

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

GUSTAVO DE SOUZA POLILLO PINTO

OBTENÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DO CARBONATO DE PROPILENO POR
ROTA QUIMIOENZIMÁTICA

Rio de Janeiro
Novembro/ 2018

GUSTAVO DE SOUZA POLILLO PINTO

**OBTENÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DO CARBONATO DE PROPILENO POR
ROTA QUIMIOENZIMÁTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica

Orientadores: Prof. Dr. Rodrigo Volcan Almeida

Prof. Dr. Alessandro Bolis Costa Simas

Profa. Dra. Evelin Andrade Manoel

Rio de Janeiro

Novembro/ 2018

GUSTAVO DE SOUZA POLILLO PINTO

**OBTENÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DO CARBONATO DE PROPILENO POR
ROTA QUIMIOENZIMÁTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica

Aprovada em

Presidente, Prof. Dr. Rodrigo Volcan Almeida
IQ/ Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Profa. Dra. Viridiana Santana Ferreira Leitão
IQ/ Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Profa. Dra. Bárbara Vasconcellos da Silva
IQ/Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof. Dr. Antônio Jorge Ribeiro da Silva
IPPN/ Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

AGRADECIMENTOS

À minha família, pela minha formação, educação e pelo suporte em todos os momentos.

Ao Prof. Rodrigo Volcan Almeida pela orientação, boa convivência e por todo o suporte necessário ao ingresso no Programa de Pós-graduação, desde o momento de nosso primeiro contato.

À Profa. Evelin Andrade Manoel, pela orientação, boa convivência, e, também, por fornecer grande parte das lipases utilizadas para o desenvolvimento desta dissertação.

Ao Prof. Alessandro Bolis Costa Simas, meu agradecimento especial, pela orientação cuidadosa e criteriosa, por ter cedido o laboratório sob sua coordenação para o trabalho experimental desta dissertação, pela boa convivência, conselhos e os inúmeros ensinamentos, não somente relacionados à esfera acadêmica.

À Profa. Denise Maria Guimarães Freire, por também fornecer as lipases utilizadas nessa dissertação, pelas dicas sempre úteis e pela possibilidade de realizar a disciplina de estágio sob sua supervisão.

Ao Prof. Antônio Jorge Ribeiro da Silva, no amparo às dúvidas analíticas e pela gentileza quanto ao uso dos equipamentos da central analítica do IPPN.

A todos os amigos dos laboratórios LaMMP (Camila, Candida, Francisco, Gabriela, Juliana e Letícia), LaBiMFar (Luana) e, em especial, ao grupo do LRB (Ângelo, Bárbara, Felipe, Gabriel, Glauber, Hyro, Juliana, Leonardo, Marcelo, Patrick, Rodrigo e Samir) pela amizade, ajuda, troca de conhecimentos, e por criarem sempre um ambiente sadio para pesquisa.

Ao Pesquisador Samir Cavalcante, pela imensa gentileza de praxe, e pelo grande auxílio no suporte de materiais para pesquisa, e por também permitir o acesso ao Laboratório do Centro Tecnológico do Exército (CTEx), para realização dos experimentos de polarimetria.

Aos amigos de IPPN, tanto de laboratórios vizinhos, quanto, em especial, aos excelentes técnicos de CG/ HPLC (Cristiane, Nívea e João), CG/ Massas (Gisele, Ari) e RMN (Francisco e Camila) pela amizade, ensinamentos de manuseio de equipamentos e *softwares* e pela imensa contribuição no desenvolvimento do projeto.

A todos os professores de pós-graduação, por terem contribuído na minha formação.

À CAPES pelo suporte financeiro à pesquisa.

Aos demais membros da banca por terem aceitado meu convite.

RESUMO

A obtenção de substâncias enantiopuras desperta grande interesse tanto em esfera acadêmica, quanto industrialmente. No presente trabalho, estudou-se o emprego de lipases e de diferentes substratos em potencial, com o objetivo de se obter o carbonato de propileno enantiomericamente puro, sobretudo o (*R*)-carbonato de propileno. Este é utilizado pela indústria farmacêutica para a síntese do tenofovir, um antirretroviral para tratamento de primeira linha da infecção por HIV. Visualizaram-se três estratégias sintéticas: 1^a) a partir de resolução de derivados 1-*O*-acilados do propano-1,2-diol (1,2-PDO); 2^a) a partir da resolução do carbonato de propileno racêmico; 3^a) a partir da resolução de derivados 1-carbonatos acíclicos de 1,2-PDO. Pela primeira, e mais promissora dentre as três, estudaram-se diversas reações, tendo-se como sítio de reação tanto a hidroxila secundária, ligada ao estereocentro, quanto o grupo éster primário dos substratos. Foram ensaiadas esterificações com ácidos graxos, transesterificação, alcoxicarbonilação, assim como, alcoólises. Destacam-se os resultados obtidos com os substratos benzoato e *p*-anisoato de 2-hidroxipropila, com os quais se conseguiu avaliar diretamente a enantiosseletividade das reações estudadas por meio do excesso enantiomérico de substrato remanescente (ee_s). Os melhores resultados foram obtidos através de transesterificação com acetato de vinila. Com o benzoato de 2-hidroxipropila, conseguiu-se ee_s de 93 % (66 % de conversão), enquanto que com o derivado *p*-anisoato, 84 % de ee_s (59 % de conversão). Dados de polarimetria do benzoato de 2-hidroxipropila indicaram que o substrato enriquecido possui a configuração *S*. As alcoólises desses substratos mostraram-se com menor enantiosseletividade, mas, curiosamente, observou-se que as mesmas procederam com enantiodireção oposta, isto é, o substrato enriquecido foi o *R*. No caso do benzoato de 2-hidroxipropila, com maiores valores de conversão deste substrato na reação de metanólise, conseguiu-se obter moderado ee_s (80 %). Para as reações de alcoólise, logrou-se êxito no desenvolvimento de protocolo simples de separação física do substrato remanescente e produto, por meio de extração com água, conferindo alta praticidade ao processo. Os substratos remanescentes de metanólise e transesterificação foram convertidos a ambos enantiômeros do carbonato de propileno, segundo processo um pote de metanólise, seguida de reação com DMC.

Palavras-chave: Carbonato de propileno; Resolução cinética; Lipase; Tenofovir

ABSTRACT

The obtention of enantiopure substances arouses great interest in both the academic and industrial fields. In the present work, the use of lipases and different potential substrates was studied in order to obtain the enantiomerically pure propylenecarbonate, especially (*R*)-propylenecarbonate. This enantiomer is used by the pharmaceutical industry for the synthesis of tenofovir, an antiretroviral for first-line treatment of HIV infection. Three synthetic strategies were studied: 1) the resolution of 1-*O*-acyl derivatives of propane-1,2-diol (1,2-PDO); 2) the resolution of the racemic propylenecarbonate; 3) the resolution of acyclic 1-carbonate 1,2-PDO derivatives. By the first and most promising of the three, several reactions were studied, aiming not only the secondary hydroxyl, which is bound to the stereocenter, but also the primary ester group in the structure of the substrates. Amongst the reactions, esterifications with fatty acids, transesterification, alkoxycarbonylation, as well as alcoholysis were assayed. The results obtained with the substrates 2-hydroxypropylbenzoate and *p*-anisoate were highlighted since it was possible to directly evaluate the enantioselectivity of the reactions by the enantiomeric excess of the remaining substrate (ee_s). The best results were accomplished by the transesterification reaction with vinyl acetate. With 2-hydroxypropyl benzoate, the ee_s was equal to 93% (at 66 % conversion) and regarding *p*-anisoate, the ee_s was of 84% (at 59 % conversion). Polarimetric data of 2-hydroxypropyl benzoate indicated that the enriched substrate has the *S* configuration. The alcoholysis of these substrates showed less enantioselectivity, but curiously, the enantiodirection was the opposite, that is, the enriched substrate has the *R* configuration. In the case of 2-hydroxypropyl benzoate, with higher conversion in the methanolysis reaction, it was possible to obtain moderate ee_s (80%). For alcoholysis reactions, a simple protocol of physical separation of the remaining substrate and product was achieved by extraction with water, giving high practicality to the process. The remaining substrates of the methanolysis and transesterification reactions were converted to both enantiomers of propylenecarbonate, by an one-pot two-step process of methanolysis, followed by the reaction with DMC.

