*e.e.*_p 97%; $E = 129$), **Tabela 13** (Entrada 5). Além disso, THF ($\log P = 0,50$) e heptano ($\log P = 4,00$), com valores bastante diferentes de $\log P$, deram conversões semelhantes (48 e 52%, respectivamente, **Tabela 13**, Entradas 2 e 4). No entanto, um co-solvente altamente lipofílico (heptano) reduziu significativamente a enantioseletividade ($E = 78$, **Tabela 13**, Entrada 4), e o co-solvente alifático prótico (*n*-butanol) resultou em um valor mais baixo ainda ($E = 16$, **Tabela 13**, Entrada 3). Este último resultado pode ser atribuído a uma interferência de ligações de hidrogênio no sítio ativo da enzima.

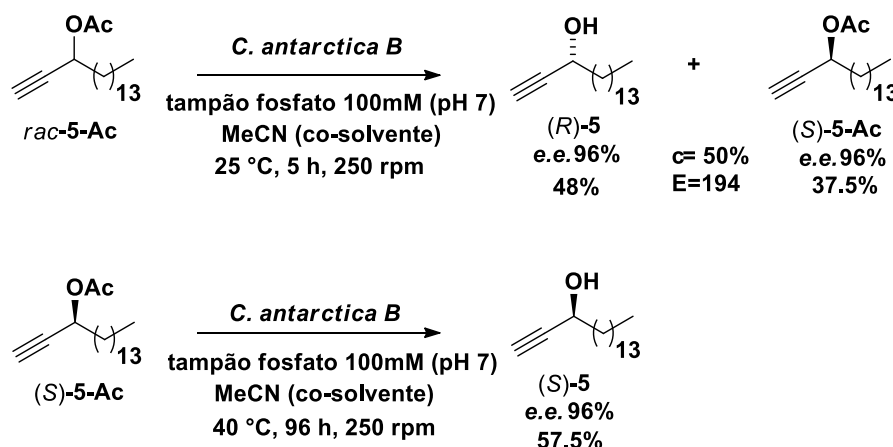
Até onde sabemos, não existe uma regra geral na hidrólise enzimática que explique os efeitos diretos da adição de co-solvente aos sistemas aquosos na conformação enzimática. Apesar disso, uma maior flexibilidade enzimática é normalmente observada na hidrólise realizada em meio aquoso (sem co-solvente), onde as moléculas de água induzem alterações conformacionais no sítio ativo (TSOU, 1998; RARIY e KLIBANOV, 2009; BROOS, 2002). Sugere-se que a adição de um co-solvente capaz de retirar as moléculas de água do sítio ativo da enzima altere seu microambiente, induzindo alterações na conformação da enzima (LIMA *et al.*, 2017). Além de promover mudanças na conformação enzimática, a adição de um co-solvente ao sistema aquoso da reação também influencia a transferência de massa do substrato entre as fases aquosa e orgânica devido à presença de uma interface. Portanto, em alguns casos, a adição de co-solventes orgânicos a reações catalisadas por lipase pode melhorar os valores de conversão (FABER, 2011).

Como visto anteriormente, a RCE de *rac*-**2-Ac** e *rac*-**124-Ac**, ambos exibindo cadeias longas insaturadas, também produziu bons resultados em meio totalmente aquoso.

Diferentemente, o *rac*-**5-Ac** possui uma cadeia mais longa completamente saturada e sua RCE ocorreu apenas com a adição de co-solvente (**Tabela 13**). Nesse caso, pode-se sugerir que a adição de co-solvente é responsável por promover uma conformação enzimática adequada e melhorar a transferência de massa de *rac*-**5-Ac** entre as fases aquosa e orgânica.

Por fim, a RCE do *rac*-**5-Ac** que apresentou os melhores resultados foi a catalisada pela lipase CAL-B nas condições de MeCN como co-solvente; 2:1 enzima:substrato (m:m); 25 °C e 5 h de reação (**Figura 35**). Vale destacar que na literatura (ARFAOUI *et al.*, 2013) foi relatado apenas a síntese do (*S*)-**5** (*e.e.* >99%), o qual foi obtido a partir de um intermediário quiral enantiopuro (*e.e.*100%). Portanto, os resultados aqui apresentados são inéditos e representam a primeira RCE do (*R*)-**5** enantioenriquecido (*e.e.* 96%). A hidrólise de (*S*)-**5-Ac** com a lipase CAL-B produziu (*S*)-**5** com 57,5% de rendimento e 96% de excesso enantiomérico (Item 5.6.5.1, p. 72) (**Figura 35**).

Figura 35. Reação de RCE (*via* hidrólise) do LAC *rac*-**5-Ac** e hidrólise enzimática do (*S*)-**5-Ac**



4.6 Resolução cinética enzimática do acetato de 1-(tri-isopropilsilil) penta-1,4-di-in-3-ila (*rac*-**6-Ac**).

Ao contrário dos LACs **2-5** que apresentavam estruturas com 17 átomos de carbono, o alqunilcarbinol *rac*-**6** possui apenas 5 carbonos em sua estrutura (**Figura 27, p. 47**). É importante ressaltar que segundo a literatura todas as tentativas de preparação do (*R*)- e (*S*)-**6**, enantiomericamente puros falharam através de síntese assimétrica, o que levou os autores a empregarem a RCE *via* acilação como metodologia alternativa (LISTUNOV *et al.*, 2018a).

A reação biocatalítica foi realizada empregando-se a lipase CAL-B, em ciclohexano, acetato de vinila (doador de grupo acila), relação enzima:substrato (m:m) de 1:5, tempo de 24 h e temperatura ambiente. Sob essas condições, o (*S*)-**6** foi obtido com apenas 42% de excesso enantiomérico e 31% de conversão. Para atingir *e.e.* de 95%, os autores repetiram 3 vezes a reação com o álcool enantioenriquecido [(*S*)-**6**], isolado após cada resolução. Portanto, o desenvolvimento de métodos de RCE do *rac*-**6**, considerado um intermediário importante em síntese orgânica, representa um desafio para a área de biocatálise.

4.6.1 Triagem de lipases na RCE do *rac*-**6**-Ac

O estudo da resolução cinética enzimática, *via* hidrólise, de *rac*-**6**-Ac foi iniciado pela triagem de 15 lipases e 1 esterase, todas comerciais (**Figura 36**). As reações foram realizadas nas seguintes condições: relação enzima:substrato (m:m) de 2:1, 80% de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7), 20% de MeCN (co-solvente), temperatura de 30 °C e tempo de 48 h. Os resultados encontram-se apresentados na **Tabela 14**.

Figura 36. Resolução cinética enzimática do *rac*-**6**-Ac *via* reação de hidrólise

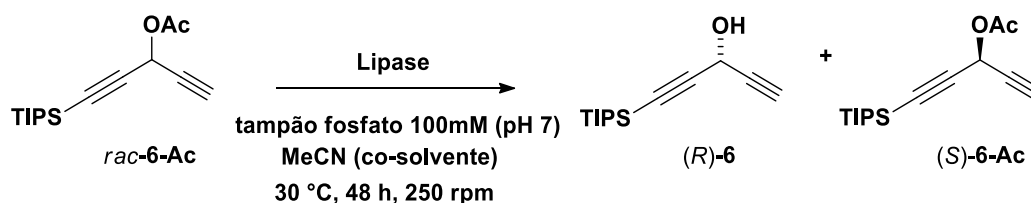


Tabela 14. Triagem de lipases na RCE (via hidrólise) de *rac*-6-Ac

Entrada	Lipase	<i>e.e.</i> _p (%) ^a	<i>e.e.</i> _s (%) ^a	<i>c</i> (%) ^b	<i>E</i> ^c
1	<i>P. camemberti</i>	-	-	0	-
2	Pâncreas de porco	-	-	0	-
3	<i>R. niveus</i>	-	-	0	-
4	Esterase imob. em Eupergit® C de fígado de porco	-	-	0	-
5	<i>P. fluorescens</i> imob. em sol-gel AK pumice	93	1	1	26
6	<i>C. rugosa</i>	49	61	45	7
7	<i>A. niger</i>	0	0	90	1
8	<i>R. oryzae</i> imob. em immobead-150	>99	9	9	>200
9	Amano lipase de <i>P. fluorescens</i>	>99	86	46	>200
10 ^d	Amano lipase de <i>P. fluorescens</i>	98	87	47	>200
11	Amano lipase PS-IM	>99	88	47	>200
12 ^d	Amano lipase PS-IM	>99	13	35	>200
13	<i>T. lanuginosus</i> imob. em immobead-150	98	94	49	>200
14 ^d	<i>T. lanuginosus</i> imob. em immobead-150	>99	53	33	>200
15	<i>C. antarctica</i> B imob. em resina acrílica	90	>99	53	>200
16 ^d	<i>C. antarctica</i> B imob. em resina acrílica	96	98	50	>200
17	Amano lipase de <i>M. javanicus</i>	>99	22	18	>200
18	<i>R. miehei</i> imob. em resina aniônica	>99	12	11	>200
19	<i>P. fluorescens</i> imob. em immobead 150	>99	45	31	>200
20	<i>P. fluorescens</i> imob. em sol-gel AK	>99	21	17	>200

^a Determinado por CG-DIC; ^b Conversão, $c = e.e._s / (e.e._s + e.e._p)$;

^c Razão enantiomérica, $E = \ln[1 - c(1 + e.e._p)] / \ln[1 - c(1 - e.e._p)]$; ^d Condições: 40 °C, 24 h.

Na resolução cinética do *rac*-6-Ac, as lipases de *P. camemberti*, pâncreas de porco e *R. niveus* foram consideradas inativas, bem como a esterase imobilizada de fígado de porco (Tabela 14, Entradas 1-4). Além disso, as lipases de *P. fluorescens* imobilizada em sol-gel AK pumice e *R. oryzae* imobilizada em immobead-150 exibiram valores de conversão baixos (Tabela 14, Entradas 5 e 8). Entre as enzimas testadas, a lipase de *A. niger* foi a mais ativa, atingindo 90% de conversão (Tabela 14, Entrada 7).

Todas as outras enzimas apresentaram alta enantioselectividade ($E > 200$), destacando Amano lipase de *P. fluorescens*, Amano lipase PS-IM, *T. lanuginosus* imobilizada em immobead-150 e *C. antarctica* B imobilizados em resina acrílica, levando a RCE a valores de conversão próximos a 50% (Tabela 14, Entradas 9, 11, 13 e 15). Dentre estas enzimas, apenas a Amano lipase de *P. fluorescens* e a Amano lipase PS-IM (Entradas 9 e 11) levaram ao produto (*R*)-6 com valores de *e.e.* > 99% e conversão próxima a 50%. Destacam-se

também as enzimas Amano lipase de *M. javanicus*, *R. miehei* imob. em resina aniônica, *P. fluorescens* immob. em immovead 150 e *P. fluorescens* imob. em sol-gel AK que proporcionaram valores de excesso enantiomérico para o álcool (*e.e.p*) >99% e enantiosseletividade >200 (**Tabela 14**, Entradas 17 a 20).

A fim de reduzir o tempo de reação para 24 h, a RCE de *rac-6-Ac* foi repetida a uma temperatura mais alta (40 °C), usando Amano lipase de *P. fluorescens*, Amano lipase PS-IM, *T. lanuginosus* imobilizado em immovead-150 e *C. antarctica* B imobilizados em resina acrílica (**Tabela 14**, Entradas 10, 12, 14 e 16). Nestes casos, a CAL-B apresentou o melhor valor de conversão (*c* = 50%), mantendo altos excessos enantioméricos para o substrato remanescente (*e.e.s* 98%) e produto (*e.e.p* 96%), (**Tabela 14**, Entradas 16).

Dessa forma, com o objetivo de se obter valores de conversão de 50% e de otimizar essa reação de RCE, novos experimentos foram realizados com as enzimas que foram mais eficazes na triagem, modificando a temperatura, o tempo reacional, razão enzima:substrato e efeito do co-solvente.

4.6.2 Estudo da influência de co-solvente na RCE de *rac-6-Ac*

Inicialmente, a resolução cinética do *rac-6-Ac* foi repetida usando uma temperatura de 40 °C e um tempo reacional de 24 h, substituindo MeCN ($\log P = -0,33$) pelo co-solvente menos polar THF ($\log P = 0,49$), usando as lipases Amano PS de *B. cepacia* imobilizada em terra de diatomáceas, lipase Amano de *P. fluorescens*, lipase de *T. lanuginosus* imobilizada em immovead-150 e lipase de *C. antarctica* B imobilizada em resina acrílica (**Tabela 15**).

Tabela 15. Resultados da resolução cinética de *rac-6-Ac* via hidrólise, usando a relação enzima:substrato (2:1), THF como co-solvente a 40 °C durante 24 h

Entrada	Lipase	<i>e.e.p</i> (%) ^a	<i>e.e.s</i> (%) ^a	<i>c</i> (%) ^b	E ^c
1	<i>T. lanuginosus</i> imob. em immovead-150	>99	>99	50	>200
2	Amano lipase de <i>P. fluorescens</i>	>99	94	48	>200
3	<i>C. antarctica</i> B imob. em resina acrílica	98	55	36	>200
4	Amano lipase PS-IM	>99	42	30	>200

^a Determinado por CG-DIC; ^b Conversão, $c = e.e.s/(e.e.s+e.e.p)$;

^c Razão enantiomérica, $E = \ln[1-c(1+e.e.p)]/\ln[1-c(1-e.e.p)]$;

Entre as enzimas testadas, apenas *T. lanuginosus* imobilizada em imobead-150 apresentou melhora significativa nos resultados quando comparado ao experimento realizado em MeCN como co-solvente, produzindo (*R*)-**6** e (*S*)-**6-Ac** com valores de *e.e.* > 99%, conversão de 50% e *E* > 200 (**Tabela 15**, Entrada 1).

A comparação dos resultados com a lipase de *T. lanuginosus* imobilizada no imobead-150 em MeCN e THF revelou claramente a grande influência do co-solvente orgânico na RCE do *rac*-**6-Ac**. Desse modo, decidiu-se dar continuidade o estudo do efeito do co-solvente, bem como da sua ausência.

4.6.3 Estudo da influência de co-solvente na RCE de *rac*-**6-Ac** catalisada pela lipase *T. lanuginosus* imobilizada em imobead-150

Além de THF, realizou-se a RCE de *rac*-**6-Ac** em outros co-solventes, como *n*-butanol, acetona e heptano, mantendo as demais condições utilizadas no experimento anterior, **Tabela 16**.

Tabela 16. Resultados da resolução cinética de *rac*-**6-Ac** via hidrólise, usando a relação enzima:substrato (2:1), a 40 °C, 24 h e utilizando a lipase TLL, na presença e ausência de co-solventes

Entrada	Co-solvent	log <i>P</i>	<i>e.e.</i> _{<i>p</i>} (%) ^a	<i>e.e.</i> _{<i>s</i>} (%) ^a	<i>c</i> (%) ^b	<i>E</i> ^c
1	THF	0,50	>99	>99	50	>200
2	MeCN	-0,33	>99	53	33	>200
3	Acetona	-0,24	>99	98	49	>200
4	Heptano	4,00	>99	94	49	>200
5	<i>n</i> -Butanol	0,83	>99	72	42	>200
6	Ausência de co-solvente	-	94	97	51	131

^a Determinado por CG-DIC; ^b Conversão, $c = e.e._s / (e.e._s + e.e._p)$;

^c Razão enantiomérica, $E = \ln[1 - c(1 + e.e._p)] / \ln[1 - c(1 - e.e._p)]$;

Embora todos os co-solventes tenham proporcionado a obtenção de valores de *e.e.* e de conversões mais altos (**Tabela 16**, Entradas 3-5) em relação a MeCN (**Tabela 16**, Entrada 2), foi apenas na presença de THF que o produto (*R*)-**6** e o substrato remanescente (*S*)-**6-Ac** foram produzidos em suas formas enantiomericamente puras (**Tabela 16**, Entrada 1). Notavelmente, uma diminuição considerável nos valores de enantioseletividade (*E*= 131) e *e.e.* foram observados quando a RCE do *rac*-**6-Ac** foi realizada na ausência de co-solvente (**Tabela 16**, Entrada 6).

Da mesma forma discutida anteriormente para o *rac-5-Ac* (Item 4.5.1, p. 58), no que diz respeito à influência do co-solvente na RCE deste composto, não foi evidenciada correlação com o correspondente índice de lipofilicidade $\log P$ para o estudo com o *rac-6-Ac*. Mesmo assim, é evidente que o co-solvente desempenha um papel importante na RCE deste último intermediário.

4.6.4 Estudo da razão enzima:substrato na RCE de *rac-6-Ac* catalisada pela lipase *T. lanuginosus* imobilizada em *immobead-150*

Foi realizado o estudo do efeito da variação da razão enzima:substrato (m:m) na resolução cinética enzimática do *rac-6-Ac*, utilizando tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7), temperatura de 40 °C e um tempo reacional de 24 h para reação mediada por *T. lanuginosus* imobilizada em *immobead-150*, em THF como co-solvente. Os resultados encontram-se sumariados na **Tabela 17**.

Tabela 17. Resultados da resolução cinética de *rac-6-Ac* com a lipase TLL via hidrólise em THF como co-solvente variando-se a razão substrato:enzima

Entrada	Razão substrato: enzima (m:m)	<i>e.e.</i> _p (%) ^a	<i>e.e.</i> _s (%) ^a	<i>c</i> (%) ^b	<i>E</i> ^c
1	1:2 ^d	>99	>99	50	>200
2	1:1	>99	>92	48	>200
3	1: 0,5	>99	22	18	>200

^a Determinado por CG-DIC; ^b Conversão, $c = e.e._s / (e.e._s + e.e._p)$;

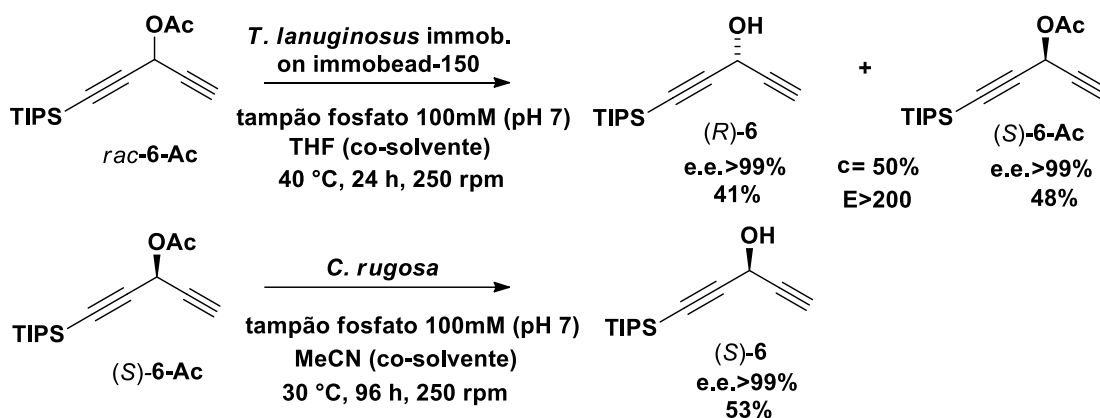
^c Razão enantiomérica, $E = \ln[1 - c(1 + e.e._p)] / \ln[1 - c(1 - e.e._p)]$; ^d resultado do Item 4.6.2.

