



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DALILA MARIA BARBOSA DAVI**

**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**

**FORTALEZA**

**2022**

DALILA MARIA BARBOSA DAVI

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

Dissertação de Mestrado submetida à  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação  
em Química, da Universidade Federal do Ceará  
como requisito parcial para obtenção do Título  
de Mestre em Química. Área de concentração:  
Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Conceição  
Ferreira de Oliveira

FORTALEZA

2022

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)

---

- D271e 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 alquil carbinóis lipídios / Dalila Maria Barbosa Davi. – 2022.  
57 f. : il.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2022.  
Orientação: Prof. Dr. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira.
1. Biocatálise. 2. Dialquilcarbinol. 3. Lipase. 4. Resolução cinética. I. Título.

CDD 540

---

DALILA MARIA BARBOSA DAVI

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

Dissertação 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 Mestre em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovada em: 21/01/2022.

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

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos que me concedeu nesta vida como as amizades que colocou em meu caminho ao longo desta jornada.

A minha família que são meus alicerces que dedicam todo seu amor e compreensão: Neuza Ribeiro (mãe), Ari Davi (pai), Fabianny Davi (irmã) e Bernardo Davi (sobrinho)

Aos professores Dra. Maria Conceição Ferreira de Oliveira (orientadora), Dr. Marcos Carlos de Mattos e Dra. Fátima Miranda Nunes que são os basilares do LABS. Obrigada pela contribuição no meu amadurecimento, através dos ensinamentos, compreensão e por estarem sempre à disposição.

Aos colegas Diana Kelly pela paciência e pelos ensinamentos que foi de suma importância para o início desta jornada, Thiago Fonseca pela paciência e por ter contribuído muito nessa reta final.

Em especial a Stephany Swellen pela colaboração e está comigo desde o início me dando força, aconselhando e compreendendo os meus momentos com seu companheirismo.

Em especial a Katiany Abreu e Roniele Félix por terem acreditado na minha capacidade, pelo incentivo, pela amizade e por terem impulsionado desde o início.

A Naara Santana por ter sido de suma importância nessa jornada através da sua amizade e companheirismo.

Aos meus colegas de trabalho Gledson, Ana Gabriele, Gabriella, Bruna, Artur, Daniel, Yana, Kimberly, Stephani e Jonatas que contribuíram no desenvolvimento da pesquisa.

Aos amigos Liange, Tiago, Hortência, Nayanna, Tatiana, Marília, Savia, Paulo e Glemilson pela amizade ao longo da caminhada.

Um agradecimento especial ao grupo de pesquisa coordenado pelos professores Yves Génisson e Remi Chauvin da Universidade Paul Sabatier-Toulouse III pela parceria para o desenvolvimento deste trabalho.

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo investigar a resolução cinética enzimática (RCE) do dialquinilcarbinol *rac*-1-[tris(isopropil)silil]penta-1,4-diin-3-ol (*rac*-1), via reação de acilação catalisada por lipase, para produzir os dialquinilcarbinóis (*R*-2 e *S*-1) enantiomericamente puros ou enriquecidos. Inicialmente, realizou-se a triagem de dez lipases comerciais para a resolução cinética do *rac*-1. Dentre elas, as enzimas *Candida antarctica* B imobilizada em resina acrílica (CAL-B), *Thermomyces lanuginous* imobilizada em imobead-150 (TLL), Amano PS da *Burkholderia cepacia* imobilizada em terra diatomácea (PS-IM) e a enzima livre Amano lipase de *Pseudomonas fluorescens* foram as selecionadas, por apresentarem resultados de excesso enantiomérico (*e.e.p* e *e.e.s*) >99%, conversão (*c*) de 50% e enantiosseletividade (*E*) >200. A influência do solvente na RCE catalisada por essas enzimas foi investigada, realizando-se a reação em heptano, hexano, ciclohexano, tolueno, éter etílico, tetrahydrofurano (THF) e acetonitrila (ACN). Dentre estes, heptano e hexano foram os solventes que resultaram *e.e.p* e *e.e.s* >99%, *c*=50% e *E* >200 para todas as enzimas testadas. No caso das lipases CAL-B e PS-IM, cinco dos sete solventes testados (exceto THF e ACN) produziram resultados ótimos de RCE. Posteriormente, estudos com a enzima CAL-B e o solvente heptano foram realizados para avaliar a influência da temperatura, tempo, relação enzima:substrato e reuso da enzima na reação. Os estudos resultaram na otimização da RCE do *rac*-1 (*e.e.p* e *e.e.s* > 99%, *c* = 50% e *E* = 200) com a reação sendo realizada sob as seguintes condições: CAL-B, heptano, 40°C, 2 h e relação enzima:substrato (0.5:1). Estudos de reuso da lipase sob estas condições foi realizado, resultando, já no segundo ciclo, numa redução dos valores de conversão (*c* = 40%) e excessos enantioméricos do substrato e do produto (*e.e.p* > 99% e *e.e.s* > 66%), e com *E* > 200.

**Palavras-chave:** biocatálise; dialquinilcarbinol; lipase; resolução cinética.

## ABSTRACT

This work aimed to investigate the enzymatic kinetic resolution (EKR) of the dialkynyl carbinol *rac*-1-[tris(isopropyl)silyl]penta-1,4-dien-3-ol (*rac*-**1**), via lipase catalyzed acylation reaction, to produce the enantiomerically pure or enriched dialkynylcarbinols (*R*-**1** and *S*-**1**). Initially, ten commercial lipases with enzymatic potential for the kinetic resolution of *rac*-**1** were screened. Among them, the enzymes *Candida antarctica* B immobilized on acrylic resin (CAL-B), *Thermomyces lanuginosus* immobilized on immovead-150 (TLL), Amano PS from *Burkholderia cepacia* immobilized on diatomaceous earth (PS-IM) and the free enzyme Amano lipase from *Pseudomonas fluorescens* were selected for presenting results of enantiomeric excess ( $ee_p$  and  $ee_s$ ) >99%, conversion ( $c$ ) of 50% and enantioselectivity ( $E$ ) >200. The influence of the solvent on the EKR catalyzed by these enzymes was investigated, performing the reaction in heptane, hexane, cyclohexane, toluene, ethyl ether, tetrahydrofuran (THF) and acetonitrile (ACN). Among these, heptane and hexane were the solvents that resulted in  $ee_p$  and  $ee_s$  >99%,  $c=50\%$  and  $E >200$  for all tested enzymes. In the case of lipases CAL-B and PS-IM, five of the seven solvents tested (except THF and ACN) produced optimal EKR results. Subsequently, studies with the CAL-B enzyme and the heptane solvent were carried out to evaluate the influence of temperature, time, enzyme:substrate ratio and enzyme reuse in the reaction. The studies resulted in the optimization of the RCE of *rac*-**1** ( $ee_p$  and  $ee_s > 99\%$ ,  $c = 50\%$  and  $E = 200$ ) with the reaction being carried out under the following conditions: CAL-B, heptane, 40°C, 2 h and enzyme ratio:substrate (0.5:1). Study on the lipase under these conditions was carried out, resulting, already in the second cycle, in a reduction of the conversion value ( $c = 40\%$ ) and enantiomeric excesses of both the substrate and the product ( $ee_p > 99\%$  and  $ee_s > 66\%$ ), although maintaining  $E > 200$ .

**Keywords:** biocatalysis; dialkynylcarbinol; lipases; kinetic resolution.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Representação dos fragmentos de alquenil-alquinilcarbinol (AAC) natural e dialquinilcarbinol (DAC) bioinspirado.....	9
Figura 2	- Mecanismo geral da catálise enzimática, promovido pela tríade catalítica no sítio ativo da lipase.....	11
Figura 3	- Representação simplificada dos mecanismos de hidrólise e esterificação (acilação) na produção de álcoois e acetatos de configuração oposta.....	12
Figura 4	- Número de publicações dos últimos 20 anos, de acordo com pesquisa no “Web of Science”, usando os termos “lipase and biocatalysis” como critérios de pesquisa.....	16
Figura 5	- Representação dos dobramentos $\alpha/\beta$ hidrolase (A) e representação estrutural da lipase (B).....	17
Figura 6	- Estruturas químicas dos aminoácidos aspartato (Asp), histidina (His) e serina (Ser) que formam a tríade catalíticas das lipases (FERREIRA,2016).....	19
Figura 7	- Ilustração de uma reação de RCE, via acilação, em que apenas um dos enantiômeros é convertido em produto.....	21
Figura 8	- Representação simplificada das cavidades de uma lipase, segundo a regra de Kazlauskas.....	22
Figura 9	- Modelo empírico de Kazlauskas para reações de acilação de álcoois secundários e hidrólise dos correspondentes ésteres, na presença de lipases.....	23
Figura 10	- Estruturas químicas do fragmento comum aos DAC lipídicos e de exemplos de produtos naturais desta classe isolados de esponjas.....	25
Figura 11	- Estrutura química do sinton 1-[tris(isopropil)silil]penta-1,4-diin-3-ol.....	28

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	- Representação da síntese assimétrica do DAC baseado no método de Carreira modificado (LISTUNOV et al., 2018a).....	10
Esquema 2	- Síntese de dialquinilcarbinol racêmico (LISTUNOV et al., 2015).....	10
Esquema 3	- Resolução cinética enzimática de um acetato de ACL, via hidrólise, descrito na literatura (ALMEIDA et al., 2020).....	11
Esquema 4	- Representação das reações de hidrólise, esterificação e transesterificação catalisadas por lipases.....	18
Esquema 5	- Ciclo catalítico das lipases em uma reação de acilação de álcoois secundários.....	20
Esquema 6	- Resolução cinética enzimática de um acetato de DAC lipídico realizada por Bourkhis et al., 2018.....	26
Esquema 7	- Resolução cinética enzimática do acetato de 1-[tris(isopropil)silil]penta-1,4-diol (rac-1-Ac), via hidrólise, realizada por Almeida et al., 2020.....	26
Esquema 8	- Resolução cinética enzimática, via acilação, do rac-1 catalisada por lipase.....	29

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Resolução cinética enzimática (RCE) do acetato do rac-1 (via hidrólise) e do rac-1 (via acilação) descritas na literatura.....	13
Tabela 2	- Classificação das enzimas mediante o tipo de reação catalisada (LEHNINGER, 2013).....	15
Tabela 3	- Resultados da triagem de lipases na resolução cinética enzimática, via acilação, do rac-1.....	29
Tabela 4	- Resultados da triagem de solventes na resolução cinética enzimática, via acilação, do rac-1 catalisada por lipases.....	31
Tabela 5	- Resultados da resolução cinética de rac-1 com CAL-B, via acilação, variando-se temperatura e tempo.....	33
Tabela 6	- Resultados da resolução cinética enzimática do rac-1 com CAL-B, via acilação, variando-se a razão enzima:substrato.....	34
Tabela 7	- Resultados da resolução cinética enzimática de rac-1, via acilação, utilizando a lipase CAL-B, em heptano, com relação enzima:substrato 2:1, 30°C por 24h.....	35
Tabela 8	- Resultados da resolução cinética enzimática de rac-1, via acilação, utilizando a lipase CAL-B, em heptano, com relação enzima:substrato 2:1, 40°C por 2h.....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Grupo acetila
ACLs	Alquilcarbinóis lipídicos
<i>c</i>	Conversão
CAL-B	Lipase de <i>Candida antarctica</i> B imobilizada em resina acrílica
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
E	enantiosseletividade
<i>ee</i>	excesso enantiomérico
<i>ee<sub>p</sub></i>	excesso enantiomérico do produto
<i>ee<sub>s</sub></i>	excesso enantiomérico do substrato
MHz	Megahertz
pH	Potencial Hidrogeniônico
PS IM	Amano PS da <i>Burkholderia cepacia</i> imobilizada em terra diatomácea
<i>rac</i>	Racêmico
RCE	Resolução Cinética Enzimática
R <sub>f</sub>	Fator de retenção
rpm	Rotação por minuto
RM IM	Lipase a partir de <i>Rhizomucor miehei</i>
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de <sup>13</sup> C
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H
THF	Tetra-hidrofurano
TLL	<i>Thermomyces lanuginous</i> imobilizada em immobead-150

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
2	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
2.1	<b>Biocatálise</b> .....	18
2.2	<b>Enzimas</b> .....	19
2.3	<b>Lipases</b> .....	21
2.4	<b>Resolução Cinética Enzimática</b> .....	25
2.4.1	<i>Regra de kazlauskas</i> .....	26
2.4.2	<i>Parâmetros para biocatálise</i> .....	28
2.5	<b>Dialquilcarbinóis (dac) lipídicos: ocorrência e atividade biológica</b> .....	28
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	32
3.1	<b>Objetivo geral</b> .....	32
3.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	32
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	33
4.1	<b>Triagem de lipases na resolução cinética enzimática do rac-1</b> .....	33
4.2	<b>Estudo da influência de solvente na resolução cinética enzimática de rac-1</b> .....	35
4.3	<b>Estudo do tempo na resolução cinética enzimática do rac-1 catalisada pela lipase cal-b</b> .....	37
4.4	<b>Estudo da razão enzima:substrato na resolução cinética enzimática de rac-1 catalisada pela lipase cal-b</b> .....	38
4.5	<b>Estudo do reuso da lipase cal-b na resolução cinética enzimática de rac-1</b> .....	39
5	<b>CONCLUSÃO</b> .....	42
6	<b>PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	43
6.1	<b>Equipamentos</b> .....	43
6.2	<b>Solventes e reagentes</b> .....	43
6.3	<b>Adsorventes</b> .....	44
6.4	<b>Enzimas</b> .....	44
6.5	<b>Triagem de lipases comerciais na rce do rac-1</b> .....	44
6.6	<b>Avaliação da resolução cinética enzimática do rac-1 variando o solvente, a proporção da relação enzima:substrato e reuso da enzima</b> .....	45

6.7	Avaliação da resolução cinética enzimática do rac-1 variando o tempo e a temperatura.....	45
6.8	Avaliação da resolução cinética enzimática do rac-1 variando a relação enzima:substrato e a temperatura.....	45
6.9	Avaliação do reuso da lipase candida antartica b (cal-b) imobilizada em resina acrílica.....	45
6.9.1	<i>Obtenção do enantiômero (S)-1 através da resolução cinética enzimática via acilação do rac-1.....</i>	46
6.9.2	<i>Obtenção do enantiômero (R)-1 através da resolução cinética enzimática via hidrólise do (R)-2.....</i>	46
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	47
	<b>ANEXO A -CROMATOGRAMAS DE REFERÊNCIA.....</b>	53

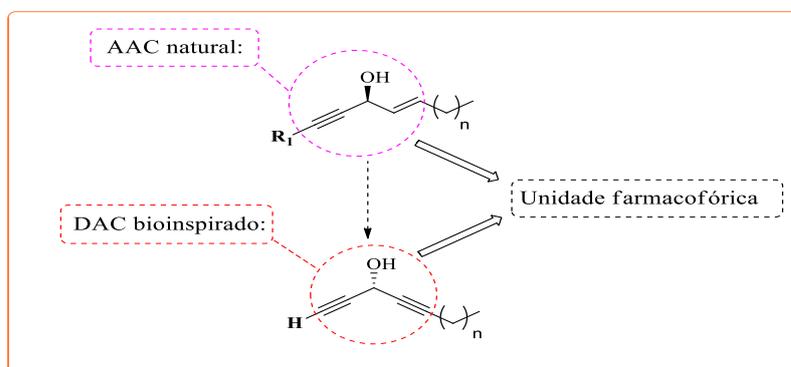
## 1. INTRODUÇÃO

Moléculas enantiomericamente puras são extremamente importantes para as indústrias farmacêutica, alimentícia, agrícola e cosmética (CHOI *et al.*, 2015), o que requer o desenvolvimento de metodologias mais sustentáveis na produção das mesmas (WOODLEY, 2019). Com isso, o uso de processos biocatalíticos para a obtenção de compostos enantiomericamente puros vem crescendo nos últimos anos, uma vez que reduzem os impactos ambientais e são mais seletivos (PRIER; KOSJEK, 2019). Nesse contexto, o emprego de catalisadores enzimáticos na resolução cinética enzimática de racematos torna-se uma estratégia importante na obtenção de substâncias quirais (DEL ARCO *et al.*, 2021).