Keywords: Propylenecarbonate; Kinetic Resolution; Lipase; Tenofovir

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Enovelamento canônico das lipases, com destaque para a tríade catalítica (Adaptado de JAEGER et al, 1999).	30
Figura 2: Mecanismo de hidrólise de éster (propionato de etila) por lipases (JAEGER et al, 1999).	33
Figura 3: A) Reações usualmente catalisadas por lipases; B) Ataque do intermediário acil-enzima por diferentes nucleófilos (GHANEM, 2007).	35
Figura 4: Modelo empírico de enantiopreferência de lipases para alcoóis secundários, desenvolvido por Kazlauskas e colaboradores. L: grupo mais volumoso e M: grupo menos volumoso (GOTOR-FERNÁNDEZ et al, 2006).	37
Figura 5: Dados de cristalografia evidenciando as diferenças de interação entre os enantiômeros de um derivado do mentol com a histidina catalítica da CRL (Adaptado de CYGLER et al, 1994).	38
Figura 6: Modelo descritivo da enantiopreferência de CAL-B para alcoóis secundários (ROTTICCI et al, 2001).	39
Figura 7: Estratégias para obtenção de substâncias enantiopuras (Adaptado de ROUF; TANEJA 2013).	41
Figura 8: Mecanismo de uma resolução cinética catalisada, indicando diferença de velocidade entre os enantiômeros de um substrato (R e S) com um catalisador quiral.	42
Figura 9: Diferença de energia dos estados de transição ($\Delta\Delta G^{++}$) dos enantiômeros de um racemato na presença de um catalisador quiral (Adaptado de KEITH et al, 2001). R: Constante dos gases e T: Temperatura (K).	43
Figura 10: Relação de conversão com os excessos enantioméricos do substrato e produto (KEITH et al, 2001).	44
Figura 11: Relação de conversão com os excessos enantioméricos do substrato e produto em reação reversível, com $s = 20$ e $K = 0,1$ (FABER, 2018).	46
Figura 12: Enantiômeros do propano-1,2-diol.	48
Figura 13: Comparação entre o efeito estérico dos substituintes da α -hidróxi-fenilpropanona e da α -hidróxi-propanona (KADYROV et al, 2009).	50
Figura 14: Mecanismos de acoplamento de CO ₂ a epóxidos (Adaptado de WU et al, 2016). ..	61
Figura 15: Dificuldade natural de se obter regioseletividade em reações com propano-1,2-diol.	84

Figura 16: Cromatograma da esterificação do 1,2-PDO com ácido oléico (4:1), catalisada por N435 em hexano; 18 h de reação à t.a. Oleato de 2-hidroxipropila (19 min.) e oleato de 2-oleoiloxipropila (33-38 min.).	87
Figura 17: Cromatograma de esterificação do 1,2-PDO com ácido oléico (4:1), catalisada por N435 em diclorometano; 18 h de reação à t.a. Oleato de 2-hidroxipropila (19 min.).	88
Figura 18: CCF da reação de esterificação do 1,2-PDO com ácido oléico (4:1), à t.a., em hexano (19 h) e diclorometano (18 h); massa lipase/ massa 1,2-PDO = 6; Eluente: 15 % AcOEt/ hexano.	88
Figura 19: Análise por CCF do screening de isopropanólise em hexano (5 % <i>i</i> -PrOH) do oleato de 2-hidroxipropila; massa lipase/ massa substrato = 6; volume de reação: 1,0 mL Eluente: 15 % AcOEt/ Hexano.	92
Figura 20: Cromatograma de esterificação do benzoato de 2-hidroxipropila com ácido caprílico, catalisada por N435 em hexano; 5 h a 30 °C. Ácido caprílico (6 min.); benzoato de 2-hidroxipropila (9 min.); benzoato de 2-capriloiloxipropila (17 min.).	99
Figura 21: Cromatograma de <i>screening</i> de esterificação do benzoato de 2-hidroxipropila com ácido oléico catalisada por N435 em hexano; 24 h a 30 °C. Benzoato de 2-hidroxipropila (9 min.); ácido oléico (16 min.); benzoato de 2-oleoiloxipropila (23-24 min.).	99
Figura 22: Cromatograma do benzoato de 2-hidroxipropila racêmico em coluna quiral (AD-H). Fluxo: 0,8 mL min. (10 % <i>i</i> -PrOH/ hexano); 232 nm.	100
Figura 23: Cromatograma do substrato remanescente da esterificação com ácido oléico (coluna chiralpak AD-H; fluxo 0,8 mL/ min; 10 % <i>i</i> -PrOH/Hexano; 232 nm); 52 % de conversão; 15 % de <i>ee</i> _s .	102
Figura 24: Expansão do cromatograma da reação de esterificação do benzoato de 2-hidroxipropila com ácido caprílico via N435 em 67 % hexano/ TBME à t.a; 83 % de conversão. Expansão na região do tempo de retenção do substrato, mostrando os picos dos regioisômeros do monocapriloato de 1,2-propanodiol (9,2 e 9,3 min.) e do substrato (9,1 min.).	103
Figura 25: Expansão do cromatograma da reação de esterificação do benzoato de 2-hidroxipropila com ácido caprílico via N435 em 67 % hexano/ TBME à t.a; 83 % de conversão. Expansão na região do tempo de retenção do produto, mostrando o pico referente ao capriloato de 2-capriloiloxipropila (16,4 min.).	104
Figura 26: Cromatograma do substrato remanescente da esterificação com ácido caprílico (coluna chiralpak AD-H; fluxo 0,8 mL/ min; 10 % <i>i</i> -PrOH/Hexano; 232 nm); 83 % de conversão; 50 % de <i>ee</i> _s .	104
Figura 27: Cromatograma da transesterificação do benzoato de 2-hidroxipropila com acetato de vinila catalisada por N435. Benzoato de 2-acetoxipropila (10,6 min.).	105

Figura 28: Cromatograma do substrato remanescente da transesterificação com acetato de vinila (coluna chiralpak AD-H; fluxo 0,8 mL/ min; 10 % <i>i</i> -PrOH/Hexano). 70 % de conversão; 97 % de <i>ee</i> _s	106
Figura 29: Cromatograma da alcoxicarbonilação do benzoato de 2-hidroxiopropila com DMC catalisada por N435, à t.a.; 24 h. Benzoato de metila (4,44 min.); benzoato de 2-hidroxiopropila (9,06 min.); carbonato de propileno (3,08 min.).	108
Figura 30: Cromatograma do substrato remanescente da reação de alcoxicarbonilação (coluna AD-H; fluxo 0,8 mL/ min; 10 % <i>i</i> -PrOH/Hexano; 232 nm). 77 % de conversão; 59 % de <i>ee</i> _s	111
Figura 31: Cromatograma da fração obtida por coluna cromatográfica contendo o carbonato de propileno (pico de menor intensidade, em 3,08 min.).	112
Figura 32: Cromatograma do substrato remanescente de metanólise (coluna Chiralpack AD-H; fluxo 0,8 mL/ min; 10 % <i>i</i> -PrOH/Hexano; 232 nm). 75 % de conversão; 80 % de <i>ee</i> _s	113
Figura 33: Cromatograma do <i>p</i> -anisoato de 2-hidroxiopropila racêmico em coluna quiral (Chiralpak AD-H). Fluxo: 0,8 mL min. (10 % <i>i</i> -PrOH/ hexano); 252 nm.	114
Figura 34: Cromatograma do substrato remanescente de metanólise (coluna Chiralpak AD-H; fluxo 0,8 mL/ min; 10 % <i>i</i> -PrOH/Hexano; 252 nm). 50 % de conversão; 33 % de <i>ee</i> _s	115
Figura 35: Cromatograma do substrato remanescente de transesterificação com acetato de vinila (coluna Chiralpak AD-H; fluxo 0,8 mL/ min; 10 % <i>i</i> -PrOH/Hexano; 252 nm). 59 % de conversão; 84 % de <i>ee</i> _s	117
Figura 36: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do produto isolado do Esquema 51, mostrando sinais dos regioisômeros do carbamato formado.	121
Figura 37: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do produto isolado do esquema 52, mostrando sinais do carbonato de propileno.	122
Figura 38: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do produto issolado do esquema 53, mostrando os sinais dos prótons metílicos dos regioisômeros do carbonato acíclico (1,18 e 1,27 ppm) e do carbonato de propileno (1,46 ppm).	123

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Aminação assimétrica redutiva da prositagliptina via (<i>R</i>)-transaminase (SAVILE et al, 2010; DESAI, 2011).	27
Esquema 2: Processo biocatalisado para a síntese do intermediário quiral da atorvastatina (MA et al, 2010).	28
Esquema 3: Reação de alcoóis com acilantes irreversíveis via lipases (FABER, 2018).....	40
Esquema 4: Reação de alcoóis com acilantes quase-irreversíveis (FABER, 2018).	40
Esquema 5: Obtenção de ambos enantiômeros do propano-1,2-diol variando-se a configuração do catalisador, por meio de resolução cinética hidrolítica (SCHAUS et al, 2002).	48
Esquema 6: Obtenção do (<i>R</i>)-propano-1,2-diol a partir de resolução cinética hidrolítica (TOKUNAGA et al, 1997).	49
Esquema 7: Di-hidroxilação assimétrica do propeno para obtenção do (<i>R</i>)-propano-1,2-diol (VANHESSCHE; SHARPLESS, 1997).	50
Esquema 8: Redução assimétrica da α -hidróxi-propanona a (<i>R</i>)-propano-1,2-diol (SAITO et al, 2001).	51
Esquema 9: Resolução cinética do propano-1,2-diol com propionato de metila via PPL (JANSSEN et al, 1991).	52
Esquema 10: Resolução cinética do propano-1,2-diol com acetato de vinila via PFL (IZQUIERDO et al, 2000).	52
Esquema 11: Obtenção do (<i>R</i>)-propano-1,2-diol a partir da hidrólise do diacetato de propano-1,2-diol via PPL (POPPE et al, 1993).	53
Esquema 12: Resolução cinética do propano-1,2-diol com benzoato de vinila via MML e CAL-B (CIUFFREDA et al, 2003).	54
Esquema 13: Resolução cnética do benzoato de 2-hidroxipropila com benzoato de vinila via MML (CIUFFREDA et al, 2003).	54
Esquema 14: Resolução cinética dinâmica do 1-tert-butóxi-2-propanol com acetato de isopropenila via N435 (SHUKLOV et al, 2014).	55
Esquema 15: Hidrólise de derivados 2-butanoato-1-éteres do propano,1,2-diol via CAL-B (HOFF et al, 1996).	56
Esquema 16: Hidrólise do acetato de 1-metóxi-2-propanila via CalB (BAUMANN et al, 2000).	56