A variação da razão substrato:enzima (m:m) foi avaliada em duas diferentes quantidades (1:1 e 1:0,5) para TLL. Nesse caso, foi possível verificar que, com redução da razão substrato:enzima (m:m) para 1:1 (Entrada 2) ocorreu uma redução no valor de *e.e.* do (*S*)-**6-Ac** (92%), bem como da conversão ($c = 48\%$). Quando a razão substrato:enzima (m:m) foi de 1:0,5 (Entrada 3), a reação foi ainda mais lenta, já que o valor de conversão diminuiu para 18% com conseqüente diminuição do valor de *e.e.* de (*S*)-**6-Ac** para 22%.

Finalmente, o estudo da RCE do éster de alquilcarbinol *rac-6-Ac* permitiu definir as condições ideais para a obtenção dos álcoois quirais (*R*)- e (*S*)-**6** enantiomericamente puros (*e.e.* >99%), com máxima conversão ($c=50\%$) e enantiosseletividade >200, **Figura 37**. A hidrólise enzimática de (*S*)-**6-Ac** foi realizada com a lipase de *C. rugosa*, pois observou-se que essa enzima não é enantiosseletiva na resolução

cinética de *rac*-6-Ac (Tabela 14, p. 62), Entrada 6. Portanto, o composto (*S*)-6 enantiopuro foi produzido com rendimento de 53% e excesso enantiomérico > 99% (Figura 37) (Item 5.6.6.1, p. 73). Assim, vale ressaltar que esses resultados são muito superiores aos descritos na literatura (Figura 27, p. 47) para a síntese desses mesmos compostos.

Figura 37. Reação de RCE (via hidrólise) do LAC *rac*-6-Ac e hidrólise enzimática de (*S*)-6-Ac



5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1 Equipamentos

Os espectros de RMN ^1H e de ^{13}C , as determinações de rotações ópticas específicas e os dados de massa de alta resolução foram obtidos pelo grupo de pesquisa *Laboratoire de Synthèse et Physicochimie de Molécules d'Intérêt Biologique* (SPCMIB), da Universidade Paul Sabatier - Toulouse III, França.

As análises das reações de hidrólise nas resoluções cinéticas enzimáticas foram feitas em um cromatógrafo gasoso da marca Shimadzu, modelo GC 2010, com um detector DIC, utilizando-se um auto-injetor da marca Shimadzu, modelo AOC-20i. A fase móvel utilizada foi o gás nitrogênio com 0,5 bar.

Para a fase estacionária, utilizou-se uma coluna quirral do tipo CP-ChiraSil-DEX CB com um comprimento de 25 m, diâmetro interno de 0,25 mm, diâmetro externo de 0,39 mm e 0,25 μm da espessura de filme para a separação dos enantiômeros do:

- ✓ **rac-2-Ac** – Temperatura do injetor: 250 °C; pressão 110 KPa; fluxo da coluna: 9.2 (nitrogênio); Temperatura do detector: 220 °C; Rampa de temperatura: 155 °C (30 min.); 0,1 °C/min. até 190 °C e 5 °C/min. até 220 °C; Tempos de retenção foram: (*R*)-2-Ac (65,43 min.); (*S*)-2-Ac (64,29 min.)
- ✓ **rac-3-Ac** – Temperatura do injetor: 220 °C; pressão 110 KPa; fluxo da coluna: 9.8 (nitrogênio); Temperatura do detector: 230 °C; Rampa de temperatura: 160 °C (10 min.); 0,1 °C/min. até 162 °C e 0,01 °C/min. até 165 °C. Tempos de retenção foram: (*R*)-3-Ac (90,05 min.); (*S*)-3-Ac (88,09 min.).
- ✓ **rac-4-Ac**. Temperatura do injetor: 250 °C; pressão 100 KPa; fluxo da coluna: 9.2 (nitrogênio); Temperatura do detector: 220 °C; Rampa de temperatura: 155 °C (30 min.); 0,1 °C/min. até 190 °C e 5 °C/min. até 220 °C; Tempos de retenção foram: (*S*)-4-Ac (80,63 min.) e (*R*)-4-Ac (81,75 min.).
- ✓ **rac-5; rac-5-Ac** - Temperatura do Injetor: 250 °C; Pressão 100 KPa; Fluxo da coluna: (nitrogênio); Temperatura do detector: 220 °C; Rampa de temperatura: 155 °C (30 min.); 0,1 °C/min. até 190 °C e 5 °C/min. até 220 °C; Tempos de retenção foram: (*S*)-5 (51,86 min.) e (*R*)-5 (53,94 min.); (*S*)-5-Ac (65,83 min.) e (*R*)-5-Ac (68,40 min.).
- ✓ **rac-6; rac-6-Ac** - Temperatura do Injetor: 200 °C; Pressão 70 KPa; Fluxo da coluna: 1.19 (nitrogênio); Temperatura do detector: 250 °C; Rampa de temperatura: 120 °C; 0,3 °C/min. até 135 °C (3 min) e 0,5 °C/min. até 155 °C (5 min.); (*R*)-6 (40,13 min.) e (*S*)-6 (39,43 min.); (*R*)-6-Ac (30,44 min.) e (*S*)-6-Ac (28,72 min.).

Utilizou-se, também, a coluna com fase estacionária quiral Rt[®]bDEXcst, com comprimento de 30 m, diâmetro interno de 0,25 mm, diâmetro externo de 0,39 mm e 0,25 µm da espessura de filme para a separação dos enantiômeros do:

- ✓ *rac-2* – rampa de temperatura: 175 °C (3 min.); 1 °C/min. 190 °C; 5 °C/min. 220 °C. Tempos de retenção foram: (*R*)-2 (16,94 min.); (*S*)-2 (17,98 min.).
- ✓ *rac-3* – rampa de temperatura: 198 °C (10min); 2 °C/min. 210 °C (10 min.). Tempos de retenção foram: (*R*)-3 (26,99 min.); (*S*)-3 (25,84 min.)

As reações feitas com agitação foram realizadas em um *shaker* de bancada, com uma incubação refrigerada, da marca Analítica de modelo SI-300R.

5.2 Solventes e reagentes

Os solventes heptano, hexano, acetona, diclorometano e *n*-butanol foram de procedência Biograde[®]. A acetonitrila e tetraidrofurano, grau CLAE, foram da marca TEDIA[®].

Os seguintes reagentes foram usados: anidrido acético (Ac₂O), de procedência Vetec[®]; Sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e 4-(*N,N*-dimetilamino)piridina (DMAP), de procedência Sigma-Aldrich[®]; Tampão fosfato de sódio 100 mM (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄).

5.3 Biocatalisadores

Os biocatalisadores empregados, todos de procedência Sigma-Aldrich[®], foram:

- ✓ Amano lipase G de *Penicillium camemberti*;
- ✓ Amano lipase PS de *Burkholderia cepaci* imobilizada em terra diatomácea;
- ✓ Amano lipase M de *Mucor javanicus*;
- ✓ Amano lipase AK de *Pseudomonas fluorescens*;
- ✓ Amano lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em immobead-150;
- ✓ Amano lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em Sol-Gel-AK;
- ✓ Amano lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada Sol-Gel-AK pumice;
- ✓ Lipase de *Rhizopus oryzae*;
- ✓ Lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em immobead-150;
- ✓ Lipase de *Aspergillus niger*;
- ✓ Lipase de *Pancreas porcine*;

- ✓ Lipase de *Candida rugosa*;
- ✓ Lipase de *Rhizopus niveus*;
- ✓ Lipase de *Candida antarctica* B immobilizada em resina acrílica;
- ✓ Lipozyme RM IM de *Rhizomucor miehei* immobilizada em resina aniônica;
- ✓ Esterase immobilizada em Eupergit® de fígado de porco.

5.4 Adsorventes

Para a realização das análises cromatográficas de adsorção em colunas foi utilizada como fase estacionária gel de sílica (60-230 mesh) comercial, de procedência Vetec®. Nas análises cromatográficas em camada delgada (CCD) foram empregadas cromatoplasmas comerciais de gel de sílica 60 G 5-40 µm, sobre poliéster T-6145, com camada de 250 µm de espessura e dimensões de 10 x 5 cm, da marca Sigma Chemical Co®.

Após eluição das substâncias nas cromatoplasmas, procedeu-se a revelação com solução de vanilina (5 g) em ácido perclórico (0,75 mol/L) em etanol (C₂H₅O, 100 mL), seguida de aquecimento a 100 °C com pistola aquecedora da marca Dekel®, modelo DK1060, por aproximadamente 1 min.

5.5 Preparações dos acetados racêmicos de alquilcarbinóis

A reação de *O*-acetilação ocorreu em um balão de 15 mL, contendo 50 mg do *rac*-alquilcarbinol (1 eq.) dissolvido em 2 mL de CH₂Cl₂, numa concentração final de 0,1 mol/L. Em seguida, adicionaram-se 10 eq. de anidrido acético (190 µL, 2,0 mmol) e 1 eq. de DMAP (24 mg, 0,20 mmol). A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente (aproximadamente 30 °C) por 10 min. Após evaporação do solvente, o produto bruto foi purificado utilizando uma coluna cromatográfica com gel de sílica, tendo como fase móvel a mistura hexano:CH₂Cl₂ (1:1). Os rendimentos para os produtos *rac*-2-Ac, *rac*-3-Ac, *rac*-4-Ac, *rac*-5-Ac e *rac*-6-Ac foram de 85%, 79%, 81%, 74% e 90%, respectivamente.

5.6 Procedimentos gerais para as resoluções cinéticas enzimáticas

5.6.1 Triagem de lipases comerciais na RCE de *rac*-2-Ac e *rac*-6-Ac

Em um *vial* de 2 mL, dissolveu-se 1 eq. (5 mg, 0,018 mmol) do acetato de alquilcarbinol racêmico em 144 µL de MeCN e 36 µL de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7) na proporção 80/20 (v/v) e, por último, adicionou-se a lipase em uma proporção lipase:substrato (m:m) de 2:1 (10 mg da lipase). A reação foi realizada a 30 °C por 48 h, com

uma rotação de 250 rpm em *shaker*. Posteriormente, separou-se a enzima do meio por filtração simples e realizou-se a extração do produto com AcOEt (3 x 5 mL). A fase orgânica foi tratada com Na₂SO₄ anidro e após filtração simples, o solvente foi evaporado à pressão reduzida. O produto bruto foi analisado por CG-DIC na concentração de 1 mg da amostra em 1 mL de AcOEt grau CLAE.

5.6.2 Resolução cinética enzimática do *rac-2-Ac*

Em um Erlenmeyer de 10 mL, adicionaram-se 90 mg (0,35 mmol) de *rac-2-Ac* e 0,7 mL de MeCN (co-solvente), seguidos de 2,8 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7), razão 80:20 (v/v) solvente:co-solvente. Em seguida, adicionou-se 180 mg da lipase de *Candida antarctica* B, em uma razão 2:1 (m:m) em relação ao substrato. Manteve-se a reação sob agitação (250 rpm) a 30 °C durante 48 h. Após filtração da enzima, o produto foi extraído com AcOEt (3 x 5 mL) e a fase orgânica foi tratada com Na₂SO₄. Após filtração e evaporação do solvente, o produto bruto foi purificado por cromatografia em gel de sílica usando como eluente hexano:CH₂Cl₂ (7:3), levando a obtenção de (*R*)-**2** (34 mg, 40% de rendimento; *e.e.* >99%) e de (*S*)-**2-Ac** (36 mg, 40% de rendimento; *e.e.* >99%).

5.6.2.1 Hidrólise química do (*S*)-**2-Ac**

O acetato (*S*)-**2-Ac** (10,5 mg, 0,036 mmol) foi dissolvido em metanol (MeOH) (250 µL) e carbonato de potássio (K₂CO₃) (5 mg, 1 eq.). A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente. Após 2 h, a CCD mostrou um consumo completo do material de partida. Em seguida, adicionou-se água e a mistura foi extraída com éter dietílico (Et₂O). A fase orgânica foi lavada com uma solução saturada de cloreto de sódio e tratada com sulfito de sódio (Na₂SO₃) anidro, filtrada e concentrada até a *secura* sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia flash em gel de sílica utilizando como eluente éter de petróleo/Et₂O (90:10), levando a 7,9 mg do álcool (*S*)-**2**, correspondendo a 88% de rendimento (BOURKHIS *et al.*, 2018).

5.6.3 Resolução cinética enzimática do *rac-3-Ac*

Em um Erlenmeyer de 10 mL, adicionaram-se 49 mg (0,171 mmol) de *rac-3-Ac* e 343 µL de MeCN (co-solvente), seguidos de 1,37 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7), razão 80:20 (v/v) tampão:co-solvente. Em seguida, adicionou-se 98 mg da lipase de *Candida antarctica* B, em uma razão 2:1 (m:m) em relação ao substrato. A reação foi mantida

sob agitação (250 rpm) em *shaker* a 25 °C durante 3 h. Após filtração da enzima, o produto foi extraído com AcOEt (3 x 5 mL) e a fase orgânica foi tratada com Na₂SO₄ anidro. Após filtração e evaporação do solvente, o produto bruto foi purificado por cromatografia em gel de sílica usando como eluente hexano:CH₂Cl₂ (6:4), levando a obtenção de (*R*)-**3** (18 mg, 44% de rendimento; *e.e.* 96%) e de (*S*)-**3-Ac** (23 mg, 47% de rendimento; *e.e.* 95%).

5.6.3.1 Hidrólise enzimática do (*S*)-**3-Ac**

Em um Erlenmeyer de 1 mL, adicionaram-se 19,4 mg (0,0678 mmol) do (*S*)-**3-Ac** e 136 µL de THF (co-solvente), seguidos de 543 µL de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7), razão 80:20 (v/v) tampão:co-solvente. Em seguida, adicionou-se 78 mg da lipase de *Candida antarctica* B, em uma razão 4:1 (m:m) em relação ao substrato. A reação foi agitada durante 68 h a 40 °C, seguido de filtração para remoção da enzima. O produto foi extraído com AcOEt (3 x 5 mL) e a fase orgânica foi tratada com Na₂SO₄ anidro. Após filtração e evaporação do solvente a pressão reduzida, o produto foi purificado por cromatografia em gel de sílica usando como eluente hexano:CH₂Cl₂ (6:4), levando a obtenção de (*S*)-**3** (12,7 mg, *e.e.* 95%) com rendimento de 77%.

5.6.4 Resolução cinética enzimática do *rac*-**4-Ac**

Em um Erlenmeyer de 5 mL adicionaram-se 47,5 mg (0,163 mmol) de *rac*-**4-Ac** e 325 µL de MeCN (co-solvente), seguidos de 1,3 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7), razão 80:20 (v/v) tampão:co-solvente. Em seguida, adicionou-se 95 mg da lipase de *Candida antarctica* B, em uma razão 2:1 (m:m) em relação ao substrato. Manteve-se a reação sob agitação (250 rpm) a 25 °C durante 3 h. Após filtração da enzima, o produto foi extraído com AcOEt (3 x 5 mL) e a fase orgânica foi tratada com Na₂SO₄ anidro. Após filtração e evaporação do solvente, o produto bruto foi purificado por cromatografia em gel de sílica usando como eluente hexano:CH₂Cl₂ (7:3), levando a obtenção de (*R*)-**4** (21 mg, 52% de rendimento; *e.e.* 97%) e de (*S*)-**4-Ac** (20 mg, 42% de rendimento; *e.e.* 95%).

5.6.4.1 Síntese do (*R*)-**4-Ac**

Em um balão de 5 mL adicionou-se 6,5 mg (0,03 mmol) de (*R*)-**4** dissolvido em 1 mL de CH₂Cl₂, concentração 0,1 mol/L. Em seguida acrescentou-se anidrido acético (25 µl, 0,3 mmol, 10 eq.) e DMAP (3 mg, 0,03 mmol, 1 eq.). Após 10 min, evaporou-se o solvente sob pressão reduzida e purificou-se o produto bruto por cromatografia em gel de sílica,

utilizando como eluente hexano:CH₂Cl₂, 7:3, levando a obtenção de (*R*)-**4-Ac** (5,5 mg, 72% de rendimento, *e.e.* 97%).

5.6.4.2 Hidrólise enzimática de (*S*)-**4-Ac**

Em um Erlenmeyer de 1 mL adicionaram-se 20,4 mg (0,0675 mmol) de (*S*)-**4-Ac** e 137 µL de THF (co-solvente), seguidos de 548 µL de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7), razão 80:20 (v/v) tampão:co-solvente. Em seguida, adicionou-se 78 mg da lipase de *Candida antarctica* B, em uma razão 5:1 (m:m), em relação ao substrato. A reação foi agitada durante 120 h a 40 °C, seguido de filtração para remoção da enzima. O produto foi extraído com AcOEt (3 x 5 mL) e a fase orgânica foi tratada com Na₂SO₄ anidro. Após filtração e evaporação do solvente sob pressão reduzida, o produto bruto foi purificado por cromatografia em gel de sílica usando como eluente hexano:CH₂Cl₂ (7:3), levando a obtenção de (*S*)-**4** (13,7 mg, *e.e.* 95%) com rendimento de 80%.