Uma das classes de compostos estudadas em RCE são os denominados compostos acetilênicos ou poliacetilênicos lipídicos constituem uma família de metabólitos secundários bioativos produzidos por organismos vivos, tais como as esponjas marinhas (NICKEL *et al.*, 2015). Esses compostos são destacados na literatura por exibirem uma ampla variedade de atividade de interesse biológico, em especial à sua citotoxicidade contra uma série de linhagens de células tumorais (TUYEN *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2018).

Nestes produtos naturais, o fragmento estrutural alquenil-alquinilcarbinol (AAC) foi identificado como sendo o grupo farmacofórico, responsável pelas propriedades biológicas (Figura 1). Posteriormente, uma abordagem reacional, que consistiu na variação estrutural sistemática do AAC lipídico natural, levou à descoberta de um novo farmacofórico artificial bioinspirados, a unidade terminal de dialquinilcarbinol (DAC), Figura 1. A presença deste fragmento nos compostos lipídicos bioensaiados, resultou em citotoxicidade ainda mais promissora contra células tumorais (LISTUNOV *et al.*, 2016).

Figura 1 - Representação dos fragmentos de alquenil-alquinilcarbinol (AAC) natural e dialquinilcarbinol (DAC) bioinspirado

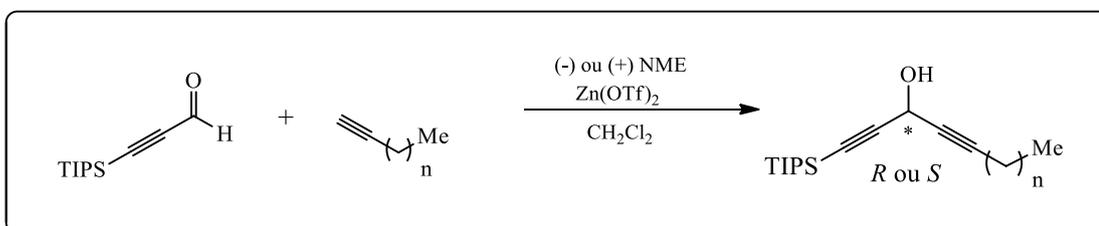


Fonte: Listunov *et al.* (2018<sup>a</sup>).

Em função de suas características estruturais incomuns e seus potenciais citotóxicos, a preparação de poliacetilênicos carbinólicos lipídicos quirais tem sido relatada na literatura. As metodologias envolvem a síntese assimétrica com catalisadores quirais, síntese quimioenzimática e resolução cinética enzimática (RCE) de racematos (BOURKIS *et al.*, 2018).

A alcinilação enantiosseletiva de aldeídos é uma das reações mais úteis para a preparação de compostos DAC lipídicos quirais, utilizando vários derivados de alcinos como nucleófilos (LI *et al.*, 2011). Para a formação de DACs quirais, destaca-se o método de Carreira modificado, que emprega a reação com aldeídos,  $Zn(OTf)_2$  como catalisador e (+) - ou (-)-*N*-metilefedrina (NME) como o ligante quiral (LISTUNOV *et al.*, 2018a), Esquema 1.

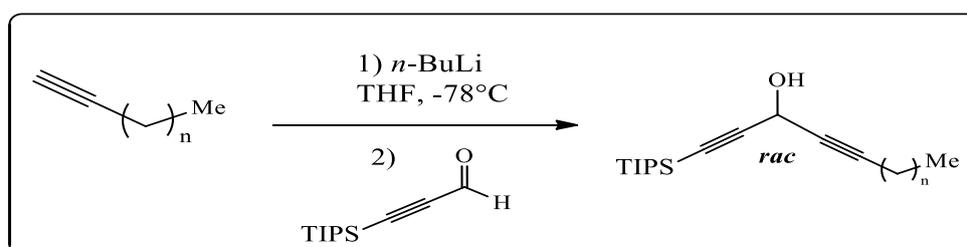
Esquema 1 - Representação da síntese assimétrica do DAC baseado no método de Carreira modificado



Fonte: Listunov *et al.* (2018a).

A síntese dos DACs lipídicos racêmicos descritos na literatura (LISTUNOV *et al.*, 2015) envolveu a litição de alcinos terminais com *n*-BuLi, seguida da adição do organolítio a um aldeído propargílico protegido (Esquema 2).

Esquema 2 - Síntese de dialquinilcarbinol racêmico

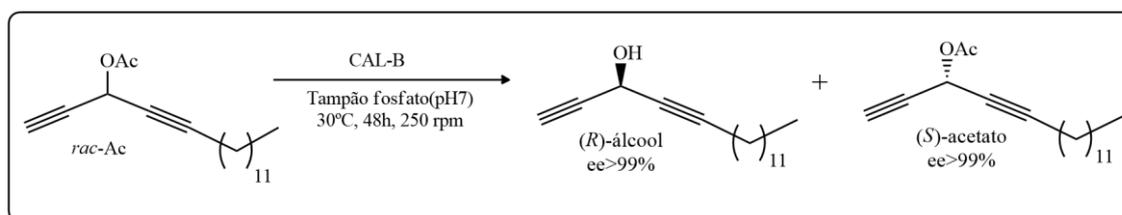


Fonte: Listunov *et al.* (2015).

A RCE é uma metodologia bastante empregada na obtenção de álcoois quirais a partir de racematos. Esta emprega lipases como catalisadores, que permitem a “discriminação quiral”, ou seja, qualquer tipo de quiralidade presente no substrato é reconhecida (DIAS *et al.*, 2019). Com isso, um dos enantiômeros é biotransformado mais rapidamente que o outro. Logo, este procedimento se torna uma alternativa viável para a produção de dialquinilcarbinóis quirais, por meio da *hidrólise*, quando o substrato de partida são os acetatos racêmicos, ou por meio da *acilação*, que parte do próprio álcool racêmico.

Almeida e colaboradores (2020) avaliaram 12 lipases comerciais na resolução cinética de um acetado de ACL contendo 12 carbonos saturados, *via* hidrólise, usando MeCN (20% em tampão) como co-solvente. A triagem revelou a lipase *Candida antarctica* B imobilizada em resina acrílica (CAL-B) imobilizado em resina acrílica como sendo a mais eficiente na RCE, rendendo o (*R*)-álcool (rendimento de 39%) e o (*S*)-acetato (39% de rendimento), com  $ee_s$  e  $ee_p > 99\%$ ,  $c=50\%$  e  $E>200$ , Esquema 3.

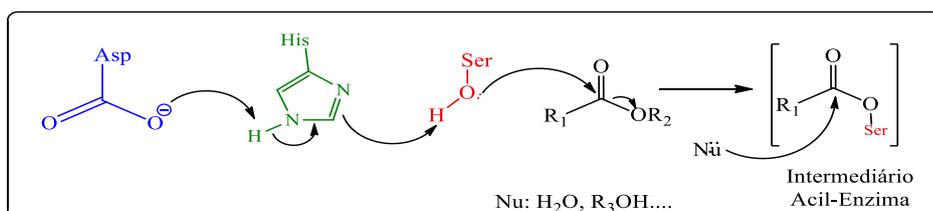
Esquema 3 - Resolução cinética enzimática de um acetato de ACL, via hidrólise, descrito na literatura



Fonte: Almeida *et al.* (2020).

A hidrólise e a esterificação dos racematos catalisados por lipase são realizados no sítio ativo da enzima, que é formado pela tríade catalítica (resíduos dos aminoácidos Serina-Histidina-Aspartato). O mecanismo geral da catálise enzimática está representado na Figura 2.

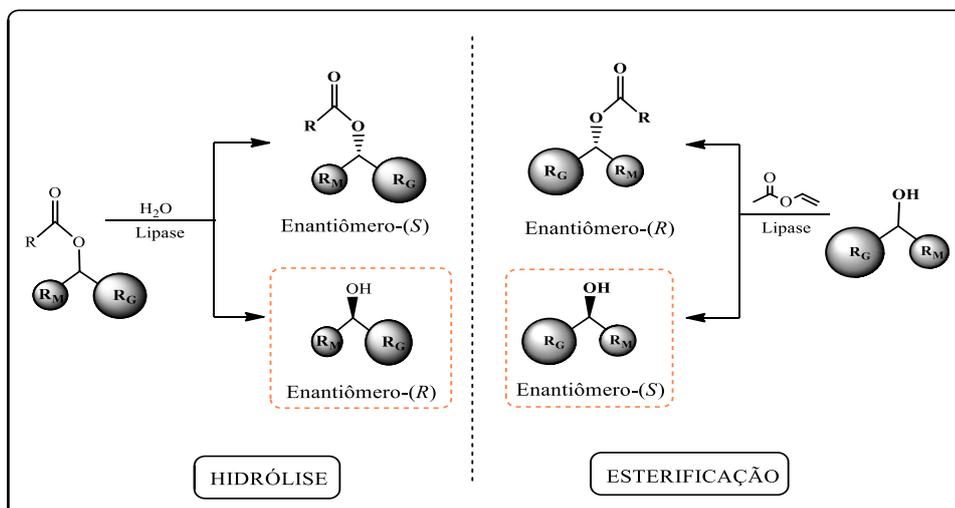
Figura 2 - Mecanismo geral da catálise enzimática, promovido pela tríade catalítica no sítio ativo da lipase



Fonte: Adaptado Faber (2011).

Conforme representado na Figura 2, o ânion do aspartato remove o hidrogênio ácido da histidina que, por sua vez, torna-se mais básica e ataca o hidrogênio da hidroxila da serina. O oxigênio nucleofílico da serina ataca o grupo carboxila do substrato, formando o intermediário acil-enzima. Por fim, o nucleófilo (Nu), geralmente água (mecanismo de hidrólise), ataca o intermediário acil-enzima. Quando a enzima está operando em um ambiente de baixa concentração de água, qualquer outro nucleófilo pode competir pelo intermediário acil-enzima, como por exemplo, uma molécula álcool (mecanismo de acilação de racêmico), levando assim a formação de um éster diferente (FABER, 2011; FERREIRA, 2016). É importante frisar que as duas estratégias de resolução, *via* hidrólise e *via* acilação, são complementares, pois geram como produtos os álcoois quirais com configurações opostas (Figura 3).

Figura 3 – Representação simplificada dos mecanismos de hidrólise e esterificação (acilação) na produção de álcoois e acetatos de configuração oposta



Fonte: Elaborado pelo autor.

O 1-[tris(isopropil)silil]penta-1,4-diin-3-ol (**1**) quiral é considerado um sinton versátil a ser empregado na síntese dos alquinil carbinóis lipídicos (LISTUNOV *et al.*, 2015; LISTUNOV *et al.*, 2018a). As referências mencionadas na Tabela 1 mostraram o desenvolvimento de metodologias biocatalíticas para a produção do **1** e seu acetato enatiopuros.

Tabela 1 - Resolução cinética enzimática (RCE) do acetato do *rac*-**1** (via hidrólise) e do *rac*-**1** (via acilação) descritas na literatura.

<i>Método</i>	<i>Processo</i>	<i>Referência</i>
REC via hidrólise		ALMEIDA <i>et al.</i> (2020)
REC via acilação		LISTUNOV <i>et al.</i> (2018)

Motivados pelos resultados promissores da RCE de **1**, via hidrólise, obtidos no nosso grupo de pesquisa (ALMEIDA *et al.*, 2020), resolveu-se investigar a metodologia

complementar, empregando-se o acetato de **1** (*rac*-**1**-Ac) como substrato racêmico a ser resolvido por lipases.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Biocatálise

A produção de moléculas por organismos vivos envolve uma série de reações complexas, catalisadas por enzimas, que ocorrem sob condições brandas e apresentam alta seletividade. Estas características dão embasamento e servem de inspiração para a biocatálise, uma alternativa atraente e ecologicamente coerente para os processos químicos que envolvem catalise química convencionais (FRYSZ-KOWSKA, 2020; WU *et al.*, 2021 ).

Do ponto de vista ambiental, as reações catalisadas por enzimas são mais compatíveis com os princípios da química verde e da química circular por serem mais sustentáveis. Em termos de economia, recursos energéticos e eficiência energética, a biocatálise, normalmente, envolve menor consumo de energia, redução de poluição industrial, reciclagem de biocatalisadores e redução no uso de solventes e reagentes perigosos (FRYSZ-KOWSKA, 2020; WOHLGEMUTH, 2021).

O uso dos biocatalisadores vem ganhando cada vez mais força com o avanço da tecnologia. Neste contexto, destacam-se a descoberta de novas variantes de enzimas, a modificação de enzimas através da engenharia de proteínas, além da modelagem de enzimas através de ferramentas computacionais (bioinformática) (WU *et al.*, 2021).

A biocatálise tem vasta aplicação na preparação de intermediários opticamente ativos. Dentre estes, destaca-se o emprego de enzimas na síntese de álcoois quirais de interesse das indústrias farmacêuticas e de aromas e fragrâncias está entre os mais proeminentes. Na indústria farmacêutica, esta classe de compostos são intermediários-chave na síntese de medicamentos (CHEN, 2019; PRIER; KOSJEK, 2019; DAL MAGRO *et al.*, 2019; MICKLISTSCH, 2019; WU *et al.*, 2021).

### 2.2. Enzimas

As enzimas são macromoléculas constituídas por proteínas, formadas por uma sequência de resíduos de aminoácidos ligados covalentemente entre si por ligações peptídicas, que possuem a habilidade de catalisar reações químicas e bioquímicas com alta régio-, estereo- e quimiosseletividade (LEHNINGER, 2013).

Estabilidade, especificidade de substrato e enantiosseletividade são características essenciais para uma boa atividade enzimática e subsequente aplicação industrial. A evolução da engenharia de proteínas, combinada com a evolução tecnológica de sequenciamento contribuíram no desenvolvimento de biocatalisadores (ALI *et al.*, 2021).

Embora a atividade catalítica das enzimas possa ser bastante reconhecida, muitas vezes sua estabilidade e custo são considerada uma limitação. Para contornar esses efeitos, a imobilização foi proposta inicialmente para superar os problemas associados a recuperação enzimática (SHELDON; VAN PELT, 2013).

Mais tarde, a imobilização foi usada para resolver algumas limitações das enzimas como, por exemplo, melhoramento da atividade enzimática sob condições adversas de catálise (DAL MAGRO *et al.*, 2020). Em uma abordagem sobre imobilização de enzimas, Arana-Peña *et al.*, (2021) relataram uma visão geral sobre imobilização de enzimas, discutindo suas vantagens e desvantagens, e focando em estratégias recentes para superar alguns dos problemas inerentes à imobilização. Em outra revisão, Gkantzou *et al.* (2021) abordam as descobertas enzimáticas recentes, que incluem o desenvolvimento nanobiocatalisadores e suas aplicações em transformações biocatalíticas.

Devido ao número cada vez maior de enzimas que são descobertas, os bioquímicos, por meio de um acordo internacional, adotaram um sistema de nomenclatura e classificação de enzimas. Esse sistema divide as enzimas em seis classes, cada uma com subclasses, com base nos tipos de reações que catalisam (LEHNINGER, 2013).