Esquema 17: Hidrólise do butirato de 1-butildimetilsililóxi-2-propanila via PFL (GOERGENSE; SCHNEIDER, 1991).....	57
Esquema 18: Bioedução enantiosseletiva da α -hidróxipropanona via GDH (LEE; WHITESIDES, 1986).....	57
Esquema 19: Resolução cinética oxidativa do propano-1,2-diol via <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (KOMETANI, 1993b).	58
Esquema 20: Utilização do (R)-carbonato de propileno na síntese do tenofovir (Adaptado de SCHULTZE et al, 1998).....	60
Esquema 21: Resolução cinética do óxido de propileno com CO ₂ via complexo Co(III)-salen e PPNF (BERKESSEL et al, 2006).....	62
Esquema 22: Resolução cinética do óxido de propileno com TBAMC via complexo Co(III)-salen (BERKESSEL et al, 2006).	62
Esquema 23: Resolução cinética do óxido de propileno com CO ₂ via complexo Co(III)-salen e PPN-DNP (REN et al, 2012).	63
Esquema 24: Resolução cinética do óxido de propileno com CO ₂ via complexo polimérico de Co(III)-salen e Bu ₄ NF (YAN; JING, 2009).	63
Esquema 25: Resolução cinética do óxido de propileno com CO ₂ via complexo Co(III)-salen bifuncional (CHANG et al, 2009).	64
Esquema 26: Síntese do (R)-carbonato de propileno a partir do (S)-lactato de etila (WHITAKER et al, 2008).	65
Esquema 27: Síntese quimioenzimática do (R)-carbonato de propileno a partir do carbonato de glicerol em fluxo contínuo (SUVEGES et al, 2018).	66
Esquema 28: Estratégia de resolução dos substratos-chave propostos, ilustrando-se as possíveis configurações de produto e substrato remanescente de cada reação enzimática.	70
Esquema 29: Estratégia de abertura enantiosseletiva do carbonato de propileno com diversos nucleófilos.	71
Esquema 30: Estratégia de resolução dos carbonatos acíclicos do propano-1,2-diol, mostrando as possíveis configurações de produto e substrato remanescente, destacando-se a ciclização deste para a obtenção do carbonato de propileno.	72
Esquema 31: Mono-O-acilação regiosseletiva do 1,2-propanodiol com cloretos de acila.....	84
Esquema 32: Mono-O-acilação regiosseletiva do 1,2-propanodiol via reação de Steglich.	85
Esquema 33: <i>Screening</i> de esterificação do 1,2-propanodiol com ácido oléico via lipases, mostrando os produtos possíveis de reação.	87

Esquema 34: Síntese regioseletiva de oleato e caprilato de 2-hidroxipropila via RMIM.....	90
Esquema 35: Derivatização do 1,2-propanodiol a carbonato de propileno.....	91
Esquema 36: Isopropanólise do oleato de 2-hidroxipropila via lipases.	91
Esquema 37: Alcoólises dos derivados 1- <i>O</i> -acilados de ácidos graxos.....	93
Esquema 38: Transesterificação dos derivados 1- <i>O</i> -acilados de ácidos graxos.....	95
Esquema 39: Mono- <i>O</i> -acilação regioseletiva do 1,2-propanodiol com cloreto de benzoíla. .	97
Esquema 40: Mono- <i>O</i> -acilação regioseletiva do 1,2-propanodiol com cloreto de <i>p</i> -anisoíla.	97
Esquema 41: Esterificação do benzoato de 2-hidroxipropila com os ácidos oléico e caprílico.	101
Esquema 42: Transesterificação do benzoato de 2-hidroxipropila com acetato de vinila.....	106
Esquema 43: Hipótese mais provável de formação de benzoato de metila a partir da reação de alcoxicarbonilação do benzoato de 2-hidroxipropila.....	109
Esquema 44: Hipótese de formação do carbonato de propileno a partir do carbonato acíclico.	109
Esquema 45: Alcoxicarbonilação do benzoato de 2-hidroxipropila com DMC.....	110
Esquema 46: Metanólise do benzoato de 2-hidroxipropila	113
Esquema 47: Metanólise do <i>p</i> -anisoato de 2-hidroxipropila.....	115
Esquema 48: Transesterificação do <i>p</i> -anisoato de 2-hidroxipropila com acetato de vinila. ..	116
Esquema 49: Hidrólise de carbonato cíclico via PPL (KAWASHIMA et al, 1993).....	118
Esquema 50: Reações de alcoólises testadas com o carbonato de propileno como substrato.	119
Esquema 51: Aminólise do carbonato de propileno com etilamina.	120
Esquema 52: Reação do 1,2-propanodiol com cloroformiato de benzila, na tentativa de se gerar o derivado carbonato acíclico de interesse.	122
Esquema 53: Reação do 1,2-propanodiol com cloroformiato de benzila, gerando os regioisômeros do carbonato acíclico esperado, além do carbonato de propileno.	123

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Os 12 princípios da Química Verde (Adaptado de SHELDON; WOODLEY, 2017)	22
Quadro 2: Conversão conforme o tempo da reação do oleato de 2-hidroxipropila com isopropanol (11 eq.), com 12,5 % m/ m de N435, à t.a.	94
Quadro 3: Conversão conforme o tempo da reação do capriloato de 2-hidroxipropila com isopropanol (11 eq.), com 12,5 % m/ m de N435, à t.a.	94
Quadro 4: Conversão conforme o tempo da reação do capriloato de 2-hidroxipropila com metanol (11 eq.), com 12,5 % m/ m de N435, à t.a.	94
Quadro 5: Conversão conforme o tempo da reação do oleato de 2-hidroxipropila com acetato de vinila (5 eq.), com 25 % m/ m de N435, à t.a.	95
Quadro 6: Conversão conforme o tempo da reação do capriloato de 2-hidroxipropila com acetato de vinila (5 eq.), com 25 % m/ m de N435, à t.a.	96
Quadro 7: Conversão conforme o tempo da reação do benzoato de 2-hidroxipropila com ácido oléico (3 eq.), com massa de N435/ massa de substrato = 3, à t.a.	101
Quadro 8: Conversão conforme o tempo da reação do benzoato de 2-hidroxipropila com ácido caprílico (3 eq.), com massa de N435/ massa de substrato = 3, à t.a.	102
Quadro 9: Conversão conforme o tempo da reação do benzoato de 2-hidroxipropila com acetato de vinila (5 eq.), à t.a, com 25 % m/m de N435.	107
Quadro 10: Conversão conforme o tempo da reação do benzoato de 2-hidroxipropila com DMC (53 eq.), à t.a, com massa de N435/massa de substrato = 3.	110
Quadro 11: Conversão conforme o tempo da reação do benzoato de 2-hidroxipropila com metanol (11 eq.), à t.a, com massa de N435/massa de substrato = 3.	113
Quadro 12: Conversão conforme o tempo da reação do <i>p</i> -anisoato de 2-hidroxipropila com metanol (11 eq.), à t.a, com massa de N435/massa de substrato = 3.	115
Quadro 13: Conversão conforme o tempo da reação do <i>p</i> -anisoato de 2-hidroxipropila com acetato de vinila (5 eq.), à t.a, com massa de N435/massa de substrato = 3.	116
Quadro 14: Condições testadas de alcoólise do carbonato de propileno via lipases.	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação EC de enzimas (Adaptado de < http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/ >)	21
Tabela 2: Fatores <i>E</i> nos segmentos da indústria química (SHELDON, 2017).....	23

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

Asp: Aspartato

BINAP: 2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftil

BINOL: 1,1'-Bi-2-naftol

Bu₄NF: Fluoreto de tetrabutilamônio

c: Conversão

CAL-A: Lipase de *Candida atarctica* A

CAL-B: Lipase de *Candida atarctica* B

CCF: Cromatografia em camada fina

CG: Cromatografia gasosa

CMC: Concentração micelar crítica

CRL: Lipase de *Candida rugosa*

DABCO: 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano

DBU: 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno

DCC: *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida

DMAP: 4-dimetilaminopiridina

DMC: Dimetilcarbonato

DMF: *N,N*-Dimetilformamida

DHQR: Diidroquinidil

DIPEA: *N,N*-diisopropiletilamina

E: Fator de Seletividade (usual em processos biocatalisados)

E: Fator *E* (métrica usual em química verde)