5.6.5 Resolução cinética enzimática de *rac*-**5-Ac**

Em um Erlenmeyer de 10 mL adicionaram-se 20 mg (0,068 mmol) de *rac*-**5-Ac** e 136 µL de MeCN (co-solvente), seguidos de 544 µL de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7), razão 80:20 (v/v) tampão:co-solvente. Em seguida, adicionou-se 40 mg da lipase de *Candida antarctica* B, em uma razão 2:1 (m:m) em relação ao substrato. A reação foi mantida sob agitação (250 rpm) a 25 °C durante 5 h. Após filtração da enzima, o produto foi extraído com AcOEt (3 x 5 mL) e a fase orgânica foi tratada com Na₂SO₄. Após filtração e evaporação do solvente, o produto bruto foi purificado por cromatografia em gel de sílica usando como eluente hexano:CH₂Cl₂ (1:1), levando a obtenção de (*R*)-**5** (8,2 mg, 48% de rendimento; *e.e.* 96%) e de (*S*)-**5-Ac** (7,5 mg, 39.5% de rendimento; *e.e.* 96%).

5.6.5.1 Hidrólise de (*S*)-**5-Ac**

Em um Erlenmeyer de 1 mL adicionaram-se 7,5 mg (0,026 mmol) de (*S*)-**5-Ac** e 52 µL de MeCN (co-solvente), seguidos de 208 µL de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7), razão 80:20 (v/v) tampão:co-solvente. Em seguida, adicionou-se 30 mg da lipase de *Candida antarctica* B, em uma razão 4:1 (m:m) em relação ao substrato. A reação foi agitada durante 96 h a 40 °C, seguido de filtração para remoção da enzima. O produto foi extraído com AcOEt (3 x 1 mL) e a fase orgânica foi tratada com Na₂SO₄. Após filtração e evaporação do solvente, o produto bruto foi purificado por cromatografia em gel de sílica usando como

eluente hexano:CH₂Cl₂ (1:1), levando a obtenção de (*S*)-**5** (3,8 mg, *e.e.* 96%) com rendimento de 57,5% e de (*S*)-**5-Ac** (2,3 mg, *e.e.* 96%) com rendimento de 30,7%.

5.6.6 Resolução cinética enzimática de *rac*-**6-Ac**

Em um Erlenmeyer de 10 mL adicionaram-se 30 mg (0,108 mmol) de *rac*-**6-Ac** e 216 µL de THF (co-solvente), seguidos de 864 µL de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7), razão 80:20 (v/v) tampão:co-solvente. Em seguida, adicionou-se 60 mg da lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em imobead 150 em uma razão 2:1 (m:m) em relação ao substrato. A reação foi mantida sob agitação (250 rpm) a 40 °C durante 24 h. Após filtração da enzima, o produto foi extraído com AcOEt (3 x 5 mL) e a fase orgânica foi tratada com Na₂SO₄ anidro. Após filtração e evaporação do solvente, o produto bruto foi purificado por cromatografia em gel de sílica usando como eluente hexano:CH₂Cl₂ (1:1), levando a obtenção de (*R*)-**6** (14 mg, 41% de rendimento; *e.e.* >99%) e de (*S*)-**6-Ac** (15 mg, 48% de rendimento; *e.e.* >99%).

5.6.6.1 Hidrólise enzimática de (*S*)-**6-Ac**

Em um Erlenmeyer de 10 mL adicionaram-se 29 mg (0,104 mmol) de (*S*)-**6-Ac** e 208 µL de MeCN (co-solvente), seguidos de 832 µL de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7), razão 80:20 (v/v) tampão:co-solvente. Em seguida, adicionou-se 87 mg da lipase de *Candida rugosa*, em uma razão 3:1 (m:m) em relação ao substrato. A reação foi agitada durante 96 h a 30 °C, seguido de filtração para remoção da enzima. O produto foi extraído com AcOEt (3 x 5 mL) e a fase orgânica foi tratada com Na₂SO₄. Após filtração e evaporação do solvente sob pressão reduzida, o produto bruto foi purificado por cromatografia em gel de sílica usando como eluente hexano:CH₂Cl₂ (1:1), levando a obtenção de (*S*)-**6** (13 mg, *e.e.* > 99%) com rendimento de 53% e de (*S*)-**6-Ac** (11.1 mg, *e.e.* >99%) com rendimento de 38.4%.

5.7 Cálculo do excesso enantiomérico, da conversão e da enantiosseletividade

Os cálculos dos excessos enantioméricos de substrato remanescente e produto nas resoluções cinéticas, *via* hidrólise, dos acetatos de alquilcarbinóis racêmicos foram realizados através das análises dos cromatogramas obtidos por CG-DIC, de acordo com a **Equação 1**.

Equação 1. Equação empregada no cálculo de excesso enantiomérico (*e.e.*).

$$e.e.(%) = \frac{\text{área do enantiômero majoritário} - \text{área do enantiômero minoritário}}{\text{área do enantiômero majoritário} + \text{área do enantiômero minoritário}} \times 100\%$$

As conversões nas reações de resolução cinética enzimática foram calculadas através da **Equação 2**.

Equação 2. Equação empregada no cálculo de conversão (*c*) para reações de resolução cinética enzimática.

$$c(\%) = \frac{e.e.s}{e.e.s + e.e.p} \times 100\%$$

Os resultados de enantiosseletividade (*E*) foram calculados através da **Equação 3**.

Equação 3. Equação empregada no cálculo da enantiosseletividade (*E*).

$$E = \frac{\ln[1 - c(1 + e.e.p)]}{\ln[1 - c(1 - e.e.p)]}$$

5.8 Dados físicos e espectrométricos

rac-2-Ac: Óleo amarelo (70% Hexano/CH₂Cl₂) Rf 0,5. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6,02 (q, *J* 2,1 Hz, 1H); 2,54 (d, *J* 2,4 Hz, 1H); 2,22 (td, *J* 6,9 e 2,1 Hz, 2H); 2,13 (s, 3H); 1,62 – 1,46 (m, 2H); 1,42-1,22 (m, 20H); 0,88 (t, *J* 6,6 Hz, 3H). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): (CO) 169,13; (C≡C) 87,12; (C≡C) 78,17; (C≡C) 73,55; (C≡C) 72,94; (CH-OH) 52,22; (10 CH₂) 31,90; 29,64; 29,62; 29,58; 29,46; 29,33; 29,05; 28,81; 28,10; 22,67; (COOCH₃) 20,81; (CH₂) 18,68; (CH₃) 14,10. HRMS-DCI (CH₄) *m/z* [M+H]⁺ calculado C₁₉H₃₁O₂: 291,2324, encontrado: 291,2338. (*S*)-**2-Ac:** [α]_D²⁰ = -17,2 (c 1,6, CHCl₃) (BOURKHIS *et al.*, 2018).

rac-3-Ac: Óleo amarelo (60% Hexano/CH₂Cl₂) Rf 0,6. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6,08-6,05 (m, 1H); 2,57 (d, *J* 2,4 Hz, 1H); 2,28 (td, *J* 7,0 e 0,8 Hz, 2H); 2,12 (s, 3H); 1,58 – 1,45 (m, 2H); 1,42-1,22 (m, 14 H); 0,88 (t, *J* 6,8 Hz, 3H). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): (CO) 168,89; (C≡C) 83,63; (C≡C) 73,98; (C≡C) 70,78; (C≡C) 67,79; (C≡C) 63,90; (CH-OH) 53,10; (8 CH₂) 31,86; 29,52; 29,42; 29,27; 29,02; 28,78; 27,93; 22,65; (COOCH₃)

20,64; (CH₂) 19,23; (CH₃) 14,09. HRMS m/z [M]⁺ calculado C₁₉H₂₆O₂: 286,1933, encontrado: 286,1942. (*S*)-**3-Ac**: [α]_D²⁰ = 45,49 (c 0,6, CHCl₃) (BOURKHIS *et al.*, 2018).

rac-**4-Ac**: Óleo (50% Hexano/CH₂Cl₂) Rf 0,5. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5,96 – 5,84 (m, 2H); 5,54 (d, *J* 2,4 Hz, 1H); 5,30 (d, *J* 2,4 Hz, 1H); 2,25 (td, *J* 6,9 e 2,1 Hz, 2H); 2,10 (s, 3H); 1,55-1,45 (m, 2H); 1,39-1,33 (m, 18H); 0,88 (t, *J* 6,6 Hz, 3H). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (CO) 169,99, (C=C) 133,81, (C=C) 118,66, (C≡C) 88,55, (C≡C) 75,56, (CH-OH) 65,66, (9 CH₂) 32,13, 29,87, 29,85, 29,82, 29,71, 29,56, 29,30, 29,07, 28,65, (COOCH₃) 21,32, (CH₂) 18,99, (CH₃) 14,32. HRMS m/z [M+H]⁺: calculado C₁₉H₃₃O₂: 293,2481, encontrado: 293,2481.

rac-**5-Ac**: Óleo (50% Hexano/CH₂Cl₂) Rf 0,6. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5,32-5,29 (td, *J* 7,0 e 0,8 Hz, 2H); 2,41 (d, *J* 2,4 Hz, 1H); 2,05 (s, 3H); 1,74-1,72 (m, 2H); 1,26 (m, 24 H); 0,85 (t, *J* 6,8 Hz, 3H). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): (CO) 170,20; (C≡C) 81,57; (C≡C) 73,59; (CH-OH) 64,12; (12 CH₂) 34,85; 32,14; 29,91; 29,89; 29,87; 29,83; 29,74; 29,65; 29,57; 29,30; 25,10; 22,87; (COOCH₃) 21,21; (CH₃) 14,33. HRMS m/z [M+H]⁺: calculado C₁₉H₃₄O₂: 294,2559, encontrado: 294,2565.

rac-**6-Ac**: Óleo amarelo (50% Hexano/CH₂Cl₂) Rf 0,5. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,08 (s, 21 H); 2,13 (s, 3H); 2,54 (d, *J* 2,4 Hz, 1H); 6,05 (d, *J* 2,4 Hz, 1H); RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 11,2; 18,6; 20,9; 53,3; 73,3; 77,9; 88,1; 99,8; 169,1. HRMS-DCI (CH₄) m/z [M+C₂H₅-EtOAc]⁺ calculado C₁₄H₂₃Si: 219,1563, encontrado: 219,1570 (LISTUNOV *et al.*, 2018).

6 CONCLUSÃO

O estudo de resolução cinética enzimática de alquilcarbinóis, *via* hidrólise, catalisada por lipase foi realizado com cinco substratos, sendo quatro de cadeias carbônicas longas (17 átomos de carbono) e um com 5 carbonos na cadeia. Através da variação de parâmetros reacionais tais como co-solvente, relação enzima:substrato (m:m), tempo e temperatura reacional foi possível estabelecer as melhores condições para a obtenção dos álcoois enantiomericamente puros (**2** e **6**) e enantioenriquecidos (**3**, **4** e **5**). Exceto para **6**, que foi idealmente resolvido com a lipase *T. lanuginosus* imobilizada em imobead-150 (TLL), todos os outros substratos foram resolvidos mais eficientemente na presença da lipase *C. antarctica* B imobilizada em resina acrílica (CAL-B).

Portanto, as resoluções cinéticas de acetatos de alquilcarbinol racêmicos (*rac*-**2-6-Ac**) mediadas por lipases, por meio de abordagem hidrolítica, produziram tanto (*R*)-álcoois quanto os (*S*)-acetatos em altos valores de excesso enantiomérico (*e.e.* 95 a > 99%), conversões ideais (*c*= 50%) e enantiosseletividades (*E* > 200). Ressalta-se que a lipase de *C. antarctica* B imobilizada em resina acrílica provou ser um biocatalisador robusto na RCE de *rac*-**2-5-Ac** em meio tampão (pH 7,0) e MeCN. No caso do *rac*-**6-Ac**, o uso de THF como co-solvente foi um requisito fundamental para a eficiência do processo.

Vale ressaltar que para *rac*-**6-Ac**, a lipase de *T. lanuginosus* imobilizada em imobead-150 foi eficiente em catalisar a resolução cinética ideal (*e.e.*_s e *e.e.*_p > 99%; *c*= 50% e *E*> 200) somente quando 20% THF foi adicionado ao meio tamponado. Conseqüentemente, o uso de co-solventes em alguns casos pode ser uma estratégia poderosa para ajustar a enantiosseletividade da lipase.

Por fim, destaca-se a capacidade da CAL-B em hidrolisar (*S*)-**3-Ac**, (*S*)-**4-Ac** e (*S*)-**5-Ac** e da lipase de *C. rugosa* em hidrolisar (*S*)-**6-Ac**, nos correspondentes (*S*)-álcoois, com manutenção da pureza enantiomérica. Cabe ressaltar que todos os resultados apresentados nesse estudo são significativamente superiores aos reportados na literatura na preparação dos mesmos compostos *via* síntese assimétrica (**2-5**) ou biocatalítica (**6**).

Portanto o estudo da RCE desses acetatos de alquinilcarbinol racêmicos gerou duas publicações. Uma parte da RCE dos compostos *rac-2-Ac* e *rac-3-Ac* e a atividade citotóxica dos compostos (*R* e *S*) enantiomericamente puros ou enantioenriquecidos foram publicados no artigo: “Skeletal Optimization of Cytotoxic Lipidic Dialkynylcarbinols” (BOURKHIS *et al.*, 2018), publicado no periódico *ChemMedChem* (DOI: 10.1002/cmdc.201800118). A continuação do estudo de RCE dos compostos *rac-2-Ac* e *rac-3-Ac* e o estudo de RCE dos compostos *rac-5-Ac* e *rac-6-Ac* foram publicados no artigo: “Lipase-catalysed enantioselective kinetic resolution of *rac*-lipidic alkynylcarbinols and a C5 synthon thereof *via* a hydrolysis approach” (ALMEIDA *et al.*, 2020), publicado no periódico *Molecular Catalysis* (DOI: 10.1016/j.mcat.2020.110926).

REFERÊNCIAS

- ABAD, J-L.; SOLDEVILA, C.; CAMPS, F.; CLAPÉS P. Novel Chemoenzymatic Strategy for the Synthesis of Enantiomerically Pure Secondary Alcohols with Sterically Similar Substituents. **Journal of Organic Chemistry**, v. 68, p. 5351-5356, 2003.
- ALMEIDA, D. K. C.; SILVA, M. R.; MATTOS, M. C.; NUNES, F. M.; BALLEREAU, S.; GÉNISSON, Y.; MARAVAL, V.; CHAUVIN, R.; OLIVEIRA, M. C. F. Lipase-catalysed enantioselective kinetic resolution of rac-lipidic alkynylcarbinols and a C5 synthon thereof via a hydrolysis approach. **Molecular Catalysis**, v. 488, p. 110926, 2020.
- ARFAOUI, E. D.; GENISSON, Y.; LISTUNOV, D.; FABING, I.; OUKESSOU, M.; FRONGIA, C.; LOBJOIS, V.; SAMSON, A.; AUSSEIL, F.; BEN-TAMA, A.; EL HADRAMI, E. M.; CHAUVIN, R. Identification of chiral alkenyl- and alkynylcarbinols as pharmacophores for potent cytotoxicity. **ChemMedChem**, v. 8, p. 1779-1786, 2013.
- ATANASOV, A. G.; BLUNDER, M.; FAKHRUDIN, N.; LIU, X.; NOHA, S. M.; MALAINER, C.; KRAMER, M. P.; COCIC, A.; KUNERT, O.; SCHINKOVITZ, A.; HEISS, E. H.; SCHUSTER, D.; DIRSCH, V. M.; BAUER, R. Polyacetylenes from *Notopterygium incisum*—New Selective Partial Agonists of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma. **PlosOne**, v. 8, p. 1-9, 2013.
- BANDEIRA, P. T.; THOMAS, J. C.; OLIVEIRA, A. R. M.; PIOVAN, L. Lipase-mediated kinetic resolution: An introductory approach to practical biocatalysis. **Journal of Chemical Education**, v. 94, n. 6, p. 800-805, 2017.
- BEZBORODOV, A. M.; ZAGUSTINA, N. A. Enzymatic Biocatalysis in Chemical Synthesis of Pharmaceuticals. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 52, p. 237-249, 2016.
- BIROLI, W. G.; FERREIRA, I. M.; ALVARENGA, N.; SANTOS, D. A.; MATOS, I. L.; COMASSETO, J. V.; PORTO, A. L. M. Biocatalysis and biotransformation in Brazil: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 481-510, 2015.
- BHARDWAJ, K. K.; GUPTA, R. Synthesis of chirally pure enantiomers by lipase. **Journal of Oleo Science**, v. 66, p. 1073-1084, 2017.
- BOURKHIS, M.; ALMEIDA, D. K. C.; GASPARD, H.; RULLIERE, P.; LISTUNOV, D.; JOLY, E.; ABDERRAHIM, R.; MATTOS, M. C.; OLIVEIRA, M. C. F.; MARAVAL, V.; CHAUVIN, R.; GÉNISSON, Y. Skeletal optimization of cytotoxic lipidic dialkynylcarbinols. **ChemMedChem**, v. 13, p. 1124-1130, 2018.
- BRABCOVA, J.; FILICE, M.; GUTARRA, M.; PALOMO, J. M. Synthesis of enantiopure drugs and use of intermediary drugs by lipase immobilized catalysis. **Current Bioactive Compounds**, v. 9, p.113-136, 2013.
- BROOS, J. Impact of the enzyme flexibility on the enzyme enantio-selectivity in organic media towards specific and non-specific substrates. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 20, n. 4, p. 291-295, 2002.

CARREIRA, E. M. The Discovery of novel reactivity in the development of C-C bond-forming reactions: in situ generation of zinc acetylides with Zn^{II}/R_3N . **Accounts of Chemical Research**, v. 33, p. 373-381, 2000.

CARVALHO, A. C. L.; FONSECA, T. S.; MATTOS, M. C.; OLIVEIRA, M. C. F.; LEMOS, T. L. G.; MOLINARI, F.; ROMANO, D.; SERRA, I. Review: Recent advances in lipase-mediated preparation of pharmaceuticals and their intermediates. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 29682-29716, 2015.

CARVALHO, A. C. L. M. **Síntese quimioenzimática de antiarrítmicos: (r)-mexiletina e análogos**. 2017. Tese (Doutorado em Química) Centro de ciências exatas-Departamento de Química Orgânica e Inorgânica. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

CHEN, P.; ZHU, X.; Kinetic resolution of propargylic alcohols *via* stereoselective acylation catalyzed by lipase PS-30. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 97, p. 184-188, 2013.

CHEN, B.; LIU, Z.; ZHANG, Y.; LI, W.; SUN, Y.; WANG, Y.; WANG, Y.; SUN, Y. Application of high-speed counter-current chromatography and HPLC to separate and purify of three polyacetylenes from *Platycodon grandiflorum*. **Journal Separation Science**, v. 41, p. 789-796, 2017.

CHOI, J. M.; HAN, S. S.; KIM, H. S. Review: Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1443-1454, 2015.

