

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

PAMELA TAISLINE BANDEIRA

**RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA DE ÁLCOOIS ALIFÁTICOS  
EMPREGANDO LIPASE DE METAGENÔMICA**

CURITIBA

2015

PAMELA TAISLINE BANDEIRA

**RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA DE ÁLCOOIS ALIFÁTICOS  
EMPREGANDO LIPASE DE METAGENÔMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Piovan

CURITIBA

2015

---

B214r

Bandeira, Pamela Taisline

Resolução cinética enzimática de álcoois alifáticos empregando lipase de metagenômica/ Pamela Taisline Bandeira. – Curitiba, 2015.

132 f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-graduação em Química, 2015.

Orientador: Leandro Piovan .

Bibliografia: p. 65-75.

1. Lipase. 2. Metagenômica. 3. Álcoois. 4. Compostos alifáticos. 5. Cinética de enzimas. I. Universidade Federal do Paraná. II. Piovan, Leandro. III. Título.

CDD: 572.744

---

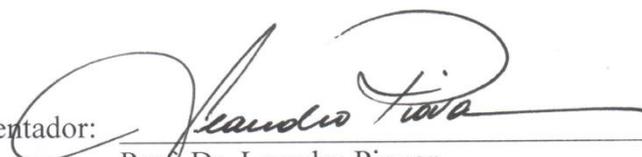
## TERMO DE APROVAÇÃO

RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA DE ÁLCOOIS ALIFÁTICOS EMPREGANDO  
LIPASE DE METAGENÔMICA

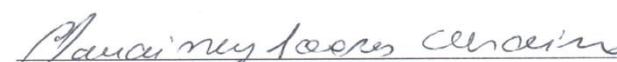
por

PAMELA TAISLINE BANDEIRA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de  
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,  
pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador:   
Prof. Dr. Leandro Piovan  
Dep. de Química – UFPR

  
Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza  
Dep. de Bioquímica – UFPR

  
Prof. Dr. Claudiney Soares Cordeiro  
Dep. de Química – UFPR

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Leandro Piovan pela orientação ao longo do mestrado, além da amizade e confiança cedida a mim.

Ao Prof. Dr. Alfredo Ricardo Marques de Oliveira pelas valiosas contribuições ao longo de toda a pesquisa.

Ao Prof. Dr. Claudiney Soares Cordeiro pelas contribuições no exame de qualificação e defesa da dissertação.

Ao Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza, a Prof. Dra. Nadia Krieger e ao doutorando Robson Carlos Alnoch por cederem gentilmente a lipase de metagenômica para que este trabalho pudesse ser realizado.

A Universidade Federal do Paraná e ao Departamento de Química pela estrutura oferecida. Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Química pelo pronto atendimento sempre que necessário.

A CAPES, ao CNPq e a Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

Aos amigos do Laboratório de Síntese Química e Enzimática (LasQuE) pelas diversas contribuições e as boas conversas durante as  $n$  xícaras de café.

Aos meus pais, Rosa e Alencar, por me apoiaram a chegar até aqui e me incentivarem a ir mais longe.

A todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para que este trabalho pudesse ser concretizado, mas não tiveram seus nomes citados aqui, gostaria de deixar os meus mais sinceros agradecimentos.

## RESUMO

As técnicas convencionais de obtenção de enzimas baseiam-se no isolamento e cultivo de microrganismos. No entanto, estima-se que somente 1% deles sejam cultiváveis em laboratório, o que limita o espectro de enzimas potencialmente acessíveis. Um método alternativo e eficiente para obter catalisadores de interesse biotecnológico é a prospecção metagenômica, que consiste na extração de material genético de uma amostra do meio ambiente, com posterior clonagem em um microrganismo cultivável em laboratório, resultando em uma coleção de clones denominada biblioteca metagenômica, a qual é sequenciada e analisada por técnicas específicas. Embora várias enzimas já tenham sido isoladas de bibliotecas metagenômicas construídas a partir de diferentes ambientes, pouco é descrito a respeito da aplicabilidade delas em síntese orgânica. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo a avaliação do desempenho de uma lipase obtida a partir de uma biblioteca metagenômica, a LipG9, em reações de resolução cinética enzimática (RCE) de uma série de álcoois alifáticos quirais. A série de álcoois sintetizada foi planejada de forma que o desempenho desta lipase inédita fosse investigado frente a reações de transesterificação de álcoois alifáticos com diferentes tamanhos de cadeias carbônicas ligadas ao centro estereogênico. Também avaliou-se a influência de parâmetros reacionais, tais como temperatura e solvente orgânico e a tentativa de RCE via reação de hidrólise dos ésteres correspondentes. Os álcoois de configuração absoluta S foram obtidos com excessos enantioméricos de 26% a 81% e, após otimização das condições reacionais, foi possível obter o álcool (S)-pentan-2-ol com elevada pureza óptica (ee = 96%) e taxa de conversão de 58%, apesar de ainda ser necessária a otimização do tempo de reação para obtenção deste composto com rendimento elevado. Este foi o primeiro estudo descrevendo a RCE de álcoois alifáticos mediada pela enzima LipG9, sendo que esta lipase se mostrou promissora, uma vez que apresentou, para o tipo de reação explorada, atividade e seletividade comparáveis a enzimas disponíveis comercialmente. Também é importante ressaltar que a lipase LipG9 não possui qualquer modificação genética dirigida e ainda precisa passar por estudos adicionais de imobilização, com objetivo de aumentar a estabilidade e atividade enzimática e alcançar reprodutibilidade para este processo.

**Palavras-chave:** lipase, metagenômica, álcoois alifáticos, resolução cinética.

## ABSTRACT

Conventional techniques for obtaining microbial enzymes are based on the isolation and cultivation of microorganisms. However, it is estimated that only 1% of them can be cultivated in the laboratory, which limits the range of potentially available enzymes. An alternative and efficient method to obtaining new catalysts of biotechnological interest is the metagenomic prospection, which consists in extracting genetic material from environmental sample, with subsequent cloning into a host, resulting in a collection of clones called metagenomic library, which is sequenced and analyzed by specific techniques. Several enzymes have been isolated from metagenomic libraries constructed from different environments, however few reports are described about their applicability in organic synthesis. In this context, this work presents an evaluation of a lipase obtained from a metagenomic library, LipG9, in enzymatic kinetic resolution (EKR) of chiral aliphatic *sec*-alcohols. The series of synthesized alcohols was designed so that the performance of LipG9 was investigated in transesterification reactions of alcohols with different sizes of carbon chain bonded to the stereogenic center. It was evaluated the influence of reaction parameters, such as temperature and organic solvent, and hydrolysis reactions of the corresponding esters. The *S* alcohols were obtained with 26% and 81% of enantiomeric excesses and, after the optimization of reaction conditions, the (*S*)-pentan-2-ol was obtained in high optical purity (ee = 96%) and conversion rate of 58%, although it is necessary the optimization of reaction time to obtain this compound with higher yield. This research was the first study describing the EKR of aliphatic alcohols mediated by LipG9, and this lipase has shown promising biocatalyst since it showed activity and selectivity comparable to commercially available enzymes for the explored reactions. It is worth mentioning that LipG9 lipase has no direct genetic modification and additional studies of immobilization are needed, in order to increase the enzyme stability and activity and achieve reproducibility for this process.

**Key-words:** lipase, metagenomics, aliphatic alcohols, kinetic resolution.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Enantiômeros do fármaco talidomida .....	14
Figura 2. Descarboxilação do (S)-DOPA.....	15
Figura 3. Exemplos de substâncias que apresentam ação diferenciada devido à sua configuração absoluta.....	15
Figura 4. Álcoois enantiomericamente puros utilizados como precursores sintéticos..	17
Figura 5. Diagrama da variação de energia de uma reação biocatalisada .....	20
Figura 6. Reação de hidrólise de triacilgliceróis mediada por lipase .....	23
Figura 7. Estrutura cristalográfica da lipase de <i>Candida antarctica</i> fração B, a CAL-B .	23
Figura 8. Representação do sítio catalítico da lipase de <i>Candida antarctica</i> fração A, a CAL-A, composto por resíduos de aminoácidos, com destaque para a tríade: serina, histidina e aspartato.....	24
Figura 9. Representação do mecanismo da ação catalítica de uma lipase .....	24
Figura 10. Diferentes nucleófilos aplicáveis às reações mediadas por lipases.....	25
Figura 11. Obtenção de lipases por prospecção metagenômica.....	27
Figura 12. Álcoois e ésteres sintetizados.....	31
Figura 13. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , TMS) do octan-2-ol ( <b>24</b> ).....	32
Figura 14. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do octan-2-ol ( <b>24</b> ).....	33
Figura 15. Espectro no IV do octan-2-ol ( <b>24</b> ). .....	34
Figura 16. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz, TMS) do acetato de 2-octila ( <b>24a</b> ) .....	35
Figura 17. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) do acetato de 2-octila ( <b>24a</b> ).....	36
Figura 18. Espectro no IV do acetato de 2-octila ( <b>24a</b> ) .....	36
Figura 19. Cromatograma da resolução enantiomérica do (R,S)-acetato de 2-pentila ( <b>21a</b> ).....	37
Figura 20. Cromatograma do (R,S)-pentan-2-ol ( <b>21</b> ) .....	38
Figura 21. Cromatograma da mistura (R,S)-pentan-2-ol ( <b>21</b> ) e (R,S)-acetato de 2-pentila ( <b>21a</b> ).....	38
Figura 22. Cromatograma do acetato de 2-pentila ( <b>21a</b> ) e do propionato de 2-pentila ( <b>21b</b> ) obtido via derivatização do pentan-2-ol ( <b>21</b> ) com anidrido propiônico.....	39
Figura 23. Triacilgliceróis ( <b>27-29</b> ) utilizados como substratos para determinação da atividade lipolítica dos clones da biblioteca metagenômica.....	40
Figura 24. Comparação dos cromatogramas do acetato de 2-pentila (R,S)- <b>21a</b> e do propionato de 2-pentila (R,S)- <b>21b</b> (A) e da RCE mediada por CAL-B (B) para determinação da configuração absoluta dos enantiômeros .....	64

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Racemização do fármaco talidomida .....	14
Esquema 2. Redução de cetonas pró-quirais levando a um único álcool enantiopuro	17
Esquema 3. Hidrogenação de cetonas aromáticas pró-quirais catalisada pelo complexo Ru-TsDPEN.....	18
Esquema 4. Redução enantiosseletiva de cetonas alifáticas mediada por células de <i>Geotrichum candidum</i> .....	18
Esquema 5. Reações de hidrólise dos ésteres <b>11</b> e <b>12</b> mediada pela enzima de metagenômica LipS .....	27
Esquema 6. Reação de transesterificação dos álcoois <b>13-17</b> mediada por enzimas LipC12 e LipG9, oriundas de metagenômica .....	28
Esquema 7. Reação de hidrólise dos ésteres <b>18-20</b> mediada por enzimas LipC12 e LipG9.....	28
Esquema 8. Redução química das cetonas para obtenção dos álcoois de interesse..	31
Esquema 9. Acetilação química dos álcoois para obtenção dos ésteres correspondentes .....	34
Esquema 10. Derivatização do álcoois alifáticos ( <b>21-26</b> ) para obtenção dos propionatos correspondentes ( <b>21b-26b</b> ).....	39
Esquema 12. Reagentes empregados como doadores de acila em RCE e o enol produzido como subproduto.....	47
Esquema 13. Acetato de etila empregado como doador de acila na RCE e álcool produzido como subproduto.....	47
Esquema 14. Tentativa de resolução dos ésteres via hidrólise mediada por LipG9 empregando água como nucleófilo .....	52
Esquema 15. Tentativa de resolução dos ésteres via hidrólise mediada por LipG9 empregando tampão fosfato como solvente e nucleófilo.....	52
Esquema 16. Tentativa de resolução dos ésteres via hidrólise mediada por LipG9 empregando tolueno como solvente a 70°C .....	53

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Classificação das enzimas de acordo com o tipo de reação catalisada.....	21
Tabela 2. Exemplos de lipases disponíveis comercialmente.....	22
Tabela 3. Resolução cinética enzimática dos álcoois ( <i>R,S</i> )- <b>21-26</b> mediada por LipG942	
Tabela 4. RCE do ( <i>R,S</i> )-pentan-2-ol ( <b>21</b> ) mediada por LipG9 na presença de diferentes reagentes doadores de acila.....	46
Tabela 5. RCE do ( <i>R,S</i> )-pentan-2-ol ( <b>21</b> ) mediada por LipG9 em diferentes temperaturas .....	49
Tabela 6. RCE do ( <i>R,S</i> )-pentan-2-ol ( <b>21</b> ) mediada por LipG9 em diferentes solventes orgânicos.....	50

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

$\Delta G$	Energia livre de Gibbs
$\delta$	Deslocamento químico
ACN	Acetonitrila
Ac <sub>2</sub> O	Anidrido acético
<i>c</i>	Conversão
CAL-B	Lipase de <i>Candida antarctica</i> fração B
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG-quiral	Cromatógrafo a gás com coluna de fase estacionária quiral
<i>d</i>	Dupleto
DMAP	<i>N,N</i> -Dimetilaminopiridina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOPA	3,4-dihidroxifenilalanina
<i>E</i>	Razão enantiomérica
E.C.	<i>Enzyme Commission</i>
<i>ee</i>	Excesso enantiomérico
Enz	Enzima
Hz	Hertz
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
IV	Infra-vermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
MTBE	Éter <i>terc</i> -metil-butílico
NADH	Dinucleotídeo de Nicotinamida Adenina
Nu	Nucleófilo
ppm	Partes por milhão
<i>q</i>	Quarteto
quint.	Quinteto
RCE	Resolução cinética enzimática
RMN de <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN de <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
rpm	Rotações por minuto
<i>s</i>	Simpleto
sext.	Sexteto

sl	Simpleto largo
t	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
TsDPEN	N-( <i>p</i> -toluenossulfonil)-1,2-difeniletilenodiamina

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	A IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA DA QUIRALIDADE.....	13
1.2	ÁLCOOIS SECUNDÁRIOS ENANTIOPUROS.....	16
1.2.1	Obtenção de álcoois secundários enantiopuros.....	17
1.3	RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	19
1.3.1	Enzimas.....	20
1.3.1.1	Lipases.....	22
1.3.1.2	Lipases obtidas por prospecção metagenômica.....	26
2	OBJETIVOS.....	30
2.1	OBJETIVO GERAL.....	30
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
3.1	SÍNTESE QUÍMICA E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS DE INTERESSE.....	31
3.2	RESOLUÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS.....	37
3.3	RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA (RCE).....	40
3.3.1	Biocatalisador.....	40
3.3.2	Resolução via reação de transesterificação enzimática mediada por LipG9.....	41
3.3.3	Investigação dos parâmetros reacionais da resolução cinética mediada por LipG9.....	45
3.3.3.1	Avaliação da influência do reagente doador de acila na resolução cinética enzimática.....	45
3.3.3.2	Avaliação da influência da temperatura na resolução cinética enzimática.....	48
3.3.3.3	Avaliação da influência do solvente orgânico na resolução cinética enzimática.....	49
3.3.4	Tentativa de resolução cinética enzimática via reação de hidrólise dos ésteres ( <i>R,S</i> )- <b>21a-26a</b> .....	52
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
5	PARTE EXPERIMENTAL.....	55
5.1	SÍNTESE QUÍMICA E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS DE INTERESSE.....	55
5.1.1	Síntese e caracterização dos álcoois alifáticos ( <i>R,S</i> )- <b>21-26</b> .....	56
5.1.2	Síntese e caracterização dos ésteres ( <i>R,S</i> )- <b>21a-26a</b> .....	58
5.1.3	Síntese e caracterização dos propionatos ( <i>R,S</i> )- <b>21b-26b</b> .....	60
5.2	REAÇÕES DE RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	62
5.2.1	Enzimas avaliadas como biocatalisadores.....	62
5.2.2	Reações de transesterificação dos álcoois ( <i>R,S</i> )- <b>21-26</b> mediada por lipases.....	62
5.2.3	Reações de hidrólise dos ésteres ( <i>R,S</i> )- <b>21a-26a</b> mediada por lipase.....	62
5.2.4	Determinação da pureza enantiomérica.....	63
5.2.5	Determinação da configuração absoluta.....	63
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
	APÊNDICES.....	76

# 1 INTRODUÇÃO

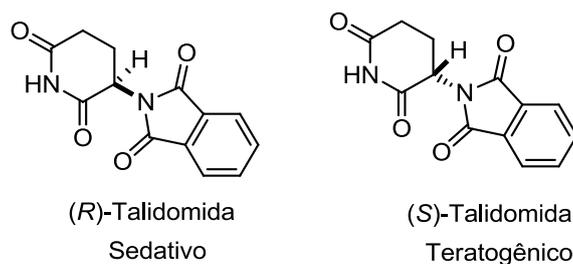
## 1.1 A IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA DA QUIRALIDADE

A área da ciência que estuda o arranjo tridimensional das moléculas é chamada estereoquímica. Esse ramo da química abrange o estudo de moléculas que são caracterizadas pela ausência de elementos de simetria e são ditas quirais. Essas moléculas podem existir de duas maneiras: enantiômeros e diastereoisômeros. Diastereoisômeros são moléculas que não são imagens especulares umas das outras e possuem propriedades físicas diferentes. Já os enantiômeros são imagens especulares um do outro, mas não são superponíveis.<sup>1</sup>

A maioria dos enantiômeros apresenta propriedades físicas e químicas idênticas em ambientes aquirais, como, por exemplo, solubilidade e propriedades espectroscópicas, exceto uma propriedade específica: o desvio do plano da luz polarizada. Os enantiômeros desviam o plano da luz polarizada na mesma magnitude, mas em direções opostas. No entanto, quando estão em um ambiente quiral, os enantiômeros apresentam propriedades físicas diferentes. Isso ocorre devido à formação de complexos diastereoisoméricos entre o enantiômero e o ambiente quiral, e diastereoisômeros, como dito, apresentam propriedades distintas.<sup>2,3</sup> Como resultado, as propriedades físico-químicas de um composto podem depender da configuração absoluta do enantiômero e da sua interação com um ambiente quiral externo.

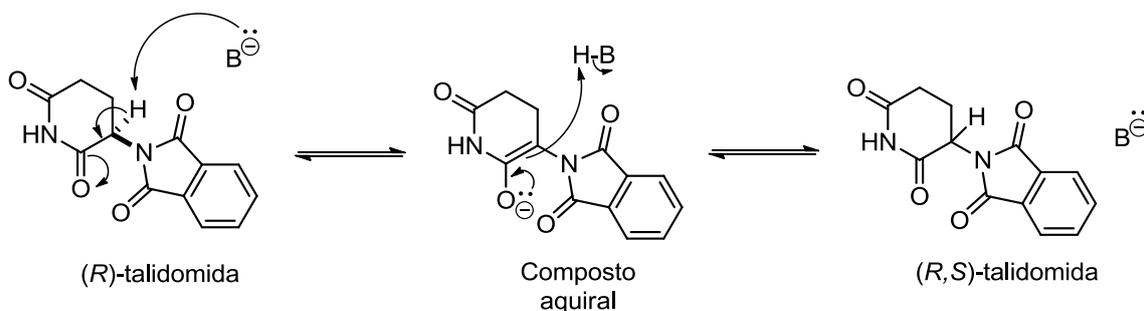
Exemplos de ambientes quirais são as macromoléculas, como, por exemplo, os receptores biológicos e as enzimas presentes nos organismos vivos. Dessa forma, os enantiômeros podem ser discriminados (absorvidos, ativados ou degradados) de maneiras diferentes no organismo.

A ação diferenciada de enantiômeros no organismo pôde ser evidenciada com o exemplo clássico do fármaco talidomida (Figura 1). Este fármaco foi administrado, na forma de racemato, à mulheres grávidas com intuito de prevenir enjoos, no entanto, somente o enantiômero *R* apresenta as propriedades sedativas desejadas, enquanto o *S* apresenta propriedades teratogênicas, resultando na má-formação ou ausência de membros no feto.<sup>4</sup>



**Figura 1.** Enantiômeros do fármaco talidomida

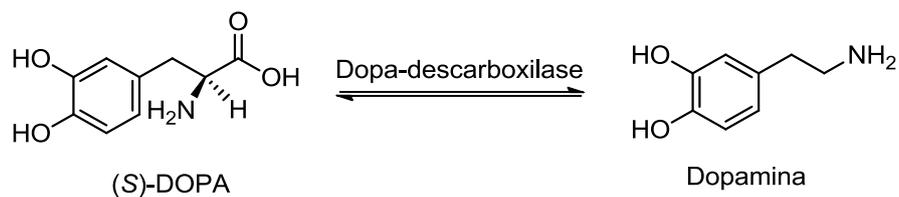
Outro problema associado ao uso da talidomida é que mesmo administrado em sua forma enantiopura, o enantiômero *R* é racemizado *in vivo* via remoção do hidrogênio  $\alpha$  à carbonila (Esquema 1). Após este trágico episódio, evidenciou-se a importância do estudo das propriedades de cada enantiômero isoladamente.



**Esquema 1.** Racemização do fármaco talidomida

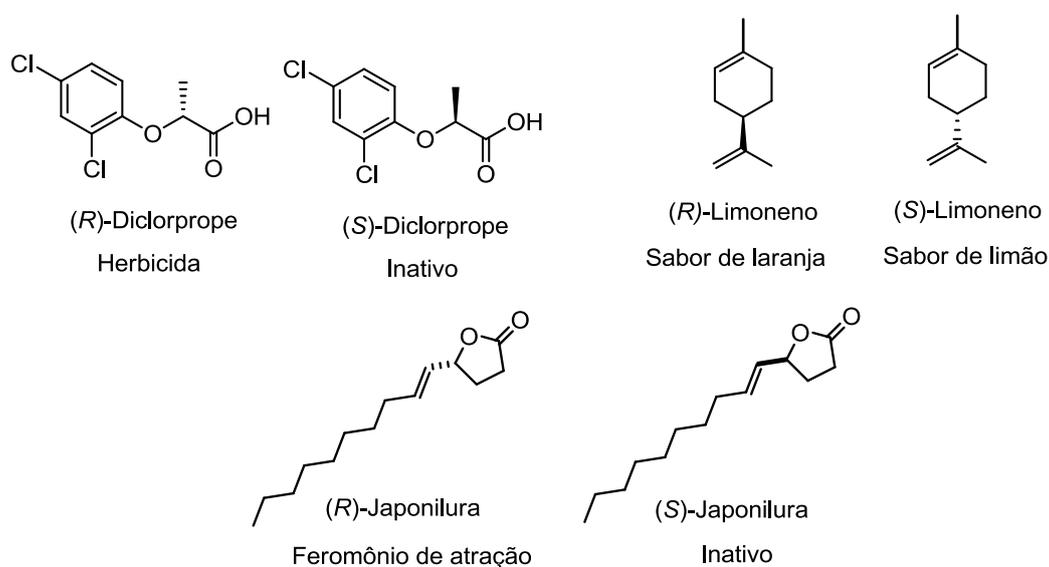
Outro exemplo curioso é o composto (*S*)-3,4-dihidroxifenilalanina, o (*S*)-DOPA ou L-DOPA, precursor da dopamina utilizada no tratamento da doença de Parkinson. O (*S*)-DOPA é inativo, e só é ativado após uma reação de descarboxilação *in vivo* levando a um composto aquiral, a dopamina, que apresenta as propriedades desejadas (Figura 2). No entanto, apesar de inativo, o (*S*)-DOPA necessita ser administrado, pois a dopamina não consegue romper a barreira do sangue até o seu sítio de ação (o cérebro), sendo necessário o uso deste “pró-fármaco”. Vale ressaltar que a dopamina, que é a forma ativa do fármaco, é um composto aquiral e poderia ser obtida a partir de qualquer um dos enantiômeros do DOPA, no entanto, a etapa de descarboxilação é mediada por uma enzima, chamada dopa-decarboxilase, altamente enantiosseletiva frente ao enantiômero *S*. Dessa forma, se o DOPA for administrado como racemato, apenas o enantiômero *S* será transformado em

dopamina levando a um acúmulo do enantiômero *R*, que não é metabolizado pela enzima, o que pode ser prejudicial ao organismo.<sup>5</sup>



**Figura 2.** Descarboxilação do (S)-DOPA

A ação diferenciada dos enantiômeros não se aplica somente à classe dos fármacos. Moléculas quirais de substâncias empregadas como agroquímicos, aditivos alimentares e feromônios também podem apresentar propriedades distintas entre seus enantiômeros (Figura 3). Como exemplo pode-se citar o enantiômero *R* do dicloroprope que é empregado como herbicida, enquanto que o enantiômero *S* é inativo.<sup>6</sup> Outro exemplo é o limoneno, cujo enantiômero *R* possui sabor de laranja enquanto o *S* possui sabor de limão. Um exemplo curioso é o composto (*R*)-japonilura, empregado como feromônio de atração sexual do besouro do gênero *Popillia japonica*, conhecido popularmente como besouro-japonês. Se o enantiômero *R* do japonilura estiver contaminado com apenas 2% do enantiômero *S*, a mistura é três vezes menos ativa quando comparado ao feromônio *R* enantiomericamente puro.<sup>6</sup>



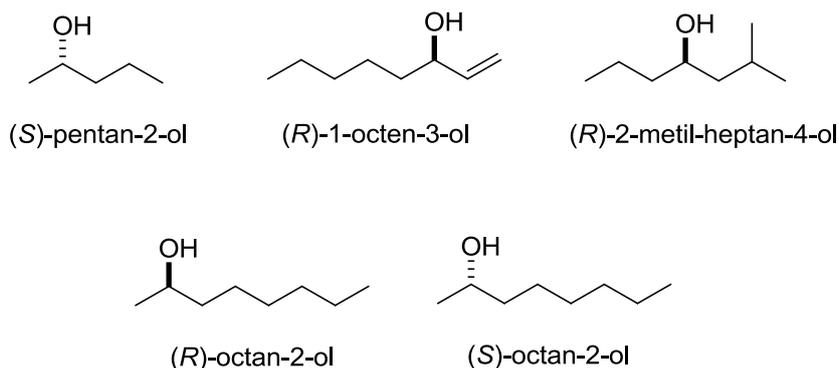
**Figura 3.** Exemplos de substâncias que apresentam ação diferenciada devido à sua configuração absoluta

A importância da quiralidade e sua forte associação com as propriedades farmacocinéticas de um composto, além da ampla utilidade sintética de moléculas enantiopuras como, por exemplo, na preparação de novos fármacos, produtos agroquímicos, dispositivos eletrônicos e ópticos<sup>7</sup> e polímeros com novas propriedades, faz da preparação desta classe de compostos uma área proeminente de investigação na química orgânica,<sup>8</sup> destacando-se a importância de descobrir novas metodologias de obtenção de compostos em sua forma enantiomericamente pura ou enriquecida.

## 1.2 ÁLCOOIS SECUNDÁRIOS ENANTIOPUROS

Dentre as classes de compostos enantiomericamente puros de interesse, destaca-se a dos álcoois secundários e seus derivados, os quais são importantes blocos de construção quirais devido à grande versatilidade sintética desta classe de compostos orgânicos, que podem sofrer diversas transformações químicas levando, por exemplo, epóxidos, éteres e aminas.<sup>9</sup>

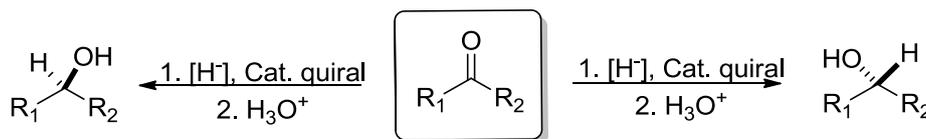
Além da grande versatilidade sintética desta classe de compostos orgânicos como intermediários sintéticos, muitas vezes ela está presente no produto final. Alguns exemplos de álcoois alifáticos utilizados em suas formas enantiopuras estão apresentados na Figura 4. O (S)-pentan-2-ol é um importante intermediário sintético empregado na produção de fármacos utilizados no tratamento da doença de Alzheimer, os quais inibem a liberação e/ou a síntese dos peptídeos  $\beta$ -amilóides associados a doença.<sup>10</sup> Os álcoois (R)-oct-1-en-3-ol e o (R)-2-metil-heptan-4-ol são utilizados juntamente com feromônios para atração de mosquitos do gênero *Metamasius hemipterus*, uma praga em plantações de cana-de-açúcar.<sup>11,12</sup> Outro exemplo notável são ambos os enantiômeros do octan-2-ol que são importantes precursores sintéticos empregados na produção de agroquímicos e cristais líquidos.<sup>13,14</sup>



**Figura 4.** Álcoois enantiomericamente puros utilizados como precursores sintéticos

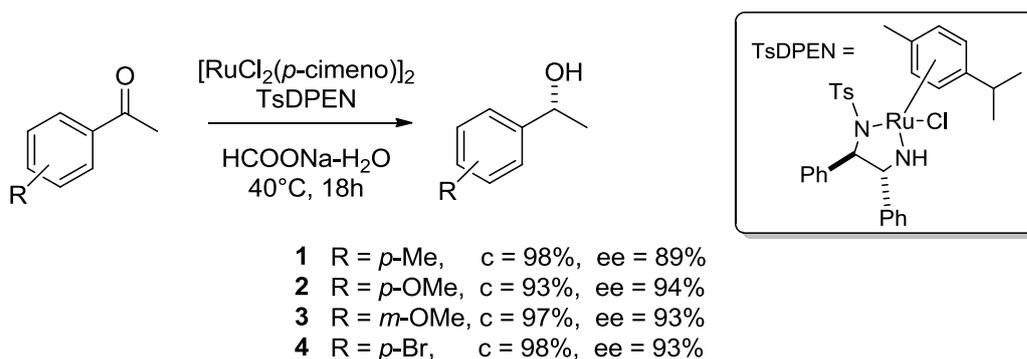
### 1.2.1 Obtenção de álcoois secundários enantiopuros

Dentre os métodos de obtenção de álcoois enantiomericamente puros<sup>15,16</sup> encontra-se a catálise assimétrica, a partir da redução enantiosseletiva de cetonas pró-quirais levando a obtenção de um único álcool enantiopuro (Esquema 2).<sup>17</sup>



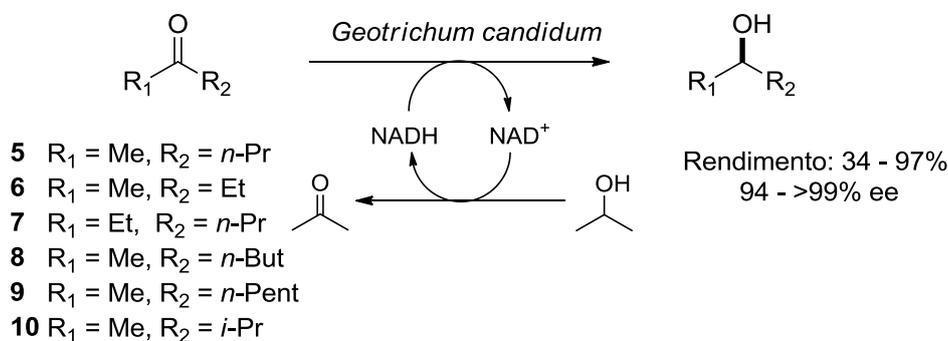
**Esquema 2.** Redução de cetonas pró-quirais levando a um único álcool enantiopuro

Álcoois enantiopuros foram obtidos a partir da hidrogenação assimétrica das cetonas aromáticas pró-quirais catalisada por complexos de rutênio. Neste caso, o catalisador metálico foi gerado *in situ* a partir da reação do *N*-(*p*-toluenossulfonil)-1,2-difeniletlenodiamina (TsDPEN) com  $\text{RuCl}_2(p\text{-cimeno})_2$  em solução aquosa de formiato de sódio a 40°C, levando aos álcoois **1-4** correspondentes com excessos enantioméricos de até 94% e com altas taxas de conversão.<sup>18</sup>



**Esquema 3.** Hidrogenação de cetonas aromáticas pró-quirais catalisada pelo complexo Ru-TsDPEN

Em 2002, Matsuda e colaboradores<sup>19</sup> relataram a biorredução enantiosseletiva das cetonas alifáticas **5-10** mediada por células de *Geotrichum candidum*, levando a obtenção dos correspondentes (S)-álcoois com bons rendimentos e excessos enantioméricos. Neste processo a cetona é reduzida ao álcool correspondente com concomitante oxidação do cofator NADH a NAD<sup>+</sup>. A adição de propano-2-ol regenera o NADH a partir de uma reação acoplada, como apresentado no Esquema 4.



**Esquema 4.** Redução enantiosseletiva de cetonas alifáticas mediada por células de *Geotrichum candidum*

Outro método de obtenção de álcoois enantiopuros é a partir resolução de racematos, processo onde, na presença de um agente quiral, somente um dos enantiômeros do álcool racêmico é transformado no produto, restando o outro enantiômero puro, com rendimento teórico de 50% para cada um. A resolução de álcoois secundários racêmicos é bem descrita na literatura,<sup>20,21</sup> mas a maioria dos artigos relata a resolução de álcoois que possuem grupos volumosos, como, por

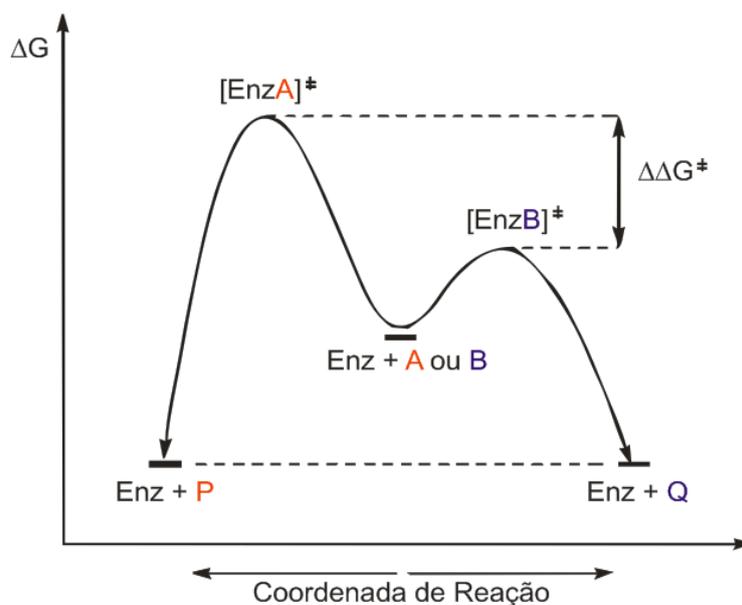
exemplo, fenila e derivados substituídos, ligados ao centro de quiralidade. Já sobre a resolução de álcoois secundários alifáticos pouco é encontrado na literatura.

Apesar do avanço significativo dos métodos baseados em catálise assimétrica, a resolução de racematos ainda é o método mais utilizado para obtenção de álcoois enantiomericamente puros,<sup>22,23,24,25</sup> destacando-se a resolução cinética empregando enzimas como catalisadores quirais.

### 1.3 RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA

De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), resolução cinética refere-se à separação parcial ou completa dos enantiômeros de um racemato, em virtude de taxas desiguais de reação dos enantiômeros com um agente quiral.<sup>26</sup> Se o agente quiral empregado for uma enzima, o processo é então denominado resolução cinética enzimática ou resolução biocatalítica.

Em uma resolução cinética enzimática, os enantiômeros A e B de um racemato interagem de maneira distinta com a estrutura quiral da enzima (Enz). Dessa forma, os complexos diastereoisoméricos enzima-substrato, formados a partir da interação de cada enantiômero com a enzima, possuem diferentes valores de energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) para seus respectivos estados de transição  $[\text{EnzA}]^\ddagger$  e  $[\text{EnzB}]^\ddagger$  (Figura 5). Como resultado observa-se uma diferença na energia de ativação ( $\Delta\Delta G^\ddagger$ ) entre as reações de A e B com a enzima e assim, se, por exemplo, o enantiômero B for melhor reconhecido pela enzima, o complexo diastereoisomérico EnzB levará ao estado de transição com menor energia, e B será transformado em Q mais rapidamente que o enantiômero A, que levaria ao produto P.<sup>27</sup> Se o processo biocatalítico for eficiente, espera-se que o valor de  $\Delta\Delta G^\ddagger$  seja suficientemente grande ( $\Delta\Delta G^\ddagger \geq 18,83 \text{ kJ/mol}$ ) para que somente um enantiômero seja transformado no produto desejado, e assim, a conversão será de 50% e os compostos envolvidos serão obtidos com elevada pureza óptica ( $ee > 99\%$ ).<sup>28</sup>



**Figura 5.** Diagrama da variação de energia de uma reação biocatalisada

**Enz** representa a enzima, **A** e **B** os enantiômeros de um racemato a ser resolvido, **P** e **Q** os dois possíveis produtos e  $\Delta\Delta G^\ddagger$  é a diferença de energia de ativação entre os complexos diastereoisoméricos  $[\text{EnzA}]^\ddagger$  e  $[\text{EnzB}]^\ddagger$ .

A capacidade da enzima distinguir um enantiômero do outro é mensurada pelo valor de *E*, conhecido como coeficiente enantiomérico. Uma reação não-seletiva apresenta um *E* igual a 1, enquanto que reações com *E* acima de 20 são consideradas úteis em síntese orgânica.<sup>90</sup>

### 1.3.1 Enzimas

Enzimas são macromoléculas orgânicas constituídas normalmente por unidades proteicas, com atividades intra ou extracelular. As enzimas têm a função de catalisar reações químicas, através da diminuição da energia de ativação, assim como qualquer outro catalisador.

De acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) as enzimas são classificadas em seis grandes classes de acordo com a reação que catalisam (Tabela 1). A codificação das enzimas é composta pela abreviação E.C. (Enzyme Commission) e pode ser seguida de até quatro números referentes às subclasses que a enzima pertence.<sup>29</sup>

A grande variedade de reações que podem ser biocatalisadas faz com que enzimas sejam intensivamente exploradas em síntese orgânica.<sup>30</sup> Dentre as diversas reações, destacam-se a síntese e hidrólise de ésteres<sup>31</sup>, álcoois,<sup>32</sup> lactonas<sup>33</sup>,

lactamas,<sup>34</sup> epóxidos,<sup>35,36</sup> oxi-redução de alquenos,<sup>37</sup> oxidação de sulfetos a sulfóxidos,<sup>38</sup> reações aldólicas<sup>39</sup> e de Diels-Alder.<sup>40</sup>

**Tabela 1.** Classificação das enzimas de acordo com o tipo de reação catalisada

<b>Classes de enzimas</b>	<b>Algumas Subclasses</b>	<b>Reações catalisadas</b>	<b>Aplicação em Síntese</b>
Oxidoredutases (EC 1)	Hidrogenases, oxidases, peroxidases	Oxidação e redução: oxigenação de ligações C-H, C-C, C=C, C=O	25%
Transferases (EC 2)	Transaldolases Transcetolase	Transferência de grupos: aldeídico, cetônico, acila, açúcar, fosforila ou metila	5%
Hidrolases (EC 3)	Esterases, lipases, peptidases celulases, amilases	Hidrólise e síntese de ésteres, amidas, epóxidos, nitrilas e anidridos, hidrólise de carboidratos	60%
Liases (EC 4)	Descarboxilases Cetoacidolases	Adição e eliminação de pequenas moléculas a ligações C=C, C=N, C=O	7%
Isomerases (EC 5)	Racemases epimerases, mutases	Isomerizações tais como racemização, epimerização	2%
Ligases (EC 6)	DNA-ligases, NAD <sup>+</sup> sintetases	Síntese e clivagem de ligações C-O, C-S, C-N, C-C	1%

DNA: Ácido desoxirribonucleico, NAD<sup>+</sup>: Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina.

Além da gama de reações orgânicas catalisadas por enzimas, o uso destes biocatalisadores visando à obtenção de compostos enantiomericamente puros pode oferecer vantagens tais como alta eficiência catalítica e especificidade, além de atuarem em condições brandas de temperatura e pH, ou ainda em meios reacionais diversos incluindo solventes orgânicos, solventes em estado supercrítico<sup>41</sup> e líquidos iônicos<sup>42</sup>, tornando-se uma alternativa econômica e ambientalmente viável quando comparadas a catalisadores químicos convencionais.<sup>27</sup>

### 1.3.1.1 Lipases

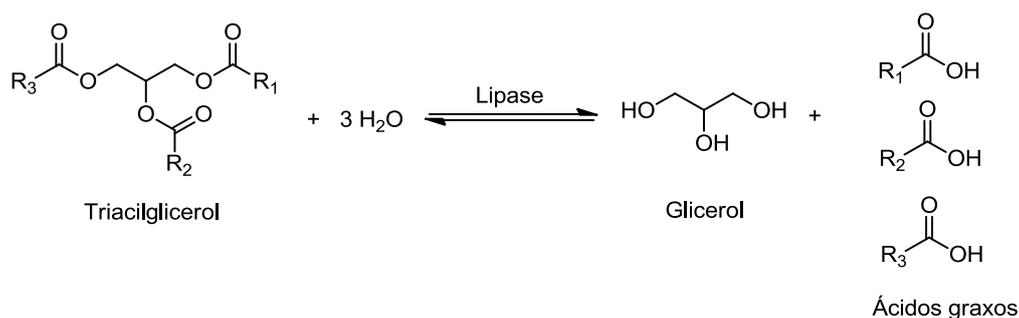
A área da ciência que emprega enzimas isoladas visando a biotransformação de compostos orgânicos é chamada biocatálise. Dentre as enzimas mais aplicadas para este fim, tanto na indústria quanto no meio acadêmico, destaca-se a grande classe das hidrolases (EC 3), sendo a classe de enzimas responsável por cerca de 60% das aplicações em síntese orgânica (Tabela 1). As lipases, uma das sub-classes das hidrolases, são as enzimas hidrolíticas mais explorada na obtenção de compostos enantiomericamente puros. Estima-se que 40% de todas as biotransformações industriais relevantes têm sido realizadas com lipases.<sup>27</sup>

Tamanha aplicação das lipases em biocatálise está intimamente ligada ao fato de que estas enzimas não requerem cofatores. Além do mais, o uso destes biocatalisadores pode oferecer vantagens tais como: alto grau de seletividade (químico, régio- e enantiosseletividade) frente aos substratos, estabilidade em solvente orgânico<sup>43</sup>, podem ser obtidas dos mais diversos organismos (bactérias, fungos, leveduras, plantas, animais), muitas estão disponíveis comercialmente (Tabela 2), além de aceitarem uma gama de substratos não-naturais sendo extremamente versáteis em síntese orgânica.<sup>44</sup>

**Tabela 2.** Exemplos de lipases disponíveis comercialmente<sup>45</sup>

Origem	Fonte de lipases	Aplicações
Fungo	<i>Candida rugosa</i>	Síntese orgânica
	<i>Candida antarctica</i>	Síntese orgânica
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Aditivo de detergentes
	<i>Rhizomucor miehei</i>	Processamento de alimentos
Bactéria	<i>Burkholderia cepacia</i>	Síntese orgânica
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Aditivo de detergentes
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Aditivo de detergentes
	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Síntese orgânica

As lipases são hidrolases de ésteres de triacilglicerol (E.C. 3.1.1.3), ou seja, em seu ambiente natural, catalisam reações de hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa liberando os ácidos graxos correspondentes, glicerol e/ou mono- ou diacilglicerol ou, no caso de meios aquo-restritos, catalisam a reação inversa, promovendo a síntese de triacilgliceróis (Figura 6).<sup>27,46</sup>



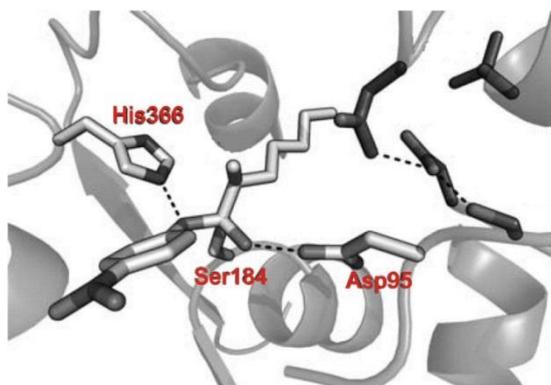
**Figura 6.** Reação de hidrólise de triacilgliceróis mediada por lipase

Diversas enzimas já possuem sua estrutura tridimensional elucidada,<sup>47</sup> o que gera informações importantes e permite que, através de técnicas de engenharia de proteínas e de biologia molecular moderna, as propriedades catalíticas possam ser controladas e modificadas, o que pode resultar em novos biocatalisadores com características melhoradas, como, por exemplo, mais seletivos e/ou mais termoestáveis. Estudos de raios X mostraram que as lipases de *Candida antarctica* apresentam em suas estruturas um padrão conformacional comum, denominado de conformação  $\alpha/\beta$  hidrolase, composto de uma sequência de  $\alpha$ -hélices e folhas  $\beta$ -pregueadas alternadas (Figura 7).<sup>48</sup>



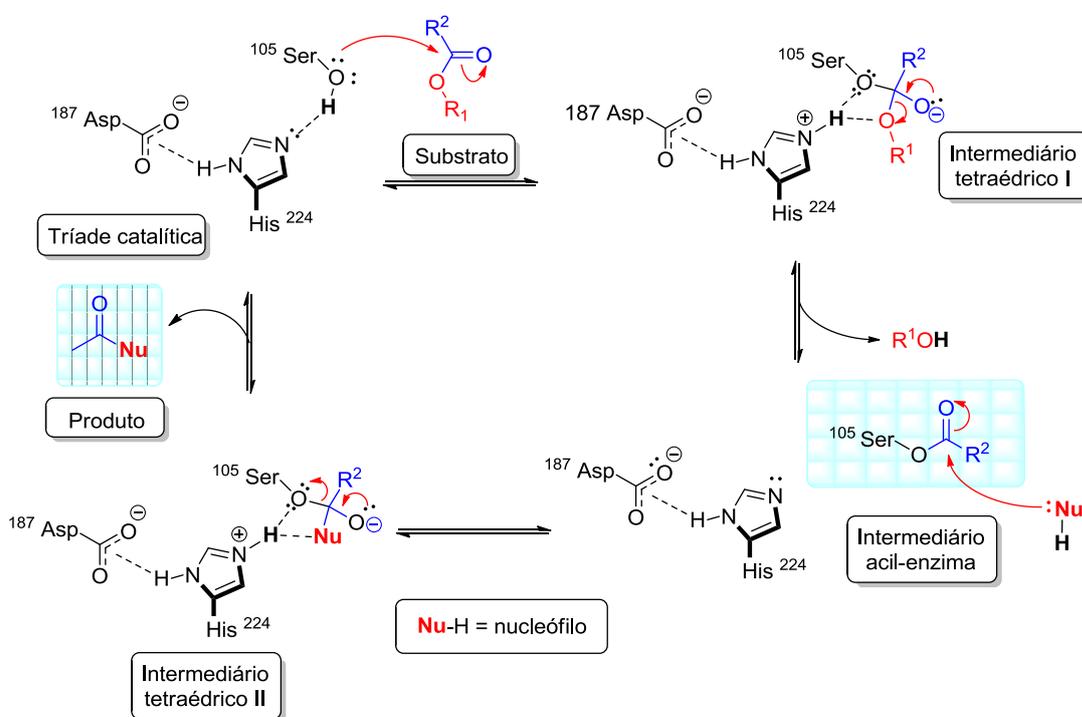
**Figura 7.** Estrutura cristalográfica da lipase de *Candida antarctica* fração B, a CAL-B<sup>49,50</sup>

A catálise enzimática propriamente dita ocorre em uma região da enzima onde encontra-se o sítio catalítico, geralmente uma cavidade, onde ocorre interações com substratos específicos, catalisando a transformação química (Figura 8).<sup>51</sup>



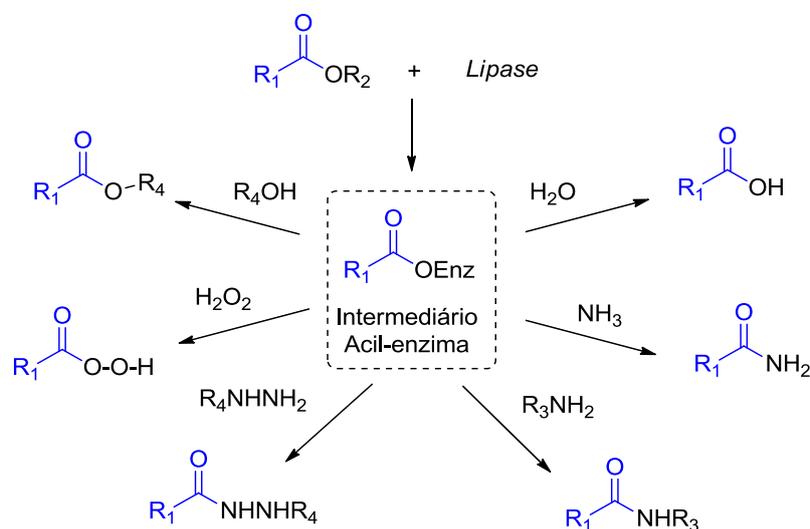
**Figura 8.** Representação do sítio catalítico da lipase de *Candida antarctica* fração A, a CAL-A, composto por resíduos de aminoácidos, com destaque para a tríade: serina, histidina e aspartato<sup>52</sup>

No caso das lipases, o sítio catalítico é composto por uma tríade de resíduos de aminoácidos: um de serina (nucleófilo), um imidazólico de histidina e um carboxílico de ácido aspártico ou glutâmico.<sup>53</sup> Esses resíduos de aminoácidos estão tridimensionalmente dispostos próximos uns dos outros, e dessa forma, interações ácido-base provocam uma diminuição do  $pK_a$  da hidroxila da serina tornando-a mais nucleofílica, o que possibilita o ataque ao carbono carbonílico do substrato, de acordo com o mecanismo exemplificado na Figura 9.<sup>27,54,55</sup>



**Figura 9.** Representação do mecanismo da ação catalítica de uma lipase

Assim que o ataque ao carbono carbonílico do substrato ocorre, o intermediário tetraédrico I é formado, seguido da liberação do grupo  $R_1OH$  e formação do intermediário acil-enzima. Após a formação deste intermediário ele pode sofrer um ataque de diferentes espécies nucleofílicas presentes no meio reacional, o que demonstra a grande versatilidade das reações catalisadas por lipases, como reações de hidrólise/alcoólise, amonólise, aminólise, hidrazinólise, de formação de perácidos e reações de transesterificação (Figura 10).<sup>27</sup> O ataque do nucleófilo (Nu-H) ao intermediário acil-enzima, leva à formação de um segundo intermediário tetraédrico (intermediário tetraédrico II) e, em seguida, ocorre a liberação do produto acilado e a regeneração da enzima.