EC: Comissão enzimática

ee: excesso enantiomérico

Eq: Equivalente

FDH: Formiato desidrogenase

GDH: Glicose desidrogenase

Gln: Glutamina

Gly: Glicina

Hex: Hexano

His: Histidina

HHDH: Haloidrina dehalogenase

HPLC: do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

k_{rel} : Fator de Seletividade

k_{cat} : Constante de *turnover*

K_M : Constante de Michelis Menten

KRED: Cetoreductase

LA: do inglês *Lewis acid*

m/ m: razão massa/ massa

MOF: Rede metaloorgânica

MS: do inglês *Mass Spectrometry*

N435: Novozyme 435

NAD^+ / NADH: Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina forma oxidada e reduzida

$NADP^+$ / NADPH: Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NEt_3 : Trietilamina

Nu: Nucleófilo

1,2-PDO: 1,2-Propanodiol ou propilenoglicol

PFL: Lipase de *Pseudomonas fluorescens*

PHAL: Ftalizina

Ph_3CCl : Cloreto de tritila

PLP: Piridoxal fosfato

PPL: Lipase de pâncreas de porco

PPN-DNP: 2,4-dinitrofenóxido de bis-trifenilfosforanilideno amônio

PPNF: Fluoreto de bis-trifenilfosforanilideno amônio

PS: *Pseudomonas cepacia*

PY: Piridina

PYR: Pirimidina

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

RM: *Rhizomucor miehei*

s: Fator de Seletividade

Ser: Serina

SEGPPOS: 5,5'-Bis(difenilfosfino)-4,4'-bi-1,3-benzodioxol

t.a: Temperatura ambiente

TBAMC: Carbonato de tetrabutilamônio

TBME: Metil tert-butil éter

TBDMS: Tert-butildimetilsilil éter

Thr: Treonina

THF: Tetraidrofurano

TL: *Thermomyces lanuginosus*

Trp: Triptofano

TsCl: Cloreto de tosilato

UV: ultravioleta

V/V: razão volume/ volume

δ : Deslocamento químico

$[\alpha]^\theta_\lambda$: Rotação óptica específica

SUMÁRIO

1. Introdução	21
1.1 Biocatálise e seu contexto na química verde e sustentável.....	21
1.1.1 A evolução da biocatálise industrial	24
1.1.2 Exemplos de aplicação de biocatalisadores engenherados na indústria farmacêutica.....	26
1.2 Emprego de lipases como biocatalisadores	28
1.2.1 Estrutura e mecanismo de catálise das lipases.....	29
1.2.1.1 Estrutura da lipase B de <i>Candida antarctica</i> (CAL-B)	31
1.2.1.2 Mecanismo de catálise das lipases.....	33
1.2.2 Uso de lipases em síntese orgânica.....	34
1.2.2.1 Uso de lipases na obtenção de alcoóis enantioenriquecidos.....	36
1.2.2.1.1 Enantiosseletividade de lipases para alcoóis secundários.....	36
1.2.2.2 Reações de acilação enantiosseletivas via lipases	39
1.4 Métodos químicos de obtenção do propano-1,2-diol opticamente ativo	47
1.5 Emprego do propano-1,2-diol e seus derivados como substratos de lipases	51
1.5.1 Resolução cinética enzimática de derivados éteres do propano-1,2-diol	54
1.6 Bioeduções e bioxidações para obtenção dos enantiômeros do propano-1,2-diol	57
1.7 Obtenção de propano-1,2-diol opticamente ativo por fermentação.....	59
1.8 Métodos de obtenção do carbonato de propileno	59
1.8.1 Obtenção de carbonato de propileno enantioenriquecido por resolução do óxido de propileno	60
1.8.2 Outras estratégias para a obtenção do carbonato de propileno opticamente ativo	64
2. Justificativa.....	67
3. Objetivo geral	69
3.1 Objetivos específicos	69
4. Estratégias.....	70
4.1 Estratégia 1: Resolução de 1-O-acil propano-1,2-diois via lipases	70

4.2 Estratégia 2: Abertura enantiosseletiva do carbonato de propileno racêmico por nucleófilos catalisada por lipases.....	71
4.3 Estratégia 3: Resolução de carbonatos acíclicos do propano-1,2-diol via lipases.....	71
5. Parte experimental	73
5.1 Materiais e métodos gerais	73
5.2 Procedimento geral de <i>screenings</i> enzimáticos	74
5.3 Procedimento experimental para as cinéticas de conversão	74
5.4 Procedimento para análises de HPLC com fase estacionária quiral	75
5.5 Procedimento para análise de excesso enantiomérico de substrato remanescente (ee_s) e produto (ee_p) das cinéticas enzimáticas	75
5.6 Substâncias sintetizadas como padrões de análise e substratos enzimáticos ou isoladas de reações de cinéticas enzimáticas	76
5.7 Procedimentos experimentais de síntese de padrões de análise e substratos enzimáticos	77
5.7.1 Síntese do oleato de 2-hidroxipropila	77
5.7.2 Síntese de oleato de 2-hidroxipropila e oleato de 2-oleoiloxipropila	78
5.7.3 Síntese do capriloato de 2-hidroxipropila	78
5.7.4 Síntese do capriloato de 2-capriloiloxipropila	79
5.7.5 Síntese do benzoato de 2-hidroxipropila	80
5.7.6 Síntese do benzoato de 2-oleoiloxipropila.....	80
5.7.7 Síntese do benzoato de 2-capriloiloxipropila.....	81
5.7.8 Síntese do benzoato de 2-acetoxipropila	82
5.7.9 Síntese do <i>p</i> -anisoato de 2-hidroxipropila	83
6. Resultados e Discussão.....	84
6.1 Síntese química dos derivados 1- <i>O</i> -acilados do 1,2-PDO a partir de ácidos graxos.....	84
6.2 Síntese enzimática dos derivados 1- <i>O</i> -acilados do 1,2-PDO a partir de ácidos graxos .	85
6.2.1 <i>Screening</i> sobre a regioseletividade da esterificação do 1,2-PDO com ácidos graxos via lipases.....	86

6.2.2 Estudo em maior escala da regioseletividade da esterificação do 1,2-PDO com ácidos graxos via lipases	89
6.3 Resolução enzimática dos derivados 1- <i>O</i> -acilados de ácidos graxos via lipases	90
6.3.1 <i>Screening</i> de alcoólise	90
6.3.2 Cinéticas de alcoólise dos derivados 1- <i>O</i> -acilados de ácidos graxos	93
6.3.3 Cinéticas de transesterificação dos derivados 1- <i>O</i> -acilados de ácidos graxos	95
6.4 Síntese química do benzoato e <i>p</i> -anisoato de 2-hidroxipropila	96
6.5 Resolução enzimática do benzoato de 2-hidroxipropila via lipases	98
6.5.1 <i>Screenings</i> de esterificação com ácidos graxos	98
6.5.2 Cinética de esterificação com ácidos graxos	100
6.5.3 <i>Screening</i> de transesterificação com acetato de vinila.....	105
6.5.4 Cinéticas de transesterificação com acetato de vinila.....	106
6.5.5 <i>Screening</i> de alcoxicarbonilação com carbonato de dimetila (DMC)	107
6.5.6 Cinética de alcoxicarbonilação com carbonato de dimetila (DMC).....	109
6.5.7 Cinética de Metanólise.....	112
6.6 Resolução enzimática do <i>p</i> -anisoato de 2-hidroxipropila via lipases	114
6.6.1 Cinética de Metanólise.....	114
6.6.2 Cinética de Transesterificação com acetato de vinila.....	116
6.7 Resolução enzimática do carbonato de propileno via lipases.....	117
6.8 Resolução enzimática via lipases dos derivados obtidos de cloroformatos.....	121
7. Conclusão	125
8 Referências:	126
9. Anexos.....	143
9.1 Cromatogramas de CG das substâncias sintetizadas como padrões de análise e substratos enzimáticos	143
9.2 Cromatogramas das cinéticas realizadas.....	147
9.2.1 Isopropanólise do oleato de 2-hidroxipropila	147
9.2.2 Isopropanólise do capriolato de 2-hidroxipropila.....	148

9.2.3 Metanólise do caprilato de 2-hidroxipropila.....	149
9.2.4 Transesterificação do oleato de 2-hidroxipropila	150
9.2.5 Transesterificação do caprilato de 2-hidroxipropila	151
9.2.6 Esterificação do benzoato de 2-hidroxipropila com ácido oléico.....	152
9.2.7 Esterificação do benzoato de 2-hidroxipropila com ácido caprílico.....	153
9.2.8 Transesterificação do benzoato de 2-hidroxipropila com acetato de vinila.....	154
9.2.9 Alcoxycarbonilação do benzoato de 2-hidroxipropila.....	155
9.2.10 Metanólise do benzoato de 2-hidroxipropila	156
9.2.11 Metanólise do <i>p</i> -anisoato de 2-hidroxipropila	158
9.2.12 Transesterificação do <i>p</i> -anisoato de 2-hidroxipropila.....	159
9.3 Espectros de RMN de ¹ H das substâncias sintetizadas como padrões de análise e substratos enzimáticos ou isoladas das reações de cinéticas enzimáticas	160

1. Introdução

1.1 Biocatálise e seu contexto na química verde e sustentável

O termo biocatálise envolve o uso de enzimas isoladas, células inteiras (“whole cells”), ou extratos livres de células, contendo uma enzima ou conjunto de enzimas, como catalisadores em reações químicas (MILNER; MAGUIRE, 2012; SHELDON; BRADY, 2018). O emprego de enzimas em processos químicos apresenta inúmeras vantagens, dentre estas, suas elevadas quimio-, régio e enantiosseletividades, aliadas ao fato de a catálise ocorrer, normalmente, em temperaturas brandas, próximas às condições ambiente, e pressão atmosférica. Ademais, enzimas são biodegradáveis e não-tóxicas, sendo obtidas a partir da fermentação de microorganismos, logo, provenientes de fontes renováveis (SHELDON; PEREIRA, 2017; SHELDON; WOODLEY, 2017; TRUPPO, 2017).

