



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BACHARELADO

DANIEL MORAIS VIEIRA CRUZ

**RESOLUÇÃO CINÉTICA DO RAC-2-CLORO-1-(2,4-DICLOROFENIL) ETANOL VIA
ACETILAÇÃO, CATALISADA POR LIPASES**

FORTALEZA

2022

DANIEL MORAIS VIEIRA CRUZ

RESOLUÇÃO CINÉTICA DO *RAC*-2-CLORO-1-(2,4-DICLOROFENIL) ETANOL VIA
ACETILAÇÃO, CATALISADA POR LIPASES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação de Graduação em Química do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharelado em Química.

Orientador Pedagógico: Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos.

Orientador Profissional: Prof. Dr. Thiago de Sousa Fonseca.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

C961r Cruz, Daniel Morais Vieira.
Resolução cinética do rac-2-cloro-1-(2,4-diclorofenil) etanol via acetilação, catalisada por lipases / Daniel Morais Vieira Cruz. – 2022.
61 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Química, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos.

Coorientação: Prof. Dr. Thiago de Sousa Fonseca.

1. Resolução cinética enzimática. 2. Lipases comerciais. 3. Síntese quimioenzimática. I. Título.

CDD 540

DANIEL MORAIS VIEIRA CRUZ

RESOLUÇÃO CINÉTICA DO *RAC*-2-CLORO-1-(2,4-DICLOROFENIL) ETANOL VIA
ACETILAÇÃO, CATALISADA POR LIPASES

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Graduação em Química do Centro de
Ciências da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial à obtenção do grau de
Bacharelado em Química.

Aprovada em: 12/07/2022.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Thiago de Sousa Fonseca
Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Ceará – Campus Crateús (IFCE)

Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos
Universidade da Integração Internacional
da Lusofonia Afro-Brasileira (Unilab)

A Deus.

Aos meus pais, ao meu irmão
e a todos que de alguma forma
contribuíram na minha jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar forças nos momentos de turbulências e superar as dificuldades que surgiram durante minha vida.

Aos meus pais, Luiz Carlos e Maria do Carmo pelos sacrifícios desde minha concepção, por serem minha base na vida, aos degraus que construíram para chegar aonde estou e me demonstrar que o amor é demonstrado por ações e não só por palavras.

Ao Alan e a Carla, em especial ao Alan que é um dos companheiros mais antigos nessa jornada, por sempre estarem presentes, estendendo a mão quando.

A minha namorada Marília, por todo apoio, paciência, amor e consideração nesses quase dois anos de namoro. Além de me ensinar a fazer referências e organizar minhas coisas.

A Kimberly por ter sido minha mãe de ciência, me ensinando o valor da força de vontade por aquilo que ama, a necessidade do dever e que devemos cuidar daqueles que amamos porque o sentimento de família pode ser estendido àqueles que estão segurando nossa mão em momentos de dificuldade.

A Clarinha, Felipe, Gabriel, Iago, Lara, Lauren, Lilian, Manu, Michel, Nicolas, Sabrina e Yana, não estávamos em uma jornada em busca das esferas do dragão, ou a Mordor destruir o anel, ou em busca do One piece, mas eles conseguiram fazer com que esses cinco anos virassem jornada ser épica, me ensinando de que realmente momento ruins e tristes são uma nova oportunidade de sorrir e de viver mais uma vez.

Ao Alissu, Artur, Augusto, Bruna, Dalila, Gabi, Gabs, Gledson, Jonatas, Naara, Nicaely, Paulo, Prof. Conceição e Stephany por me ajudarem dentro e fora do laboratório com apoios, conselhos e química que me foram ensinados.

A Jamily, Julie, Manel, Paloma, Sergio, Victor e Wesley por estarem juntos nas horas difíceis, os conselhos e as mesas foram como oásis nessa caminhada.

Ao meu orientador prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos, pela oportunidade de ser bolsista na área que tanto amo, pela confiança durante esses anos, pelos conselhos que contribuíram para minha formação não só profissional, mas também como indivíduo.

Ao meu coorientador prof. Dr. Thiago de Sousa Fonseca por todos os ensinamentos, por toda compreensão, paciência e apoio que me deu nesses tempos difíceis.

Ao prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos por avaliar meu trabalho e apresentar críticas construtivas para tornar ele melhor.

À CAPES, CNPq e PIBIC pelo suporte financeiro que possibilitou a realização desse trabalho.

“A vida é como um lápis que certamente se esgotará, mas deixará a bela escrita da vida.”
(Nami).

RESUMO

O (*S*)-2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etanol (**S-3**) é um intermediário chave na síntese quimioenzimática do (*R*)-luliconazol (**R-1**), conhecido comercialmente pela marca Luzu. O (*R*)-**1** é um fármaco quiral antifúngico azólico, utilizado no tratamento de micoses causadas por dermatófitos como o *Trichophyton rubrum* e o *Epidermophyton floccosum*, ambos agentes responsáveis por tineas pedis, cruris e corporis e onicomicose. Neste trabalho, propõe-se uma rota biocatalítica, em consonância com a química verde, para obter o (**S-3**) a partir da resolução cinética enzimática do 2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etanol (**rac-3**), via reação de acetilação, catalisada por lipases. Foi realizada uma triagem utilizando sete lipases comerciais e seis solventes orgânicos, na presença de acetato de vinila, como doador de acila. Dentre as lipases avaliadas, a lipase de *Candida antarctica* do tipo A (CAL-A) imobilizada em imobead 150, recombinada com *Aspergillus oryzae* foi a enzima mais eficiente na resolução cinética de **rac-3**. Após o estudo de vários parâmetros foi possível estabelecer as condições otimizadas na resolução cinética de **rac-3**: 30 h reação, 40 °C, proporção enzima;substrato de 2:1 (m:m) e acetonitrila como solvente. Sob tais condições reacionais, a resolução cinética de **rac-3** levou a obtenção do (*S*)-acetato de 2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etila (**S-4**) com excesso enantiomérico de 97% e a halodrina remanescente (*R*)-2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etanol (**R-3**) com *ee* > 99%, com 50 % de conversão e razão enantiomérica (*E*) > 200. O (*S*)-2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etanol (**S-3**) foi eficientemente obtido após a hidrólise enzimática de (**S-4**) na presença da lipase CAL-B, com excesso enantiomérico > 99%.

Palavras-chave: Resolução cinética enzimática; Lipases comerciais; Síntese quimioenzimática.

ABSTRACT

(*S*)-2-Chloro-1-(2,4-dichlorophenyl)ethanol (**S-3**) is a key intermediate in the chemoenzymatic synthesis of (*R*)-luliconazole (**R-1**), commercially known under the brand name Luzu. (**R-1**) is an azole antifungal chiral drug used in the treatment of mycoses caused by dermatophytes such as *Trichophyton rubrum* and *Epidermophyton floccosum*, both agents responsible for tinea pedis, cruris and corporis and onychomycosis. In this work, we propose a biocatalytic route, in line with green chemistry, to obtain (*S*)-**3** from the enzymatic kinetic resolution of 2-chloro-1-(2,4-dichlorophenyl)ethanol (**rac-3**), via acetylation reaction, catalyzed by lipases. A screening was performed using seven commercial lipases and six organic solvents, in the presence of vinyl acetate, as acyl donor. Among the evaluated lipases, *Candida antarctica* type A lipase (CAL-A) immobilized in Immobead 150, recombined with *Aspergillus oryzae* was the most efficient enzyme in the kinetic resolution of **rac-3**. After the study of several parameters it was possible to establish the optimized conditions in the kinetic resolution of **rac-3**: 30 h, 40 ° C, enzyme:substrate ratio of 2:1 (m:m) and acetonitrile as solvent. Under such reaction conditions, the kinetic resolution of **rac-3** led to (*S*)-2-chloro-1-(2,4-dichlorophenyl)ethyl acetate (**S-4**) with an enantiomeric excess of 97% and the halohydrin remaining (*R*)-2-chloro-1-(2,4-dichlorophenyl)ethanol (**R-3**) with *ee* > 99%, with 50% conversion and enantiomeric ratio (E) > 200. (*S*)-2-chloro-1-(2,4-dichlorophenyl)ethanol (**S-3**) was efficiently obtained after enzymatic hydrolysis of (**S-4**) in the presence of lipase CAL-B, with enantiomeric excess > 99%.

Keywords: Enzyme kinetic resolution; Commercial lipases; Chemoenzymatic synthesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Número de fármacos racêmicos, quirais e não quirais aprovados pela FDA no período de 2002 até 2015	18
Figura 2	– Ligação de duas moléculas de aminoácidos (a) e deslocalização do par de elétrons do nitrogênio da amida (b)	20
Figura 3	– Formação da estrutura secundária de uma proteína	20
Figura 4	– Representação do aminoácido (a) e os níveis de estrutura proteica: primária (b), secundária (c), terciária (d) e quaternária (e).....	21
Figura 5	– Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> , conformação fechada (a) (código PDB 1DT3) e conformação aberta (b) (código PDB: 1EIN). As tampas fechada e aberta, bem como a tríade catalítica, foram destacadas pelas cores laranja, magenta e amarelo, respectivamente	23
Figura 6	– Ciclo catalítico das lipases em uma reação de transesterificação com álcool secundário.....	24
Figura 7	– Representação simplificada das cavidades de uma lipase, segundo a regra de Kazlauskas.....	25
Figura 8	– Estrutura do Immobead 150	28
Figura 9	– (<i>R</i>)-luliconazol	29
Figura 10	– Cromatograma do padrão do (<i>S/R</i>)-2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etanol.....	54
Figura 11	– Cromatograma do padrão do acetato (<i>S/R</i>) -2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etila...	54
Figura 12	– Cromatograma referente à reação de acetilação mediada pela CAL-A em heptano	55
Figura 13	– Cromatograma referente à reação de acetilação mediada pela CAL-A em hexano	55
Figura 14	– Cromatograma referente à reação de acetilação mediada pela CAL-A em cicloexano.....	56
Figura 15	– Cromatograma referente à reação de acetilação mediada pela CAL-A em MTBE	56

Figura 16 – Cromatograma referente à reação de acetilação mediada pela CAL-A em THF	57
Figura 17 – Cromatograma referente à reação de acetilação mediada pela CAL-A em acetonitrila, 24 h	57
Figura 18 – Cromatograma referente à reação de acetilação mediada pela CAL-A em acetonitrila, 30 h	58
Figura 19 – Cromatograma referente ao primeiro ciclo de reuso da reação de acetilação mediada pela CAL-A em acetonitrila	58
Figura 20 – Cromatograma referente ao segundo ciclo da reação de reuso de acetilação mediada pela CAL-A em acetonitrila	59
Figura 21 – Cromatograma referente ao terceiro ciclo da reação de reuso de acetilação mediada pela CAL-A em acetonitrila	59
Figura 22 – Cromatograma referente ao quarto ciclo da reação de reuso de acetilação mediada pela CAL-A em acetonitrila.....	60
Figura 23 – Cromatograma referente ao quinto ciclo da reação de reuso de acetilação mediada pela CAL-A em acetonitrila.....	60
Figura 24 – Cromatograma referente à reação de hidrólise do acetato de (<i>S</i>)-2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etila, na presença de CAL-B.....	61

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Resultados do reuso da CAL-A.....	42
---	----

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Síntese do (<i>R</i>)-luliconazol desenvolvida por Fonseca (2018)	30
Esquema 2 – Proposta de síntese do S-3 , intermediário do (<i>R</i>)-luliconazol, a ser desenvolvida neste projeto	31
Esquema 3 – Resolução cinética dinâmica do 2-cloro-1-feniletanol	32
Esquema 4 – Síntese do <i>rac</i> - 3 e do <i>rac</i> - 4	39
Esquema 5 – Resolução cinética enzimática <i>via</i> reação de acetilação do <i>rac</i> - 3 utilizando lipases, em meio orgânico.....	39
Esquema 6 – Reação de hidrólise enzimática do (<i>S</i>)- 4	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das enzimas e reações que catalisam segundo IUBMB.....	21
Tabela 2 – Solventes e reagentes utilizados neste trabalho	34
Tabela 3 – Lipases utilizadas neste trabalho	35
Tabela 4 – Tempos de retenção dos enantiômeros na análise por CG.....	36
Tabela 5 – Resultados obtidos na resolução cinética de <i>rac-3</i> mediada pela CAL-A, em solventes orgânicos, em 24 horas de reação à 40 °C	40
Tabela 6 – Triagem de lipases realizadas em cicloexano	51
Tabela 7 – Triagem de lipases realizadas em heptano	51
Tabela 8 – Triagem de lipases realizadas em Acetonitrila.....	52
Tabela 9 – Triagem de lipases realizadas em MTBE.....	52
Tabela 10 – Triagem de lipases realizadas em THF.....	53
Tabela 11 – Triagem de lipases realizadas em Hexano.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
AcOVin	Acetato de vinila
c	Conversão
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
DIC	Detector de ionização de chama
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
E	Enantiosseletividade
<i>e.e.</i>	Excesso enantiomérico
<i>e.e._s</i>	Excesso enantiomérico do substrato
<i>e.e._p</i>	Excesso enantiomérico do produto
R_f	Fator de retenção
h	Hora (s)
min	Minuto (s)
η_m	Nanômetro
rac	Racêmico
rpm	Rotação por minuto
THF	Tetraidrofurano
UV	Ultravioleta
UFC	Universidade Federal do Ceará

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
%	Porcentagem
β	Beta
®	Marca Registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Quiralidade	17
1.2	Biocatálise	18
1.2.1	<i>Enzimas</i>	19
1.2.1.1	<i>Lipases</i>	22
1.2.1.2	<i>Previsão da seletividade das lipases</i>	25
1.2.1.3	<i>Lipases imobilizadas</i>	26
1.3	(R)-luliconazol	28
1.4	Resolução cinética enzimática via acetilação do 2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etanol (<i>rac-3</i>)	29
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivo geral	33
2.2	Objetivos específicos	33
3	MATERIAIS	34
3.1	Solventes e reagentes	34
3.2	Lipases	34
3.3	Adsorventes e reveladores	35
3.4	Equipamentos	35
3.5	Condições de análise no CG	36
4	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	37
4.1	Secagem de solventes	37
4.2	Obtenção da halodrina 2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etanol (<i>rac-3</i>)	37
4.3	Obtenção do acetato de 2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etila (<i>rac-4</i>)	37
4.4	Reação de resolução cinética enzimática via acetilação do <i>rac-3</i>	38
4.5	Reações de reuso da CAL-A	38
4.6	Hidrólise enzimática do (<i>S</i>)-4	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	Síntese do <i>rac-2</i>-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etanol (<i>rac-3</i>) e do <i>rac</i>-acetato de 2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etila (<i>rac-4</i>)	39
5.2	Triagem de lipases na resolução cinética de <i>rac-3</i> via reação de acetilação .	39
5.3	Estudo de reuso da CAL-A na resolução cinética de <i>rac-3</i>, via reação de	41

	acetilação.....	
5.4	Hidrólise do (S)-acetato de 2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etila (S-4).....	42
6	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	45
	APÊNDICE A – TABELAS DOS RESULTADOS DAS TRIAGENS DAS LIPASES EM SOLVENTE ORGÂNICO.....	51
	APÊNDICE B – CROMATOGRAMAS	54

1 INTRODUÇÃO

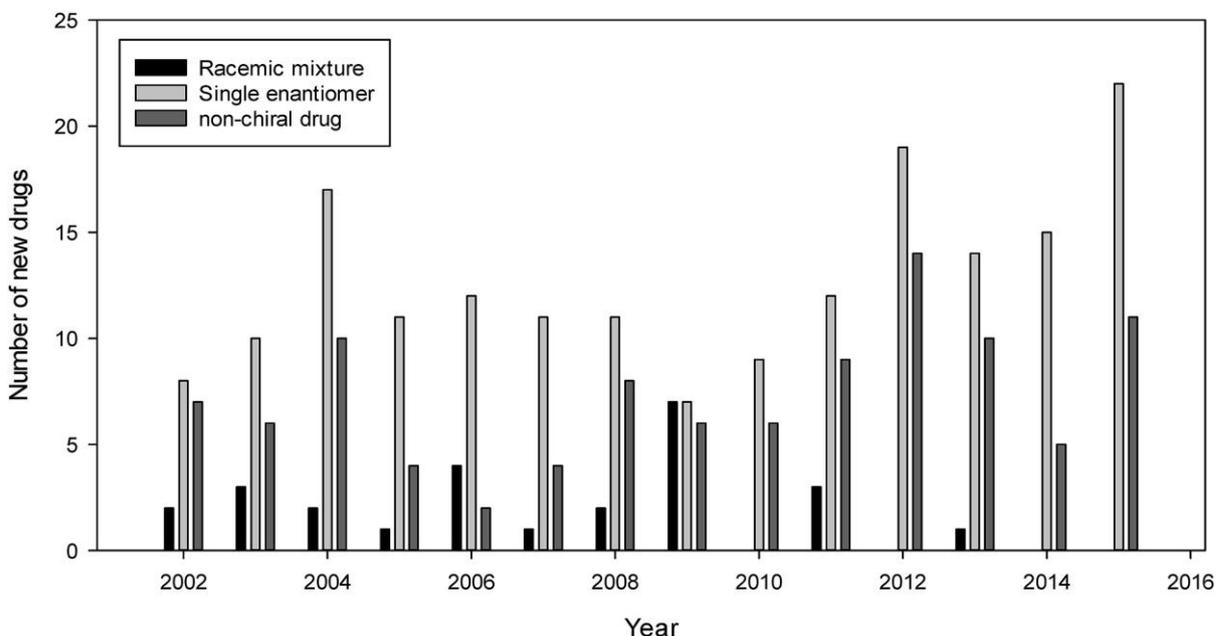
1.1 Quiralidade

A quiralidade é uma propriedade geométrica que se aplica em escala macro- e microscópica. Nas moléculas, a quiralidade está presente nos isômeros ópticos que são os enantiômeros, os quais devem apresentar um centro de assimetria em um ou mais carbonos, ou seja, carbonos que tenham quatro ligantes diferentes. Tal fator ocasiona a não sobreposição das imagens especulares dessas moléculas e, dessa forma, demonstra o efeito da quiralidade, (BLASER, 2013) (KLEIN, 2016).