**Figura 10.** Diferentes nucleófilos aplicáveis às reações mediadas por lipases

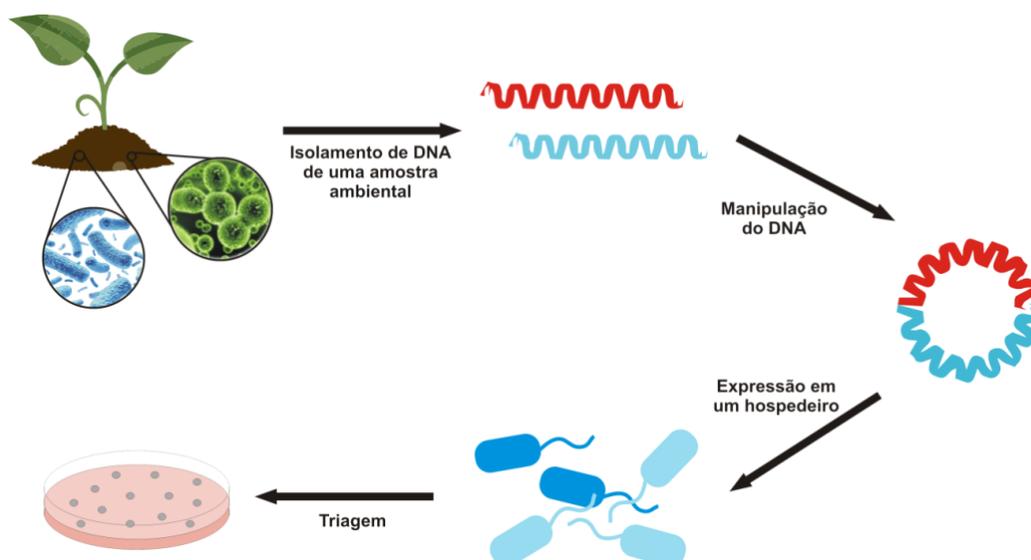
Apesar da vasta aplicação de lipases, tanto na indústria quanto no meio acadêmico, muitos dos biocatalisadores disponíveis comercialmente não apresentam atividade e estabilidade satisfatórias em processos biocatalíticos mais elaborados, além de que muitas enzimas apresentam custo elevado por serem modificadas geneticamente, fazendo-se necessário a identificação de novas lipases que apresentem características melhoradas visando a aplicação destes biocatalisadores em síntese orgânica.

### 1.3.1.2 Lipases obtidas por prospecção metagenômica

Lipases podem ser isoladas dos mais diversos meios, tais como plantas, animais e microrganismos, sendo as de origem microbiana as mais exploradas em síntese orgânica.<sup>56</sup> A obtenção de lipases foi, durante muito tempo, dependente de técnicas de cultivo. No entanto, essa técnica apresenta limitações, pois estima-se que somente cerca de 1% dos microrganismos sejam cultiváveis em laboratório,<sup>57</sup> dessa forma, os 99% restantes não teriam seu potencial explorado. Isto se deve ao fato de que meios de cultura, na maioria das vezes, são incapazes de reproduzir as condições encontradas no ambiente. Outra limitação associada ao cultivo de microrganismos é que muitos deles podem ser nocivos à saúde humana, como, por exemplo, fungos e bactérias patogênicos.

Nos últimos anos, técnicas de biologia molecular modernas têm sido empregadas para identificar ou desenvolver biocatalisadores de interesse.<sup>58,59,60</sup> Dentre essas abordagens, a triagem em bibliotecas metagenômicas é uma alternativa eficiente para compreender a diversidade microbiana e encontrar novos biocatalisadores, independentemente de técnicas tradicionais cultivo.

O termo metagenômica ou genômica ambiental é definido como a “*aplicação de técnicas de genômica moderna para o estudo de comunidades de microrganismos diretamente em seus ambientes naturais, sem a necessidade de isolamento e cultivo em laboratório das espécies individuais*”.<sup>61</sup> Dessa forma, a técnica de metagenômica supera a limitação imposta pelo cultivo *in vitro* de microrganismos, baseando-se na construção de uma biblioteca de material genético obtido diretamente de fontes ambientais (solo, ar, ambientes aquáticos, plantas, animais). Para isso, fragmentos de DNA são extraídos de uma amostra ambiental, sequenciados, analisados e clonados em uma bactéria hospedeira cultivável em laboratório, geralmente *Escherichia coli*, e, após a expressão, os clones são submetidos à triagem para a propriedade desejada, neste caso, a produção de lipases (Figura 11).<sup>62</sup>

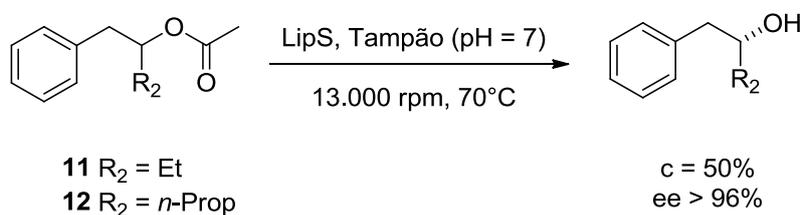


**Figura 11.** Obtenção de lipases por prospecção metagenômica

Fonte. Adaptado da referência 62

Além de superar a limitação imposta pelo cultivo *in vitro* de microrganismos, a técnica de metagenômica oferece a vantagem de realizar análises de forma relativamente imparcial, uma vez que não é necessário o conhecimento prévio dos microrganismos presentes na amostra investigada.<sup>62</sup>

Em 2012, duas novas lipases foram obtidas de uma biblioteca metagenômica construída a partir de amostras de solo e água da cidade de Hamburgo, na Alemanha, e identificadas como LipS e LipT. Estas lipases apresentaram termoestabilidade em até 75°C e a LipS apresentou alta seletividade em reações de hidrólise dos ésteres **11** e **12** levando a obtenção dos (*R*)-álcoois correspondentes com excessos enantioméricos maiores que 96% (Esquema 5).<sup>63</sup>

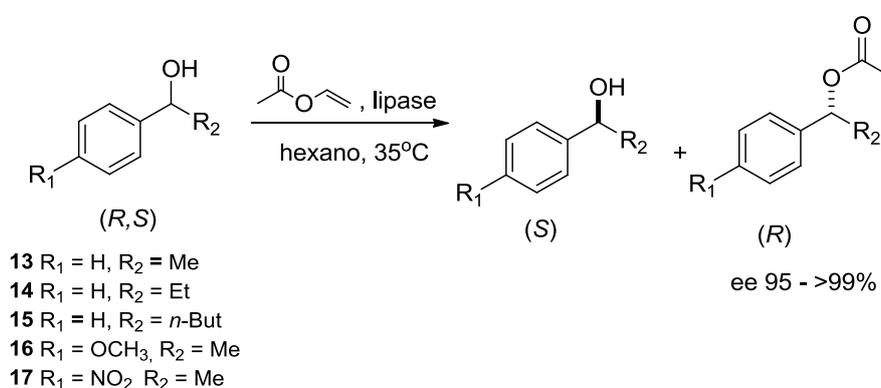


**Esquema 5.** Reações de hidrólise dos ésteres **11** e **12** mediada pela enzima de metagenômica LipS

Outra lipase inédita foi isolada de uma biblioteca metagenômica construída a partir de sedimentos de maré na Coreia do Sul e identificada como EstEH112. Esta lipase foi avaliada em reações de resolução cinética visando a obtenção de álcoois

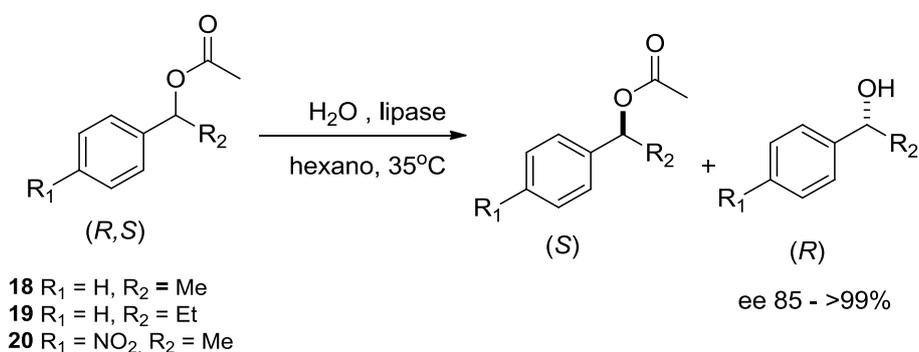
terciários enantiomericamente enriquecidos, no entanto, baixos coeficientes enantioméricos foram observados para estas reações ( $E < 5$ ).<sup>64</sup>

Recentemente, Costa<sup>65</sup> avaliou duas lipases obtidas de uma biblioteca metagenômica construída a partir de uma amostra de solo contaminado com gordura animal (LipC12 e LipG9)<sup>66,67</sup> na resolução cinética de álcoois benzílicos *p*-substituídos e ésteres carboxílicos. As reações de transesterificação dos álcoois **13-17** levaram aos respectivos produtos com excessos enantioméricos de 95% a maiores que 99% (Esquema 6). A reação de transesterificação do álcool **13** apresentou taxa de conversão de 49% em 30 horas, levando a obtenção do álcool (S) remanescente com excesso enantiomérico de 95%.



**Esquema 6.** Reação de transesterificação dos álcoois **13-17** mediada por enzimas LipC12 e LipG9, oriundas de metagenômica

As reações de hidrólise dos ésteres **18-20** apresentaram menores taxas de conversão quando comparadas às reações de transesterificação, no entanto, altos coeficientes enantioméricos ( $E > 200$ ) foram observados (Esquema 7).



**Esquema 7.** Reação de hidrólise dos ésteres **18-20** mediada por enzimas LipC12 e LipG9

Embora várias lipases já tenham sido isoladas de bibliotecas metagenômicas construídas a partir de diferentes ambientes,<sup>68,69,70,71,72</sup> pouco é descrito a respeito da aplicabilidade destas lipases em síntese orgânica, mais especificamente na resolução de racematos, destacando-se a oportunidade de avaliação da enantiosseletividade de uma lipase oriunda de metagenômica frente a reações de transesterificação de álcoois secundários alifáticos com diferentes tamanhos de cadeias carbônicas ligadas ao centro estereogênico e reações de hidrólise dos respectivos ésteres, caracterizando assim o objetivo deste trabalho.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desempenho da lipase LipG9, obtida de uma biblioteca metagenômica, na resolução cinética enzimática de álcoois secundários alifáticos e seus respectivos ésteres.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

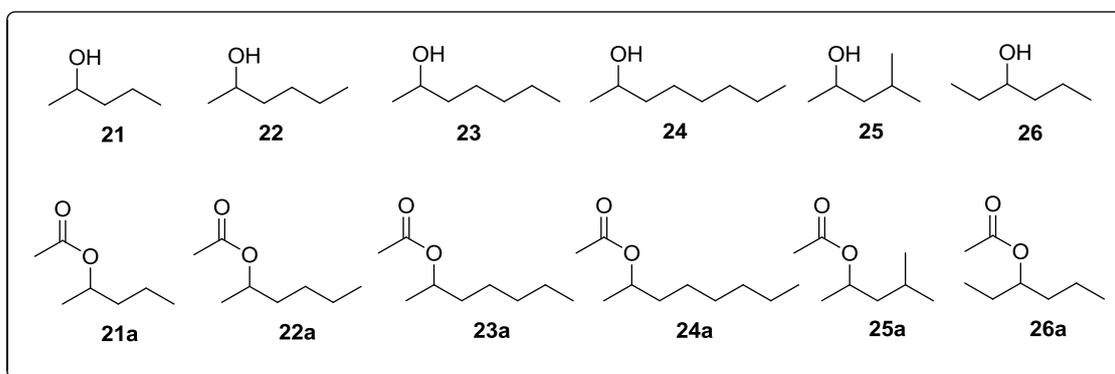
Os objetivos específicos definidos foram:

- ✓ Síntese e caracterização dos álcoois alifáticos e ésteres carboxílicos correspondentes;
- ✓ Resolução cromatográfica dos compostos sintetizados para posterior determinação dos parâmetros de estereosseletividade das reações enzimáticas;
- ✓ Síntese e caracterização dos propionatos correspondentes para aplicação como padrões cromatográficos;
- ✓ Avaliação do desempenho da enzima LipG9 em reações de resolução cinética enzimática;
- ✓ Investigação dos parâmetros reacionais em reações de resolução cinética enzimática mediadas pela enzima LipG9;

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

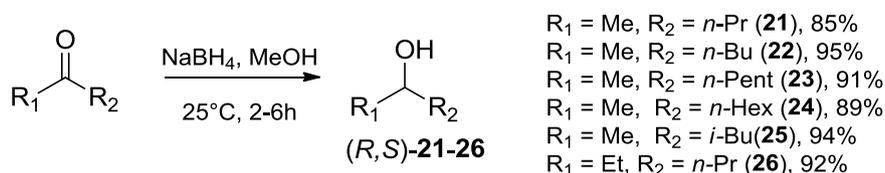
#### 3.1 SÍNTESE QUÍMICA E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS DE INTERESSE

A primeira etapa do trabalho consistiu na síntese e caracterização dos álcoois secundários alifáticos (*R,S*)-**21-26** de interesse e dos ésteres (*R,S*)-**21a-26a** correspondentes mostrados na Figura 12. Esta série de compostos foi planejada de forma que fosse investigado o desempenho da enzima LipG9 frente a compostos com diferentes tamanhos de cadeias carbônicas (**21 – 24** e **21a - 24a**), com uma cadeia ramificada (**25** e **25a**) e, também, com o grupo hidroxila na posição -3 (**26** e **26a**).



**Figura 12.** Álcoois e ésteres sintetizados.

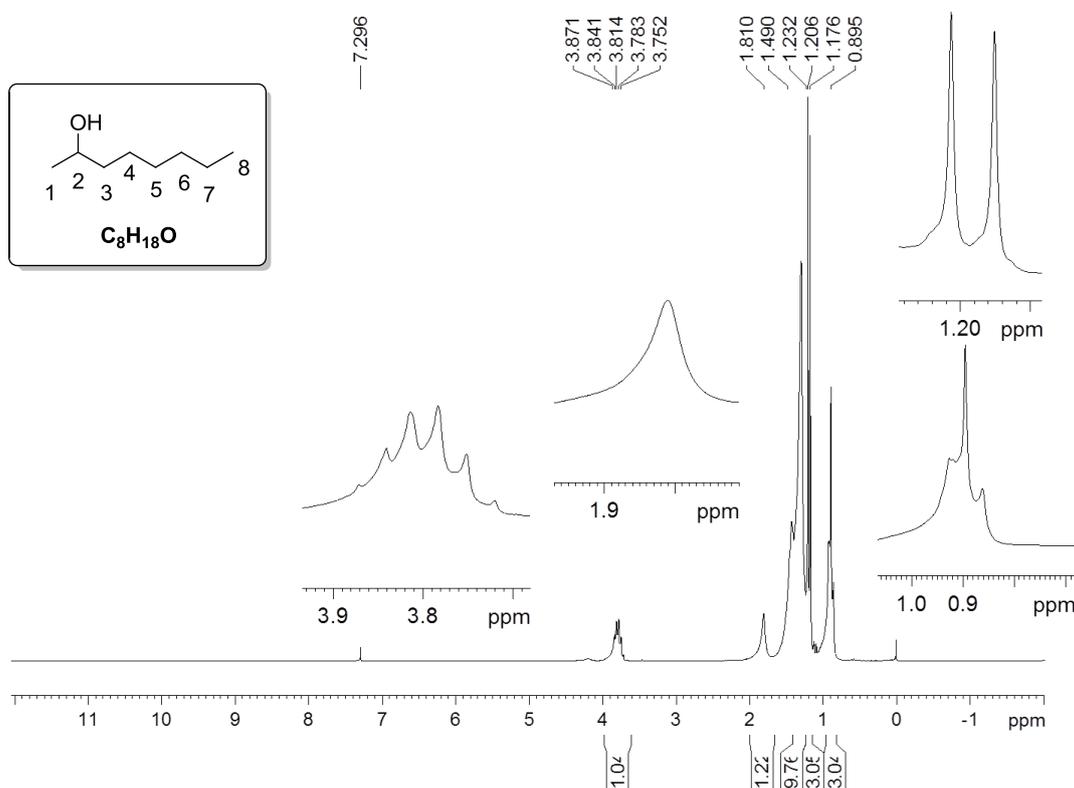
Os álcoois alifáticos (*R,S*)-**21-26** foram sintetizados via redução química das cetonas comerciais correspondentes com borohidreto de sódio em metanol, de acordo com metodologia bem estabelecida na literatura<sup>73</sup> (Esquema 8). Todos os álcoois obtidos são óleos translúcidos e foram purificados por destilação fracionada. Os produtos foram obtidos com rendimentos entre 85-95%.



**Esquema 8.** Redução química das cetonas para obtenção dos álcoois de interesse.

Todos os compostos sintetizados foram caracterizados por RMN de <sup>1</sup>H, de <sup>13</sup>C e IV e os dados espectroscópicos obtidos estão de acordo com a literatura.<sup>74,75,76</sup>

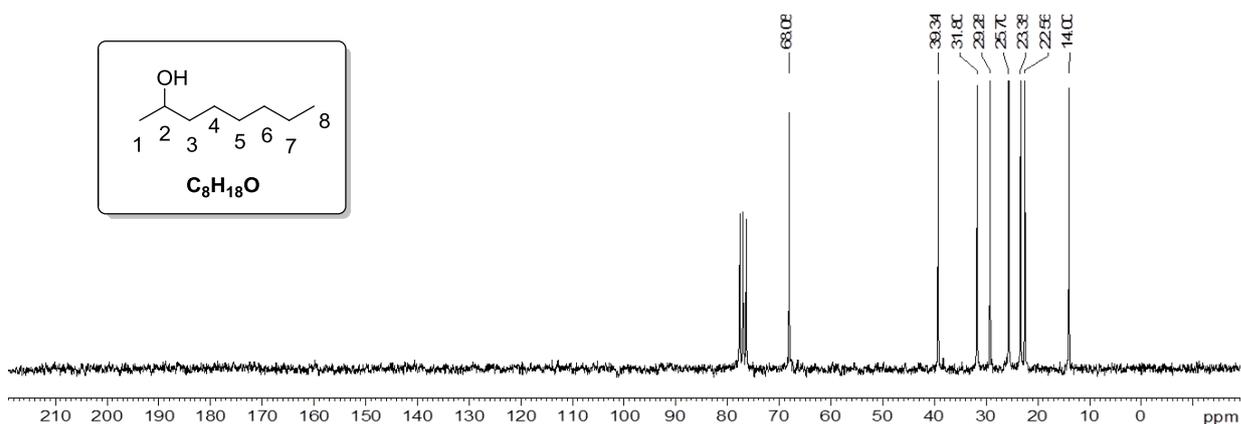
Devido à similaridade dos álcoois (*R,S*)-**21-26** sintetizados, será discutida somente a caracterização do octan-2-ol (**24**). No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **24** (Figura 13) observou-se um tripleto (t) na região de 0,89 ppm com constante de acoplamento ( $J$ ) de 6,8 Hz, com integral para três hidrogênios, atribuído aos hidrogênios da metila terminal (8). Na região de 1,20 ppm observou-se um duplete (d), com  $J = 6,2$  Hz, com integral para três hidrogênios, atribuído aos hidrogênios da metila (1) vizinha ao carbono carbinólico. Em 1,81 ppm observou-se um simpleto largo (sl), com integral para um hidrogênio, referente ao hidrogênio lábil da hidroxila da função álcool. Na região de 3,75 a 3,87 ppm observou-se um sexteto (sext), com  $J = 6,2$  Hz, referente a um hidrogênio ligado ao carbono carbinólico (2). Na região 1,23 a 1,49 ppm observou-se um multiplete (m), com integral para dez hidrogênios, atribuído aos hidrogênios ligados aos carbonos metilênicos (3, 4, 5, 6, 7) da molécula.



**Figura 13.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS) do octan-2-ol (**24**).

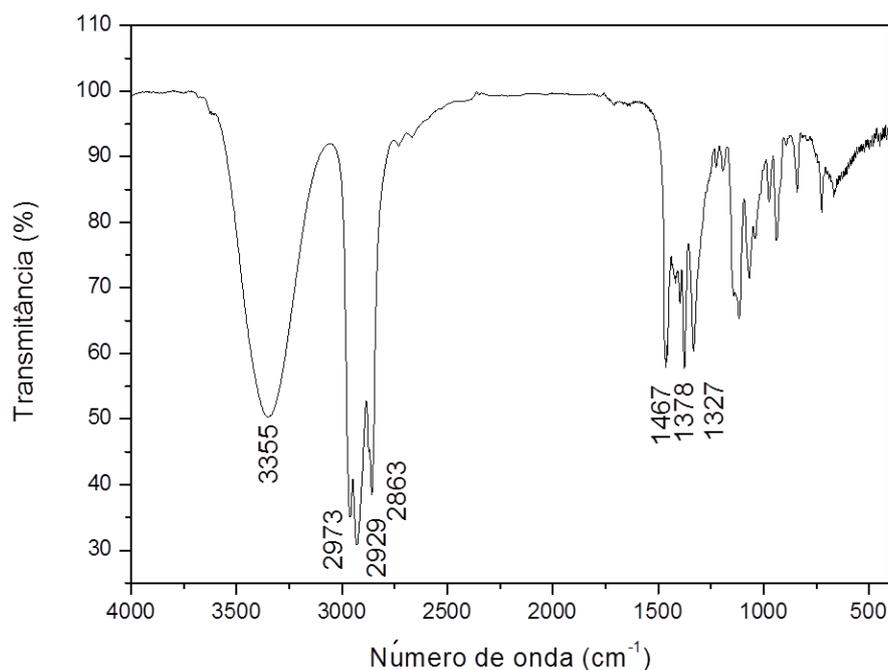
No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do octan-2-ol (**24**) (Figura 14) observou-se um sinal com deslocamento químico de 14,0 ppm atribuído ao carbono da metila (8), devido a maior distância do carbono carbinólico, consequentemente esta metila está mais protegida (blindada) e menos susceptível ao campo magnético aplicado. Observou-se sinais em 22,6, 23,4, 25,7 e 29,3 ppm atribuídos aos carbonos

metilênicos (7), (6), (4) e (5), respectivamente. Observou-se um sinal em 31,8 ppm atribuído ao carbono metilênico (1) e em 39,3 ppm atribuído ao carbono metilênico (3), estes mais desprotegidos (desblindados) devido a proximidade do carbono carbinólico, deixando-os mais susceptíveis ao campo magnético aplicado. Em 68,0 ppm observou-se um sinal com maior deslocamento químico atribuído ao carbono carbinólico (2).



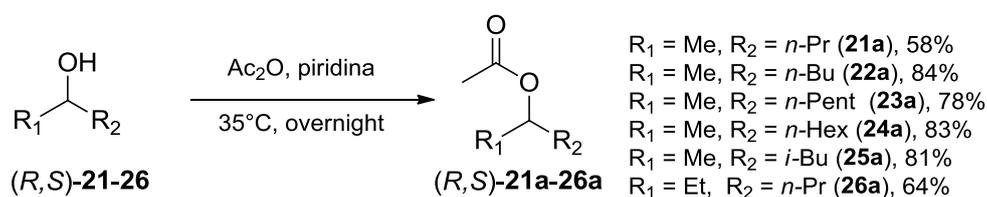
**Figura 14.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do octan-2-ol (**24**).

Na análise de espectrometria no infravermelho por transformada de Fourier em pastilha de KBr do composto **24** (Figura 15) observou-se uma banda de absorção em 3355 cm<sup>-1</sup>, com forma larga e intensa, descrita na literatura como correspondente a deformação axial da ligação de hidrogênio intramolecular característica da função álcool. Observou-se bandas intensas em 2973 cm<sup>-1</sup>, 2929 cm<sup>-1</sup> e 2863 cm<sup>-1</sup> atribuídas aos estiramentos axiais das ligações entre carbono e hidrogênio e três bandas em 1467 cm<sup>-1</sup>, 1378 cm<sup>-1</sup> e 1327 cm<sup>-1</sup> atribuídas aos estiramentos angulares das ligações entre carbono e hidrogênio.



**Figura 15.** Espectro no IV do octan-2-ol (**24**).

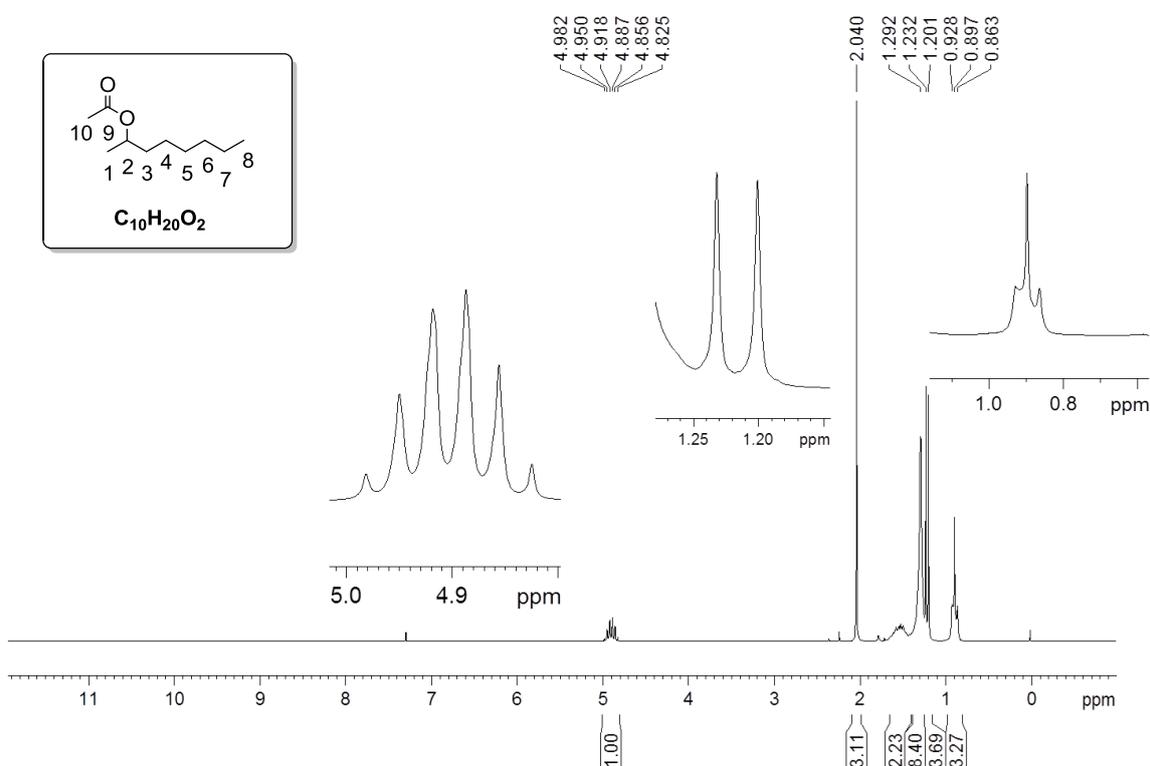
Os ésteres correspondentes (*R,S*)-**21a-26a** foram obtidos a partir da acetilação química dos álcoois (*R,S*)-**21-26** empregando anidrido acético e piridina como solvente e catalisador (Esquema 9). Os resíduos brutos obtidos das reações foram óleos amarelo escuro e após purificação por cromatografia flash utilizando como fase móvel hexano: acetato de etila na proporção 8:2 (v/v), os produtos foram obtidos como óleos levemente amarelados, com rendimentos entre 58 e 81%. Os ésteres sintetizados foram empregados como padrões cromatográficos e como substratos frente a reações de hidrólise enzimática.



**Esquema 9.** Acetilação química dos álcoois para obtenção dos ésteres correspondentes

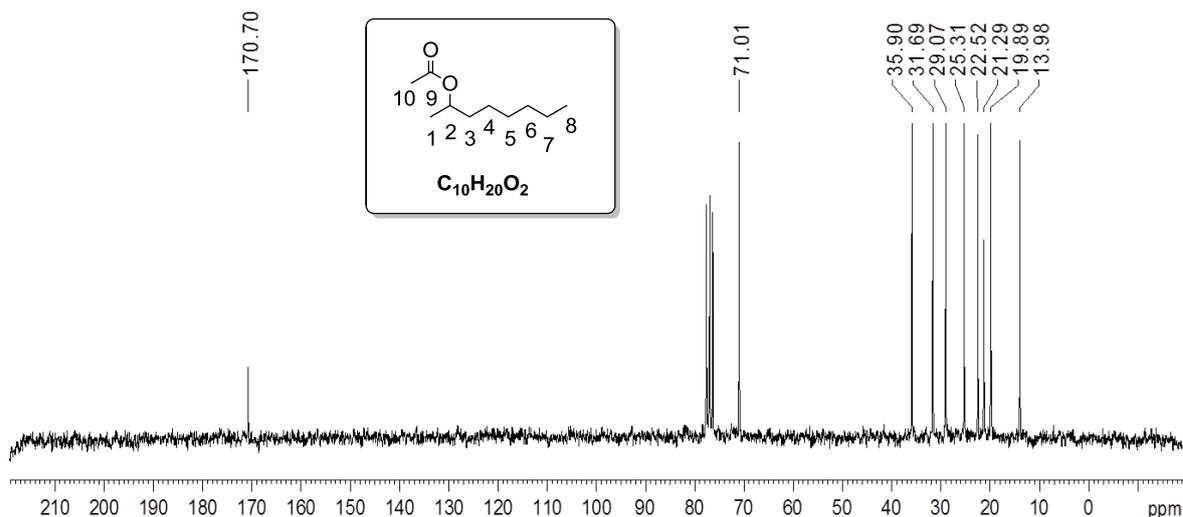
Todos os ésteres (*R,S*)-**21a-26a** foram caracterizados com base na análise dos dados de RMN de <sup>1</sup>H, de <sup>13</sup>C e IV e os dados espectroscópicos estão de acordo com a literatura.<sup>77,78</sup> Devido à similaridade dos compostos sintetizados, será discutida a caracterização do acetato de 2-octila (**24a**). No espectro de RMN de <sup>1</sup>H do composto **24a** (Figura 16), observou-se um tripleto em 0,88 ppm, com *J* = 6,7 Hz, com integral

para três hidrogênios, atribuídos aos hidrogênios da metila terminal (8). Na região de 1,20 ppm observou-se um duplete, com  $J = 6,2$  Hz, com integral para três hidrogênios, atribuído aos hidrogênios da metila (1). Observou-se um simpleto em 2,04 ppm, com integral para três hidrogênios, atribuídos aos hidrogênio da metila do grupo acetila (10). Na região de 4,90 ppm observou-se um sexteto, com  $J = 6,2$  Hz, com integral para um hidrogênio, atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono (2). Na região de 1,23 a 1,29 ppm observou-se um multiplete, com integral para dez hidrogênios, atribuído aos hidrogênios ligados aos carbonos metilênicos (3, 4, 5, 6 e 7) da molécula.



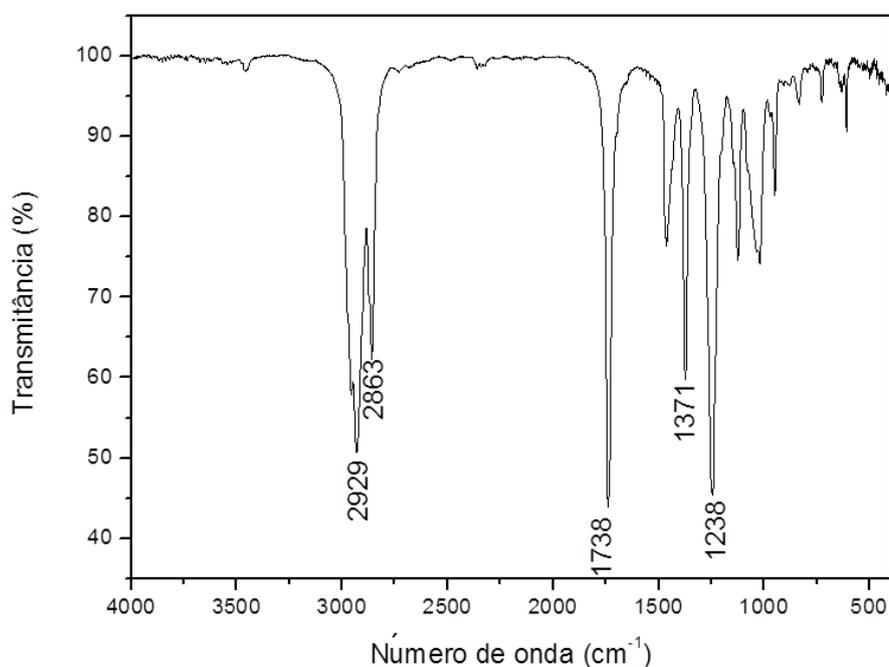
**Figura 16.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz, TMS) do acetato de 2-octila (**24a**)

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto **24a** (Figura 17) observou-se um sinal em 13,9 ppm atribuído ao carbono da metila (8), devido a maior distância do carbono carbonílico, deixando esta metila menos susceptível ao campo magnético aplicado resultando em menor deslocamento químico. Em 19,9, 21,3, 22,3, 25,3 e 29,3 ppm observou-se sinais atribuídos aos carbonos metilênicos (7), (6), (5), (4) e (10), respectivamente. Observou-se um sinal em 31,7 ppm atribuído ao carbono metilênico (1) e em 35,9 ppm atribuído ao carbono metilênico (3). Em 71,0 ppm observou-se um sinal atribuído ao carbono (2) e em 170,7 ppm um sinal atribuído ao carbono da carbonila da função éster (9).



**Figura 17.** Espectro de RMN de  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 50 MHz) do acetato de 2-octila (**24a**)

Na análise de espectrometria no infravermelho por transformada de Fourier em pastilha de KBr do composto **24a** (Figura 18) observou-se uma banda de absorção fina e intensa em  $1738\text{ cm}^{-1}$ , descrita na literatura como característica da função éster. Observou-se bandas intensas em  $2929\text{ cm}^{-1}$  e  $2863\text{ cm}^{-1}$  atribuídas aos estiramentos das deformações axiais das ligações entre carbono e hidrogênio, e em  $1371\text{ cm}^{-1}$  e  $1238\text{ cm}^{-1}$  atribuídas aos estiramentos das deformações angulares das ligações entre carbono e hidrogênio.

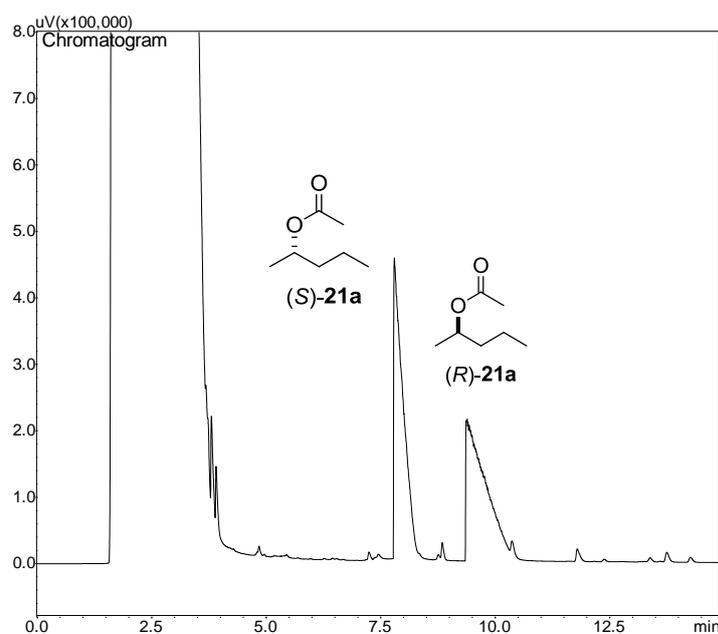


**Figura 18.** Espectro no IV do acetato de 2-octila (**24a**)

### 3.2 RESOLUÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS

A segunda etapa do trabalho consistiu na resolução cromatográfica dos compostos de interesse, a fim de determinar as condições de análises dos álcoois e ésteres envolvidos nas reações para posterior determinação dos parâmetros de estereosseletividade das reações de resolução cinética enzimática. Todos os álcoois ((*R,S*)-**21-26**) e ésteres ((*R,S*)-**21a-26a**) sintetizados foram submetidos à resolução cromatográfica utilizando cromatografia gasosa em coluna com fase estacionária quiral.

Quando os ésteres (*R,S*)-**21a-26a** foram submetidos a resolução cromatográfica, a programação com temperatura inicial de 40°C por 1 minuto com taxa de aquecimento de 2°C por minuto até 120°C resultou na resolução desejada para todos os ésteres. A resolução cromatográfica de um éster, o (*R,S*)-acetato de 2-pentila (**21a**), está ilustrada na Figura 19.

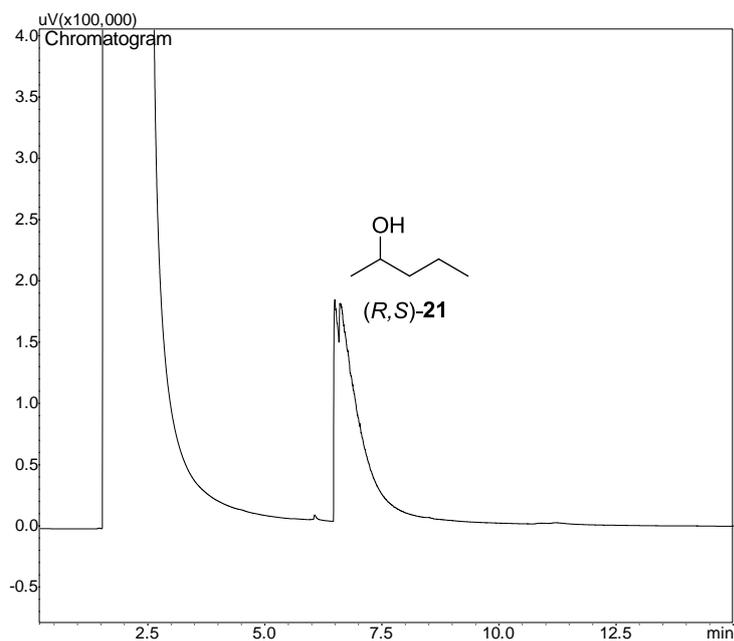


**Figura 19.** Cromatograma da resolução enantiomérica do (*R,S*)-acetato de 2-pentila (**21a**)

tr = 8,0 min e 9,9 min [CG-quiral: coluna capilar Chirasil – Dex CB (25 m x 0,25 mm); Programação: 40°C (1 min), aquecimento (2°C/min) até 120°C]

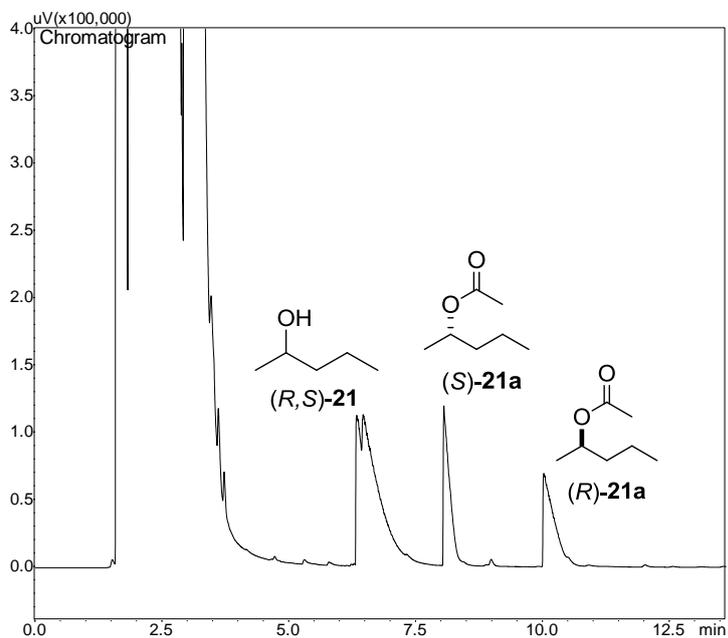
Quando os álcoois alifáticos (*R,S*)-**21-26** foram submetidos à resolução cromatográfica, diferentes isotermas e rampas de aquecimento foram testadas, no entanto, nenhuma das condições testadas resultou na resolução destes compostos e já existe relato na literatura a respeito da dificuldade da resolução cromatográfica de álcoois alifáticos.<sup>79</sup> A tentativa de resolução cromatográfica de um álcool, o (*R,S*)-

pentan-2-ol (**21**), está ilustrada na Figura 20 e o cromatograma da mistura (*R,S*)-pentan-2-ol (**21**) e (*R,S*)-acetato de 2-pentila (**21a**) está ilustrado na Figura 21.



**Figura 20.** Cromatograma do (*R,S*)-pentan-2-ol (**21**)

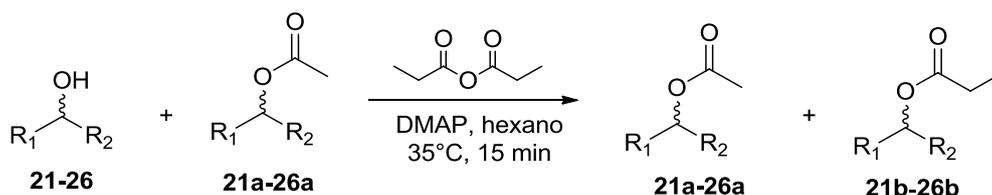
tr = 6,4 min [CG-quiral: coluna capilar Chirasil – Dex CB (25 m x 0,25 mm); Programação: 40°C (1 min), aquecimento (2°C/min) até 120°C ]



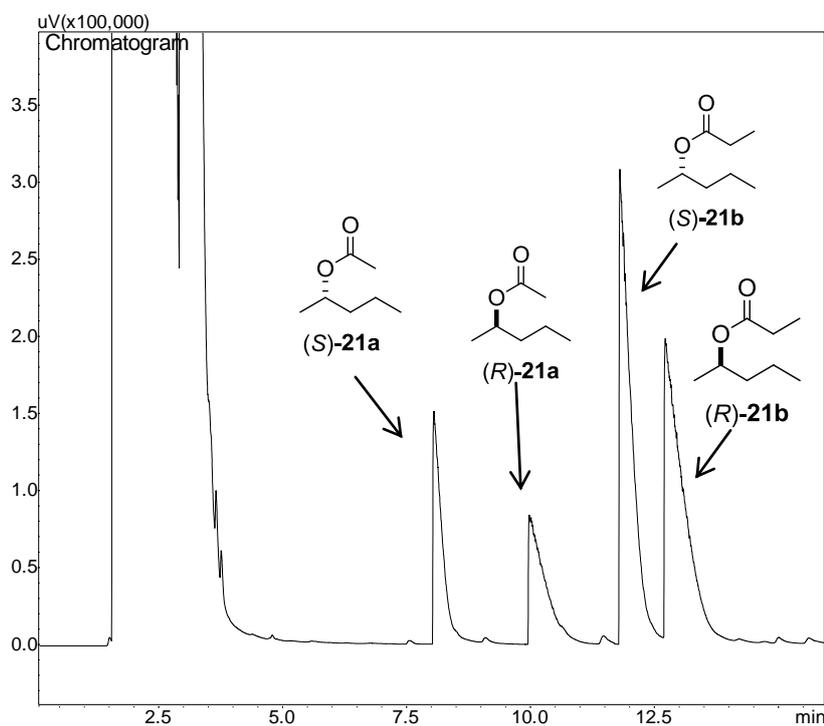
**Figura 21.** Cromatograma da mistura (*R,S*)-pentan-2-ol (**21**) e (*R,S*)-acetato de 2-pentila (**21a**)

tr = 6,4 min, 8,0 min e 10,0 min [CG-quiral: coluna capilar Chirasil – Dex CB (25 m x 0,25 mm); Programação: 40°C (1 min), aquecimento (2°C/min) até 120°C ]

Nestes casos, a determinação dos excessos enantioméricos dos álcoois (*R,S*)-**21-26** foi realizada indiretamente via derivatização aos ésteres propiônicos. Para isso, após a retirada de alíquotas das reações de RCE, adicionou-se anidrido propiônico e 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (Esquema 10). A reação foi mantida sob agitação magnética durante 15 minutos, e, em seguida, neutralizada com solução aquosa de NaHCO<sub>3</sub>. Após a derivatização, as alíquotas foram analisadas por cromatografia gasosa em coluna com fase estacionária quiral e os parâmetros de estereosseletividade determinados. O cromatograma do acetato de 2-pentila (**21a**) e do propionato de 2-pentila (**21b**) obtido via derivatização do pentan-2-ol (**21**) está ilustrado na Figura 22.