Usualmente, as enzimas são classificadas segundo o sistema de classificação EC. Este se baseia na função bioquímica de cada enzima em organismos vivos. A cada enzima são fornecidos quatro números após a abreviação EC, sendo o tipo de reação catalisada discriminado pelo primeiro número (1-6) (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação EC de enzimas (Adaptado de <<http://www.sbc.sqmul.ac.uk/iubmb/>>)

Classe	Enzima	Exemplos	Reação catalisada
1	Oxidoredutases	Desidrogenase, Oxigenase, Oxidase, Peroxidase	Oxidação e redução
2	Transferases	Transaminase, Glicosiltransferase, Transaldolase	Transferência de um grupo entre moléculas
3	Hidrolases	Lipase, Protease, Nitrilase, Nitrilase hidratase, Glicosidase, Fosfatase	Hidrólise em meio aquoso
4	Liasas	Decarboxilase, Desidratase, Aldolase	Clivagem de ligações por eliminação ou adição à dupla ligação
5	Isomerases	Racemase, Mutase, Tautomerase	Rearranjo intramolecular
6	Ligases	DNA Ligase	Formação de ligação com uso de trifosfato

A biocatálise se insere no contexto de “Química Verde”, a qual surgiu no início dos anos 1990, graças à Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. Esse termo ganhou reconhecimento mediante a publicação dos seus 12 princípios, no livro “Química Verde: Teoria e Prática”, de Anastas e Warner, em 1988 (SHELDON; WOODLEY, 2017) (**Quadro 1**).

Quadro 1: Os 12 princípios da Química Verde (Adaptado de SHELDON; WOODLEY, 2017)

- (1) Prevenção de resíduos, ao invés de remediação dos mesmos
- (2) Economia atômica
- (3) Síntese segura/ menos danosa
- (4) Desenvolvimento de produtos químicos mais seguro
- (5) Solventes e demais substâncias utilizadas no processo devem ser inócuos
- (6) Economia de energia
- (7) Uso de materiais renováveis, preferencialmente biomassa
- (8) Rotas sintéticas mais curtas, com menos derivatizações
- (9) Uso de catalisadores ao invés de reagentes em quantidades estequiométricas
- (10) Desenvolvimento de produtos pensando em sua degradação
- (11) Metodologias analíticas, em tempo real, para prevenir a geração de resíduos tóxicos
- (12) Prevenção de acidentes

A sustentabilidade de todos os processos, incluindo os biocatalisados, deve ser mensurada quantitativamente. Se não houver possibilidade de mensurá-la, não há como definir pontos a serem otimizados. Dessa maneira, não basta enquadrar um processo em um ou mais princípios da “Química Verde”, de modo meramente qualitativo, a fim de classificá-lo como sustentável. Tornam-se necessários fundamentos mais quantitativos (NI et al, 2014). Nesse intuito, as duas métricas mais antigas e simples para se avaliar a sustentabilidade de um processo químico são a economia atômica e o fator E , propostas em 1991 e 1992, respectivamente (TROST, 1991; SHELDON, 2017).

Baseando-se na economia atômica, a qual figura como um dos princípios da química verde (princípio 2), infere-se que quanto mais átomos dos reagentes forem incorporados ao produto de interesse, mais eficiente é o processo (TROST, 1991; SHELDON, 2017).

O fator E , por outro lado, é a razão entre a massa de resíduo que é gerado e a massa do produto desejado. Um fator E alto significa que o processo gera mais resíduo em detrimento do alvo sintético, e, conseqüentemente, tem impacto ambiental negativo. Diferentemente da métrica de economia de átomos, consideram-se nos cálculos os rejeitos provenientes de todas as etapas do processo, inclusive de isolamento e purificação (SHELDON, 2017). Na **tabela 2**,

podem ser observados alguns valores de fator E para alguns segmentos da indústria química, em que se constata o grande impacto da indústria farmacêutica no meio ambiente.

Tabela 2: Fatores E nos segmentos da indústria química (SHELDON, 2017)

Tipo de indústria	Toneladas por ano	Fator E (Kg de resíduo/Kg de produto)
Refino de petróleo	$10^6 - 10^8$	$< 0,1$
Química pesada	$10^4 - 10^6$	$< 1 - 5$
Química fina	$10^2 - 10^4$	$5 - 50$
Farmacêutica	$10 - 10^3$	$25 - > 100$

Diferentemente da métrica de economia de átomos, o volume de solvente a ser utilizado no meio reacional é considerado no cálculo do fator E . Entretanto, não só a quantidade, mas também, o tipo de solvente influencia na avaliação da sustentabilidade de um processo e na eficiência de um processo biocatalítico (SHELDON, 2017).

Geralmente, é tido como vantagem o uso de água como solvente, acrescido do fato de biocatalisadores, como enzimas, apresentarem atividade ótima em soluções aquosas. Porém, isso pode ser um empecilho se o substrato a ser utilizado no processo for pouco solúvel em água. Além disso, algumas reações como esterificações e transesterificações não podem ser conduzidas nesse meio, tendo-se em vista o equilíbrio químico da reação e a possibilidade de hidrólise do produto. Com isso, os solventes orgânicos, mesmo com limitações referentes à volatilidade e toxicidade continuam a ser empregados a nível industrial e, sobretudo na biocatálise (SHELDON, 2016).

Em estudo pioneiro, Zaks e Klivanov (1984) demonstraram que enzimas podem ser ativas em solventes orgânicos em condições praticamente anidras, assim como adquirir maior termoestabilidade, contribuindo para que pesquisas envolvendo biocatálise em sistemas não aquosos fossem intensificadas.

Alguns dos benefícios de meios orgânicos englobam a facilidade de isolamento do produto, por meio de evaporação de solventes voláteis, além de evitar contaminação microbiana (SHELDON; WOODLEY, 2017). Ademais, diferentes solventes podem alterar as propriedades enzimáticas, como, enantiosseletividade (KITAMOTO et al, 2015), levando à, até mesmo, inversão da enantiopreferência de enzimas (HIROSE et al, 1992; BERGLUND, 2001).

A busca por solventes alternativos, com menos toxicidade, volatilidade e que sejam passíveis de uso em processos biocatalisados é igualmente crescente. Líquidos iônicos, solventes eutéticos e o dióxido de carbono supercrítico figuram como opções promissoras aos tradicionais solventes orgânicos (SHELDON; WOODLEY, 2017).

A biocatálise é uma área sedimentada e estabelecida no contexto da química verde e sustentável, sendo continuamente aprimorada no que se refere à busca por novos biocatalisadores, assim como a otimização dos mesmos, incluindo técnicas de imobilização e engenharia de proteínas. Além disso, a pesquisa por solventes alternativos, com menores toxicidade e volatilidade, contribui para o fortalecimento dessa área (NESTL et al, 2014; ES et al, 2015; SCHWARTZ et al, 2016; SHELDON, 2016; SHELDON; WOODLEY, 2017).

1.1.1 A evolução da biocatálise industrial

O primeiro exemplo de processo biocatalisado é creditado a Louis Pasteur, em 1858. O pesquisador, outrora reconhecido pelos estudos pioneiros, em 1848, no campo de quiralidade molecular, promoveu a resolução (separação dos enantiômeros) do ácido tartárico, através de fermentação com uma variedade de microorganismos, incluindo o fungo *Penicillium glaucum*. Nos experimentos, um de seus enantiômeros, o (+)-ácido tartárico foi consumido, consideravelmente, mais rápido que o (-), permitindo o isolamento deste. Esta descoberta comprovou a existência de processos enantiosseletivos a nível biológico, sobretudo, advindos de fermentação (GAL, 2007).

No final do século 19, outras contribuições pioneiras para a difusão da biocatálise foram as de Emil Fischer, em 1894, que propôs o modelo chave-fechadura para explicar a catálise enzimática, reconhecendo a importância da configuração espacial das enzimas em suas funções como catalisadores. Esse modelo contribuiu para o trabalho de Linus Pauling, relacionado à estabilização de estados de transição em reações catalisadas por enzimas e, também, de Daniel Koshland, que sugeriu a teoria do encaixe induzido (REETZ, 2013). Ademais, Eduard Buchner, em 1877, demonstrou que extratos livres de células de leveduras eram capazes de realizar processos fermentativos, comprovando que transformações biológicas não requerem, necessariamente, células vivas, sendo agraciado com o prêmio Nobel de química em 1907 (GHANEM, 2007; REETZ, 2013; HUGHES; LEWIS, 2018).