Os enantiômeros de fármacos quirais possuem propriedades físico-químicas iguais entre si, exceto por desviarem a luz polarizada quando há o excesso de um enantiômero em relação ao outro, e por possuírem diferenças na atividade farmacológica em ambientes quirais como em organismos vivos, visto que estes possuem moléculas quirais, como por exemplo, os aminoácidos, carboidratos, hormônios, entre outros. Nesses ambientes, os enantiômeros de fármacos são divididos em duas classes, o eutômero que apresenta a atividade biológica desejada, enquanto o distômero pode apresentar menor ou nenhum efeito para a mesma atividade biológica ou até em alguns casos ser extremamente tóxica. Em suma, a presença deste último enantiômero acarreta, além da diminuição da eficácia do medicamento, um perigo ao meio ambiente devido a ecotoxicidade que ele provoca ao não ser consumido pelo corpo humano e quando expelido, acumula-se na natureza (NOVOTNA, 2014) (OTVOS e KAPPE, 2021).

Dessa forma, as agências reguladoras como a “Food and Drug Administration” (FDA) e a “European Medicines Agency” (EMA), a partir de 1992, recomendaram que as indústrias de fármacos produzam o eutômero ao invés da mistura racêmica. Essa recomendação acarretou a diminuição no número de fármacos na forma de racemato, enquanto os eutômeros foram mais aprovados pela FDA nos anos de 2002 até 2015 como visto na **Figura 1** (SANGANYADO, *et al.*, 2017). Por esse prisma, deduz-se que o desenvolvimento de rotas de síntese de fármacos quirais com alta resolução para a obtenção de enantiômeros com alto grau de pureza é indispensável e promove vantagens tanto para a saúde humana como para o meio ambiente.

Figura 1 – Número de fármacos racêmicos, quirais e não quirais aprovados pela FDA no período de 2002 até 2015.



Fonte: SANGANYAD, et al., 2017.

1.2 Biocatálise

Nos últimos anos, ocorreu um crescimento de métodos sintéticos mais inofensivos ao meio ambiente; tanto na indústria quanto nos laboratórios farmacêuticos; para produzir enantiômeros específicos de fármacos quirais, uma vez que a quiralidade certifica, intrinsecamente, a eficácia e a segurança de muitos fármacos como no caso do (*R*)-luliconazol (**R-1**). Em razão disso, a pressão pela adesão dos métodos de Biocatálise aumentou rapidamente em detrimento da síntese química convencional. Utilizar microrganismos ou enzimas, que em sua maioria são isoladas dos microrganismos, para realizar biotransformações que frequentemente necessitam de alta quimio-, régio- e estereosseletividade é uma forma de tornar o processo de síntese economicamente mais barato (PATEL, 2011) (PETERSEN; KIENER, 1998) e ambientalmente em consonância com os princípios da química verde que, em resumo, são postulações de fundamentos que orientam os processos industriais para alcançar a sustentabilidade em todas as fases de produção desde a escolha da matéria prima até a biodegradabilidade dos produtos e reagentes usados (ANASTAS; EGHBALI, 2009).

Os biocatalisadores têm a capacidade de cumprir alguns dos doze princípios da química verde já que, segundo GROGAN (2009) e HUGHES E LEWIS (2018):

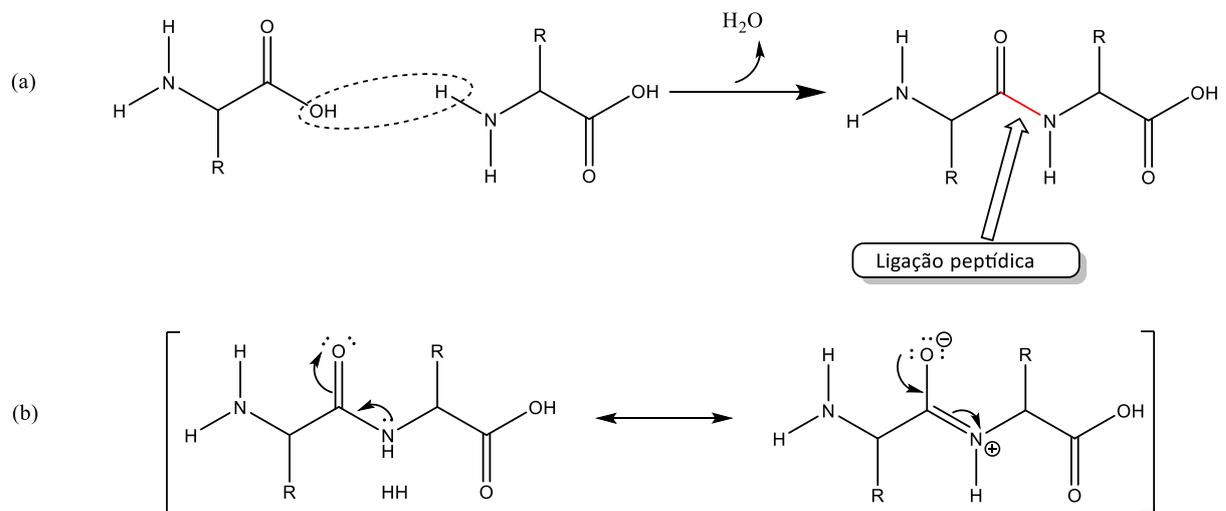
- a) são catalisadores naturais, intrinsicamente não possuem toxicidade;
- b) alguns atuam tanto em meio aquoso como em meio orgânico, como as lipases, não necessitando de condições extremas catalisarem uma reação química;
- c) devido as suas altas quimio-, régio- e estereosseletividade torna desnecessário etapas de proteção/desproteção;
- d) são catalisadores passíveis de imobilização para serem reutilizados e são biodegradáveis.

1.2.1 Enzimas

Desde a antiguidade a humanidade utiliza enzimas para processos químicos como a fermentação. Porém, nas últimas décadas o uso de enzimas cresceu na produção da química fina e dos produtos farmacêuticos, principalmente na síntese industrial de enantiômeros puros de fármacos quirais. Em parte, isso deve-se à evolução das técnicas da bioinformática e da engenharia de proteínas que possibilitaram, respectivamente, o sequenciamento e alterações na sequência de aminoácidos, com mudanças na estrutura primária da enzima surgindo enzimas recombinadas e melhoradas de uma enzima original que permitiram ajustar a capacidade, a seletividade e a estabilidade no processo de recombinação (PYSER, *et al.*, 2021) (SHELDON, WOODLEY, 2017) (TRUPPO, 2017).

As enzimas são proteínas, ou seja, são polímeros formados por monômeros de aminoácidos, que quando ligados covalentemente entre si formam uma cadeia polipeptídica tridimensional ou um conjunto delas que dão a enzima a conformação necessária para catalisar a transformação do substrato em produto. Essa conformação é consequência da interação entre as estruturas que formam a própria enzima. Existe uma hierarquia entre essas estruturas que se inicia na estrutura primária e conclui-se na estrutura terciária, além de que em alguns casos estende-se até a uma estrutura quaternária. Salienta-se que a estrutura primária é a base da enzima, são as ligações covalentes entre os aminoácidos (**figura 2A**) formando uma rede de poliamidas, que devido ao caráter de deslocalização da amida (**figura 2B**) propicia ao polímero um grau adaptável de rigidez, que é responsável pela orientação adequada dos grupos reativos no sítio ativo, e flexibilidade, responsável pelo ajuste que permite a enzima ligar-se ao substrato, (MUKESH, *et al.*, 2004).

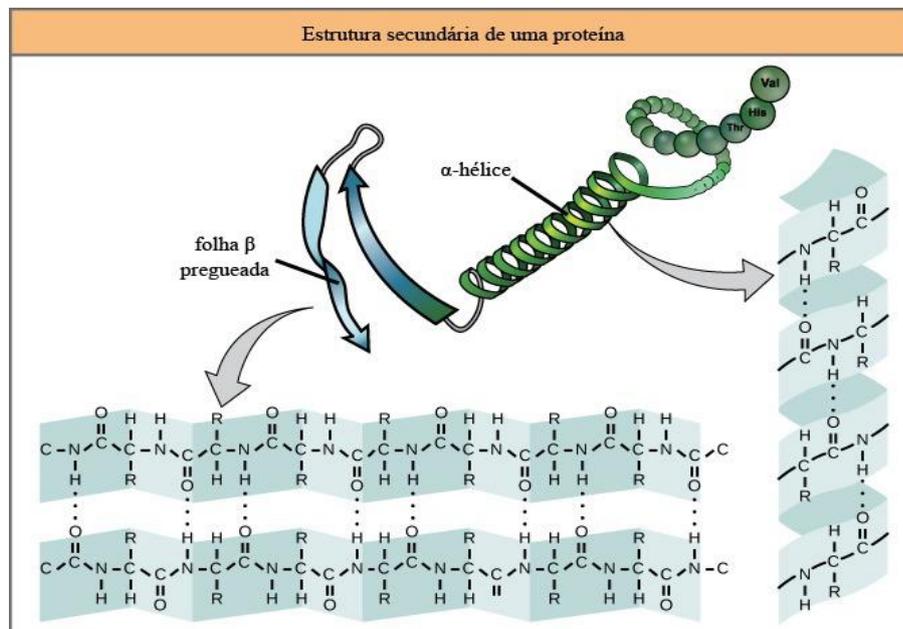
Figura 2 –Ligação de duas moléculas de aminoácidos (a) e deslocalização do par de elétrons do nitrogênio da amida (b).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Além disso, mais o hidrogênio ligado ao nitrogênio gera ligações de hidrogênio inter- e intramoleculares com as carbonilas, levando à formação de estruturas denominadas de folhas betas e de alfa hélices (**Figura 3**), (VOET, *et al.*, 2014) (LEHNINGER, 2013).

Figura 3 – Formação da estrutura secundária de uma proteína.

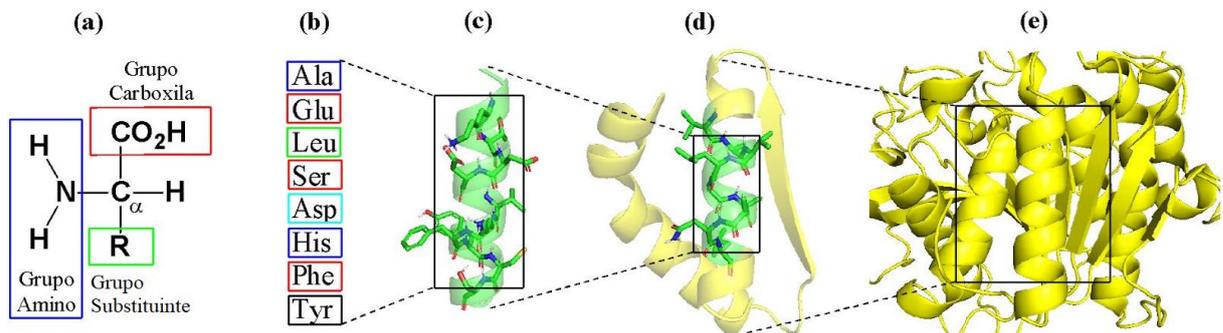


Fonte: Rye et al. (2016) com adaptações.

A estrutura terciária, em suma, é o produto das ligações covalentes da estrutura primária, das ligações de hidrogênio que compõem as folhas betas e alfa hélice e a

contribuição de interações de van der Waals, de outras ligações de hidrogênio e interações eletrostática dos resíduos de aminoácidos das cadeias peptídicas laterais. A estrutura quaternária, caso a enzima possua, é a junção de outras cadeias polipeptídicas interagindo entre si. A **Figura 4**, elaborada por NEGREIRO, 2021, ilustra a estrutura geral de um aminoácido e a estrutura de uma enzima que possui todas as quatro estruturas.

Figura 4 – Representação do aminoácido (a) e os níveis de estrutura proteica: primária (b), secundária (c), terciária (d) e quaternária (e).



Fonte: Negreiro, 2021

Concisamente, esta é a estrutura universal das enzimas. Entretanto, as enzimas diferem entre si pelas reações que elas catalisam. Por exemplo, as lipases em meio aquoso catalisam hidrólises, porém em solvente orgânico elas podem catalisar a reação inversa, a reação de esterificação ou até mesmo a reação de transesterificação (FABER, 2000). Segundo a “International Union of Biochemistry and Molecular Biology” (IUBMB), as enzimas podem ser divididas em seis classes, estas são definidas conforme o tipo de reação que catalisam, como demonstrado na **tabela 1**.

Continua Tabela 1 – Classificação das enzimas e reações que catalisam segundo IUBMB.

Classe de enzimas	Tipo de reação catalisada	Exemplos de enzimas
Oxidoredutases	Oxidação/redução, envolvendo a transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio e oxigênio	Desidrogenases, oxidases, oxigenases, peroxidases

Conclusão Tabela 1 – Classificação das enzimas e reações que catalisam segundo IUBMB

Transferases	Transferência de grupos funcionais, tais como, acila, metila, fosforila, amino	Aminoácido transaminases
Hidrolases	Reações de hidrólise, e em condições específicas a reação inversa	Lipases, acilases, nitrilases, esterases, amidases, proteases
Liases	Adição/eliminação sobre ligações C=C, C=N, C=O.	Aldolases, oxinitrilases, hidroxinitrila liases
Isomerases	Reações de isomerização	Sintetases, glicina ligase
Ligases	Formação/clivagem de duas moléculas frente a ligações C-O, C-S, C-N, C-C.	Racemases, glicose, isomerase

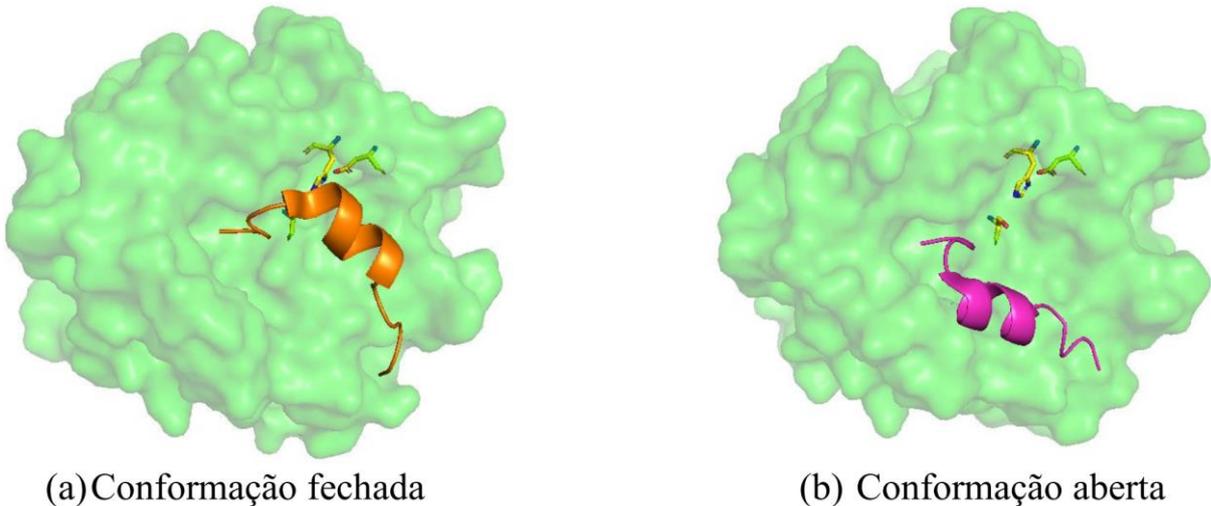
Fonte: Lehninger (2013)

1.2.1.1 Lipases

As lipases são um tipo de hidrolase e são denominadas de triacilglicerol hidrolases. Além de serem classificadas como EC 3.1.1.3 pela *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, isso significa que são hidrolases (EC 3), que atuam em ligações de ésteres (EC 3.1), especificamente em ésteres carboxílicos (EC 3.1.1) e são lipases (EC 3.1.1.3), (WEBB, 1992). As lipases, também, podem ser classificadas como α/β hidrolases, devido a presença de dobramentos de α -hélices e β -folhas. Dentre os dobramentos, as α -hélices funcionam como uma tampa hidrofóbica em algumas lipases, protegendo o sítio ativo. A presença da tampa hidrofóbica promove na lipase dois possíveis estados e a necessidade de um processo de remoção da tampa. O primeiro estado é a tampa fechada (**Figura 5a**) que causa a inativação da lipase, logo o sítio ativo não interage com o substrato. No segundo estado, a tampa encontra-se aberta (**Figura 5b**) permitindo que o substrato interaja com o sítio ativo e ocorra a catalise da reação. Esse processo de abertura da tampa é conhecido como ativação interfacial e deve-se à interação entre as fases água-óleo ou água-solvente orgânico que devido ao caráter bifásico hidrófilo-hidrofóbico promove o

deslocamento da “tampa” permitindo a entrada do substrato no sítio ativo (BORNSCHEUER e KAZLAUSKAS, 2006) (KHAN *et al.*, 2017).

Figura 5 – Lipase de *Thermomyces lanuginosus*, conformação fechada (a) (código PDB: 1DT3) e conformação aberta (b) (código PDB: 1EIN). As tampas fechada e aberta, bem como a tríade catalítica, foram destacadas pelas cores laranja, magenta e amarelo, respectivamente.