**Esquema 10:** Derivatização do álcoois alifáticos (**21-26**) para obtenção dos propionatos correspondentes (**21b-26b**)



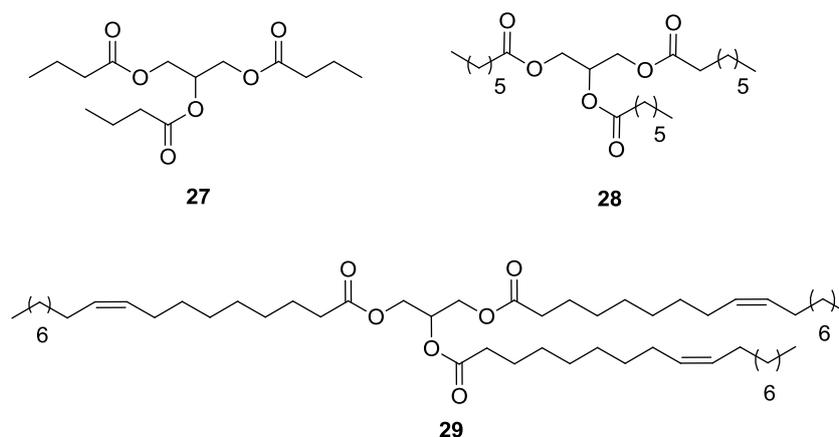
**Figura 22.** Cromatograma do acetato de 2-pentila (**21a**) e do propionato de 2-pentila (**21b**) obtido via derivatização do pentan-2-ol (**21**) com anidrido propiônico

Tr = 8,0 min, 9,9 min, 11,8 min, 12,7 min. [CG-quiral: coluna capilar Chirasil – Dex CB (25 m x 0,25 mm); Programação: 40°C (1 min), aquecimento (2°C/min) até 120°C ]

### 3.3 RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA (RCE)

#### 3.3.1 Biocatalisador

A enzima LipG9 avaliada neste trabalho foi obtida de uma biblioteca metagenômica construída por Glogauer,<sup>66</sup> a partir de uma amostra de solo contaminado com alto teor de gordura animal. A biblioteca possui cerca de 500.000 clones, os quais foram submetidos a uma seleção de atividade contra diferentes substratos (Figura 23). A partir dessa triagem, 2661 clones apresentaram atividade contra a tributirina (**27**) e 127 apresentaram atividade contra a tricaprilina (**28**). Na segunda triagem, do total de 127 clones, apenas 32 apresentaram atividade contra a trioleína (**29**), que é considerado um substrato padrão para lipases ditas verdadeiras. Por fim, os três clones que apresentaram maior atividade contra a trioleína foram selecionados para o sequenciamento, identificação e análise. Como resultado, uma nova lipase, a LipG9, foi identificada e caracterizada por Martini<sup>80</sup> e por Alnoch.<sup>81,82</sup>



**Figura 23.** Triacilgliceróis (**27-29**) utilizados como substratos para determinação da atividade lipolítica dos clones da biblioteca metagenômica

A LipG9, com massa aproximada de 55 kDa, foi imobilizada em resina hidrofóbica de polipropileno (Accurel MP-1000<sup>®</sup>) via adsorção física e apresentou atividade específica de hidrólise de 16 U contra a trioleína (**29**) em heptano, sendo U definido como a quantidade de enzima capaz de gerar 1  $\mu\text{mol}$  de ácidos graxos por minuto nas condições do ensaio. A LipG9 imobilizada apresentou termoestabilidade até 50 °C quando incubada durante 8 horas e também mostrou-se estável em vários solventes orgânicos, tais como heptano (log P = 4), hexano (log P = 3,5), tolueno (log

P = 2,5), tetrahidrofurano (log P = 0,46), acetona (log P = -0,31) e etanol (log P = -0,23), mantendo mais de 80% de sua atividade residual após 8 horas de incubação.<sup>81</sup>

Neste trabalho a enzima LipG9 foi selecionada para avaliação da enantiosseletividade frente a seis álcoois alifáticos com diferentes cadeias carbônicas ((*R,S*)-**21-26**) e seus ésteres correspondentes ((*R,S*)-**21a-26a**), sendo empregada pela primeira vez na RCE destes compostos.

### 3.3.2 Resolução via reação de transesterificação enzimática mediada por LipG9

Para todas as reações de resolução cinética enzimática dois parâmetros foram assumidos: o primeiro foi que para a enzima ser considerada ativa a conversão mínima deveria ser maior que 5% e o segundo foi que o tempo máximo de reação seria de 24 horas. Os parâmetros conversão e pureza enantiomérica foram determinados a partir das áreas observadas para cada composto nos cromatogramas e aplicação das equações apropriadas.<sup>1</sup> As configurações absolutas dos álcoois e ésteres foram atribuídas por comparação com os dados obtidos em uma reação realizada em paralelo empregando a enzima CAL-B cuja enantiopreferência em reações de resolução cinética enzimática está bem descrita na literatura.<sup>79,83,84</sup>

Em um primeiro momento, os seis álcoois alifáticos (*R,S*)-**21-26** com diferentes cadeias carbônicas foram submetidos a reações de transesterificação mediada pela enzima LipG9 empregando acetato de vinila como doador de acila, hexano como solvente e 35°C.

Os dados das reações de transesterificação dos álcoois alifáticos (*R,S*)-**21-26** mediadas pela enzima LipG9 estão apresentados na Tabela 3.

A reação de transesterificação do (*R,S*)-pentan-2-ol (**21**) mediada pela enzima LipG9 apresentou taxa de conversão de 49% em 24 horas, levando a obtenção do éster (*R*)-**21a** com 88% de excesso enantiomérico (ee) e do álcool remanescente (*S*)-**21** com 81% de ee, resultando em um coeficiente de enantiosseletividade (E) igual a 39 (Tabela 2- entrada 5). Da série de álcoois avaliada, o pentan-2-ol (**21**) é o que possui o menor grupo ( $R_2 = n$ -propila) ligado ao centro estereogênico. Quando o álcool avaliado foi o (*R,S*)-hexan-2-ol (**22**), que possui um grupo *n*-butila ligado ao estereocentro, a taxa de conversão foi de 54% em 24 horas, fornecendo o produto (*R*)-**22a** com 74% de excesso enantiomérico e o álcool (*S*)-**22** com 88% (Tabela 2 – entrada 10).

---

<sup>1</sup> Equações 1 e 2 descritas na Parte Experimental deste documento.

**Tabela 3.** Resolução cinética enzimática dos álcoois (*R,S*)-**21-26** mediada por LipG9

$$\text{R}_1\text{CH}(\text{OH})\text{R}_2 + \text{CH}_2=\text{CH}-\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_3 \xrightarrow[\text{Hexano, 35}^\circ\text{C}]{\text{LipG9}} \text{R}_1\text{CH}(\text{OH})\text{R}_2 + \text{R}_1\text{CH}(\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_3)\text{R}_2$$

$(R,S)\text{-21-26} \quad \quad \quad (S)\text{-21-26} \quad \quad \quad (R)\text{-21a-26a}$

Entrada	Álcool	Tempo (h)	c (%) <sup>a</sup>	ee (%) <sup>b</sup>		E <sup>d</sup>
				álcool <sup>c</sup>	éster	
1		3	16	19	89	21
2		6	26	33	89	23
3		9	34	41	86	20
4		12	38	53	85	21
5		24	49	81	88	39
6		3	14	17	84	14
7		6	23	27	85	16
8		9	29	42	80	13
9		12	35	48	81	15
10		24	54	88	74	19
11		3	9	7	53	3
12		6	16	6	51	3
13		9	21	20	39	3
14		12	30	25	51	4
15		24	52	47	46	4
16		3	12	6	40	2
17		6	20	12	39	2
18		9	30	15	36	2
19		12	32	20	34	2
20		24	53	36	30	3
21		3	<5	-	-	-
22		6	7	7	73	7
23		9	9	11	71	7
24		12	10	13	96	56
25		24	19	26	96	63
26		3	6	5	49	3
27		6	7	11	89	19
28		9	15	11	88	17
29		12	17	16	81	11
30		24	59	32	52	4

Condições reacionais: Álcool (*R,S*)-**21-26** (0,1 mmol), enzima imobilizada (50 mg), acetato de vinila (0,4 mmol), hexano (2 mL), 35°C; <sup>a</sup>Conversão: determinada por comparação das áreas do cromatograma; <sup>b</sup>Excesso enantiomérico: (*R*)-(*S*)/(*R*)+(*S*)x100 [CG-quiral: coluna capilar Chirasil – Dex CB (25 m x 0,25 mm); Programação de temperatura: 40°C até 120°C com taxa de aquecimento de 2°C/min; fluxo 20 mL/min]; <sup>c</sup>Excesso enantiomérico do álcool: determinado indiretamente via derivatização do álcool ao propionato correspondente; <sup>d</sup>Razão enantiomérica:  $E = \ln \{ [e.e.\text{éster} (1 - e.e.\text{álcool})] / (e.e.\text{éster} + e.e.\text{álcool}) \} / \ln \{ [e.e.\text{éster} (1 + e.e.\text{álcool})] / (e.e.\text{éster} + e.e.\text{álcool}) \}$ ;

Para as reações de transesterificação enzimática dos álcoois (*R,S*)-heptan-2-ol (**23**), que possui o grupo  $R_2 = n$ -pentila ligado ao estereocentro, e (*R,S*)-octan-2-ol (**24**), que possui o grupo  $R_2 = n$ -hexila, as taxas de conversão foram próximas a ideal (52% e 53%, respectivamente), no entanto, os produtos (*R*)-**23a** e (*R*)-**24a**, bem como os álcoois remanescentes (*S*)-**23** e (*S*)-**24**, foram obtidos com baixos excessos enantioméricos (Tabela 2- entradas 15 e 20). Estes resultados indicam que os grupos *n*-pentila e *n*-hexila, dos álcoois **23** e **24**, respectivamente, podem ser grupos considerados grandes para um encaixe mais favorecido no sítio catalítico da enzima LipG9, uma vez que para a resolução dos álcoois **21** e **22**, que possuem grupos menores ligados ao estereocentro (*n*-propila e *n*-butila), a enzima LipG9 apresentou maior enantiosseletividade.

É importante notar que, para a série dos álcoois (*R,S*)-**21-24** avaliada, o aumento do comprimento da cadeia carbônica não influenciou significativamente as taxas de conversão, mas resultou na diminuição dos valores de excessos enantioméricos dos produtos, ou seja, a enantiosseletividade das reações diminuiu.

Para o (*R,S*)-4-metil-pentan-2-ol (**25**), que possui como grupo  $R_2 = i$ -butila, a reação ocorreu mais lentamente quando comparado aos álcoois de mesma massa molecular **22** e **26**. A estrutura do álcool **25**, que possui o grupo  $R_2$  ramificado, pode ter apresentado um encaixe menos favorecido na cavidade catalítica da LipG9, o que implicou em menor taxa de conversão.

A reação de transesterificação do álcool (*R,S*)-hexan-3-ol (**26**), que possui o grupo  $R_1$  diferenciado da série avaliada ( $R_1 =$  etila), foi a que apresentou maior taxa de conversão em 24 horas (59%), mostrando que o grupo etila pode ser um grupo mais ajustável na cavidade catalítica quando comparado ao grupo metila, presente nos demais álcoois da série avaliada. No entanto, apesar da alta taxa de conversão, o produto (*R*)-**26a** foi obtido com apenas 52% de ee (Tabela 2- entrada 30).

Os resultados obtidos para as reações de transesterificação dos álcoois alifáticos **21-26** mediadas pela enzima de metagenômica LipG9 mostraram-se promissores, uma vez que, quando comparado a resultados descritos na literatura,<sup>85</sup> as reações de resolução cinética dos álcoois alifáticos (*R,S*)-butan-2-ol, (*R,S*)-pentan-2-ol, (*R,S*)-heptan-2-ol e (*R,S*)-octan-2-ol mediadas pela lipase comercial de *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK) imobilizada em sol-gel, empregando acetato de vinila como doador acila, apresentaram taxas de conversão entre 8% e 19% em 24 horas e coeficientes de enantiosseletividade (E) entre 1 e 11.

Patel e colaboradores<sup>86</sup> relataram a resolução cinética enzimática do álcool alifático (*R,S*)-pentan-2-ol empregando diferentes lipases comerciais. Quando o (*R,S*)-pentan-2-ol foi submetido a resolução mediada pelas lipases comerciais de pâncreas

de porco (PPL), de *Mucor sp.* (MAP-10) e de *Pseudomonas sp.* (lipase AK), empregando acetato de vinila como agente acilante, ambos os enantiômeros do álcool foram acetilados levando a obtenção do produto racêmico. Para a resolução mediada pela lipase de *Pseudomonas cepacia* (lipase PS-30) o (S)-pentan-2-ol foi obtido com apenas 20% de excesso enantiomérico.

Quando o (R,S)-pentan-2-ol foi submetido a resolução catalisada por CAL-B<sup>86</sup> o álcool S foi obtido com excesso enantiomérico de 99%, no entanto, vale ressaltar que a enzima comercial CAL-B é modificada geneticamente, além de possuir um processo de imobilização já bastante otimizado, já a enzima LipG9 não possui qualquer modificação genética e levou a obtenção do (S)-pentan-2-ol com 81% de excesso enantiomérico. Também é importante destacar que, até este momento, as condições reacionais de transesterificação catalisadas pela LipG9 não haviam sido otimizadas, caracterizando assim a etapa seguinte deste trabalho.

### 3.3.3 Investigação dos parâmetros reacionais da resolução cinética mediada por LipG9

Já é conhecido que as condições reacionais (por exemplo, solvente, temperatura, pH, agente acilante) podem apresentar um efeito significativo na seletividade de reações catalisadas por enzimas.<sup>87</sup> Além do mais, a enzima LipG9 avaliada neste trabalho é uma lipase que, até o momento, nunca havia sido explorada em reações de resolução cinética de álcoois alifáticos. A fim de avaliar o desempenho desta lipase inédita neste tipo de reação, três parâmetros reacionais foram investigados, sendo, primeiramente, o agente acilante empregado, seguido da temperatura e, finalmente, o solvente orgânico. Para tanto, um álcool da série foi selecionado e submetido à resolução cinética enzimática. Alíquotas foram retiradas em intervalos apropriados, submetidas à reação de derivatização e os parâmetros de estereosseletividade determinados através de análises em cromatografia gasosa com coluna de fase estacionária quiral.

#### 3.3.3.1 Avaliação da influência do reagente doador de acila na resolução cinética enzimática

Primeiramente, investigou-se o papel do agente acilante empregado nas reações de transesterificação do álcool (**21**) selecionado. Para isso, três compostos doadores de acila, facilmente disponíveis e que não reagem espontaneamente com o álcool foram testados, sendo eles: acetato de vinila (**a**), acetato de isopropenila (**c**) e acetato de etila (**d**).

Os dados das reações de transesterificação do (*R,S*)-pentan-2-ol (**21**) na presença dos doadores de acila **a**, **c** e **d**, empregando hexano como solvente e temperatura de 35°C estão apresentados na Tabela 4.

Inicialmente, o acetato de vinila foi empregado como doador de acila, levando a obtenção do éster (*R*)-**21a** e do álcool (*S*)-**21** com excessos enantioméricos de 88% e 81%, respectivamente, e taxa de conversão de 49% em 24 horas, resultando em razão enantiomérica (*E*) igual a 39 (Tabela 4 - entrada 5), conforme descrito anteriormente.

Quando o acetato de isopropenila foi empregado como doador de acila, a reação de transesterificação apresentou menor taxa de conversão em 24 horas (*c* = 36%) quando comparada a reação empregando acetato de vinila (*c* = 49%). O produto (*R*)-**21a** foi obtido com pureza enantiomérica similar (*ee* = 87%), no entanto, o álcool

(*S*)-**21** remanescente foi obtido com menor excesso enantiomérico (ee = 43%) (Tabela 4 – entrada 10).

**Tabela 4.** RCE do (*R,S*)-pentan-2-ol (**21**) mediada por LipG9 na presença de diferentes reagentes doadores de acila

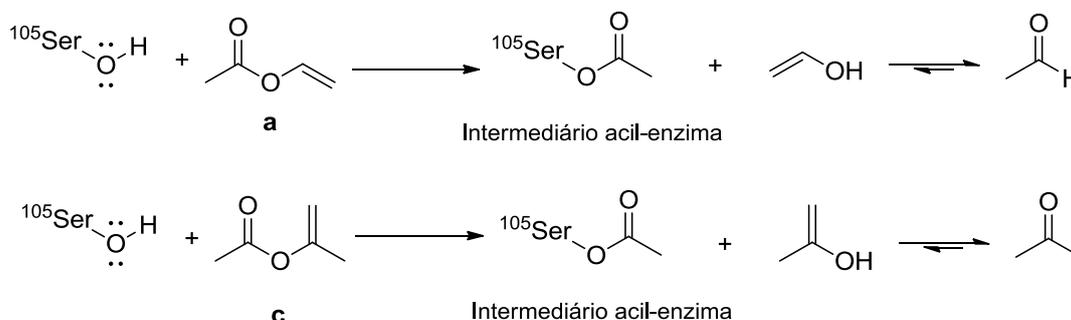
(*R,S*)-**21** +  $\text{R}_1\text{-CO-O-}$   $\xrightarrow[\text{Hexano, 35 }^\circ\text{C}]{\text{LipG9}}$  (*S*)-**21** + (*R*)-**21a, 21c e 21d**

Entrada	Agente acilante	t (h)	c (%) <sup>a</sup>	ee (%) <sup>b</sup>		E <sup>d</sup>
				álcool <sup>c</sup>	éster	
1		3	16	19	89	21
2		6	26	33	89	23
3	 a	9	34	41	86	20
4		12	38	53	85	21
5		24	49	81	88	39
6		3	<5	-	-	-
7		6	7	7	87	15
8	 c	9	13	11	85	15
9		12	16	15	87	17
10		24	36	43	87	22
11		3	-	-	-	-
12	 d	6	<5	-	-	-
13		9	<5	-	-	-
14		12	<5	-	-	-
15		24	8	5	44	3

Condições reacionais: Álcool (*R,S*)-**21** (0,1 mmol), enzima imobilizada (50 mg), agente acilante (0,4 mmol), hexano (2 mL), 35°C; <sup>a</sup>Conversão: determinada por comparação das áreas do cromatograma; <sup>b</sup>Excesso enantiomérico: (*R*)-(*S*)/(*R*)+(*S*)x100 [CG-quiral: coluna capilar Chirasil – Dex CB (25 m x 0,25 mm)]; Programação de temperatura: 40°C até 120°C com taxa de aquecimento de 2°C/min; fluxo 20 mL/min; <sup>c</sup>excesso enantiomérico do álcool: determinado indiretamente via derivatização do álcool ao propionato correspondente; <sup>d</sup>Razão enantiomérica:  $E = \ln \{ [e.e.\text{éster} (1 - e.e.\text{álcool})] / (e.e.\text{éster} + e.e.\text{álcool}) \} / \ln \{ [e.e.\text{éster} (1 + e.e.\text{álcool})] / (e.e.\text{éster} + e.e.\text{álcool}) \}$ ;

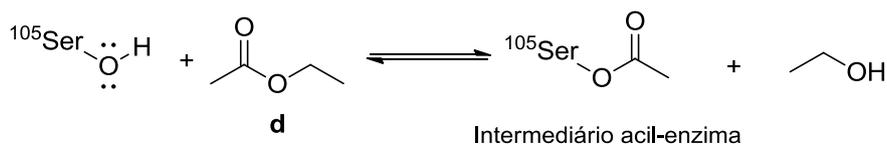
As taxas de conversão das reações de transesterificação empregando os ésteres **a** e **c** como doadores de acila podem estar relacionadas com a formação do intermediário acil-enzima e a liberação do subproduto na primeira etapa do ciclo catalítico, de acordo com o mecanismo da catálise enzimática (Figura 9, na introdução). Quando o acetato de vinila é utilizado como doador acila, o subproduto resultante da primeira etapa do ciclo catalítico é um álcool vinílico (enol), o qual tautomeriza ao composto carbonilado correspondente, o acetaldeído (PE = 20°C). Quando o acetato de isopropenila é utilizado, a tautomerização do subproduto (enol)

resulta na formação da propanona (PE = 56°C) (Esquema 11). Dessa forma, a maior taxa de conversão observada para a reação empregando acetato de vinila do que para a reação empregando acetato de isopropenila, pode ser justificada pela liberação do acetaldeído, um subproduto mais volátil do que a propanona, deslocando o equilíbrio para a formação do intermediário acil-enzima.



**Esquema 11.** Reagentes empregados como doadores de acila em RCE e o enol produzido como subproduto

Quando o acetato de etila foi utilizado como agente acilante, o subproduto resultante da primeira etapa do ciclo catalítico é o álcool etanol, como exemplificado no Esquema 12. Dessa forma, as menores taxas de conversão observadas para a reação de transesterificação do álcool (*R,S*)-**21** podem estar relacionadas com a liberação deste álcool, um subproduto com maior ponto de ebulição (PE = 78°C) quando comparado ao acetaldeído e a propanona, e, como consequência, mais dificilmente retirado do meio reacional. Outro fato a ser considerado, é a capacidade de álcoois com menor caráter hidrofóbico (mais polares) desnaturarem a enzima, o que pode ocasionar menores taxas de conversão.<sup>88</sup> Além do mais, o etanol liberado como subproduto também pode atuar como um nucleófilo atacando o intermediário acil-enzima e competindo com o álcool (*R,S*)-**21**, resultando em taxas de conversão menores para o produto esperado.



**Esquema 12:** Acetato de etila empregado como doador de acila na RCE e álcool produzido como subproduto

Uma vez que o éster (*R*)-**21a** e o álcool (*S*)-**21** foram obtidos com maior pureza enantiomérica empregando acetato de vinila como reagente doador acila, optou-se por utilizar este agente acilante nas etapas seguintes do trabalho.

### 3.3.3.2 Avaliação da influência da temperatura na resolução cinética enzimática

A fim de investigar a influência da temperatura nas reações de resolução cinética enzimática e na estabilidade da enzima LipG9, e, também, uma vez que é conhecido que o aumento da temperatura em 10°C pode duplicar a velocidade de uma reação,<sup>89</sup> optou-se por testar mais duas temperaturas com o decréscimo e o aumento de 10°C nas reações de RCE.

Os dados das reações de transesterificação do (*R,S*)-pentan-2-ol (**21**) em 25°C, 35°C e 45°C, empregando hexano como solvente e acetato de vinila como agente acilante estão apresentados na Tabela 5.

A taxa de conversão da reação de transesterificação do (*R,S*)-pentan-2-ol mediada pela LipG9 não foi afetada pela mudança da temperatura de 35°C para 25°C – Entradas 5 e 10). A reação enzimática a 25°C levou a obtenção do éster (*R*)-**21a** com 74% de excesso enantiomérico e do álcool (*S*)-**21** com 90% de ee. Apesar do álcool (*S*)-**21** ter sido obtido com maior pureza enantiomérica a 25°C do que a 35°C, o coeficiente de enantiosseletividade do processo foi menor quando comparado a reação a 35°C.

Para a reação de transesterificação do (*R,S*)-pentan-2-ol (**21**) a 45°C a taxa de conversão em 24 horas foi maior quando comparado as reações a 25°C e 35°C. O álcool (*S*)-**21** foi obtido com maior pureza enantiomérica (ee = 96%), no entanto, a reação a 45°C apresentou menor coeficiente de enantiosseletividade, uma vez que o éster (*R*)-**21a** foi obtido com 64% de excesso (entrada 15). No entanto, este menor valor de E pode ser justificado pela taxa de conversão maior que a ideal (50 %) em 24 horas. Dessa forma, o tempo ideal de reação está entre 12 e 24 horas.

Uma vez que álcool (*S*)-**21** foi obtido com maior pureza enantiomérica a 45°C, optou-se por realizar as reações enzimáticas nesta temperatura nas etapas subsequentes do trabalho.



Os dados da RCE do (*R,S*)-pentan-2-ol (**21**) em diferentes solventes estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** RCE do (*R,S*)-pentan-2-ol (**21**) mediada por LipG9 em diferentes solventes orgânicos

(*R,S*)-**21** + CC(=O)OC=C  $\xrightarrow[\text{Solvente, 45 } ^\circ\text{C}]{\text{LipG9}}$  (*S*)-**21** + (*R*)-**21a**

Entrada	Solvente	t (h)	c (%) <sup>a</sup>	ee (%) <sup>b</sup>		E <sup>d</sup>
				álcool <sup>c</sup>	Éster	
1	Hexano	3	17	12	86	15
2		6	30	34	86	18
3		9	36	26	82	13
4		12	38	39	80	13
5		24	58	96	64	17
6	Heptano	3	17	20	84	14
7		6	26	33	82	14
8		9	37	54	77	13
9		12	44	65	75	13
10		24	60	89	64	13
11	Tolueno	3	<5	-	-	-
12		6	15	19	70	7
13		9	26	30	76	10
14		12	35	52	71	10
15		24	50	63	62	8
16	MTBE	3	9	11	70	6
17		6	20	18	81	11
18		9	25	31	76	10
19		12	28	30	75	9
20		24	35	50	65	8
21	ACN	3	<5	-	-	-
22		6	<5	-	-	-
23		9	<5	-	-	-
24		12	<5	-	-	-
25		24	6	9	84	12

Condições reacionais: Álcool (*R,S*)-**21** (0,1 mmol), enzima imobilizada (50 mg), acetato de vinila (0,4 mmol), solvente (2 mL), 35°C; <sup>a</sup>Conversão: determinada por comparação das áreas do cromatograma; <sup>b</sup>Excesso enantiomérico: (*R*)-(*S*)/(*R*)+(*S*)x100 [CG-quiral: coluna capilar Chirasil – Dex CB (25 m x 0,25 mm); Programação de temperatura: 40°C até 120°C com taxa de aquecimento de 2°C/min; fluxo 20 mL/min]; <sup>c</sup>excesso enantiomérico do álcool: determinado indiretamente via derivatização do álcool ao propionato correspondente; <sup>d</sup>Razão enantiomérica:  $E = \ln \{ [e.e.\text{-éster} (1 - e.e.\text{-álcool})] / (e.e.\text{-éster} + e.e.\text{-álcool}) \} / \ln \{ [e.e.\text{-éster} (1 + e.e.\text{-álcool})] / (e.e.\text{-éster} + e.e.\text{-álcool}) \}$ ; MTBE = éter terc-butil metílico; ACN = acetonitrila.

A reação de transesterificação do (*R,S*)-pentan-2-ol (**21**) a 45°C mediada pela enzima LipG9 empregando hexano como solvente apresentou taxa de conversão de 58% em 24 horas, levando a obtenção do éster (*R*)-**21a** com 64% de excesso enantiomérico (ee) e do álcool (*S*)-**21** com 96%. Quando heptano foi empregado como solvente da reação enzimática, não foram observadas mudanças significativas nas taxas de conversão (c = 60%) quando comparado à reação em hexano, no entanto, o álcool (*S*)-**21** foi obtido com menor excesso enantiomérico (ee = 89% -Tabela 6 – Entrada 10).

A reação em tolueno levou a conversão ideal (c = 50%) em 24 horas, no entanto, os compostos (*R*)-**21a** e (*S*)-**21** foram obtidos com baixa pureza enantiomérica (Tabela 6 - Entrada 15). A reação em éter *terc*-butil-metílico (MTBE) ocorreu mais lentamente levando a 35% de conversão em 24 horas. Quando acetonitrila foi empregado como solvente, as taxas de conversão foram menores que 10% mesmo após 24 horas de reação.

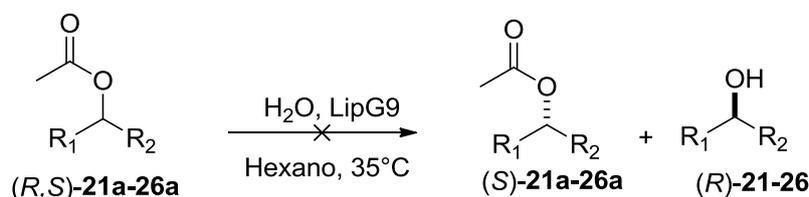
O valor de log P é, geralmente, utilizado para correlacionar a polaridade do solvente com a atividade e estabilidade enzimática em meios não aquosos.<sup>90</sup> É possível fazer uma correlação entre a atividade da enzima LipG9 e o aumento dos valores de log P do solvente. A explicação deste efeito é baseada na incapacidade de solventes hidrofóbicos retirarem a água associada à estrutura da enzima. Dessa forma, quando solventes com maiores valores de log P são utilizados, ou seja, mais hidrofóbicos, a enzima retém a hidratação necessária para permanecer cataliticamente ativa.<sup>91</sup> No entanto, em solventes hidrofílicos ocorre perda de água resultando na diminuição da atividade catalítica. Portanto, a maior atividade observada para a reação empregando heptano (log P = 4,0), hexano (log P = 3,5) e tolueno ((log P = 2,7) pode ser justificada pelos seus maiores valores de log P, ou seja, baixa polaridade desses solventes, o que leva a maior estabilidade enzimática quando comparada a solventes mais polares, como o éter *terc*-butil-metílico (MTBE, log P = 0,9) e acetonitrila (ACN, log P = -0,3), os quais tendem a retirar água necessária para a função enzimática, diminuindo assim a atividade catalítica.<sup>92</sup> Além do mais, é conhecido que solventes mais hidrofílicos podem apresentar maiores interações com os resíduos de aminoácidos da enzima, o que pode resultar na alteração do arranjo estrutural da proteína levando a perda ou diminuição da atividade catalítica.<sup>93</sup>

Após a investigação da influência do solvente orgânico na resolução cinética enzimática, concluiu-se que o melhor solvente para esta reação foi o hexano, pois levou a obtenção do álcool (*S*)-**21** com elevada pureza enantiomérica (ee = 96%). Portanto, as condições reacionais definidas como ideais para a acetilação enzimática mediada por LipG9 consistem no emprego de acetato de vinila como reagente doador

acila, temperatura de 45°C e hexano como solvente. No entanto, ainda faz-se necessário a otimização do tempo reacional para a obtenção do composto (S)-**21** enantiomericamente enriquecido com elevado rendimento.

### 3.3.4 Tentativa de resolução cinética enzimática via reação de hidrólise dos ésteres (R,S)-**21a-26a**

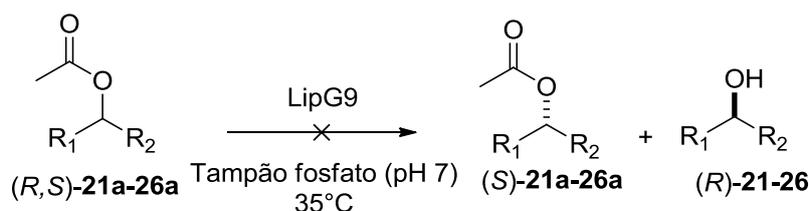
Considerando a variedade de reações que podem ser catalisadas por lipases (Figura 9 e Figura 10, na Introdução) neste trabalho os ésteres (R,S)-**21a-26a** sintetizados foram submetidos a resolução via reação de hidrólise mediada pela enzima LipG9, empregando, primeiramente, água como nucleófilo, hexano como solvente e temperatura de 35°C (Esquema 13).



**Esquema 13.** Tentativa de resolução dos ésteres via hidrólise mediada por LipG9 empregando água como nucleófilo

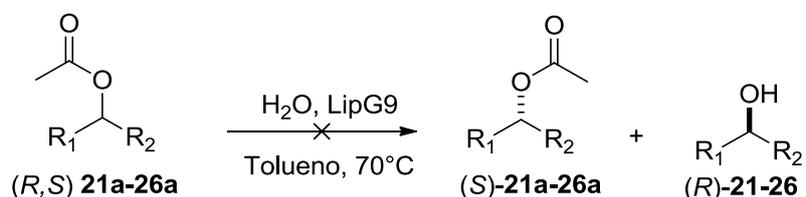
Alíquotas foram retiradas em intervalos apropriados e analisadas por cromatografia gasosa em coluna com fase estacionária quiral. No entanto, para as estas reações de hidrólise as conversões observadas foram menores do que 5% em 24 horas e por isso os parâmetros de estereosseletividade não foram calculados.

Diante do fracasso na primeira tentativa de hidrólise enzimática dos ésteres (R,S)-**21a-26a** outras condições reacionais foram avaliadas. Primeiro, empregou-se solução tampão de fosfato (pH = 7) como solvente a 35°C (Esquema 14). Alíquotas foram retiradas em intervalos apropriados, extraídas com diclorometano e analisadas. No entanto, nenhum produto da reação de hidrólise foi detectado.



**Esquema 14:** Tentativa de resolução dos ésteres via hidrólise mediada por LipG9 empregando tampão fosfato como solvente e nucleófilo

Devido à baixa solubilidade dos ésteres em água optou-se por empregar tolueno como solvente, água como nucleófilo e temperatura de 70°C.<sup>63</sup> (Esquema 15). No entanto, a reação de hidrólise dos ésteres (*R,S*)-**21a-26a** nestas condições também não ocorreu.



**Esquema 15.** Tentativa de resolução dos ésteres via hidrólise mediada por LipG9 empregando tolueno como solvente a 70°C

Apesar das reações de hidrólise não terem ocorrido é importante destacar que a enzima LipG9 apresentou quimiosseletividade frente a substratos alifáticos, uma vez que, nas condições reacionais empregadas, as reações de transesterificação ocorreram enquanto que as reações de hidrólise não. Também vale ressaltar que os parâmetros reacionais tais como razão molar éster/água, quantidade de enzima e tempo de reação não foram otimizados para as reações de hidrólise.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que a enzima LipG9 avaliada neste trabalho se mostrou promissora para possíveis aplicações biotecnológicas, pois, mesmo não possuindo qualquer modificação genética direta, quando aplicada em reações de resolução cinética altos valores de conversão e seletividade foram observados, alguns melhores do que os descritos na literatura para enzimas comerciais, com exceção a CAL-B, valendo a ressalva que esta enzima é modificada geneticamente, além de possuir um processo de imobilização já bastante otimizado.

A hidrólise dos ésteres alifáticos (*R,S*)-**21a-26a** não ocorreu, evidenciando que esses compostos não são bons substratos para estas reações. No entanto, diante dos resultados obtidos, a enzima LipG9 avaliada neste trabalho apresentou quimiosseletividade frente a compostos alifáticos, pois, nas condições experimentais testadas, as reações de transesterificação ocorreram enquanto que as de hidrólise não.

Com a investigação dos parâmetros reacionais, foi possível obter o álcool (*S*)-**21** com excesso enantiomérico de 96%, apesar de ainda ser necessária a otimização do tempo de reação, uma vez que a conversão para a reação de transesterificação do álcool (*R,S*)-**21** em 24 horas a 45°C foi acima da ideal, visando a obtenção deste composto com elevado rendimento.

Recentemente a enzima LipG9 foi avaliada em reações de resolução cinética de álcoois benzílicos por Costa<sup>65</sup> levando a obtenção dos álcoois e ésteres de interesse com elevada pureza óptica ( $ee > 99\%$ ) e alta enantiosseletividade ( $E > 200$ ), ficando evidente que esta lipase é mais eficiente para a resolução desta classe de compostos do que para os álcoois alifáticos testados neste trabalho.

## 5 PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1 SÍNTESE QUÍMICA E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS DE INTERESSE

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em um espectrômetro Bruker DPX200 operando em 200 MHz para o núcleo de hidrogênio e 50 MHz para o núcleo de carbono. Os deslocamentos químicos dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  foram expressos em relação ao tetrametilsilano ( $\delta_{\text{TMS}} = 0,00$  ppm) e de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram expressos em relação ao solvente ( $\delta_{\text{CDCl}_3} = 77,0$  ppm). As multiplicidades dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  foram relatadas como se segue: deslocamento químico em ppm ( $\delta$ ), multiplicidade (s = singlete, d = duplete, t = tripleto, q = quarteto, sext = sexteto, m = multiplete, sl = singlete largo), constante de acoplamento em hertz (Hz) e intensidade relativa (integral). Os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram relatados como se segue: deslocamento químico em ppm ( $\delta$ ).

Os espectros de infravermelho foram obtidos em um espectrômetro BOMEM modelo MB-100, em pastilha de KBr, na região de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas de vidro, utilizando-se sílica gel 60G (F 254) da Vetec<sup>®</sup>. As eluições foram feitas em solventes orgânicos puros ou combinados. As revelações das placas foram feitas por irradiação com lâmpada ultravioleta em 254/366nm e revelador de vanilina sulfúrica seguido de aquecimento lento.

As cromatografias em coluna foram realizadas em coluna de vidro, utilizando sílica *flash* 60\* (220-440 mesh) da Sigma-Aldrich<sup>®</sup>. O diâmetro interno e a altura das colunas variaram de acordo com a quantidade de material a ser purificado. As eluições foram feitas em solventes orgânicos combinados.

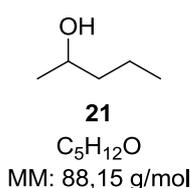
Para o acompanhamento das reações via cromatografia gasosa foi utilizado um cromatógrafo a gás Shimadzu GC-17A com coluna capilar quiral Chirasil-Dex CB, com dimensões 25 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro, e programação de temperatura de 40°C inicial por 1 minuto, rampa de aquecimento de 2°C/minuto até 120 °C e fluxo de nitrogênio de 1 mL/min.

Na síntese dos compostos foram utilizados os seguintes reagentes: pentan-2-ona (Merck<sup>®</sup>), 4-metil-pentan-2-ona (Synth<sup>®</sup>), hexan-2-ona (Aldrich<sup>®</sup>), hexan-3-ona (Merck<sup>®</sup>), heptan-2-ona (Aldrich<sup>®</sup>), octan-2-ona (Merck<sup>®</sup>), borohidreto de sódio (Acros Organic<sup>®</sup>), anidrido acético (Dinâmica<sup>®</sup>), piridina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), anidrido propiônico (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), 4-dimetilaminopiridina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), acetato de vinila (Sigma-

Aldrich®), acetato de isopropenila (Sigma-Aldrich®) e acetato de etila (J.T. Baker®). Os solventes utilizados nas sínteses dos compostos foram: diclorometano, hexano, heptano, éter *terc*-butil metílico, acetonitrila e tolueno. A purificação dos reagentes foi realizada de acordo com metodologias descritas na literatura.<sup>94</sup>

### 5.1.1 Síntese e caracterização dos álcoois alifáticos (*R,S*)-**21-26**

Em um balão de 50 mL adicionou-se a cetona de interesse (50 mmol) e metanol (50 mL). O balão foi colocado em banho de gelo, seguido da adição de borohidreto de sódio (51 mmol, 1,93 g) em porções. Então, o banho de gelo foi retirado e a reação mantida sob agitação magnética entre 2 e 6 horas. Após confirmar consumo total do material de partida por análise em cromatografia em camada delgada, o metanol foi removido, o resíduo restante diluído em água destilada (20 mL) e o pH do meio ajustado para 6 com solução de HCl. A fase aquosa foi extraída com diclorometano (3 x 20 mL), as fases orgânicas foram combinadas, lavadas com solução saturada de NaCl, secas com MgSO<sub>4</sub> anidro e filtradas. A purificação e a remoção do solvente ocorreram por destilação simples e o produto obtido caracterizado por RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C e IV (Anexos 1-6). Os produtos foram obtidos com rendimentos na faixa de 85-94%. Os dados espectroscópicos para os álcoois **21-26** sintetizados seguem abaixo:

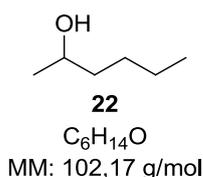


Pentan-2-ol ((*R,S*)-**21**), óleo translúcido, rendimento: 85%, PE: 119 °C.

RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS), δ (ppm): 0,91 - 1,11 (m, 3H), 1,28 (d, 6,2, 3H), 1,39 - 1,53 (m, 4H), 1,80 (sl, 1H), 3,73 - 3,80 (m, 1H).

RMN de <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 13,9; 18,8; 23,4; 41,5; 67,7;

IV (cm<sup>-1</sup>): 3341, 2959, 2922, 1467, 1363.

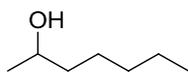


Hexan-2-ol ((*R,S*)-**22**), óleo translúcido, rendimento: 95%, PE: 138 °C.

RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS), δ (ppm): 0,84-0,99 (m, 3H), 1,18 (d, 6,2, 3H), 1,24 - 1,52 (m, 5H), 1,89 (sl, 1H), 3,79 (sext, 6,2, 1H).

RMN de <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 13,9, 22,6, 23,3, 27,9, 38,9, 68,0.

IV (cm<sup>-1</sup>): 3348, 2966, 2922, 2856, 1467, 1371, 1113.

**23**C<sub>7</sub>H<sub>16</sub>O

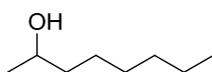
MM: 116,20 g/mol

Heptan-2-ol ((*R,S*)-**23**), óleo translúcido, rendimento: 91%, PE: 159 °C.

RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS), δ (ppm): 0,89 - 1,39 (m, 14H), 1,73 (sl, 1H), 3,78 (sext, 6,2, 1H).

RMN de <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 13,9; 22,6; 23,4; 25,4; 31,8, 39,3; 68,1.

IV (cm<sup>-1</sup>): 3328, 2966, 2922, 2856, 1467, 1371.

**24**C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>O

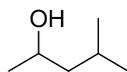
MM: 130,23 g/mol

Octan-2-ol ((*R,S*)-**24**), óleo translúcido, rendimento: 89%, PE: 174 °C.

RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS), δ (ppm): 0,89 (s, 3H), 1,20 (d, 6,2, 3H), 1,22 (sl, 1H), 1,23 – 1,49 (m, 10H), 3,78 (sext, 6,2, 1H).

RMN de <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 14,0; 22,6; 23,4; 25,7; 29,3; 31,8; 39,3; 68,1.

IV (cm<sup>-1</sup>): 3355, 2973, 2929, 2863, 1467, 1378, 1327.

**25**C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>O

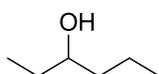
MM: 102,17 g/mol

4-Metil-pentan-2-ol ((*R,S*)-**25**), óleo translúcido, rendimento: 94%, PE: 132 °C.

RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS), δ (ppm): 0,92 (d, 6,6, 6H), 1,20 (d, 3,2, 3H), 1,33 – 1,51 (m, 1H), 1,57 (sl, 1H), 1,63 – 1,86 (m, 1H), 3,79 – 3,98 (m, 1H).

RMN de <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 22,3; 23,1; 23,9; 24,8; 48,6; 66,1.

IV (cm<sup>-1</sup>): 3319, 2959, 2871, 1467, 1392, 1327.

**26**C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>O

MM: 102,17 g/mol

Hexan-3-ol ((*R,S*)-**26**), óleo translúcido, rendimento: 92%, PE: 135 °C.

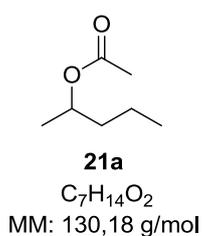
RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS), δ (ppm): 0,92 (t, 7,2, 3H), 0,93 (t, 6,9, 3H), 1,31 – 1,56 (m, 6H), 1,74 (sl, 1H), 3,44 – 3,61 (m, 1H).

RMN de <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 9,8; 14,1; 18,8; 30,1; 39,1; 73,0.

IV (cm<sup>-1</sup>): 3348, 2966, 2944, 2871, 1459, 1319.

5.1.2 Síntese e caracterização dos ésteres (*R,S*)-**21a-26a**

Em um balão de 50 mL adicionou-se o álcool de interesse (25 mmol), anidrido acético (4,73 mL, 50 mmol) e piridina (5 mL). A reação foi mantida sob agitação magnética a 35 °C durante 24 horas. Após confirmar o consumo do material de partida por cromatografia em camada delgada, adicionou-se acetato de etila (25 mL) e lavou-se a fase orgânica com solução saturada de CuSO<sub>4</sub> (4 x 25 mL). Em seguida, a fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (20 mL), solução saturada de NaCl (20 mL), seca com MgSO<sub>4</sub> anidro, filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida. Os produtos obtidos foram purificados por cromatografia *flash* utilizando como fase móvel hexano/acetato de etila em proporção adequada e caracterizados por RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C e IV (Anexos 7-12). Os dados espectroscópicos para os ésteres (*R,S*)-**21a-26a** sintetizados seguem abaixo:

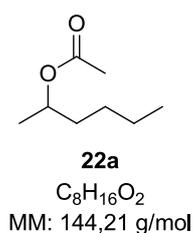


Acetato de 2-pentila ((*R,S*)-**21a**), óleo amarelo claro, rendimento: 58%, PE: 134 °C.

RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS), δ (ppm): 0,92 (t, 7,1, 3H), 1,21 (d, 6,2, 3H), 1,25 - 1,68 (m, 10H), 2,04 (s, 3H), 4,83 - 4,99 (m, 1H).

RMN de <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 13,8; 18,5; 19,8; 21,2; 30,0; 70,7; 170,7.

IV (cm<sup>-1</sup>): 2959, 1738, 1467, 1378, 1238.

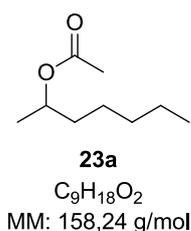


Acetato de 2-hexila ((*R,S*)-**22a**), óleo amarelo claro, rendimento: 64%, PE: 154 °C.

RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS), δ (ppm): 0,86 - 0,93 (m, 3H), 1,20 (d, 6,2, 3H), 1,25 - 1,33 (m, 4H), 1,42 - 1,63 (m, 2H), 2,03 (s, 3H), 4,89 (sext, 6,2, 1H).

RMN de <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 13,9, 19,8, 21,2, 22,4, 27,5, 35,6, 71,0, 170,7.

IV (cm<sup>-1</sup>): 2956, 1738, 1378, 1245, 1018.

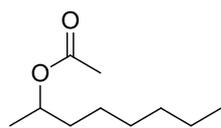


Acetato de 2-heptila ((*R,S*)-**23a**), óleo amarelo escuro, rendimento: 78%, PE: 172 °C.

RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS), δ (ppm): 0,88 (t, 6,2, 3H), 1,20 (d, 6,2, 3H), 1,20 - 1,60 (m, 8H), 2,02 (s, 3H), 4,81 - 4,97 (m, 1H).

RMN de <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 13,9; 19,8; 21,3; 22,5; 25,0; 31,6; 35,8; 70,9; 170,6.

IV (cm<sup>-1</sup>): 2930, 1738, 1459, 1378, 1246, 1121.



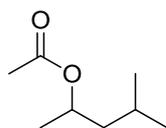
**24a**  
 $C_{10}H_{20}O_2$   
 MM: 172,26 g/mol

Acetato de 2-octila ((*R,S*)-**24a**), óleo amarelo escuro, rendimento: 83%, PE: 195 °C.