CHOI, Y. W.; VENKATESAN, T.; JENNIFER LEE, J.; KIM, Y. K. Falcarindiol inhibits LPS-induced inflammation via attenuating MAPK and JAK-STAT signaling pathways in murine macrophage RAW 264.7 cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 445, p. 169-178, 2018.

FABER, K.; **Biotransformations in Organic Chemistry**, Springer-Verlag, Berlin, 6 th ed., 2011.

FERREIRA, J. G.; PRINCIVAL, C. R.; OLIVEIRA, D. M.; NASCIMENTO, R. X.; PRINCIVAL, J. L. Enzymatic kinetic resolution of internal propargylic diols. Part I: a new approach for the synthesis of (*S*)-pent-2-yn-1,4-diol, a natural product from *Clitocybe catinus*. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 13, p. 6458-6462, 2015.

FONSECA, T. S. **Sínteses quimioenzimáticas dos fármacos (R)-luliconazol, (R)-clorprenalina e análogos e síntese química de substâncias imidazólicas**. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

FONSECA, T. S.; LIMA, L. D.; OLIVEIRA, M. C. F.; LEMOS T. L. G.; ZAMPIERI, D.; MOLINARI, F.; MATTOS, M. C. Chemoenzymatic synthesis of luliconazole mediated by lipases. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2018, p. 2110-2116, 2018.

GHANEM, A.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Application of lipases in kinetic resolution of racemates. **Chirality**, v.17, p. 1-15, 2005.

GOTOR-FERNANDES, V.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, p.111-120, 2006.

HERNÁNDEZ, J. G.; FRINGS, M.; BOLM, C. Mechanochemical Enzymatic Kinetic Resolution of Secondary Alcohols under Ball-Milling Conditions. **ChemCatChem**, v. 8, p. 1769-1772, 2016.

HUANG, S. H.; LI, W.; CHEN, L.; XU, J.; HONG, R. Chemoenzymatic construction of chiral alkenyl acetylenic alcohol, a key building block to access diastereoisomers of polyacetylenes. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 6, p. 2-7, 2015.

KAZLAUSKAS, R. J.; WEISSFLOCH, A. N. E.; RAPPAPORT, A. T.; CUCCIA, L. A. C. A Rule To predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 56, p. 2656-2665, 1991.

KIM, C.; LEE, J.; CHO, J.; OH, Y.; CHOI, Y. K.; CHOI, E.; PARK, J.; KIM, M.-J. Kinetic and dynamic kinetic resolution of secondary alcohols with ionic-surfactant-coated *Burkholderia cepacia* lipase: Substrate scope and enantioselectivity. **The Journal of organic chemistry**, v. 78, p. 2571-2578, 2013.

LI, H. J.; CHEN, T.; XIE, Y. L.; CHEN, W. D.; ZHU, X. F.; LAN, W. J. Isolation and Structural Elucidation of Chondrosterins F–H from the Marine Fungus *Chondrostereum* sp. **Marine Drugs**, v. 11, p. 551-558, 2013.

LIMA, G. V.; SILVA, M. R.; FONSECA, T. S.; LIMA, L. B.; OLIVEIRA, M. C. F.; LEMOS T. L. G.; ZAMPIERI, D.; SANTOS, J. C. S.; RIOS, N. S.; GONÇALVES, L. R. B.; MOLINARI, F.; MATTOS, M. C. Chemoenzymatic synthesis of (*S*)-Pindolol using lipases. **Applied Catalysis A, General**, v. 546, p. 7-14, 2017.

LISTUNOV, D.; MARAVAL, V.; CHAUVIN, R.; GÉNISSON, Y. Review: Chiral alkynylcarbinols from marine sponges: asymmetric synthesis and biological relevance. **Natural Product Reports**, v. 32, p. 49-75. 2015(a).

LISTUNOV, D.; MARAVAL, V.; BILLOT, C.; JOLY, E.; FABING, I.; VOLOVENKO, Y.; GÉNISSON, Y.; CHAUVIN, R. Extended structural modulation of bio-inspired chiral lipidic alkynylcarbinols as antitumor pharmacophores, **Tetrahedron**, v. 71, p. 7920-7930, 2015 (b).

LISTUNOV, D.; JOLY, E.; DUHAYON, C.; MERCERON, N. S.; FABING, I.; GÉNISSON, Y.; MARAVAL, V.; CHAUVIN, R. Methinylogation approach in chiral pharmacophore design: from alkynyl- to allenyl-carbinol warheads against tumor cells. **ChemMedChem**, v. 13, p. 1711-1722, 2018 (a).

LISTUNOV, D.; CHAUVIN, R.; JOLY, E.; RULLIÈRE, P.; GASPARD, H.; GÉNISSON, V. B.; GÉNISSON, Y.; MARAVAL, V. Review: From natural to artificial antitumor lipidic alkynylcarbinols: asymmetric synthesis, enzymatic resolution, and refined SARs. **Synthesis**, v. 50, p. 3114-3130, 2018 (b).

- LIU, Y.; XUE, J.; HAN, J.; H, H.; YUAN, T. Polyacetylenes from the florets of *Carthamus tinctorius* and their cytotoxicity. **Phytochemistry Letters**, v. 23, p. 168-171, 2018.
- MA, S.; WU, B.; JIANG, X. PdCl₂-Catalyzed Efficient Transformation of Propargylic Aminesto (*E*)- α -Chloroalkylidene- β -lactams. **Journal of Organic Chemistry**, v. 70, 2588-2593, 2005.
- McLAUGHLIN, N. P.; BUTLER, E.; EVANS, P.; BRUNTON, N. P.; KOIDIS, A.; RAI, D. K. A short synthesis of (+) and (-) – falcarinol. **Tetrahedron**, v. 66, p. 9681-9687, 2010.
- MINTO, R. E.; BLACKLOCK, B. J. Biosynthesis and function of polyacetylenes and allied natural products. **Progress in Lipid Research**, v. 47, p. 233-306, 2008.
- MURAKAMI, N.; NAKAJIMA, T; KOBAYASHI, M. Total synthesis of lembeyne A, a neuritogenic spongean polyacetylene. **Tetrahedron Letters**, v. 42, p. 1941-1943, 2001.
- NEGRI, R. Polyacetylenes from terrestrial plants and fungi: Recent phytochemical and biological advances. **Fitoterapia**, v. 106, p. 92-109, 2015.
- NICKEL, S.; SERWA, R. A.; KASCHANI, F.; NINCK, S.; ZWEERINK, S.; TATE, E. W.; KAISER, M. Chemoproteomic Evaluation of the Polyacetylene Callyspongynic Acid. **Chemistry: A European Journal**, v. 21, p. 10721-10728, 2015.
- NTUMBA, J. K.; TSHIONGO, C. M.; MIFUNDU, M. N.; ROBIETTE, R.; TABA, K. M. Effective Antimalarial Activities of α -Hydroxy Diynes Isolated from *Ongokea gore*, 2017.
- OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI, S. M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 742-756, 2009.
- ONDEYKA, J. G.; ZINK, D. L.; YOUNG, K.; PAINTER, R.; KODALI, S.; GALGOCI, A.; COLLADO, J.; TORMO, J. R.; BASILIO, A.; VICENTE, F.; WANG, J.; SINHG, S.B. Discovery of bacterial fatty acid synthase inhibitors from a phoma species as antimicrobial agents using a new antisense-based strategy. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 377-380, 2006.
- ORTIZ, C.; FERREIRA, M. L.; BARBOSA, O.; SANTOS, J. C. S.; RODRIGUES R. C.; MURCIA, A. B.; BRIAND, L. E.; LAFUENTE, R. F. **Catalysis Science & Technology**, v. 9, p. 2380-2420, 2019.
- PATEL, R. N. Review: Biocatalysis for synthesis of pharmaceuticals. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, p. 1252-1274, 2018.
- PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A.; Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.
- PINHEIRO, M. P.; RIOS, N. S.; FONSECA, T. S.; BEZERRA, F. A.; CASTELLÓN, E. R.; LAFUENTE, R. F.; MATTOS, M. C.; SANTOS, J. C. S.; GONÇALVES, L. R. B. Kinetic resolution of drug intermediates catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on Immobead-350. **Biotechnology Progress**, v. 34, p. 878-889, 2018.

PRINCIVAL, I. M. R. G.; FERREIRA, J. G.; SILVA, T. G.; AGUIAR, J. S.; PRINCIVAL, J. L. Synthesis and in vitro evaluation of (*R*), (*S*) and (*R/S*)-2-hexyne-1,4-diol, a natural product produced by fungus *Clitocybe catinus*, and related analogs as potential anticancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, p. 2839-2842, 2016.

PU, L.; MOORE, D.; BINOL-catalyzed highly enantioselective terminal alkyne additions to aromatic aldehydes. **Organic Letters**, v. 4, p. 1855-1857, 2002.

RAMINELLI, C.; COMASSETO, J. V.; ANDRADE, L. H.; PORTO, A. L. M. Kinetic resolution of propargylic and allylic alcohols by *Candida antarctica* lipase (Novozym 435®). **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 15, p. 3117-3122, 2004.

RARIY, R. V.; KLIBANOV, A. M. On the relationship between enzymatic enantioselectivity in organic solvents and enzyme flexibility. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 18, n. 5, p. 401-407, 2009.

ROBIC, A.; ULLMANN, C.; AUFRAY, P.; PERSILLON, C.; MARTIN, J. Enzymes for industrial applications. **Oilseeds & fats Crops and Lipids**, v. 24, n. 4, p.1-6, 2017.

ROMARO, D.; BONOMI, F.; MATTOS, M. C.; FONSECA, T. S.; OLIVEIRA, M. C. F.; MOLINARI, F. Review: Esterases as stereoselective biocatalysts. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 547-565, 2015.

ROUGF, A.; TANEJA, S. C. Review: Synthesis of single-enantiomer bioactive molecules: a brief overview. **Chirality**, v. 26, p. 63-78, 2014.

SARAVANAN, T.; JANAA, S.; CHADHA, A. Utilization of whole cell mediated deracemization in a chemoenzymatic synthesis of enantiomerically enriched polycyclic chromeno[4,3-b] pyrrolidines. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 12, p. 4682-4690, 2014.

SEDDIGI, Z. S.; MALIK, M. S.; AHMED, S. A.; BABALGHITH, A. O.; KAMAL, A. Review: Lipases in asymmetric transformations: Recent advances in classical kinetic resolution and lipase–metal combinations for dynamic processes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 348, p. 54-70, 2017.

SHARMA, A.; CHATTOPADHYAY, S. An Efficient Derivation of the Versatile Chiron Antipode 1-*tert*-Butyldimethylsilylpenta-1,4-diyne-3-ol: Application to the Synthesis of (15*E,R,R*)-Duryne. **Journal of Organic Chemistry**, v. 63, p. 6128-6131, 1998.

SIDDIQ, A.; DEMBITSKY, V. Acetylenic Anticancer Agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 132-170, 2008.

SILVA, M. R.; MATTOS, M. C.; OLIVEIRA, M. C. F.; LEMOS T. L. G.; GOTOR, V.; GOTOR-FERNANDEZ, V.; GONZALO, G.; LAVANDERA, I.; RICARDO, N. M. P. S. Asymmetric chemoenzymatic synthesis of *N*-acetyl- α -amino esters based on lipase-catalyzed kinetic resolutions through interesterification reactions. **Tetrahedron**, v. 70, p. 2264-2271, 2014.

STEFANUCCI, A.; DIMMITO, M. P.; ZENGIN, G.; LUISI, G.; MIRZAIE, S.; NOVELLINO, E.; MOLLICA, A. Discovery of novel amide tripeptides as pancreatic Lipase inhibitors by virtual screening. **New Journal of Chemistry**, v. 43, n. 7, p. 3208-3217, 2013.

SUN, H.; ZHANG, H.; ANG, E. L.; ZHAO, H. Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 7, p. 1275-1284, 2018.

THANGARAJ, B.; SOLOMON, P. R. Immobilization of Lipases – A Review Part I: Enzyme Immobilization. **ChemBioEngRev**, v. 6, n. 5, p. 157-166, 2019.

THOMAS, J. C.; ALNOCH, R. C.; COSTA, A. C. S.; BANDEIRA, P. T.; BURICH, M. D.; CAMPOS, S. K.; OLIVEIRA, A. R. M.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; KRIEGER, N.; PIOVAN, L. LipG9-mediated enzymatic kinetic resolution of racemates: Expanding the substrate-scope for a metagenomic lipase. **Molecular Catalysis**, v. 473, p. 110402, 2019

TUYEN, N. Q.; HOA, L. T. P. H.; HUONG, L. T. D. H.; QUANG, D. N. Heptadeca-8-en-4,6-diyne-3,10-diol – a new cytotoxic polyacetylene from vietnamese *Panax stipuleanatus*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 54, p. 156-157, 2018.

TROST, B. M.; WEISS, A. H.; JACOBI VON WANGELIN, A. Dinuclear Zn-catalyzed asymmetric alkynylation of unsaturated aldehydes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, p. 8-9, 2006.

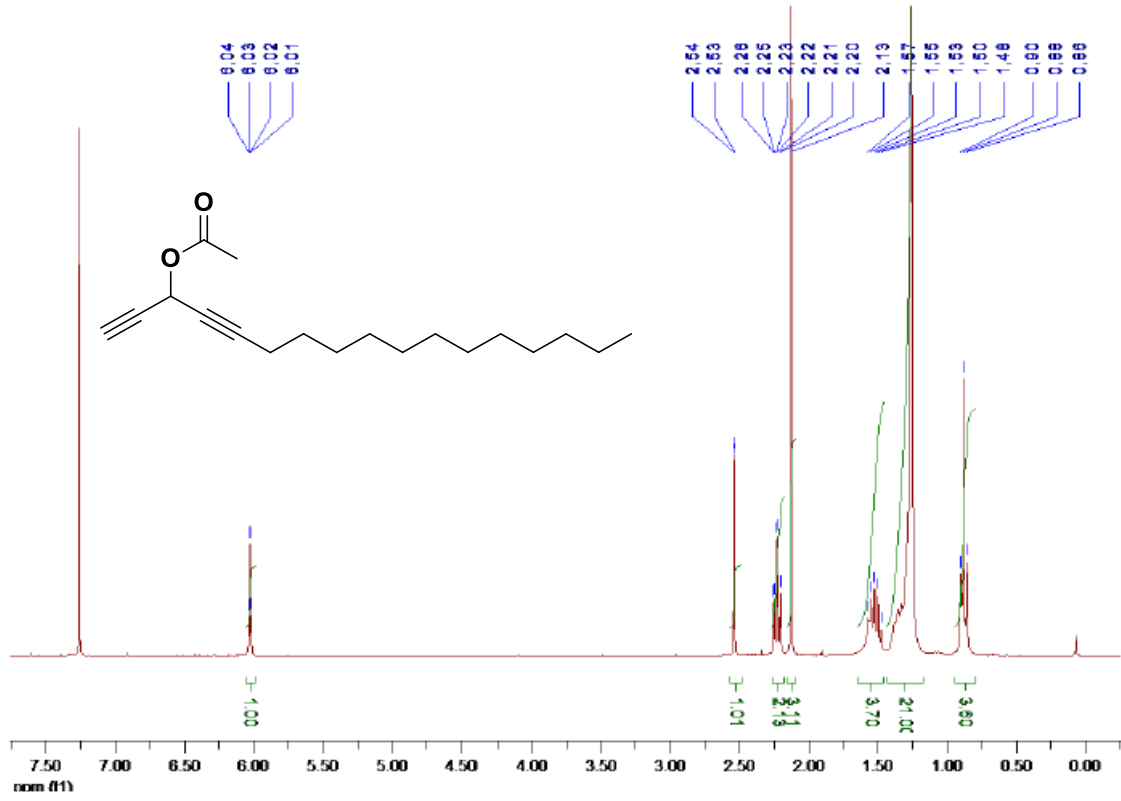
TRUPPO, M. D. Biocatalysis in the Pharmaceutical Industry: The Need for Speed. **Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, p. 476-480, 2017.

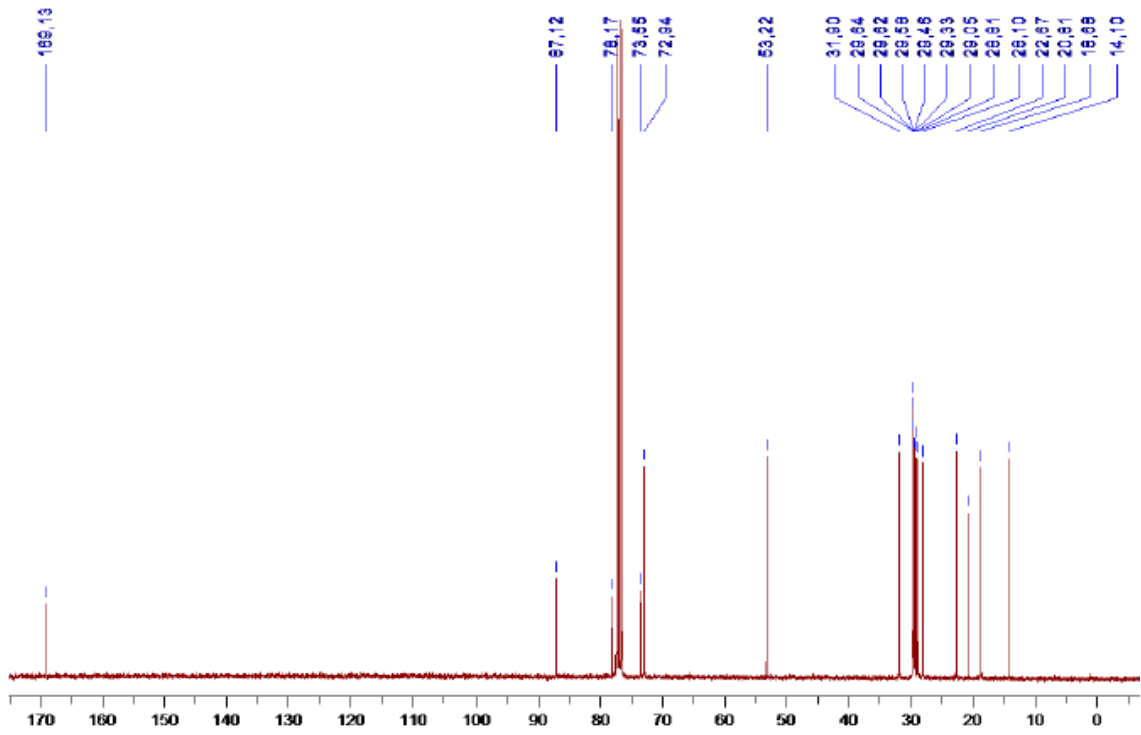
TSOU, C. L. The role of active site flexibility in enzyme catalysis. **Biochemistry**, v. 63, n. 3, p. 253-258, 1998.