Fonte: Negreiro, 2021

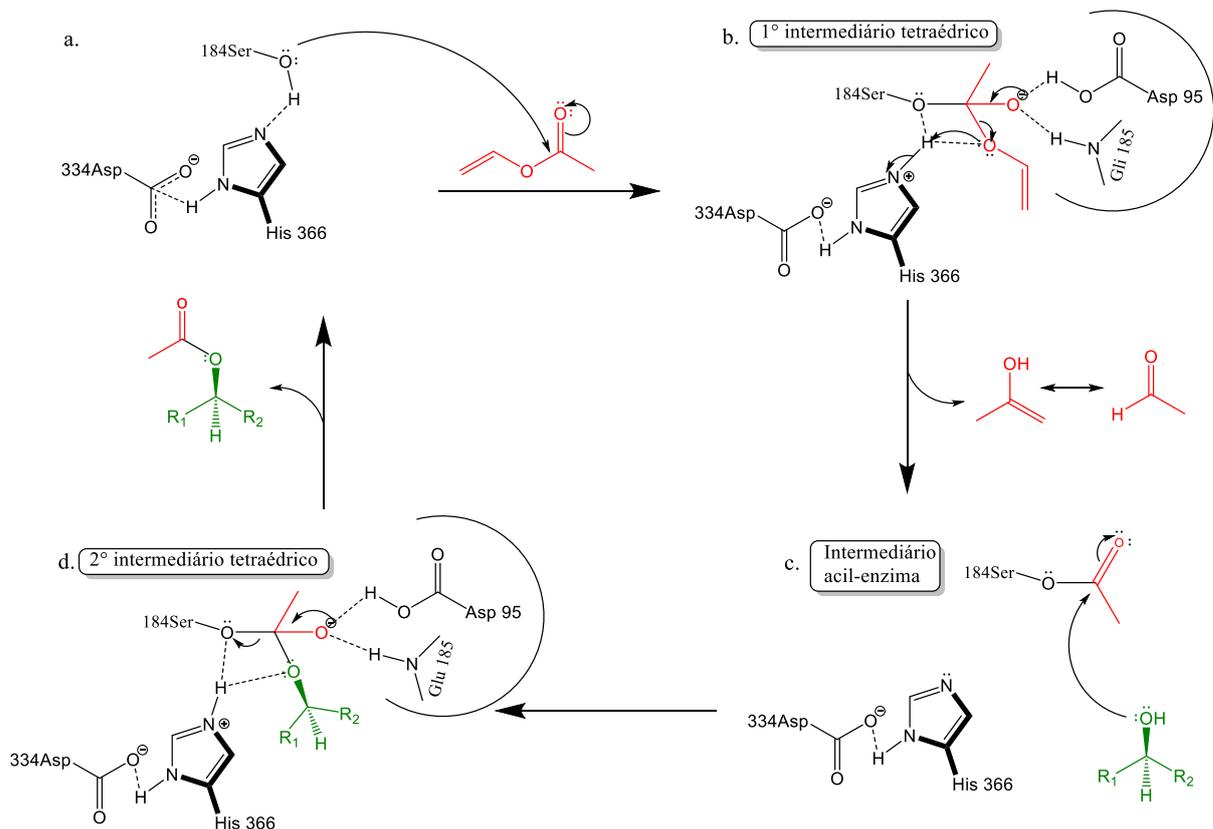
Em seguida, o deslocamento da α -hélice, o sítio ativo da lipase encontra-se livre para o possível encaixe com o substrato. Se ocorrer o encaixe, o mecanismo de ativação da lipase inicia-se com o envolvimento da tríade catalítica, que é composta pelos aminoácidos serina, histidina e aspartato, e dos resíduos de aminoácidos que compõem o bolsão oxianônico. Em reações de transesterificação, o mecanismo (Figura 6) consiste em (VEGA, 2020) (SIRÉN, *et al.*, 2020) (DAVI, 2022):

- a) Asp (334) forma uma ligação de hidrogênio com His (366), aumentando o pKa do segundo nitrogênio da histidina. Isso permite que a His (366) forme uma ligação de hidrogênio efetiva com a Ser (184). Essa ativação aumenta a nucleofilicidade do oxigênio da Ser (184) e permite um ataque nucleofílico ao carbono da carbonila do éster, com comitente desprotonação pelo nitrogênio da His (366).
- b) Forma-se o primeiro intermediário tetraédrico, o qual é estabilizado por resíduos estabilizadores de oxianions via ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos glicina (Gli 185) e aspartato (Asp 95), seguido da

restituição da ligação π da carbonila C=O, provocando a eliminação de um enol, que posteriormente se tautomeriza para um aldeído;

- c) Forma-se o intermediário acil-enzima que é atacado pelo oxigênio do álcool no seu carbono carbonílico (C=O), sendo o álcool é desprotonado pela His (366);
- d) Forma-se o segundo intermediário tetraédrico que novamente será estabilizado pelos resíduos estabilizadores de oxiânions, seguido da restituição da ligação π da carbonila C=O e saída do produto acetilado, com a restituição da Ser 184 ao desprotonar a histidina.

Figura 6 - Ciclo catalítico das lipases em uma reação de transesterificação com álcool secundário.



Fonte: SIRÉN, *et al.*, 2020 com adaptações.

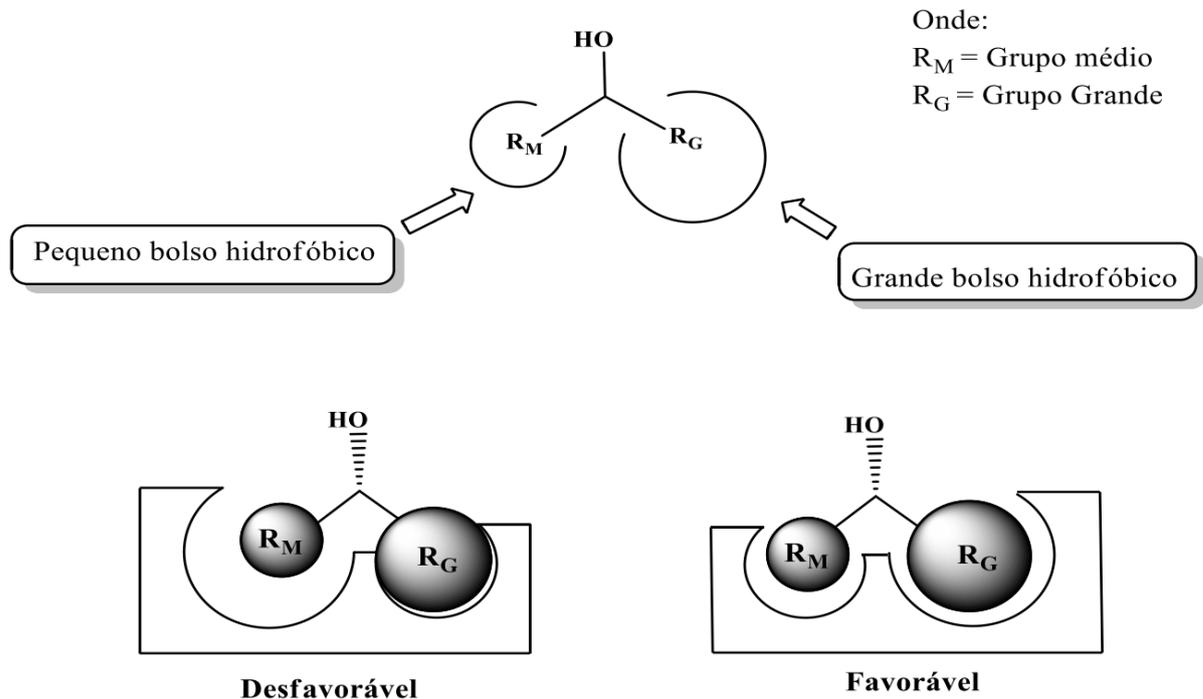
As lipases são comumente empregadas na produção de alimentos e de detergentes, além de se destacarem no enriquecimento enantiomérico de intermediários chaves na síntese de fármacos quirais. As vantagens em se utilizar as lipases incluem a grande variedade de enzimas disponíveis comercialmente, a alta gama de substratos reconhecidos por tais enzimas, a altíssima seletividade e o fato de não necessitarem de cofatores para realizar a catálise

(PYSER *et al.*, 2021). Essas características permitem aplicar lipases na resolução cinética de racematos que são intermediários chaves para a síntese de fármacos quirais.

1.2.1.2 Previsão da seletividade das lipases

Segundo KAZLAUSKAS *et al.* (1991) as resoluções cinéticas enzimáticas mediadas pelas lipases de álcoois secundários têm preferência pelo (*R*)-enantiômero em detrimento ao (*S*)-enantiômero devido às suas constantes de velocidade serem diferentes ($K_R \gg K_S$), tornando previsível o processo de separação dos enantiômeros com altos excessos enantioméricos. Essa especificidade por um enantiômero é explicada através dos dois bolsões do sítio catalítico, sendo um bolsão grande e o outro um bolsão pequeno. Nestes bolsões são acomodados os substituintes ligados ao centro estereogênico de um álcool secundário (**Figura 7**).

Figura 7 – Representação simplificada das cavidades de uma lipase, segundo a regra de Kazlauskas.



Fonte: DAVI, 2022.

1.2.1.3 Lipases imobilizadas

A solubilização da enzima, a dificuldade de tratamento pós-reação do produto na água, a inativação em solventes orgânicos, além da perda de estabilidade do biocatalisador são as principais dificuldades de utilizar enzimas livres no processo industrial. As consequências desses problemas causam ônus à economia que esses biocatalisadores podem trazer ao processo industrial (DATTA, et al., 2013). Em relação a esses problemas, uma solução estudada, nos últimos anos, foi a imobilização da enzima em um suporte insolúvel. Estes suportes permitem a fácil separação da enzima do meio reacional, melhora a estabilidade do biocatalisador em solventes orgânicos, evitando etapas de isolamento por troca de solventes e melhorando a solubilidade do substrato, além de tornar o processo mais limpo, pois evitará a contaminação do produto com a proteína utilizada (TRUPPO, 2017) (MATTE, et al., 2013).

Salienta-se, que o processo de imobilização por poder causar mudanças conformacionais na enzima, possibilita algumas interações entre a enzima e o suporte que acabe por desnaturar a proteína. Por esse motivo, busca-se aplicar um método eficiente e bem implementado para que a enzima seja imobilizada e se torne mais estável, mais ativa e mais seletiva (PINHEIRO, 2018). Os métodos de imobilização podem ser classificados de acordo com as interações enzima-suporte, caso haja interações por ligações fracas como ligações de hidrogênio, interações de van der Waals e interações hidrofóbicas, o que possibilita a reversibilidade do método por meio da dessorção da enzima. Neste caso, a imobilização da enzima é considerada um método físico e subdivide-se em:

- a) método de adsorção, em que a enzima se adsorve ao suporte através das interações fracas, o processo se desenvolve primeiro na difusão da enzima (etapa lenta) através da superfície do suporte e posteriormente adsorve no suporte (etapa rápida). O processo é de baixo custo e há pouca ou nenhuma alteração na estrutura da enzima devido à baixa interação com o suporte. Há interações de lipases com suportes hidrofóbicos por adsorção, como o octil-agarose glioxil-agarose, onde a lipase considera o suporte como a fase hidrofóbica e utiliza a tampa hidrofóbica para se adsorver no suporte, sendo a enzima imobilizada na sua conformação aberta (VOLPATO, 2009);
- b) método de encapsulamento, no qual as enzimas são retidas nos poros do suporte, os quais permitem a passagem de substratos e produtos, protegendo a enzima do contato direto com o meio reacional e evitando a inativação que

pode ocorrer devido à natureza do solvente da reação (FILHO GONÇALVES, *et al.*, 2019);

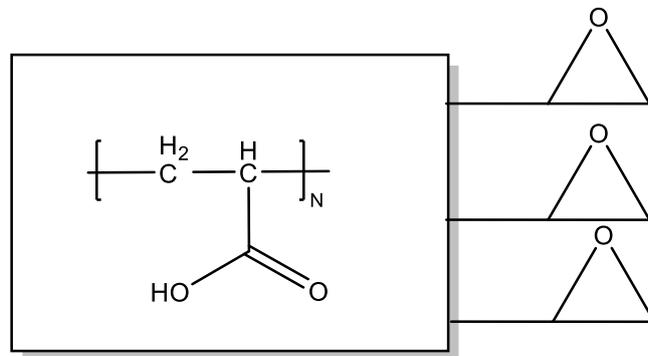
- c) método de confinamento, o qual consiste em uma matriz porosa formada por polimerização ao redor de cada molécula da enzima. O difícil controle na formação dos poros do suporte pode levar à lixiviação da enzima e a limitação de difusão do substrato e do produto dentro do suporte (CHANDRA, *et al.*, 2020).

No entanto, caso as interações sejam de natureza de ligações covalente, o que torna irreversível a imobilização, a imobilização é considerada um método químico e que subdividiu-se em:

- a) método de ligação covalente, o qual baseia-se na ativação de suportes com a inserção de grupos funcionais que reagem com os grupos nucleofílicos da enzima, como hidroxilamina, grupos carboxílicos, aminos, imidazólicos, tióis e fenólicos. Dentre os 20 aminoácidos que possuem esses grupos estão a lisina, cisteína, histidina, metionina, triptofano, arginina, ácido aspártico e glutâmico, sendo que os aminoácidos restantes não estão expostos para participar da ligação devido ao seu caráter hidrofóbico. Como a interação apresenta um caráter de ligação covalente, o biocatalisador torna-se altamente estável às alterações ambientais, tais como: agitação, pH, temperatura, presença de solventes, dentre outros (MATTE, *et al.*, 2013) (PINHEIRO, 2018) (VOLPATO, 2009);
- b) método de ligação covalente multipontual, o qual consiste em reagir os diversos grupos ativados do suporte com os aminoácidos da cadeia lateral de uma única enzima. Esse método promove um aumento elevado da rigidez da enzima em relação às mudanças conformacionais provocadas por agentes de distorção, sendo apropriado para produzir biocatalisadores mais estáveis frente às variações nas condições do ambiente reacional. Suportes de epóxidos ativados como immobead-150 (**figura 8**) são geralmente empregados neste método (MATTE, *et al.*, 2013) (PINHEIRO, 2018);
- c) método cross-linking, o qual baseia-se na formação de ligações cruzadas entre as moléculas de enzima por meio de agentes reticulantes, como o glutaraldeído. Diferencia-se do método de ligação covalente multipontual, pois a enzima pode ser previamente imobilizada em um suporte através de métodos físicos como adsorção, seguido da realização do cross-linking entre as próprias moléculas de

enzima e o suporte, formando ligações estáveis que previnem a dessorção da enzima no meio (PINHEIRO, 2018).

Figura 8 – Estrutura do Immobead 150.



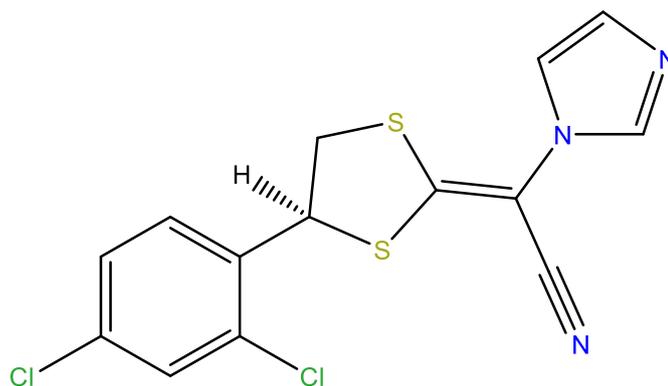
Polímero de
Metacrilato

Fonte: ALAGOZ, *et al.*, 2016

1.3 (R)-Iuliconazol

O (R)-Iuliconazol (**R-1**) (**figura 9**), conhecido comercialmente pela marca Luzu[®] para uso tópico, é um fármaco quiral antifúngico aplicado no tratamento de micosis causadas por dermatófitos como o *Trichophyton rubrum* e o *Epidermophyton floccosum*. Ambos são agentes patogênicos responsáveis não só pelas tineas pedis, cruris e corporis como também a onicomicose. Este fármaco foi desenvolvido em 2005 pela Nihon Nohyaku Co LTD (Osaka, Japão) e foi aprovado em território americano em 2015 pela FDA (Food and Drug Administration), demonstrando maior eficácia que outros antifúngicos tópicos. O (**R**)-**1** pertence à classe dos antifúngicos imidazólicos. Essa classe de antifúngico age inibindo a síntese ergosterol, um esteroide constituinte das membranas celulares dos fungos, pela inibição da enzima esteroide 14 α -desmetilase que é o alvo dos fármacos da classe imidazólicos devido ao nitrogênio piridínico do anel de cinco membros que coordenam com o ferro heme (Bausch Health Companies Inc., 2020) (PORTO *et al.*, 2021).

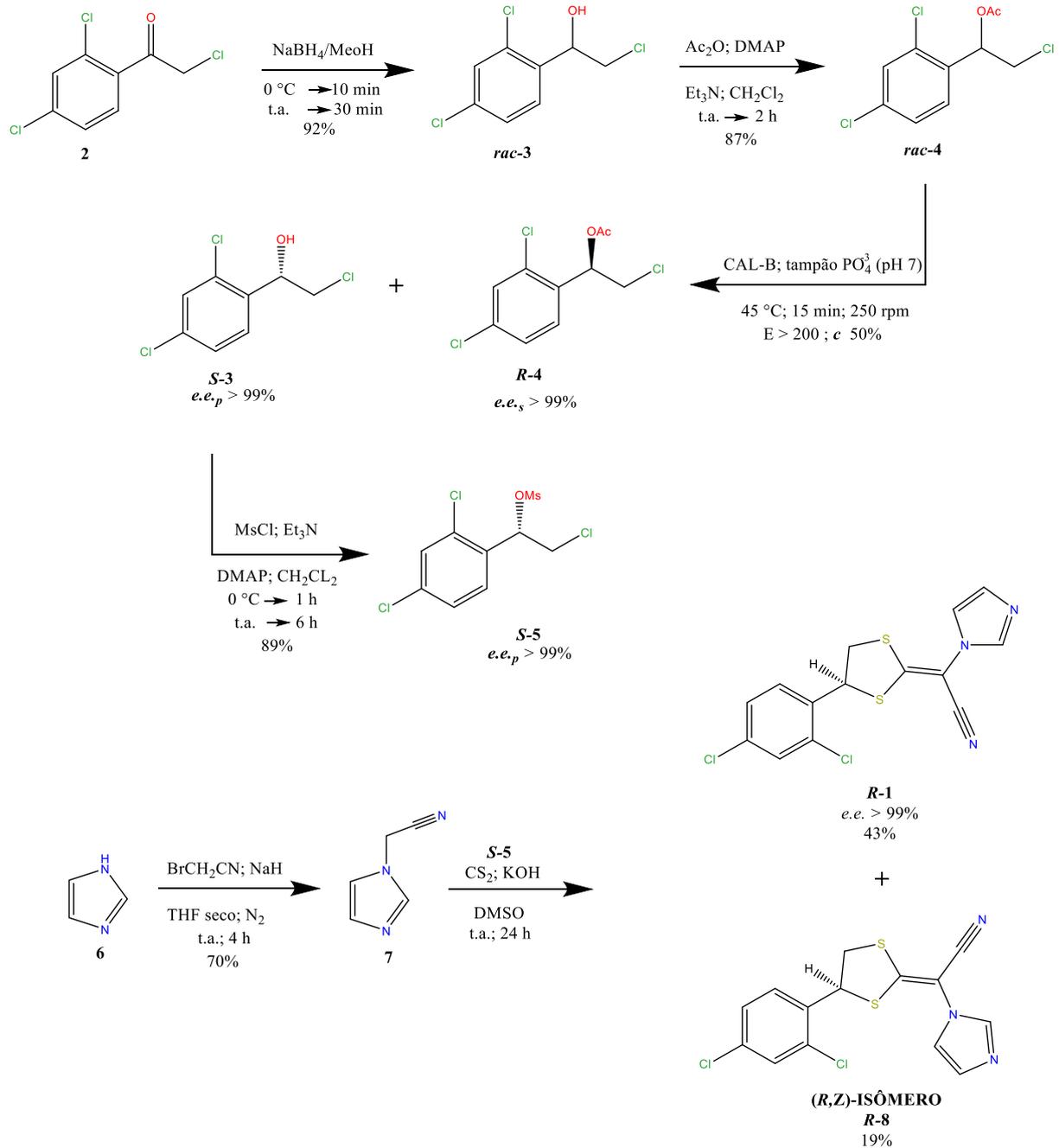
Figura 9 – (R)-luliconazol.