RMN de  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ , TMS),  $\delta$  (ppm): 0,89 (t, 6,4, 3H), 1,21 (d, 6,2, 3H), 1,25 – 1,68 (m, 10H), 2,04 (s, 3H), 4,82 – 4,98 (m, 1H).

RMN de  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm): 13,9; 19,8; 21,2; 22,5; 25,3; 29,0; 31,6; 71,0; 170,6.

IV ( $cm^{-1}$ ): 2929, 1738, 1467, 1371, 1238.



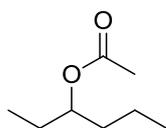
**25a**  
 $C_8H_{16}O_2$   
 MM: 144,21 g/mol

Acetato de 4-metil-2-pentila ((*R,S*)-**25a**), óleo amarelo claro, rendimento: 81%, PE: 147 °C.

RMN de  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ , TMS),  $\delta$  (ppm): 0,88 - 0,91 (m, 6H), 1,19 (d, 6,2, 3H), 1,46 - 1,72 (m, 3H), 2,01 (s, 3H), 4,88 - 5,10 (m, 1H).

RMN de  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm): 20,3; 21,2; 22,2; 22,7; 24,6; 45,0; 69,3; 170,6.

IV ( $cm^{-1}$ ): 2958, 1739, 1454, 1370, 1232.



**26a**  
 $C_8H_{16}O_2$   
 MM: 144,21 g/mol

Acetato de 3-hexila ((*R,S*)-**26a**), óleo amarelo claro, rendimento: 64%, PE: 150 °C.

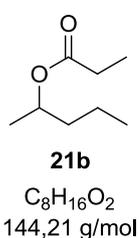
RMN de  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ , TMS),  $\delta$  (ppm): 0,85 – 0,97 (m, 7H), 1,26 – 1,64 (m, 5H), 2,06 (s, 3H), 4,78 – 4,90 (m, 1H).

RMN de  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm): 9,5; 13,9; 18,5; 21,1; 26,9; 35,7; 75,2; 170,9.

IV ( $cm^{-1}$ ): 2966, 1738, 1238, 907, 738.

5.1.3 Síntese e caracterização dos propionatos (*R,S*)-**21b-26b**

Em um balão de 5 mL adicionou-se o álcool de interesse (1 mmol), anidrido propiônico (0,25 mL, 2 mmol), DMAP (um cristal) e diclorometano (2 mL). A reação foi mantida sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 1 hora. Em seguida, ajustou-se o pH do meio para 9 com solução aquosa de NaHCO<sub>3</sub>, a fase orgânica foi separada e o resíduo bruto purificado por filtração em sílica *flash* utilizando diclorometano como eluente. O solvente foi removido sob fluxo de nitrogênio e os produtos obtidos caracterizados por RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C e IV (Anexos 13-18). Os dados espectroscópicos para os ésteres **21b-26b** sintetizados seguem abaixo:

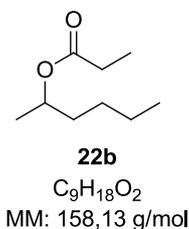


Propionato de 2-pentila ((*R,S*)-**21b**), óleo incolor, rendimento: 76%.

RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS), δ (ppm): 0,91 (t, 6,6, 3H), 1,13 (t, 7,5, 3H), 1,20 (d, 6,2, 3H), 1,25 - 1,68 (m, 4H), 2,29 (q, 7,5, 2H), 4,92 (sext, 6,2, 1H).

RMN de <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 9,2; 13,8; 18,6; 19,9; 27,9; 38,1; 70,5, 174,1.

IV (cm<sup>-1</sup>): 1194, 1459, 1731, 2871, 2966.

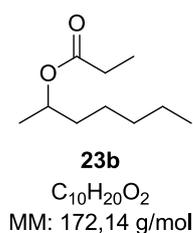


Propionato de 2-hexila ((*R,S*)-**22b**), óleo incolor, rendimento: 81%.

RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS), δ (ppm): 0,89 (t, 6,6, 3H), 1,13 (t, 7,5, 3H), 1,19 (d, 6,2, 3H), 1,23 - 1,66 (m, 7H), 2,29 (q, 7,5, 2H), 4,90 (sext, 6,2, 1H).

RMN de <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 9,2; 13,9; 19,9; 22,5; 27,5; 27,9; 35,6; 70,7; 174,1.

IV (cm<sup>-1</sup>): 1194, 1467, 1731, 2856, 2929, 2966.

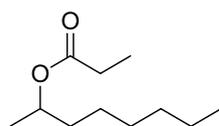


Propionato de 2-heptila ((*R,S*)-**23b**), óleo amarelado, rendimento: 78%.

RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS), δ (ppm): 0,89 (t, 6,3, 3H), 1,14 (t, 7,5, 3H), 1,21 (d, 6,2, 3H), 1,24 - 1,73 (m, 8H), 2,30 (q, 7,5, 2H), 4,91 (sext, 6,2, 1H).

RMN de <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 9,1; 13,9; 19,9; 22,5; 24,9; 27,9; 31,6; 35,8; 70,8; 174,1.

IV (cm<sup>-1</sup>): 1121, 1194, 1459, 1731, 2853, 2930.

**24b**

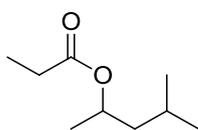
$C_{11}H_{22}O_2$   
MM: 186,29 g/mol

Propionato de 2-octila ((*R,S*)-**24b**), óleo incolor, rendimento: 87%.

RMN de  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ , TMS),  $\delta$  (ppm): 0,89 (t, 6,3, 3H), 1,14 (t, 7,5, 2H), 1,21 (d, 6,2, 3H), 1,24 – 1,70 (m, 10H), 2,30 (q, 7,5, 2H) 4,91 (sext, 6,2, 1H).

RMN de  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm): 9,1; 13,9; 19,9; 22,5; 25,3; 27,9; 29,0; 31,7; 35,9; 70,7, 174,1.

IV ( $cm^{-1}$ ): 1187, 1459, 1731, 2856, 2936.

**25b**

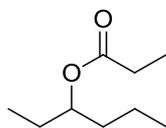
$C_9H_{18}O_2$   
MM: 158,13 g/mol

Propionato de 4-metil-2-pentila ((*R,S*)-**25b**), óleo incolor, rendimento: 82%.

RMN de  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ , TMS),  $\delta$  (ppm): 0,89 (d, 4,5, 6H), 1,13 (t, 7,5, 3H), 1,19 (d, 6,2, 3H), 1,25-1,57 (m, 3H), 2,29 (q, 7,5, 2H), 5,00 (sext, 6,2, 1H).

RMN de  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm): 9,1; 20,4; 22,3; 22,8; 24,7; 45,1; 69,1; 174,0.

IV ( $cm^{-1}$ ): 1194, 1467, 1731, 2863, 2951.

**26b**

$C_9H_{18}O_2$   
MM: 158,13 g/mol

Propionato de 3-hexila ((*R,S*)-**26b**), óleo incolor, rendimento: 73%.

RMN de  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ , TMS),  $\delta$  (ppm): 0,87 (t, 7,6, 3H), 0,90 (t, 7,3, 3H), 1,14 (t, 7,6, 3H), 1,32 – 1,67 (m, 6H), 2,31 (q, 7,6, 2H), 4,83 (quint, 6,2, 1H).

RMN de  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm): 9,2; 9,4; 13,8; 18,5; 26,9; 27,8; 35,7; 74,9; 174,2.

IV ( $cm^{-1}$ ): 1194, 1459, 1731, 2871, 2966.

## 5.2 REAÇÕES DE RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA

### 5.2.1 Enzimas avaliadas como biocatalisadores

A lipase não comercial avaliada neste trabalho, a LipG9, foi isolada e identificada no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise da Universidade Federal do Paraná (LTEB-UFPR) e cedida gentilmente pela professora Nadia Krieger. A lipase LipG9 foi obtida de uma biblioteca metagenômica construída a partir de uma amostra de solo contaminado com gordura animal e imobilizada em suporte hidrofóbico Acurrel-MP1000<sup>®</sup>.<sup>66</sup>

A lipase comercial utilizada neste trabalho foi a Novozyme 435<sup>®</sup>, que é a lipase de *Candida antarctica* fração B (CAL-B) produzida por fermentação submersa de um microrganismo geneticamente modificado de *Aspergillus* e adsorvida sobre resina macroporosa.

### 5.2.2 Reações de transesterificação dos álcoois (*R,S*)-**21-26** mediada por lipases

Em um vial de 4 mL adicionou-se o álcool de interesse (0,1 mmol), doador acila (0,4 mmol), enzima imobilizada (50 mg) e solvente (2 mL). A reação foi mantida sob agitação magnética e temperatura controlada (25°C, 35°C e 45°C). Alíquotas foram retiradas em intervalos apropriados, submetidas à reação de derivatização e analisadas em cromatógrafo em fase gasosa com coluna de fase estacionária quiral. A programação de temperatura utilizada para todas as reações foi 40°C inicial por 1 minuto até 120°C com taxa de aquecimento de 2°C/min.

### 5.2.3 Reações de hidrólise dos ésteres (*R,S*)-**21a-26a** mediada por lipase

Em um vial de 4 mL adicionou-se o acetato de interesse (0,1 mmol), água destilada (7 mg, 0,4 mmol), enzima imobilizada (50 mg) e solvente (2 mL). A reação foi mantida sob agitação magnética a temperatura controlada (35°C e 70°C). Alíquotas foram retiradas em intervalos apropriados, submetidas à reação de derivatização e analisadas em cromatógrafo em fase gasosa com coluna de fase estacionária quiral. A programação de temperatura utilizada para todas as reações foi 40°C inicial por 1 minuto até 120°C com taxa de aquecimento de 2°C/min.

#### 5.2.4 Determinação das taxas de conversão e da pureza enantiomérica

As taxas de conversão das reações de resolução cinética enzimática foram determinadas pela diferença das áreas dos picos observados nos cromatogramas para substrato e produto.

A pureza enantiomérica dos compostos envolvidos e resultantes das reações de resolução cinética foi expressa em valores de excesso enantiomérico (*ee*) e determinada pela diferença das áreas dos picos referentes a cada enantiômero observados nos cromatogramas, onde *R* corresponde à área relativa ao enantiômero (*R*) e *S* ao enantiômero (*S*), para *R*>*S* (Equação 1). Os valores de razão enantiomérica (*E*) foram determinados a partir da Equação 2.<sup>95</sup>

$$ee = \frac{(R - S)}{(R + S)} \times 100$$

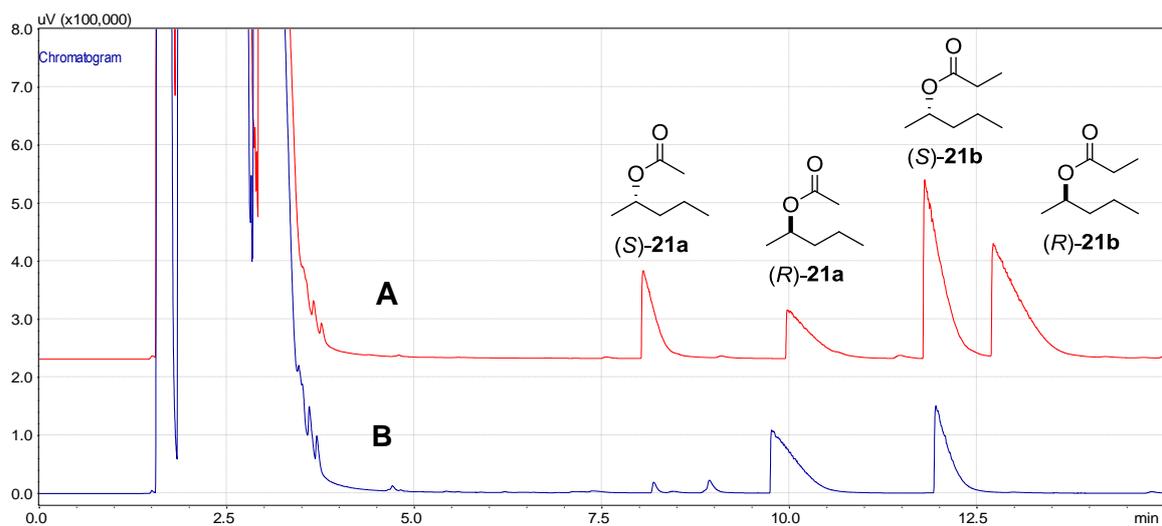
**Equação 1**

$$E = \frac{\ln\{[ee_p (1 - ees)] \div (ee_p + ees)\}}{\ln[ee_p (1 + ees) \div (ee_p + ees)]}$$

**Equação 2**

#### 5.2.5 Determinação da configuração absoluta

As configurações absolutas dos compostos envolvidos e resultantes das reações de resolução cinética enzimática foram determinadas por comparação com as configurações absolutas encontradas na literatura para a CAL-B, uma vez que a enantiosseletividade destas lipases são bem descritas na literatura.<sup>96,97,98,99,100</sup> Para isso, um álcool da série foi selecionado e submetido a RCE mediada por CAL-B, uma alíquota retirada, submetida a reação de derivatização e analisada em cromatógrafo à gás. Com o cromatograma da RCE do (*R,S*)-pentan-2-ol (**1**) mediada por CAL-B em mãos (**B**), comparou-se os tempos de retenção obtidos para esta reação com os tempos de retenção do cromatograma padrão (**A**) (Figura 24) e, dessa forma, as configurações absolutas dos enantiômeros determinadas.



**Figura 24:** Comparação dos cromatogramas do acetato de 2-pentila (*R,S*)-21a e do propionato de 2-pentila (*R,S*)-21b (A) e da RCE mediada por CAL-B (B) para determinação da configuração absoluta dos enantiômeros

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- <sup>1</sup> Clayden, J.; Geeves, N.; Warren, S.; **Organic Chemistry**, 1 ed., Oxford University Press: New York, 2000.
- <sup>2</sup> Carey, F.; Sundberg, R. **Advanced Organic Chemistry: Structure and Mechanisms**, 2 ed., Plenum Press: New York, 1984.
- <sup>3</sup> March, J.; Smith, M. B.; **Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure**, 6 ed., John Wiley & Sons: New Jersey, 2007.
- <sup>4</sup> Sheldon, R. A.; **Chirotechnology: Industrial Synthesis of Optically Active Compounds**, 1 ed., Marcel Dekker: New York, 1993.
- <sup>5</sup> Lin, G-Q.; Li, Y-M.; Chan, A. S.C.; **Principles and Applications of Asymmetric Synthesis**, John Wiley & Sons: New Jersey, 2001.
- <sup>6</sup> Schore, N. E.; Vollhardt, K. P.; **Organic Chemistry: Structure and Function**, 4 ed., W. H. Freeman and Company: New York, 2003.
- <sup>7</sup> Mine, T.; Mineta, H.; Yui, T.; Johno, M.; Process for the production of a optically active alcohol and a novel optically active alcohol. **United States Patent**, 103,517, 2000.
- <sup>8</sup> Noyori, R. Asymmetric Catalysis: Science and Opportunities. **Advanced Synthesis and Catalysis**, 345, 15-32, 2003.
- <sup>9</sup> Solomons, T. W. G.; Fryhle, C. B.; **Organic Chemistry**, 10 ed., John Wiley & Sons: New Jersey, 2011.
- <sup>10</sup> Sontakke, J. B.; Yadav, G. D.; Optimization and kinetic modeling of lipase mediated enantioselective kinetic resolution of ( $\pm$ )-2-octanol. **Natural Science**, 5, 1025-1033, 2013.
- <sup>11</sup> Takken, W.; Chemical signals affecting mosquito behaviour. **Invertebrate Reproduction and Development**, 36, 67, 1999.

---

<sup>12</sup> Ichikawa, A.; Ono, H.; Preparation of single-enantiomer 2-methyl-4-heptanol, a pheromone of *Metamasius hemipterus*, using (S)-2-methoxy-2-(1-naphthyl)propionic acid. **Journal of Chromatography A**, 1117, 38–46, 2006.

<sup>13</sup> Liese, A.; Zelinski, T.; Kula, M. R.; Kierkels, H.; Karutz, M.; Kragl, U.; Wandrey, C.; A novel reactor concept for the enzymatic reduction of poorly soluble ketones. **Journal of Molecular Catalysis: B Enzymatic**, 4, 91–99, 1998.

<sup>14</sup> Parra, M.; Vergara, J.; Hidalgo, P.; Barbera, J.; Sierra, T.; (S)-Isoleucine and (R)-2-octanol as chiral precursors of new chiral liquid crystalline thiadiazoles: synthesis, mesomorphic and ferroelectric properties. **Liquid Crystals**, 33, 739–745, 2006.

<sup>15</sup> Temba, E. S. C.; de Oliveira, I. M. F.; Donnici, C. L.; Álcoois quirais: métodos químicos e catalíticos de obtenção por redução assimétrica. **Química Nova**, 26, 112-122, 2003.

<sup>16</sup> Ghanem, A.; **Enantiomer Separation: Fundamentals and Practical Methods**. Kluwer Academic: 2005.

<sup>17</sup> Ghanem, A.; Ahmed, M.; Kelly, T.; Applications of enzymatic and non-enzymatic methods to access enantiomerically pure compounds using kinetic resolution and racemisation. **Tetrahedron**, 68, 6781-6802, 2012.

<sup>18</sup> Wu, X.; Li, X.; Hems, W.; King, F.; Xiao, J.; Accelerated asymmetric transfer hydrogenation of aromatic ketones in water. **Organic & Biomolecular Chemistry**, 2, 1818 - 1821, 2004.

<sup>19</sup> Matsuda, T.; Nakajima, Y.; Harada, T.; Nakamura, K.; Asymmetric reduction of simple aliphatic ketones with dried cells of *Geotrichum candidum*. **Tetrahedron: Asymmetry**, 13, 971–974, 2002.

<sup>20</sup> Kita, Y.; Takebe, Y.; Murata, K.; Naka, T.; Akai, S.; Convenient Enzymatic Resolution of Alcohols Using Highly Reactive, Nonharmful Acyl Donors, 1-Ethoxyvinyl Esters, **Journal of Organic Chemistry**, 65, 83–88, 2000.

- 
- <sup>21</sup> Ema, T.; Jittani, M.; Sakai, T.; Utaka, M.; Lipase-Catalyzed Kinetic Resolution of Large Secondary Alcohols Having Tetraphenylporphyrin. **Tetrahedron Letters**, 39, 6311–6314, 1998.
- <sup>22</sup> Huerta, F. F.; Minidis, A. B. E.; Bäckvall, J. E.; Racemization in asymmetric synthesis. Dynamic kinetic resolution and related processes in enzyme and metal catalysis. **Chemical Society Reviews**, 30, 321-331, 2001.
- <sup>23</sup> Breuer, M.; Ditrich, K.; Habicher, T.; Hauer, B.; Kebeler, M.; Sturmer, R.; Zelinski, T.; Industrial methods for the production of optically active intermediates. **Angewandte Chemie International Edition**, 43, 788-824, 2004.
- <sup>24</sup> a) Pellissier, H.; Organocatalyzed Dynamic Kinetic Resolution. **Advanced Synthesis & Catalysis**, 353, 659-676, 2011. b) Pellissier, H.; Recent developments in dynamic kinetic resolution, **Tetrahedron**, 67, 3769-3802, 2011.
- <sup>25</sup> Im, J-S.; Ahn, S-H.; Park, Y-H.; Reaction characteristics of the dynamic kinetic resolution of 1-phenylethanol over Ru complexes immobilized on PTA-modified  $\gamma$ -alumina and Novozym 435<sup>®</sup>. **Chemical Engineering Journal**, 234, 49–56, 2013.
- <sup>26</sup> IUPAC, Compendium of Chemical Terminology. **Goldbook**. Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org/D01679.html>> Acesso em: 30/06/2014
- <sup>27</sup> Faber, K. **Biotransformations in organic chemistry**, 6. ed, Springer: Berlin, 2011.
- <sup>28</sup> Pellissier, H. Recent developments in dynamic kinetic resolution. **Tetrahedron**, 67, 3769-3802, 2011.
- <sup>29</sup> Biochemical Nomenclature Committees. **Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)**. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/nomenclature/>> Acesso em: 13/12/2014
- <sup>30</sup> Loughlin, W. A.; Biotransformations in organic synthesis. **Bioresource Technology**, 74, 49-62, 2000.

---

<sup>31</sup> Boland, W.; Frobl, C.; Lorenz, M.; Esterolytic and lipolytic enzymes in organic synthesis. **Synthesis**, 12, 1049-1072, 1991.

<sup>32</sup> Csajagi, C.; Szatzker, G.; Rita Toke, E.; Uerge, L.; Darvas, F.; Poppe, L.; Enantiomer selective acylation of racemic alcohols by lipases in continuous-flow bioreactors. **Tetrahedron: Asymmetry** 19, 237-246, 2008.

<sup>33</sup> Zheng, J-Y.; Wang, S-F.; Zhang, Y-J.; Ying, X-X.; Wang, Y-G.; Wang, Z.; Chemoenzymatic synthesis of D-biotin intermediate lactone via lipase-catalyzed desymmetrization of meso diols. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 98, 37-41, 2013.

<sup>34</sup> Aurell, C-J.; Karlsson, S.; Ponten, F.; Andersen, S. M.; Lipase catalyzed regioselective lactamization as a key step in the synthesis of N-boc (2*R*)-1,4-oxazepane-2-carboxylic acid. **Organic Process Research & Development**, 18, 1116-1119, 2014.

<sup>35</sup> Spelberg, J. H. L.; Van Hylckama Vlieg, J. E. T.; Bosma, T.; Kellogg, R. M.; Janssen, D. B.; A tandem enzyme reaction to produce optically active halohydrins, epoxides and diols. **Tetrahedron: Asymmetry**, 10, 2863-2870, 1999.

<sup>36</sup> Kotika, M.; Václav, S.; Grulich, M.; Kyslíka, P.; Archelasc, A.; Access to enantiopure aromatic epoxides and diols using epoxide hydrolases derived from total biofilter DNA. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 65, 41-48, 2010.

<sup>37</sup> Brenna, E.; Gatti, F. G.; Manfredi, A.; Monti, D.; Parmeggiani, F.; Enoate reductase-mediated preparation of methyl (*S*)-2-bromobutanoate, a useful key intermediate for the synthesis of chiral active pharmaceutical ingredients. **Organic Process Research & Development**, 16, 262–268, 2012.

<sup>38</sup> Phillips, R.S.; May, S.W.; Enzymic sulfur oxidation reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, 3, 9-18, 1981.

<sup>39</sup> Wang, H.; Zhi, W.; Hong, Z.; Ge, C.; Hong, Y.; Lei, W.; Enzyme catalytic promiscuity: asymmetric aldol addition reaction catalyzed by a novel thermophilic esterase in organic solvent. **Green Chemistry Letters and Reviews**, 7, 145-149, 2014.

- 
- <sup>40</sup> Oikawa, H.; Kobayashi, T.; Katayama, K.; Suzuki, Y.; Ichihara, A.; Total synthesis of (-)-solanapyrone A via enzymatic Diels-Alder reaction of prosolanapyrone. **Journal of the Chemical Society**, 63, 8748-8756, 1998.
- <sup>41</sup> Wimmer, Z.; Zarevúcka, M.; A Review on the Effects of Supercritical Carbon Dioxide on Enzyme Activity. **Internacional Journal of Molecular Science**, 11, 233-253, 2010.
- <sup>42</sup> Kim, K. -W.; Song, B.; Choi, M. -Y.; Kim, M. -J.; Biocatalysis in ionic liquids: markedly enhanced enantioselectivity of lipase. **Organic Letters**, 3, 1507-1509, 2001.
- <sup>43</sup> Doukyu, N.; Ogino, H.; Organic solvent-tolerant enzymes. **Biochemical Engineering Journal**, 48, 270–282, 2010.
- <sup>44</sup> Kamal, A.; Azhar, A. M; Krishnaji, T.; Malik, M. S.; Azeza, S.; Approaches based on enzyme mediated kinetic to dynamic kinetic resolutions: A versatile route for chiral intermediates. **Coordination Chemistry Reviews**, 252, 569–592, 2008.
- <sup>45</sup> Jaeger, K. E.; Reetz, M. T.; Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Tibtech**, 16, 396-403, 1998.
- <sup>46</sup> Jaeger, K.E.; Dijkstra, B.W.; Reetz, M.T.; Bacterial Biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, 53, 315–351, 1999.
- <sup>47</sup> Uppenberg, J.; Ohrner, N.; Norin, M.; Hult, K.; Kleywegt, G. J.; Patkar, S.; Waagen, V.; Anthonsen, T.; Jones, T.A.; Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. **Biochemistry**, 34, 16838-16851, 1995.
- <sup>48</sup> Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B.W.; Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, 15, 29-63, 1994.
- <sup>49</sup> Protein Data Bank. <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1LBS>  
<Acesso em: 28/11/14>

- 
- <sup>50</sup> Sikora, A.; Siódmiak, T.; Marszall, M. P.; Kinetic resolution of profens by enantioselective esterification catalyzed by *Candida antarctica* and *Candida rugosa* lipases. **Chirality**, 26, 663-669, 2014.
- <sup>51</sup> Gilbert, H.; **Basic Concepts in Biochemistry: A Student's Survival Guide**, 2 ed., McGraw-Hill Medical: Texas, 1999.
- <sup>52</sup> Sandström, A. G.; Directed evolution of *Candida Antarctica* lipase A using an episomally replicating yeast plasmid. **Protein Engineering, Design & Selection**, 22, 413-420, 2009.
- <sup>53</sup> Schrag, J. D.; Li, Y.; Wu, S.; Cygler, M.; Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. **Nature**, 351, 761-764, 1991.
- <sup>54</sup> Jaeger, K. E.; Dijkstra, B. W.; Reetz, M. T.; Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. **Annual Reviews Microbiology**, 53, 315-351, 1999.
- <sup>55</sup> Silva, T. B.; Resolução cinética enzimática de álcoois e aminas quirais contendo boro e biorredução de cetonas contendo boro. **Tese de Doutorado em Química**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- <sup>56</sup> Böttcher, D.; Bornscheuer, U.T.; Protein engineering of microbial enzymes. **Current Opinion in Microbiology**, 13, 274–282, 2010.
- <sup>57</sup> Handelsman, J.; Rondon, M. R.; Brady, S. F.; Clardy, J.; Goodman, R. M.; Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, 5, 245-249, 1998.
- <sup>58</sup> Wahab, R. A.; Basri, M.; Rahman, M. B. A; Salleh, A.; Leow, T. C.; Combination of Oxyanion Gln114 Mutation and Medium Engineering to Influence the Enantioselectivity of Thermophilic Lipase from *Geobacillus zalihae*. **International Journal of Molecular Sciences**, 13, 11666-11680, 2012.

---

<sup>59</sup> Coelho, P.S.; Wang, Z. J.; Ener, M. E.; Baril, S. A.; Kannan, A.; Arnold, F. H.; Brustad, E. M.; A Serine-Substituted P450 Catalyzes Highly Efficient Carbene Transfer to Olefins in vivo. **Nature Chemical Biology**, 9, 485-487, 2013.

<sup>60</sup> Bastian, S.; Li, X.; Meyerowitz, J. T.; Snow, C. D.; Chen, M. M. Y.; Arnold, F. H.; Engineered ketol-acid reductoisomerase and alcohol dehydrogenase enable anaerobic 2-methylpropan-1-ol production at theoretical yield in *Escherichia coli*. **Metabolic Engineering**, 13, 345-352, 2011.

<sup>61</sup> Handelsman, J.; Rondon, M.R.; Brady, S.F.; Clardy, J.; Goodman, R.M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, 5, 245-249, 1998.

<sup>62</sup> Piel, J.; Approaches to capturing and designing biologically active small molecules produced by uncultured microbes. **Annual Review of Microbiology**, 65, 431–53, 2011.

<sup>63</sup> Chow, J.; Kovacic, F.; Antonia, Y. D.; Krauss, U.; Fersini, F.; Schmeisser, C.; Lauinger, B.; Bongen, P.; Pietruszka, J.; Schmidt, M.; Menyes, I.; Bornscheuer, U. T.; Eckstein, M.; Thum, O.; Liese, A.; Mueller-Dieckmann, J.; Jaeger, K-E.; Streit, W. R.; The Metagenome-Derived Enzymes LipS and LipT Increase the Diversity of Known Lipases. **PLoS ONE**, 7, 47665, 2012. <doi:10.1371/journal.pone.0047665>

<sup>64</sup> Oh, K-H.; Nguyen, G-S.; Kim, E-Y.; Kourist, R.; Bornscheuer, U.; Oh, T-K.; Yoon, J-W.; Characterization of a novel esterase isolated from intertidal flat metagenome and its tertiary alcohols synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 80, 67–73, 2012.

<sup>65</sup> Costa, A. C. S.; Aplicação de lipases de metagenômica em reações de resolução cinética de álcoois secundários quirais. **Dissertação de Mestrado em Química**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

<sup>66</sup> Glogauer, A.; Isolamento de clones com atividade lipolítica do metagenoma de solo contaminado com gordura animal e caracterização de uma nova e eficiente lipase. **Tese de doutorado em Bioquímica**, Universidade Federal do Paraná, 2011.

---

<sup>67</sup> Glogauer, A.; Martini, V. P.; Faoro, H.; Couto, G. H.; Müller-santos, M.; Monteiro, R. A.; Mitchell, D. A.; Souza, E. M.; Pedrosa, F. O.; Krieger, N.; Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. **Microbial Cell Factories**, 10, 54, 2011.

<sup>68</sup> Couto, G. H.; Glogauer, A.; Faoro, H.; Chubatsu, L. S.; Souza, E. M.; Pedrosa, F. O.; Isolation of a novel lipase from a metagenomic library derived from mangrove sediment from the south Brazilian coast. **Genetics and Molecular Research**, 9, 514-523, 2010.

<sup>69</sup> Faoro, H.; Glogauer, A.; Souza, E. M.; Rigo, L. U.; Cruz, L. M.; Monteiro, R. A.; Pedrosa, F. O.; Identification of a new lipase family in the Brazilian Atlantic Forest soil metagenome. **Environmental Microbiology Reports**, 3, 750–755, 2011.

<sup>70</sup> Kim, H. Y.; Kwon, E. J.; Kim, S. K.; Jeong, Y. S.; Kim, J.; Yun, H. D.; Kim, H.; Molecular cloning and characterization of a novel family VIII alkaline esterase from a compost metagenomic library. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 393, 45-49, 2010.

<sup>71</sup> Roh, C.; Villatte, F.; Isolation of a low-temperature adapted lipolytic enzyme from uncultivated micro-organism. **Journal of Applied Microbiology**, 105, 116-123, 2008.

<sup>72</sup> Hu, Y. F.; Fu, C. Z.; Huang, Y. P.; Yin, Y. S.; Cheng, G.; Lei, F.; Lu, N.; Li, J.; Ashforth, E. J.; Zhang, L. X.; Zhu, B. L.; Novel lipolytic genes from the microbial metagenomic library of the South China Sea marine sediment. **Fems Microbiology Ecology**, 72, 228-237, 2010.

<sup>73</sup> Vogel, A. I. **Practical organic chemistry**, 5 ed., Longman Scientific and Technical: New York, 1989.

<sup>74</sup> Botana, A.; Aguilar, J.; A.; Nilsson, M.; Morris, G. A.; J-modulation effects in DOSY experiments and their suppression: The Oneshot45 experiment. **Journal of Magnetic Resonance**, 208, 270-278, 2011.

<sup>75</sup> Ruddy A. J.; Kelly, C. M.; Crawford, S. M.; Wheaton, C. A.; Sydora O. L.; Small B. L.; Stradiotto, M.; Turculet, L.; (*N*-Phosphinoamidinate) iron pre-catalysts for the room

---

temperature hydrosilylation of carbonyl compounds with broad substrate scope at low loadings. **Organometallics**, 32, 5581-5588, 2013.

<sup>76</sup> Yang, Y.; Formal hydration of non-activated terminal olefins using tandem catalysts. **Chemical Communications**, 50, 2608-2611, 2014.

<sup>77</sup> Khusnutdinov, R. I.; Shchadneva, N. A.; Khisamova, L. F.; Dzhemilev, U. M.; Hydroacetoxylation of olefins with acetic acid generated in situ from vinyl acetate in the presence of ruthenium complexes. **Russian Journal of Organic Chemistry**, 47, 155-160, 2011.

<sup>78</sup> Cygler, M.; Grochulski, P.; Kazlauskas, R. J.; Schrag, J. D.; Bouthillier, F.; Rubin, B.; Serreqi, A. N.; Gupta, A. K.; Molecular Basis for the Enantioselectivity of Lipases toward Secondary Alcohols. **Journal of American Chemical Society** 116, 3180-3186, 1994.

<sup>79</sup> Ferreira, H. V.; Rocha, L. C.; Severino, R. P.; Porto, A. L. M.; Syntheses of Enantiopure Aliphatic Secondary Alcohols and Acetates by Bioresolution with Lipase B from *Candida antarctica*. **Molecules**, 17, 8955-8967, 2012.

<sup>80</sup> Martini, V. P.; Caracterização molecular e bioquímica de novas lipases obtidas por prospecção metagenômica com aplicação em biocatálise. **Tese de Doutorado em Química**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

<sup>81</sup> Alnoch, R. C.; Imobilização e caracterização de uma nova lipase obtida por prospecção metagenômica. **Dissertação de Mestrado em Bioquímica**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

<sup>82</sup> Alnoch, R. C.; Martini, V. P.; Glogauer, A.; Costa, A. C. S.; Piovan, L.; Muller-Santos, M.; de Souza, E. M.; Pedrosa, F. O.; Mitchell, D. A.; Krieger, N.; Immobilization and characterization of a new regioselective and enantioselective lipase obtained from a metagenomic library. **PLoS ONE**, 10, 2, 2015.

<sup>83</sup> Frykman, H.; Ohrner, N.; Norin, T.; Hult, K.; S-ethyl thiooctanoate as acyl donor in lipase catalysed resolution of secondary alcohols. **Tetrahedron letters**, 34, 1367-1370, 1993.

- 
- <sup>84</sup> Córdova, A.; Tremblay, M. R.; Clapham, B.; JAnda, K. D. A Sequential application of kinetic resolution and Polymer-Supported scavenging for the isolation of Chiral Secondary Alcohols. **Journal of Organic Chemistry**, 66, 5645-5648, 2001.
- <sup>85</sup> Zarcuła, C.; Coríci, L.; Croitoru, R.; Péter, F.; Kinetic Resolution of Secondary Alcohols in Lipase-Catalyzed Transesterification Reactions. In: **Annals of West University of Timisoara Series of Chemistry IX**, 16, 107-112, 2007.
- <sup>86</sup> Patel, R. N.; Banerjee, A.; Nanduri, V.; Goswami, A.; Comezoglu, F.T.; Enzymatic Resolution of Racemic Secondary Alcohols by Lipase B from *Candida antarctica*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 77, 1015-1019, 2000.
- <sup>87</sup> Turner, N. J.; Controlling chirality. **Current Opinion in Biotechnology**, 14, 401 – 406, 2003.
- <sup>88</sup> Ghanem, A.; El-Beairy, M. F.; Al-Ahdal, M. N.; Direct enantioselective HPLC monitoring of lipase-catalyzed kinetic resolution of racemates in non-standard organic solvents. **Chromatographia**, 65, 681–686, 2007.
- <sup>89</sup> Atkins, P. W.; Paula, J.; **Físico-química**, 9 ed, LTC, 2012.
- <sup>90</sup> Bornscheuer, U.; Kazlauskas, R.; **Hydrolases in Organic Synthesis. Regio- and Stereoselective Biotransformations**, Wiley-VCH: Germany, 1999.
- <sup>91</sup> Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veeger, C.; Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, 30, 81-87, 1987.
- <sup>92</sup> Hernández-Rodríguez, B.; Córdova, J.; Bárzana, E.; Favela-Torres, E.; Effects of organic solvents on activity and stability of lipases produced by thermotolerant fungi in solid-state fermentation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 61, 136–142, 2009.
- <sup>93</sup> Sharma, S.; Kanwar, S. S.; Organic Solvent Tolerant Lipases and Applications. **The Scientific World Journal**, 1-15, 2014.

---

<sup>94</sup> Amarego, W. L. F.; Chai, C. L. L.; **Purification of Laboratory Chemicals**, 5 ed.; Elsevier Science: USA, 2006.

<sup>95</sup> Chen, C.; Fujimoto, Y.; Girdaukas, G.; Sih, J. Quantitative Analyses of Biochemical Kinetic Resolution of Enantiomers. **Journal of the American Chemical Society**, 104, 7294-7299, 1982.

<sup>96</sup> Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, A. N. E.; Rappaport, A. T.; Cuccia, L. A.; A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*. **Journal of Organic Chemistry**, 56, 2656-2665, 1991.

<sup>97</sup> Frykman, H.; Ohrner, N.; Norin, T.; Hult, K.; S-ethyl thiooctanoate as acyl donor in lipase catalysed resolution of secondary alcohols. **Tetrahedron letters**, 34, 1367-1370, 1993.

<sup>98</sup> Wang, B.; Jiang, L.; Wang, J.; Ma, J.; Liu, M.; Yu, H.; A tandem and fully enzymatic procedure for the green resolution of chiral alcohols: acylation and deacylation in non-aqueous media. **Tetrahedron: Asymmetry**, 22, 980-985, 2011.

<sup>99</sup> Merabet-Khelassi, M.; Houiene, Z.; Aribi-Zouioueche, L.; Riant, O.; Green methodology for enzymatic hydrolysis of acetates in non-aqueous media via carbonate salts. **Tetrahedron: Asymmetry**, 23, 828-833, 2012.

<sup>100</sup> Ema, T.; Ura, N.; Yoshii, M.; Korenaga, T.; Sakai, T.; Empirical method for predicting enantioselectivity in catalytic reactions: demonstration with lipase and oxazaborolidine. **Tetrahedron**, 65, 9583-9591, 2009.

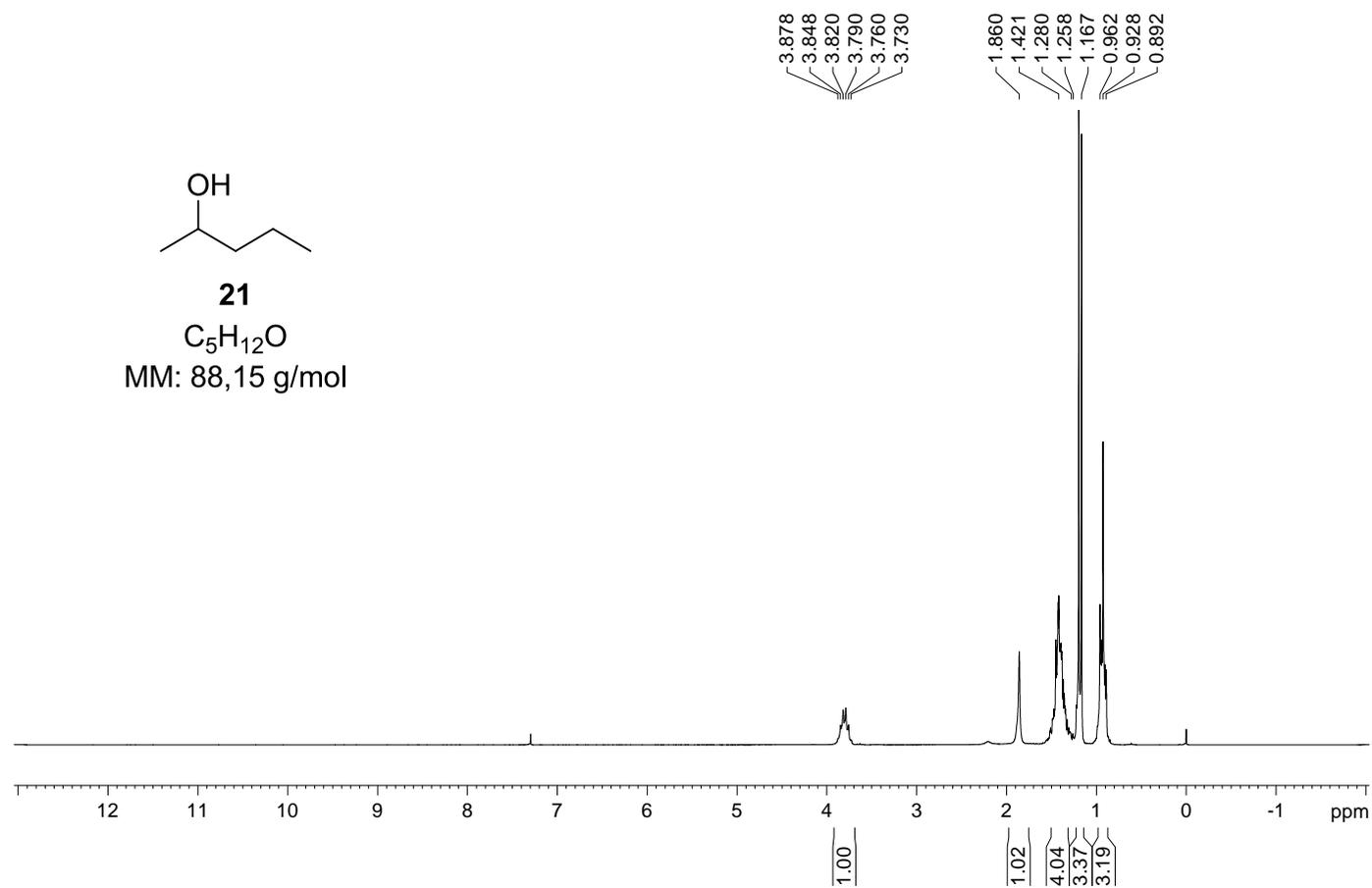
# APÊNDICES

## SUMÁRIO

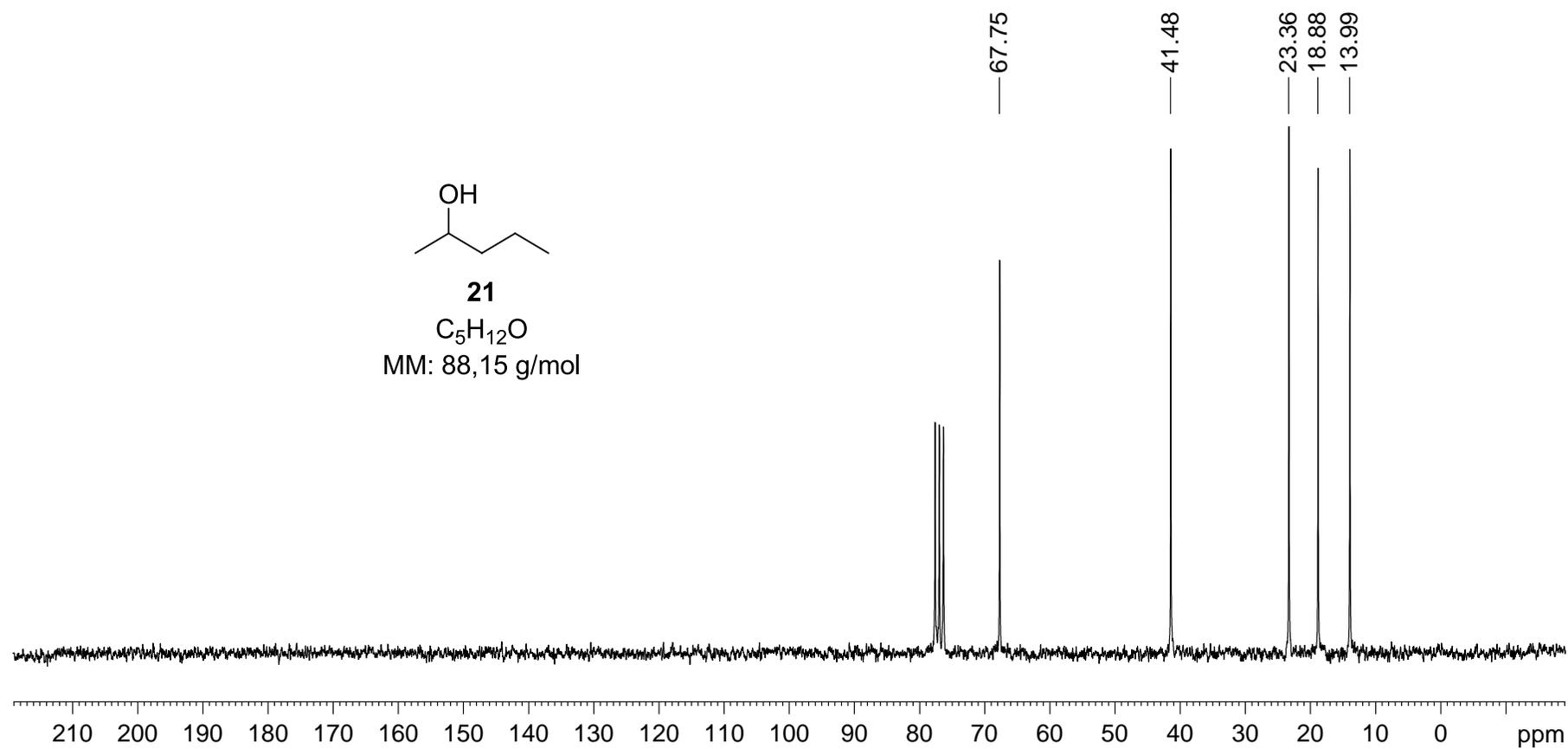
Figura 1: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , TMS) do pentan-2-ol ( <b>21</b> ).....	79
Figura 2: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do 2-pentanol ( <b>21</b> ).....	80
Figura 3: Espectro no IV de pentan-2-ol ( <b>21</b> ).....	81
Figura 4: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , TMS) do hexan-2-ol ( <b>22</b> ).....	82
Figura 5: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do hexan-2-ol ( <b>22</b> ).....	83
Figura 6: Espectro no IV do hexan-2-ol ( <b>22</b> ).....	84
Figura 7: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do heptan-2-ol ( <b>23</b> ).....	85
Figura 8: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do heptan-2-ol ( <b>23</b> ).....	86
Figura 9: Espectro no IV do heptan-2-ol ( <b>23</b> ).....	87
Figura 10: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do octan-2-ol ( <b>24</b> ).....	88
Figura 11: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do octan-2-ol ( <b>24</b> ).....	89
Figura 12: Espectro no IV do octan-2-ol ( <b>24</b> ).....	90
Figura 13: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , TMS) do 4-metil-pentan-2-ol ( <b>25</b> ).....	91
Figura 14: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do 4-metil-pentan-2-ol ( <b>25</b> ).....	92
Figura 15: Espectro no IV do 4-metil-pentan-2-ol ( <b>25</b> ).....	93
Figura 16: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , TMS) do hexan-3-ol ( <b>26</b> ).....	94
Figura 17: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do hexan-3-ol ( <b>26</b> ).....	95
Figura 18: Espectro de IV do hexan-3-ol ( <b>26</b> ).....	96
Figura 19: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do acetato de 2-pentila ( <b>21a</b> ).....	97
Figura 20: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do acetato de 2-pentila ( <b>21a</b> ).....	98
Figura 21: Espectro no IV do acetato de 2-pentila ( <b>21a</b> ).....	99
Figura 22: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do acetato de 2-hexila ( <b>22a</b> ).....	100
Figura 23: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do acetato de 2-hexila ( <b>22a</b> ).....	101
Figura 24: Espectro no IV do acetato de 2-hexila ( <b>22a</b> ).....	102
Figura 25: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz, TMS) do acetato de 2-heptila ( <b>23a</b> ).....	103
Figura 26: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) do acetato de 2-heptila ( <b>23a</b> ).....	104
Figura 27: Espectro no IV do acetato de 2-heptila ( <b>23a</b> ).....	105
Figura 28: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz, TMS) do acetato de 2-octila ( <b>24a</b> ).....	106
Figura 29: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) do acetato de 2-octila ( <b>24a</b> ).....	107
Figura 30: Espectro no IV do acetato de 2-octila ( <b>24a</b> ).....	108
Figura 31: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do acetato de 4-metil-2-pentila ( <b>25a</b> ).....	109