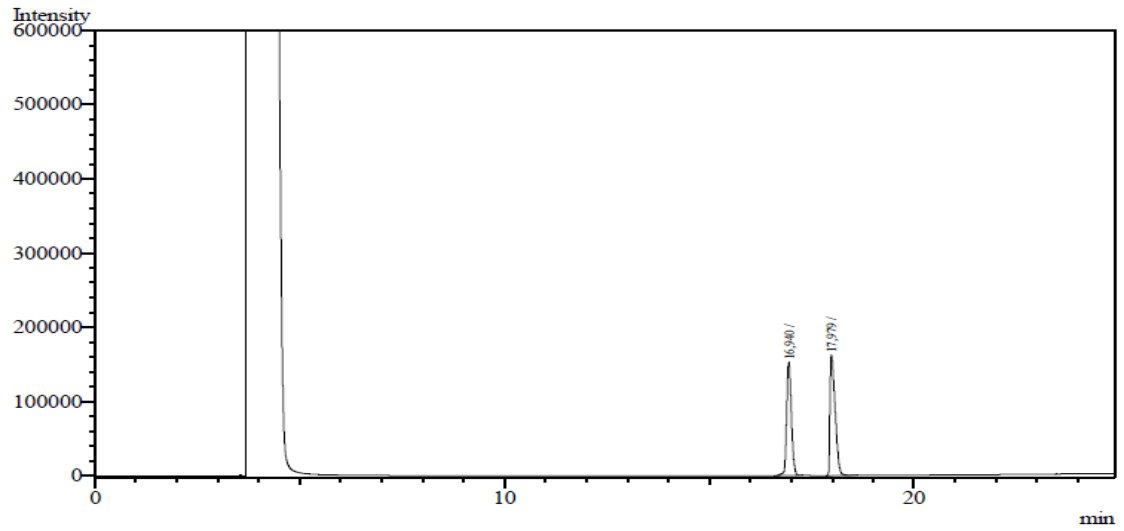
VENKATESAN, T.; CHOI, Y. W.; JENNIFER LEE, J.; KIM, Y. K. Falcarindiol inhibits LPS-induced inflammation via attenuating MAPK and JAK-STAT signaling pathways in murine macrophage RAW 264.7 cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 445, p. 169-178, 2018.

XU, D.; LIB, Z.; MAA, S. Novozym-435-catalyzed enzymatic separation of racemic propargylic alcohols. A facile route to optically active terminal aryl propargylic alcohols. **Tetrahedron Letters**, v. 44, p. 6343-6346, 2003.

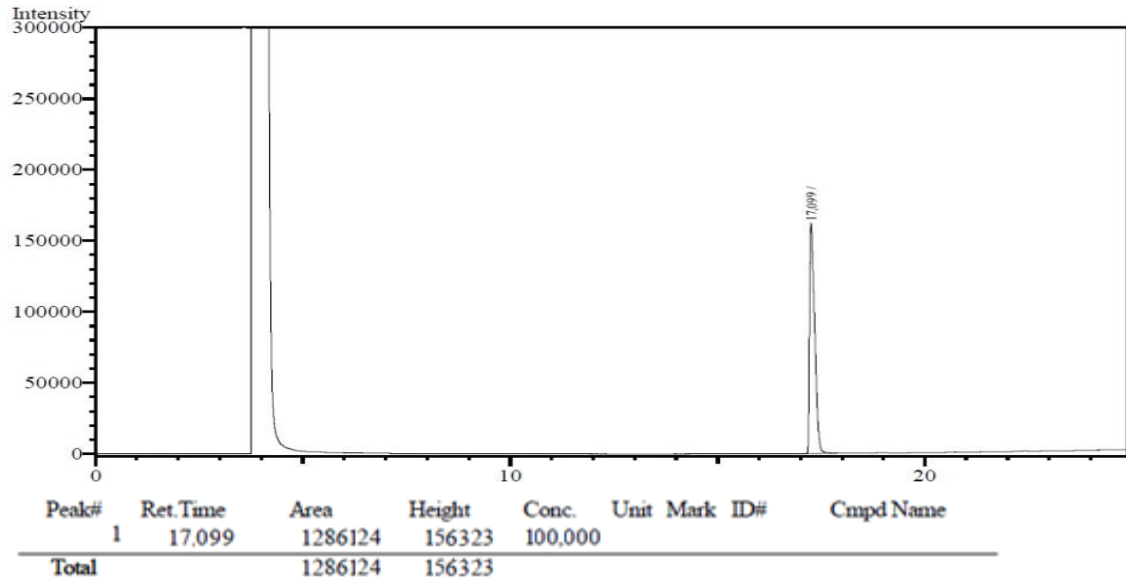
ZHONG, J. C.; LI, Z. Y.; WANG, M.; BIAN, Q. H.; ZHENG, B.; MAO, J. Y.; LI, S. N.; LIU, S. Z.; WANG, M. A.; GUO, H. C. Development of zn-prophenol-catalyzed asymmetric alkyne addition: synthesis of chiral propargylic alcohols. **Chemistry: A European Journal**, v. 18, p. 16498-16509, 2012.

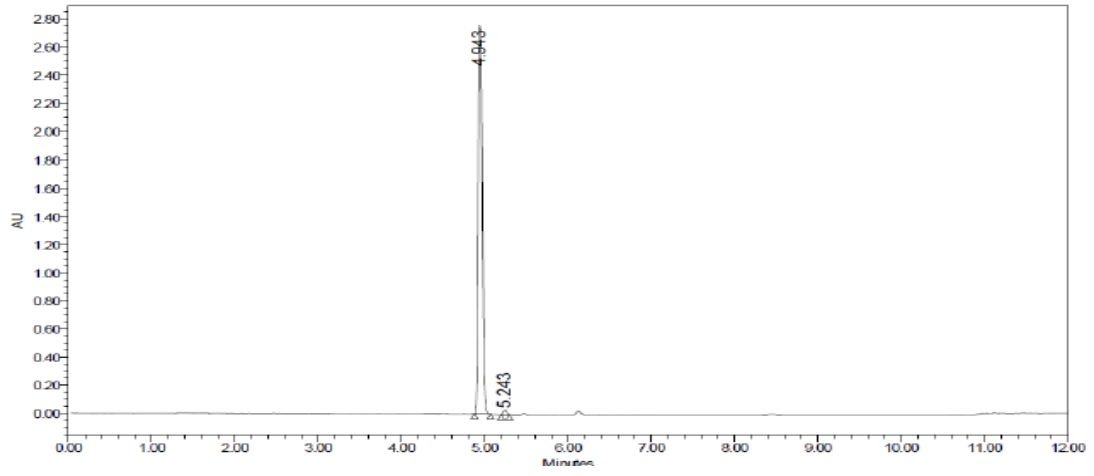
ANEXO A - RMN ^1H DE *rac*-2-Ac (300 MHz, CDCl_3)

ANEXO B - RMN ^{13}C DE *rac*-2-Ac (75 MHz, CDCl_3)

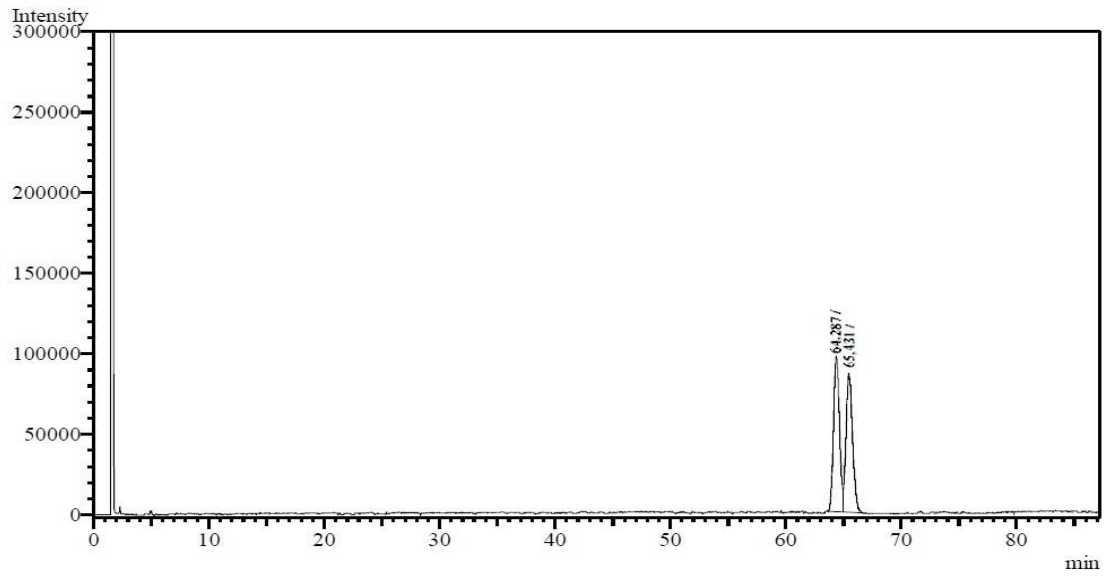
ANEXO C - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC DO *rac-2*

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	16,940	1192963	148052	49,322				
2	17,979	1225761	152123	50,678				
Total		2418724	300175					

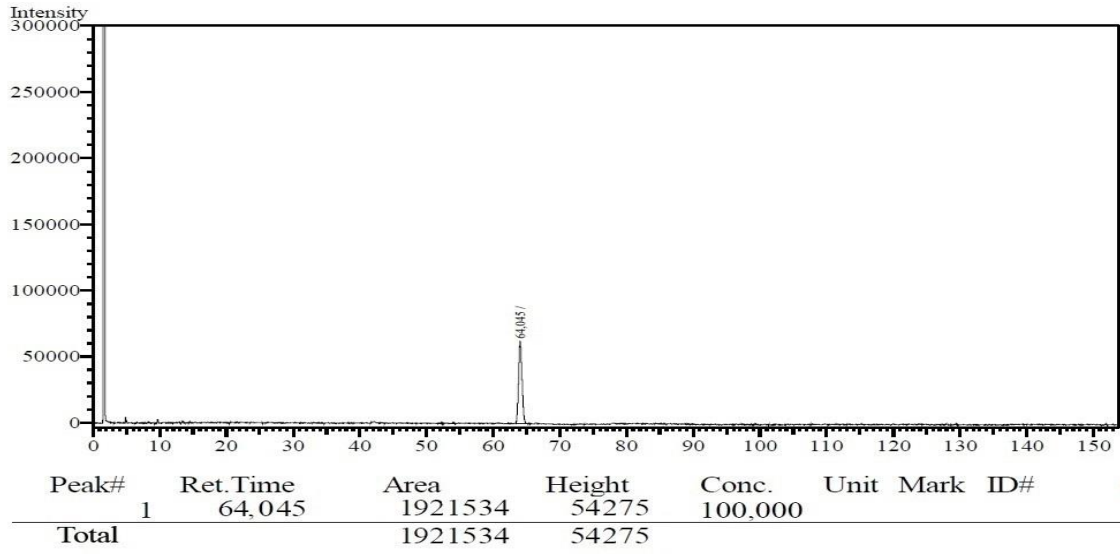
ANEXO D - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC DO (R)-2 (e.e. >99%)

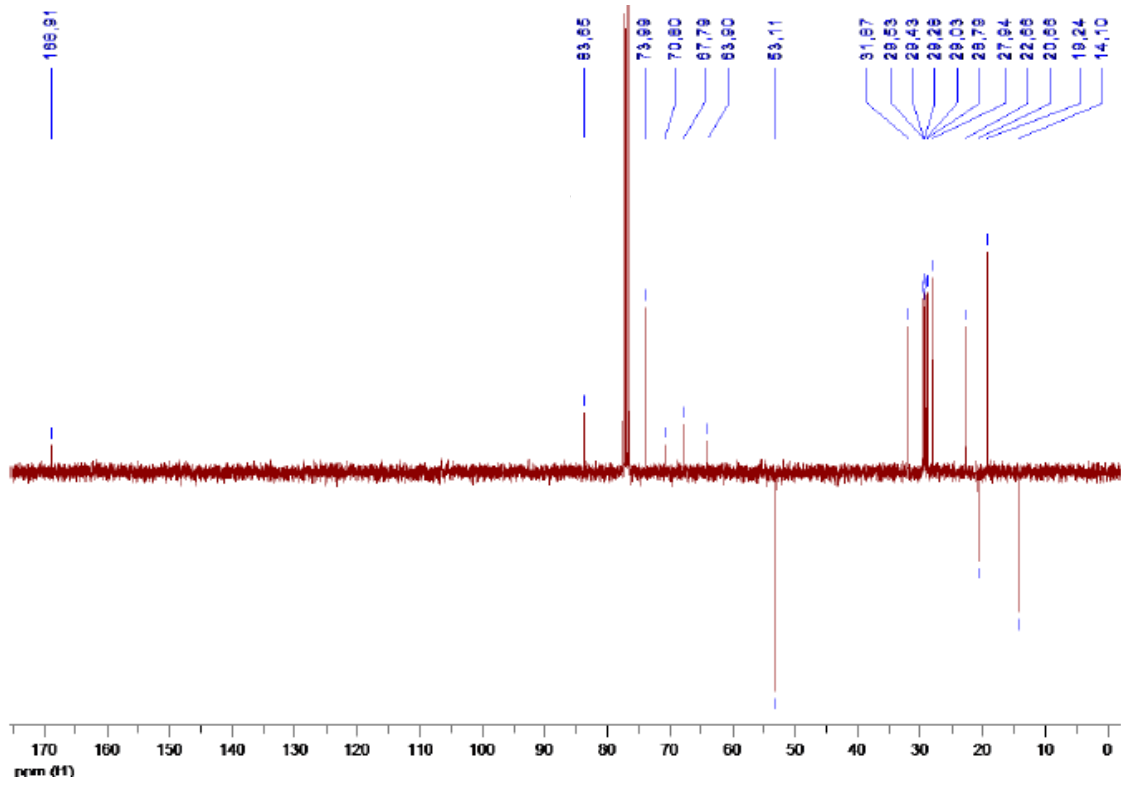
ANEXO E - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC DO (S)-2

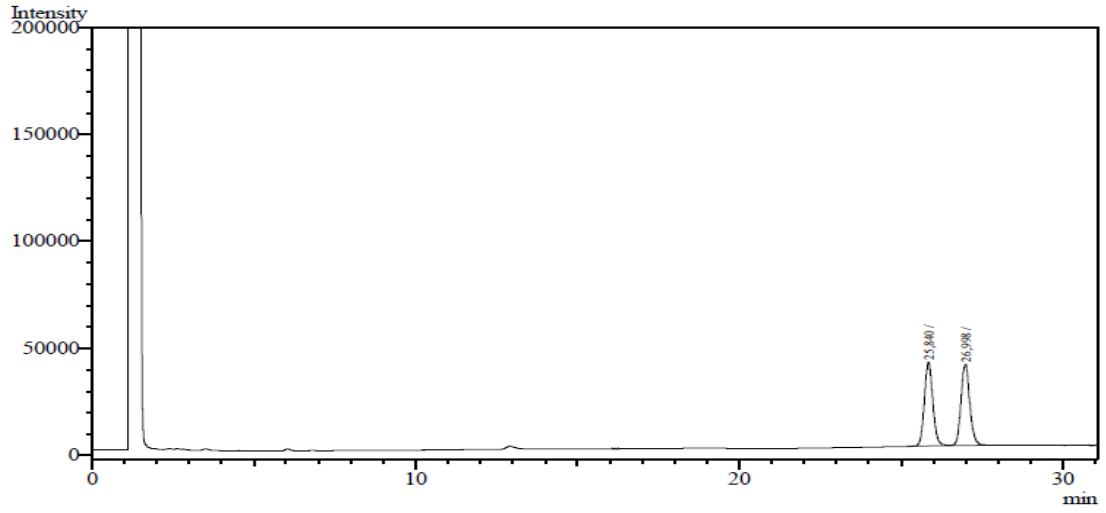
ANEXO F - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC DO *rac*-2-Ac



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit Mark	ID#	Cr
1	64,287	3546001	96905	50,716			
2	65,431	3445934	86391	49,284	V		
Total		6991935	183296				

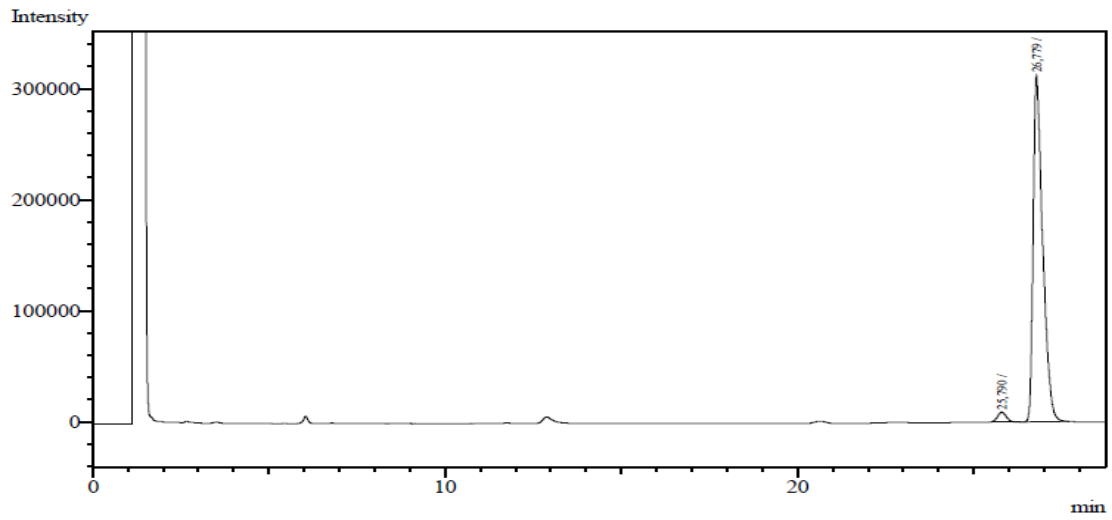
ANEXO G - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC DO (S)-2-Ac (e.e. >99%)

ANEXO I - RMN ^{13}C DE *rac*-3-Ac (75 MHz, CDCl_3)