**R-1**

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

1.4 Resolução cinética enzimática *via* acetilação do 2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etanol (*rac*-3)

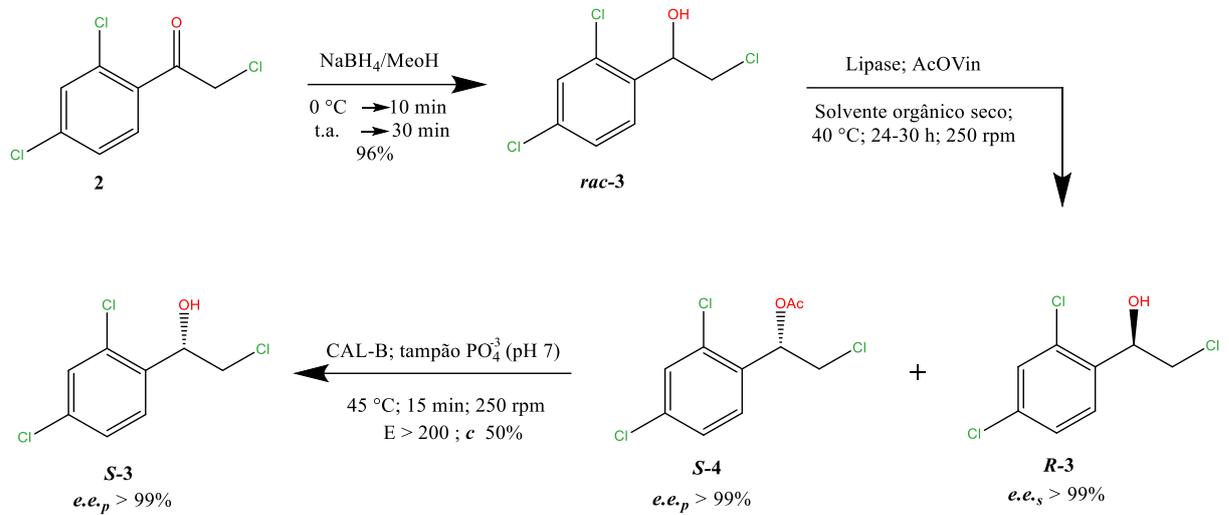
Segundo FONSECA *et al.* (2018) o *rac*-3 é um intermediário chave na síntese quimioenzimática do (R)-luliconazol (**R-1**). A síntese do *rac*-3 foi iniciada pela redução química da halocetona 2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etanonona (**2**) empregando boridreto de sódio em metanol, o produto da reação foi, posteriormente, acetilado quimicamente utilizando como doador de acila o anidrido acético com trietilamina (Et₃N) e DMAP como catalisadores em diclorometano (CH₂Cl₂) obtendo o *rac*-4. O correspondente acetilado foi submetido à resolução cinética catalisada lipase de *Candida antarctica* B (Novozym 435[®]) imobilizada em resina acrílica (CAL-B) em tampão fosfato, pH 7. Nestas condições, foi obtida a halodrina *S*-3 com um e.e. > 99% e com conversão igual a 50 % (**Esquema 1**). O *S*-3 foi submetido a um procedimento de mesilação utilizando cloreto de mesila com Et₃N e DMAP como catalisadores em CH₂Cl₂ obtendo (S)-2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)-2-metanossulfonato (**S-5**). Paralelamente, sintetizou-se o 1-cianometilimidazol (**7**) através da reação do imidazol (**6**) com a bromoacetonitrila e hidreto de sódio em THF. Em seguida, (**7**) foi submetido à uma reação com *S*-5 e disulfeto de carbono em meio básico por carbonato de potássio em dimetilformamida para a formação do produto (**R**)-1 como produto majoritário.

Esquema 1 – Síntese do (*R*)-luliconazol desenvolvida por Fonseca (2018).

Fonte: FONSECA, 2018.

A proposta desse trabalho é realizar a resolução cinética enzimática *via* acetilação de *rac*-**3**. Em seguida, o acetato de (*S*)-2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etila (*S*-**4**) será hidrolisado. FONSECA *et al.*, 2018, hidrolisaram o referido acetato utilizando a lipase CAL-B (esquema 1). Em suma, a nova rota quimioenzimática será composta com duas etapas que utilizam lipases, o que torna a síntese do (*R*)-luliconazol (*R*-**1**) em consonância com os princípios da química verde (esquema 2).

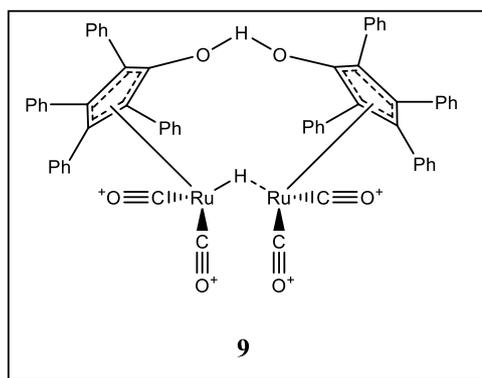
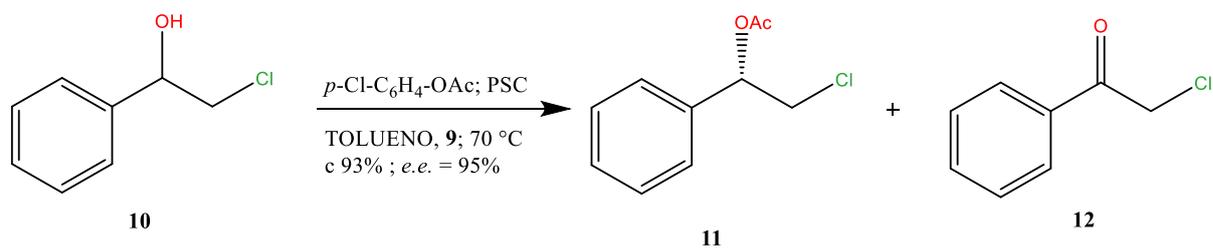
Esquema 2 – Proposta de síntese do (*S*)-**3**, intermediário do (*R*)-luliconazol (*R*-**1**), a ser desenvolvida neste projeto.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Esta rota alternativa via reação de acetilação, possibilitará estudos de resolução cinética dinâmica do *rac*-**3** com o catalisador de racemização por oxirredução conhecido como catalisador de Shvo. Este catalisador tem sido utilizado na resolução cinética dinâmica de diversas β -haloidrinas. No **Esquema 3** encontra-se exemplificado a resolução cinética dinâmica de *rac*-2-cloro-1-feniletanol (**10**), na presença da lipase de *Pseudomonas cepacia* e o catalisador de racemização Shvo (**9**). Sob as condições descritas no **Esquema 3**, obteve-se o (*S*)-acetato de 2-cloro-1-feniletila (**11**) com uma conversão de 93% e excesso enantiomérico de 95%. (PÁMIES, BÄCKVALL, 2002).

Esquema 3 – Resolução cinética dinâmica do 2-cloro-1-feniletanol.



Fonte: PÁMIÉS, BÄCKVALL, 2002

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar a resolução cinética enzimática mediada por lipases *via* acetilação do *rac*-2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etanol (*rac*-**3**).

2.2 Objetivo específicos

- Estudar a atividade das enzimas disponíveis comercialmente em diferentes solventes orgânicos apolares e polares apróticos;
- Otimizar a condição reacional com base nos testes iniciais;
- Realizar o reuso da enzima na condição otimizada;
- Obter o enantiômero **R-3** com alto excesso enantiomérico para futuros testes de racemização;
- Hidrolisar o (*S*)-acetato de 2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etila (*S*-**4**).

3 MATERIAIS

3.1 Solventes e reagentes

Os reagentes e os solventes utilizados neste trabalho estão listados na **tabela 2**.

Tabela 2 – Solventes e reagentes utilizados neste trabalho.

Solventes e/ou reagentes	Procedência
Acetato de etila	SYNTH [®]
Clorofórmio	SYNTH [®]
Diclorometano	SYNTH [®]
Hexano	SYNTH [®]
Tolueno	SYNTH [®]
Metanol	NEON [®]
Cicloexano	SIGMA-ALDRICH [®]
Heptano	SIGMA-ALDRICH [®]
Metil- <i>tert</i> -butil éter (MTBE)	SIGMA-ALDRICH [®]
Acetonitrila grau CLAE	M TEDIA [®]
Acetato de etila grau CLAE	M TEDIA [®]
Tetraidrofurano (THF) grau CLAE	BIO-GRADE [®]
2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etanona	SIGMA-ALDRICH [®]
Acetato de vinila	SIGMA-ALDRICH [®]
Boridreto de sódio	SIGMA-ALDRICH [®]
<i>N,N</i> -dimetilaminopiridina (DMAP)	SIGMA-ALDRICH [®]
Trietilamina	SIGMA-ALDRICH [®]
Anidrido acético	DINÂMICA [®]

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

3.2 Lipases

As lipases utilizadas neste trabalho estão listadas na **tabela 3**.

Tabela 3 – Solventes e Reagentes utilizados neste trabalho.

Lipases	Procedência
Lipase de <i>Candida antarctica</i> imobilizada em resina acrílica	SIGMA-ALDRICH [®]
Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada em imobead 150	SIGMA-ALDRICH [®]
Lipase de <i>Candida antarctica</i> do Tipo A imobilizada em imobead 150, recombinada com <i>Aspergillus oryzae</i>	SIGMA-ALDRICH [®]
Lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> imobead 150	SIGMA-ALDRICH [®]
Lipase do pâncreas suíno	SIGMA-ALDRICH [®]
Amano lipase de PS-IM imobilizada em terra diatomáceas	SIGMA-ALDRICH [®]
Lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> imobilizada em Sol-gel-AK em púmice	SIGMA-ALDRICH [®]

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

3.3 Adsorventes e reveladores

Cromato folhas de alumínio cobertas com gel de sílica 60 F₂₅₄- da marca MERCK[®]. As cromato folhas foram reveladas com radiação ultravioleta (UV) emitida por lâmpada modelo UVSL – 25 da MINERAL LIGHT[®] em um comprimento de onda curto (254 nm) e vanilina de procedência NEON[®].

As purificações foram realizadas em colunas cromatográficas de comprimento e diâmetro convencionais utilizando gel de sílica 60 (φ 0,063 – 0,200 mm) da marca SIGMA-ALDRICH[®].

3.4 Equipamentos

Os sistemas reacionais e soluções de solventes orgânicos foram concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotativo RV 10 digital de procedência IKA[®] acoplado a uma bomba de vácuo de diafragma GM-0.5 de procedência CE[®].

O cromatógrafo gasoso da marca Shimadzu[®] de modelo GC 2010 com um detector DIC e um auto injetor da marca Shimadzu[®] de modelo AOC-20i. Para fase estacionária, utilizou-se uma coluna quiral modelo CP-ChiraSil-DEX CB de comprimento 25

m, diâmetro interno e externo de 0,25 mm e 0,39 mm, respectivamente, e espessura de filme de 0,25 μm . Já para a fase móvel foi utilizado o gás nitrogênio 0,4 bar.

3.5 Condições de análise no CG

Condições de análise: 130 °C (5 min); 0,5 °C/min. 145 °C (8 min); 3 °C/min. 160 °C (5 min); 5 °C/min. 200 °C (10 min). Os tempos retenção de cada enantiômero estão relatados na **tabela 4**.

Tabela 4 – Tempos de retenção dos enantiômeros na análise por CG.

Entrada	Enantiômeros	Tempo de retenção (min)
1	(<i>S</i>)-3	52,426
2	(<i>R</i>)-3	56,023
3	(<i>S</i>)-4	37,345
4	(<i>R</i>)-4	37,848

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1 Secagem de solventes

Os solventes acetonitrila, cicloexano, diclorometano, heptano, hexano foram tratados com hidreto de cálcio sob refluxo em atmosfera de nitrogênio durante 30 min. Os solventes metil-*tert*-butil éter (MTBE) e tetraidrofurano (THF) passaram por uma pré-secagem com hidreto de cálcio, sob refluxo, seguido de secagem com sódio metálico em benzofenona, sob refluxo, em atmosfera de nitrogênio, até a solução adquirir uma cor azulada. (VEGA, 2020)

4.2 Obtenção da halodrina 2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etanol (*rac*-3)

1 g de **2** (1 eq.) foi dissolvido em 40 mL de metanol (0,1 M), seguido da adição de 85,11 mg (0,5 eq.) de NaBH₄. O sistema reacional foi agitado por 10 min à 0 °C. Após esse período, a reação foi aquecida à temperatura ambiente e agitada por 30 min. Ao término deste tempo, evaporou-se o metanol à pressão reduzida. Adicionou-se 10 mL de HCl 1 M e extraiu o produto com AcOEt (4 x 60 mL). As fases orgânicas foram reunidas e tratadas com Na₂SO₄ anidro, seguido de filtração e evaporação do solvente sob pressão reduzida. Em seguida, o produto bruto foi purificado em coluna cromatográfica usando como fase estacionária gel de sílica e como fase móvel hexano e clorofórmio 1:1. Após esse procedimento, foi obtida 970,6 mg da halodrina *rac*-3 (96% de rendimento) como um sólido branco com R_f (1:1 Hex:CHCl₃) = 0,37.

4.3 Obtenção do acetato de 2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etila (*rac*-4)

50 mg (1 eq.) de *rac*-3 foi dissolvido em 2 mL CH₂Cl₂. Em seguida, adicionou-se 13,5 mg (0,5 eq.) de DMAP, 15,4 µL de Et₃N (1 eq.) e 21 µL de Ac₂O (3 eq.). Após 2 horas de reação, adicionou-se 1 mL de água destilada e extraiu-se a fase aquosa com CH₂Cl₂ (3 x 10 mL). As fases orgânicas foram reunidas, tratadas com Na₂SO₄ anidro, seguido de filtração e evaporação do solvente sob pressão reduzida. Em seguida, o produto bruto foi purificado em coluna cromatográfica usando como fase estacionária gel de sílica e como fase móvel hexano e clorofórmio 1:1. Após esse procedimento, foi obtida 48,26 mg do acetato *rac*-4 (82% de rendimento) como um sólido branco com R_f (1:1 Hex:CHCl₃) = 0,87.

4.4 Reação de resolução cinética enzimática *via* acetilação do *rac-3*

Em um Erlenmeyer esmerilhado de 5 mL foram adicionados 10 mg (1 eq.) de *rac-3* e 20 mg de lipase (2 de enzima: 1 substrato, m:m), seguido de vedação com um septo. O sistema foi submetido a vácuo para purgar o ar, seguido de adição de N₂. Posteriormente, adicionou-se solvente orgânico seco para dissolver o substrato até perfazer uma concentração de 0,1 M, seguido da adição de 40,88 µL de acetato de vinila (10 eq.). O sistema reacional foi agitado a 250 rpm em “shake” orbital a 40 °C por 24 h. A agitação estendeu-se por 30 h. Após esse tempo de reação, foi realizada uma análise no cromatográfica gasoso acoplado ao detector por ionização em chama (CG-DIC), coletando 50 µL do sistema reacional e diluindo em 1 mL de AcOEt grau CLAE.

4.5 Reações de reuso da CAL-A

Em um Erlenmeyer esmerilhado de 5 mL, foram adicionados 50 mg de *rac-3* e 100 mg de lipase (2 de enzima: 1 substrato, m:m), seguido de vedação com um septo. O sistema foi submetido a vácuo para purgar o ar, seguido de adição de N₂. Em seguida, dissolveu-se o substrato em solvente orgânico seco até perfazer a concentração de 0,1 M, seguido da adição de 204,38 mL de acetato de vinila (10 eq.). O sistema reacional foi agitado a 250 rpm em “shake” orbital a 40 °C por 30 h. Ao término de cada ciclo, a lipase foi separada do meio reacional por filtração a vácuo e foi lavada com acetonitrila grau CLAE (3 x 10 mL). Em seguida, retirou-se uma alíquota (0,2 mL) da água mãe e diluiu-se em 1 mL de AcOEt grau CLAE. A alíquota foi analisada em CG-DIC. Esse procedimento foi realizado em todos os 5 ciclos.

4.6 Hidrólise enzimática do (*S*)-4

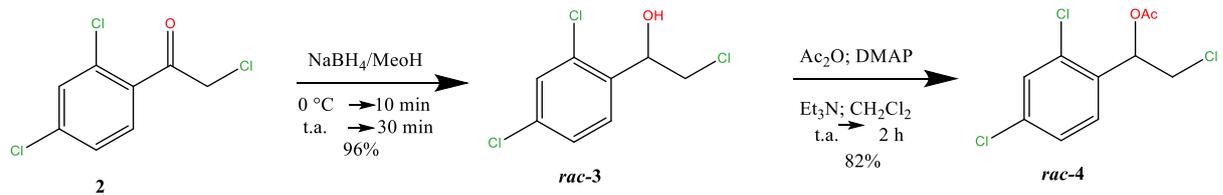
A hidrólise enzimática de (*S*)-4 foi realizada utilizando a proporção 1:0,5 de substrato e CAL-B em tampão fosfato (0,1 mM, pH 7). A reação ocorreu em um “shaker” orbital à 45 °C por 15 minutos. Após esse tempo, o meio reacional foi extraído com AcOEt (3 x 5 mL). As fases orgânicas foram reunidas e tratadas com Na₂SO₄ anidro, seguido de filtração e evaporação à pressão reduzida. Posteriormente, diluiu-se 1 mg do produto bruto em 1 mL de AcOEt grau CLAE e analisou-se a amostra em CG-DIC.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese do *rac*-2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etanol (*rac*-3) e do *rac*-acetato de 2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etila (*rac*-4)

Inicialmente, as sínteses de *rac*-3 e de *rac*-4 foram realizadas, primeiramente, para que os correspondentes enantiômeros fossem separados em CG-DIC, utilizando uma coluna quiral. O segundo objetivo foi sintetizar *rac*-3 para ser utilizado como substrato nas resoluções cinéticas enzimática, via reação de acetilação. A síntese de *rac*-3 ocorreu sem a formação de epóxido, com rendimento de 96%. A síntese de *rac*-4 ocorreu sem formação de subprodutos, com rendimento de 82%. Desta forma, uma vez de posse dos padrões *rac*-3 e *rac*-4 (produto que será formado na resolução cinética de *rac*-3), procedemos com a triagem das lipases.