Durante a primeira era da biocatálise, cientistas reconheceram que componentes de células vivas poderiam ser aplicados em transformações químicas de grande valia, complementando o conhecimento de outrora, acerca de técnicas fermentativas, que já eram

largamente difundidas (BORNSCHEUER et al, 2012). Alguns exemplos incluem o uso de glicose isomerase para converter glicose à frutose, para confecção de xaropes com alto teor de frutose (JENSEN; RUGH, 1987); de penicilina G acilase na semissíntese de antibióticos β -lactâmicos (BRUGGINK et al, 1998) e, até mesmo, o emprego de proteases em formulações de detergentes, sendo, em 1914, lançado o primeiro detergente, denominado *Burnus*, o qual continha a enzima pancreatina, pela companhia Rohm, na Alemanha (GHANEM, 2007; MILNER; MAGUIRE, 2012).

Na segunda era, nos anos de 1980 e 1990, a ênfase foi depositada na extensão do escopo de substratos reconhecidos por enzimas, representando um avanço na obtenção de intermediários sintéticos com utilidade nas indústrias farmacêutica e de química fina. Citam-se a obtenção de cianoidrinas quirais para a síntese de herbicidas e fármacos, através de catálise por oxinitrilases (hidroxinitrila-liases) (GRIENGL et al, 2000); a síntese, via lipases, de ésteres de ácidos graxos, como emolientes, para a indústria de cosméticos (HILLS, 2003); a síntese de ácido acrílico e acrilamida, precursores para obtenção da poliacrilamida, polímero de ampla aplicação industrial, a partir da acrilonitrila, por meio de nitrilase e nitrila-hidratase, ambas enzimas provenientes de células de *Rhodococcus rhodocrous*, (NAGASAWA et al, 1990, 1993).

A terceira e, até então, presente era da biocatálise é marcada pelo desenvolvimento de técnicas moleculares para a engenharia de proteínas (BORNSCHEUR et al, 2012; PORTER et al, 2016; SHELDON; BRADLEY, 2018), com os trabalhos dos grupos de Frances Arnold (CHEN; ARNOLD, 1993) e Willem Stemmer (STEMMER, 1994). Por meio dos trabalhos de Stemmer, sobretudo, o potencial das técnicas moleculares para a obtenção de enzimas mutantes foi intensificado ao se introduzir o mecanismo de recombinação, tal como ocorre no modelo de evolução de Darwin (STEMMER, 1994).

Através desse modelo de evolução Darwiniana *in vitro*, um ciclo envolvendo mutagênese, recombinação e *screening* dos mutantes pode ser repetido até que as características de interesse possam ser observadas nas enzimas mutantes. Como consequência, propriedades das enzimas podem ser alteradas para que as mesmas possam atuar com altas atividades e estabilidades, reconhecendo substratos não-naturais e em condições mais adversas. Essas alterações das propriedades enzimáticas são necessárias, visto que processos químicos requerem biocatalisadores estáveis, seletivos e robustos, os quais operam sob condições previamente delineadas, como temperaturas elevadas, alta concentração de substratos e presença de solventes orgânicos (REETZ, 2011; PORTER et al, 2016; SHELDON; WOODLEY, 2017).

A engenharia de enzimas para um determinado processo inicia-se mediante a definição das propriedades enzimáticas a serem modificadas, como aumento de estabilidade, seletividade, escopo de substratos, ou, até mesmo, a combinação das mesmas. Previamente ao surgimento das técnicas moleculares que impulsionaram a biocatálise moderna, somente algumas alternativas eram disponíveis, como a imobilização enzimática. Entretanto, o aumento de estabilidade observado, por si só, era moderado e normalmente insuficiente para o emprego na catálise da maioria dos processos químicos (BORNSCHEUER et al, 2012). Conseqüentemente, as técnicas de evolução dirigida permitiram um progresso significativo na aplicação industrial de biocatalisadores e contribuíram para que os mesmos fossem engenherados a fim de se adaptarem a um processo. Observa-se um avanço em comparação ao pensamento tradicional, pelo qual processos químicos eram alterados com a finalidade de se adaptarem aos biocatalisadores disponíveis comercialmente (CHOI et al, 2015; SHELDON, 2017).

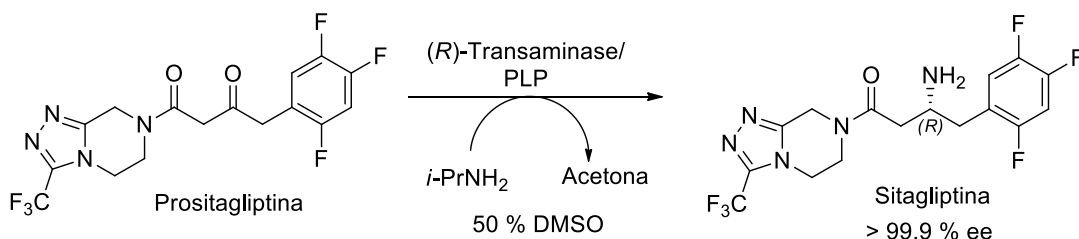
Além da engenharia de proteínas, que contribuiu para a geração de enzimas com propriedades designadas (*tailor-designed*) para um determinado processo, outro fator que possibilitou a difusão de biocatalisadores no campo industrial foi a produção dos mesmos em larga escala. Anteriormente, muitas enzimas eram disponíveis somente em pequenas quantidades e altos preços, por meio de extração de tecidos de animais e de plantas. Atualmente, com a técnica de DNA recombinante e a expressão heteróloga de proteínas, uma variedade de microorganismos encontra-se disponível como sistemas de expressão, destacando-se a *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*. Em bancos de dados públicos, podem ser encontradas diversas sequências de proteínas, e, além disso, os genes que codificam para as mesmas podem ser adquiridos para a expressão em um determinado microorganismo (DE SOUZA et al, 2017).

1.1.2 Exemplos de aplicação de biocatalisadores engenherados na indústria farmacêutica

Um dos exemplos de sucesso na aplicação de enzimas na indústria farmacêutica remete à síntese do fármaco antiglicêmico sitagliptina, princípio ativo do medicamento Januvia, indicado para o tratamento de diabetes tipo II. Pesquisadores da empresa Codexis e da Merck juntaram esforços e engenheiraram uma transaminase (*R*)-seletiva proveniente de *Arthrobacter* sp. para a aminação redutiva assimétrica do intermediário cetônico prositagliptina (SAVILE et al, 2010; DESAI, 2011; CHOI et al, 2015) (**Esquema 1**).

As pesquisas partiram de uma transaminase (*R*)-seletiva sem atividade para o substrato cetônico (prositagliptina), tendo-se em vista que nenhuma transaminase testada reconheceu esse substrato para catalisar a reação desejada de aminação. Através de engenharia de proteínas, com múltiplos ciclos de evolução dirigida, obteve-se uma variante com 27 mutações. Dos 17 aminoácidos que interagem com o substrato, 10 dos mesmos foram mutados (SAVILE et al, 2010; DESAI, 2011; CHOI et al, 2015).

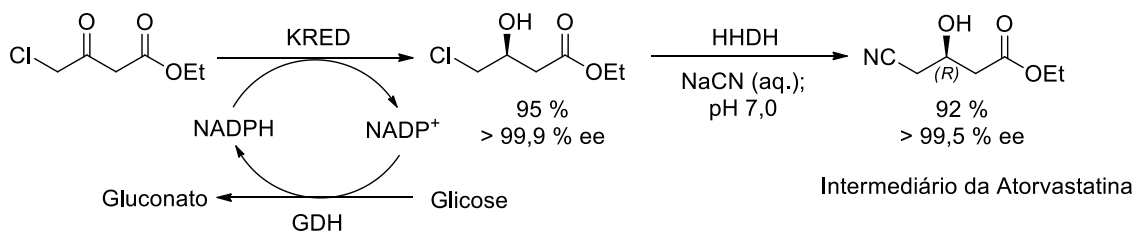
O processo biocatalisado proporcionou um aumento de 13 % em rendimento e 53 % em produtividade (g/ L.h) e redução de 19% de rejeito gerado em relação ao anterior, no qual se empregava catálise química utilizando o metal ródio e hidrogênio molecular (250 psi ~ 17 atm) para o procedimento de hidrogenação assimétrica. Devido ao importante resultado, os inventores desse processo (Merck e Codexis) receberam, em 2010, o prêmio da Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana (US EPA) pela utilização de condições reacionais menos danosas ao ambiente (“greener”) (SAVILE et al, 2010; DESAI, 2011; CHOI et al, 2015).



Esquema 1: Aminoação assimétrica redutiva da prositagliptina via (*R*)-transaminase (SAVILE et al, 2010; DESAI, 2011).

Outro exemplo clássico de êxito na engenharia enzimática foi o utilizado para síntese do intermediário quiral da atorvastatina, um fármaco utilizado para redução de colesterol, o qual é princípio ativo do medicamento Lipitor. O processo contém duas etapas e envolve 3 enzimas, uma cetoreductase (KRED) para a redução assimétrica de uma α -clorocetona à clorohidrina correspondente, na presença de glicose e glicose desidrogenase (GDH) para regenerar o cofator necessário à redução enzimática (NADPH) (1ª etapa); halohidrina dehalogenase (HHDH) para converter a clorohidrina à cianohidrina de interesse (2ª etapa) (MA et al, 2010; CHOI et al, 2015; SHELDON, 2017) (**Esquema 2**).