ANEXO J - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC DO *rac-3*

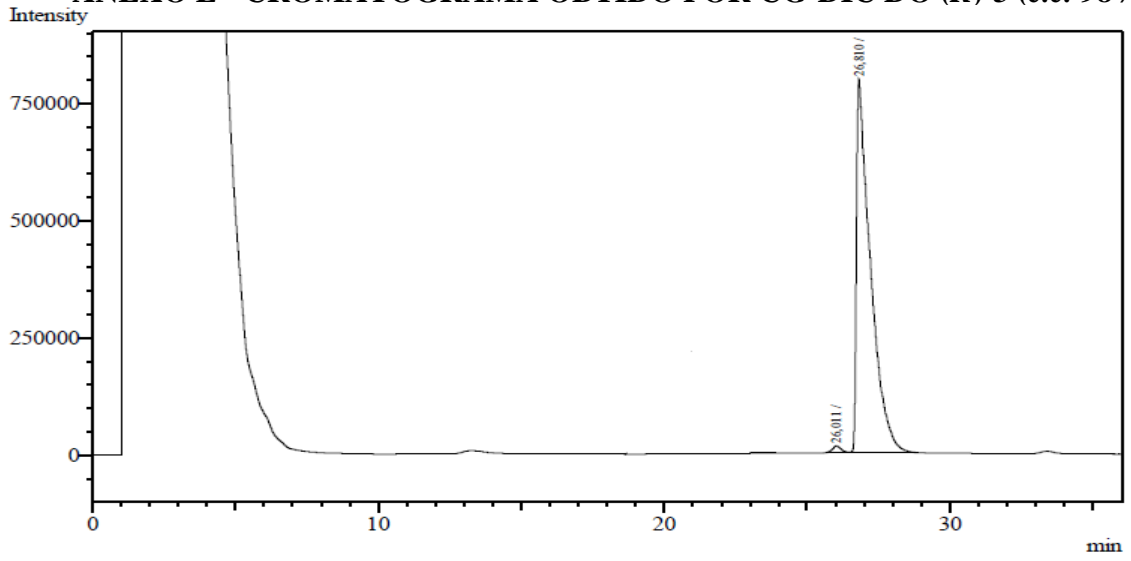
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	25,840	712901	39273	49,805				
2	26,998	718479	37886	50,195		V		
Total		1431380	77159					

ANEXO K - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC DO (R)-3 (e.e. 96%)

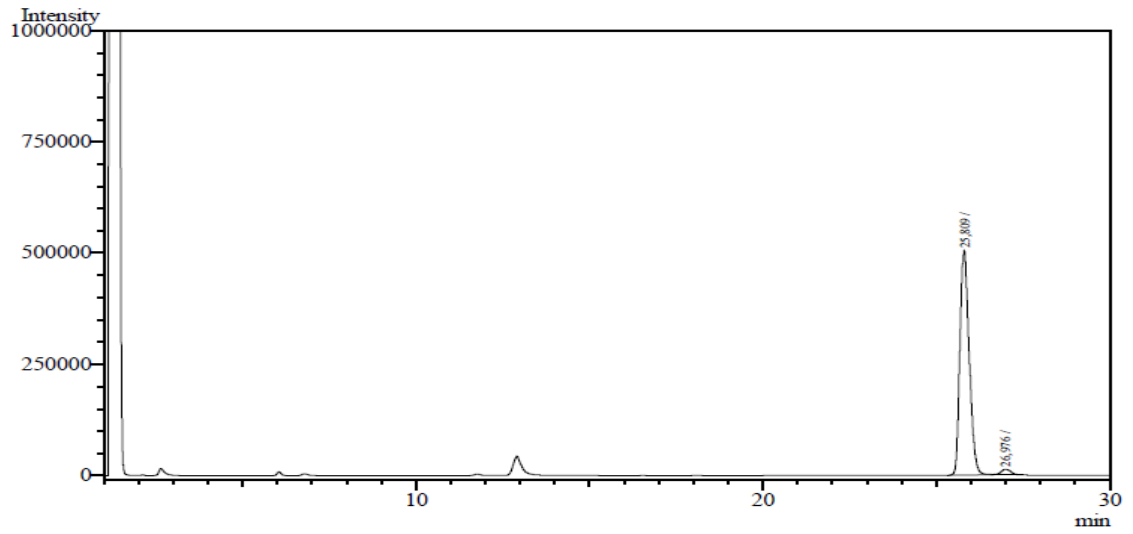


Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	25.790	151206	9051	2,521				
2	26.779	5847309	312261	97,479				
Total		5998515	321312					

ANEXO L - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC DO (R)-3 (e.e. 98%)

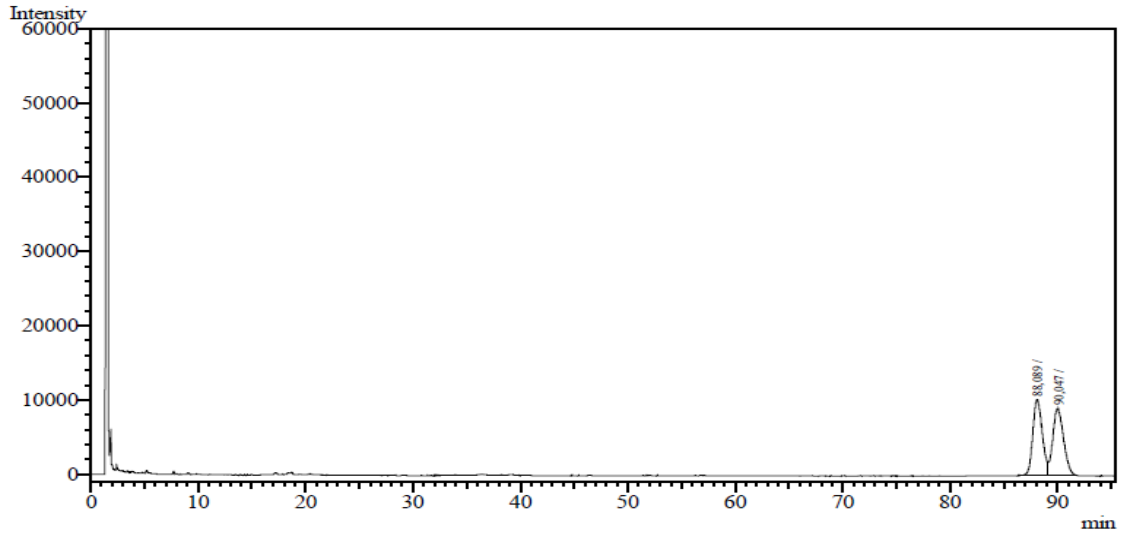


Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	26.011	290872	14147	1.062				
2	26.810	27107220	797190	98.938		V		
Total		27398092	811337					

ANEXO M - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC DO (S)-3 (e.e. 95%)

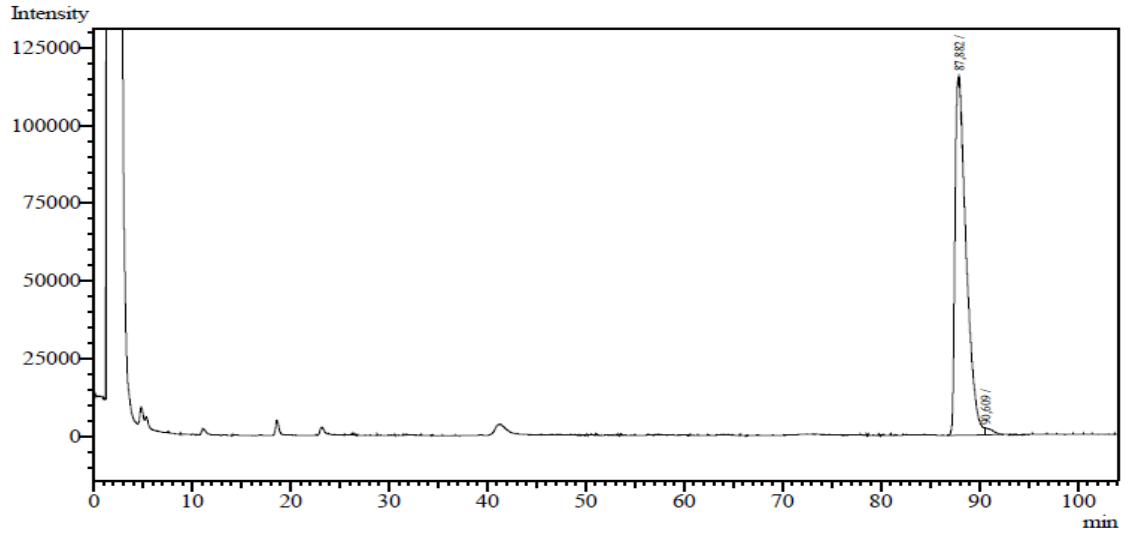
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	25.809	9387018	503287	97.603				
2	26.976	230564	12321	2.397				
Total		9617582	515608					

ANEXO N - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC DO *rac*-3-Ac



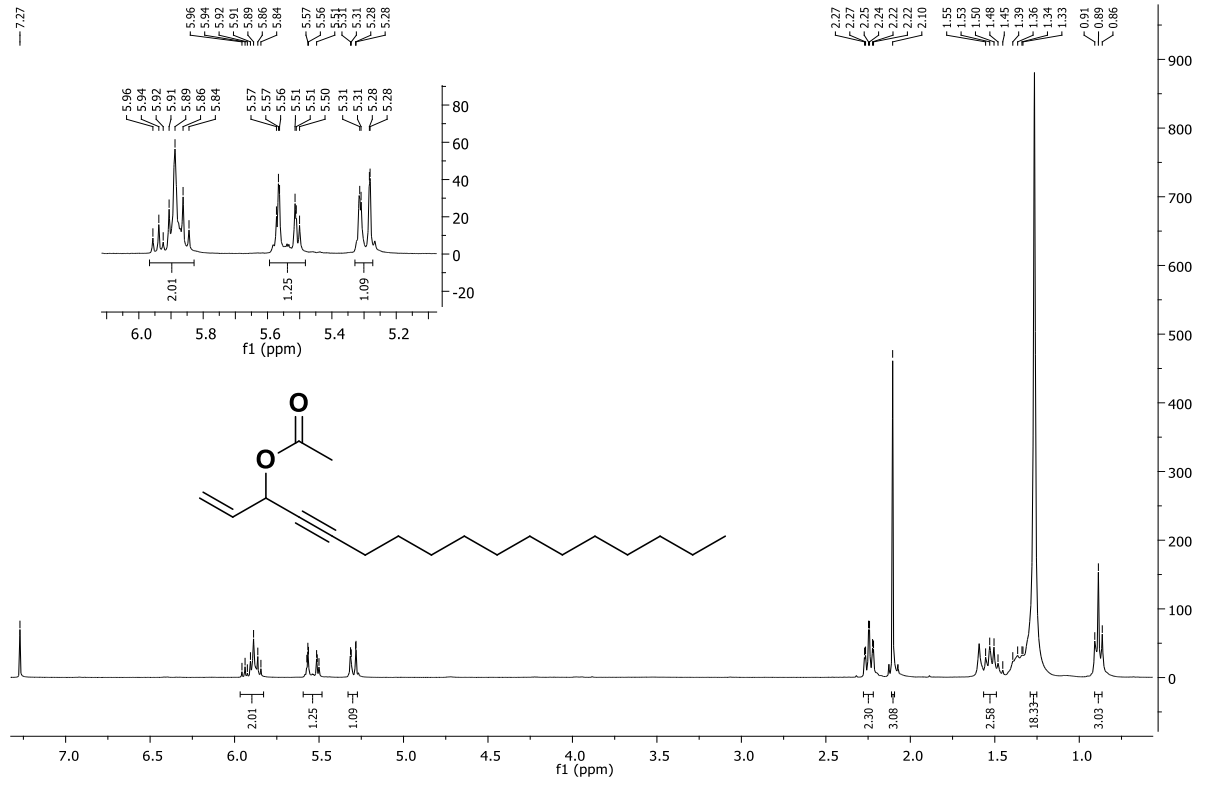
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	88.089	626166	10251	50,140				
2	90.047	622664	9001	49,860		V		
Total		1248830	19252					

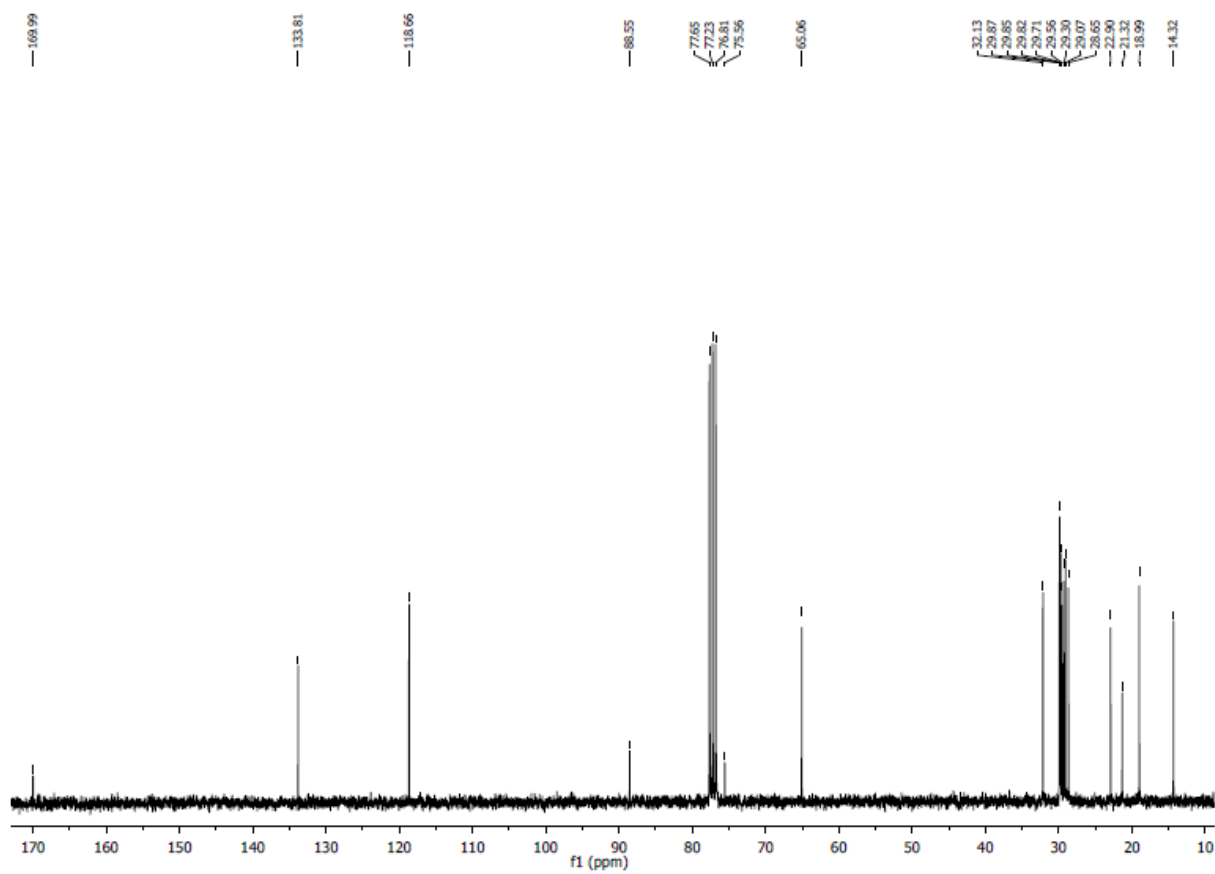
ANEXO O - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC DO (S)-3-Ac (e.e. 98%)



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	87.882	9026378	115963	98.787				
2	90.609	110850	2230	1.213		V		
Total		9137228	118193					

ANEXO P - RMN ^1H DE *rac*-4-Ac (300 MHz, CDCl_3)



ANEXO Q - RMN ^{13}C DE *rac*-4-Ac (75 MHz, CDCl_3)

ANEXO R - MASSA DE ALTA RESOLUÇÃO, MODO POSITIVO DO COMPOSTO *rac*-4-Ac

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Monoisotopic Mass, Odd and Even Electron Ions

368 formula(e) evaluated with 2 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-100 H: 0-100 N: 0-10 O: 0-10

DCI-CH4

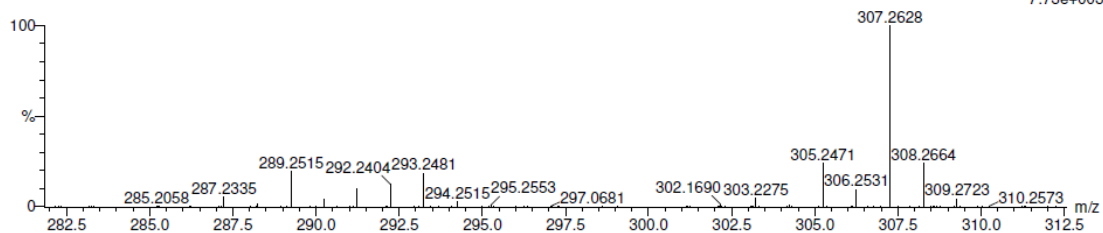
20190716-MB144OAc- 2 (0.033) Cm (2:12-130:132x5.000)