Esquema 4 – Síntese do *rac*-3 e do *rac*-4.

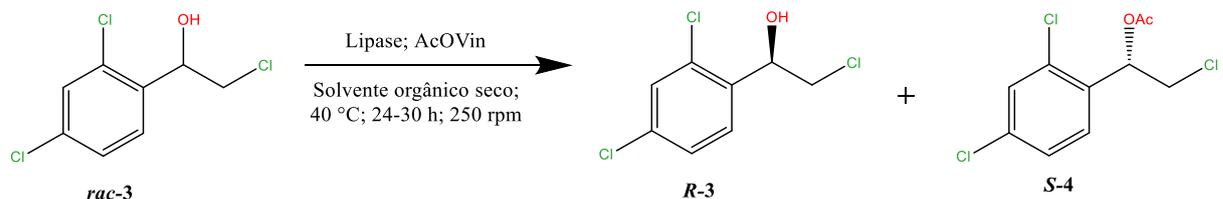


Fonte: Elaborado pelo próprio autor

5.2 Triagem de lipases na resolução cinética de *rac*-3 via reação de acetilação

Inicialmente, realizou-se a triagem com sete lipases comerciais (**item 3.2**) em seis solventes orgânicos secados previamente, e segundo metodologia relatada no **item 4.4** (**esquema 5**). As análises das amostras foram realizadas com o método relatado no **item 3.5**.

Esquema 5 – Resolução cinética enzimática *via* reação de acetilação do *rac*-3 utilizando lipases, em meio orgânico.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Ao final da triagem, apenas a lipase de *Candida antarctica* do tipo A imobilizada em imobead 150, recombinada com *Aspergillus oryzae* (CAL-A) apresentou atividade satisfatória na triagem, com conversões acima da 20% em todos os seis solventes testados (**tabela 5**). As outras seis lipases levaram a valores de conversão entre 1-14%. Diante de tais resultados, a CAL-A foi escolhida como a lipase a ser utilizada nos próximos experimentos. Os resultados obtidos na triagem de lipases encontram-se apresentados no **APÊNDICE A**.

Tabela 5 – Resultados obtidos na resolução cinética de *rac-3* mediada pela CAL-A, em solventes orgânicos, em 24 horas de reação à 40 °C.

Entrada	Solvente (Log P) ^[d]	Classificação de risco	<i>ee_s</i>(%) ^a	<i>ee_p</i>(%) ^a	<i>C</i>(%) ^b	<i>E</i> ^c
1	Heptano (4,00)	0,8021	79	80	50	22
2	Hexano (3,50)	0,7057	63	58	52	7
3	Cicloexano (3,20)	0,7892	64	63	50	8
4	TBME (1,43)	não relatado	69	93	43	56
5	THF (0,49)	não relatado	13	>99	22	>200
6	Acetonitrila (-0,33)	0,8687	52	>99	34	>200
7^e	Acetonitrila (-0,33)	0,8687	> 99	97	50	>200

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

^[a]Determinado por GC; ^[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] da Silva e Nascimento (2014)

^[e]30 h de reação

O log P representa uma escala quantitativa da polaridade de um solvente tomando como referência a razão octanol/água (Fonseca *et al.*, 2015), caso o log P seja < 2 o solvente é

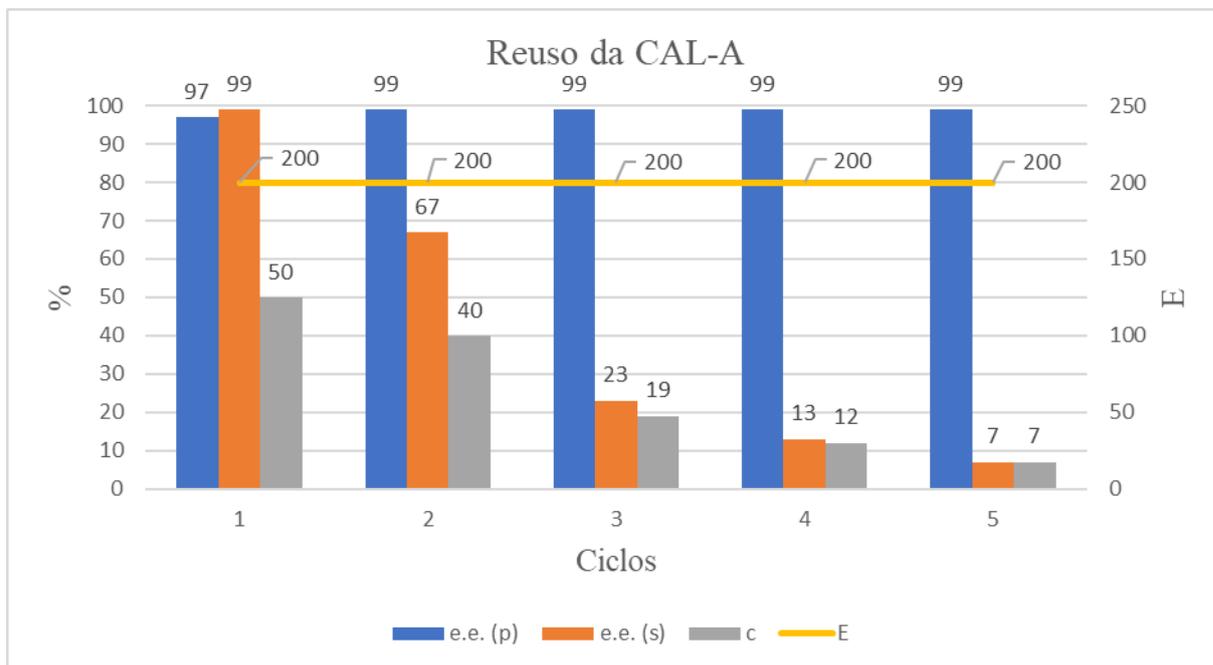
considerado hidrofílico, enquanto > 2 , o solvente é considerado hidrofóbico (BAECK *et al.*, 2022). Segundo LAANE *et al.*, 1987, a atividade de enzimas em solventes de log P de baixos valores (hidrofóbicos) é maior em relação à obtida em solventes de log P de altos valores (hidrófilos). Os solventes hidrófilos são propícios a remover a água do sítio ativo, essencial para a atividade catalítica da enzima. Nota-se que os valores de log P do heptano, hexano e cicloexano são bem próximos (**Tabela 3**, entradas **1**, **2** e **3**), levando a valores de conversão em torno de 50%. Conforme os solventes se tornam mais hidrófilos, como TBME e THF (**Tabela 3**, entradas **4** e **5**), os valores de conversão diminuíram para 43 e 22% respectivamente, com exceção da acetonitrila (**Tabela 3**, entrada **6**) que é um solvente mais hidrófilo e que levou a um valor de conversão moderado.

Entre os seis solventes testados, destacaram-se o THF e a acetonitrila (**entradas 5 e 6** respectivamente), os quais levaram a uma maior seletividade, ambas > 200 em 24 h de reação, todavia com valores de conversão moderados. Entre o THF e a acetonitrila, escolheu-se a acetonitrila para a realização de novos experimentos. Tal escolha foi devido a classificação de risco do referido solvente, fator que leva em consideração as propriedades físico-químicas e risco a saúde humana e ambiental (YILMAZ e SOYLAK (2020)). O valor de classificação de risco para a acetonitrila (0,8687) é o mais próximo do solvente de referência que é a água, com classificação de risco igual à 1,000. Cabe ressaltar que a classificação de risco do THF não foi relatada. Em um novo experimento, a resolução cinética de *rac*-**3** foi realizada alterando o tempo reacional de 24 para 30 h. Sob tais condições reacionais, a resolução cinética de *rac*-**3** levou a formação do acetato (*S*)-**4** com 97% de excesso enantiomérico (*ee*), da halodrina remanescente (*R*)-**3** com *ee* $> 99\%$, 50% de conversão e razão enantiomérica (*E*) > 200 (**Tabela 3**, entrada **7**).

5.3 Estudo de reuso da CAL-A na resolução cinética de *rac*-**3**, via reação de acetilação

O estudo do reuso da CAL-A (proporção 1:2, substrato: enzima, m:m) foi realizado nas condições reacionais aperfeiçoadas para a resolução cinética de *rac*-**3**: acetonitrila seca como solvente, acetato de vinila como agente doador de acila, 40 °C, 250 rpm e 30 h de reação. Ao término de cada ciclo, a lipase foi separada do meio reacional por filtração a vácuo e foi lavada com acetonitrila grau CLAE (3 x de 10 mL). Os resultados obtidos encontram-se apresentados no **gráfico 1**.

Gráfico 1 – Resultados do reuso da CAL-A.



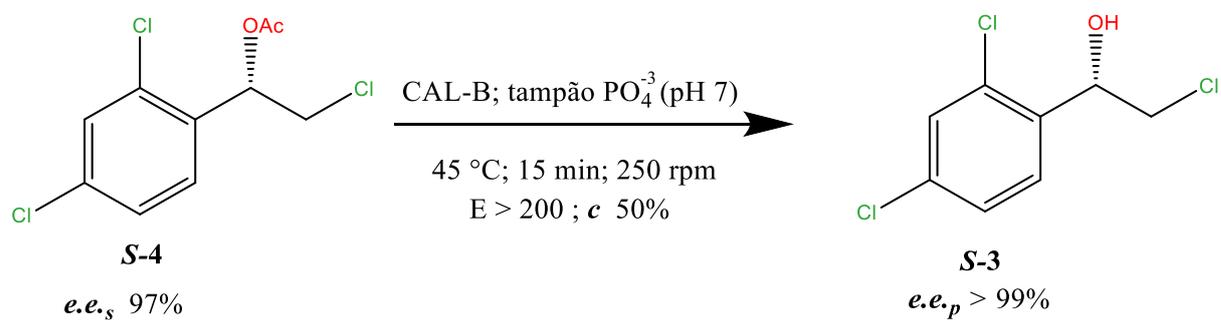
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Ocorreu uma redução da atividade da lipase no segundo ciclo com a conversão de 40% e a atividade diminuiu acentuadamente no terceiro (19%), quarto (12%) e quinto (7%) ciclos. Concernente à seletividade, observou-se um aumento no excesso enantiomérico do produto acetilado de 97% no primeiro ciclo para 99% no segundo ciclo; esse valor manteve-se inalterado até o quinto ciclo reacional. Portanto, a CAL-A apresentou apenas 2 ciclos reacionais com alta atividade e seletividade

5.4 Hidrólise do (S)-acetato de 2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etila (S-4)

O produto da reação de acetilação mediada por lipase CAL-A foi o (S)-4. Entretanto o intermediário chave para a síntese do fármaco (R)-luliconazol (R-1) é a correspondente halodrina (S)-3. Para a obtenção de (S)-3 foi utilizado a metodologia relatada por FONSECA *et al.*, 2018. A hidrólise do acetato (S)-4 (97% *ee*), na presença da lipase CAL-B, levou à halodrina (S)-3 com > 99% *ee*.

Esquema 6 – Reação de hidrólise enzimática do (S)-4.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

6. CONCLUSÃO

A resolução cinética enzimática do *rac*-2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etanol (***rac*-3**) foi realizada na presença de lipases, via reação de acetilação. A lipase de *Candida antarctica* do tipo A (CAL-A) imobilizada em imobead 150, recombinada com *Aspergillus oryzae* foi a enzima mais eficiente na resolução cinética de ***rac*-3**, levando ao (*S*)-acetato de 2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etila (***S*-4**) com excesso enantiomérico de 97% e a haloidrina remanescente (*R*)-2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etanol (***R*-3**) com *ee* > 99%, em 30 h, 40 °C, na presença de acetato de vinila como doador de acila e acetonitrila como solvente. Em tais condições, a resolução cinética de ***rac*-3** ocorreu com 50 % de conversão e com uma razão enantiomérica (*E*) > 200.

As atividades das lipases avaliadas foram relacionadas com os valores de log P dos solventes utilizados. Notou-se que os solventes apolares, mais hidrofóbicos, como heptano (*c* 50%), hexano (*c* 52%) e cicloexano (*c* 50%) levaram a valores mais altos de conversão em comparação a solventes polares apróticos, mais hidrófilos, como MTBE (*c* 43%), THF (*c* 22%) e acetonitrila (*c* 34%). Por outro lado, dentre os solventes avaliados na resolução cinética de ***rac*-3**, a acetonitrila e o THF foram os que levaram aos mais altos valores de seletividade (*E* > 200). A acetonitrila foi escolhida como solvente ideal na resolução cinética de ***rac*-3** por possuir um valor de classificação de risco (0,8687) mais próximo da água (1,00) classificado como solvente de referência.

O estudo de reuso da CAL-A foi realizado nas condições otimizadas para a resolução cinética de ***rac*-3**. Foram avaliados cinco ciclos reacionais e somente nos dois primeiros ciclos foram mantidos valores de conversão entre 40 e 50%; valores de excesso enantiomérico do produto (***S*-4**) entre 97 e 99%. No terceiro (*c* 19%), quarto (*c* 12%) e quinto (*c* 7%) ciclos reacionais os valores de conversão apresentaram uma drástica diminuição, ainda que a seletividade tenha permanecido notavelmente alta [*ee* de (***S*-4**) > 99%].

A hidrólise do acetato (***S*-4**) (97% *ee*) foi eficientemente realizada na presença de CAL-B, levando a obtenção da haloidrina (***S*-3**) com excesso enantiomérico > 99%.

REFERÊNCIAS

BIOLOGICAL Macromolecules. *In*: RYE, Connie; WISE, Robert; JURUKOVSKI, Vladimir; DESAIX, Jean; CHOI, Jung; AVISSAR, Yael. **Biology**. Texas: OpenStax, 2016. cap. Proteína. Disponível em: <https://openstax.org/books/biology/pages/3-4-proteins>. Acesso em: 26 jul. 2022.

BLASER, Hans-Ulrich. Chirality and its implications for the pharmaceutical industry. **Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali**, Roma, ano 2013, v. 24, ed. 1, p. 213-216, 9 jan. 2013. DOI 10.1007/s12210-012-0220-2. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12210-012-0220-2>. Acesso em: 25 jul. 2022.

BORNSCHEUER, U. T.; KAZLAUSKAS, R. J. **Hydrolases in Organic Synthesis**. 2nd. Weinheim: Wiley-VCH, 2006.

DA SILVA, Jaqueline M. R.; NASCIMENTO, Maria da Graça. Epoxidação do β -cariofileno com lipases imobilizadas em gel de ágar. **Química Nova**, [s. l.], v. 37, ed. 6, p. 1022-1027, 30 jun. 2014. DOI 10.5935/0100-4042.20140171. Disponível em: http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=199. Acesso em: 2 jul. 2022.

DATTA, Sumitra; CHRISTENA, L. Rene; RAJARAM, Yamuna Rani Sriramulu. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 BIOTECH**, [s. l.], v. 3, ed. 1, 3 fev. 2013. DOI 10.1007/s13205-012-0071-7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3563746/#>. Acesso em: 2 jul. 2022.

DAVI, Dalila Maria Barbosa. **EMPREGO DE LIPASES NA RESOLUÇÃO CINÉTICA DO RAC-1- [TRIS(ISOPROPIL)SILIL]PENTA-1,4-DIIN-3-OL, UM IMPORTANTE INTERMEDIÁRIO PARA SÍNTESE DE ALQUINIL CARBINÓIS LIPÍDIOS**. 2022. 59 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Programa de PósGraduação em Química da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022.

DOBLE, Mukesh; KRUTHIVENTI, Anil Kurnar; GAIKAR, Vilas Gajanan. Enzyme: Structure and Functions. *In*: DOBLE, Mukesh; KRUTHIVENTI, Anil Kurnar; GAIKAR, Vilas Gajanan. **Biotransformations and Bioprocesses**. Nova Iork: MARCEL DEKKER,

INC., 2004. p. 31-56. ISBN 0-8247-4775-5.

Faber, K.; **Biotransformations in Organic Chemistry**; 4 ed.; Germany; Ed. Springer – Verlag; 2000.

FILHO, Danielle Gonçalves; SILVA, Amanda Gonçalves; GUIDINI, Carla Zanella. Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Alemanha, ano 2019, v. 103, ed. 1, p. 7399–7423, 2 ago. 2019. DOI 10.1007/s00253-019-10027-6. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-019-10027-6#Fig3>. Acesso em: 29 jul. 2022.

FONSECA, T. S.; SILVA, M. R.; OLIVEIRA, M. C. F.; LEMOS, T. L. G.; MARQUES, R. A.; MATTOS, M. C. Chemoenzymatic synthesis of rasagiline mesylate using lipases. **Applied Catalysis A: General**, v. 492, p. 76-82, 2015.

FONSECA, Thiago de Sousa. **Sínteses quimioenzimáticas dos fármacos (R)-luliconazol, (R)-clorprenalina e análogos e síntese química de substâncias imidazólicas**. 2017. 210 f. Tese (Doutorado em Química)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

GROGAN, Gideon. Biotransformations, Microbes and Enzymes. *In*: GROGAN, Gideon. **Practical Biotransformations: A Beginner's Guide**. 1. ed. United Kingdom: A John Wiley and Sons, Ltd., Publication, 2009.

HUGHES, Greg; LEWIS, Jared C. Introduction: Biocatalysis in Industry. **CHEMICAL REVIEWS**, [s. l.], ano 2018, v. 118, ed. 1, p. 1-3, 10 jan. 2018. DOI 10.1021/acs.chemrev.7b00741. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.chemrev.7b00741>. Acesso em: 1 jun. 2022.

KAZLAUSKAS, Romas J.; WEISSFLOCH, Alexandra N. E.; RAPPAPORT, Aviva T.; CUCCIA, Louis A. A Rule To Predict Which Enantiomer of a Secondary Alcohol Reacts Faster in Reactions Catalyzed by Cholesterol Esterase, Lipase from *Pseudomonas cepacia*, and Lipase from *Candida rugosa*. **J. Org. Chem.**, Washington, ano 1991, v. 56, ed. 8, p. 2656-2665, 1 abr. 1991. DOI 10.1021/jo00008a016. Disponível em: <https://pubs.acs.org/action/doSearch?AllField=A+Rule+To+Predict+Which+Enantiomer+of+>

a+Secondary+Alcohol+Reacts+Faster+in+Reactions+Catalyzed+by+Cholesterol+Esterase%2C+Lipase+from+Pseudomonas+cepacia%2C+and+Lipase+from+Candida+rugosa. Acesso em: 2 jul. 2022.