Empregaram-se técnicas de evolução dirigida para melhorar a atividade e estabilidade das enzimas, mas mantendo suas altas enantiosseletividades (MA et al, 2010; CHOI et al, 2015; SHELDON, 2017).



Esquema 2: Processo biocatalisado para a síntese do intermediário quiral da atorvastatina (MA et al, 2010).

Com a engenharia dos biocatalisadores, houve melhora em diversos parâmetros do processo, como aumento de produtividade (500 % e 9500 %) e rendimento (12 % e 37 %), diminuição da carga de enzima necessária (90 % e 96 %), aumento da concentração de substrato empregado (100 % e 600 %) e diminuição do tempo de reação (67 % e 93 %), sendo esses valores referentes às etapas com KRED/ GDH e HDDH, respectivamente. Destaca-se que não houve comprometimento das enantiosseletividades observadas nas reações com KRED e HDDH nativas, além de não haver problemas de emulsão e separação de fases (MA et al, 2010; CHOI et al, 2015; SHELDON, 2017). Os inventores desse processo (Codexis) também receberam, em 2006, o prêmio da US EPA pela utilização de condições reacionais menos danosas ao ambiente (“greener”).

1.2 Emprego de lipases como biocatalisadores

As lipases (EC 3.1.1.3) são triacilglicerol hidrolases ubíquas, sendo presentes em todos os tipos de organismos, como fungos, bactérias, plantas e animais. Essas enzimas atuam, essencialmente, na digestão, transporte e processamento de lipídeos, exercendo sua função nativa de hidrólise de ligações ésteres de cadeias longas de triacilgliceróis (JAEGER; EGGERT, 2002).

Além de seu papel natural no metabolismo lipídico, as lipases são empregadas em diversos segmentos industriais, como aditivos em formulações de detergentes, na confecção de ingredientes alimentícios, na síntese de biopolímeros, biolubrificantes e na produção de biodiesel (HOUDE et al, 2004; HASAN et al, 2006; ANOBOM et al, 2014; AOUF et al, 2014).

Na área de síntese orgânica, as lipases são amplamente estudadas e utilizadas devido a sua relativa estabilidade em solventes orgânicos; por não necessitarem de cofatores para sua

atividade catalítica; pela grande número de substratos que interagem com essas enzimas; pelas altas seletividades (régio-, químio- e enantio-) reportadas (ADLERCREUTZ, 2013; KUMAR et al, 2016).

Outro fator preponderante para a vasta aplicação industrial de lipases decorre de sua grande disponibilidade comercial, tanto na forma livre, como imobilizada. Quanto a sua origem, as lipases mais utilizadas são provenientes de microorganismos (fungos e bactérias), sendo produzidas por meio da técnica de DNA recombinante, através de expressão heteróloga em bactérias e leveduras (ADLERCREUTZ, 2013).

Diversas técnicas de imobilização de enzimas, dentre estas lipases, são descritas na literatura, tendo como vantagens a fácil recuperação do catalisador do meio reacional; a reciclabilidade, podendo-se reutilizar o catalisador sem que haja, idealmente, perda de sua atividade; a possibilidade de se desenvolverem processos contínuos. Além disso, a imobilização pode também ser utilizada para aumentar a estabilidade de enzimas em solventes orgânicos, e, inclusive, melhorar suas atividades e enantiosseletividades (ADLERCREUTZ, 2013; SHELDON, 2013; MANOEL et al, 2016).

1.2.1 Estrutura e mecanismo de catálise das lipases

Considerando-se sua estrutura tridimensional, a maioria das lipases apresenta grande variabilidade na estrutura primária (sequência de aminoácidos), entretanto, compartilha da mesma arquitetura característica da família das $\alpha\beta$ hidrolases (SCHRAG; CYGLER 1997; JAEGER et al, 1999; NARDINI; DIJKSTRA, 1999). Esta família se configura em um dos maiores grupos de enzimas relacionadas estruturalmente, mas com funções catalíticas diversas, incluindo, além de hidrolases, membros de outras classes, como oxidorreduases e liases (HOLMQUIST, 2000).

O enovelamento canônico, descoberto por Ollis e colaboradores (1992), é constituído, no centro, por uma folha- β formada, normalmente, por 8 fitas paralelas, exceto por β_2 , que é antiparalela. As fitas β_3 à β_8 são conectadas por α -hélices localizadas ao redor da folha- β (SCHRAG; CYGLER 1997; JAEGER et al, 1999; NARDINI; DIJKSTRA, 1999).

O sítio ativo das lipases é composto por uma tríade catalítica formada, por ordem de sequência primária, pelos aminoácidos serina, aspartato, sendo este, em alguns casos, substituído por glutamato, e histidina. O resíduo nucleofílico corresponde à serina, enquanto a função de catalisador ácido é desempenhada pelo aspartato ou glutamato. Destaca-se que, em outras enzimas da família das $\alpha\beta$ hidrolases, o resíduo nucleofílico pode ser uma cisteína ou

aspartato. Ressalta-se também, que a histidina é o único aminoácido que se conserva em todas as tríades catalíticas dessa família (SCHRAG; CYGLER 1997; JAEGER et al, 1999; ANOBOM et al, 2014).

O aminoácido serina, nucleofílico, localiza-se em uma sequência de pentapeptídeo Gly-X-Ser-X-Gly (Gly = glicina; Ser = serina; X = qualquer aminoácido), altamente conservada na estrutura das lipase, a qual forma uma curva acentuada (curva- γ) entre a fita $\beta 5$ da folha- β central e a α -hélice seguinte (αC). Originalmente, o aspartato ou glutamato catalíticos encontram-se na curva após a fita $\beta 7$, entretanto, sua localização pode variar entre as estruturas das lipases. Esse aminoácido interage por ligação de hidrogênio com a histidina da tríade catalítica, a qual é localizada após a fita $\beta 8$ (SCHRAG; CYGLER 1997; JAEGER et al, 1999; ANOBOM et al, 2014) (**Figura 1**).

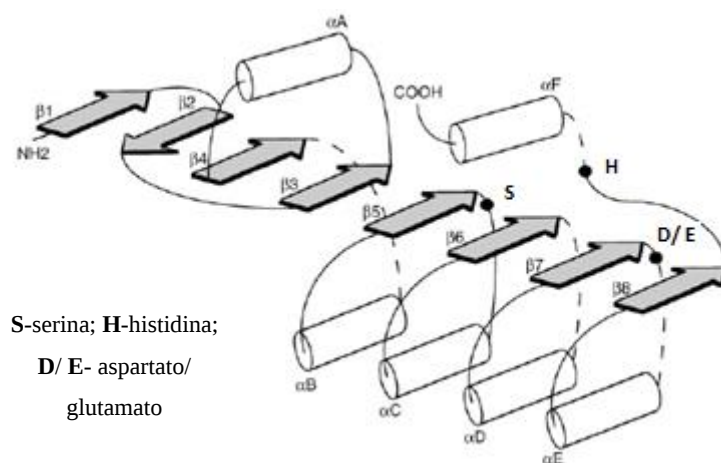


Figura 1: Enovelamento canônico das lipases, com destaque para a tríade catalítica (Adaptado de JAEGER et al, 1999).

Tradicionalmente, as lipases são caracterizadas por aumento drástico de sua atividade quando se encontram na interface lipídeo/ água, devido ao fenômeno denominado ativação interfacial, conforme observado por Sarda e Desnuelle (1958). Com algumas dessas enzimas, ocorre aumento drástico de sua atividade lipolítica, quando o substrato atinge concentrações acima de sua concentração micelar crítica (CMC), tornando-se insolúvel (emulsão). Esse fenômeno é usualmente utilizado para diferenciar as lipases de outras enzimas lipolíticas, como esterases (FERRATO et al, 1997). Esse fenômeno de ativação é promovido por rearranjos estruturais na região do sítio ativo das lipases. Na ausência de interface lipídeo/ água, o sítio ativo é coberto por uma estrutura denominada tampa (*lid*). Porém, na presença de

substâncias hidrofóbicas, a tampa é aberta, permitindo a interação do sítio catalítico com o substrato (VERGER, 1997; JAEGGER et al, 1999).

As alterações na estrutura das lipases durante o fenômeno de ativação interfacial são tradicionalmente estudadas por meio da comparação de cristais dessas enzimas obtidos em diferentes condições, na tentativa de serem obtidos exemplares que reportem o estado ativo (tampa aberta) e o inativo (tampa fechada). No caso da lipase de *Candida rugosa* (CRL), a título de exemplo, a comparação entre essas duas formas, aberta e fechada, mostrou que 508 dos 532 átomos de Ca da estrutura da lipase foram sobrepostos com um desvio (RMS) de apenas 0,30 Å, sendo a exceção formada pelos 26 Ca pertencentes à estrutura de tampa, que se deslocaram em até 25 Å entre essas duas conformações (GROCHULSKI et al, 1994).