Figura 32: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do acetato de 4-metil-2-pentila ( <b>25a</b> ).....	110
Figura 33: Espectro no IV do acetato de 4-metil-2-pentila ( <b>25a</b> ). .....	111
Figura 34: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do acetato de 3-hexila ( <b>26a</b> ). .....	112
Figura 35: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do acetato de 3-hexila ( <b>26a</b> ).. ..	113
Figura 36: Espectro no IV do acetato de 3-hexila ( <b>26a</b> ). .....	114
Figura 37: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do propionato de 2-pentila ( <b>21b</b> ). .....	115
Figura 38: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do propionato de 2-pentila ( <b>21b</b> ). .....	116
Figura 39: Espectro no IV do propionato de 2-pentila ( <b>21b</b> ).....	117
Figura 40: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do propionato de 2-hexila ( <b>22b</b> ). .....	118
Figura 41: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do propionato de 2-hexila ( <b>22b</b> ). .....	119
Figura 42: Espectro no IV do propionato de 2-hexila ( <b>22b</b> ).....	120
Figura 43: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do propionato de 2-heptila ( <b>23b</b> ). .....	121
Figura 44: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do propionato de 2-heptila ( <b>23b</b> ). .....	122
Figura 45: Espectro no IV do propionato de 2-heptila ( <b>23b</b> ).....	123
Figura 46: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do propionato de 2-octila ( <b>24b</b> ). .....	124
Figura 47: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do propionato de 2-octila ( <b>24b</b> ). .....	125
Figura 48: Espectro no IV do propionato de 2-octila ( <b>24b</b> ). .....	126
Figura 49: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do propionato de 4-metil-2-pentila ( <b>25b</b> ). .....	127
Figura 50: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do propionato de 4-metil-2-pentila ( <b>25b</b> ). .....	128
Figura 51: Espectro no IV do propionato de 4-metil-2-pentila ( <b>25b</b> ). .....	129
Figura 52: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do propionato de 3-hexila ( <b>26b</b> ). .....	130
Figura 53: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do propionato de 3-hexila ( <b>26b</b> ). .....	131
Figura 54: Espectro no IV do propionato de 3-hexila ( <b>26b</b> ).....	132

## Apêndice 1



**Figura 1:** Espectro de RMN de  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ , TMS) do pentan-2-ol (**21**).



**Figura 2:** Espectro de RMN de  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ ) do 2-pentanol (**21**).

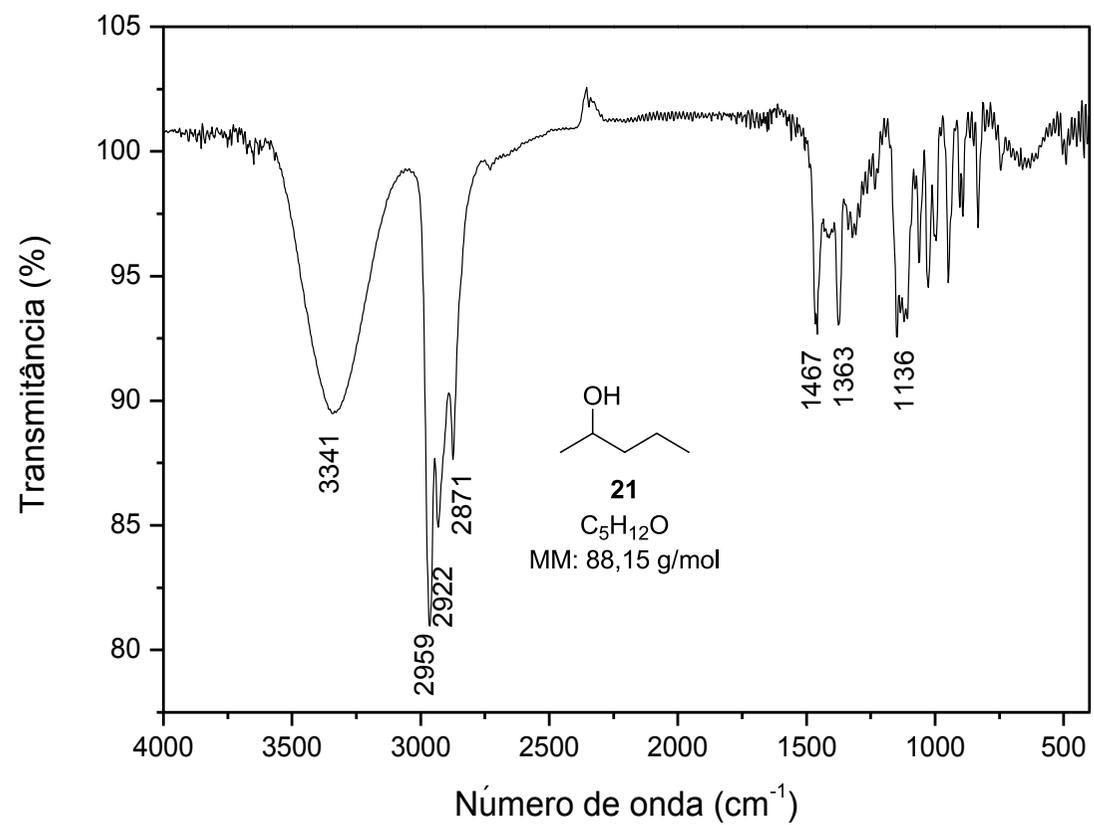
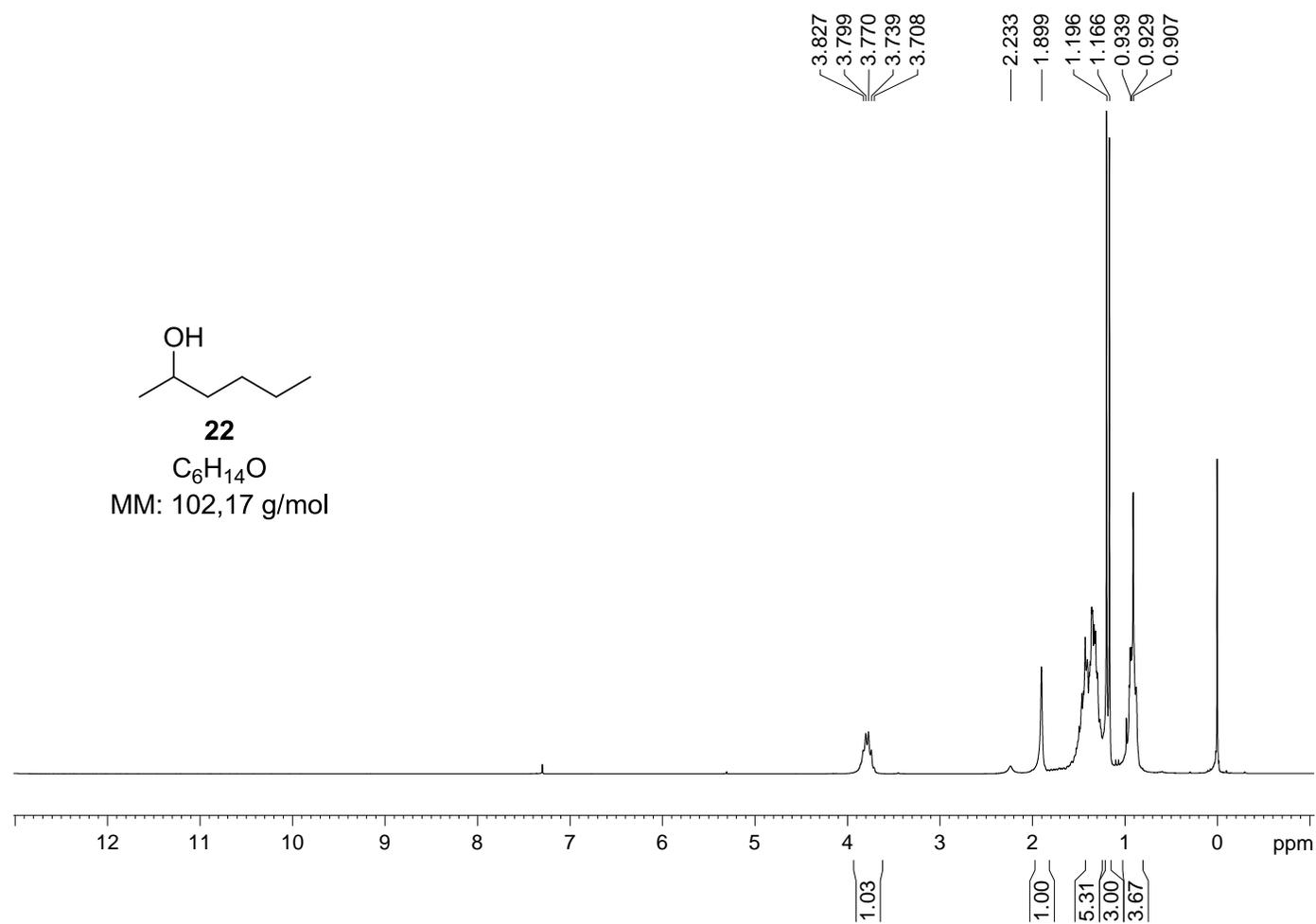
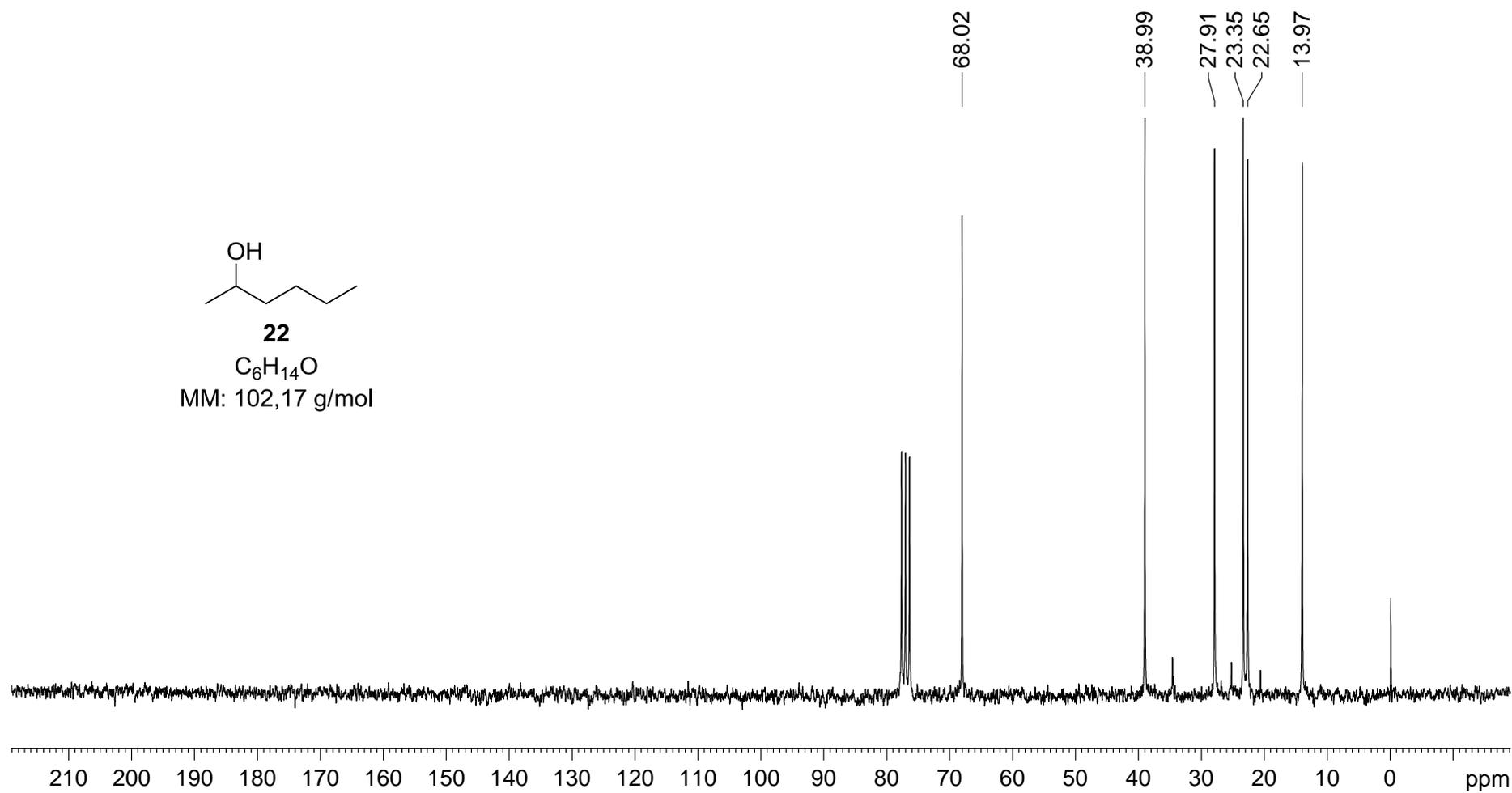


Figura 3: Espectro no IV de pentan-2-ol (**21**).

## Apêndice 2



**Figura 4:** Espectro de RMN de  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ , TMS) do hexan-2-ol (**22**).



**Figura 5:** Espectro de RMN de  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ ) do hexan-2-ol (**22**).

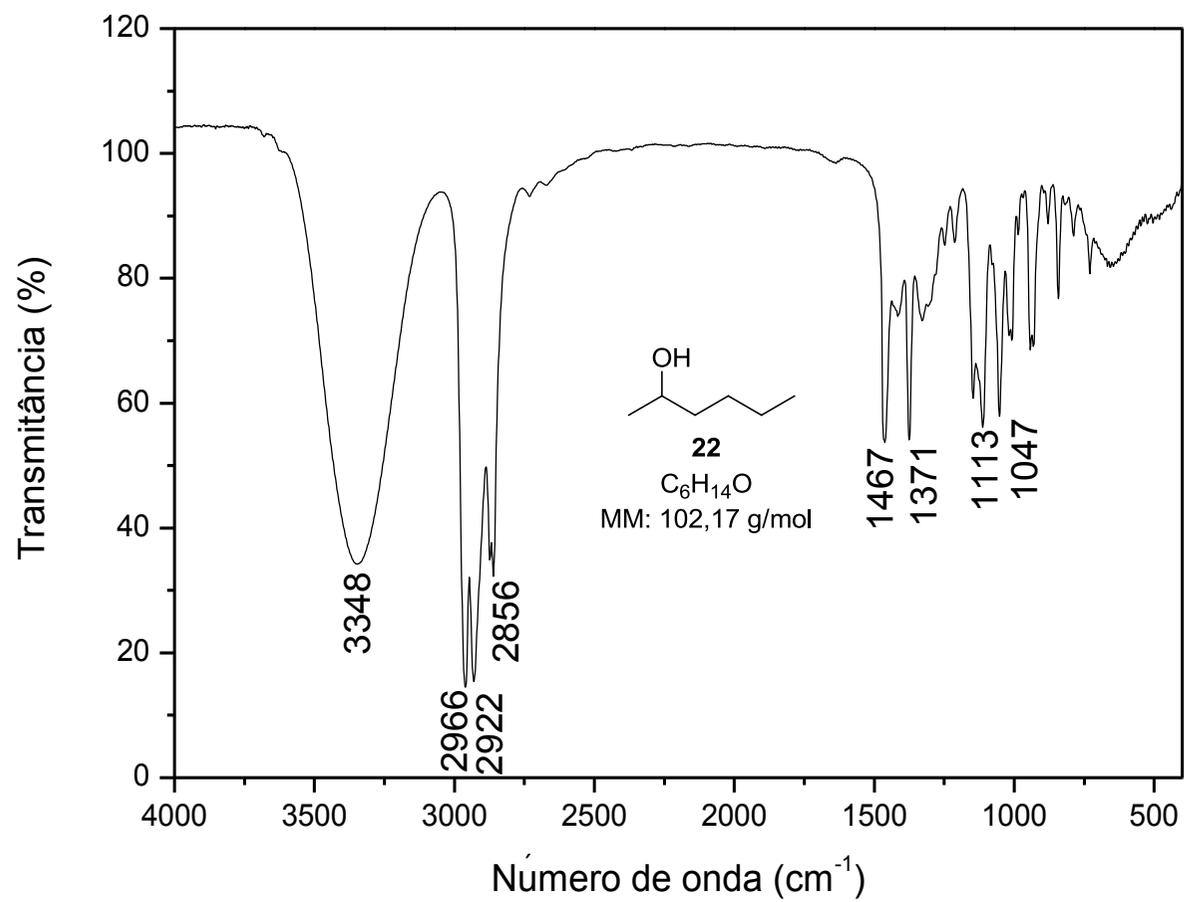


Figura 6: Espectro no IV do hexan-2-ol (**22**).

## Apêndice 3

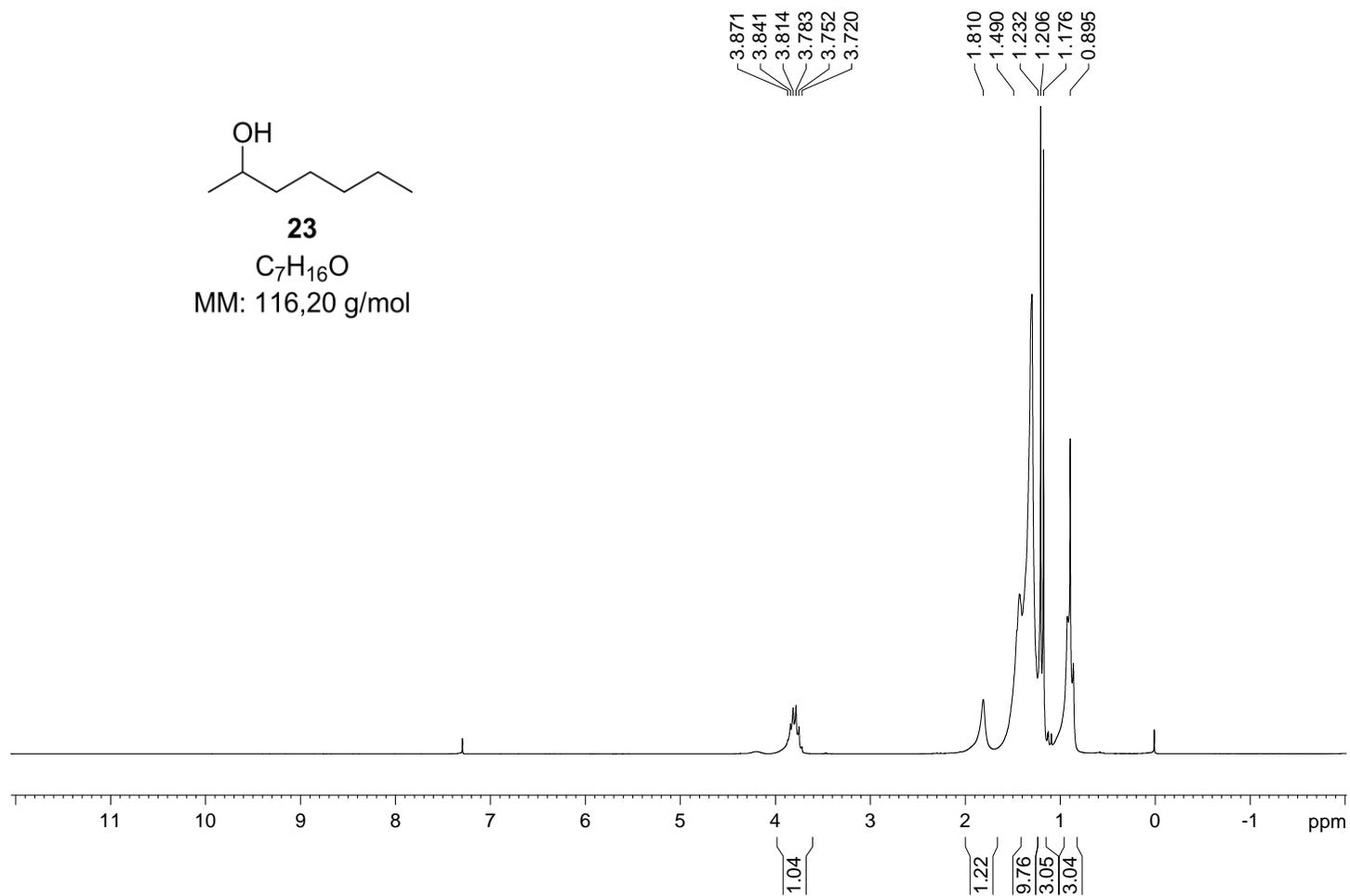
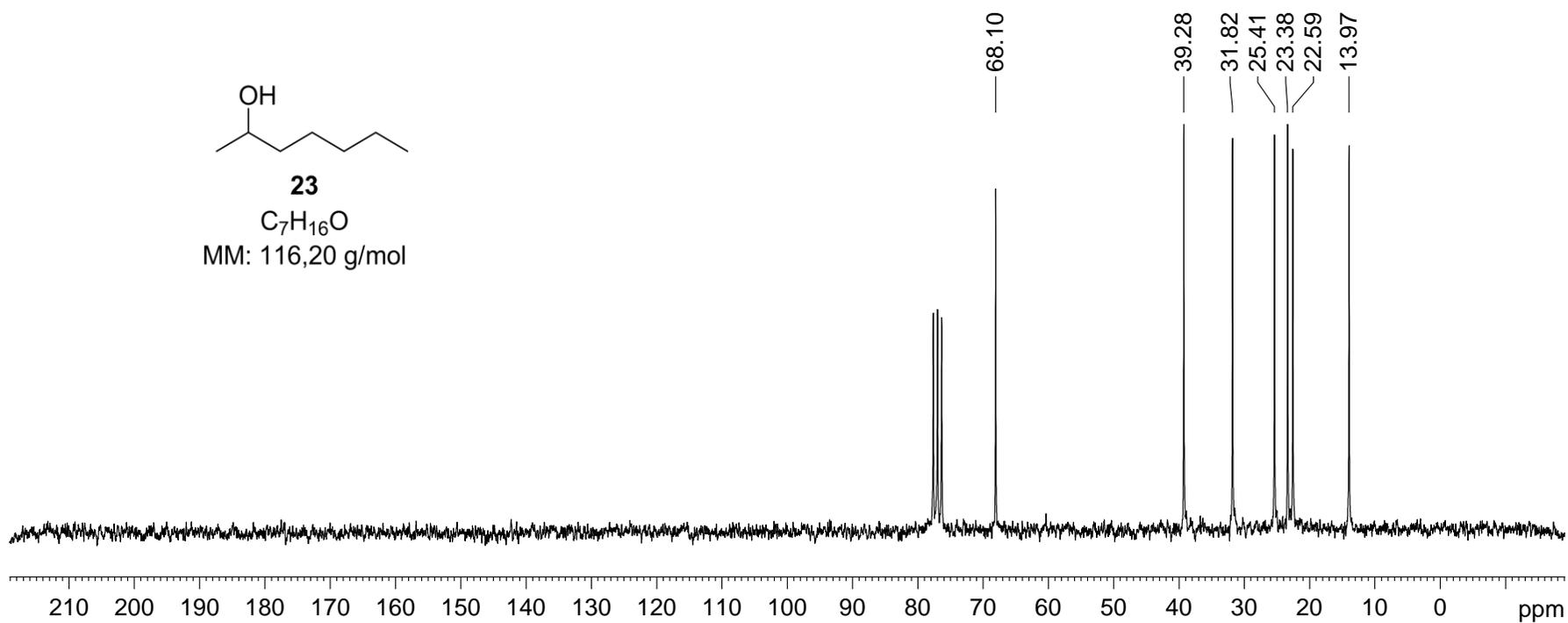
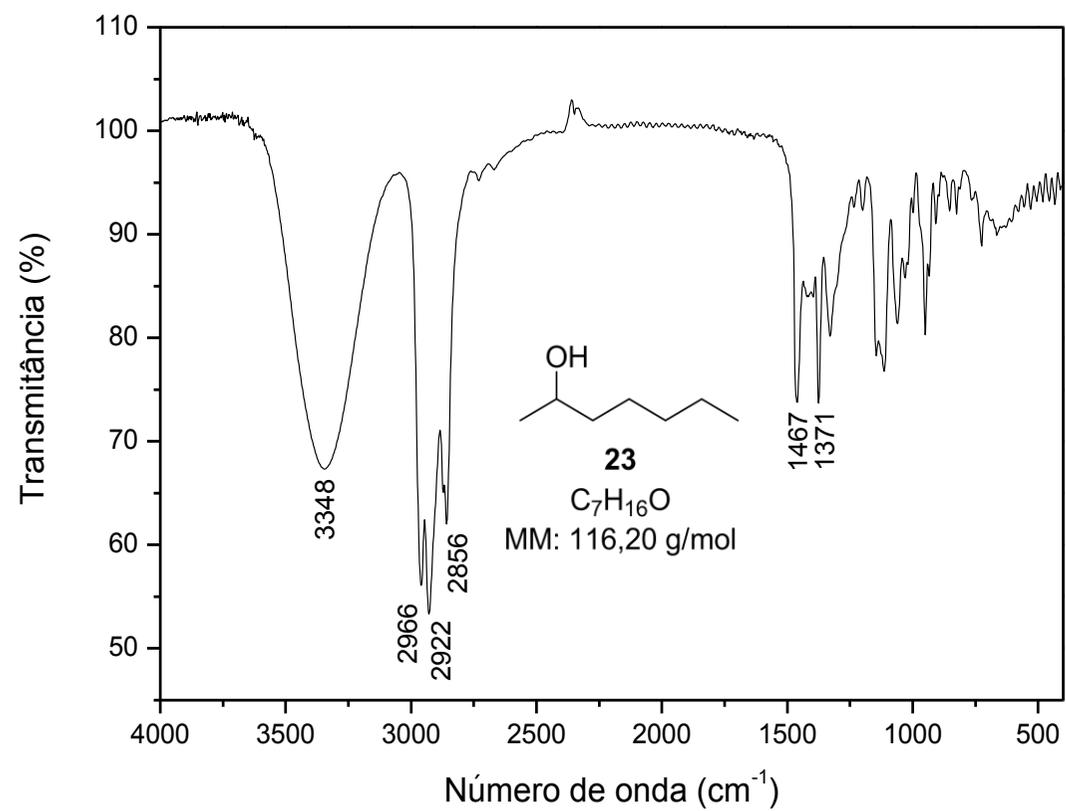


Figura 7: Espectro de RMN de  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ ) do heptan-2-ol (**23**).



**Figura 8:** Espectro de RMN de  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ ) do heptan-2-ol (**23**).



**Figura 9:** Espectro no IV do heptan-2-ol (**23**).

## Apêndice 4

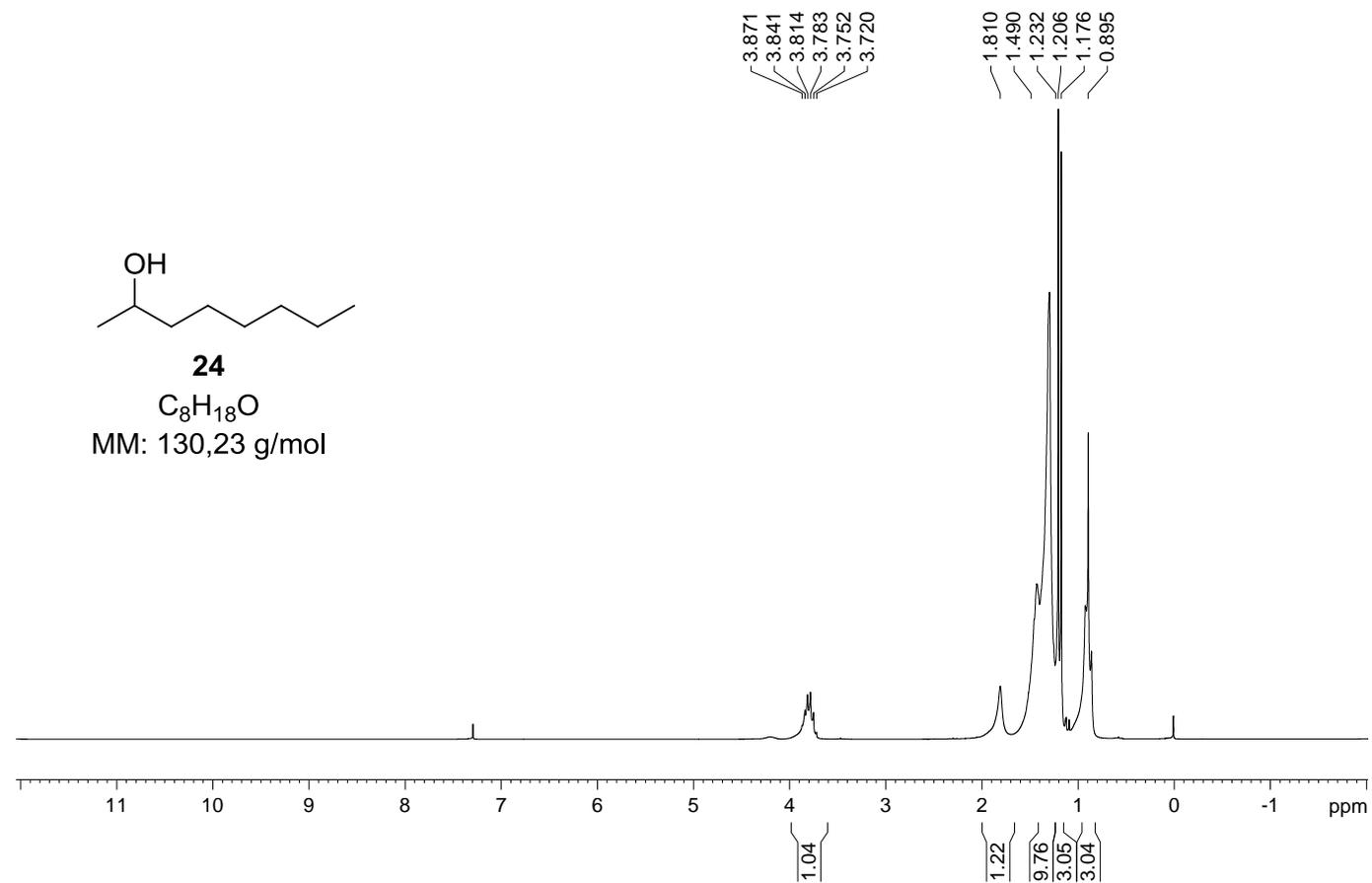


Figura 10: Espectro de RMN de  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ ) do octan-2-ol (**24**).

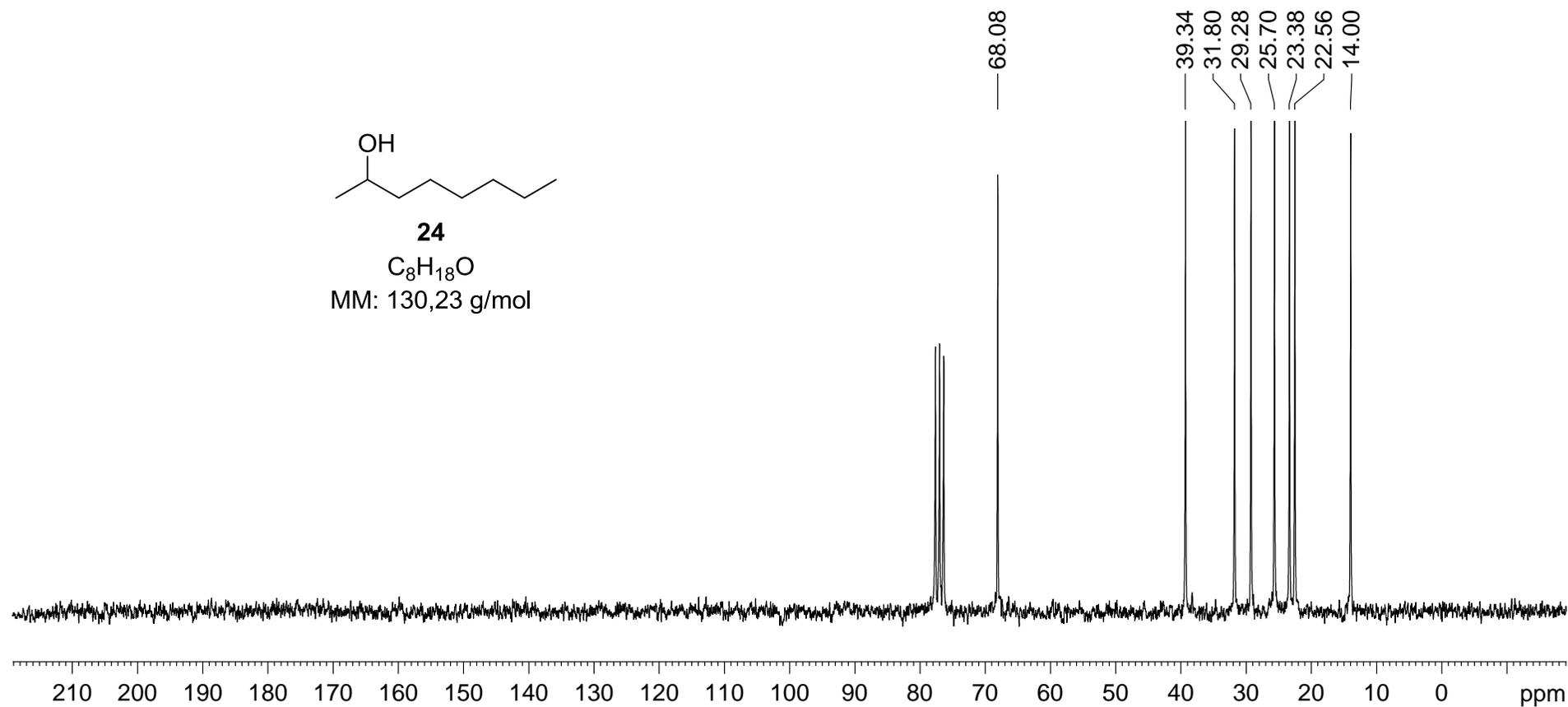


Figura 11: Espectro de RMN de  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ ) do octan-2-ol (**24**).

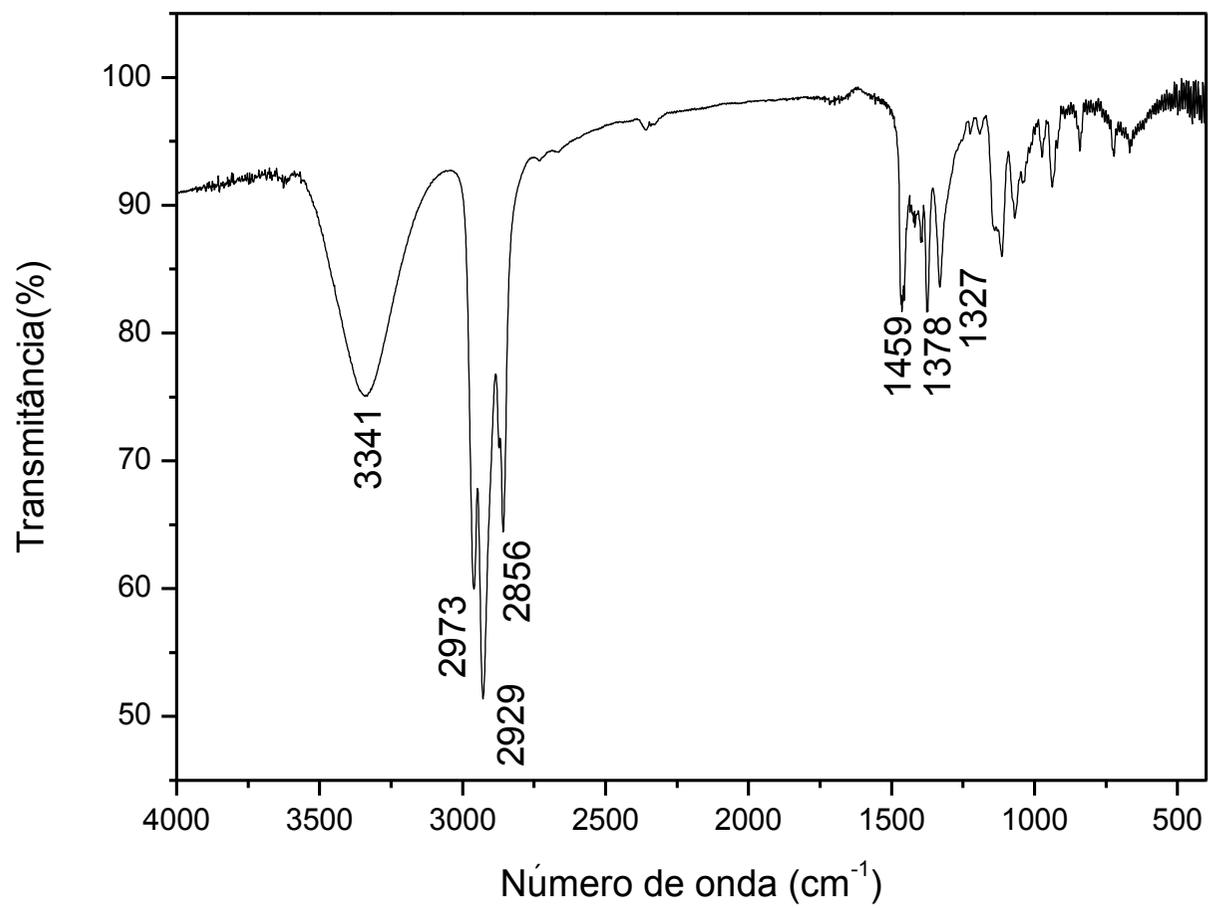


Figura 12: Espectro no IV do octan-2-ol (24).

## Apêndice 5

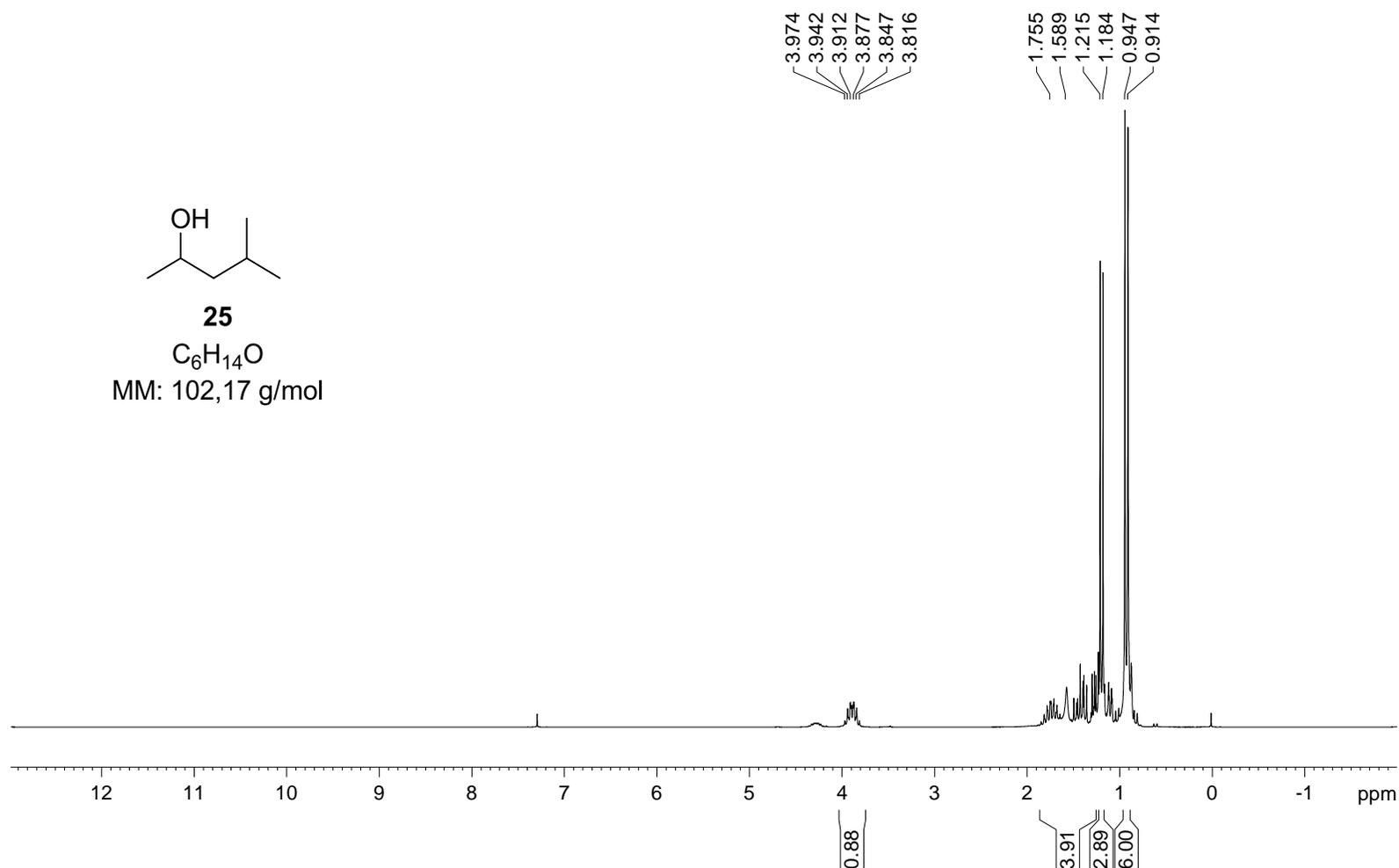
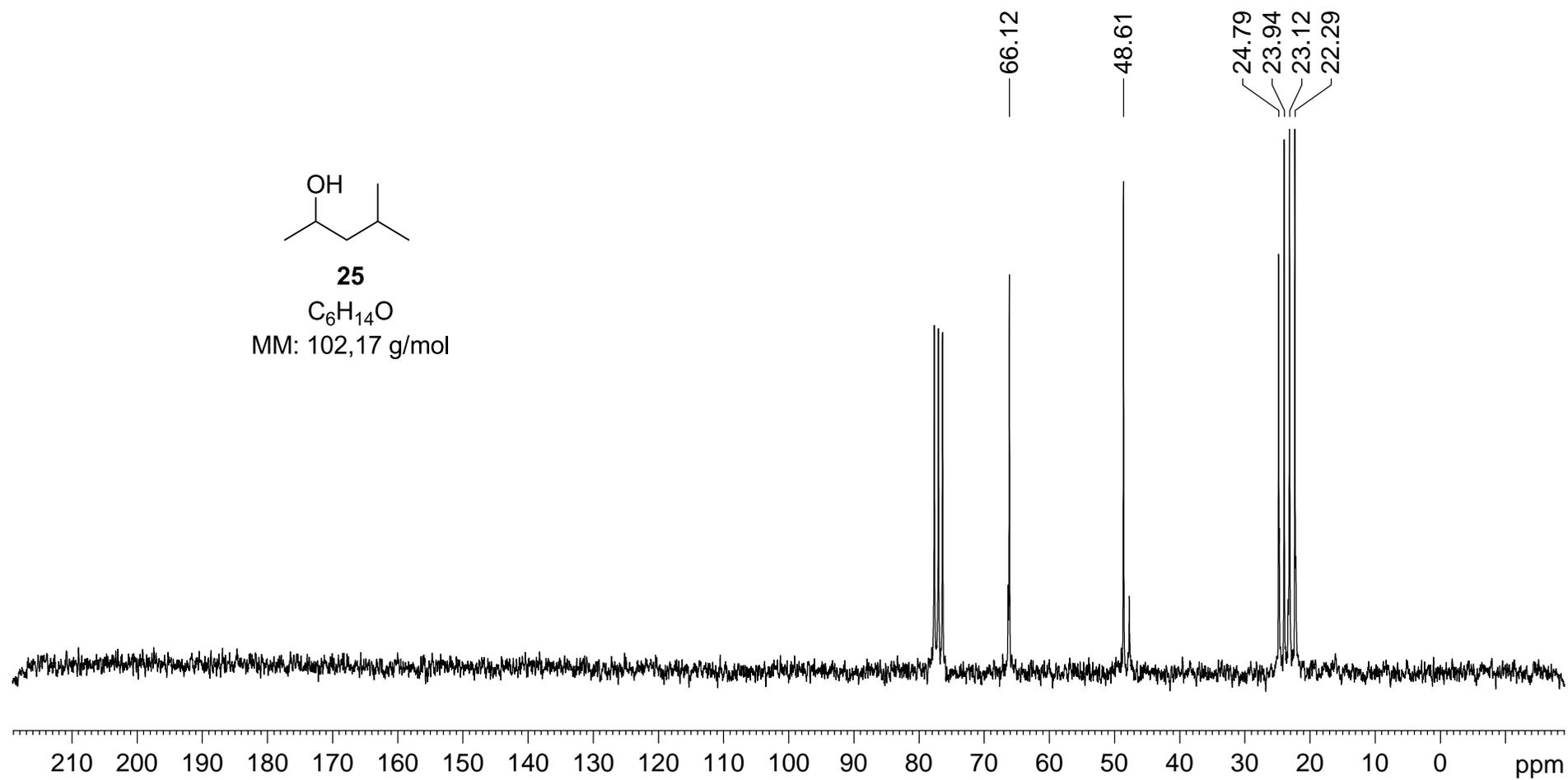
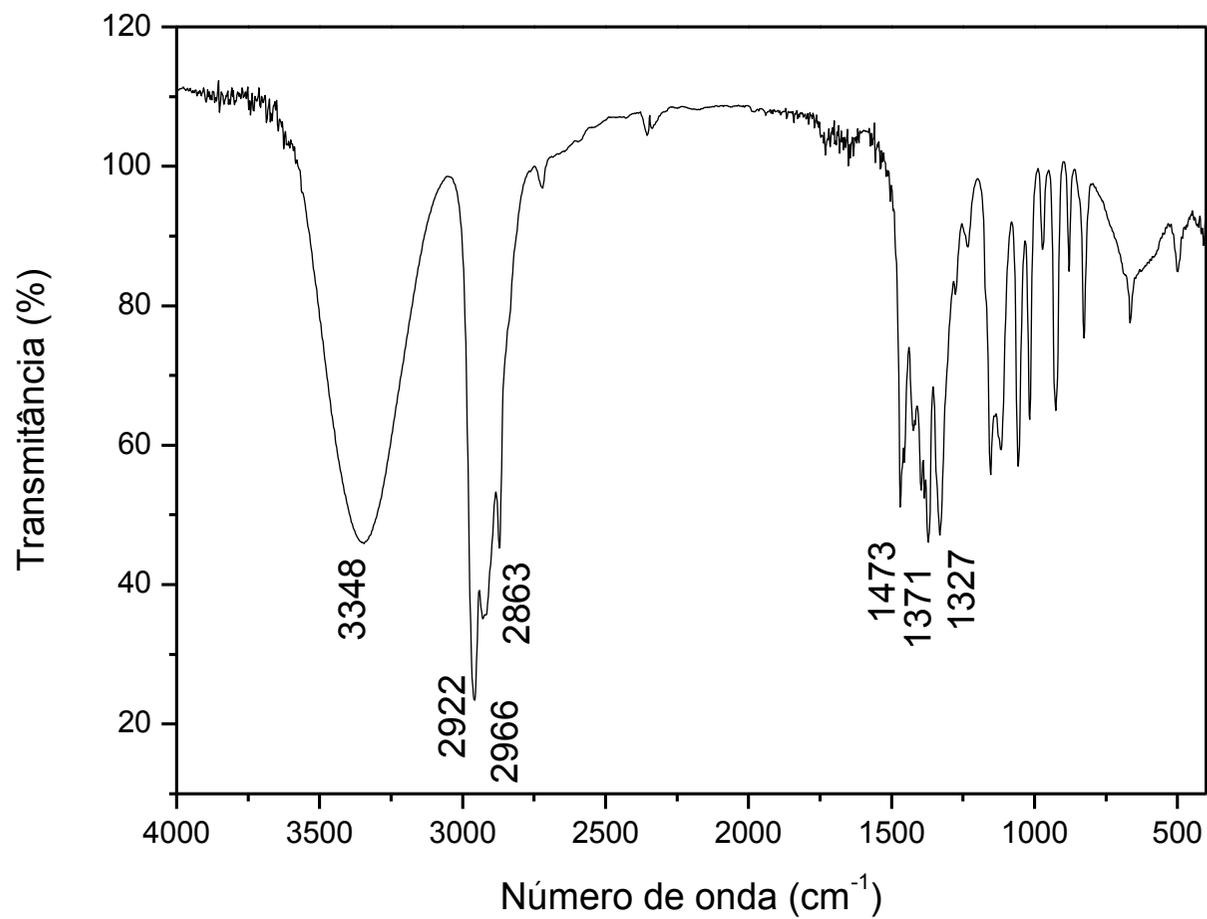


Figura 13: Espectro de RMN de  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ , TMS) do 4-metil-pentan-2-ol (**25**).