Tabela 2 - Classificação das enzimas mediante o tipo de reação catalisada

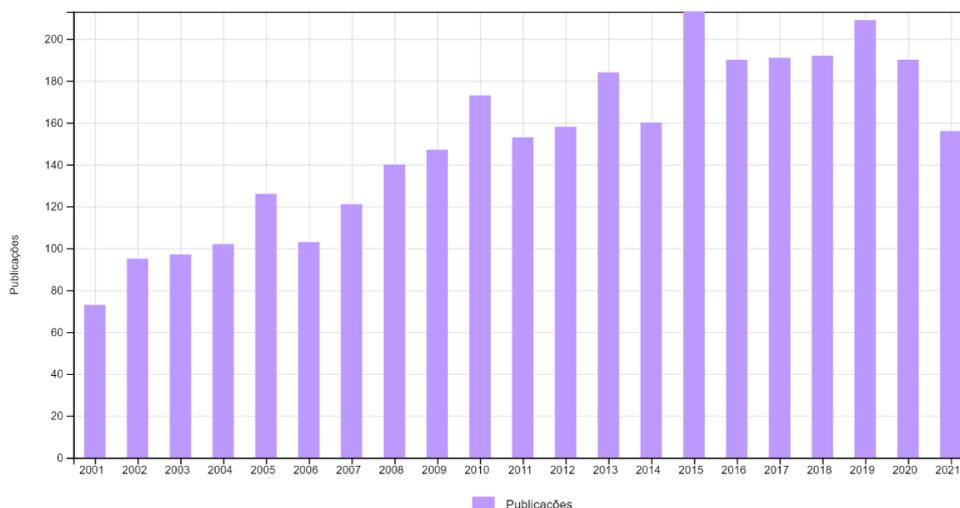
<b>CLASSES DE ENZIMAS</b>	<b>TIPO DE REAÇÃO CATALISADA</b>	<b>EXEMPLOS DE ENZIMAS</b>
<b>OXIDORREDUTASES</b>	Oxidação/redução, envolvendo a transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio e oxigênio.	Desidrogenases, oxidases, oxigenases, peroxidases
<b>TRANSFERASES</b>	Transferência de grupos funcionais, tais como, acil, metil, fosforil, amino.	Aminoácido transaminases

<b>HIDROLASES</b>	Reações de hidrólise, e em condições específicas a reação inversa.	Lipases, acilases, nitrilases, esterases, amidases, proteases
<b>LIASES</b>	Adição/eliminação sobre ligações C=C, C=N, C=O.	Aldolases, oxinitrilases, hidroxinitrila liases
<b>ISOMERASES</b>	Reações de isomerização	Sintetases, glicina ligase
<b>LIGASES</b>	Formação/clivagem de duas moléculas frente a ligações C-O, C-S, C-N, C-C.	Racemases, glicose, isomerase

Fonte: Lehninger (2013).

Dentre as enzimas apresentadas na Tabela 2, destacam-se as lipases (EC 3.1.1.3), que pertencem ao grupo das hidrolases. As lipases são empregadas em um grande número de processos biocatalíticos, em escalas laboratorial e industrial (MIRANDA *et al.*, 2015; SEDDIGI *et al.*, 2017). O número de publicações envolvendo estas enzimas vem crescendo continuamente, conforme extraído do banco dados “*Web of Science*”, usando os termos “lipase and biocatalysis” como critérios de pesquisa. A Figura 4 apresenta o número de trabalhos publicados nos últimos 20 anos (de janeiro de 2001 a outubro de 2021), tendo um total de 3.173 publicações.

Figura 4 - Número de publicações dos últimos 20 anos, de acordo com pesquisa no “*Web of Science*”, usando os termos “lipase and biocatalysis” como critérios de pesquisa

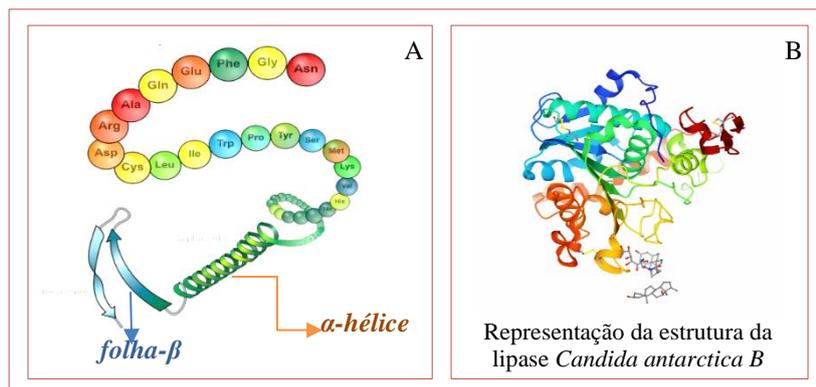


Fonte: Lehninger (2013).

### 2.3. Lipases

As lipases, segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), são classificadas como triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3, onde EC significa *Enzyme Commission*, o primeiro dígito (3) referente ao nome da classe (hidrolase), o segundo (1) é a subclasse (atua sobre ligações éster), o terceiro (1) refere-se à subclasse (carboxil éster hidrolase), e o quarto número (3) significa que a enzima atua sobre triglicerídeos (BEZBORODOV; ZAGUSTINA, 2016). As lipases, normalmente, têm a presença do dobramento  $\alpha/\beta$  hidrolase, sendo composto por várias  $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$  intercaladas (Figura 5). Este é um dobramento bastante comum nas hidrolases, e algumas delas têm um domínio de tampa que sofre ativação interfacial durante o processo catalítico (ALI *et al.*, 2021).

Figura 5- Representação dos dobramentos  $\alpha/\beta$  hidrolase (A) e representação estrutural da lipase (B).

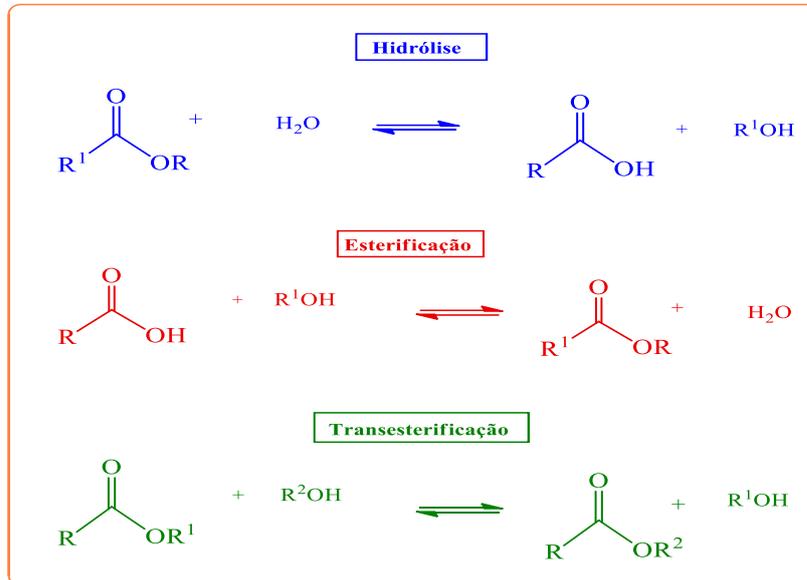


Fonte: Elaborado pelo autor.

As lipases são, as enzimas mais utilizadas em biotransformação, por conta da sua ampla especificidade de substrato, acessibilidade comercial e ausência de qualquer dependência de cofator (RODRIGUES, 2019). Além disso, a capacidade de trabalharem em meios heterogêneos, apresentarem estabilidade em solventes orgânicos e catalisarem na interface lipídio-água, são características adicionais que fazem com que estas enzimas tenham aplicações em vários segmentos industriais, como alimentos, detergentes, indústrias farmacêuticas, têxteis, cosméticas e de papel (SONI, 2021).

As lipases são capazes de catalisar reações de hidrólise, acilação, entre outras, tendo notável aplicação na resolução cinética de álcoois, ácidos, ésteres e amidas (FABER, 2011; SANFILIPPO *et al.*, 2018). Conforme já mencionado, além de promoverem hidrólise, as lipases também catalisam reações reversas, ou seja, reações de formação de ésteres a partir de álcoois ou ácido carboxílico, com liberação de água (esterificação) (SAAT *et al.*, 2019; AGAPAY *et al.*, 2020; ESCOBETO; FERNÁNDEZ, 2021). O processo de hidrólise e esterificação podem ser combinados numa sequência de reações denominadas transesterificação (OH *et al.*, 2019; REIG *et al.*, 2020; POOJA *et al.*, 2021). O Esquema 4 resume as reações catalisadas por lipases.

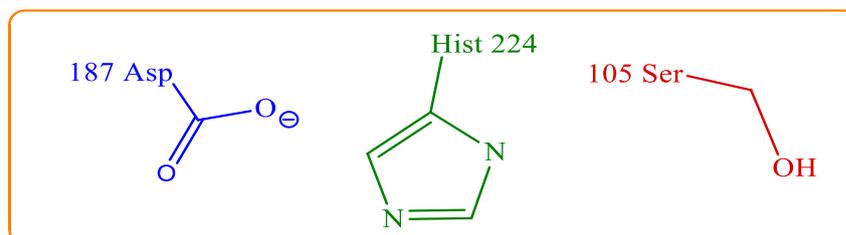
Esquema 4 - Representação das reações de hidrólise, esterificação e transesterificação catalisadas por lipases.



Fonte: Adaptado de Ferreira (2016).

A determinação da estrutura da lipase revelou que o sítio ativo é formado por três resíduos de aminoácidos, conhecidos também como tríade catalítica, que são responsáveis pelo mecanismo catalítico, (ALI *et al.*, 2021) (Figura 6).

Figura 6 - Estruturas químicas dos aminoácidos aspartato (Asp), histidina (His) e serina (Ser) que formam a tríade catalíticas das lipases

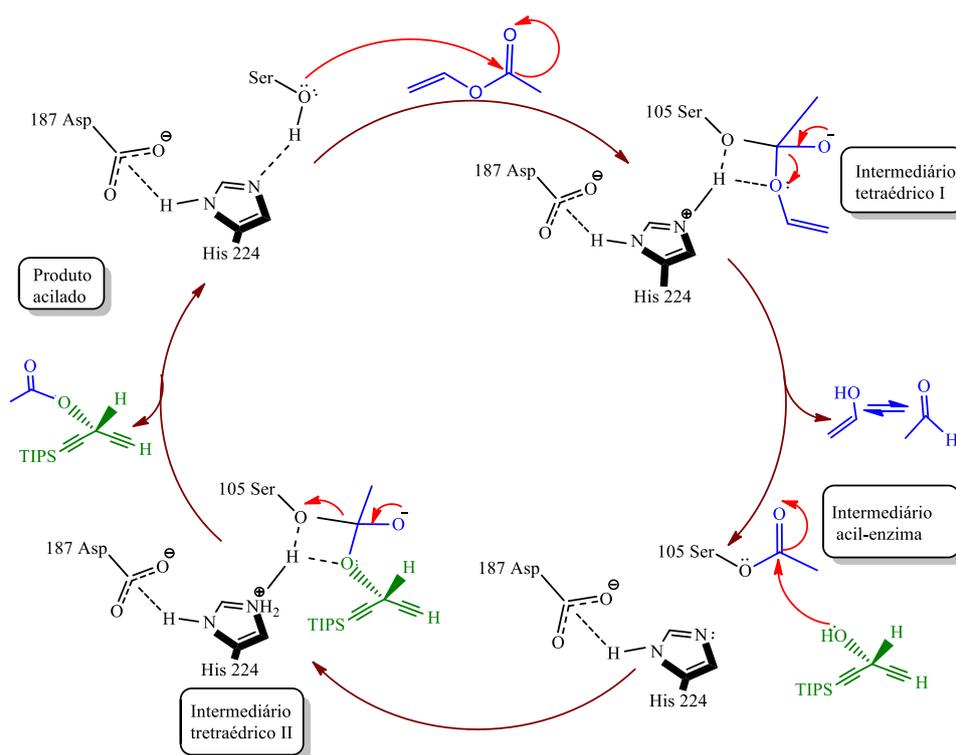


Fonte: Adaptado de Ferreira (2016).

As lipases são enzimas que apresentam um mecanismo peculiar de atuação (Figura 6). Podem catalisar reações de formação de ésteres a partir de um álcool e de um doador de grupo acila, em ambiente não aquoso. Esta reação de acilação ocorre em etapas: (i) inicialmente,

o arranjo espacial desses três resíduos de aminoácidos favorece a histidina a aumentar a nucleofilicidade do grupo hidroxila da serina através de uma ligação de hidrogênio. Então o grupo hidroxila da serina age como nucleófilo atacando a carboxila do substrato doador de acila, clivando a ligação C=O, originando assim o intermediário tetraédrico I, que é estabilizado por pontes de hidrogênio. Nesta fase, a histidina captura o hidrogênio liberado pela serina e o aspartato estabiliza a carga positiva que se forma na histidina. Após a sua estabilização, o intermediário tetraédrico I é desfeito pelo retorno da ligação C=O e, conseqüente, clivagem da ligação éster. O álcool liberado captura o próton da histidina, formando assim um complexo acil-enzima; (ii) na etapa seguinte, um nucleófilo apropriado (H<sub>2</sub>O, álcool ou amina) ataca o carbono da ligação C=O do intermediário acil-enzima, formando o intermediário tetraédrico II. Por fim, a reconstituição da ligação C=O desfaz o intermediário tetraédrico II e fornece o produto acilado, regenerando a enzima que retorna ao ciclo catalítico (SILVA, 2016).

Esquema 5 - Ciclo catalítico das lipases em uma reação de acilação de álcoois secundários



Fonte: Elaborada pelo autor.

Durante o curso de todas as reações mediadas por lipases, qualquer tipo de quiralidade no substrato é "reconhecida" pela enzima, o que causa uma preferência por uma das duas possíveis vias estereoquímicas para a reação. O valor desta discriminação é um parâmetro

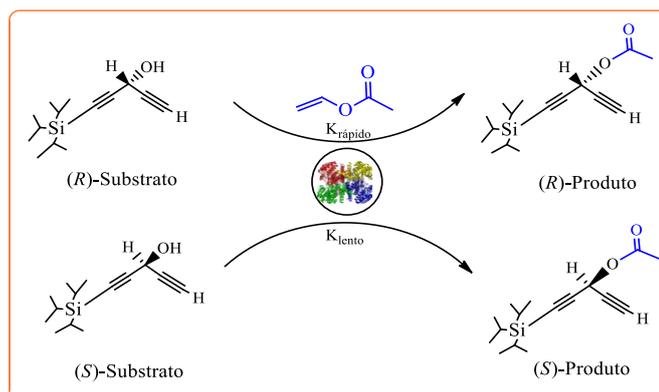
crucial para as resoluções cinéticas, uma vez que a "seletividade" é governada pela cinética reacional (DIAS, *et al.*, 2019).

#### 2.4. Resolução Cinética Enzimática

A resolução cinética enzimática (RCE) é uma importante estratégia para a obtenção de substâncias quirais a partir de racematos (BHARDWAJ; GUPTA, 2017). Ela se baseia na separação dos enantiômeros através de uma reação enantiosseletiva, devido a cada um dos enantiômeros possuírem velocidades de reação diferentes. Ou seja, para se obter uma boa resolução, a constante de especificidade (ou seja,  $k_{cat}/K_M$ ) da lipase para uma reação com um dos enantiômeros deve ser muito maior do que para a mesma reação com o outro enantiômero. Por exemplo, se a razão da constante de especificidade para o enantiômero *R* ( $k_{catR}/K_{MR}$ ) for muito alta em comparação com a constante de especificidade para o enantiômero *S* ( $k_{catS}/K_{MS}$ ), no momento em que o enantiômero *R* foi totalmente convertido no produto, essencialmente, nenhum enantiômero *S* terá reagido. Como resultado, a reação fornecerá uma mistura de 50% do produto de configuração *R* e 50% do reagente inicial de configuração *S*, Figura 7. Assim, o valor de conversão (*c*) ideal para a reação é de 50% (SILVA, 2011). Vale mencionar que, a razão da constante de especificidade é também conhecida como razão enantiomérica e representada pelo símbolo *E* (DIAS *et al.*, 2019).

A estereosseletividade enzimática surge da diferença de energia existente no estado de transição, associado à formação dos dois complexos diastereoméricos no sítio ativo da enzima. Estes complexos diastereoméricos possuem energias livres ( $\Delta G$ ) diferentes, permitindo sua "discriminação quiral", ou seja, um dos enantiômeros é biotransformado mais rapidamente que o outro (FERREIRA, 2016).