KHAN, F. I.; LAN, D.; DURRANI, R.; HUAN, W.; ZHAO, Z.; WANG, Y.. The lid domain in lipases: structural and functional determinant of enzymatic properties. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 5, p. 1–13, 2017. Disponível em:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2017.00016/full#:~:text=The%20increased%20activity%20of%20lipases,et%20al.%2C%202009>. DOI 10.3389/fbioe.2017.00016.

Acesso em: 27 jul. 2022.

KLEIN, David. Estereoisomeria: Introdução à Estereoisomeria. *In*: KLEIN, David. **Química Orgânica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora Ltda., 2016. v. 1, cap. 5, p. 193-199. ISBN 978-85-216-3105-7.

KORHONOVA, Martina; BARTONKOVA, Iveta; DVORAK, Zdenek. Differential Effects of Omeprazole and Lansoprazole Enantiomers on Aryl Hydrocarbon Receptor in Human Hepatocytes and Cell Lines. **PLOS ONE**, [s. l.], ano 2014, v. 9, ed. 6, 2 jun. 2014. DOI 10.1371/journal.pone.0098711. Disponível em:

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0098711>. Acesso em: 25 jul. 2022.

LAANE, Colja *et al.* Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 30, ed. 1, p. 81-87, 1987. DOI <https://doi.org/10.1002/bit.260300112>. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bit.260300112>. Acesso em: 3 jul. 2022.

LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 6ª Edição, 2013. Ed. Artmed.

LUZU: Creme. Responsável técnico Bausch Health Companies Inc.. Laval: Bausch Health Companies Inc., 2020. 1 bula de remédio, 2 p.

FONSECA, Thiago de Sousa; *et al.* Chemoenzymatic synthesis of luliconazole mediated by lipases. **EUROPEAN JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY**, v. 2018, p. 2110-2116, 2018.

MATTE, Carla Roberta *et al.* Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* Lipase by Different Techniques on Immobead 150 Support: Characterization and Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 172, p. 2507-2520, 25 dez. 2013. DOI 10.1007/s12010-013-0702-4. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-013-0702-4#citeas>. Acesso em: 2 jul. 2022.

NEGREIRO, J. M. **ESTUDO IN SILICO DA ATIVIDADE CATALÍTICA DA LIPASE DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* NA BIOCONVERSÃO DO DITERPENÓ ANNONALIDA E SEUS DERIVADOS ACILADOS**. 2021. 86 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Programa de PósGraduação em Química da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

NOVOTNA, Aneta; SROVNALOVA, Alzbeta; SVECAROVA, Michaela;

ÖTVÖS, Sándor B.; KAPPE, C. Oliver. Continuous flow asymmetric synthesis of chiral active pharmaceutical ingredients and their advanced intermediates. **Green Chemistry**, [s. l.], ano 2021, v. 23, ed. 17, p. 6117-6138, 3 ago. 2021. DOI 10.1039/D1GC01615F. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2021/gc/d1gc01615f>. Acesso em: 26 jul. 2022.

PÁMIES, Oscar; BACKVALL, Jan-E. Chemoenzymatic Dynamic Kinetic Resolution of α -Halo Alcohols. An Efficient Route to Chiral Epoxides. **JOC Article**, [s. l.], v. 67, ed. 25, p. 9006–9010, 20 nov. 2002. DOI <https://doi.org/10.1021/jo026157m>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jo026157m>. Acesso em: 2 jul. 2022.

PATEL, Ramesh N. Biocatalysis: Synthesis of Key Intermediates for Development of Pharmaceuticals. **ACS Catalyst**, [s. l.], v. 1, ed. 9, p. 1056-1074, 26 jul. 2011. DOI 10.1021/cs200219b. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/cs200219b>. Acesso em: 22 jun. 2022.

PETERSEN, Michael; KIENER, Andreas. Biocatalysis Preparation and functionalization of N-heterocycles. **Green Chemistry**, [s. l.], v. 1, ed. 2, p. 99-106, 1999. DOI

10.1039/A809538H. Disponível em:

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1999/GC/a809538h>. Acesso em: 22 jun. 2022.

PINHEIRO, M. P. **Desenvolvimento de biocatalisadores enzimáticos pela estabilização de Lecitase Ultra em suporte macroporoso**. 2018. 93 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)-Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

PORTO, Douglas dos Santos *et al.* A Review of Characteristics, Properties, Application of Nanocarriers and Analytical Methods of Luliconazole. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, [s. l.], 19 maio 2021. DOI :10.1080/10408347.2021.1926219. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408347.2021.1926219>. Acesso em: 6 jul. 2022.

PYSER, Joshua B.; CHAKRABARTY, Suman; ROMERO, Evan O.; NARAYAN, Alison R. H. State-of-the-Art Biocatalysis. **ACS Central Science**, [s. l.], v. 7, ed. 7, p. 1089-1268, 28 jul. 2021. DOI 10.1021/acscentsci.1c00273. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acscentsci.1c00273>. Acesso em: 24 jun. 2022.

SANGANYADO, E.; LU, Z.; FU, Q.; SCHLENK, D.; GAN, J. Chiral pharmaceuticals: A review on their environmental occurrence and fate processes. **Water Research**, v. 124, ed. 1, p. 527-542, 1 nov. 2017. DOI 10.1016/j.watres.2017.08.003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0043135417306565?via%3Dihub>. Acesso em: 22 jul. 2022.

SHELDON, Roger A.; WOODLEY, John M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. **CHEMICAL REVIEWS**, [s. l.], v. 118, ed. 2, p. 801-838, 6 set. 2017. DOI 10.1021/acs.chemrev.7b00203. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.chemrev.7b00203>. Acesso em: 24 jun. 2022.

TRUPPO, Matthew David. Biocatalysis in the Pharmaceutical Industry – The Need for Speed. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, Washington, ano 2018, v. 8, ed. 5, p. 476--480, 18 abr. 2017. DOI 10.1021/acsmchemlett.7b00114. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5430392/>. Acesso em: 7 jun. 2022.

VEGA, Kimberly Benedetti. **Síntese quimioenzimática do apremilast usando lipases e cetorredutases**. 2020. 92 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020.

VOET, D; VOET, J. G.; PRATT, C. W. (2014). **Fundamentos de Bioquímica: a vida em nível molecular**. Artmed Editora, 4ªed.

VOLPATO, Giandra. **Produção, purificação e imobilização de lipases de Staphylococcus warneri EX17 produzidas em glicerol**. Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub. 2009. 158 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Escola de engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

WEBB, E. C. Enzyme Nomenclature 1992. **Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes**. San Diego, California: Academic Press, 1992.

YILMAZ, Erkan; SOYAK, Mustafa. Type of green solvents used in separation and preconcentration methods. *In: NEW Generation Green Solvents for Separation and Preconcentration of Organic and Inorganic Species*. [S. l.]: Elsevier, 2020. cap. 5, p. 207--266. ISBN 978-0-12-818569-8. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012818569800005X>. Acesso em: 22 jun. 2022.

**APÊNDICE A – TABELAS DOS RESULTADOS DAS TRIAGENS DAS
LIPASES EM SOLVENTE ORGÂNICO.**

Tabela 6 – Triagem de lipases realizadas em cicloexano:

Entrada	Lipase	ee_s (%) ^a	ee_p (%) ^a	C (%)^b	E^c
1	<i>Candida antarctica</i> imobilizada em resina acrílica	5	99	5	>200
2	<i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada Immobead 150	7	99	7	>200
3	Amano Lipase PS-IM Imobilizado em terra diatomáceas	2	92	2	25,59
4	<i>Rhizopus oryzae</i> imobilizada em Immobead 150	6	99	6	>200
5	<i>Pseudomonas fluorescens</i> imobilizada em Sol-gel-AK em púmice	5	93	5	30

^[a]Determinado por GC; ^[b]Conversão, $c = e.e._s / (e.e._s + e.e._p)$;

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

Tabela 7 – Triagem de lipases realizadas em heptano:

Entrada	Lipase	ee_s (%) ^a	ee_p (%) ^a	C (%)^b	E^c
1	<i>Candida antarctica</i> imobilizada em resina acrílica	4	99	4	>200
2	<i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada em Immobead 150	3	99	3	>200
3	<i>Rhizopus oryzae</i> imobilizada em Immobead 150	1	95	1	41
4	Pâncreas de porco	3	19	14	1

^[a]Determinado por GC; ^[b]Conversão, $c = e.e._s / (e.e._s + e.e._p)$;

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

Tabela 8 – Triagem de lipases realizadas em acetonitrila:

Entrada	Lipase	ee_s (%) ^a	ee_p (%) ^a	C (%) ^b	E ^c
1	<i>Candida antarctica</i> imobilizada em resina acrílica	3	99	3	>200
2	<i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada em Immobead 150	2	99	2	>200
3	<i>Rhizopus oryzae</i> imobilizada em Immobead 150	1	94	1	32
4	Amano Lipase PS-IM imobilizada em terra de diatomáceas	3	99	3	>200

^[a]Determinado por GC; ^[b]Conversão, $c = e.e.s / (e.e.s + e.e.p)$;

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

Tabela 9 – Triagem de lipases realizadas em MTBE:

Entrada	Lipase	ee_s (%) ^a	ee_p (%) ^a	C (%) ^b	E ^c
1	<i>Candida antarctica</i> imobilizada em resina acrílica	3	99	3	>200
2	<i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada em Immobead 150	9	99	8	>200
3	<i>Rhizopus oryzae</i> imobilizada em Immobead 150	2	99	2	>200
4	Pâncreas de porco	14	93	13	30

^[a]Determinado por GC; ^[b]Conversão, $c = e.e.s / (e.e.s + e.e.p)$;

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

Tabela 10 – Triagem de lipases realizadas em THF:

Entrada	Lipase	ee_s (%) ^a	ee_p (%) ^a	C (%) ^b	E ^c
1	<i>Candida antarctica</i> imobilizada em resina acrílica	3	99	3	>200
2	<i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada em Immobead 150	3	99	2	>200
3	<i>Rhizopus oryzae</i> imobilizada em Immobead 150	3	99	3	>200

^[a]Determinado por GC; ^[b]Conversão, $c = e.e.s / (e.e.s + e.e.p)$;

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

Tabela 11 – Triagem de lipases realizadas em hexano:

Entrada	Lipase	ee_s (%) ^a	ee_p (%) ^a	C (%) ^b	E ^c
1	<i>Candida antarctica</i> imobilizada em resina acrílica	3	23	10	2

^[a]Determinado por GC; ^[b]Conversão, $c = e.e.s / (e.e.s + e.e.p)$;

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

APÊNDICE B – CROMATOGRAMAS

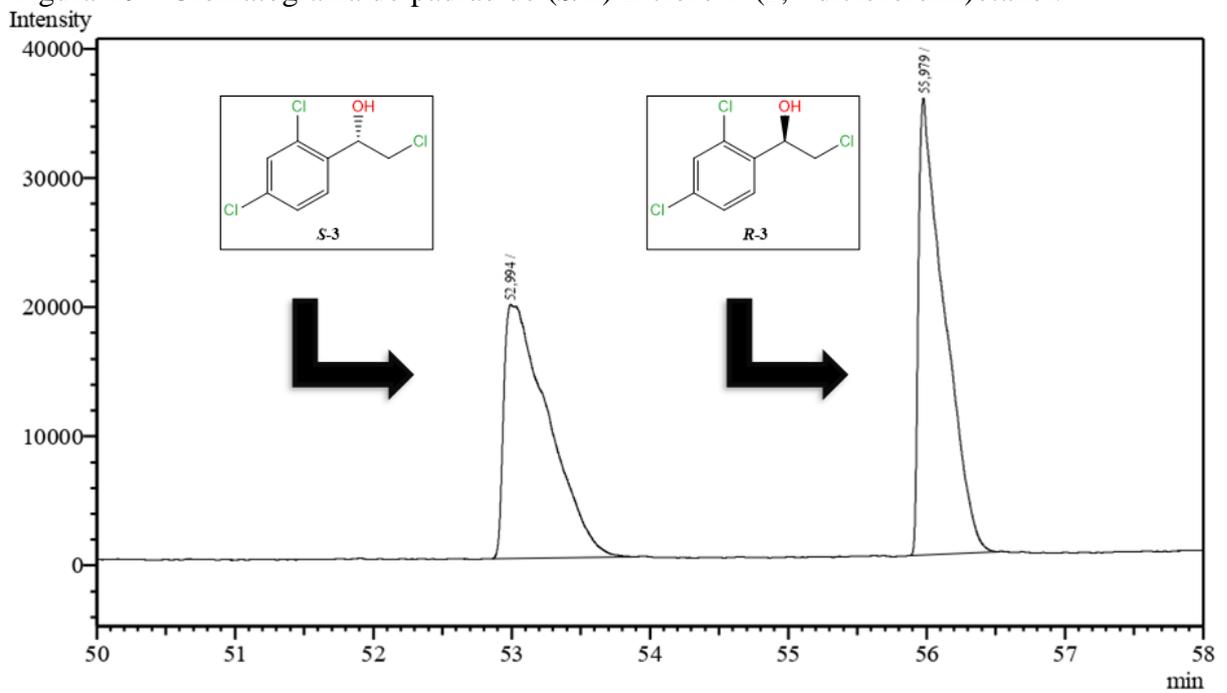
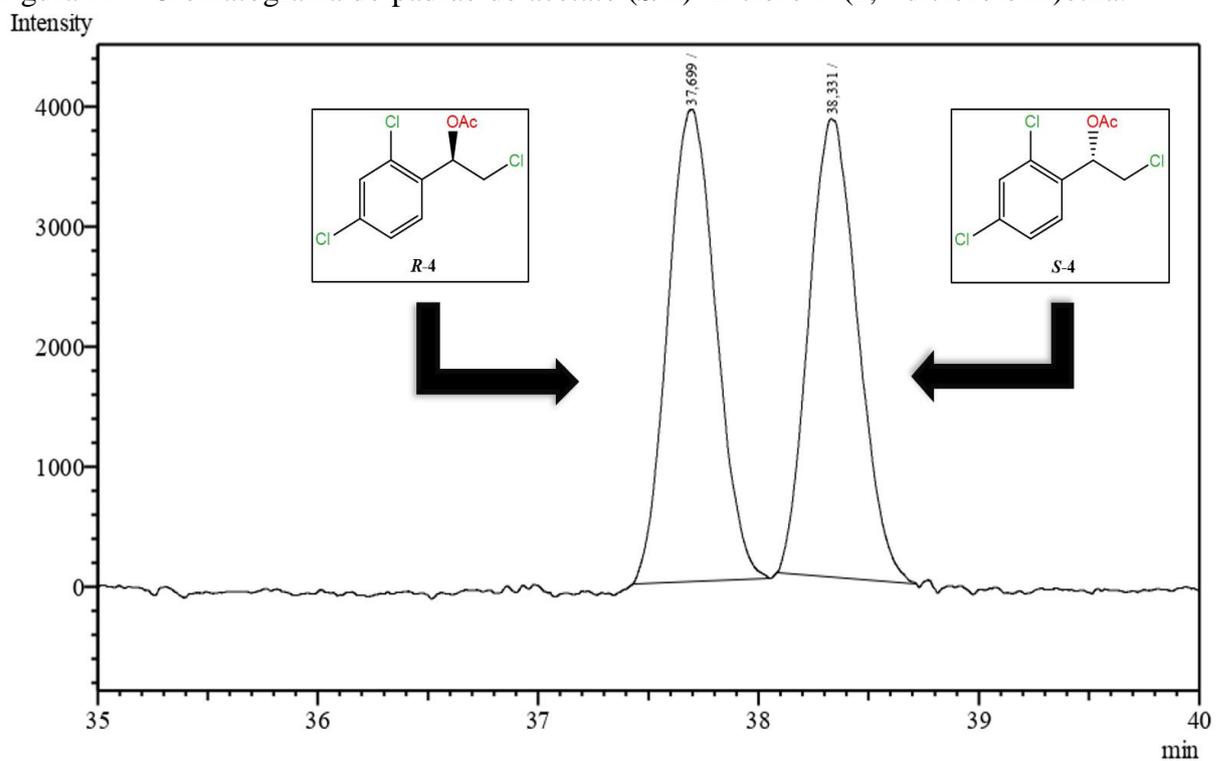
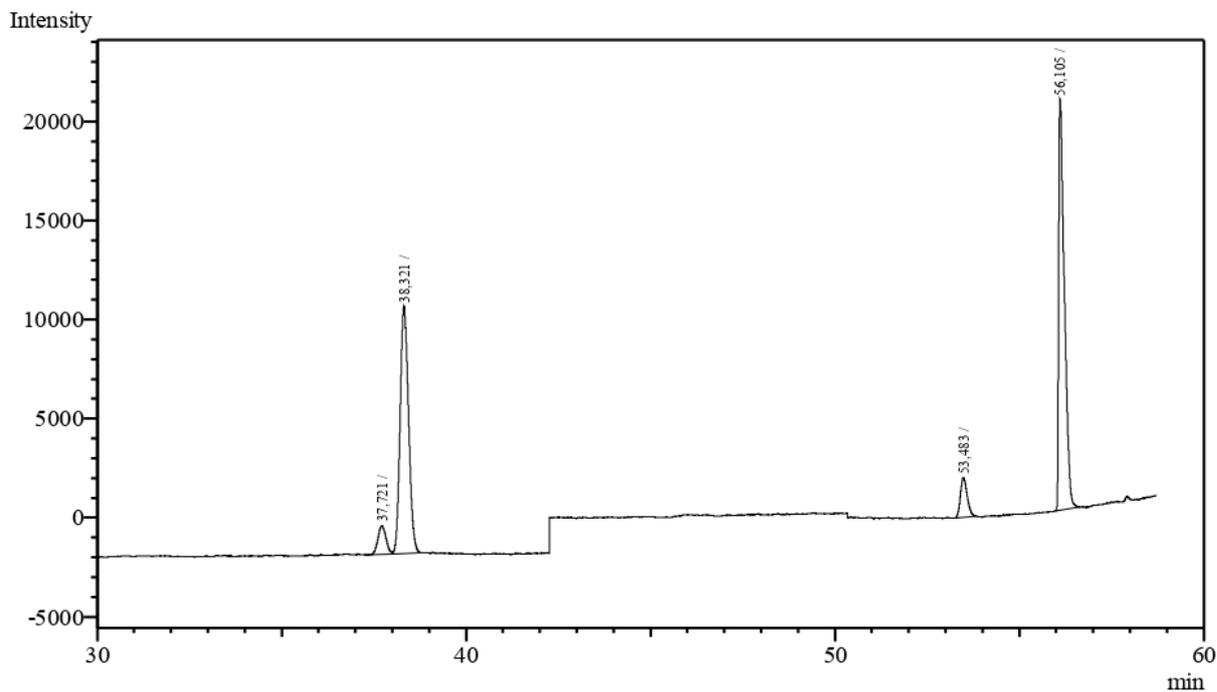
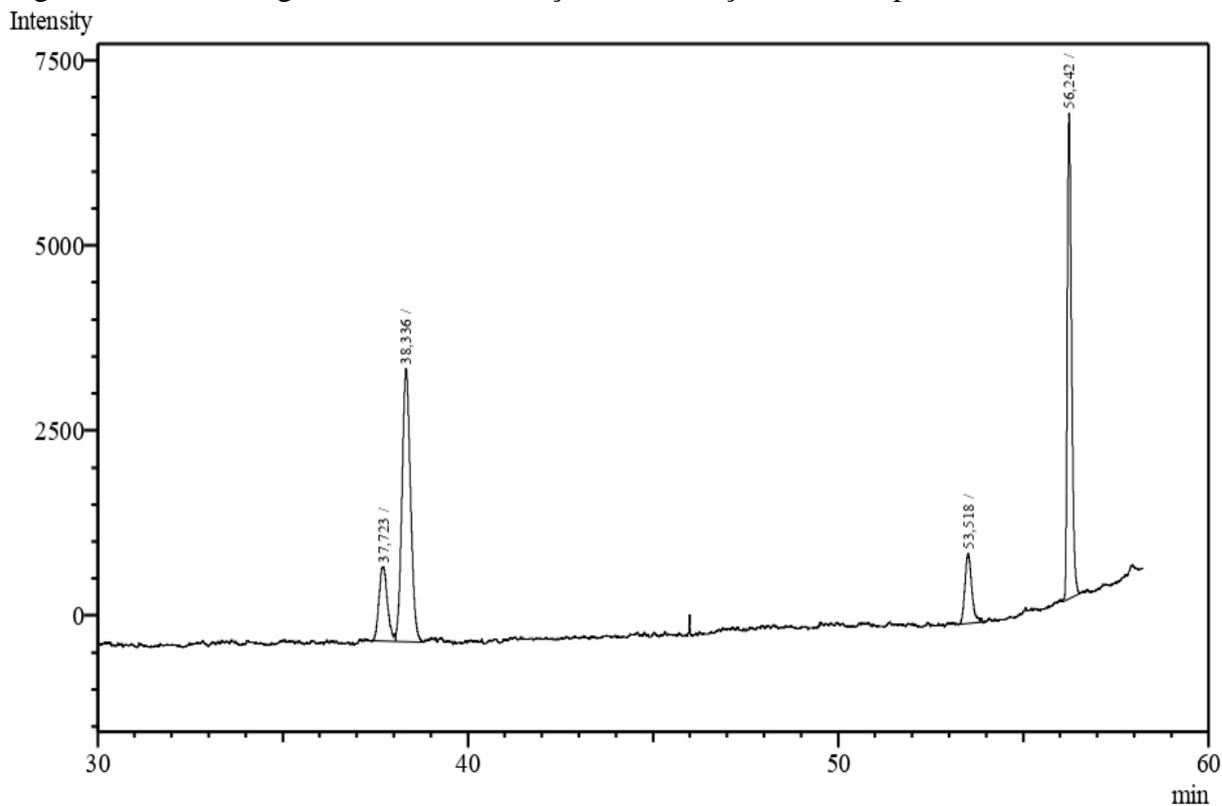
Figura 10 – Cromatograma do padrão do (*S/R*)-2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etanol.Figura 11 – Cromatograma do padrão do acetato (*S/R*)-2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etila.