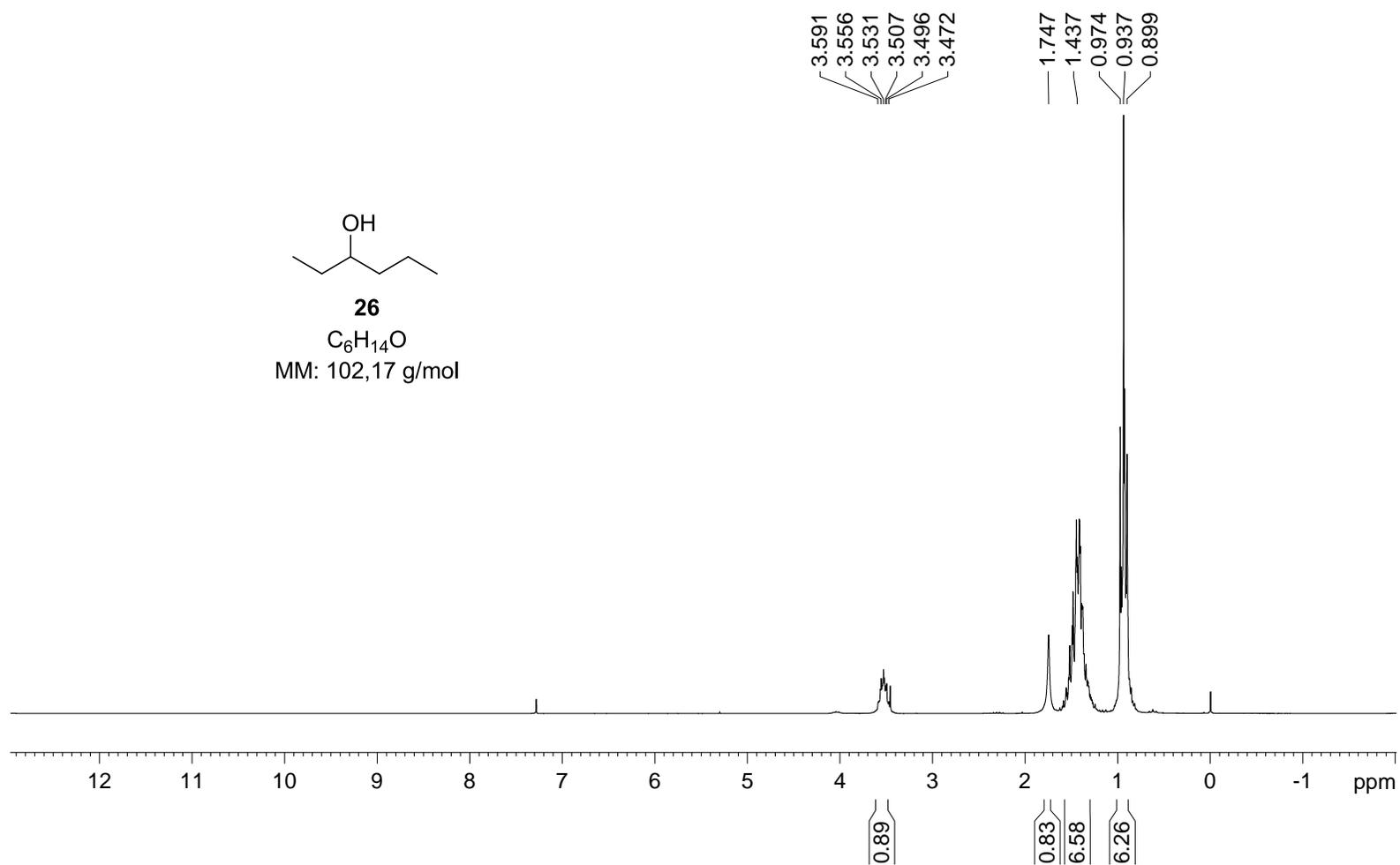


**Figura 14:** Espectro de RMN de  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ ) do 4-metil-pentan-2-ol (**25**).



**Figura 15:** Espectro no IV do 4-metil-pentan-2-ol (**25**).

## Apêndice 6



**Figura 16:** Espectro de RMN de  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ , TMS) do hexan-3-ol (**26**).

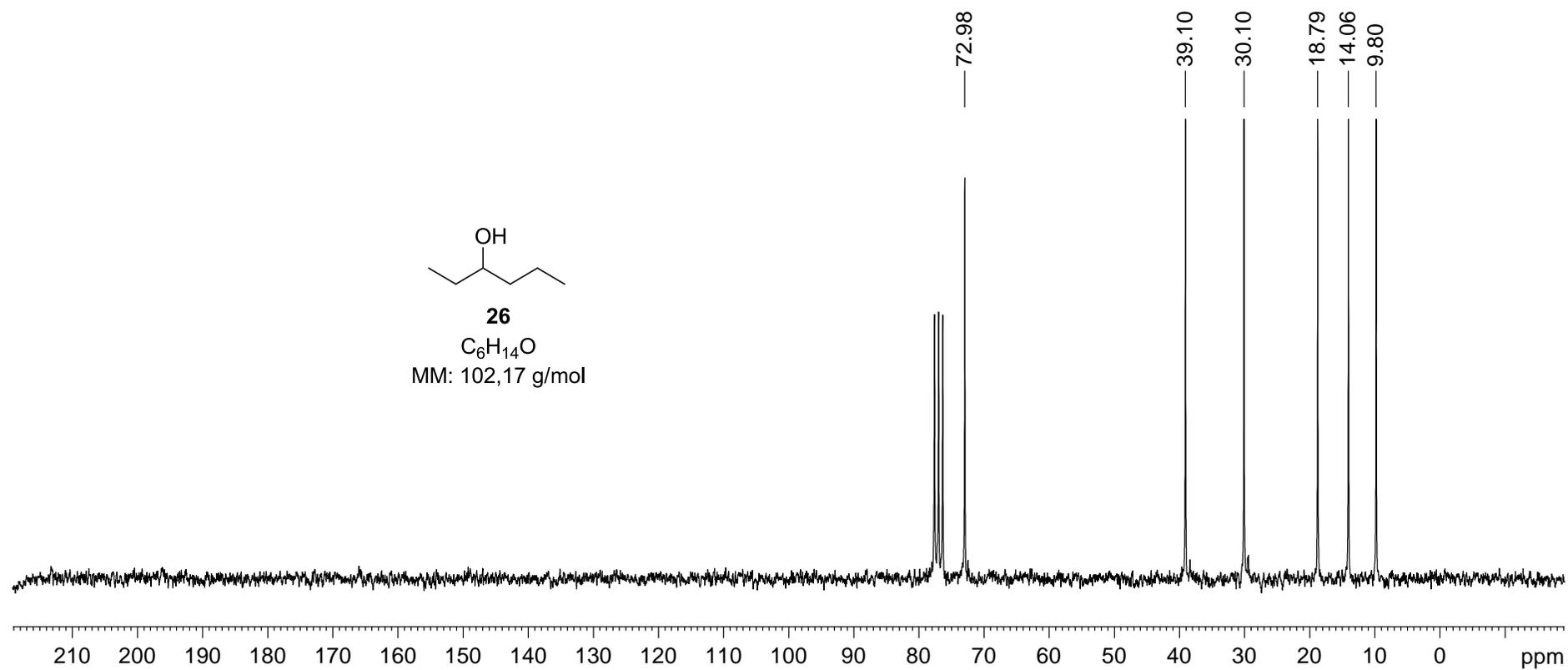
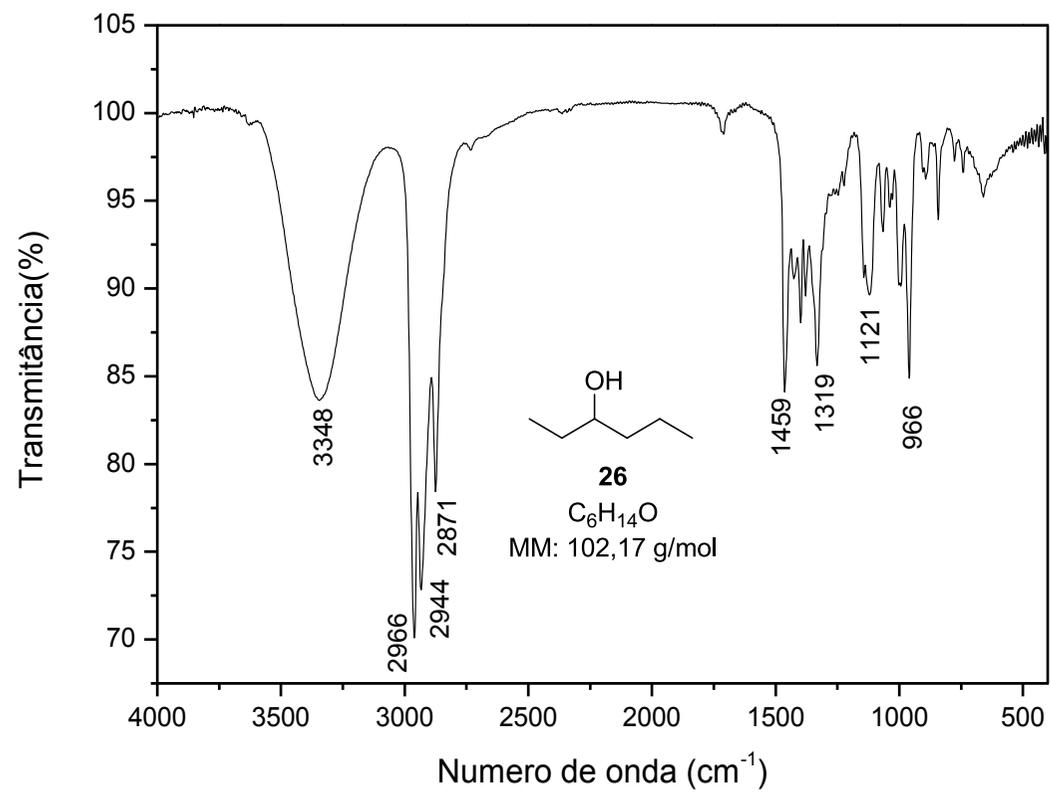


Figura 17: Espectro de RMN de  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ ) do hexan-3-ol (**26**).



**Figura 18:** Espectro de IV do hexan-3-ol (**26**).

## Apêndice 7

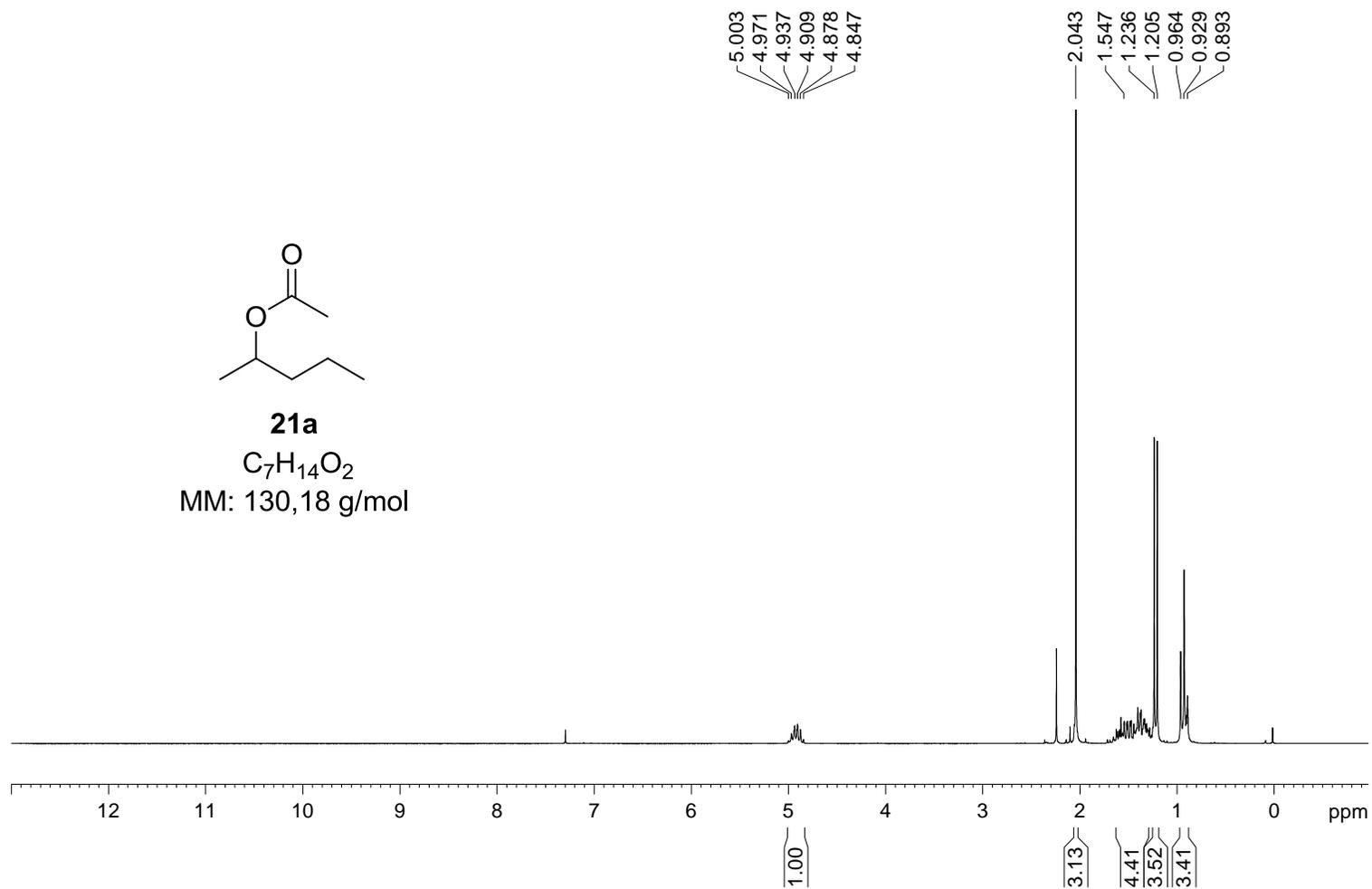
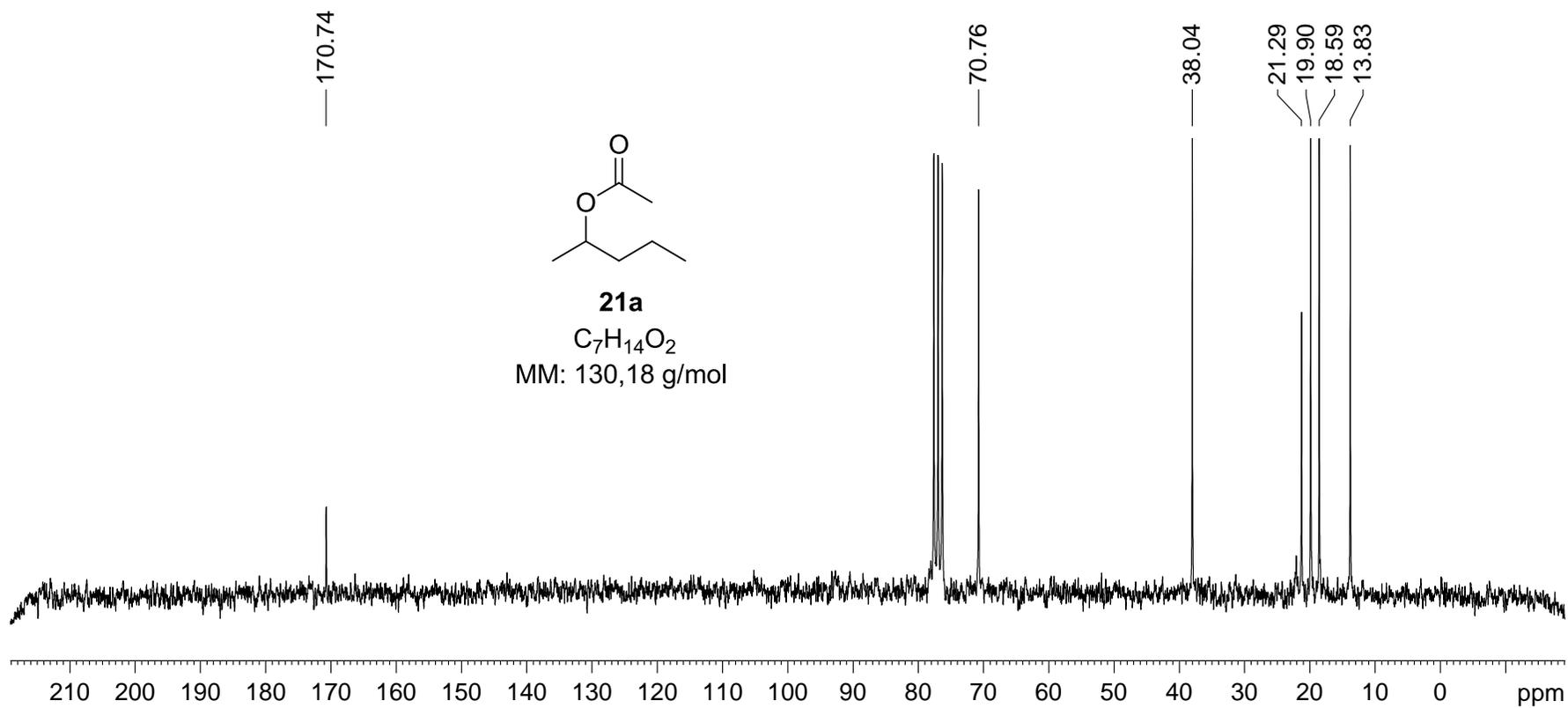
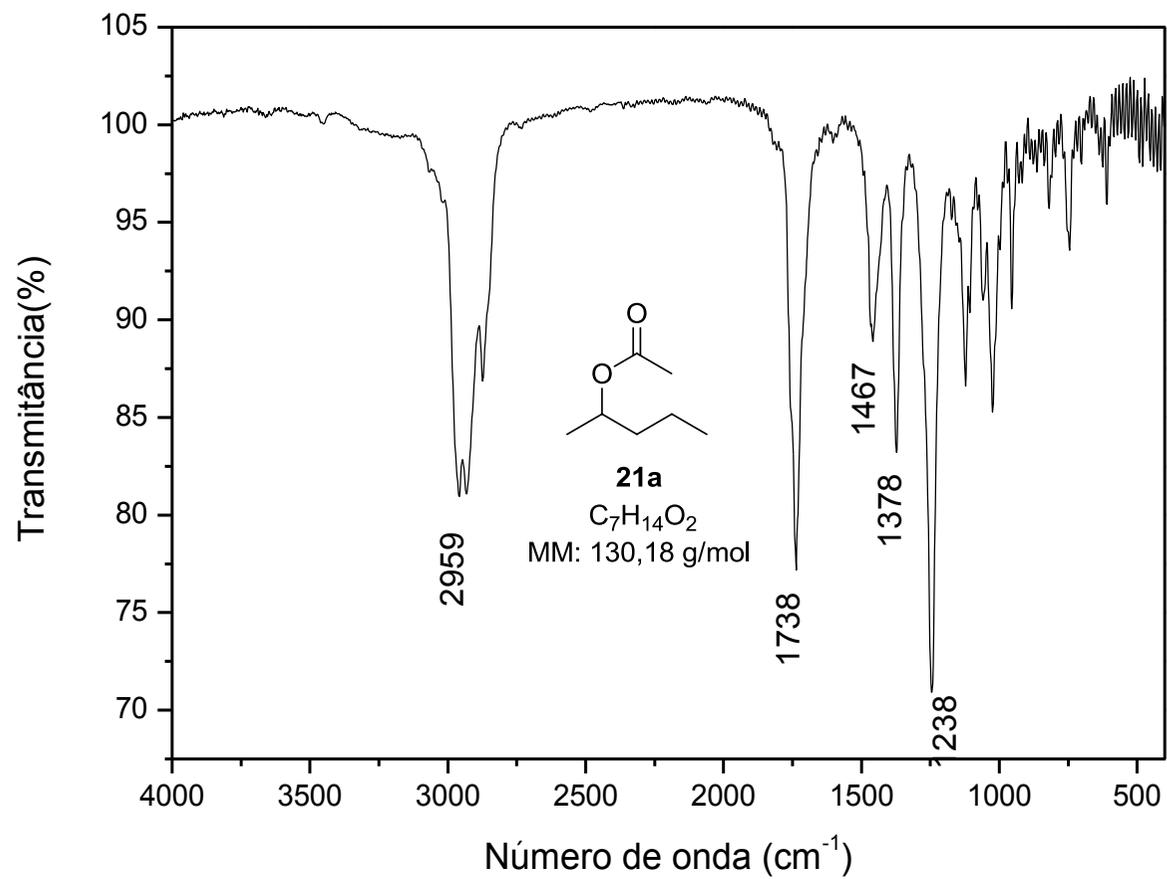


Figura 19: Espectro de RMN de  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ ) do acetato de 2-pentila (**21a**).



**Figura 20:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do acetato de 2-pentila (**21a**).



**Figura 21:** Espectro no IV do acetato de 2-pentila (**21a**).

## Apêndice 8

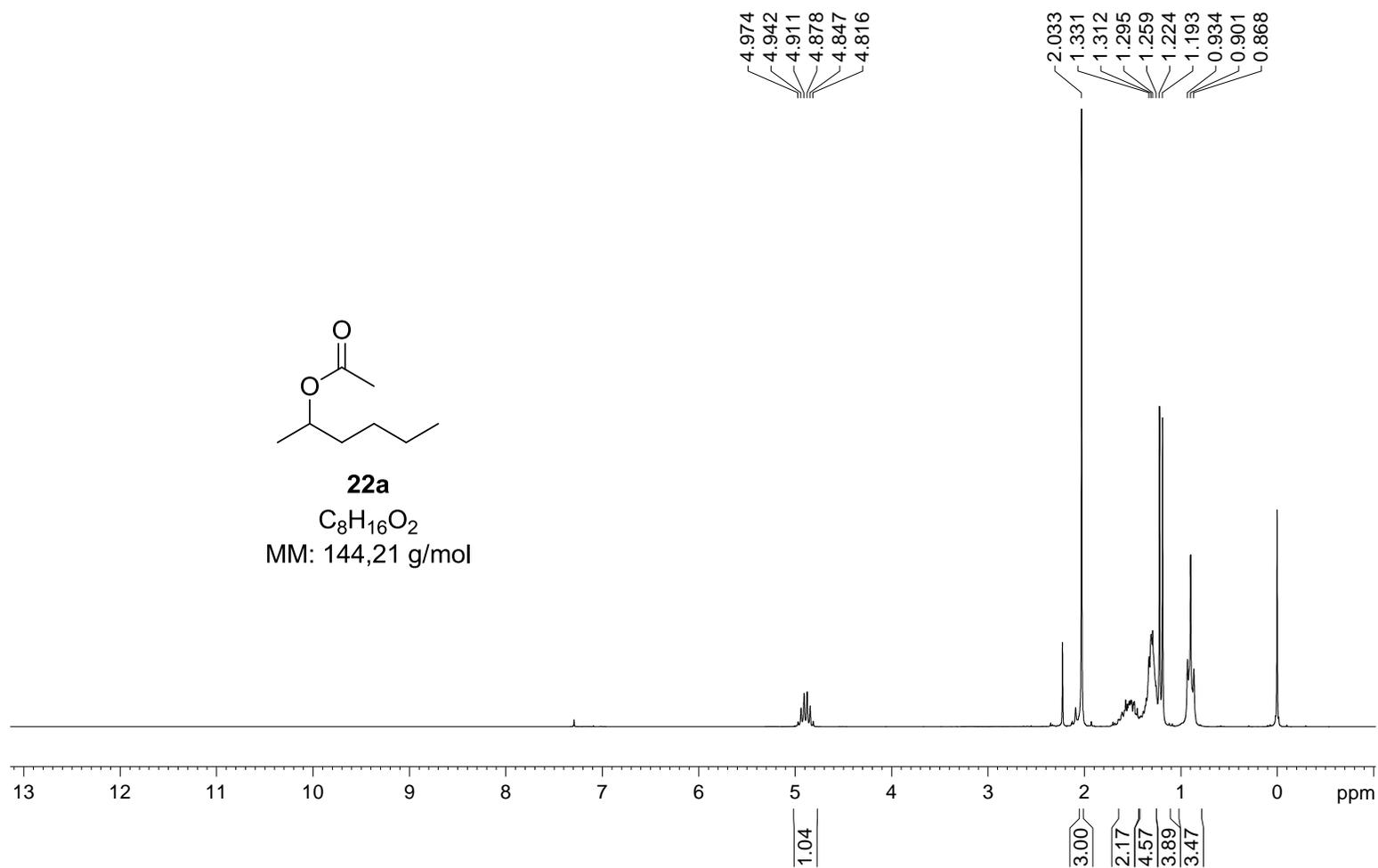


Figura 22: Espectro de RMN de  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ ) do acetato de 2-hexila (**22a**).

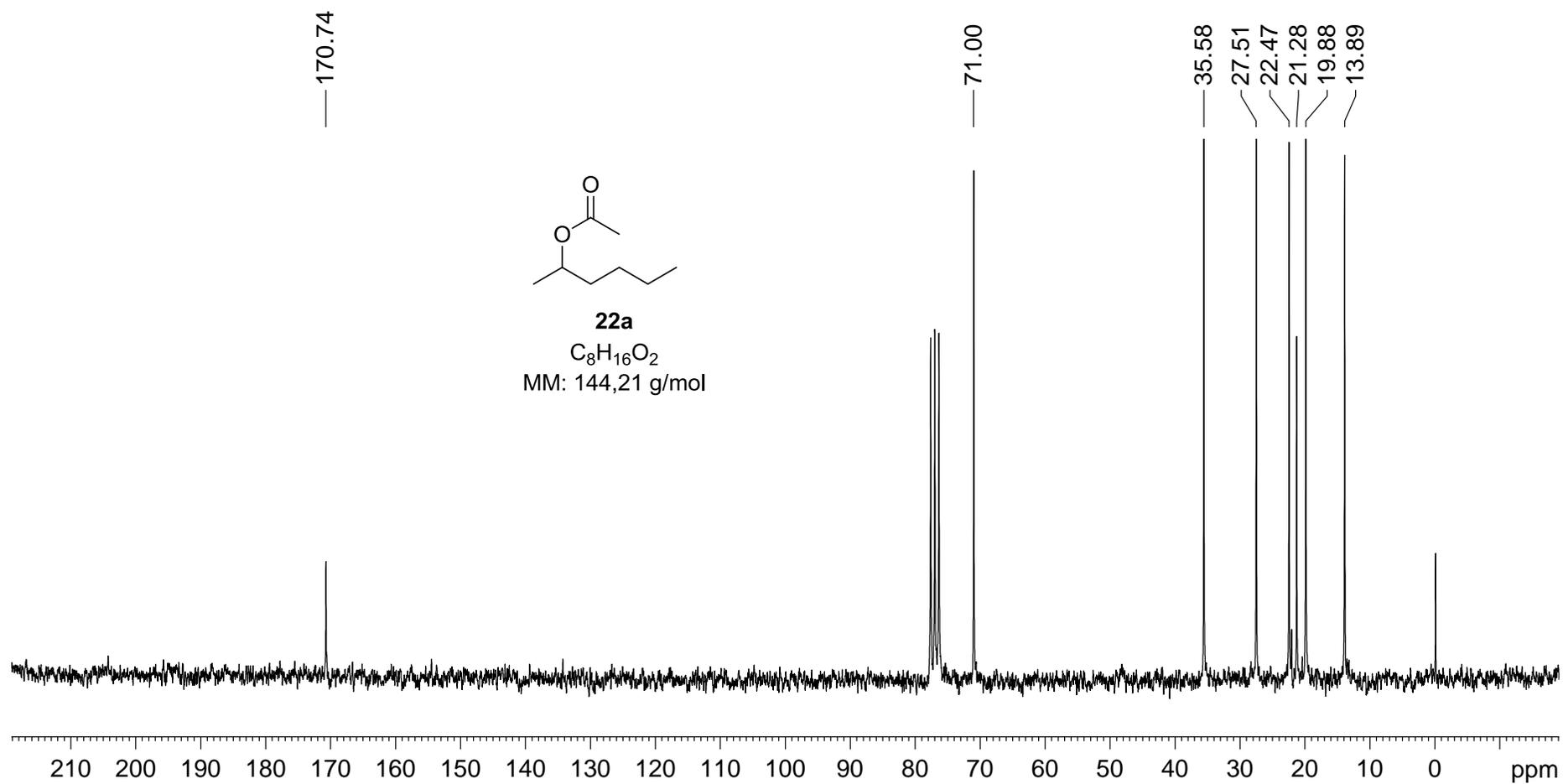
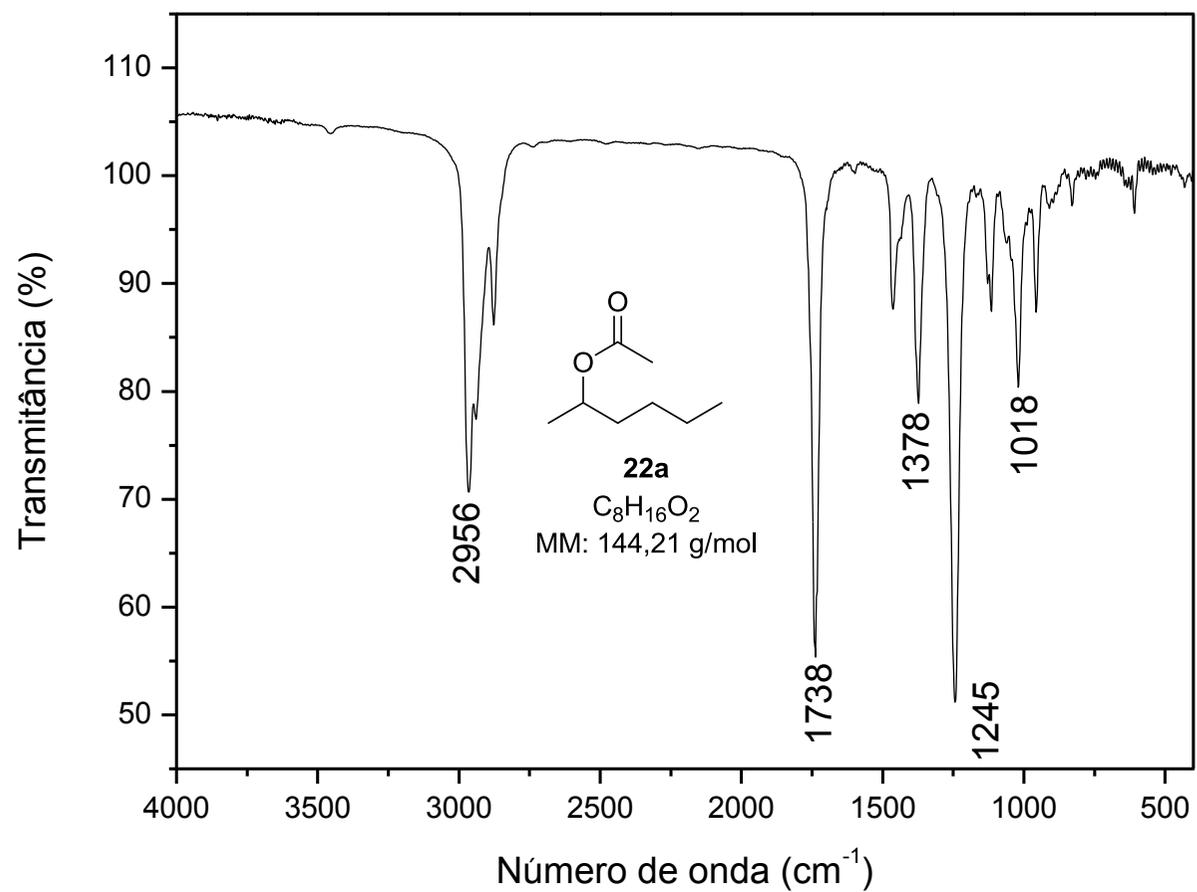
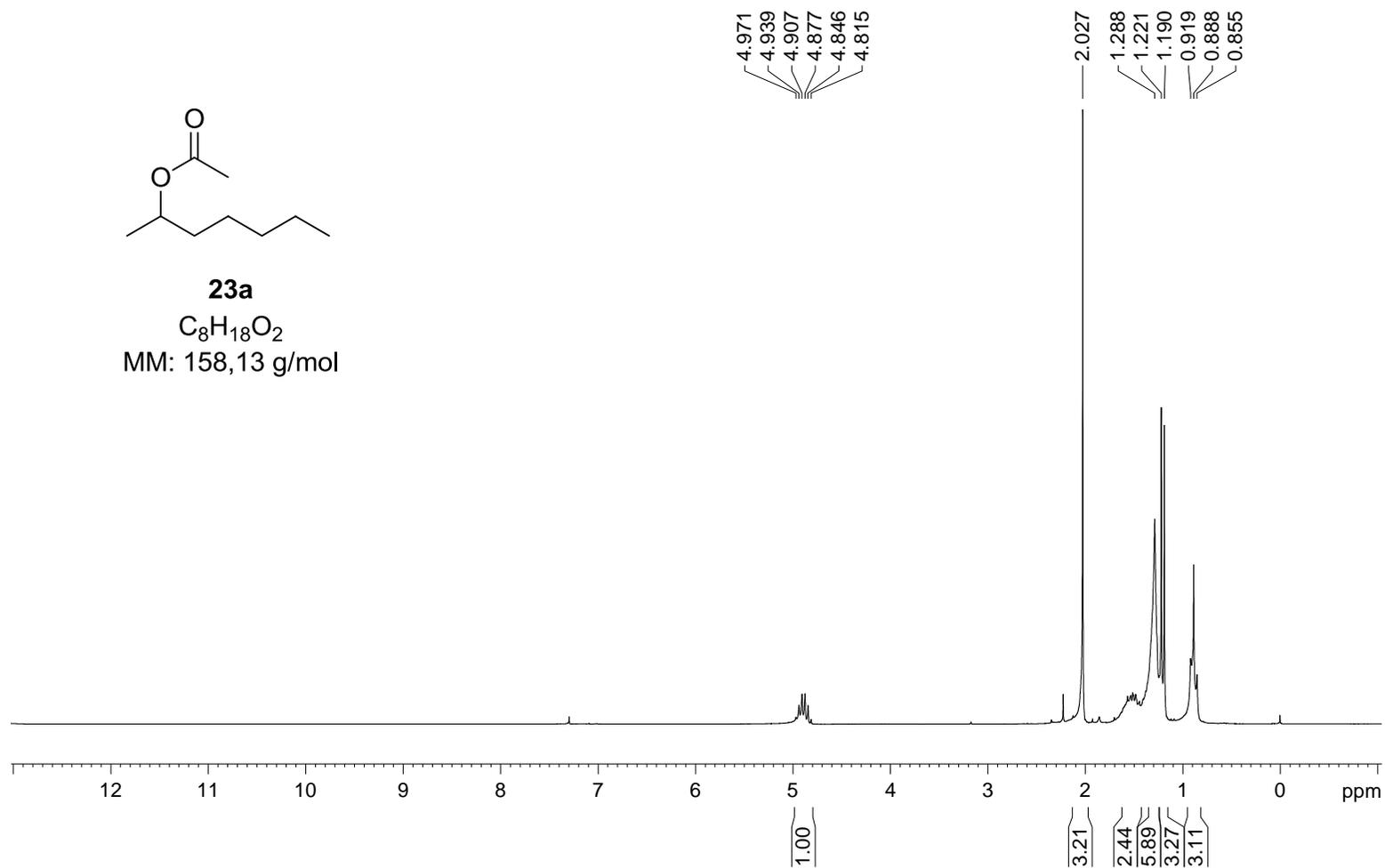


Figura 23: Espectro de RMN de  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ ) do acetato de 2-hexila (22a).

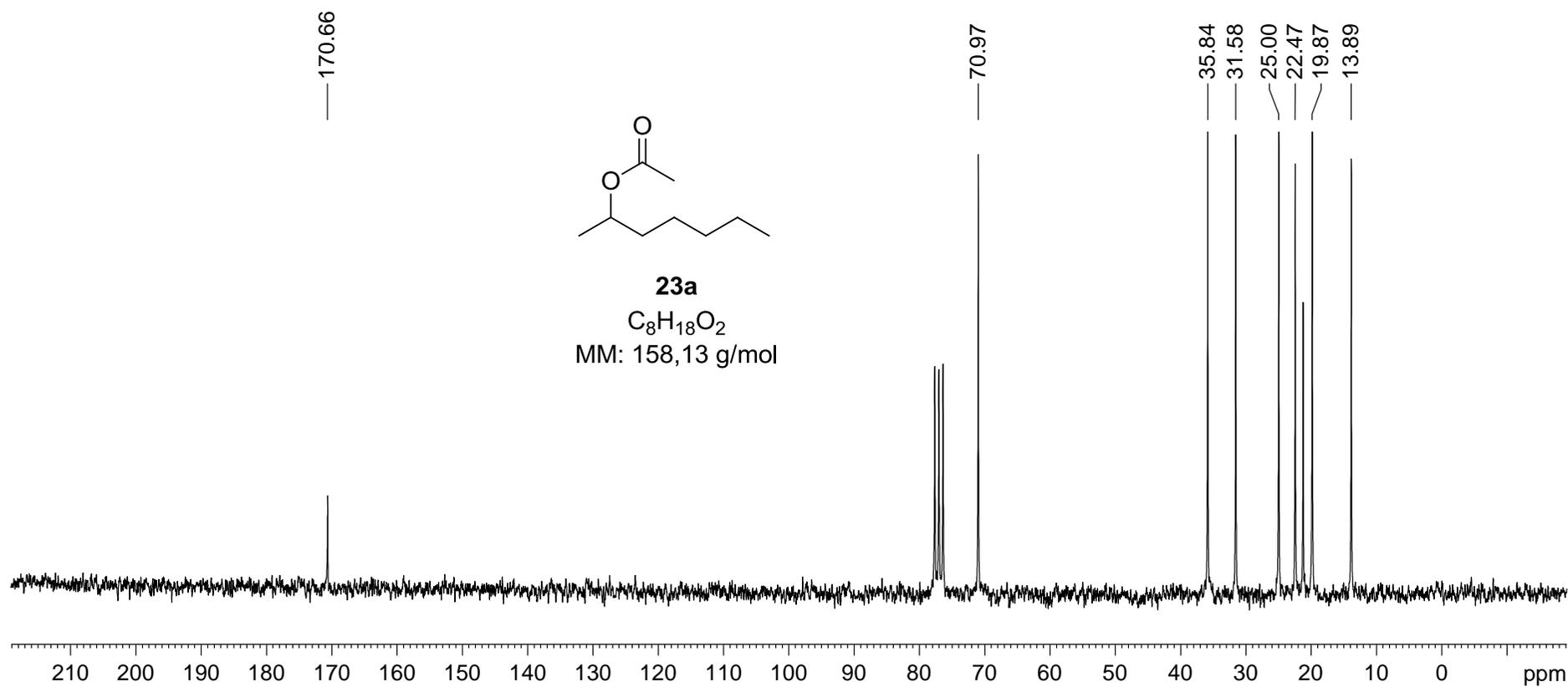


**Figura 24:** Espectro no IV do acetato de 2-hexila (**22a**).

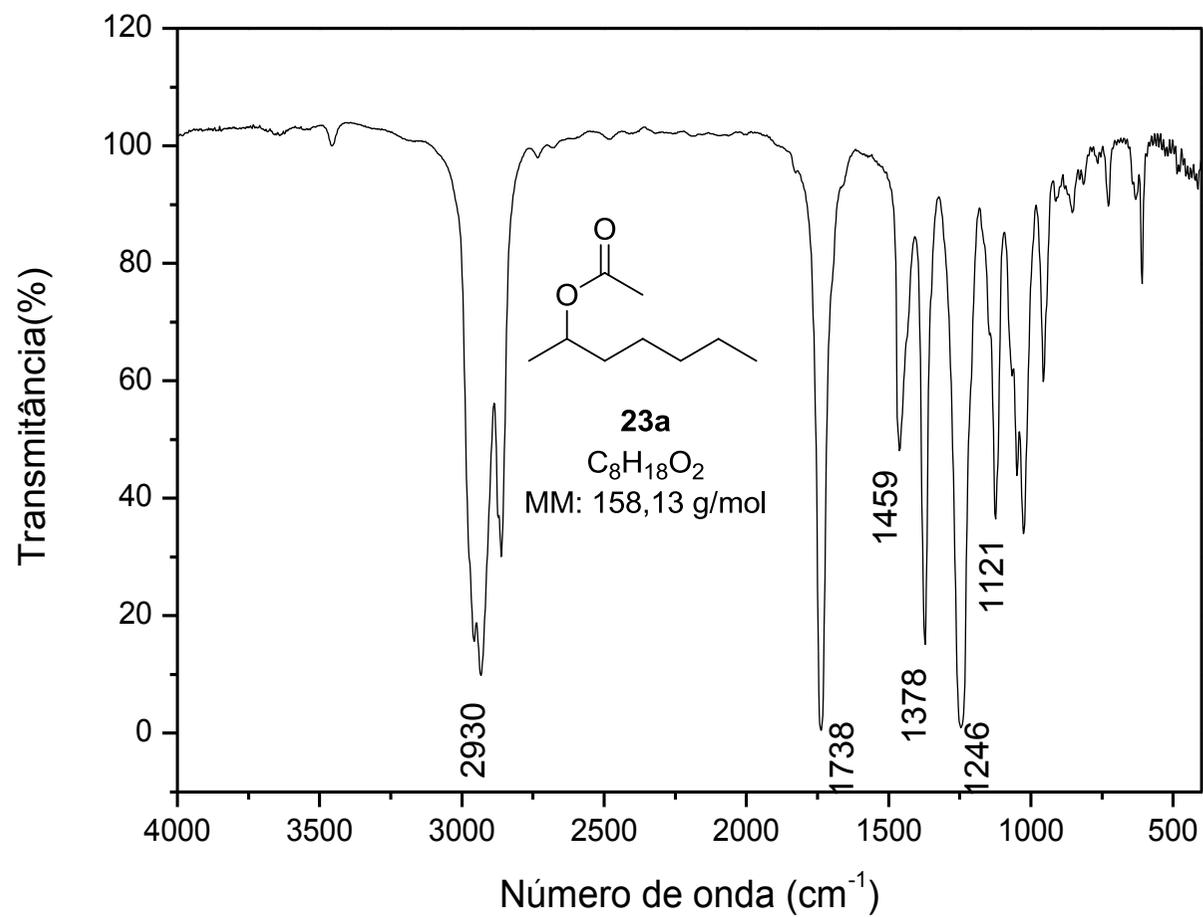
## Apêndice 9



**Figura 25:** Espectro de RMN de  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 200 MHz, TMS) do acetato de 2-heptila (**23a**).

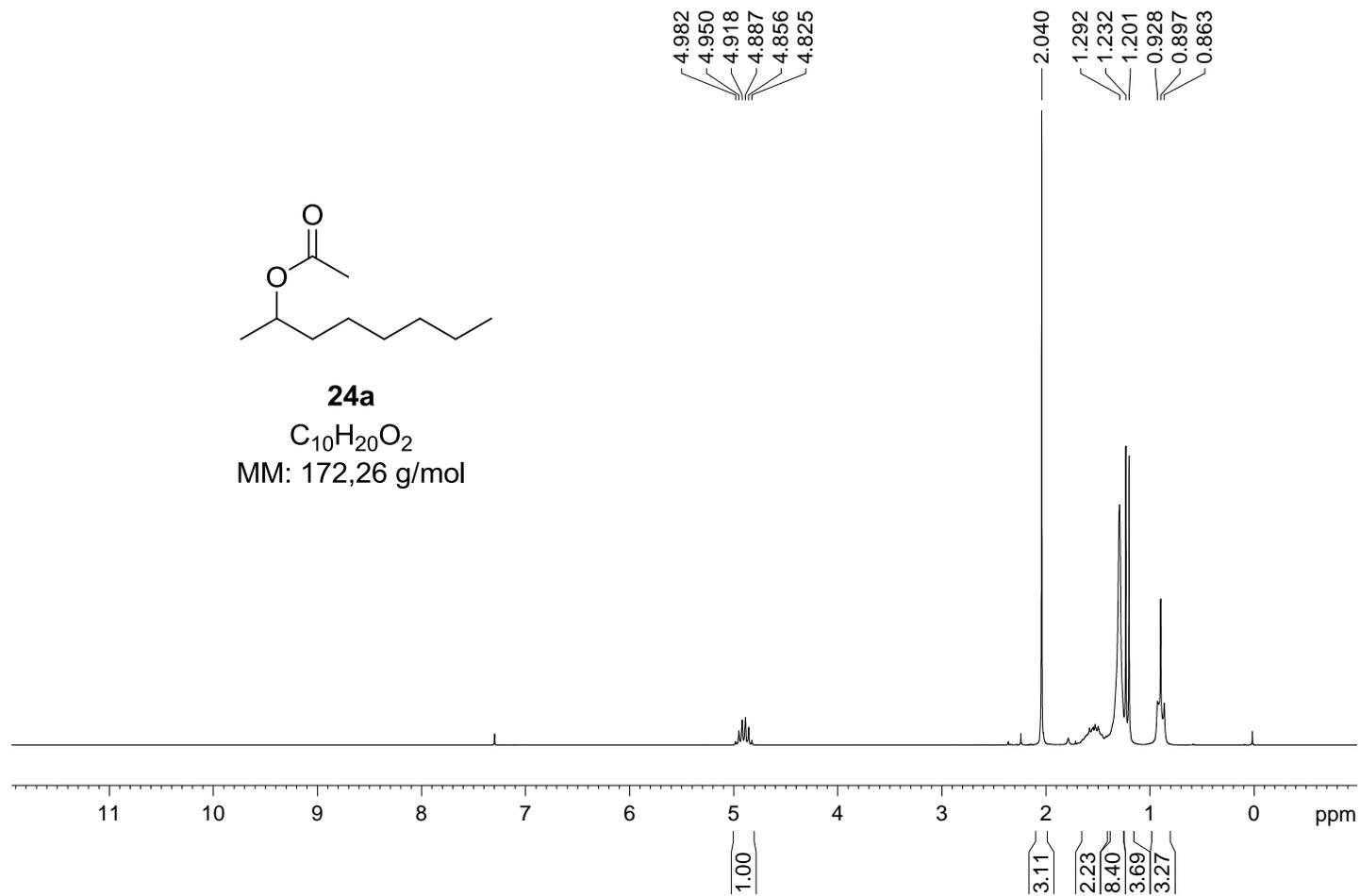


**Figura 26:** Espectro de RMN de  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 50 MHz) do acetato de 2-heptila (**23a**).