Figura 7 - Ilustração de uma reação de RCE, *via* acilação, em que apenas um dos enantiômeros é convertido em produto



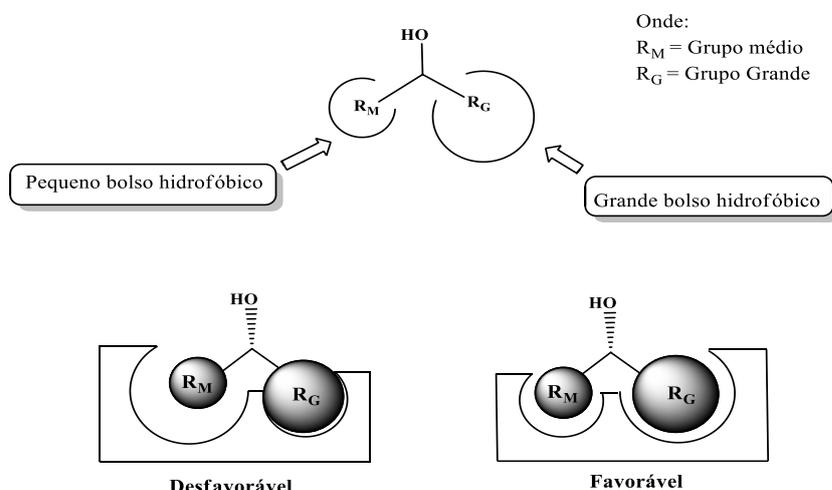
Fonte: Elaborado pelo autor.

A enantiosseletividade das lipases é de grande interesse e importância para resolução de racematos e obtenção de blocos quirais para síntese química. Para melhor compreender a questão da enantiosseletividade das lipases, é imprescindível a explicação sobre a “regra de Kazlauskas” (ROMANO *et al.*, 2020). Através desta regra, pode-se especular quais substratos serão bons “candidatos” à RCE, e quais não serão (SILVA, 2016).

#### 2.4.1. Regra de Kazlauskas

Em 1991, Kazlauskas e colaboradores desenvolvem uma regra empírica (regra de Kazlauskas) que explica o reconhecimento quiral das lipases, podendo prever a enantiopreferência destas enzimas frente a um determinado substrato (SILVA, 2011). Nesta regra, o modelo do sítio ativo da lipase consiste em duas cavidades de tamanhos diferentes, uma grande (G) e outra pequena (P) (Figura 8). A enantiopreferência ocorre devido a um encaixe perfeito de um dos enantiômeros nos bolsões hidrofóbicos (modo favorável), enquanto o outro enantiômero não terá um encaixe perfeito (modo desfavorável) (KAZLAUSKAS *et al.*, 1991).

Figura 8 - Representação simplificada das cavidades de uma lipase, segundo a regra de Kazlauskas

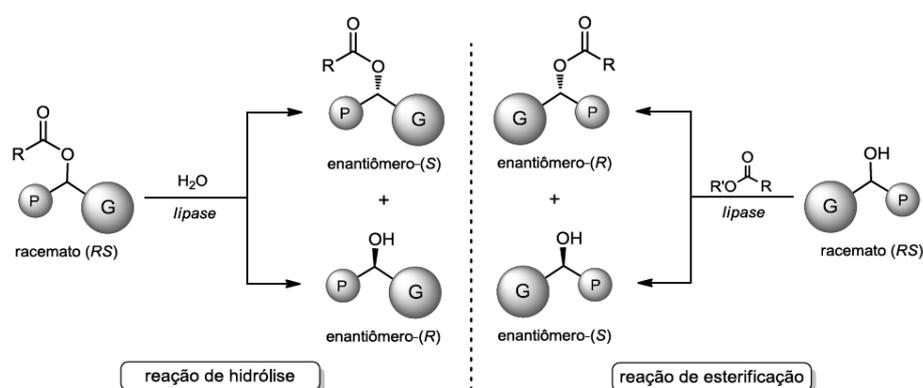


Fonte: Elaborado pelo o autor.

Desta forma, para reações com álcoois secundários mediada por lipase, é possível prever qual enantiômero que será favorecido cineticamente, em função dos tamanhos dos grupos substituintes e da acomodação destes no sítio ativo da enzima. A regra indica que nas reações de acilação, o álcool acetilado será de configuração *R* e o remanescente permanecerá com configuração *S* (KAZLAUSKAS *et al.*, 1991).

Embora o modelo proposto por Kazlauskas e colaboradores tenha sido destinado para a hidrólise de ésteres, esta regra também tem sido extrapolada e bem aceita para a acilação de álcoois secundários (Figura 9).

Figura 9 - Modelo empírico de Kazlauskas para reações de acilação de álcoois secundários e hidrólise dos correspondentes ésteres, na presença de lipases



Fonte: Adaptado de Ferreira (2016).

### 2.4.2. Parâmetros para Biocatálise

Os parâmetros para avaliar uma resolução cinética enzimática catalisada por lipase podem ser definidos pelo excesso enantiomérico (*ee*), percentual de conversão e pela razão enantiomérica ou fator de seletividade *E*. O valor de *ee* determina a pureza enantiomérica do composto, e seu valor pode ser obtido pela **Equação 1**:

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

A conversão (*c*) é expressa pela seguinte **Equação 2**:

$$c(\%) = \frac{e.e.s}{e.e.s + e.e.p} \times 100 \quad (2)$$

Logo, após substituição do termo *c* e manipulações algébricas, a seletividade *E* pode ser expressa apenas em termos dos excessos enantioméricos *eep* e *ees* na seguinte **Equação 3**:

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

Uma RCE que apresenta um valor de *E* igual a 1 é considerada uma reação não seletiva. Para a resolução cinética enzimática ser aceitável, *E* deve possuir um valor mínimo igual a 20, sendo o ideal >200 (FABER, 2011).

## 2.5. Dialquilcarbinóis (DAC) lipídicos: ocorrência e atividade biológica

Entre os compostos naturais, os compostos acetilênicos constituem uma família rica de metabólitos secundários, produzidos por plantas, fungos, algas, esponjas marinhas e insetos. Os DAC lipídicos são conhecidos por possuírem bioatividades potentes, como antimicrobianas, antivirais, antifúngicas, citotóxicas e inibidoras de enzimas. Eles também têm sido considerados úteis como nutracêuticos para o desenvolvimento de alimentos mais saudáveis (CAMPOS *et al.*, 2020).

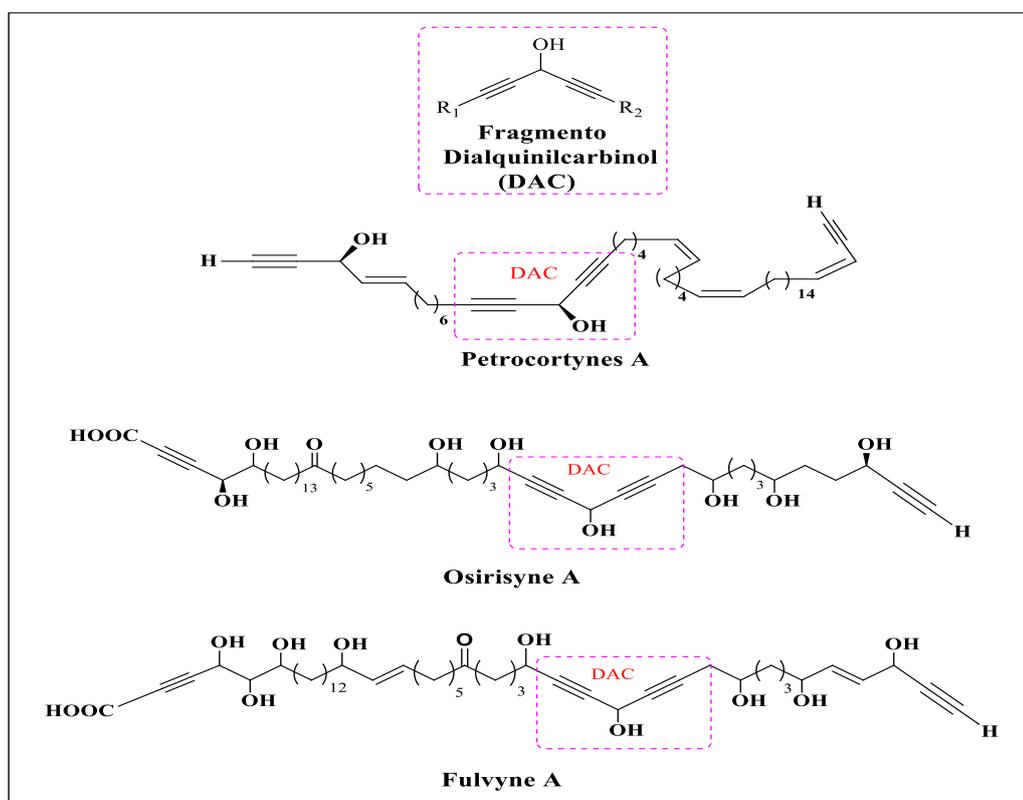
As esponjas marinhas da ordem Haplosclerida, incluindo os gêneros *Petrosia* e *Xestospongia* (SANTIAGO, 2019; A FRISTOHADY *et al.*, 2021), *Haliclona* (ZHU, 2019 *et al.*; GUNATHILAKE *et al.*, 2020) e *Callyspongia* (EL-HAWARY *et al.*, 2019;

HADISAPUTRI *et al.*, 2021), são as principais fontes de poliacetilenos de cadeia longa. Dentre estes, o gênero *Petrosia* destaca-se na biossíntese dessa classe de metabólitos secundários que exibem notável atividade biológica *in vitro*, especialmente ação citotóxica contra diversos tipos de células tumorais (LISTUNOV *et al.*, 2018b).

O potencial biológico dos DAC lipídicos naturais motivou muitos estudos de investigação da unidade responsável pela atividade citotóxica da molécula. Estudos da relação estrutura-atividade com derivados sintéticos revelaram que, entre as moléculas acetilênicas investigadas, aquelas onde a ligação tripla encontrava-se na posição geminal a um grupo hidroxila, ou seja, pertencente a função de álcool propargílico, eram a de maior potencial biológico. Assim, o fragmento dialquinilcarbinol (DAC) foi identificado como sendo o grupo farmacoforo da classe (LISTUNOV *et al.*, 2015a).

A Figura 10 apresenta exemplos de estruturas de DAC lipídicos naturais isolados de esponjas marinhas (CAMPOS *et al.*, 2020). É importante frisar que, até o momento, nenhum produto natural foi relatado com DAC em posição terminal.

Figura 10 - Estruturas químicas do fragmento comum aos DAC lipídicos e de exemplos de produtos naturais desta classe isolados de esponjas

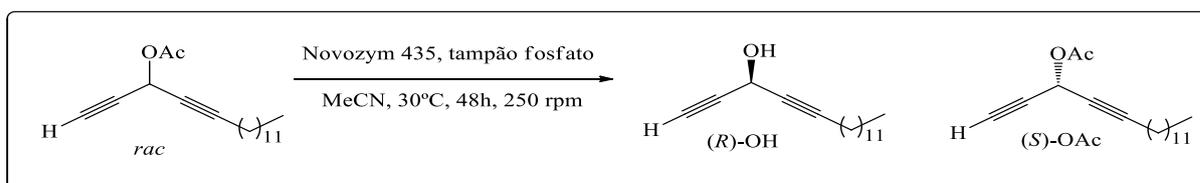


Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma busca pelo número de publicações no banco de dados do “SciFinder” e “Web of Science” sobre “dialkynylcarbinol” revelou um total de 14 publicações (LISTUNOV *et al.*, 2015a, b, c, d, e; LISTUNOV *et al.*, 2016; BOURKHIS *et al.*, 2017; BOURKHIS *et al.*, 2018a, b; LISTUNOV *et al.*, 2018a, b, c; RULLIERE *et al.*, 2019; ALMEIDA *et al.*, 2020). Dentre estas, as que empregaram a RCE de DACs serão apresentadas a seguir.

Bourkhis e colaboradores (2018) testaram uma série de lipases na resolução do acetato de DAC lipídico (*rac*-Ac) representado no Esquema 6. As enzimas mais eficientes foram Amano PS da *Burkholderia cepacia* imobilizada em terra diatomácea (PS-IM), *Thermomyces lanuginous* imobilizada em immovead-150 (TLL) e *Candida antarctica* B imobilizada em resina acrílica (Novozym 435). Esta última apresentou resultados ideais, permitindo o isolamento do (*R*)-Ac em 39% de rendimento e *ee*>92% e (*S*)-Ac em 40% de rendimento com *ee*> 99% (Esquema 6).

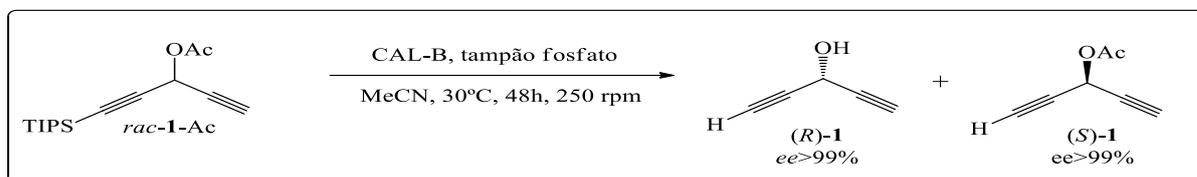
Esquema 6 - Resolução cinética enzimática de um acetato de DAC lipídico realizada por Bourkhis *et al.*, 2018



Fonte: Bourkhis *et al.* (2018).

Almeida e colaboradores (2020) investigaram quinze lipases comercialmente disponíveis para avaliar a resolução cinética do acetato de 1-[tris(isopropil)silil]penta-1,4-diin-3-ol (*rac*-1-Ac), *via* hidrólise (Esquema 8). As lipases que apresentaram alta enantiosseletividade (*E*> 200) foram Amano lipase de *Pseudomonas fluorescens*, Amano PS da *Burkholderia cepacia* imobilizada em terra diatomácea (PS-IM), *Thermomyces lanuginous* imobilizada em immovead-150 (TLL) e *Candida antarctica* B imobilizada em resina acrílica (CAL-B), com valores de conversão próximos a 50%.

Esquema 7 - Resolução cinética enzimática do acetato de 1-[tris(isopropil)silil]penta-1,4-diin-3-ol (*rac*-1-Ac), via hidrólise, realizada por Almeida *et al.*, 2020



Fonte: Almeida *et al.* (2020).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

- Empregar lipases na resolução cinética do 1-[tris(isopropil)silil]penta-1,4-diin-3-ol, via acilação, para a produção dos álcoois enantiomericamente puros e/ou enriquecido.

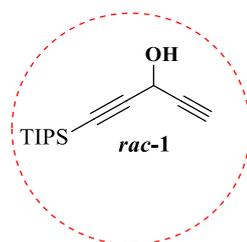
#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar diferentes lipases comerciais na RCE;
- Avaliar o papel do solvente na RCE;
- Otimizar o processo através da variação da temperatura, tempo e relação enzima:substrato;
- Avaliar o reuso da enzima.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O 1-[tris(isopropil)silil]penta-1,4-diin-3-ol é um DAC contendo somente cinco carbonos, que tem um dos carbonos terminais protegido com o grupo tri-isopropilsilila (TIPS), Figura 11. Este tem sido considerado um sinton importante na síntese de DAC lipídicos, uma vez que já representa o farmacóforo quiral dos compostos bioativos (LISTUNOV *et al.*, 2015a).

Figura 11 - Estrutura química do sinton 1-[tris(isopropil)silil]penta-1,4-diin-3-ol.



Fonte: Elaborado pelo autor

Somente dois artigos publicados na literatura investigaram o emprego de lipases na produção **1** de forma quiral através de RCE. O primeiro foi desenvolvido por Listunov *et al.*, (2018) e envolveu a RCE, *via* acilação, do álcool 1-[tris(isopropil)silil]penta-1,4-diin-3-ol. Entretanto, o (*S*)-**1** foi obtido com excesso de (*ee<sub>s</sub>* 42%), o (*R*)-**2** com (*ee<sub>p</sub>* 97%) e conversão (*c*=31%). Nesse estudo, as condições empregadas foram após 24 horas de reação em temperatura ambiente e utilizando ciclohexano como solvente.

O segundo trabalho foi desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa (ALMEIDA *et al.*, 2020), que investigou a RCE, *via* hidrólise, do acetato de **1** (*rac*-**1**-Ac). Os resultados alcançados nos motivaram a realizar o estudo da reação complementar (*via* acilação), como forma de melhorar os resultados descritos na literatura.