Figura 12 – Cromatograma referente à reação de acetilação mediada pela CAL-A em heptano.



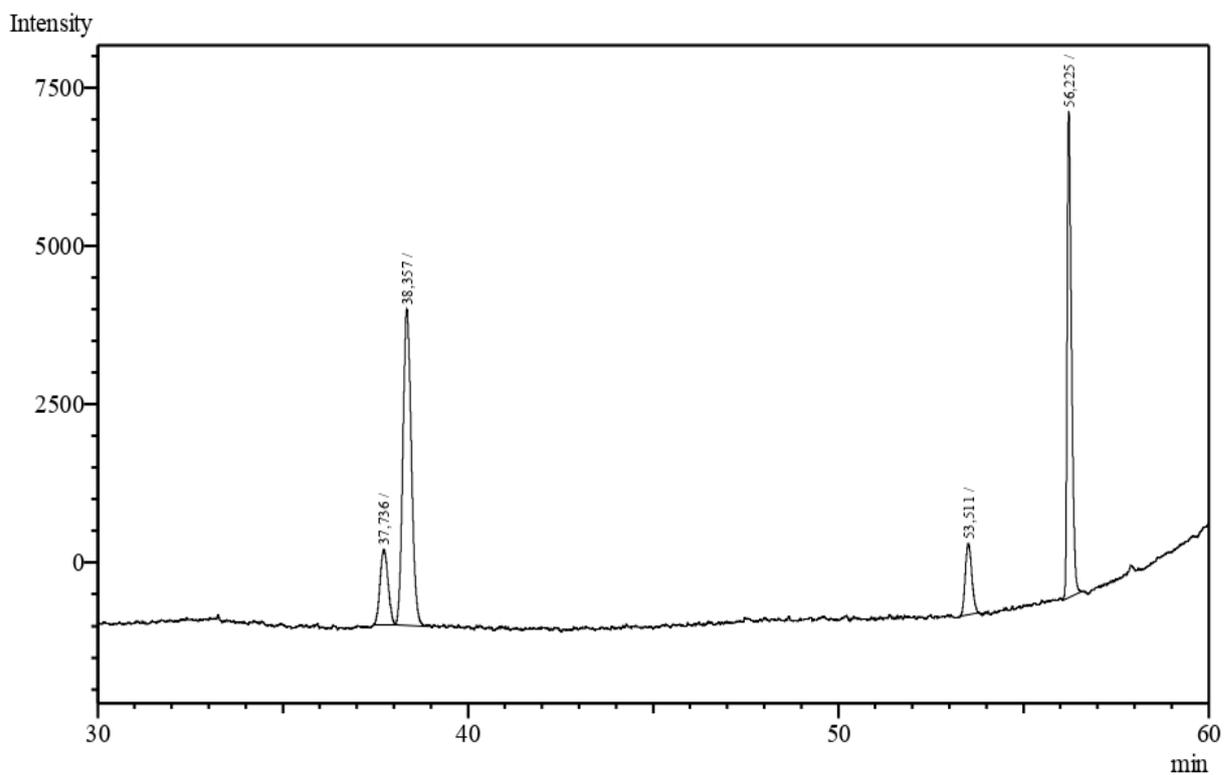
Condições: 2:1 proporção massa de enzima/substrato; 40 °C; 24 h.

Figura 13 – Cromatograma referente à reação de acetilação mediada pela CAL-A em hexano.



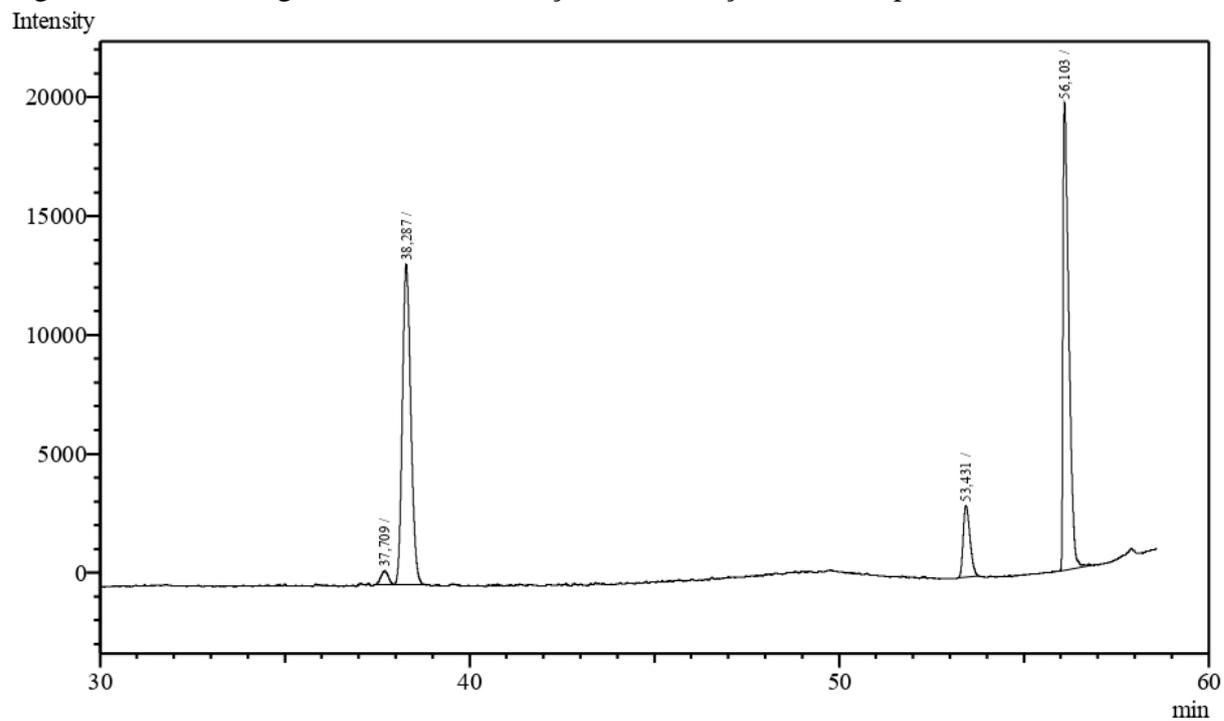
Condições: 2:1 proporção massa de enzima/substrato; 40 °C; 24 h.

Figura 14 – Cromatograma referente à reação de acetilação mediada pela CAL-A em ciclohexano.



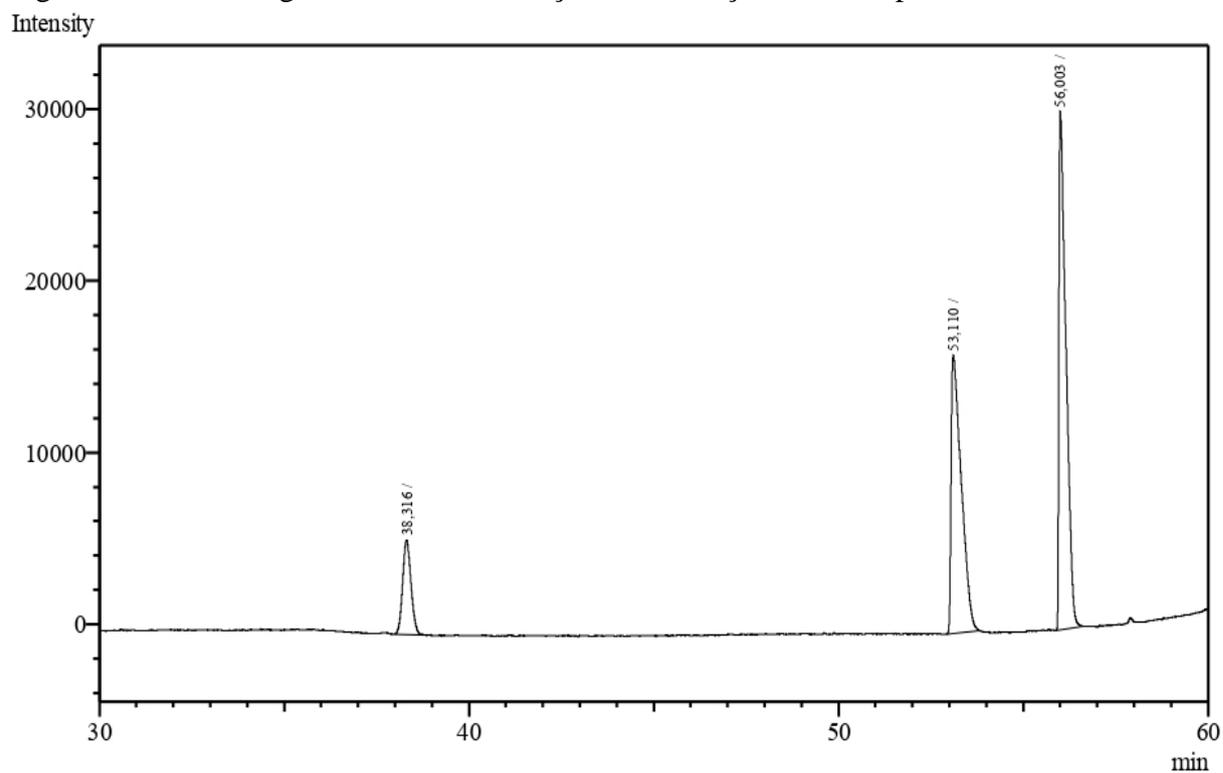
Condições: 2:1 proporção massa de enzima/substrato; 40 °C; 24 h.

Figura 15 – Cromatograma referente à reação de acetilação mediada pela CAL-A em MTBE.



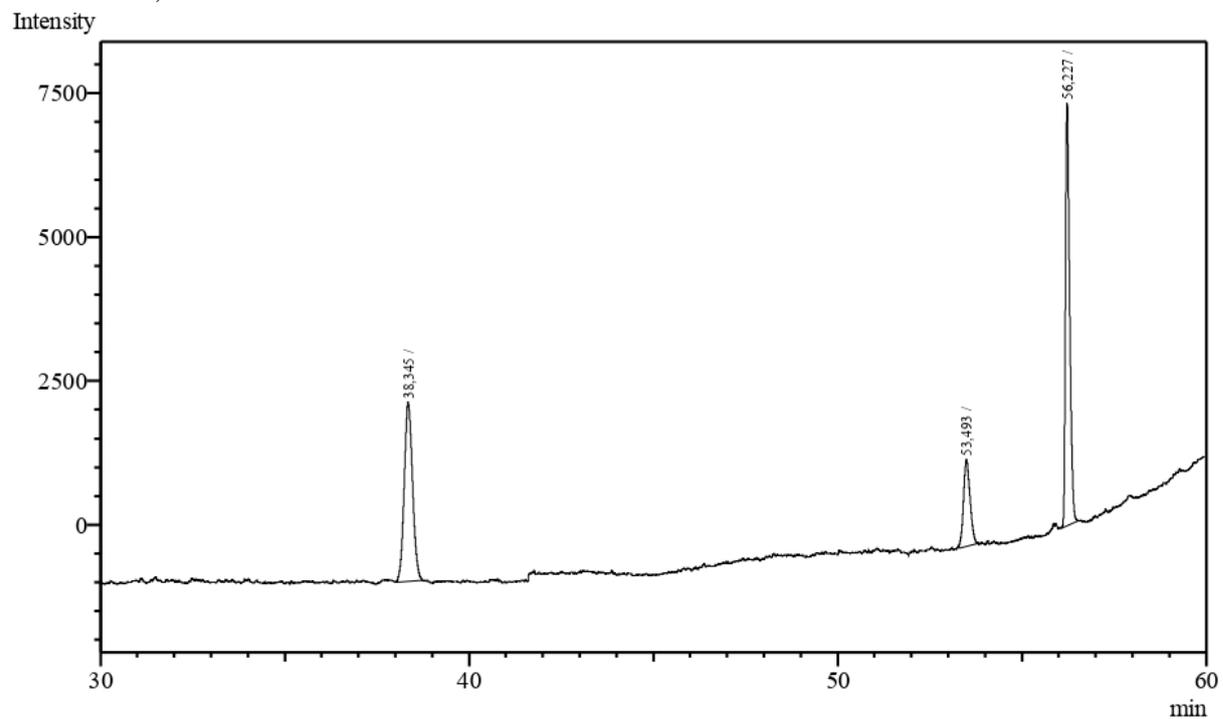
Condições: 2:1 proporção massa de enzima/substrato; 40 °C; 24 h.

Figura 16 – Cromatograma referente à reação de acetilação mediada pela CAL-A em THF.



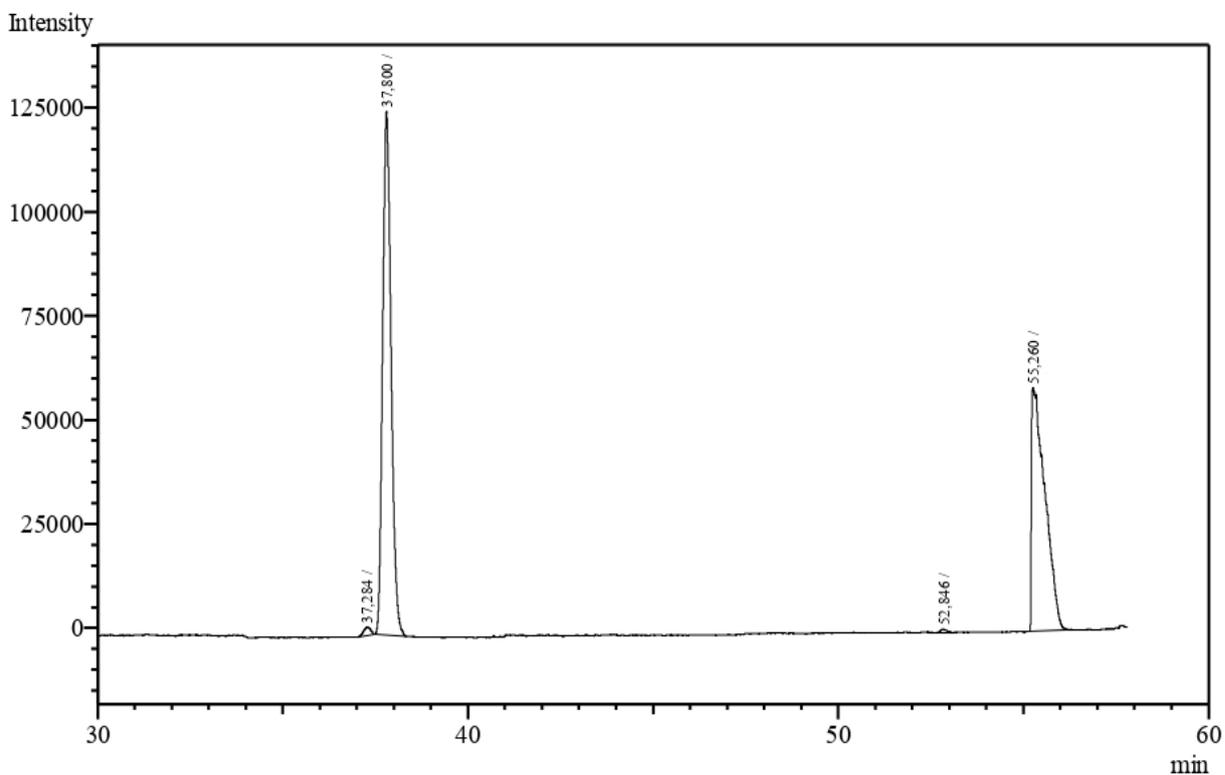
Condições: 2:1 proporção massa de enzima/substrato; 40 °C; 24 h.