**Figura 27:** Espectro no IV do acetato de 2-heptila (**23a**).

## Apêndice 10

Figura 28: Espectro de RMN de  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 200 MHz, TMS) do acetato de 2-octila (**24a**).

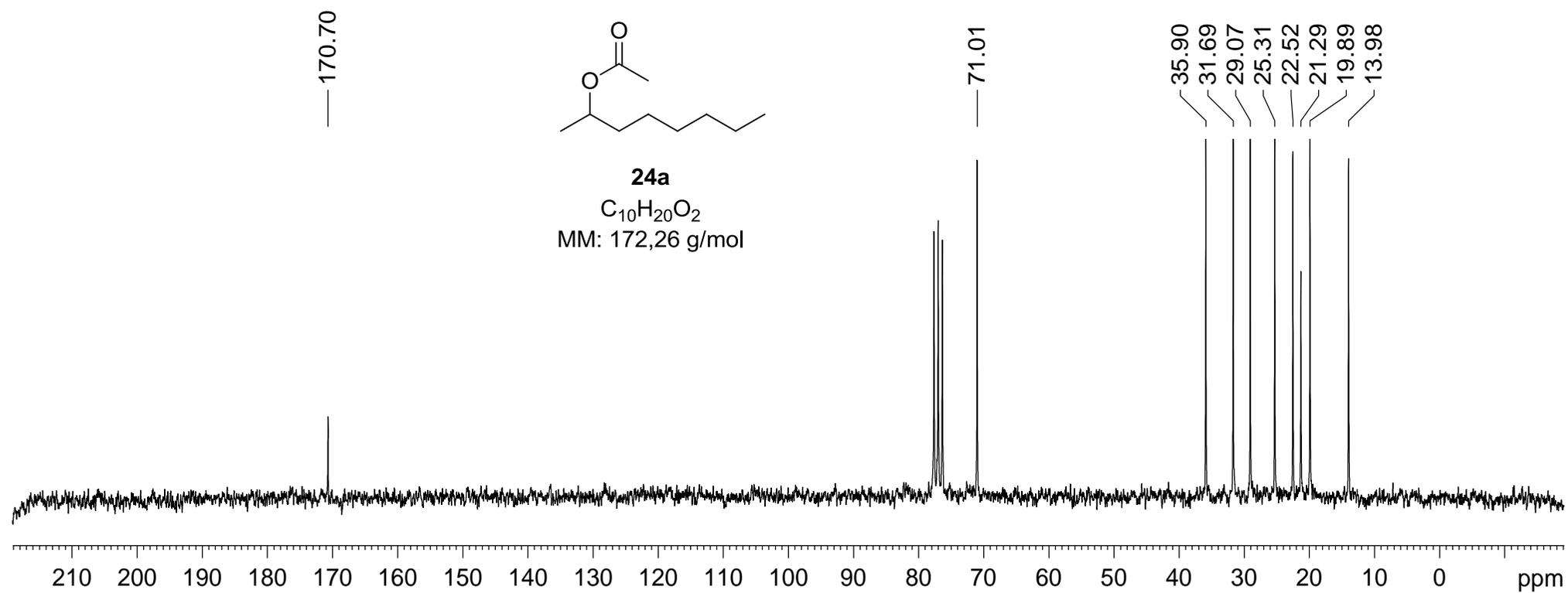


Figura 29: Espectro de RMN de  $^{13}C$  (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) do acetato de 2-octila (**24a**).

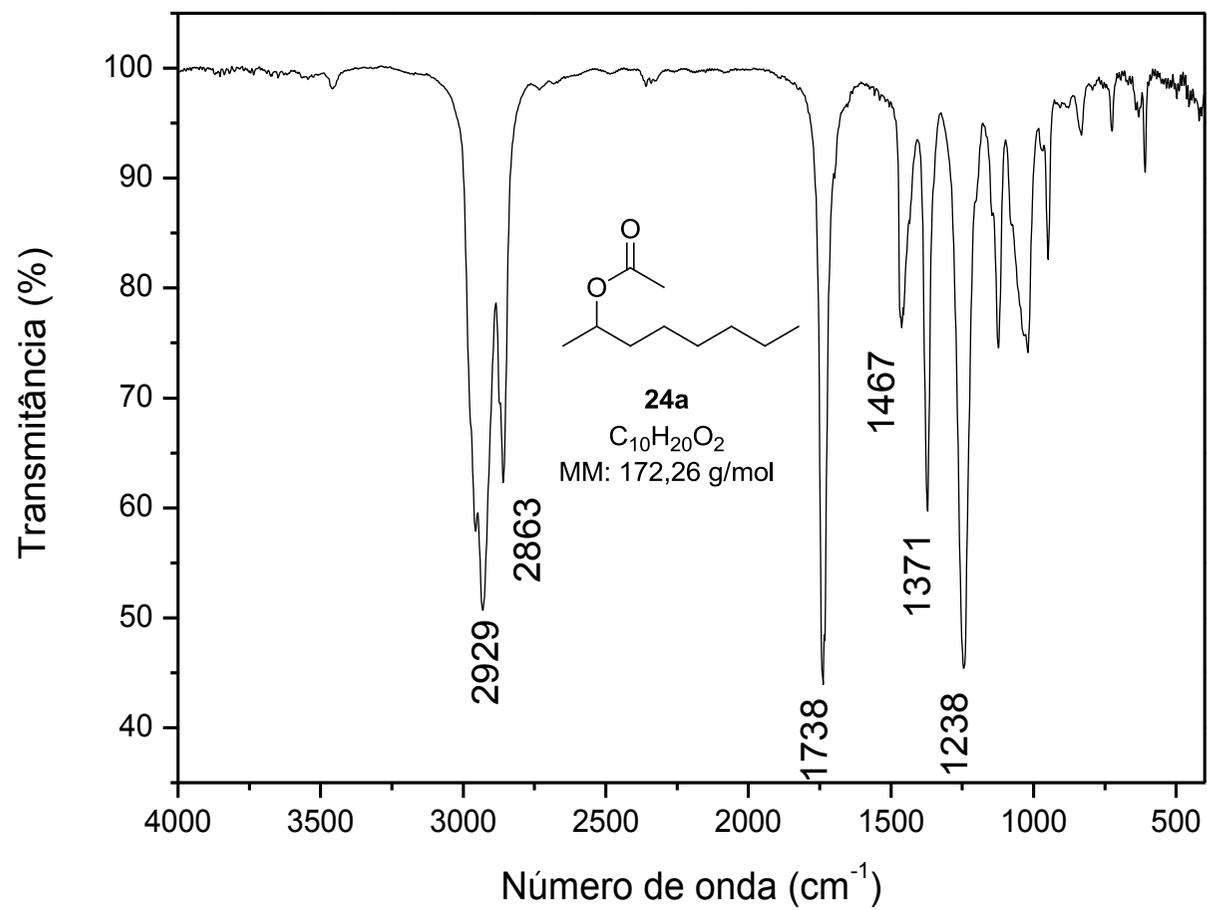
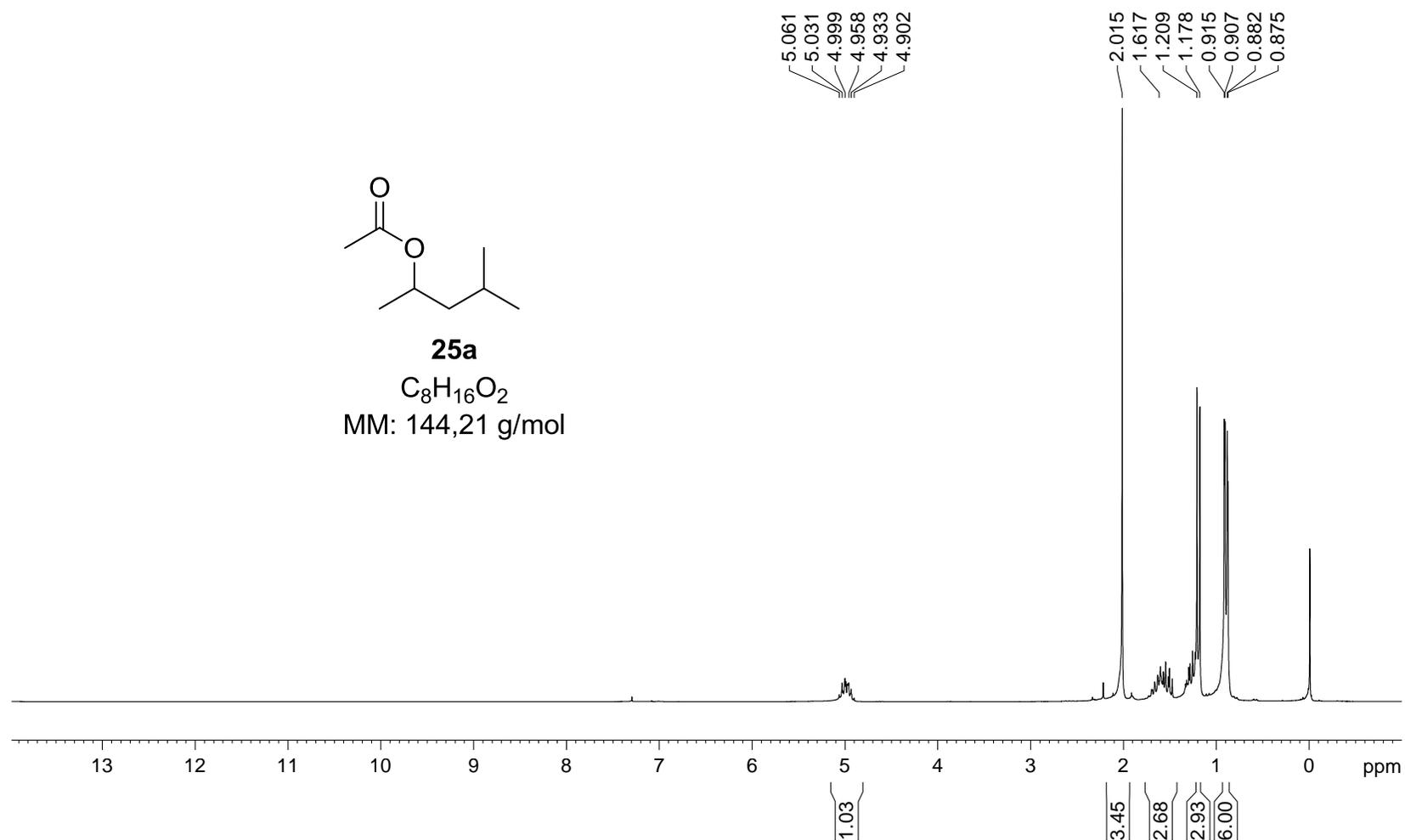


Figura 30: Espectro no IV do acetato de 2-octila (**24a**).

## Apêndice 11



**Figura 31:** Espectro de RMN de  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ ) do acetato de 4-metil-2-pentila (**25a**).

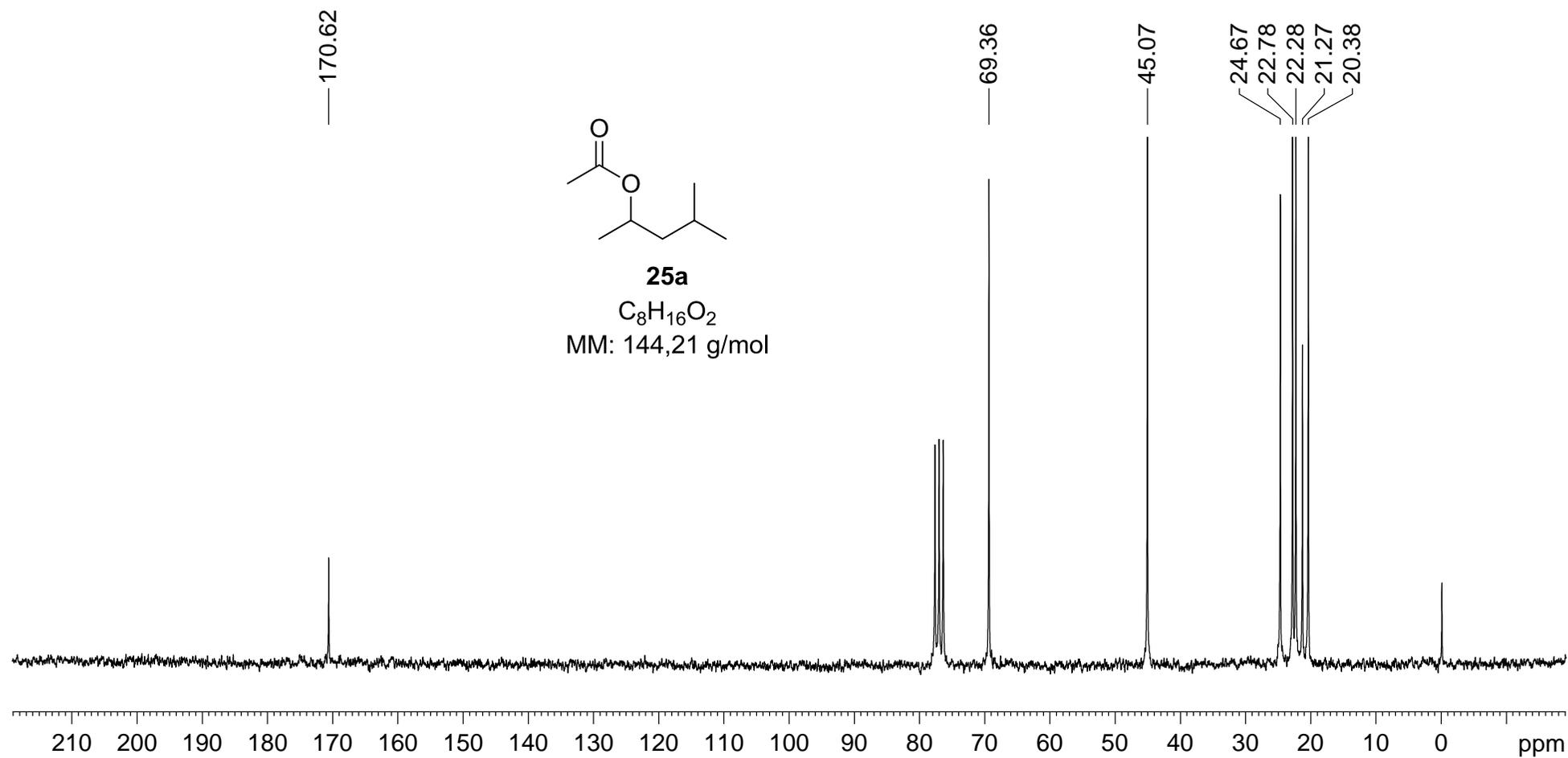
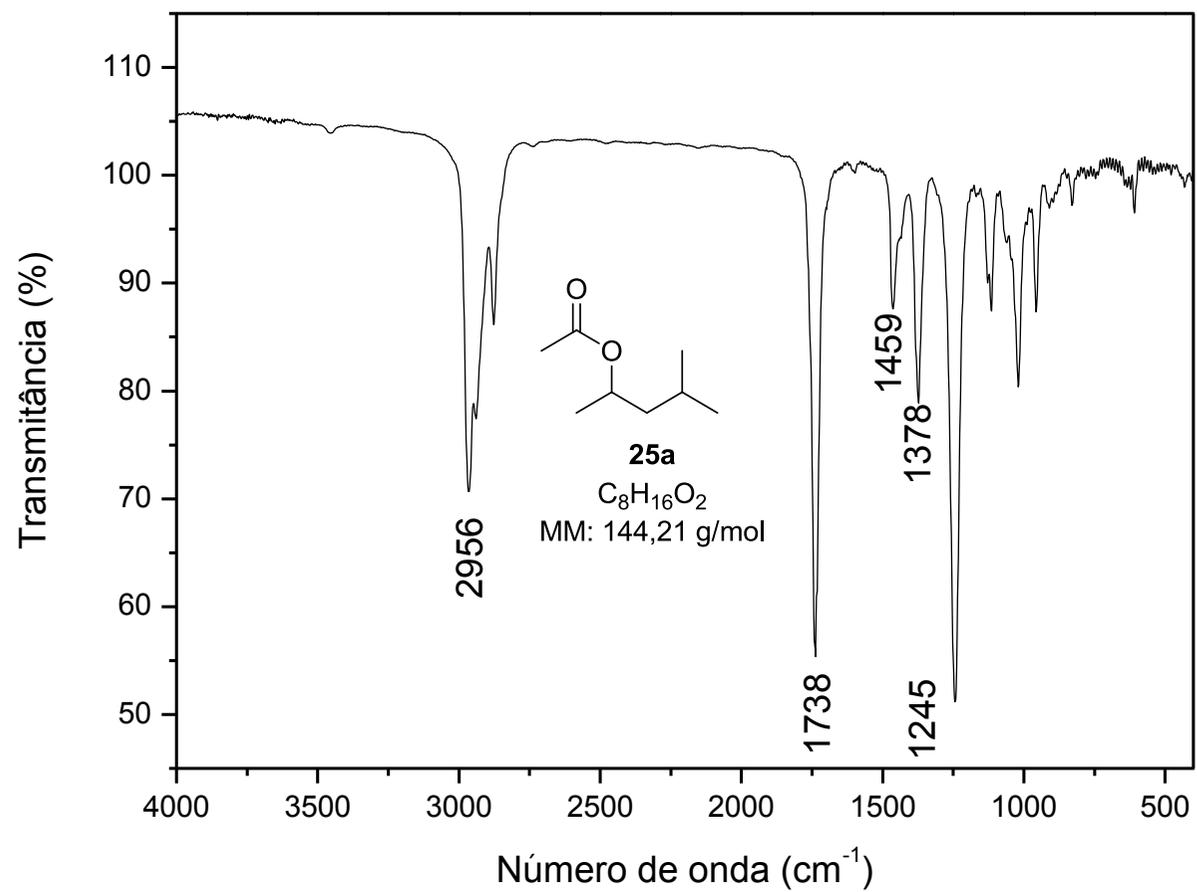


Figura 32: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do acetato de 4-metil-2-pentila (**25a**).



**Figura 33:** Espectro no IV do acetato de 4-metil-2-pentila (**25a**).

## Apêndice 12

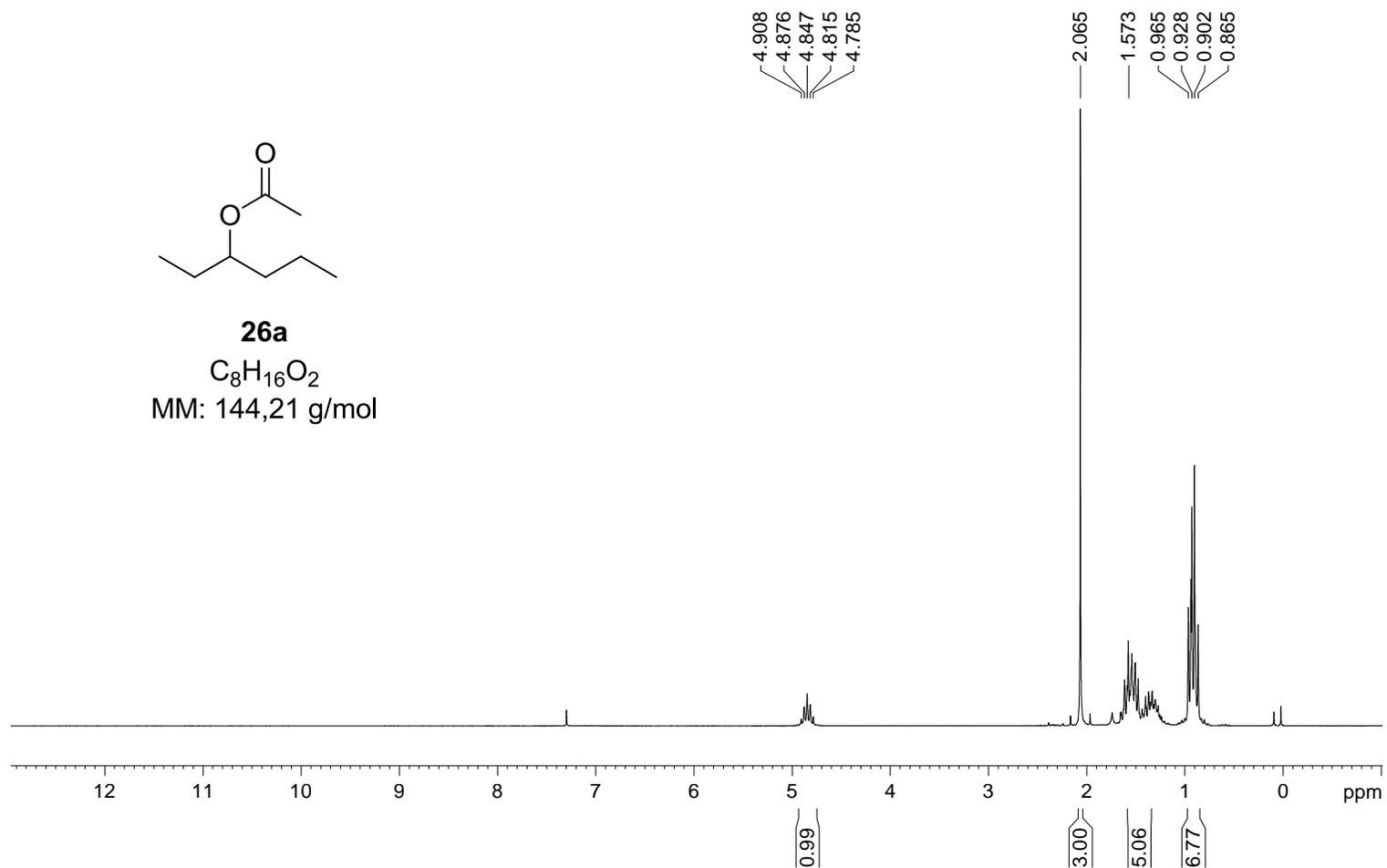


Figura 34: Espectro de RMN de  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ ) do acetato de 3-hexila (**26a**).

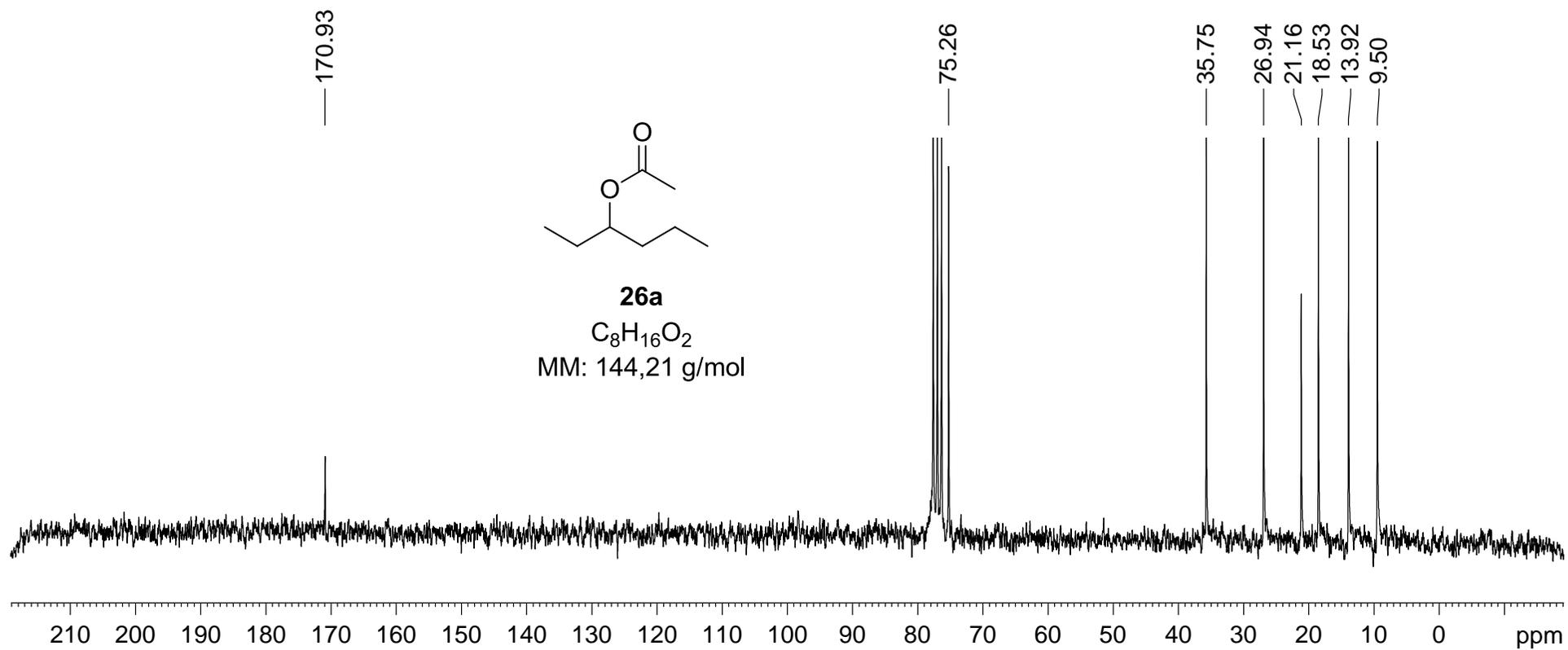
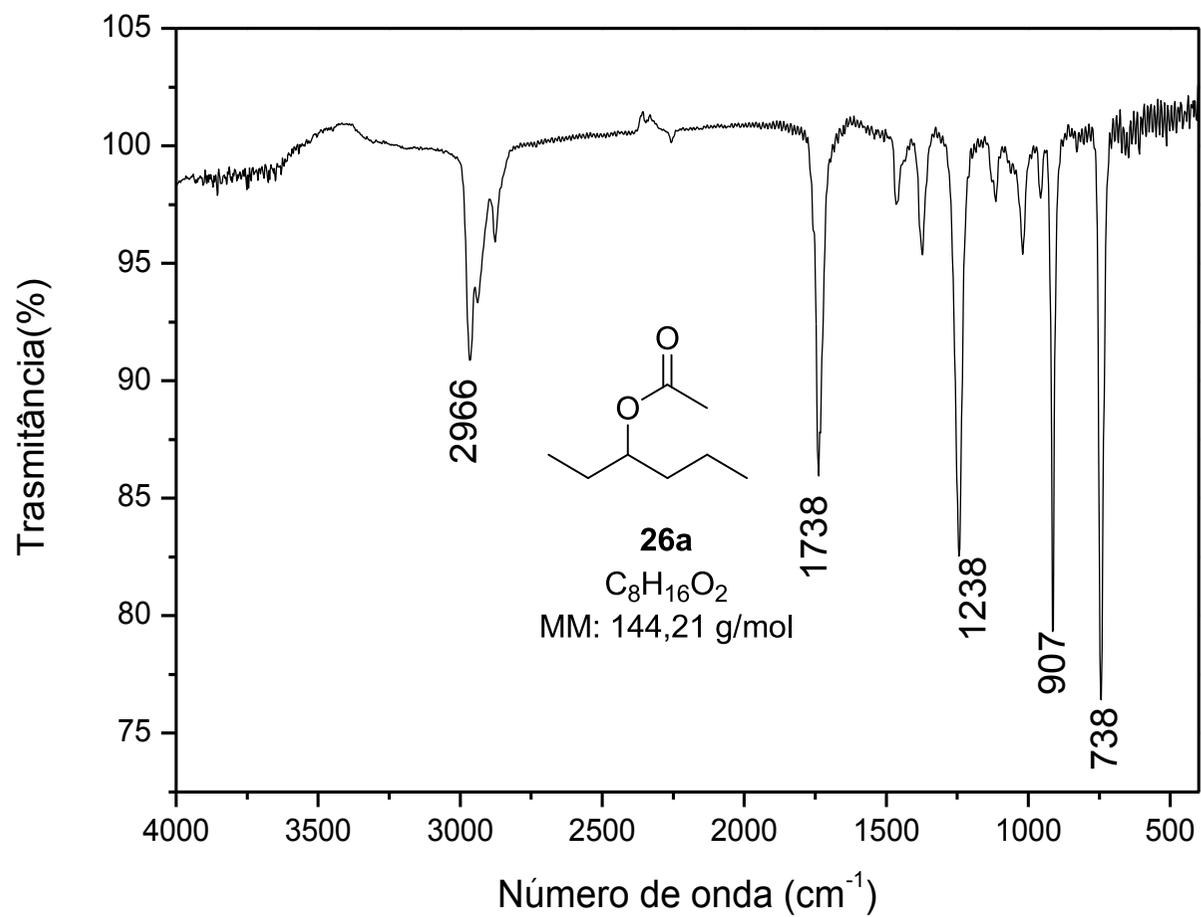
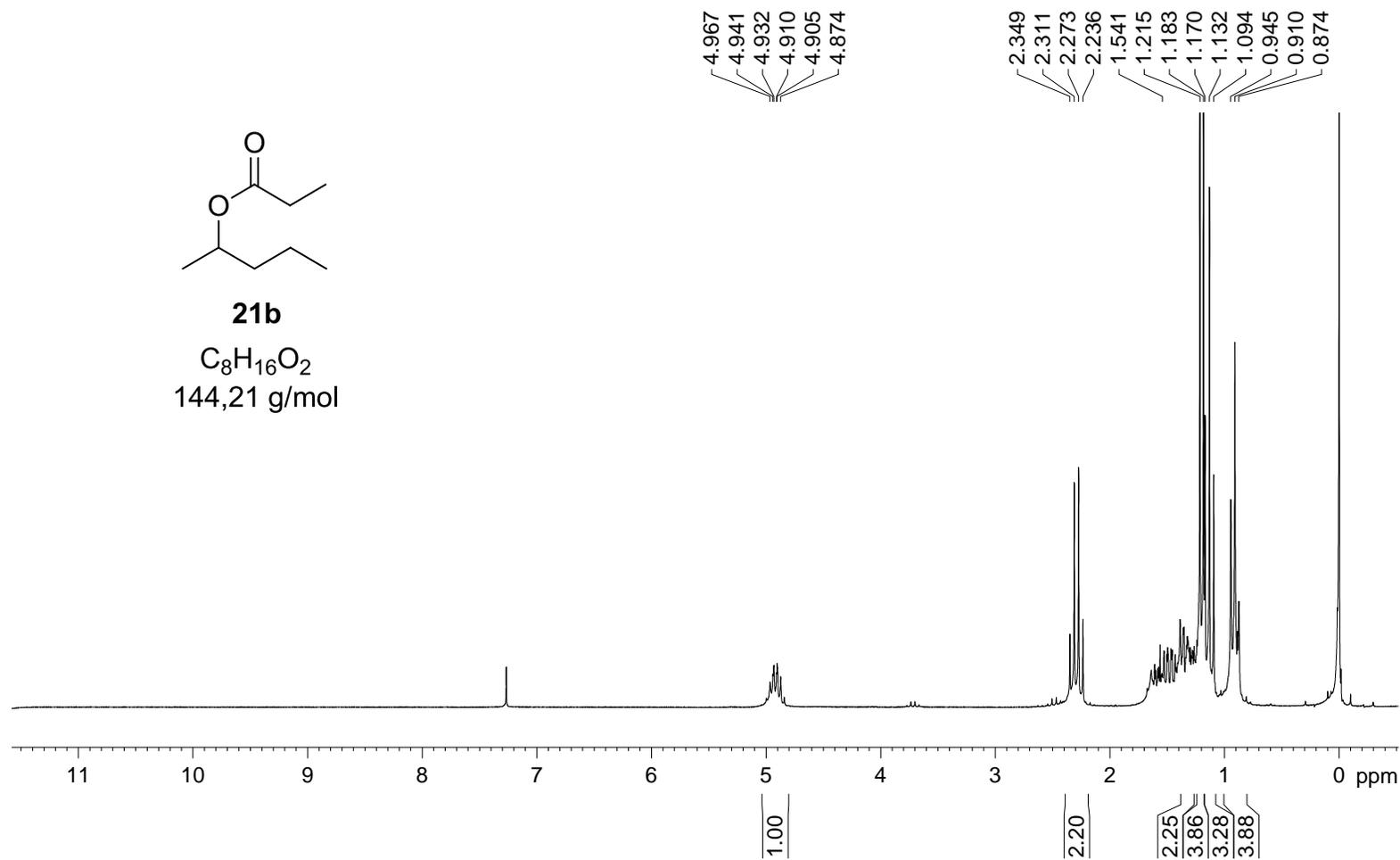


Figura 35: Espectro de RMN de  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ ) do acetato de 3-hexila (**26a**).



**Figura 36:** Espectro no IV do acetato de 3-hexila (**26a**).

## Apêndice 13



**Figura 37:** Espectro de RMN de  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ ) do propionato de 2-pentila (**21b**).

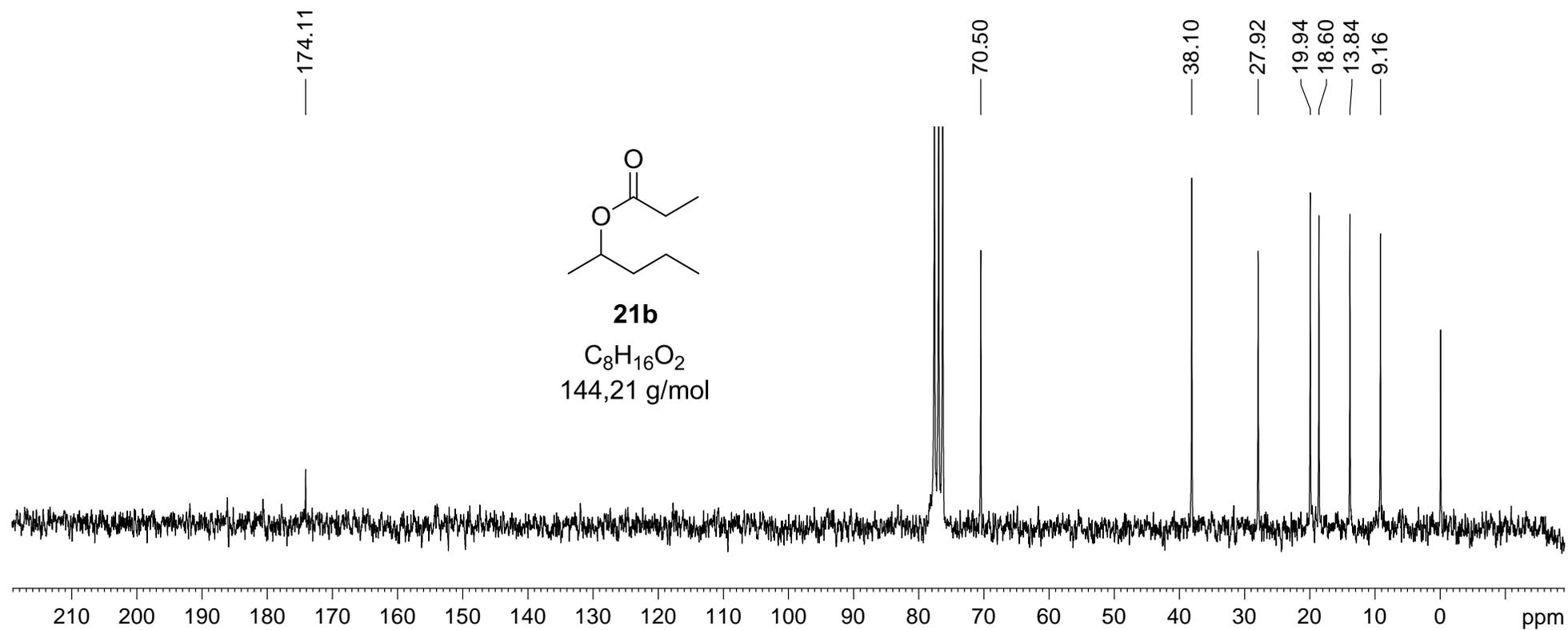


Figura 38: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do propionato de 2-pentila (21b).

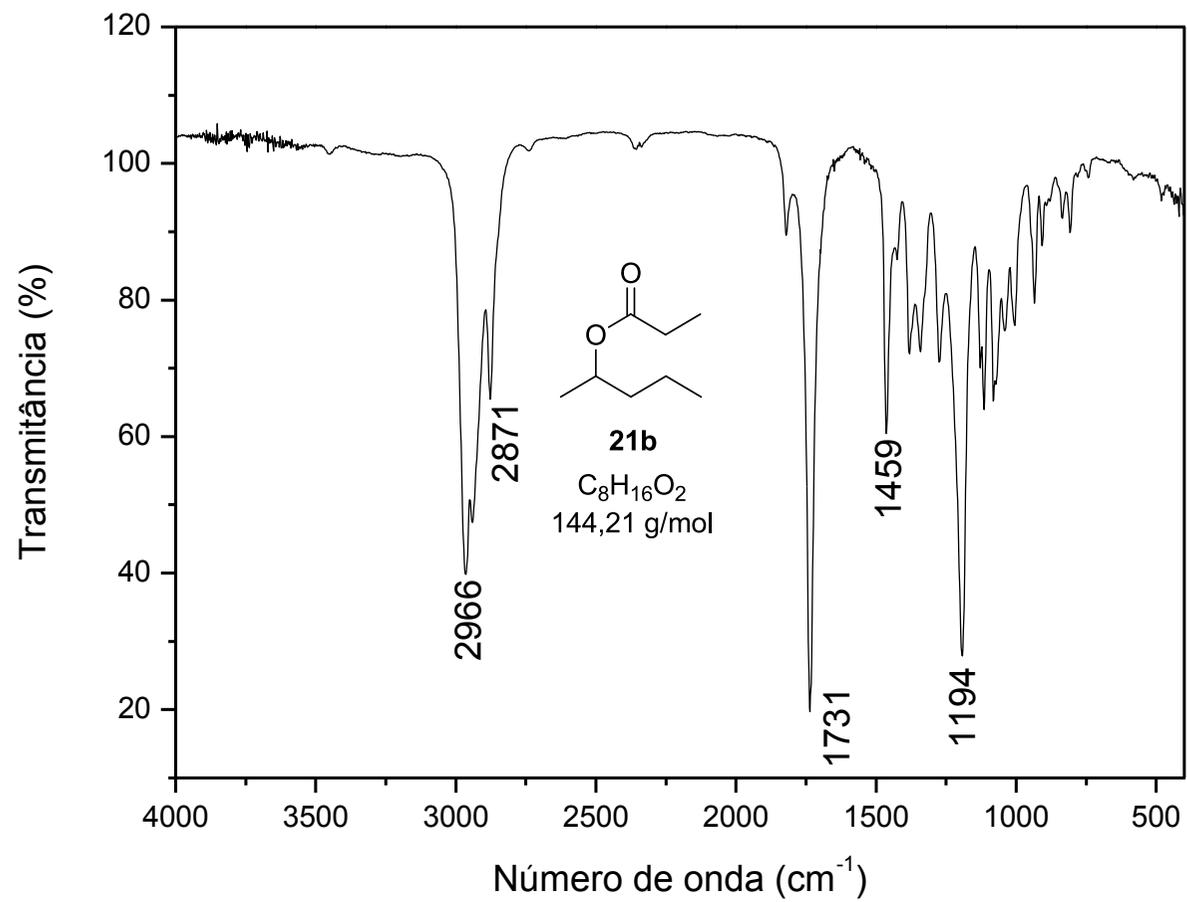


Figura 39: Espectro no IV do propionato de 2-pentila (**21b**).

## Apêndice 14

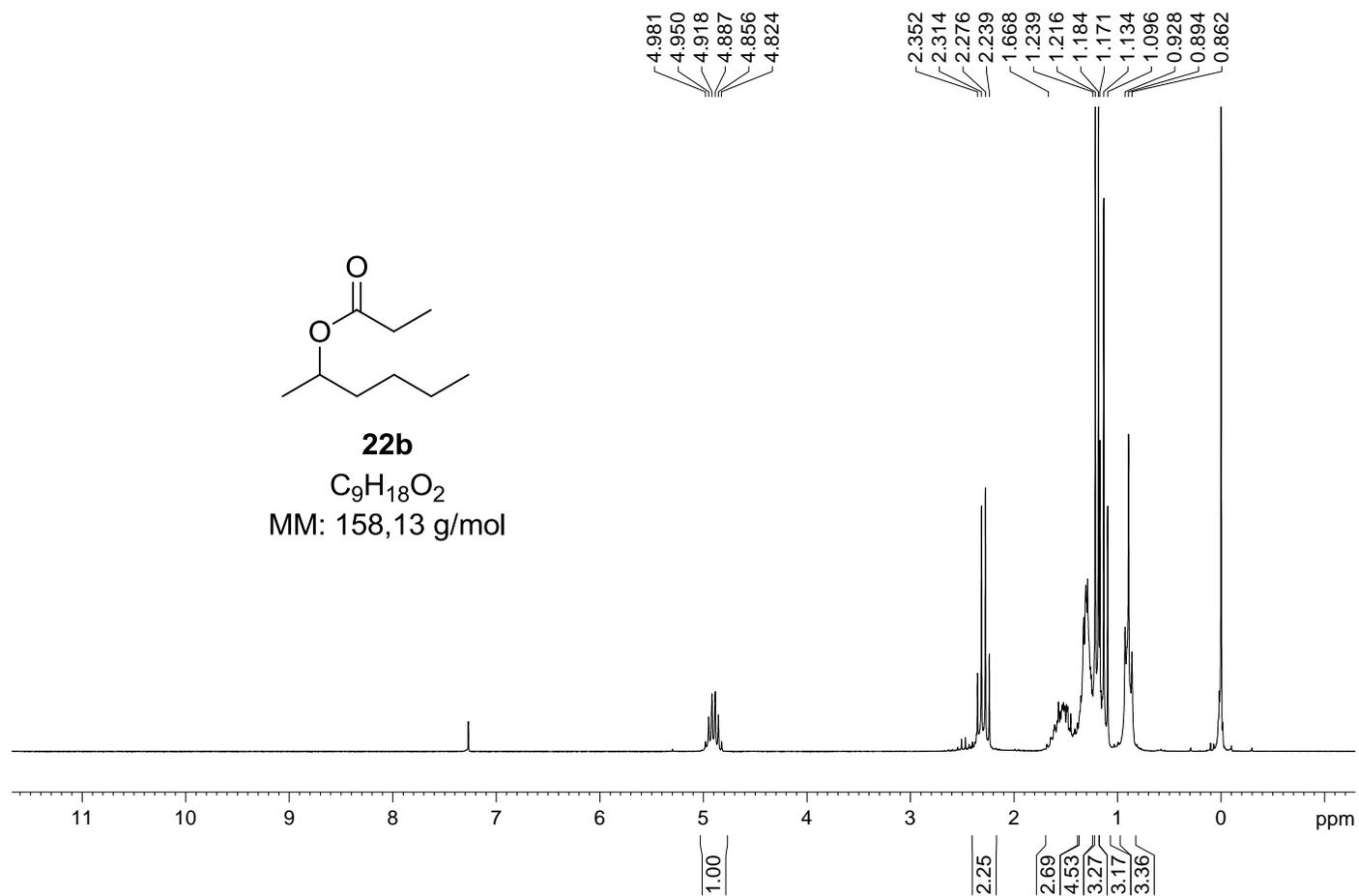
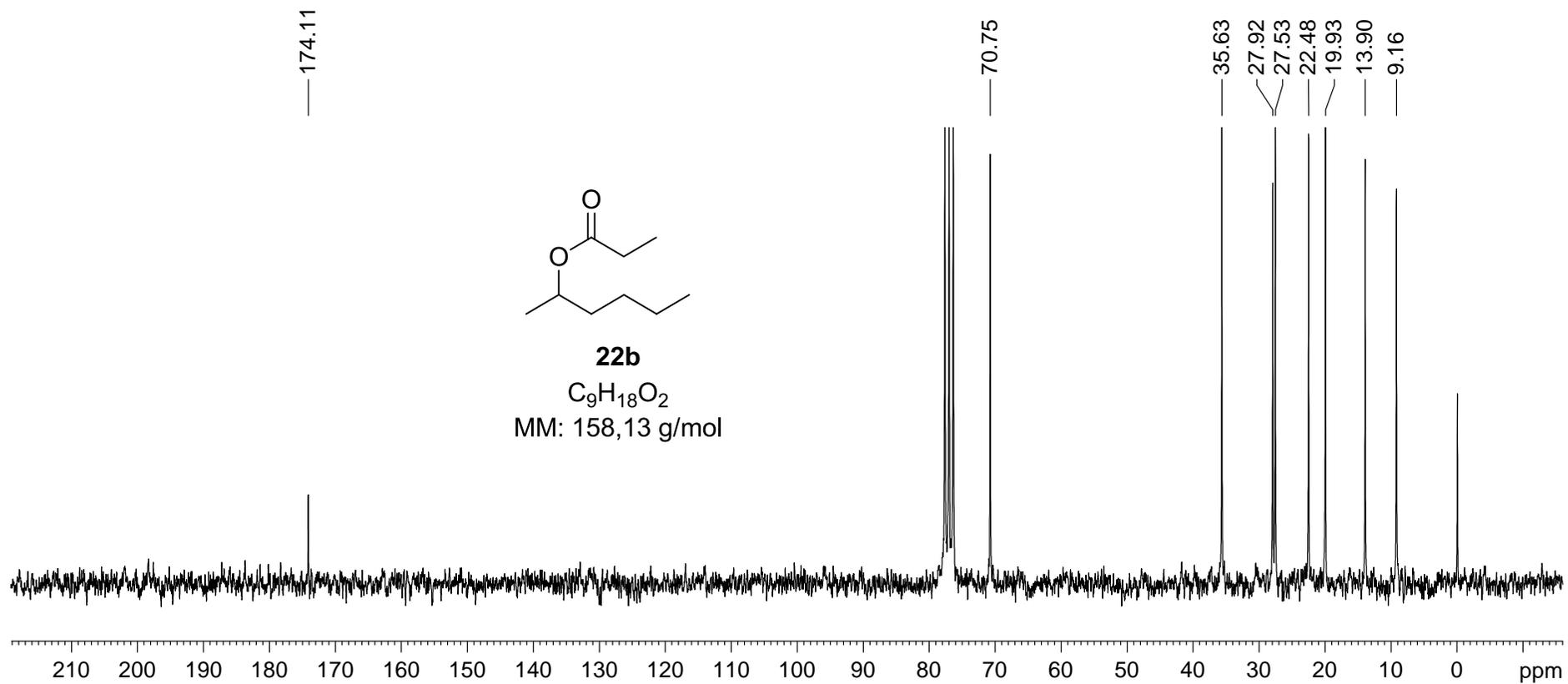
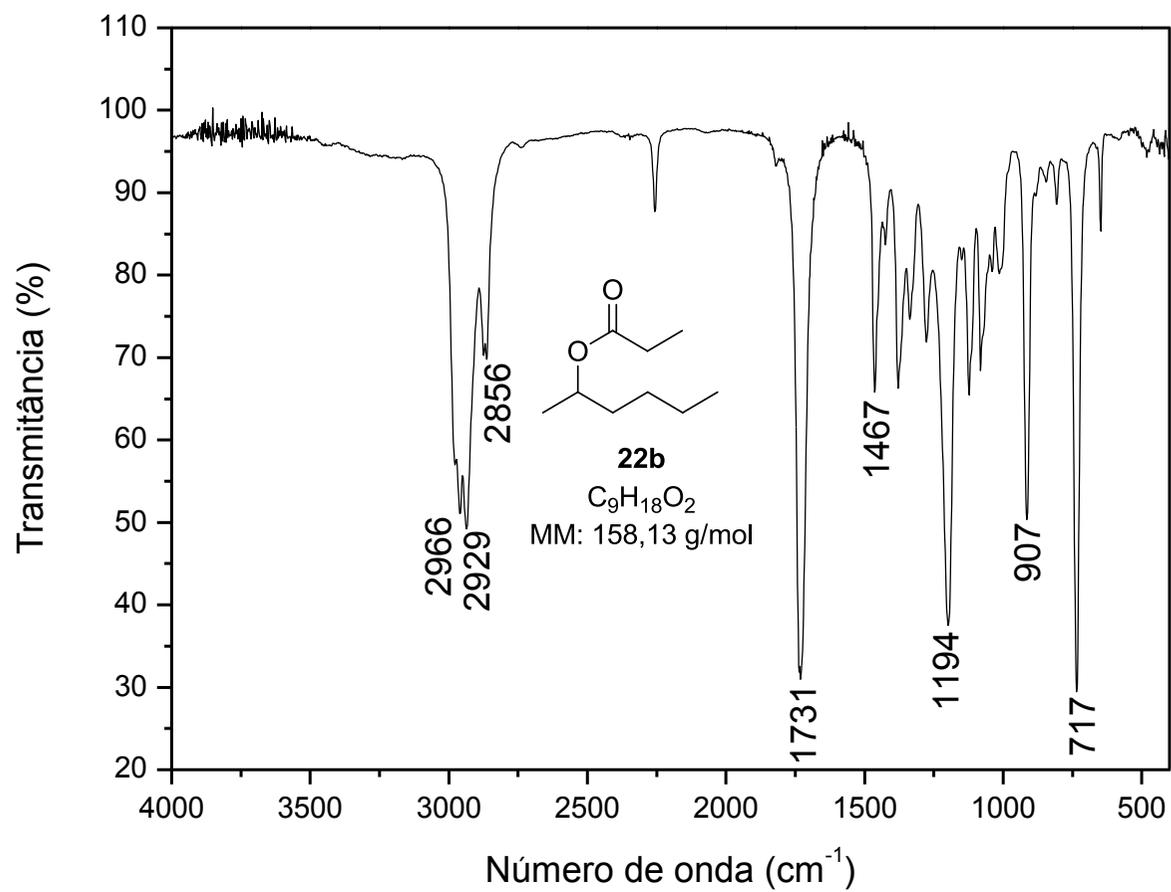


Figura 40: Espectro de RMN de  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ ) do propionato de 2-hexila (**22b**).