GCT Premier CAB109

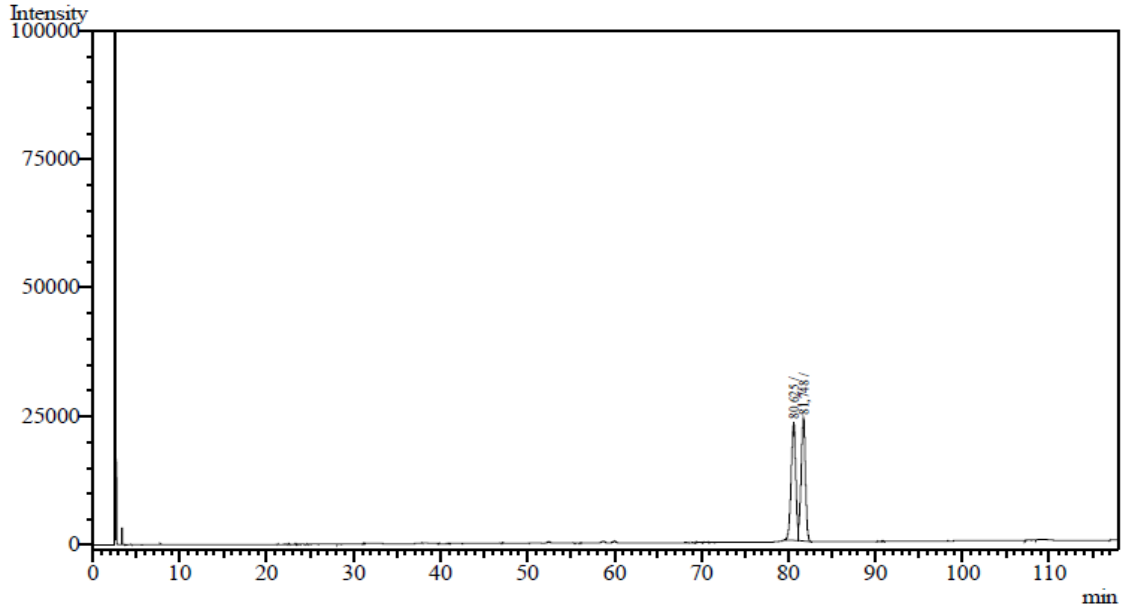
16-Jul-2019 15:01:52

TOF MS CI+

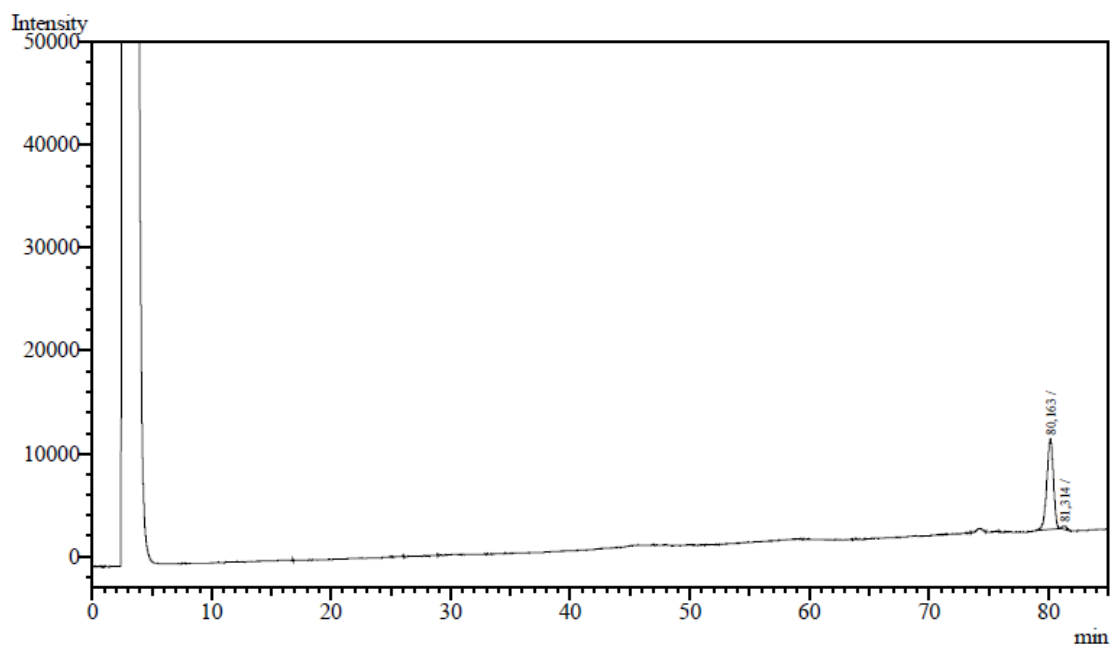
7.73e+003



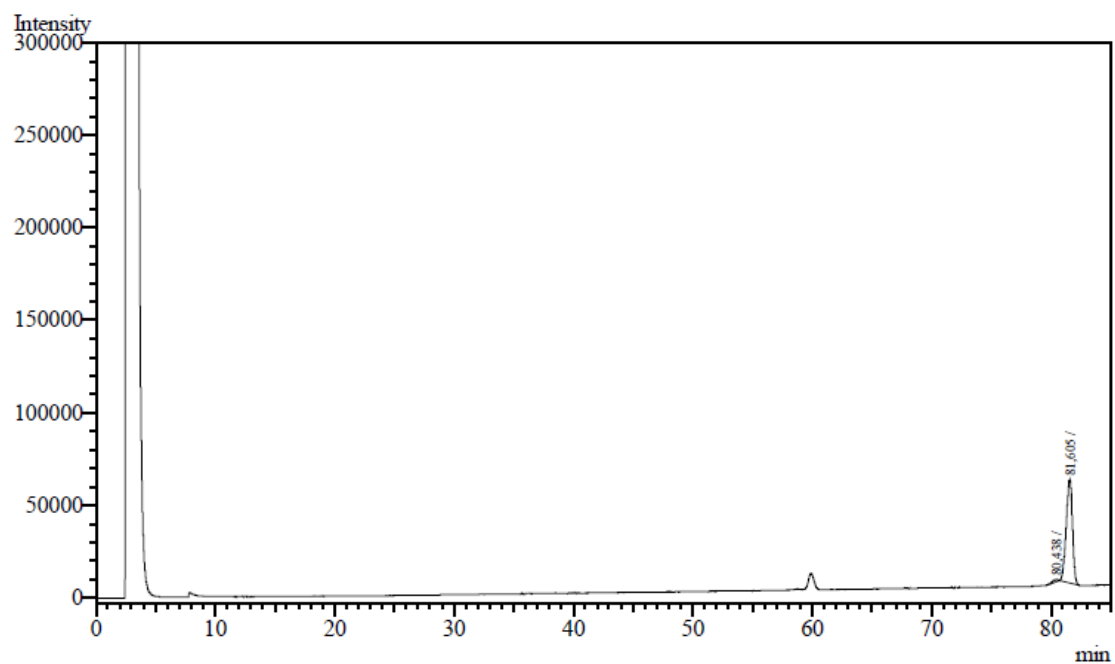
ANEXO S - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC DO *rac*-4-Ac



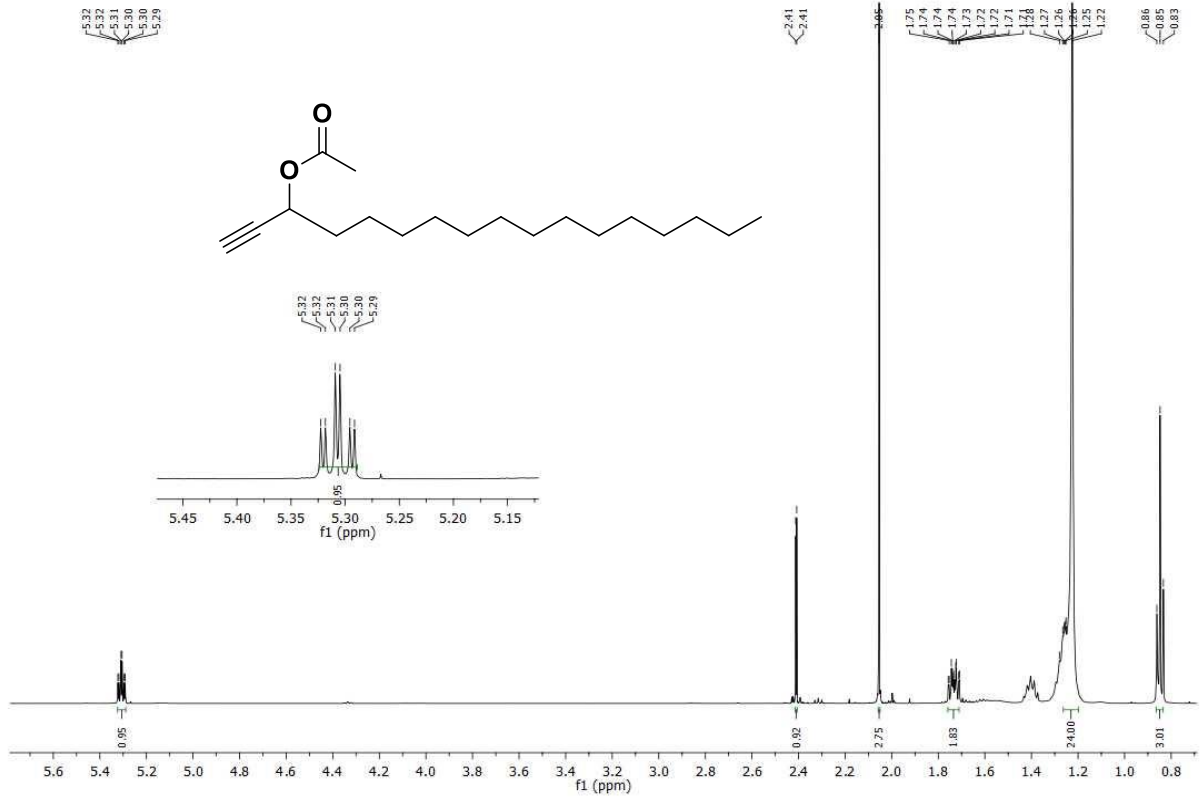
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	80,625	831741	23007	50,410				
2	81,748	818222	23945	49,590		V		
Total		1649963	46952					

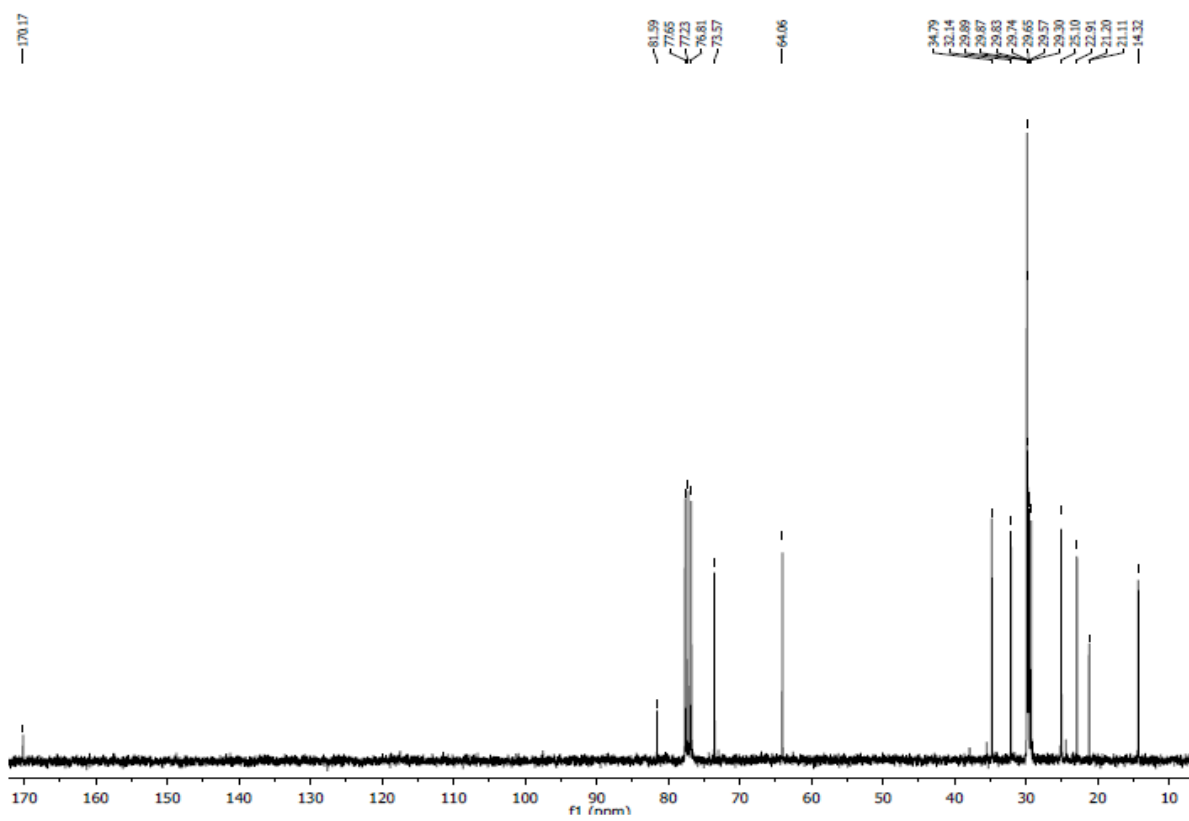
ANEXO T - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC (S)-4-Ac (e.e. 95%)

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	80.163	331789	8815	97.322				
2	81.314	9130	329	2.678				
Total		340919	9144					

ANEXO U - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC (*R*)-4-Ac (*e.e.* 97%)

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	80.438	35071	1211	1,685				
2	81.605	2046288	55835	98,315				
Total		2081359	57046					

ANEXO V - RMN ^1H DE *rac*-5-Ac (300 MHz, CDCl_3)

ANEXO W - RMN ^{13}C DE *rac*-5-Ac (75 MHz, CDCl_3)

ANEXO X - MASSA DE ALTA RESOLUÇÃO, MODO POSITIVO DO COMPOSTO

rac-5-Ac

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Monoisotopic Mass, Odd and Even Electron Ions

361 formula(e) evaluated with 1 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-100 H: 0-100 N: 0-10 O: 0-10

DCI-CH4

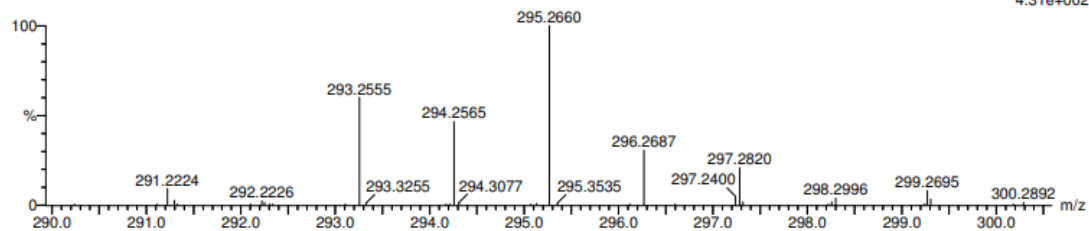
20190716-HN23OAc- 17 (0.283) Cm (15:29-144:149x5.000)

GCT Premier CAB109

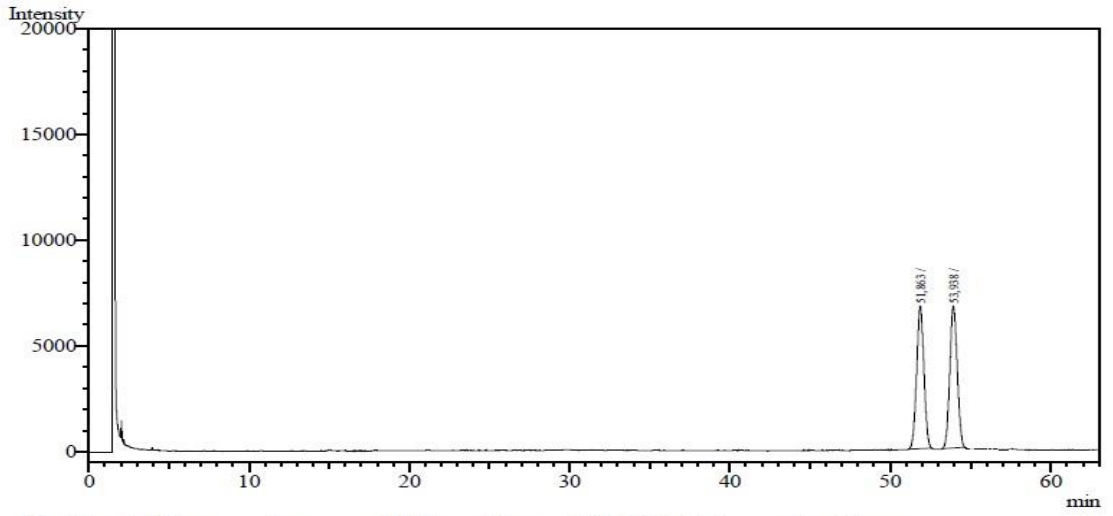
16-Jul-2019 15:13:24

TOF MS Cl-

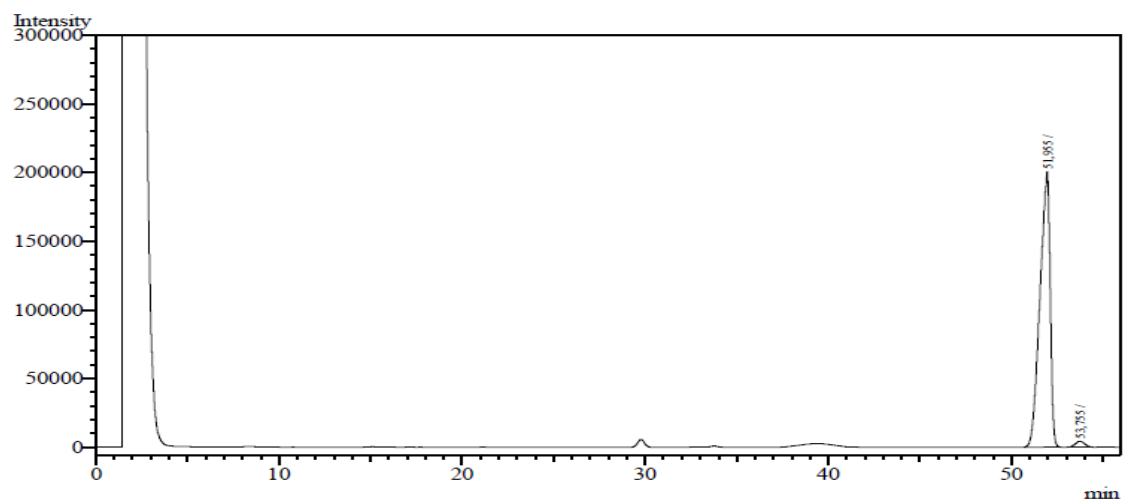
4.31e+002



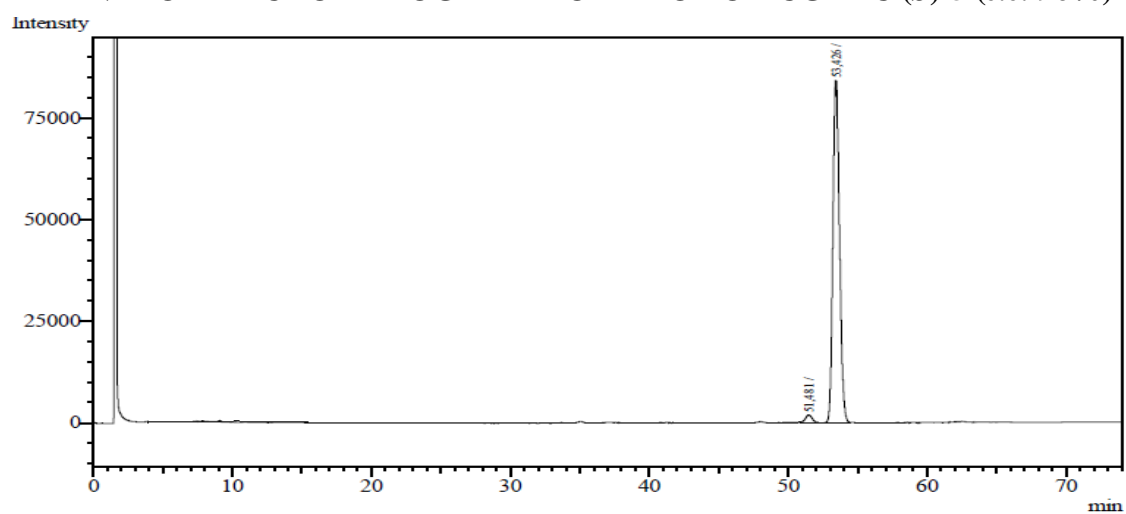
ANEXO Y - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC *rac*-5