##### 4.1 Triagem de lipases na resolução cinética enzimática do *rac*-**1**

A triagem enzimática para a resolução cinética do dialquinilcarbinol 1-[tris(isopropil)silil]penta-1,4-diin-3-ol (*rac*-**1**) foi realizada com 10 lipases comerciais (Tabela 3), empregando-se as condições já estabelecidas pelo grupo em estudos similares de triagem enzimática (FONSECA *et al.*, 2015): solvente orgânico hexano, acetato de vinila como doador

de acila, temperatura de 30°C, tempo reacional de 24 h, agitação de 250 rpm e razão enzima substrato 2:1 (m/m) (Esquema 8). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.

Esquema 8 - Resolução cinética enzimática, via acilação, do *rac*-1 catalisada por lipase

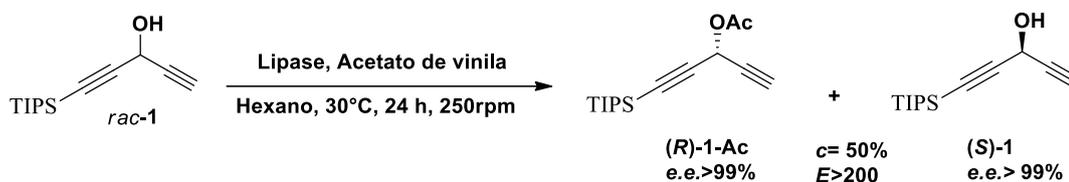


Tabela 3 – Resultados da triagem de lipases na resolução cinética enzimática, via acilação, do *rac*-1

<i>Entrada</i>	<i>Lipase</i>	<i>ee<sub>p</sub></i> (%) <sup>a</sup>	<i>ee<sub>s</sub></i> (%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>
<b>1</b>	<i>Candida antarctica</i> B imobilizada em resina acrílica (CAL-B)	>99	>99	50	>20 0
<b>2</b>	<i>Thermomyces lanuginous</i> imobilizada em immobead-150 (TLL)	>99	>99	50	>20 0
<b>3</b>	<i>Lipozyme</i> RM IM	>99	20	16	>20 0
<b>4</b>	Amano PS da <i>Burkholderia cepacia</i> imobilizada em terra diatomácea (PS-IM)	>99	>99	50	>20 0
<b>5</b>	Amano lipase PS <i>Burkholderia cepacia</i>	99	25	20	>20 0
<b>6</b>	Amano M de <i>Mucor javanicus</i>	-	-	-	-
<b>7</b>	Amano lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	>99	>99	50	>20 0
<b>8</b>	<i>Rhizopus oryzae</i>	>99	2	2	>20 0
<b>9</b>	<i>Rhizopus niveus</i>	-	-	-	-
<b>10</b>	<i>Candida rugosa</i>	93	20	18	>20 0

Fonte: Dados de pesquisa.

<sup>a</sup> Determinado por CG;

<sup>b</sup> Conversão,  $c = e.e.s/(e.e.s+e.e.p)$ ;

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

As lipases imobilizadas CAL-B (*Candida antarctica* B imobilizada em resina acrílica), TLL (*Thermomyces lanuginous* imobilizada em immobead-150) e PS-IM (Amano PS da *Burkholderia cepacia* imobilizada em terra diatomácea) apresentaram melhores resultados de atividade e seletividade enzimática, uma vez que os valores de conversão ( $c= 50\%$ ), excesso

enantiomérico *e.e.* (>99%) e de enantiosseletividade ( $E > 200$ ) encontrados estão de acordo com os padrões que caracterizam uma excelente resolução cinética enzimática. Dentre as lipases livre, a *Pseudomas fluorescens* foi a que também apresentou ótimos resultados de conversão ( $c=50\%$ ), *ee* (>99%) e enantiosseletividade (>200).

É importante observar que, a atribuição das configurações de substrato ((*S*)-**1**) e produto ((*R*)-**2**) na RCE de *rac-1* foram atribuídas através da comparação dos tempos de retenção destes compostos nos cromatogramas (análises por CG) obtidos em cada experimento com os descritos por Almeida *et al.* (2020). Os tempos de retenção dos álcoois no racemato é de 40,311min e 39,437min para o (*R*)-álcool e (*S*)-álcool, respectivamente. No caso do racemato do acetato de **1**, os tempos de retenção são de 30,070min e 28,787min para o (*R*)-acetato e (*S*)-acetato, respectivamente.

Na triagem enzimática observou-se que as enzimas que foram eficientes promoveram a acilação do (*R*)-**1**, formando o (*R*)-**1**-Ac com os seguintes tempos de retenção em cada enzima testada: 30,386min (CAL-B); 30,365min (TLL); 30,366min (PS-IM) e 30,446min (*P. fluorescens*). Os tempos de retenção para o (*S*)-**1** remanescente foram: 39,177min (CAL-B); 39,172min (TLL); 39,204min (PS-IM); 39,269min (*P. fluorescens*). Os cromatogramas estão apresentados no ANEXO II.

Os resultados mostraram uma enantiopreferência enzimática que segue a regra empírica de Kazlauskas (KAZLAUSKAS *et al.*, 1991), uma vez que o álcool de configuração *R* foi acetilado preferencialmente. A referida regra preconiza que nas reações de acilação, utilizando lipases, o álcool acetilado será de configuração *R* e o remanescente permanecerá com configuração *S* (KAZLAUSKAS *et al.*, 1991).

Com o objetivo de otimizar a resolução cinética enzimática de *rac-1*, novos experimentos foram realizados com as enzimas que se mostraram mais eficientes na triagem, visando investigar o efeito do solvente, do tempo, da temperatura, da relação enzima:substrato e do reuso das enzimas.

#### **4.2 Estudo da influência de solvente na resolução cinética enzimática de *rac-1***

O solvente a ser utilizado em biocatálise precisa ser compatível com a enzima, para que ela permaneça ativa e não seja desnaturada. O parâmetro mais frequentemente usado para descrever quantitativamente a polaridade de um solvente sobre seu efeito no processo biocatalítico é o logaritmo do coeficiente de partição ( $\log P$ ). Além da lipofilicidade, propriedades como polarizabilidade e constante dielétrica dos diferentes solventes também

podem ser levados em consideração para investigar a influência destes na reação (LAANE *et al.*, 1987; VALIVETY *et al.*, 1991; LORTIE, 1997).

Com isso, foi realizada uma triagem de solventes, usando heptano (log *P* 4,0), hexano (log *P* 3,5), ciclo hexano (log 3,2), tolueno (log *P* 2,5), éter etílico (log *P* 0,83), THF (log *P* 0,49) e acetonitrila (log *P* -0,33) na RCE de *rac*-1 com as enzimas imobilizadas CAL-B, TLL e PS-IM, além da lipase livre de *P. fluorescens*. Os resultados obtidos nesse estudo estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados da triagem de solventes na resolução cinética enzimática, via acilação, do *rac*-1 catalisada por lipases

		<i>CAL-B</i>				<i>Pseudomonas fluorescens</i>			
<i>Solvente</i>	<i>Log P</i>	<i>e.e.p</i> (%) <sup>a</sup>	<i>e.e.s</i> (%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>	<i>e.e.p</i> (%) <sup>a</sup>	<i>e.e.s</i> (%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>
<i>Heptano</i>	4,0	>99	>99	50	>200	>99	>99	50	>200
<i>Hexano</i>	3,5	>99	>99	50	>200	>99	>99	50	>200
<i>Ciclo hexano</i>	3,2	>99	98	50	>200	>99	97	49	>200
<i>Tolueno</i>	2,5	>99	>99	50	>200	>99	54	35	>200
<i>Éter etílico</i>	0,83	>99	>99	50	>200	>99	35	26	>200
<i>Tetra-hidrofurano (THF)</i>	0,49	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acetonitrila (ACN)</i>	-0,33	-	-	-	-	>99	42	30	>200

		<i>TLL</i>				<i>PS-IM</i>			
<i>Solvente</i>	<i>Log P</i>	<i>e.e.p</i> (%) <sup>a</sup>	<i>e.e.s</i> (%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>	<i>e.e.p</i> (%) <sup>a</sup>	<i>e.e.s</i> (%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>
<i>Heptano</i>	4,0	>99	>99	50	>200	>99	>99	50	>200
<i>Hexano</i>	3,5	>99	>99	50	>200	>99	>99	50	>200
<i>Ciclo hexano</i>	3,2	>99	66	40	>200	>99	>99	50	>200
<i>Tolueno</i>	2,5	>99	76	43	>200	>99	98	49	>200
<i>Éter etílico</i>	0,83	>99	65	39	>200	>99	>99	50	>200
<i>Tetra-hidrofurano (THF)</i>	0,49	>99	9	8	>200	>99	42	30	>200
<i>Acetonitrila (ACN)</i>	-0,33	>99	10	9	>200	>99	63	39	>200

Fonte: Dados de pesquisa.

<sup>a</sup> Determinado por CG;

<sup>b</sup> Conversão,  $c = e.e.s/(e.e.s+e.e.p)$ ;

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

De acordo com os resultados apresentada na Tabela 4, as enzimas CAL-B, TLL, PS-IM e *P. fluorescens* levaram à produção do (*R*)-**2** e (*S*)-**1** com valores máximos de excesso enantiomérico (*e.e.*) em solventes apolares. Com o aumento da polaridade dos solventes em estudo, ocorreu uma considerável diminuição do (*e.e.*) e da conversão (*c*). Normalmente, quando há mudança de polaridade do solvente, as lipases sofrem alguma alteração na sua atividade enzimática (FONSECA *et al.*, 2015). Essas alterações são devido ao ambiente aquoso natural das enzimas; os grupos hidrofílicos como -COO-, -OH, -NH<sub>3</sub>, -SH, e -CONH<sub>2</sub> estão localizados na superfície externa da enzima tornando-a hidratada. Como consequência, a superfície de uma enzima é coberta por uma camada de água fortemente ligada. Esta água residual é responsável por reter a estrutura tridimensional e, portanto, sua atividade catalítica (KAZLAUSKAS *et al.*, 1991; FABER, 2011). Logo, a atividade enzimática em reações catalisadas por lipases aumenta com o aumento dos valores de log *P*. Solventes polares (log *P* negativo) tendem a retirar parte da água que constitui a camada de hidratação essencial da superfície da enzima, 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).

Desse modo, os estudos seguintes foram realizados com base na enzima que apresentou um amplo espectro de solventes estudados, que no caso foi a CAL-B. Dentre os 7 solventes testados, a CAL-B apresentou uma atividade eficiente em 5 deles. É importante frisar também que o heptano foi selecionado para ser empregado nos estudos posteriores devido ao seu apelo “sustentável”. De acordo com a literatura, o heptano possui algumas vantagens em detrimento aos outros solventes, como um menor dano à segurança, à saúde e ao meio ambiente (GRUNDTVIG *et al.* 2018).

### 4.3 Estudo do tempo na resolução cinética enzimática do *rac*-**1** catalisada pela lipase CAL-B

Com o objetivo de obter a relação entre a temperatura e o tempo reacional da resolução cinética, foi realizado, a princípio, estudos com a temperatura de 30°C e tempos de 24 e 12 horas. Posteriormente, com o intuito de diminuir o tempo reacional, os estudos foram realizados com temperatura de 40°C e tempos de 24, 12, 6, 2 e 1 hora. As condições empregadas foram: CAL-B, heptano, enzima:substrato (2:1) e os resultados estão descritos na Tabelas 5.

Tabela 5 - Resultados da resolução cinética de *rac-1* com CAL-B, via acilação, variando-se temperatura e tempo.

<i>Entrada</i>	<i>Temperatura(°C)</i>	<i>Tempo(h)</i>	<i>ee<sub>p</sub>(%)<sup>a</sup></i>	<i>ee<sub>s</sub>(%)<sup>a</sup></i>	<i>c(%)<sup>b</sup></i>	<i>E<sup>c</sup></i>
<b>1</b>	30	24	>99	>99	50	>200
<b>2</b>		12	>99	86	46	>200
<b>3</b>	40	24	>99	>99	50	>200
<b>4</b>		12	>99	>99	50	>200
<b>5</b>		6	>99	>99	50	>200
<b>6</b>		2	>99	>99	50	>200
<b>7</b>		1	>99	94	48	>200

Fonte: Dados de pesquisa.

<sup>a</sup> Determinado por CG;

<sup>b</sup> Conversão,  $c = e.e.s/(e.e.s+e.e.p)$ ;

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

A análise dos resultados da Tabela 5 mostrou que, quando a RCE foi realizada a 30°C ocorreu uma diminuição considerável dos valores de  $ee_s$  e conversão ( $c$ ) em função da redução do tempo de 24h ( $ee_p > 99\%$ ;  $ee_s > 99\%$ ;  $c = 50\%$ ;  $E > 200$ ) para 12h ( $ee_p > 99\%$ ;  $ee_s 86\%$ ;  $c = 46\%$ ;  $E > 200$ ), obtendo-se os valores desejáveis no tempo maior.

Os estudos da RCE de *rac-1* a 40°C foram iniciados com o tempo 24h, seguindo-se da diminuição deste para 12, 6 e 2h. Em todos os experimentos, foram obtidos valores de excessos enantioméricos, conversão e enantiosseletividade ideais ( $ee_p > 99\%$ ;  $ee_s > 99\%$ ;  $c = 50\%$ ;  $E > 200$ ). Entretanto, a diminuição do tempo reacional para 1 hora resultou na diminuição dos valores de conversão ( $c = 48\%$ ) e excesso enantiomérico do substrato ( $ee_s 94\%$ ).

A partir destes resultados, concluiu-se que o aumento da temperatura de 30 para 40°C resultou uma diminuição considerável no tempo da RCE de *rac-1* catalisada por CAL-B na presença de heptano.

#### 4.4 Estudo da razão enzima:substrato na resolução cinética enzimática de *rac-1* catalisada pela lipase CAL-B

Foi realizado o estudo da variação da razão enzima:substrato da RCE do *rac-1*, nas temperaturas de 30 e 40°C, tempos de 24h e 2h, respectivamente. Os resultados estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6- Resultados da resolução cinética enzimática do *rac-1* com CAL-B, via acilação, variando-se a razão enzima:substrato

<i>Entrada</i>	<i>Temperatura(°C)</i>	<i>Relação (enzima:substrato)</i>	<i>ee<sub>p</sub>(%)<sup>a</sup></i>	<i>ee<sub>s</sub>(%)<sup>a</sup></i>	<i>c(%)<sup>b</sup></i>	<i>E<sup>c</sup></i>
<b>1</b>	30	2:1	>99	>99	50	>200
<b>2</b>		1:1	>99	74	43	>200
<b>3</b>	40	2:1	>99	>99	50	>200
<b>4</b>		1:1	>99	>99	50	>200
<b>5</b>		0.5:1	>99	>99	50	>200
<b>6</b>		0.25:1	>99	40	28	>200

Fonte: Dados de pesquisa.

<sup>a</sup> Determinado por CG;

<sup>b</sup> Conversão,  $c = e.e.s/(e.e.s+e.e.p)$ ;

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

A variação da razão enzima:substrato (m/m) foi avaliada em duas diferentes proporções (2:1 e 1:1) para a temperatura de 30°C (Tabela 6). Foi possível observar que a redução da razão de 2:1 para 1:1 provocou uma diminuição significativa nos valores de conversão ( $c=43\%$ ) e excesso enantiomérico do substrato ( $ee_s$  74%). O mesmo estudo foi realizado a uma temperatura de 40°C, tendo sido observados os parâmetros ideais ( $ee_p>99\%$ ;  $ee_s>99\%$ ;  $c=50\%$ ;  $E>200$ ) nas proporções de enzima:substrato (m/m) de 2:1, 1:1 e 0,5:1. No entanto, quando a razão foi reduzida para 0,25:1 (m/m), ocorreu uma diminuição significativa nos valores de conversão ( $c=28\%$ ) e excesso enantiomérico do substrato ( $ee_s$  40%).