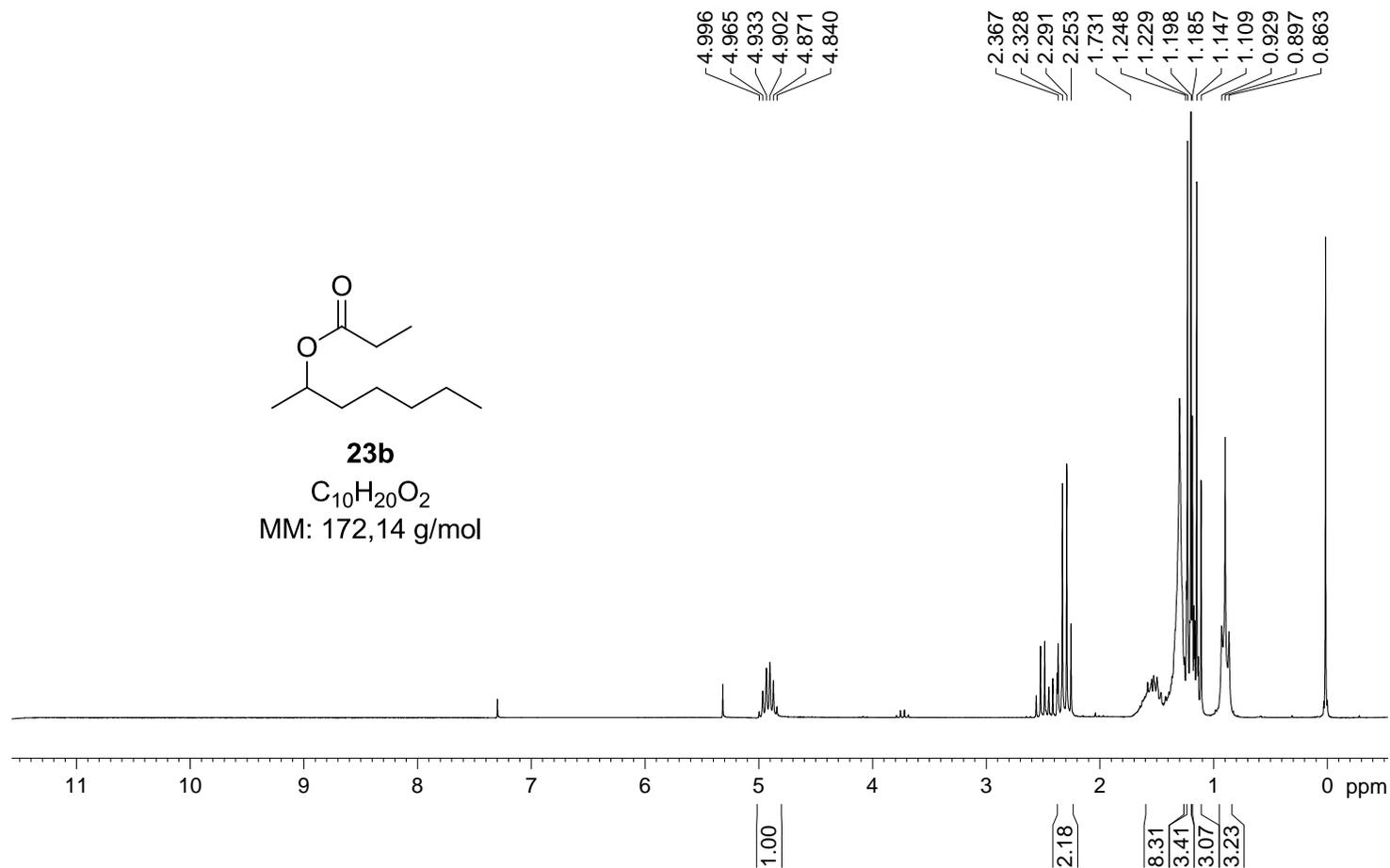


**Figura 41:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do propionato de 2-hexila (**22b**).

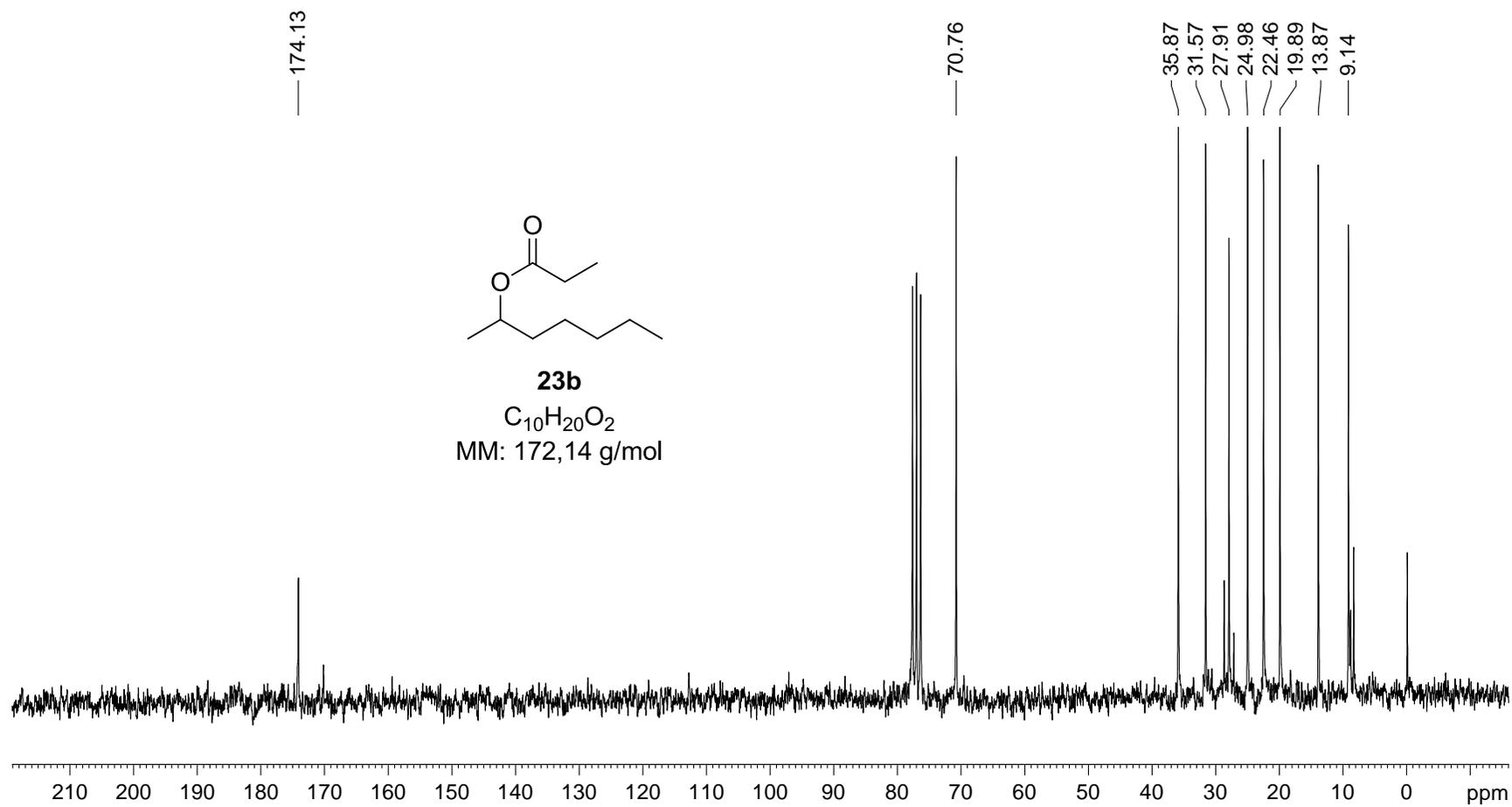


**Figura 42:** Espectro no IV do propionato de 2-hexila (**22b**).

## Apêndice 15



**Figura 43:** Espectro de RMN de  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ ) do propionato de 2-heptila (**23b**).



**Figura 44:** Espectro de RMN de  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ ) do propionato de 2-heptila (**23b**).

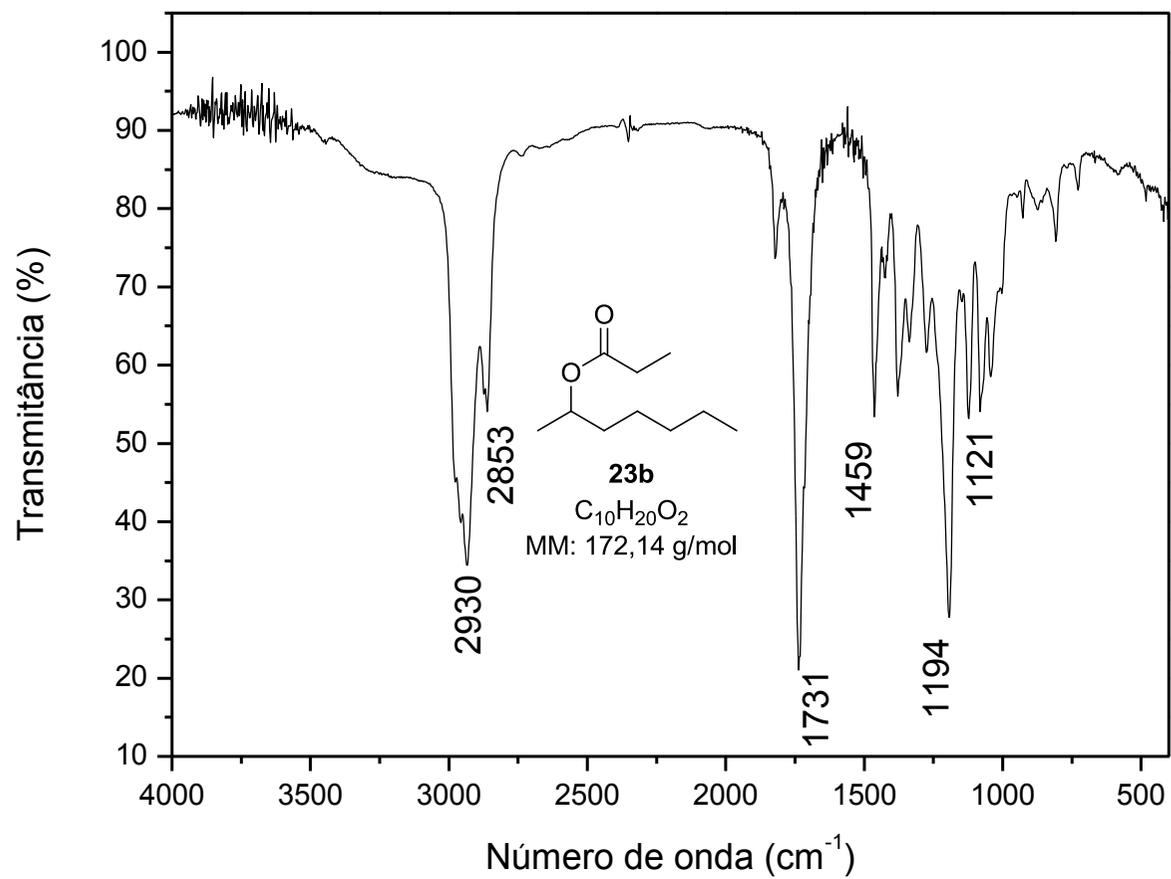
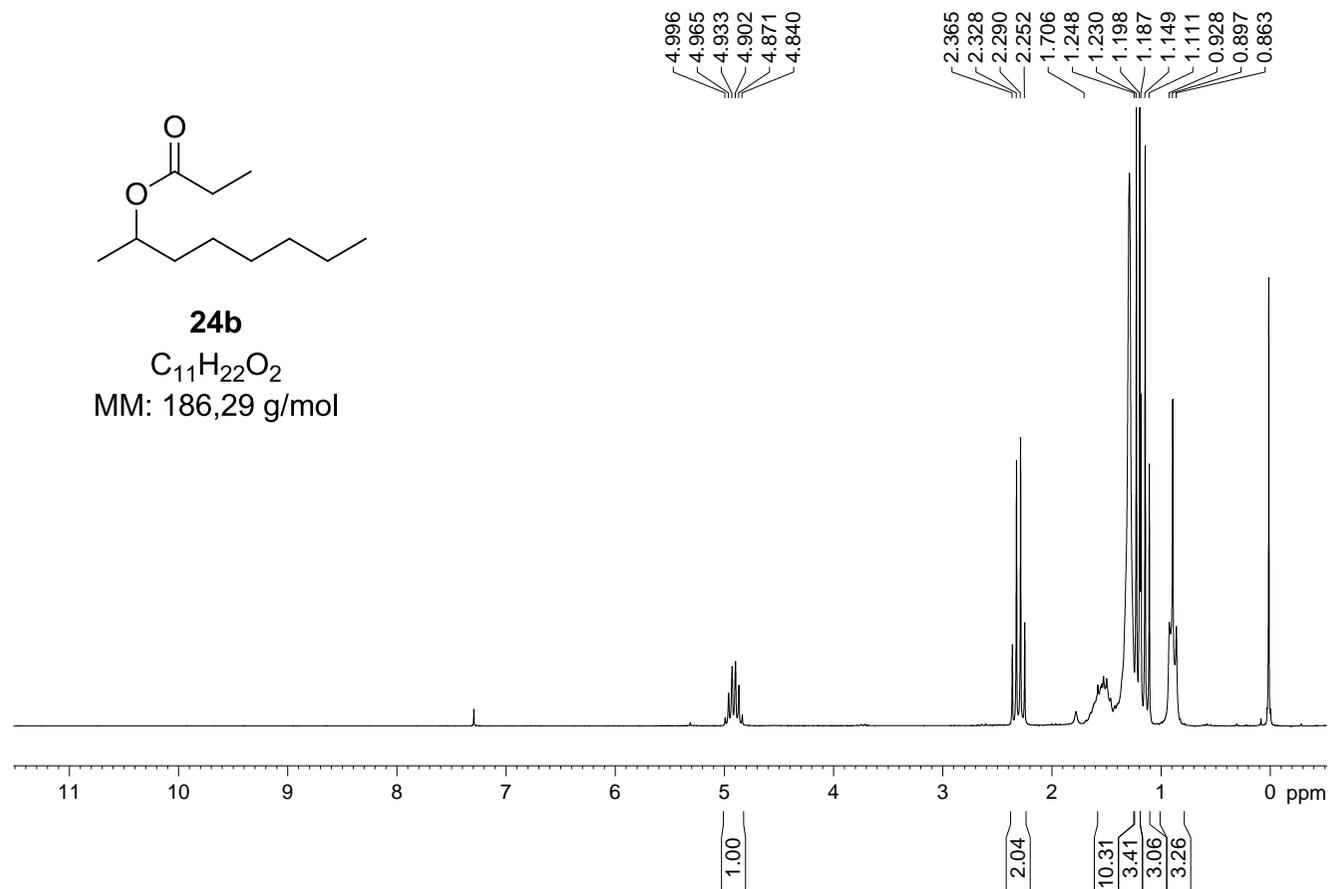
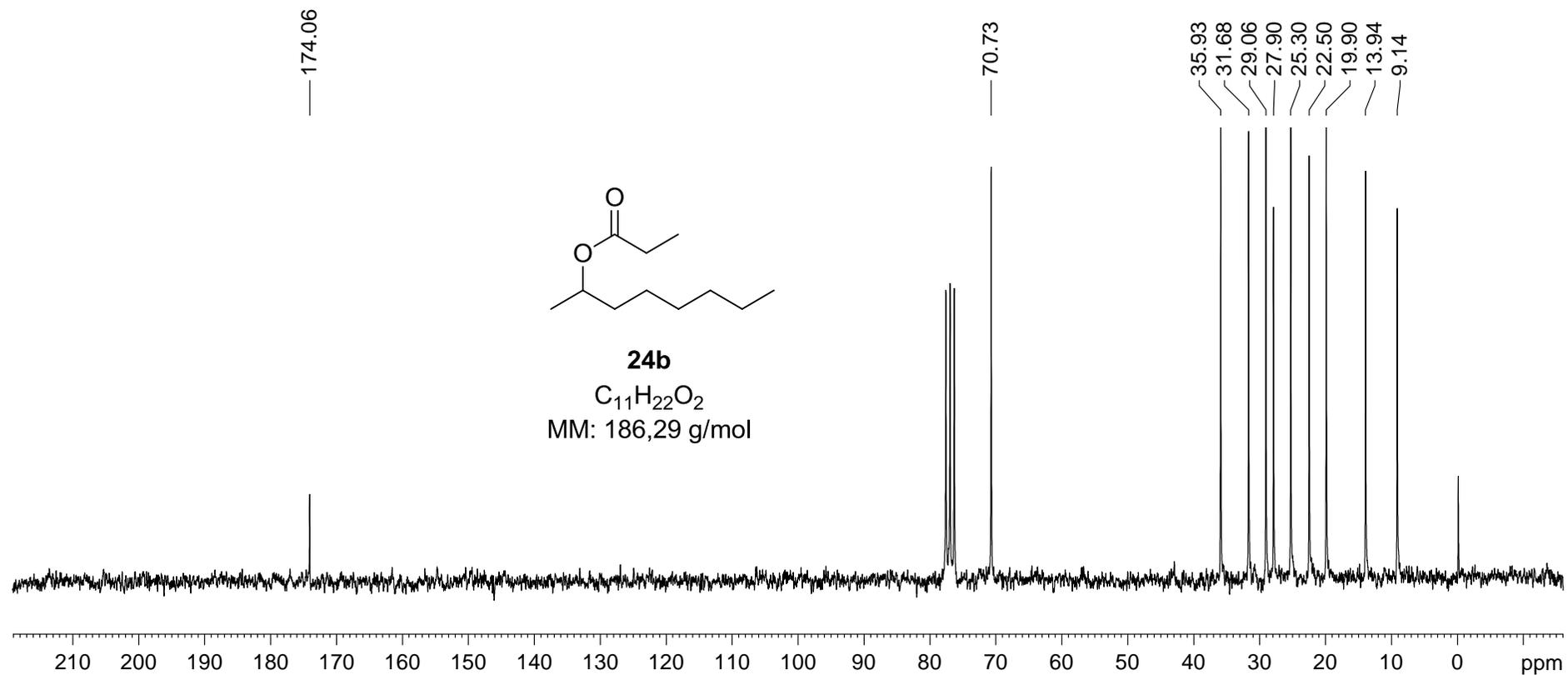


Figura 45: Espectro no IV do propionato de 2-heptila (23b).

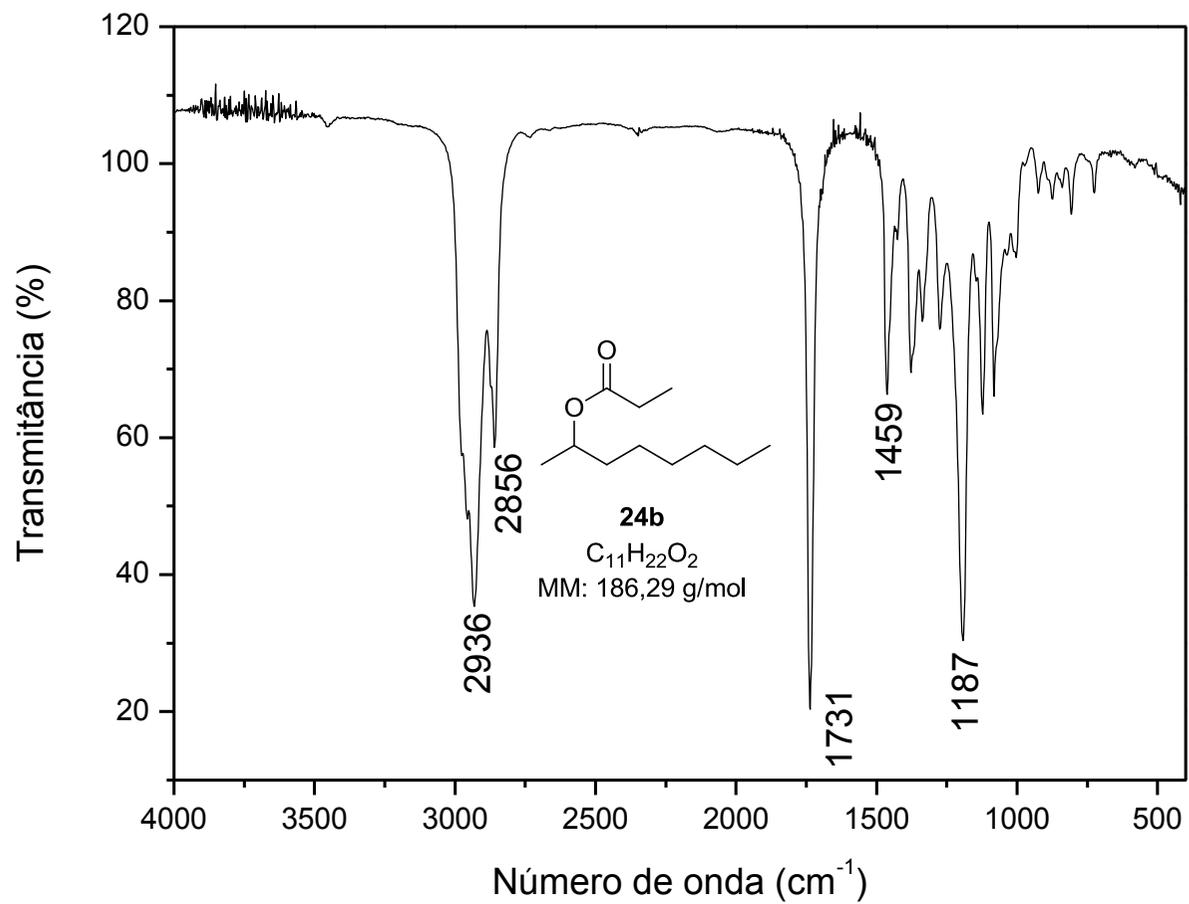
## Apêndice 16



**Figura 46:** Espectro de RMN de  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ ) do propionato de 2-octila (**24b**).

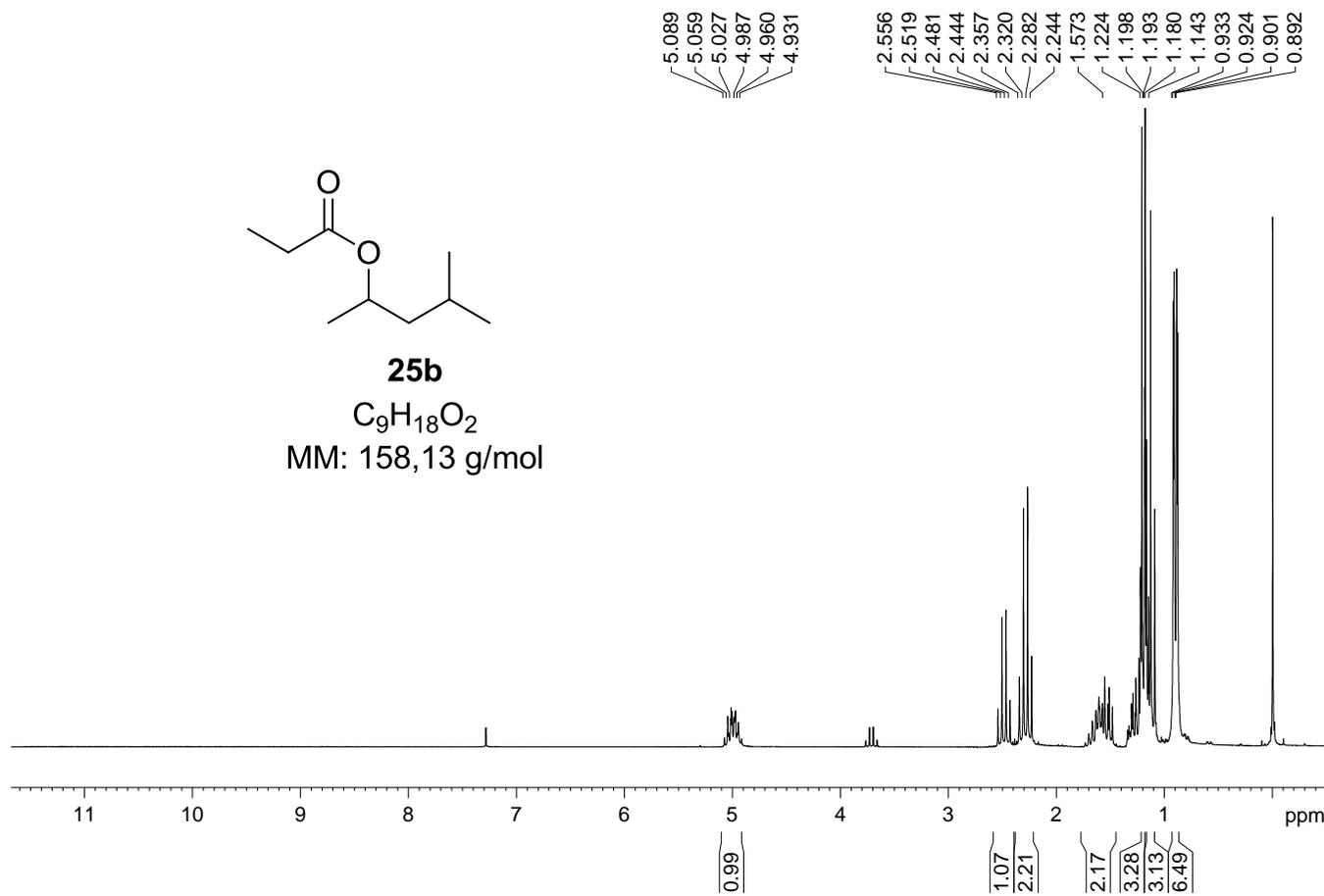


**Figura 47:** Espectro de RMN de  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ ) do propionato de 2-octila (**24b**).

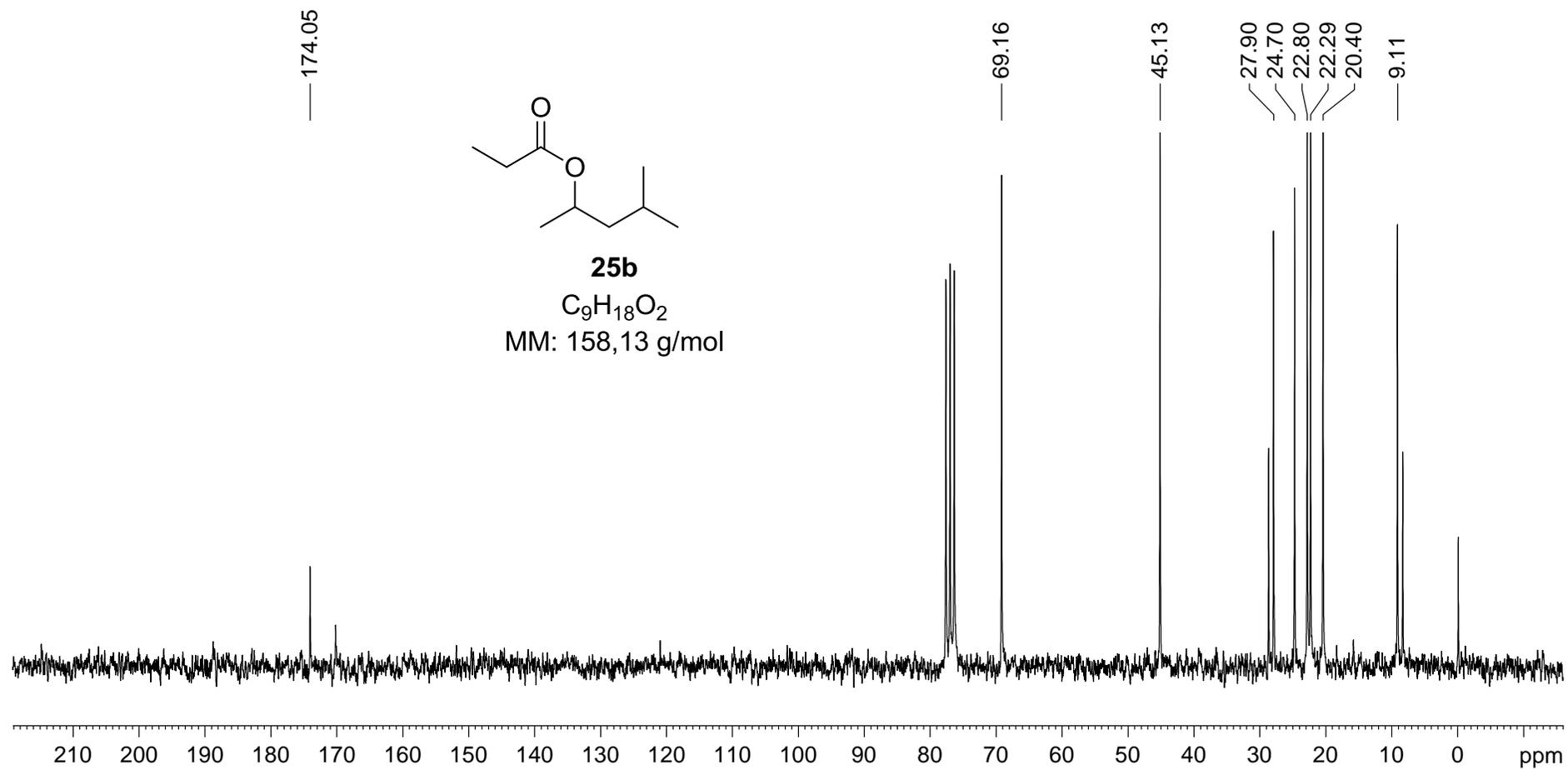


**Figura 48:** Espectro no IV do propionato de 2-octila (**24b**).

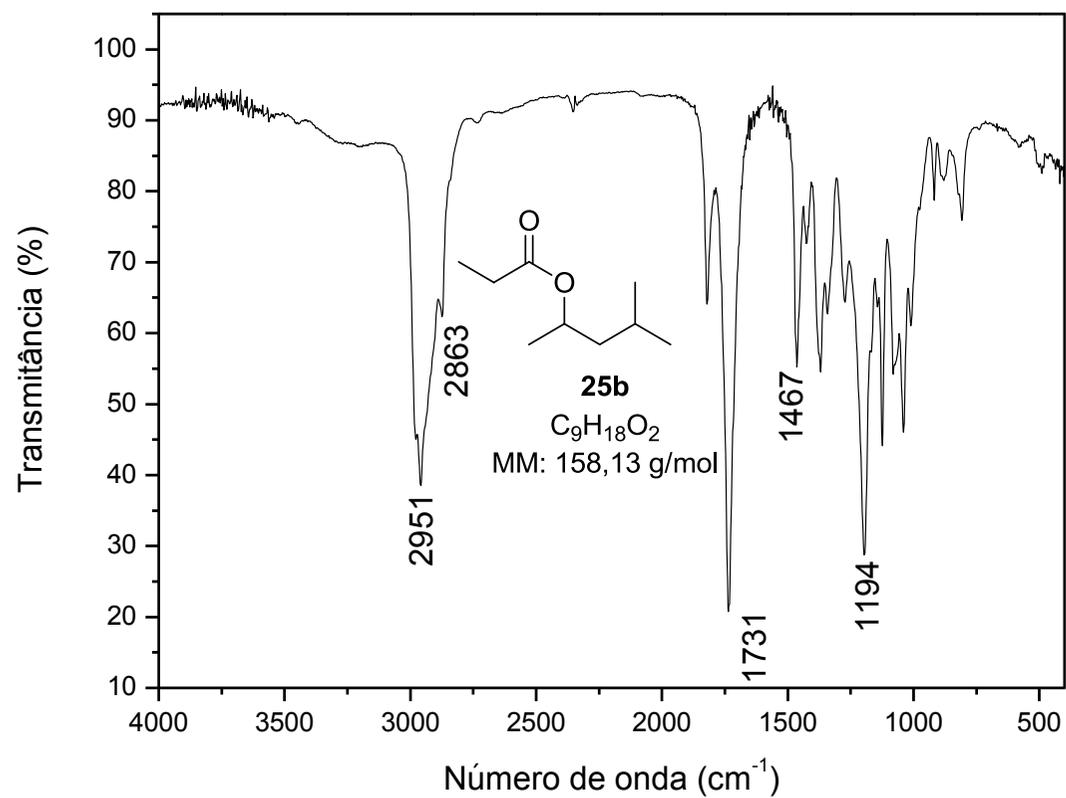
## Apêndice 17



**Figura 49:** Espectro de RMN de  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ ) do propionato de 4-metil-2-pentila (**25b**).



**Figura 50:** Espectro de RMN de  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ ) do propionato de 4-metil-2-pentila (**25b**).



**Figura 51:** Espectro no IV do propionato de 4-metil-2-pentila (**25b**).

## Apêndice 18

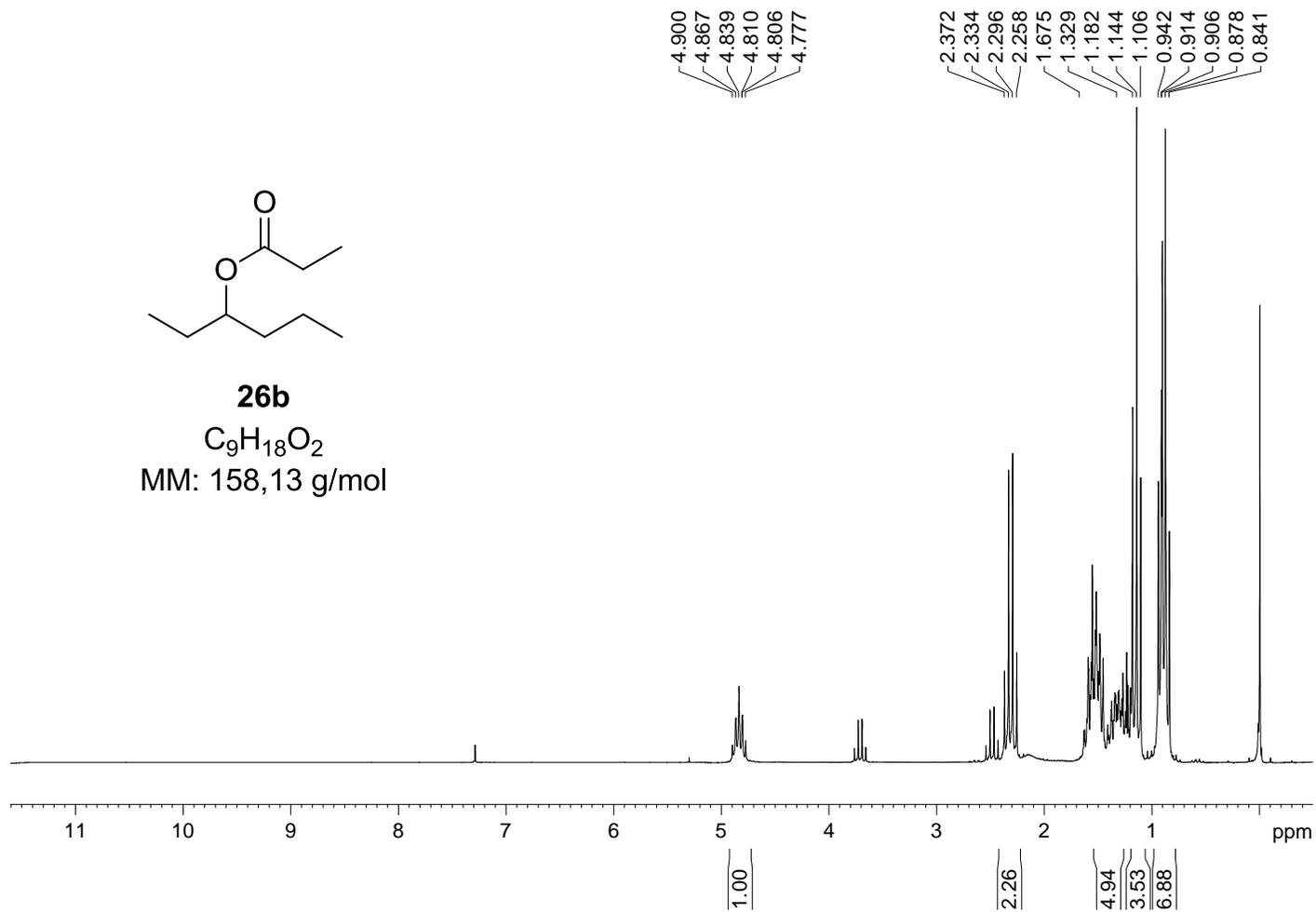
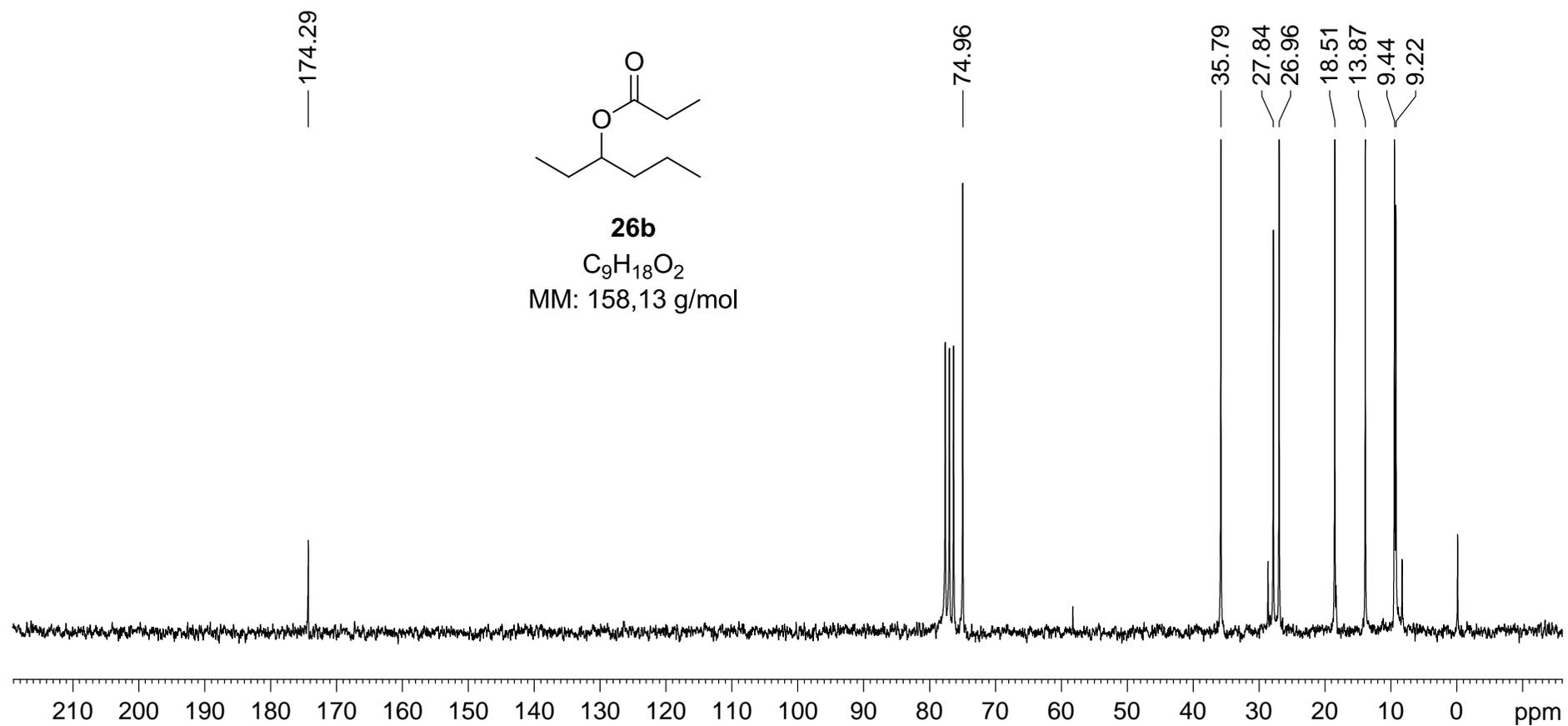
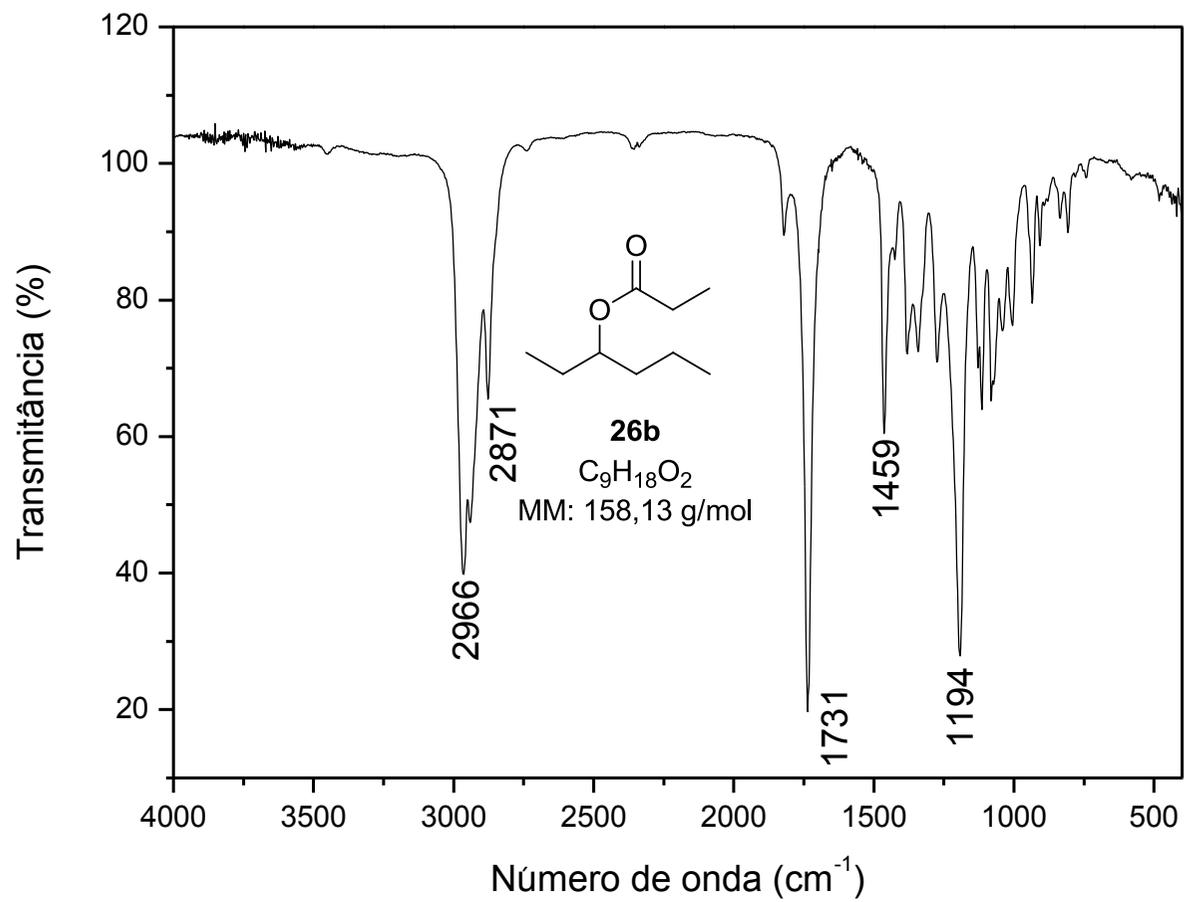


Figura 52: Espectro de RMN de  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ ) do propionato de 3-hexila (**26b**).



**Figura 53:** Espectro de RMN de  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ ) do propionato de 3-hexila (**26b**).



**Figura 54:** Espectro no IV do propionato de 3-hexila (**26b**).