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	51.863	213813	6754	49,651				
2	53.938	216820	6719	50,349				
Total		430633	13473					

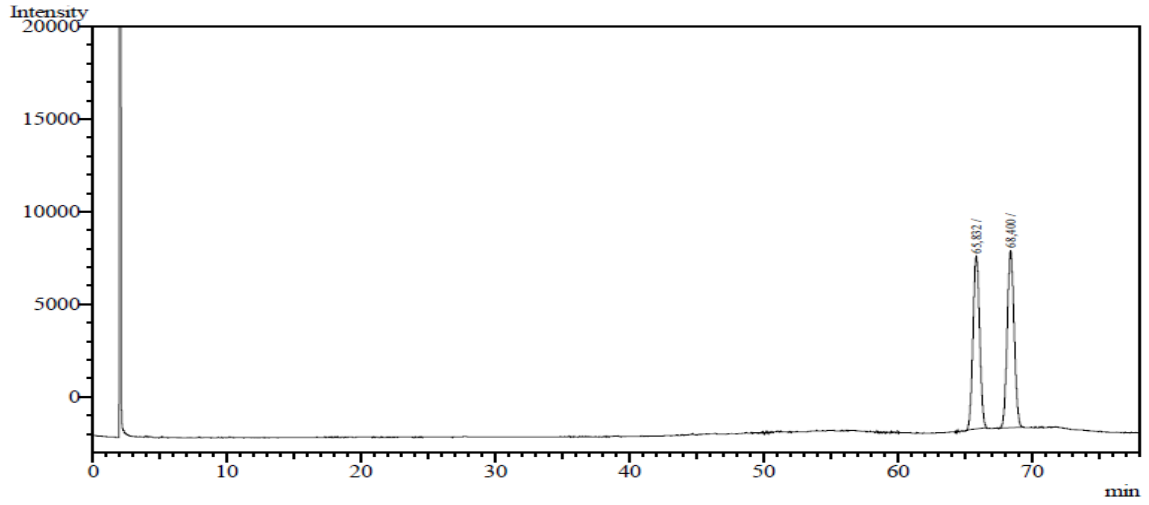
ANEXO Z - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC (*R*)-5 (e.e. 96%)

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	51.955	7717550	200477	98,142				
2	53.755	146142	4289	1,858				
Total		7863692	204766					

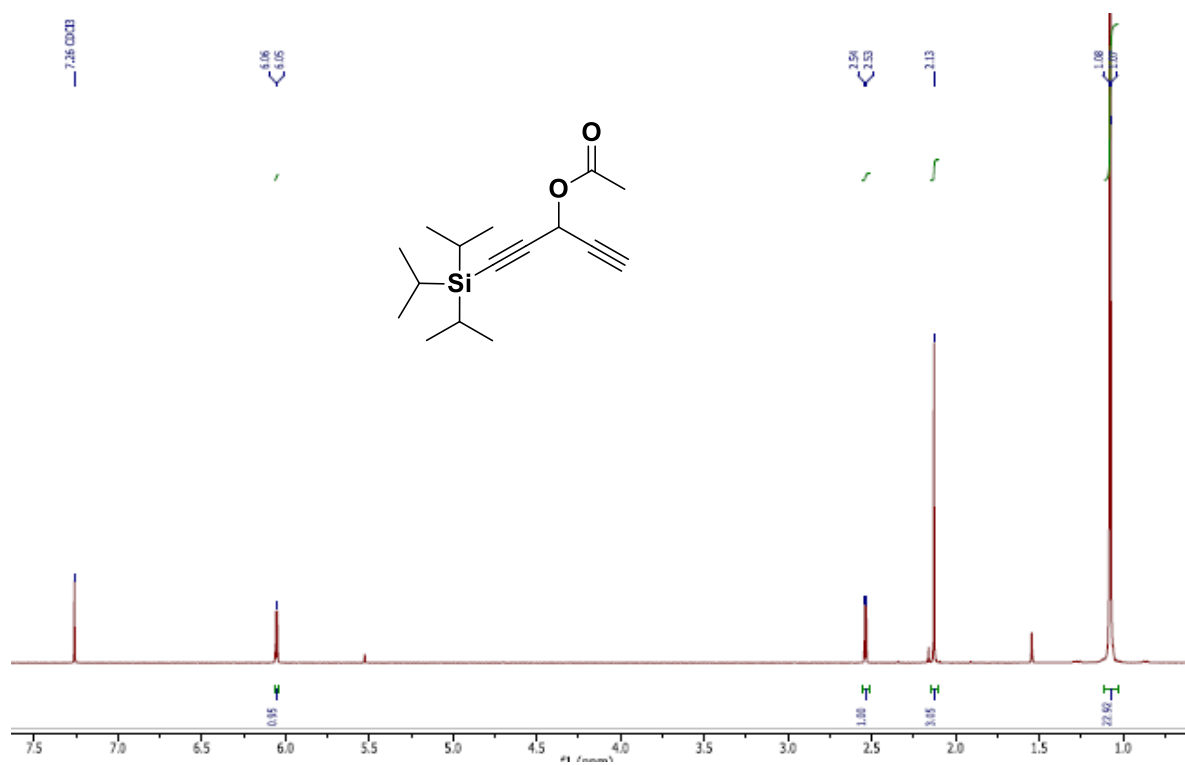
ANEXO AA - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC (S)-5 (e.e. 96%)

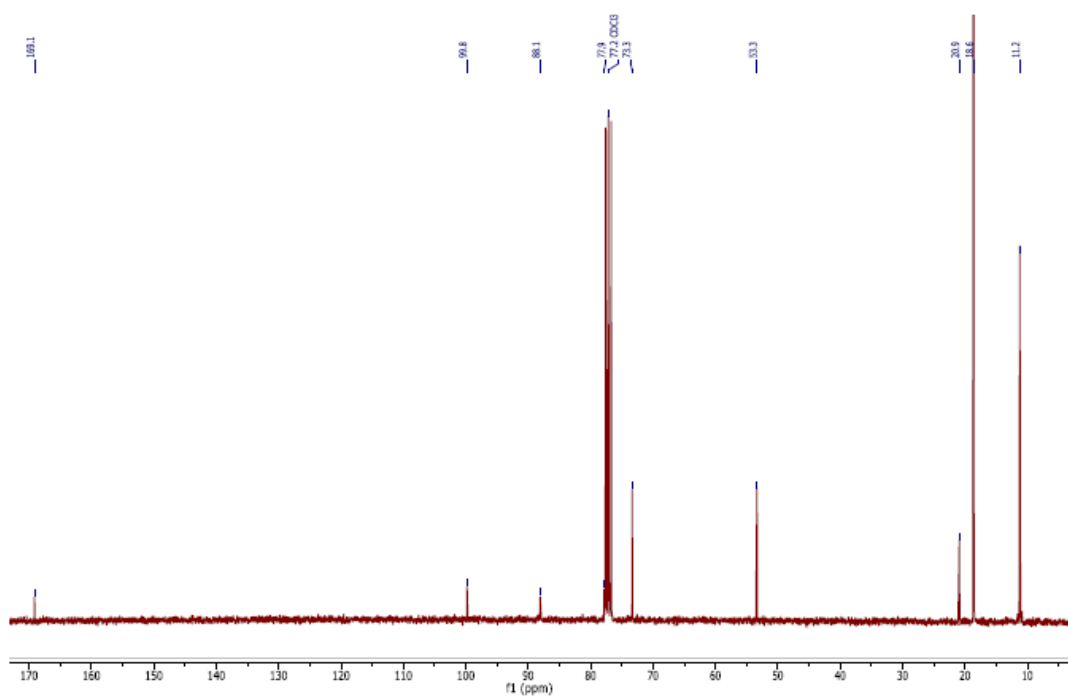
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	51.481	62660	1902	2.212				
2	53.426	2770348	84115	97.788				
Total		2833008	86017					

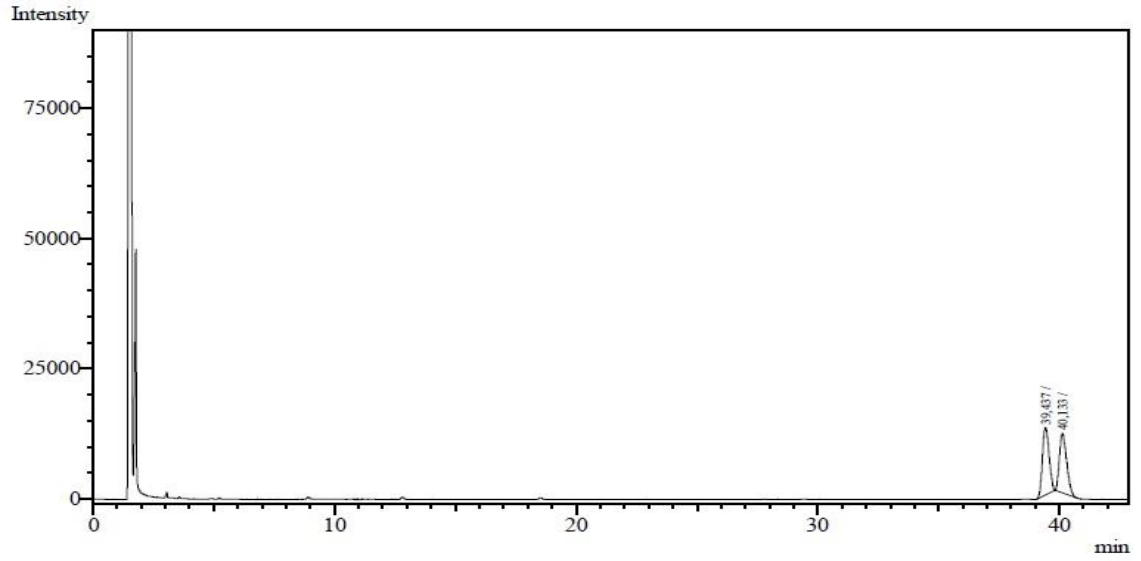
ANEXO AB - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC *rac*-5-Ac



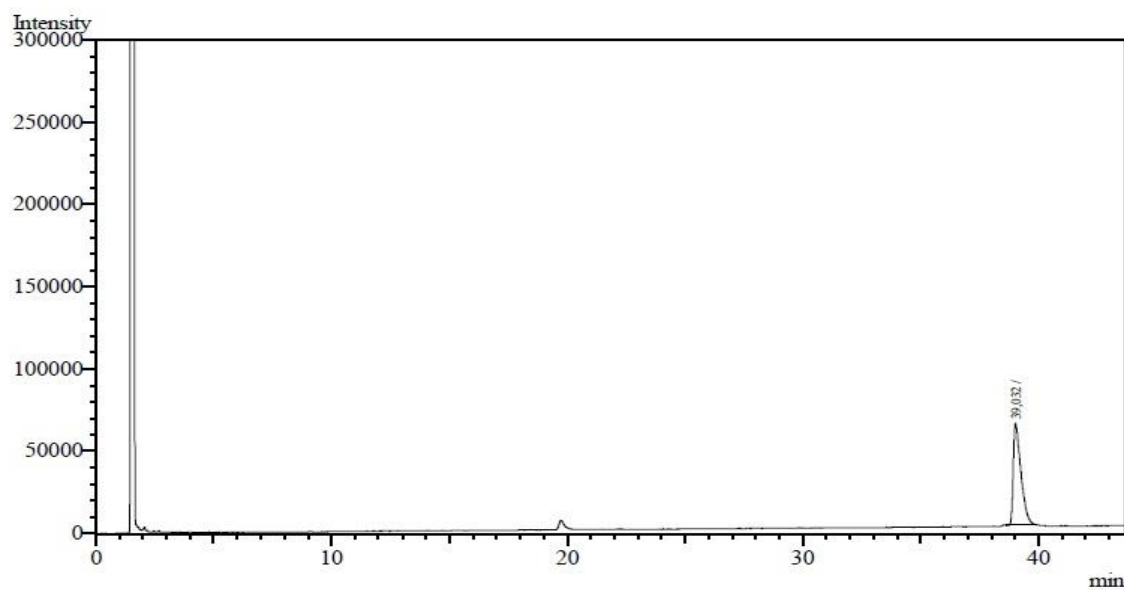
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	65.832	321205	9320	48.396				
2	68.400	342493	9570	51.604				
Total		663698	18890					

ANEXO AC - RMN ^1H DE *rac*-6-Ac (300 MHz, CDCl_3)

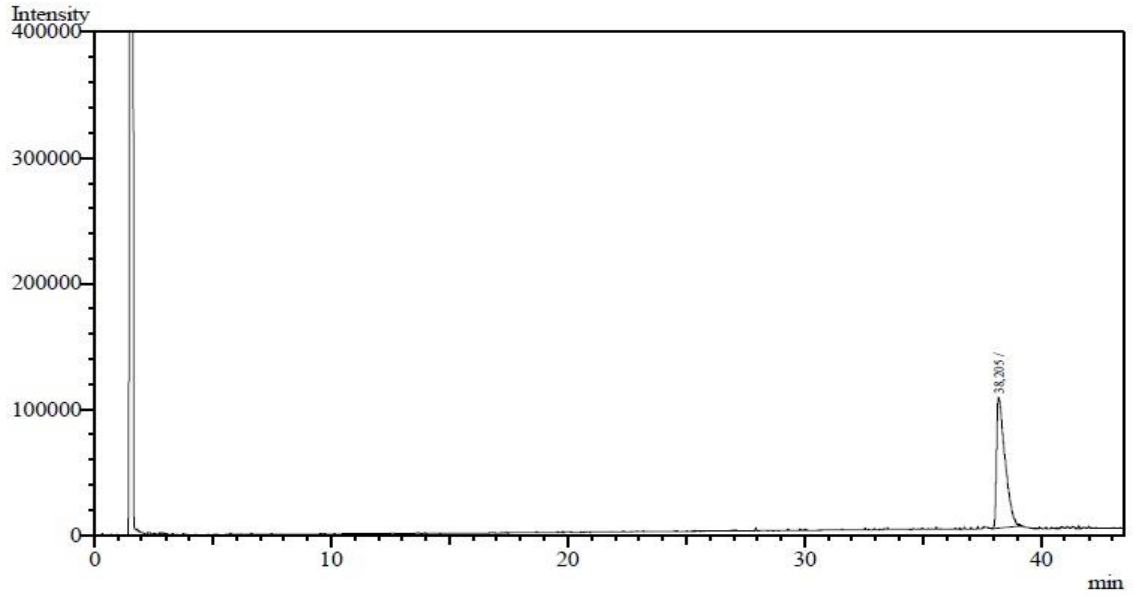
ANEXO AD - RMN ^{13}C DE *rac*-6-Ac (75 MHz, CDCl_3)

ANEXO AE - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC *rac-6*

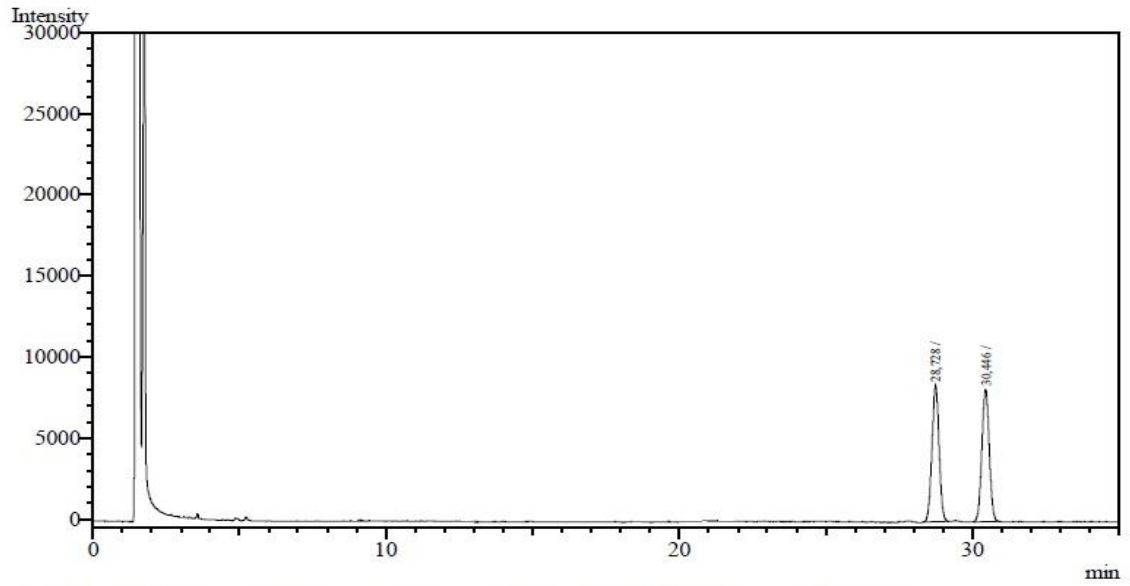
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	39.437	248631	12969	50.905				
2	40.133	239792	11422	49.095				
Total		488423	24391					

ANEXO AF - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC (R)-6 (e.e. > 99%)

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	39.032	1405233	62184	100.000				
Total		1405233	62184					

ANEXO AG - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC (S)-6 (e.e. > 99%)

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	38.205	2592854	104085	100.000				
Total		2592854	104085					

ANEXO AH - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-DIC *rac*-6-Ac

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	28.728	141761	8430	49.815				
2	30.446	142813	8161	50.185				
Total		284574	16591					