A partir desses resultados, concluiu-se que, quando a RCE de *rac-1* é realizada a 30°C, faz-se necessária uma proporção de enzima:substrato (m/m) de 2:1 para que os resultados sejam ótimos. Entretanto, quando a mesma reação é realizada a 40°C, a proporção de enzima:substrato (m/m) pode ser reduzida até 0,5:1.

#### 4.5 Estudo do reuso da lipase CAL-B na resolução cinética enzimática de *rac-1*

Em comparação com as enzimas livres, as enzimas imobilizadas são mais robustas e mais resistentes as mudanças do ambiente reacional, incluindo influências de temperatura, pH e solventes orgânicos. Outras importantes vantagens das enzimas imobilizadas, em comparação

com as enzimas livres, são a possibilidade de reutilização do biocatalisador; facilidade de separação do catalisador e do produto da reação (ELLIAH *et al*, 2004).

Uma vez que a CAL-B é uma lipase imobilizada comercialmente em resina acrílica, foi realizado o estudo de reutilização dessa enzima, avaliando-se os valores de conversão e enantiosseletividade em cada ciclo. O estudo foi realizado nas temperaturas de 30°C (tempo de 24h) e 40°C (tempo de 2h), com a relação enzima:substrato de 2:1 e 0,5:1, respectivamente. Os resultados encontram-se representados nas Tabelas 7 e 8.

É possível observar na Tabela 7 que no segundo ciclo de reuso os resultados permanecem satisfatórios, mantendo a mesma atividade e seletividade enzimática obtidas no primeiro ciclo. Observou-se que, a partir do terceiro ciclo ocorreu um decréscimo significativo no valor de conversão ( $c=41\%$ ). Sendo assim, a enzima CAL-B possibilitou um reuso de apenas 2 ciclos à temperatura de 30°C, com relação enzima:substrato 2:1.

Tabela 7 - Resultados da resolução cinética enzimática de *rac-1*, via acilação, utilizando a lipase CAL-B, em heptano, com relação enzima:substrato 2:1, 30°C por 24h

<i>Entrada</i>	<i>Ciclos</i>	$ee_p$ (%) <sup>a</sup>	$ee_s$ (%) <sup>a</sup>	$c$ (%) <sup>b</sup>	$E^c$
<b>1</b>	R1c	>99	>99	50	>200
<b>2</b>	R2c	>99	>99	50	>200
<b>3</b>	R3c	>97	68	41	>200

Fonte: Dados de pesquisa.

<sup>a</sup>Determinado por CG;

<sup>b</sup>Conversão,  $c = e.e.s/(e.e.s+e.e.p)$ ;

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

A Tabela 8 mostra os resultados da RCE de *rac-1* realizada a 40°C, relação enzima:substrato 0,5:1 e tempo de 2h. Neste caso, observou-se que os resultados não foram satisfatórios já a partir do segundo ciclo, ocorrendo uma diminuição significativa dos valores de excesso enantiomérico ( $ee_p >99\%$  e  $ee_s$  66%) e conversão ( $c=40\%$ ).

Tabela 8 - Resultados da resolução cinética enzimática de *rac-1*, via acilação, utilizando a lipase CAL-B, em heptano, com relação enzima:substrato 0,5:1, 40°C por 2h

<i>Entrada</i>	<i>Ciclos</i>	<i>ee<sub>p</sub></i> (%) <sup>a</sup>	<i>ee<sub>s</sub></i> (%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>
<i>1</i>	R1c	>99	>99	50	>200
<i>2</i>	R2c	>99	66	40	>200

Fonte: Dados de pesquisa.

<sup>a</sup> Determinado por CG;

<sup>b</sup> Conversão,  $c = e.e.s/(e.e.s+e.e.p)$ ;

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

Com isso, concluiu-se que, quando a RCE de *rac-1* é realizada a 30°C (tempo de 24h e relação 2:1 de enzima:substrato), a CAL-B só pode ser usada em 2 ciclos. Na temperatura mais elevada (40°C, 2 h e relação 0,5:1 de enzima:substrato), a mesma lipase não permite reuso.

## 5. CONCLUSÃO

O estudo da resolução cinética enzimática do dialquilcarbinol *rac*-1-[tris(isopropil)silil]penta-1,4-diin-3-ol (*rac*-**1**), *via* acilação, catalisada por lipase foi realizado, permitindo concluir que:

- (i) O screening de 10 lipases comerciais permitiu identificar na RCE excelentes respostas com as lipases CAL-B (*Candida antarctica* B imobilizada em resina acrílica), TLL (*Thermomyces lanuginous* imobilizada em imobead-150) e PS-IM (Amano PS da *Burkholderia cepacia* imobilizada em terra diatomácea) e *Pseudomas fluorescens*. Como sendo as que apresentaram os resultados ideais de conversão ( $c = 50\%$ ), excesso enantiomérico *e.e.* ( $>99\%$ ) e de enantiosseletividade ( $E > 200$ ).
- (ii) O estudo da influência das lipases (CAL-B, TLL, PS-IM e *P. fluorescens*). Mostrou que os solventes apolares são os mais eficientes esta reação.
- (iii) O estudo de otimização dos parâmetros reacionais da RCE com a lipase CAL-B, variando-se temperatura, tempo e relação enzima:substrato. Substrato, resultou na seguinte condição: para a temperatura de 30°C com o tempo de 24 horas e da relação enzima:substrato de da razão 2:1 e para a temperatura de 40°C com o tempo de 2 horas e da relação 0,5:1 e enzima:substrato. Todas as reações foram realizadas em heptano.
- (iv) O estudo do reuso da lipase CAL-B nas condições otimizadas não foi satisfatório, demonstrando uma diminuição nos excessos enantioméricos e conversão a partir do 2 ciclo.

Por fim, cabe ressaltar-se que todos os resultados apresentados nesse estudo são significativamente superiores aos reportados na literatura na preparação do mesmo composto *via* síntese assimétrica e biocatalítica.

## 6. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 6.1 Equipamentos

A caracterização foi realizada através de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e Carbono-13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ) unidimensionais, espectrometria de massas de alta resolução, rotação ótica, espectro de infravermelho e ponto de fusão. Para a preparação do *rac-1* que foi realizada no *Laboratoire de Synthèse et Physicochimie de Molécules d'Intérêt Biologique* (SPCMIB), da Universidade Paul Sabatier - Toulouse III, França. (LISTUNOV *et al.*, 2015).

O acompanhamento das reações de acilação nas resoluções cinéticas enzimáticas foram feitos em um cromatógrafo a gás 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 50 KPa. Para a fase estacionária, utilizou-se uma coluna quiral 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  $\mu\text{m}$  da espessura de filme para a separação dos enantiômeros. As condições de análise e tempos de retenção para os racematos foram:

- ***rac-2*** - Temperatura do Injetor: 200°C; Pressão 70 KPa; Fluxo da coluna: 0.75 (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.); Tempos de retenção: (*R*)-SB448-Ac (39,90 min.) e (*S*)-SB448-Ac (37,89 min.).
- ***rac-1***- Temperatura do Injetor: 200°C; Pressão 100 KPa; Fluxo da coluna: 1.19 (nitrogênio); Temperatura do detector: 250°C; Rampa de temperatura: 120°C; 0,5°C/min até 135°C e 0,5°C/min até 155°C; Tempos de retenção: (*R*)-**2** (34,32 min.) e (*S*)-**1** (33,77 min.).

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

### 6.2 Solventes e reagentes

Os solventes heptano, hexano, éter etílico, ciclo-hexano e tolueno usados foram de procedência Biograde. A acetonitrila e tetraidrofurano, grau CLAE, foram da marca TEDIA. O acetato de vinila procedência Sigma-Aldrich®

### 6.3 Adsorventes

As separações cromatográficas em coluna aberta foram realizadas utilizando gel de sílica 60-230 mesh) comercial, de procedência Vetec<sup>®</sup>. Nas análises por 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<sup>®</sup>.

Após eluição das substâncias nas cromatoplasmas, as mesmas foram reveladas através de pulverização com solução de vanilina (5 g) em ácido perclórico (0,75 mol/L) em etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O, 100 mL), seguida de aquecimento a 100°C com pistola aquecedora da marca Dekel<sup>®</sup>, modelo DK1060, por aproximadamente 1 min.

### 6.4 Enzimas

As lipases *Candida antarctica* B (CAL-B, Novozym 435<sup>®</sup>) imobilizada em resina acrílica, Amano lipase AK a partir da *Pseudomonas fluorescens*, lipase a partir do *Rhizopus oryzae*, lipase a partir da *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em immobead-150, Amano lipase PS a partir da *Burkholderia cepacia*, Amano lipase PS-IM a partir da *Burkholderia cepacia* imobilizada em terra diatomácea, Amano lipase M a partir do *Mucor javanicus*, lipase da *Candida rugosa* e a lipase a partir do *Rhizopus niveus*, a lipase a partir do pâncreas do porco, todas comerciais de procedência Sigma-Aldrich<sup>®</sup>. Lipozyme RM IM a partir do *Rhizomucor miehei* imobilizada em resina aniônica de procedência Novo Nordisk.

### 6.5 Triagem de lipases comerciais na RCE do *rac-1*

Em um *vial* de 2 mL adicionou-se 3mg do *rac-1* (0,108 mmol) e 6mg de lipase, razão enzima:substrato 2:1 (m:m) e sob atmosfera inerte foi adicionado 135 µL de hexano seco e 6 µL de acetado de vinila como agente acilante. A reação foi mantida sob agitação a 250 rpm em shaker durante 24 h a 30°C. Após separação da enzima por filtração, o produto foi extraído com AcOEt (3 x 400 µL). O produto bruto obtido foi analisado por CG-DIC na concentração de 1 mg da amostra pura em 1 mL de AcOEt grau CLAE.

### **6.6 Avaliação da resolução cinética enzimática do *rac-1* variando o solvente, a proporção da relação enzima:substrato e reuso da enzima**

O estudo da influência de diferentes solventes na RCE do *rac-1* foi realizada seguindo o procedimento descrito no item 6.5 variando-se os solventes hexano, heptano, ciclohexano, tolueno, éter-etílico, tetra-hidrofurano (THF) e acetonitrila (ACN).

### **6.7 Avaliação da resolução cinética enzimática do *rac-1* variando o tempo e a temperatura**

O estudo da influência do tempo foi realizado em diferentes tempos e temperatura na RCE do *rac-1* foi realizada seguindo o procedimento descrito no item 6.5. Mas utilizando como solvente o heptano. Variando-se os tempos de 24 e 12 horas em 30°C e 24,12, 6, 2 e 1 hora para 40°C.

### **6.8 Avaliação da resolução cinética enzimática do *rac-1* variando a relação enzima:substrato e a temperatura**

O estudo da influência do foi realizado em diferentes proporções entre enzima e substrato temperatura na RCE do *rac-1* foi realizada seguindo o procedimento descrito no item 6.5 mas utilizando como solvente o heptano. Variando-se a razão enzima:substrato 2:1 e 1:1 em 30°C e 2:1, 1:1, 0.5:1 e 0,25:1 para 40°C.

### **6.9 Avaliação do reuso da lipase *Candida antarctica* B (CAL-B) imobilizada em resina acrílica**

b

Foi realizado o estudo do reuso da CAL-B imobilizada em resina acrílica empregando as seguintes condições: heptano como solvente, proporção enzima:substrato 2:1, com temperaturas de 30° e 40°C e um tempo reacional de 24 e 2 horas, respectivamente. Ao término de cada ciclo, a enzima foi filtrada a vácuo e lavada com heptano.

### 6.9.1 Obtenção do enantiômero (*S*)-1 através da resolução cinética enzimática *via* acilação do *rac*-1

Em um Erlenmeyer de 5 mL adicionou-se 50 mg de *rac*-1 (0,211 mmol) e em seguida 100 mg de *Candida antarctica* B imobilizada em resina acrílica (CAL-B) em uma razão 2:1 (m:m). Sob atmosfera inerte foi adicionado 2160  $\mu$ L de heptano seco, seguido de 100  $\mu$ L acetado de vinila como agente acilante. A reação foi mantida sob agitação de 250 rpm durante 24 h a 30°C. Após filtração da enzima, o produto foi extraído com AcOEt (5 x 3 mL), tratado com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrado em evaporador rotativo. O material bruto obtido foi purificado por cromatografia em gel de sílica usando hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) obtendo-se os compostos (*S*)-1 (14 mg, 41% de rendimento; *e.e.* >99%) e (*R*)-2 (15 mg, 48% de rendimento; *e.e.* >99%).

### 6.9.2 Obtenção do enantiômero (*R*)-1 através da resolução cinética enzimática *via* hidrólise do (*R*)-2

Em um Erlenmeyer de 5 mL adicionou-se 50 mg de (*R*)-2 (0,180 mmol) e 360  $\mu$ L de MeCN (co-solvente), seguidos de 1440  $\mu$ L de tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7), razão 80:20 (v/v) solvente:co-solvente. Em seguida, colocou-se 200 mg da lipase *Candida rugosa*, em uma razão 4:1 (m:m) em relação ao substrato. A reação ocorreu durante 96 horas a 40° C, seguido de filtração para remoção da enzima. O produto foi extraído com AcOEt (3 x 5 mL) e a fase orgânica tratada com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Após filtração e destilação do solvente, o produto foi purificado por cromatografia em gel de sílica usando hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) obtendo-se o (*R*)-1 com 53% de rendimento (13 mg, *e.e.* > 99%).

## REFERÊNCIAS

- AGAPAY, R. C.; JU, Y. H.; NGUYEN, P. L. T.; ISMADJI, S.; ANGKAWIJAYA, A. E.; GO, A. W. Process evaluation of solvent-free lipase-catalyzed esterification schemes in the synthesis of structured triglycerides from oleic and palmitic acids. **Chemical Engineering**, v. 16, p. 2606, 2020.
- ALI, S.; LIU, X.; SEN, L.; LAN, D.; WANG, J.; HASSAN, I. M.; WANG, Y. Sequence and structure-based method to predict diacylglycerol lipases in protein sequence. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 182, p. 455-463, 2021. **Applied Biochemistry**, v. 0, p. 1-8, 2021.
- ARANA-PEÑA, S.; CARBALLARES, D.; MORELLON-STERLLING, R.; BERENGUER-MURCIA, Á.; ALCANTARA, RODRIGUES, A. R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Enzyme co-immobilization: Always the biocatalyst designers' choice or not? **Biotechnology Advances**, v. 51, 2021.
- 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.
- BEZBORODOV, A. M.; ZAGUSTINA, N. A. Enzymatic Biocatalysis in Chemical Synthesis of Pharmaceuticals. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 52, n.3, p. 237 - 249, 2016.
- BHARDWAJ, K. K.; GUPTA, R. Synthesis of chirally pure enantiomers by lipase. **Journal of Oleo Science**, p.1 - 12, 2017.
- 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.
- 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.
- CAMPOS, P. E.; HERBETTE, G.; CHENDO, C.; CLERC, P.; TINTILLIER, F.; DE VOOGD, N. J.; PAPANAGNOU, E. D.; TROUGAKOS, I. P.; JERABEK, M.; BIGNON, J.; GO, G. L.; JAMAL OUZZANI, J.; GAUVIN-BIALECKI, A. Osirisynes g-i, new long-chain highly oxygenated polyacetylenes from the mayotte marine sponge haliclona sp. **Marine Drugs**, v.18, p. 350, 2020.
- 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. **Molecular Sciences**, v. 16, p. 29682 - 29716, 2015.

CHEN, B., DE SOUZA, F. Z. R. Enzymatic synthesis of enantiopure alcohols: current state and perspectives. **RSC advances**, v. 9, 2019.

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.

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.

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.

DEL ARCO, J., ACOSTA, J., FERNANDEZ-LUCAS, J. New trends in the biocatalytic production of nucleosidic active pharmaceutical ingredients using 2' - deoxyribosyltransferases. **Biotechnology Advances**, v. 51 2021.

DIAS, G. S., BANDEIRA, P. T., JAERGER, S., PIOVAN, L., MITCHELL, D. A., WYPYCH, F., KRIEGER, N. Immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase on layered double hydroxide of Zn/Al-Cl for kinetic resolution of *rac*-1-phenylethanol. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 130, 2019.