Figura 17 – Cromatograma referente à reação de acetilação mediada pela CAL-A em acetonitrila, 24h.



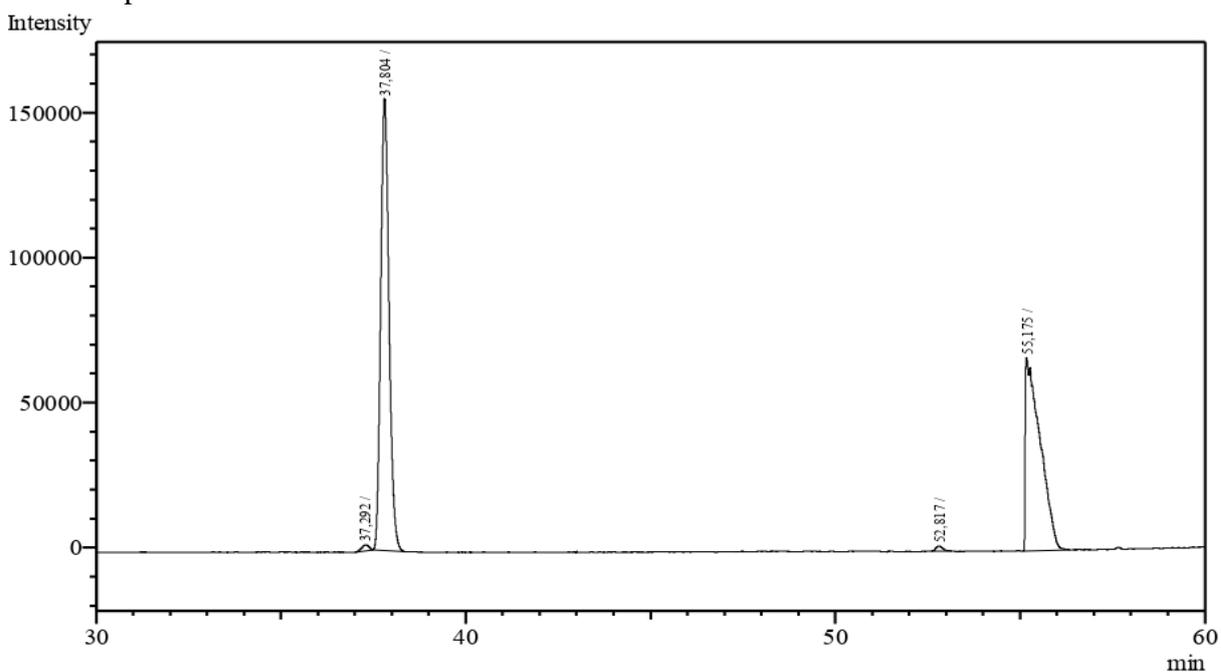
Condições: 2:1 proporção massa de enzima/substrato; 40 °C; 24 h.

Figura 18 – Cromatograma referente à reação de acetilação mediada pela CAL-A em acetonitrila, 30 h.



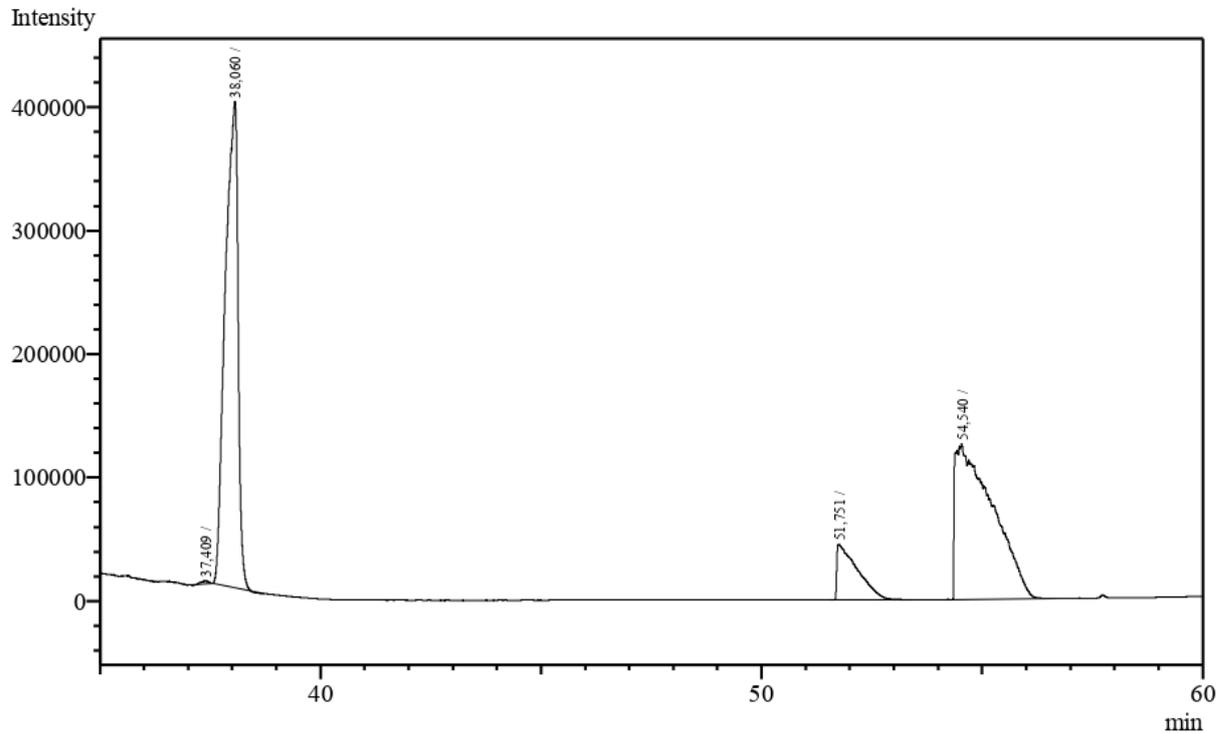
Condições: 2:1 proporção massa de enzima/substrato; 40 °C; 30 h.

Figura 19 – Cromatograma referente ao primeiro ciclo de reuso da reação de acetilação mediada pela CAL-A em acetonitrila.



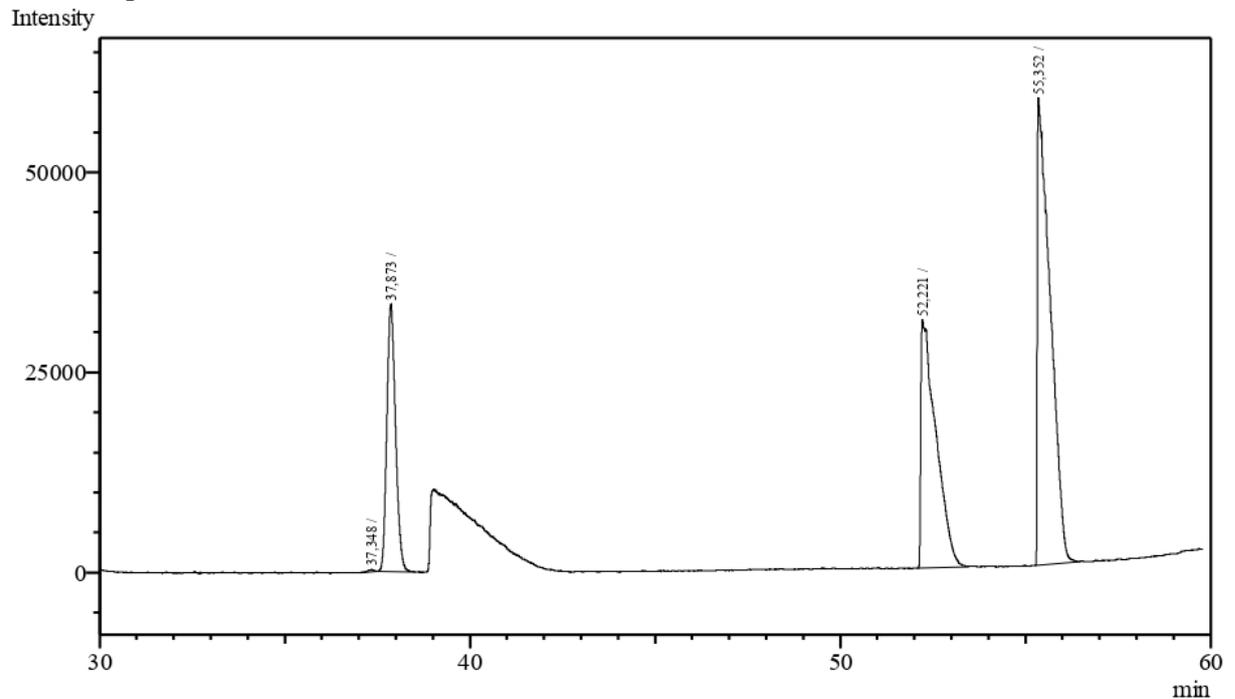
Condições: 2:1 proporção massa de enzima/substrato; 40 °C; 30 h.

Figura 20 – Cromatograma referente ao segundo ciclo da reação de reuso de acetilação mediada pela CAL-A em acetonitrila.



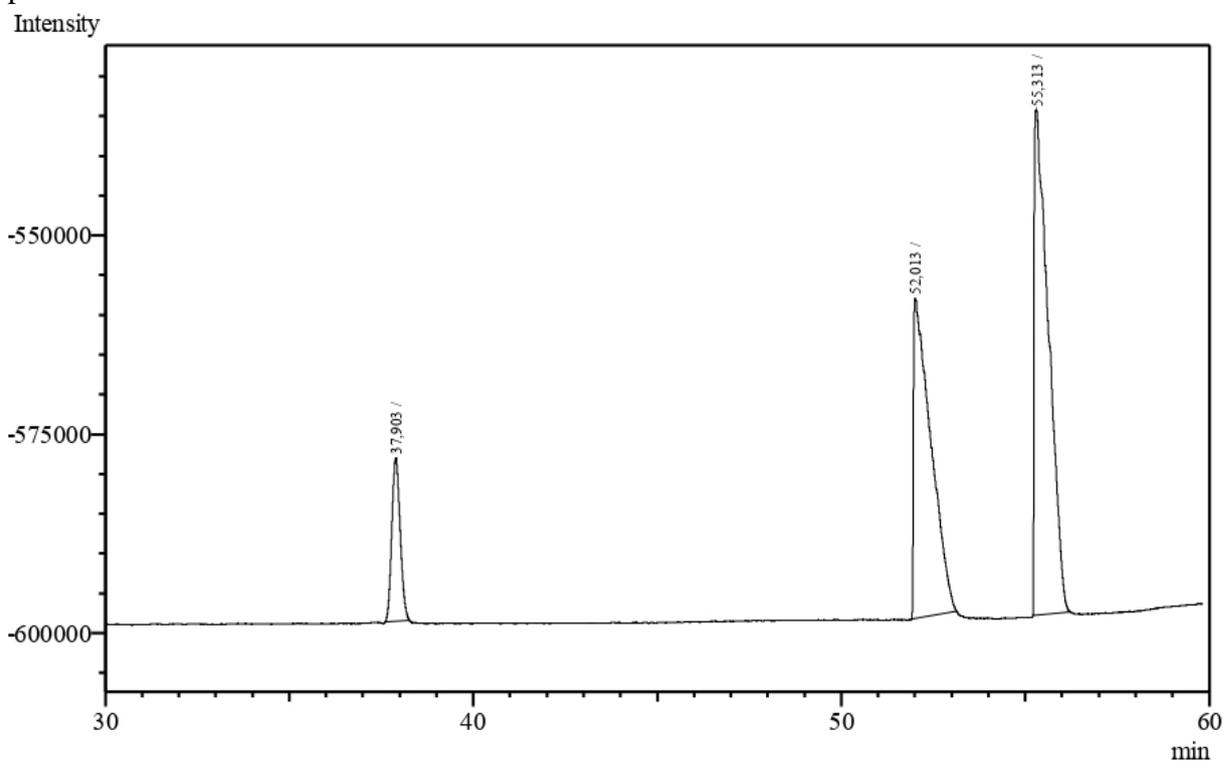
Condições: 2:1 proporção massa de enzima/substrato; 40 °C; 30 h.

Figura 21 – Cromatograma referente ao terceiro ciclo da reação de reuso de acetilação mediada pela CAL-A em acetonitrila.



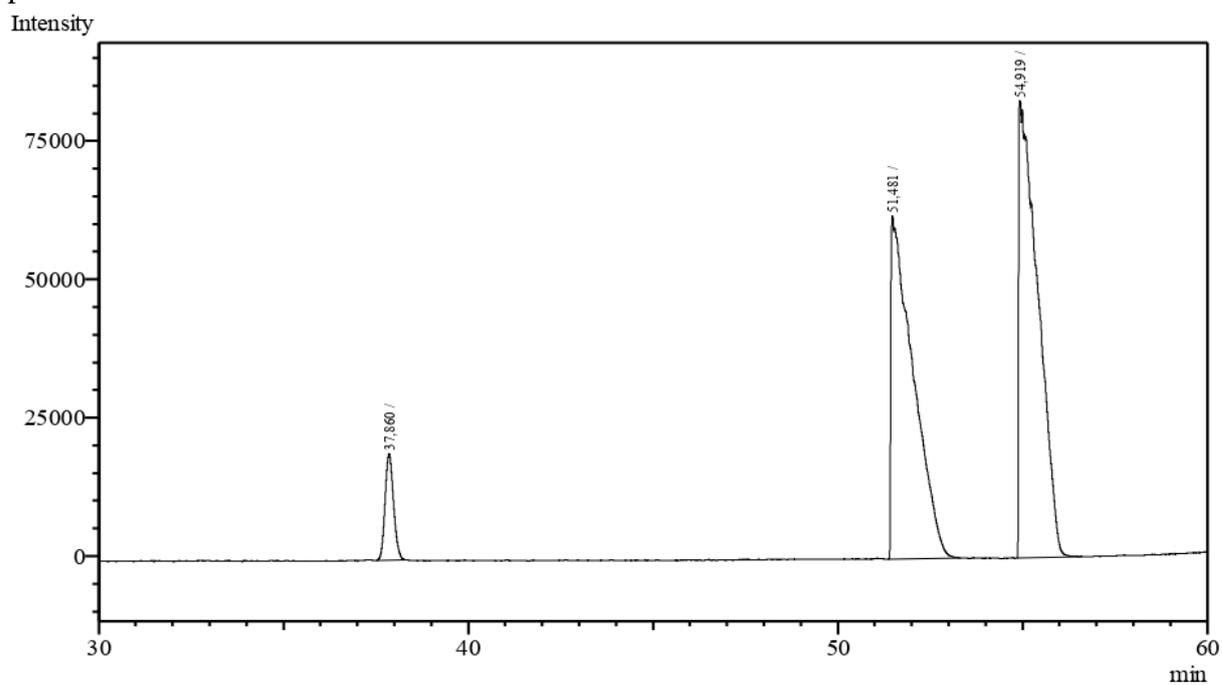
Condições: 2:1 proporção massa de enzima/substrato; 40 °C; 30 h.

Figura 22 – Cromatograma referente ao quarto ciclo da reação de reuso de acetilação mediada pela CAL-A em acetonitrila.



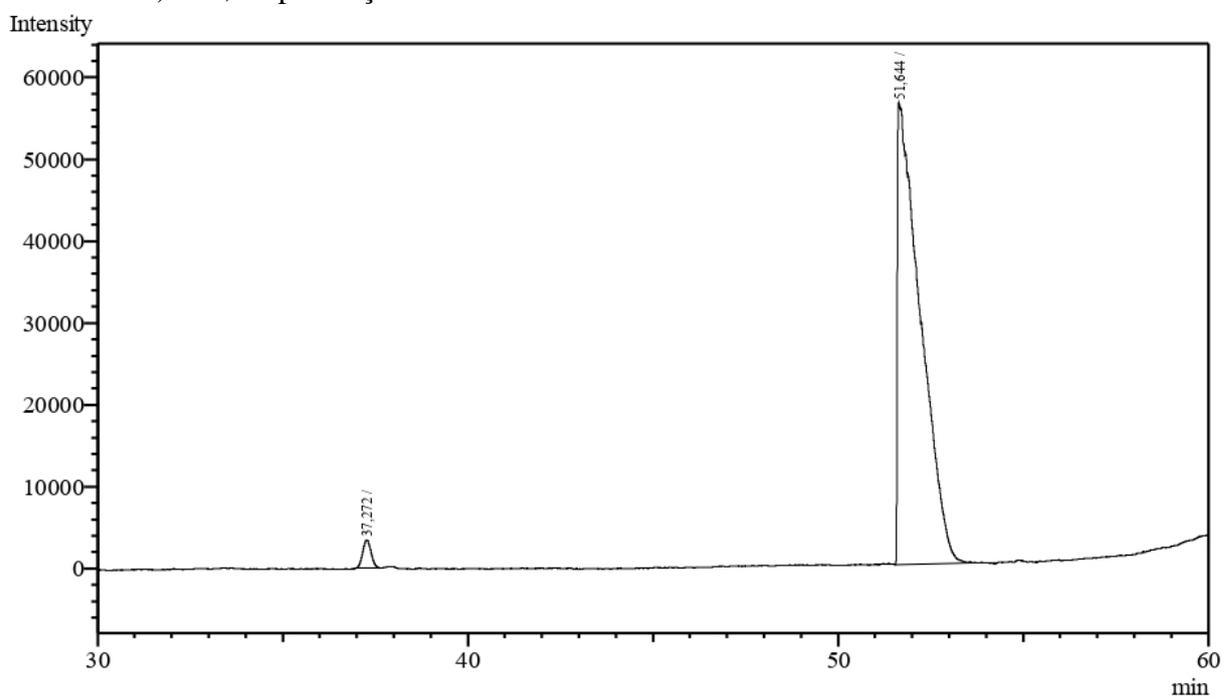
Condições: 2:1 proporção massa de enzima/substrato; 40 °C; 30 h.

Figura 23 – Cromatograma referente ao quinto ciclo da reação de reuso de acetilação mediada pela CAL-A em acetonitrila.



Condições: 2:1 proporção massa de enzima/substrato; 40 °C; 30 h.

Figura 24 – Cromatograma referente à reação de hidrólise do acetato de (S)-2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etila, na presença de CAL-B.



Condições: 0,5:1 proporção massa de enzima/substrato; 40 °C; 15 min.