EL-HAWARY, S. S., SAYED, A. M., MOHAMMED, R., HASSAN, H. M., RATEB, M. E., AMIN, E., MOHAMMED, T. A., EL-MESERY, M., MUHSINAH, A. B., ALSAYARI, A., WAJANT, H., ANANY, M. A., ABDELMOHSEN, U. R. Bioactive Brominated Oxindole Alkaloids from the Red Sea Sponge *Callyspongia siphonella*. **Marine Drugs**, v.17, p 2-13, 2019

ESCOBEDO, L. S.; FERNÁNDEZ, V. G. Solvent role in the lipase-catalysed esterification of cinnamic acid and derivatives. Optimisation of the biotransformation conditions. **Tetrahedron**, v. 81, p. 13-18, 2021.

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

FRANTZ, R. F.; TOMOOKA, C. S.; 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<sup>II</sup>/R<sub>3</sub>N. **Accounts of Chemical Research**, v. 33, p. 373, 2000.

FRYSZ-KOWSKA, A., DEVINE, P.N. Biocatalysis in drug discovery and development. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 55, p. 151–160, 2020.

GKANTZOU, E., CHATZIKONSTANTINOY, A.V., FOTIADOU, R., GIANNAKOPOULOU, A., PATILA, M., STAMATIS, H. Trends in the development of innovative nanobiocatalysts and their application in biocatalytic transformations. **Biotechnology Advances**, v. 51, 2021.

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.

GUPTA, N. Enzyme function in organic solvents. **European Journal of Biochemistry**, v. 203, p. 25-32, 1992

HOBISCH, M., HOLTMANN, D., DE SANTOS, P.G., ALCALDE, M., HOLLMANN, F., KARA, S. Recent developments in the use of peroxygenases—exploring their high potential in selective oxyfunctionalisations. **Biotechnology Advances**, v. 51, 2021.

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**, 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.

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.; 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).

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.; 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.; 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).
- 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. PdCl<sub>2</sub>-Catalyzed Efficient Transformation of Propargylic Aminesto (*E*)- $\alpha$ -Chloroalkylidene- $\beta$ -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.
- 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  $\alpha$ -Hydroxy Dienes Isolated from *Ongokea gore*, 2017.
- OH, Y.; PARK, S.; YOO, E.; JO, S.; HONG, J.; KIM, J. K.; KIM, K. J.; OH, K. K.; LEE, S. H. Dihydrogen-bonding deep eutectic solvents as reaction media for lipasecatalyzed transesterification. **Biochemical Engineering Journal**, v. 142, p. 34-40, 2019.
- POOJA, S.; ANBARASAN, B.; PONNUSAMI, V.; ARUMUGAM, A. Produção eficiente e otimização de biodiesel a partir do óleo de kapok (*Ceiba pentandra*) pelo processo de transesterificação da lipase: abordando o impacto ambiental positivo. **Renewable Energy**, v.165, p. 619-631, 2021.
- PRIER, C. K., KOSJEK, B. Recent preparative applications of redox enzymes. **Chemical Biology**, v. 49, p. 105-112, 2019.
- PRINCIPAL, I. M. R.G; FERREIRA, J. G.; SILVA, T. G.; AGUIAR, J. S.; PRINCIPAL, F. 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, 2002.

REIG, F. T.; MORA, L.; TOLDRÁ, F. Developments in the Use of Lipase Transesterification for Biodiesel Production from Animal Fat Waste. **Applied Sciences**, v. 10, p. 5085, 2020.

ROMANO, I. P., DOS SANTOS, V. S., LOUZADA, A. C. L. P., JUNIOR, R. C. P., EDSON J. C., MOTA, A. J., BARROSO, H. S., JUNIOR, I. I., PEREIRA, J. O., FILHO, S. A. F., ZANOTTO, S. P. Evaluation of amazon fungi biomass as a source of lipases for biocatalysis. **Quim. Nova**, v. 43, p. 146-154, 2020.

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

SAAT, M, N.; SUFFIAN, M.; ANNUAR, M. One-pot lipase-catalyzed esterification of  $\epsilon$ -caprolactone with methyl-Dglucopyranoside and its elongation with free 6-hydroxyhexanoate monomer units. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 67, p. 354-365, 2020.

SANFILIPPO, C.; ADRIANO PATERNÒ, A. A.; PATTI, A. Resolution of racemic amines via lipase-catalyzed benzylation: Chemoenzymatic synthesis of the pharmacologically active isomers of labetalol. **Molecular Catalysis**, v. 449, p. 79-84, 2018.

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.

SHARMA, A.; CHATTOPADHYAY, S. Chemoenzymatic synthesis of (*S*)-eicos-(4*E*)-en-1-yn-3-ol, the cytotoxic principle of the marine sponge, *Cribrochalina vasculum*. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 9, p. 2635–2639, 1998.

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

SILVA, E. D. **Síntese e resolução cinética de dióis alílicos trans promovida por lipases**. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

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- $\alpha$ -amino esters based on lipase-catalyzed kinetic resolutions through interesterification reactions. **Tetrahedron**, v. 70, p. 2264-2271, 2014.

SONI, S. Trends in lipase engineering for enhanced biocatalysis. **Biotechnology and 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. 8, p. 128, 2006.

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, 2018.

VALIVETY, R. H. Solvent effects on biocatalysis in organic systems: Equilibrium position and rates of lipase catalyzed esterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v.38, n. 10, p. 1137–1143, 1991.

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.

WATANABE, K.; TSUDA, Y.; YAMANE, Y.; TAKAHASHI, H.; IGUCHI, K.; NAOKI, H.; FUJITA, T.; VAN SOEST, R.W.M. **Tetrahedron Letters**, v. 41, p. 9271 - 9276, 2000.  
WOHLGEMUTH, R. Biocatalysis—key enabling tools from biocatalytic one-step and multi-step reactions to biocatalytic total synthesis. **New Biotechnol**, v. 60, p. 113–123, 2021.

WOODLEY, J. M. Accelerating the implementation of biocatalysis in industry. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 103, p. 4733-4739, 2021

WU, S., SNAJDROVA, R., MOORE, J.C., BALDENIUS, K., BORNSCHEUER, U.T. Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications. **Angewandte Chemie**, v. 60, p. 88-119, 2021.

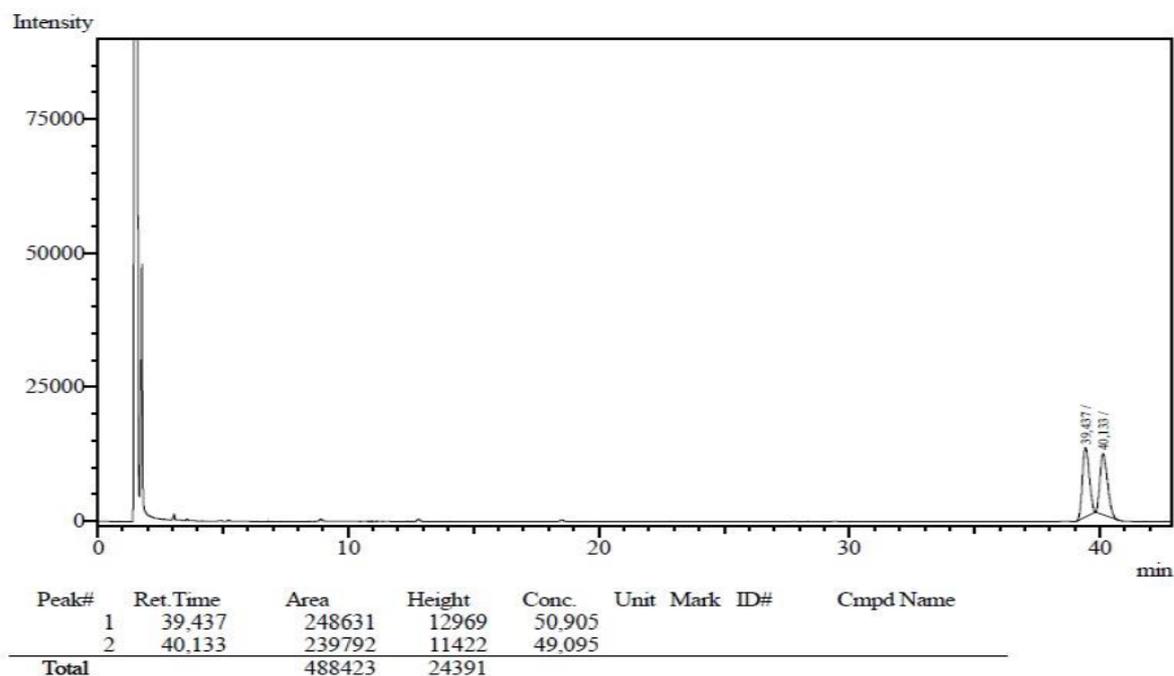
XU, D.; LIB, Z.; MAA, S. Novozym-435-catalyzed enzymatic separation of racemic propargylic alcohols. A facile route to optically active terminal aryl propargylic alcohols. **Tetrahedron Letters**, v. 44, p. 6343 - 6346, 2003.

XU, P., LIANG, S., ZONG, M.H., LOU, W.Y. Ionic liquids for regulating biocatalytic process: achievements and perspectives. **Biotechnology Advances**, V. 51, 2021.

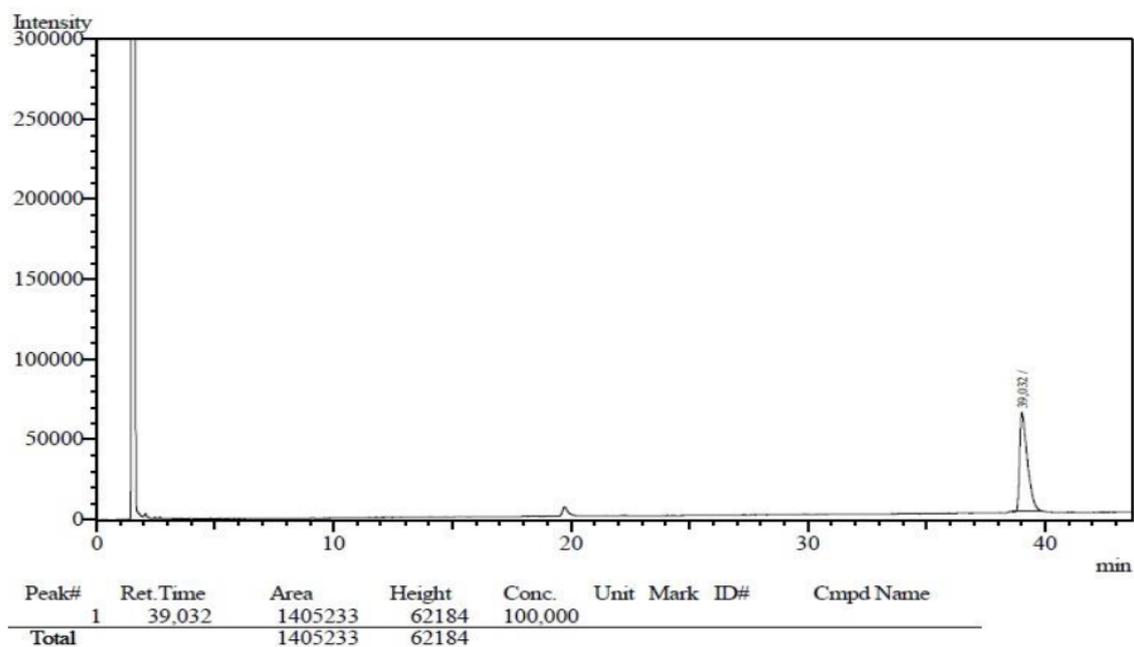
ZHONG, J. C.; LI, Z. Y.; WANG, M.; BIAN, Q. H.; ZHENG, B.; MAO, J. Y.; LI, S. N.; LIU, S. Z.; WANG, M. A.; GUO, H. C. Development of zn-prophenol-catalyzed asymmetric alkyne addition: synthesis of chiral propargylic alcohols. **Chemistry: A European Journal**, v. 17, p. 5782, 2011.

ZHU, J., LIU, Y., LIU, Z., WANG, H., ZHANG, H. Bioactive Nitrogenous Secondary Metabolites from the Marine Sponge Genus *Haliclona*. **Marine Drugs**, v.17, p. 682, 2019.

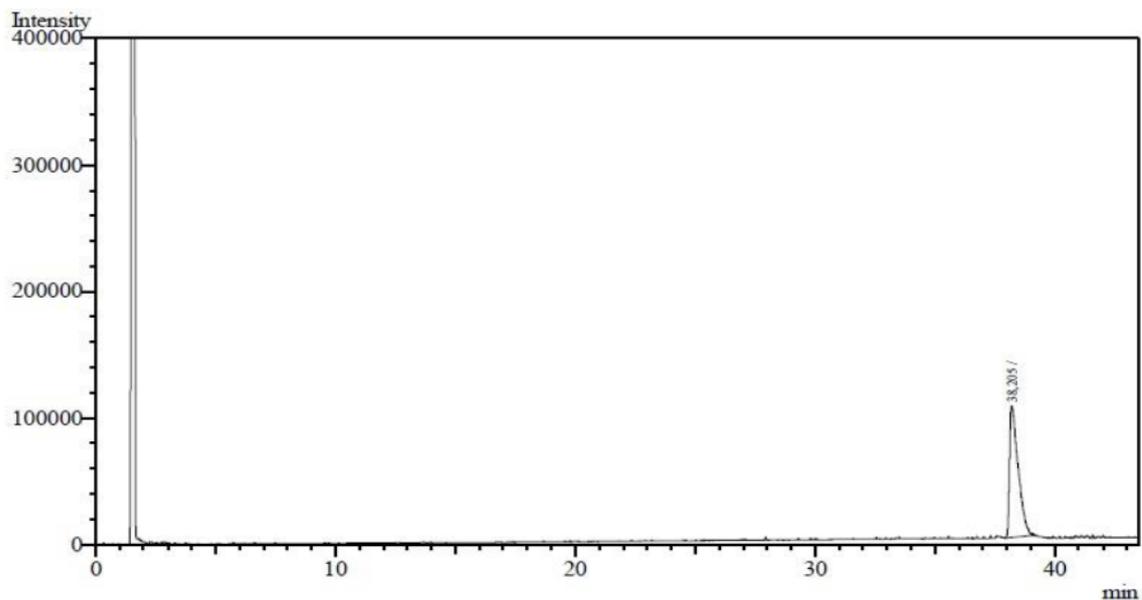
**ANEXO A -CROMATOGRAMAS DE REFERÊNCIA**  
**Ref-1-CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG/DIC DO *rac*-1**



**ref-2-CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG/DIC DO (*R*)-1**

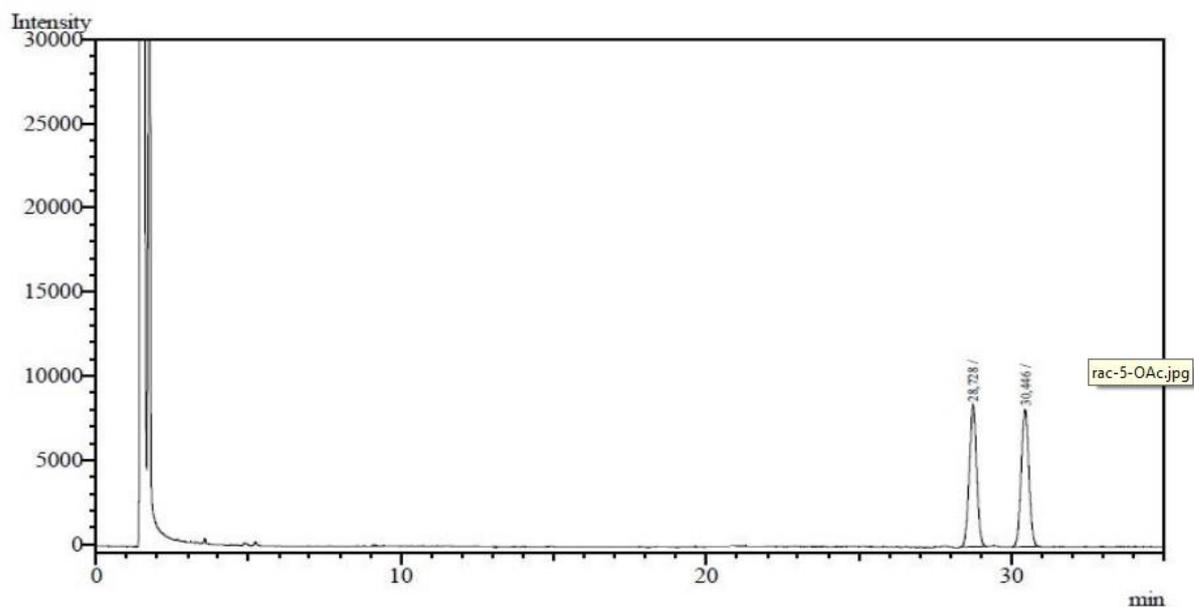


**ref-3-CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG/DIC DO (*S*)-1**



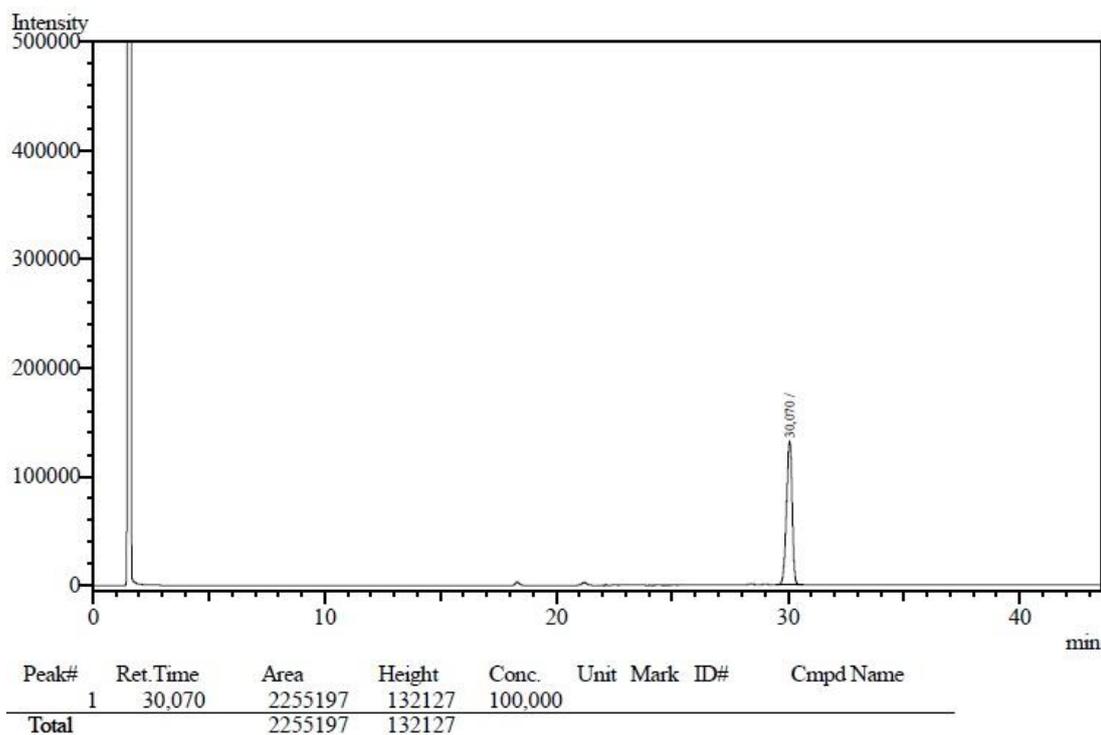
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	38,205	2592854	104085	100,000				
<b>Total</b>		2592854	104085					

ref-4-CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG/DIC DO *rac*-1-Ac

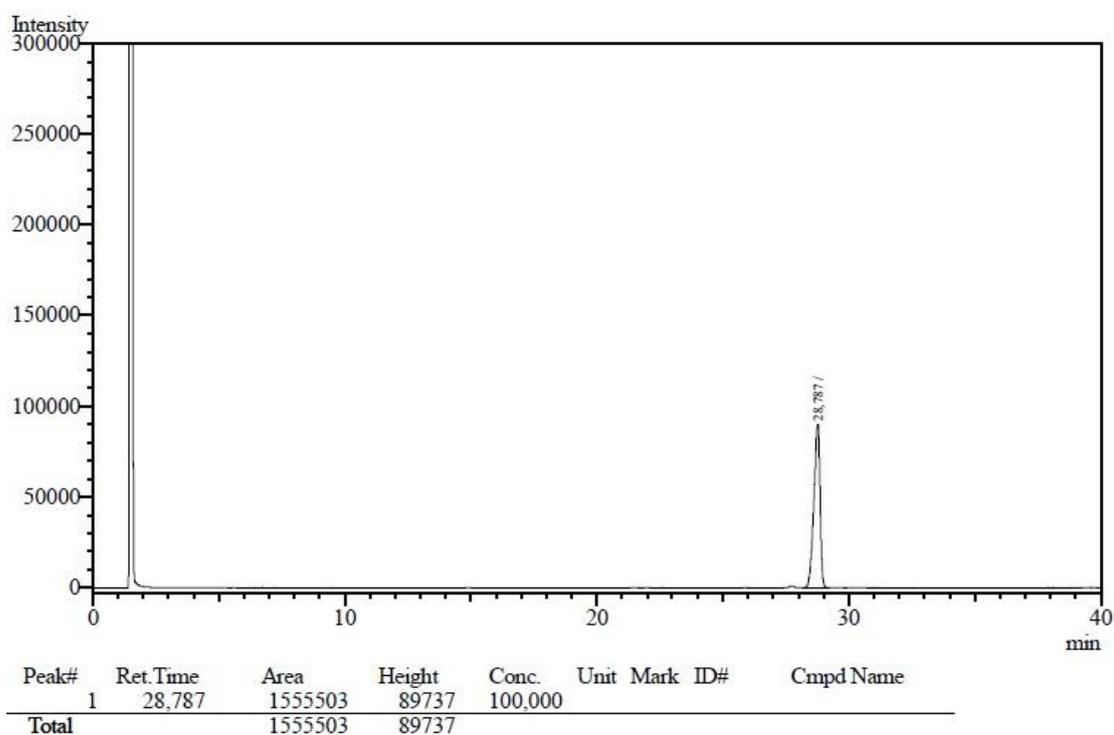


Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	28,728	141761	8430	49,815				
2	30,446	142813	8161	50,185				
<b>Total</b>		284574	16591					

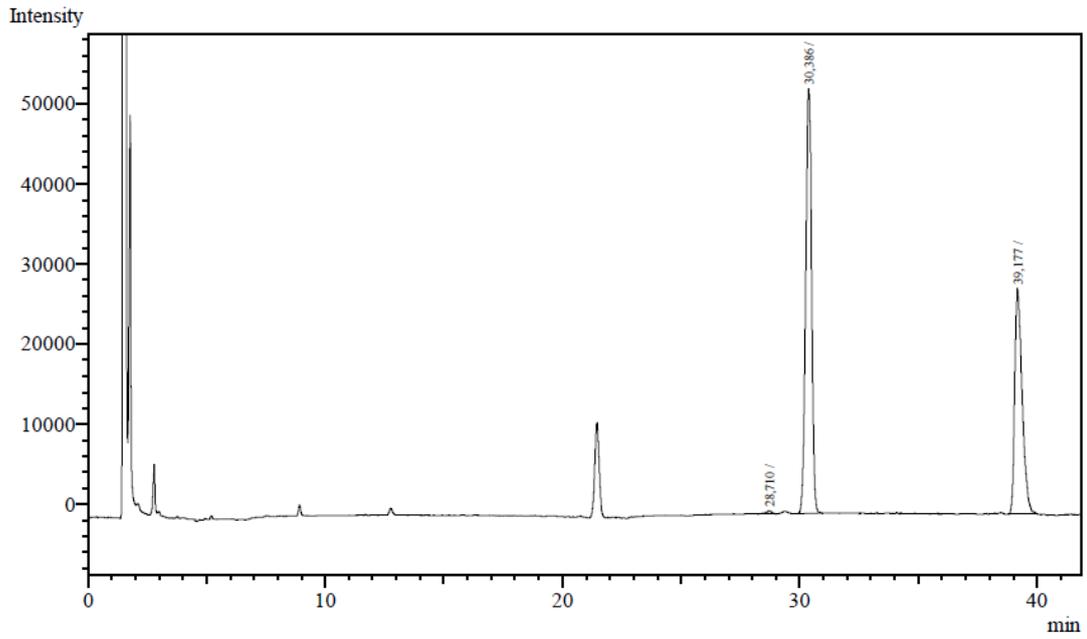
ref-5-CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG/DIC DO (*R*)-1-Ac



Ref-6-CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG/DIC DO (S)-1-Ac

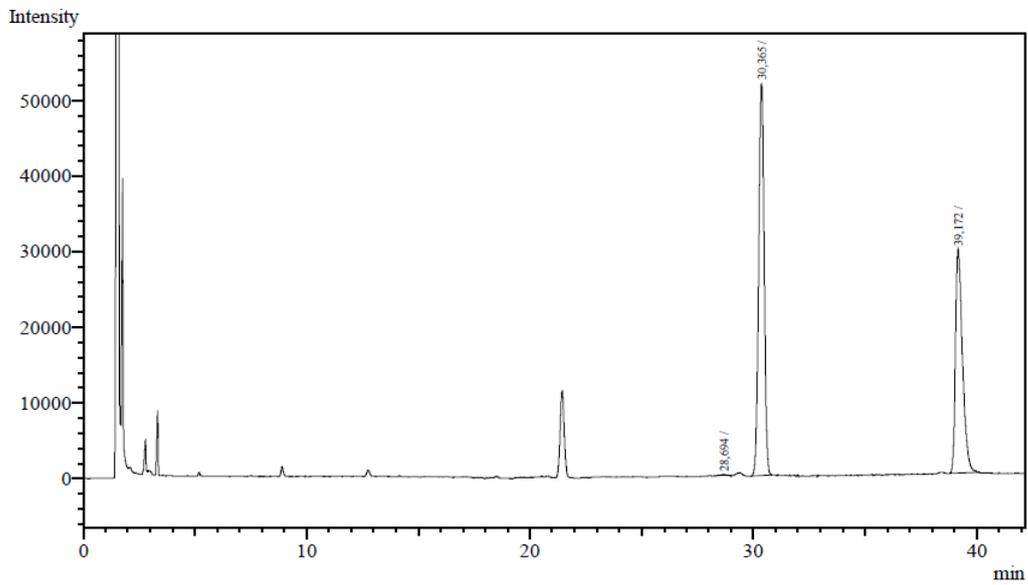


**ANEXO-B CROMATOGRAMAS DA TRIAGEM ENZIMÁTICA COM AS ENZIMAS EFICIENTES CAL-B**



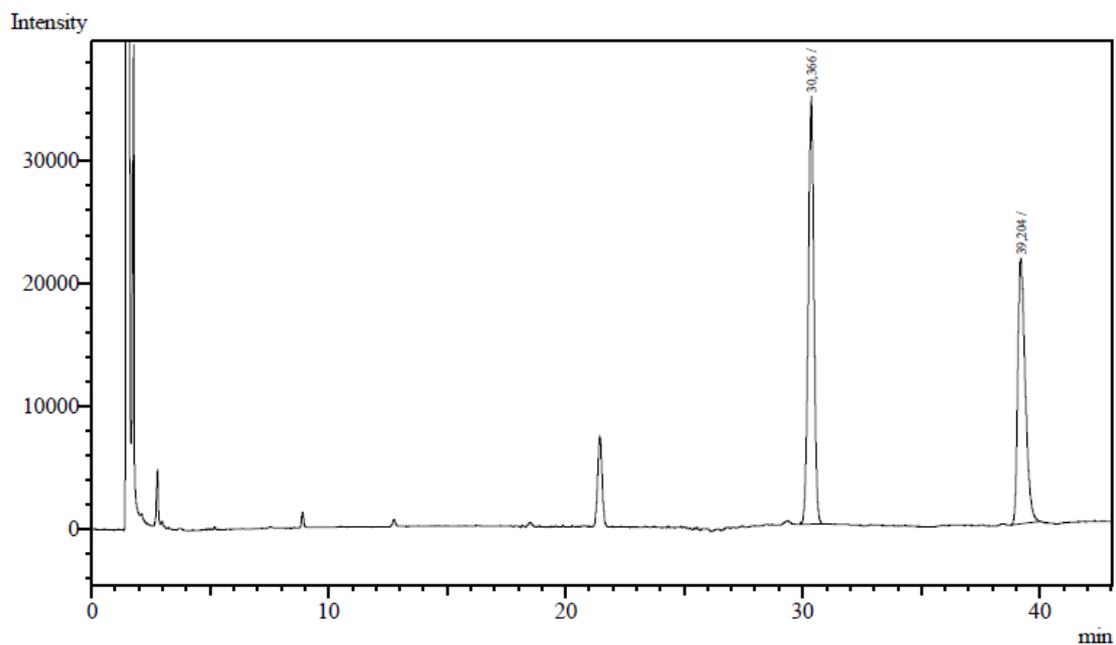
Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	28,710	6270	384	0,408				
2	30,386	916649	53058	59,631				
3	39,177	614292	28247	39,961				
<b>Total</b>		<b>1537211</b>	<b>81689</b>					

## TLL



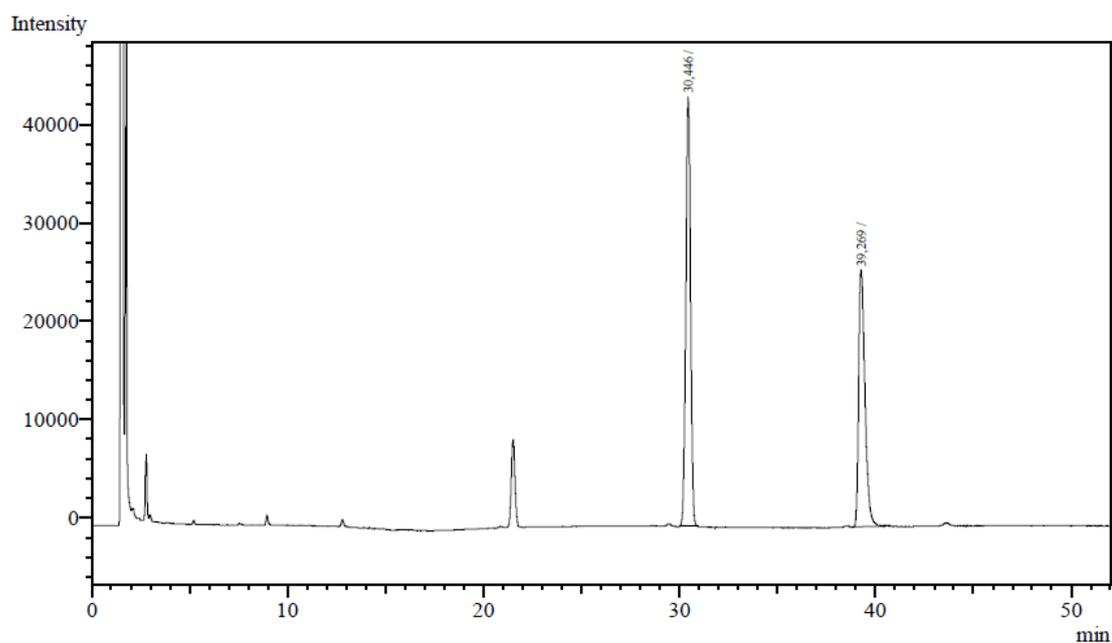
Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	28,694	2813	174	0,183				
2	30,365	887905	51893	57,706				
3	39,172	647955	29635	42,111				
<b>Total</b>		<b>1538673</b>	<b>81702</b>					

## PS-IM



Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	30,366	585394	34902	55,225		V		
2	39,204	474614	21672	44,775				
<b>Total</b>		1060008	56574					

*Pseudomonas fluorescens*



Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	30,446	732606	43708	55,604				
2	39,269	584936	26147	44,396		S		
<b>Total</b>		1317542	69855					