A maior parte das lipases possui a estrutura da tampa, entretanto, existem casos em que a mesma é ausente. Portanto, a presença da tampa, assim como o fenômeno de ativação interfacial não são critérios suficientes para caracterizar uma enzima como lipase (VERGER, 1997). Conforme os tipos de morfologia da tampa, os quais podem variar drasticamente entre as lipases, pode-se classificá-las em diferentes grupos (KHAN et al, 2017).

Uma das lipases mais utilizadas a nível acadêmico e industrial, denominada lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B), é foco de contínuos estudos a fim de se investigarem a existência de uma tampa em sua estrutura, assim como, o fenômeno de ativação interfacial exibido por essa lipase (STAUCH et al, 2015; MARTINELLE et al, 1995). Isto é justificado pelo fato de a caracterização de transições extensas de conformação a nível atômico através de métodos biofísicos experimentais continua a ser uma tarefa difícil. Técnicas como a cristalografia de raios-x fornecem informações essenciais a nível de conformação estática, mas carecem sob o ponto de vista dinâmico. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear, que poderia suprir essa limitação, não é largamente utilizada, devido à limitação imposta pela massa molecular dessas enzimas. Com isso, alternativas como simulação de dinâmica molecular podem ser de grande valia (HENZLER-WILDMAN; KERN, 2007; BORDES et al, 2010; ANOBOM et al, 2014).

1.2.1.1 Estrutura da lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B)

A levedura *Candida antarctica* originalmente isolada no lago Vanda na Antártica, produz duas lipases diferentes, as lipases A e B (CAL-A and CAL-B). Dentre estas, a CAL-B é a mais utilizada, tendo destaque em processos biocatalisados, principalmente, com o nome comercial Novozyme 435 (N435) (KIRK; CHRISTENSEN, 2002; YANG et al, 2013). A

CAL-B é uma proteína com massa molar de 33 KDa e uma sequência de 317 aminoácidos, tendo sua estrutura tridimensional elucidada via cristalografia por Uppenberg e colaboradores (1994). Sua tríade catalítica é formada pelos aminoácidos serina (Ser) 105, aspartato (Asp) 187 e histidina (His) 224. A sequência do pentapeptídeo contendo a serina nucleofílica, Gly-X-Ser-X-Gly, altamente conservada na maioria das lipases, não é encontrada em CAL-B, sendo a primeira glicina (Gly) substituída por uma treonina (Thr), gerando a sequência Thr-Trp-Ser-Gln-Gly. Além disso, essa enzima possui, no centro, 7 fitas- β , uma a menos que o convencional. O correto enovelamento dessa lipase é auxiliado pela presença de três ligações dissulfeto (UPPENBERG et al, 1994).

Desde sua descoberta, a presença de uma tampa na estrutura da CAL-B é alvo de debate. No estudo inicial, ao se analisar as formas dessa enzima cristalizada, acreditou-se que a mesma se encontrava em uma conformação aberta, com o sítio ativo acessível ao solvente, sendo a α -hélice 5, reconhecida, potencialmente, como tampa. Essa afirmação foi fundamentada pelo fato de essa região apresentar mobilidade, variando de conformação de α -hélice organizada para uma estrutura desordenada, em condições de mudança de pH dos cristais (UPPENBERG et al, 1994). Entretanto, em estudo posterior do mesmo grupo (UPPENBERG et al, 1995), esta última hipótese foi descartada, o que tem impulsionado pesquisas acerca do tema.

Na tentativa de se detectar a ativação interfacial de CAL-B, Martinelle e colaboradores (1995) realizaram um estudo dessa enzima em reações de hidrólise de substratos, dentre estes o butirato de *p*-nitrofenila. Não se observou mudança pronunciada de atividade quando se excedeu o limite de solubilidade desse substrato (presença de interface), o que difere drasticamente do comportamento da lipase modelo, a de *Thermomyces lanuginosa*, nessas mesmas condições, com a qual se observa aumento de atividade.

Mais recentemente, estudos mais modernos baseados em dinâmica molecular confirmaram a alta mobilidade da α -hélice 5 (SKØT et al, 2009), podendo se comportar como tampa, exibindo diferentes conformações, dependendo da temperatura do processo (GANJALIKHANY et al, 2012). Além disso, Zisis e colaboradores (2015) reportaram um aumento de atividade, em aproximadamente sete vezes, da CAL-B quando esta foi imobilizada em suporte hidrofóbico, esferas de vidro revestidas por cadeias alquílicas (octil), atribuída a uma mudança conformacional que conduz a uma maior abertura para o sítio ativo. Entretanto, essa ativação é restrita a substratos volumosos, representados no trabalho por ésteres formados por alcoóis volumosos, levando à conclusão de que essa lipase atuaria como esterase para pequenos substratos. Essa afirmação foi respaldada por estudos de dinâmica

molecular, que demonstraram uma alta mobilidade da estrutura da α -hélice 5, que foi classificada pelos autores como pequena tampa.

1.2.1.2 Mecanismo de catálise das lipases

O mecanismo de catálise das lipases pode ser compreendido por meio da reação de hidrólise de ésteres, ilustrado na **figura 2**. Primeiramente, ocorre o ataque nucleofílico da serina catalítica na carbonila da ligação éster do substrato. A nucleofilicidade da hidroxila da serina é aumentada através da interação com a histidina da tríade catalítica (etapa 1). Forma-se o primeiro intermediário tetraédrico, no qual o átomo de oxigênio da carbonila adquire uma carga negativa (oxiânion), que é estabilizada por ligações de hidrogênio com outros aminoácidos da cadeia principal da enzima, em um sítio denominado buraco/fenda do oxiânion (*oxyanion hole*) localizado no sítio ativo da enzima (etapa 2). Posteriormente, libera-se uma molécula de álcool, como grupo de saída, do intermediário tetraédrico, o qual é desfeito, enquanto a cadeia acílica permanece covalentemente ligada à enzima (intermediário acil-enzima) (etapa 3). Com o ataque da água (nucleófilo de reações de hidrólise), que, assim como a serina, tem sua nucleofilicidade aumentada pela histidina da tríade catalítica, no intermediário acil-enzima, ocorre a formação do segundo intermediário tetraédrico (etapa não mostrada na figura) e posterior regeneração da enzima, com a liberação do produto ácido carboxílico (etapa 4) (JAEGER et al, 1999).

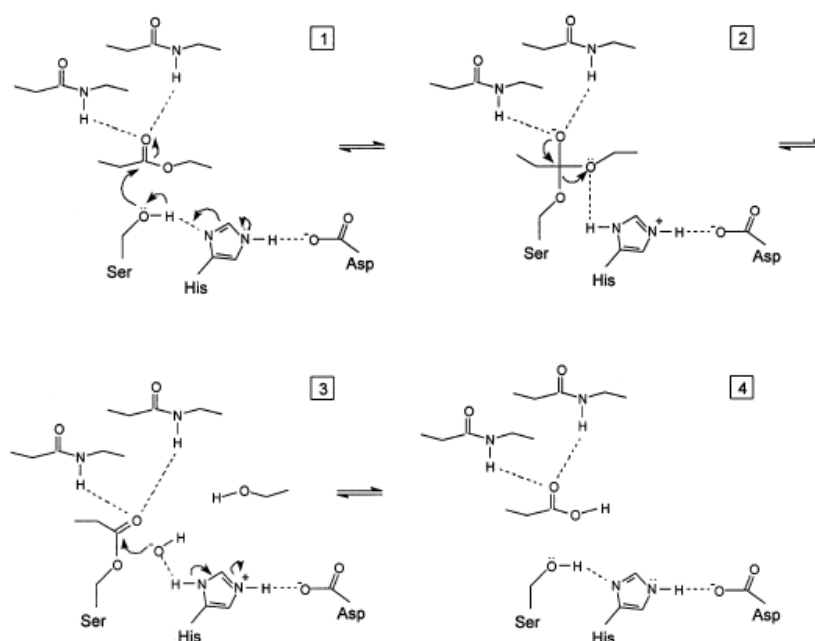


Figura 2: Mecanismo de hidrólise de éster (propionato de etila) por lipases (JAEGER et al, 1999).

Além da hidrólise de ésteres, reação natural de hidrolases, como as lipases, estas enzimas podem catalisar outras reações, discutidas na próxima seção.

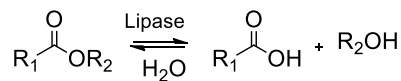
1.2.2 Uso de lipases em síntese orgânica

O uso de lipases em síntese orgânica foi promovido pela observada estabilidade em solventes orgânicos (ZAKS; KLIBANOV, 1984). Em meios não aquosos, as lipases podem ser utilizadas para a síntese de ésteres, através da esterificação de alcoóis com ácidos carboxílicos. Esse tipo de reação tem o sentido reverso ao de reação de hidrólise, a qual é a reação natural das hidrolases. Logo, para promover o deslocamento do equilíbrio no sentido de formação de ésteres, meios orgânicos com baixa atividade de água devem ser usados (GHANEM, 2007).

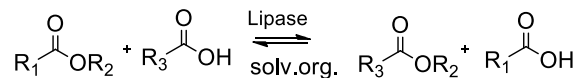
Além de serem ativas em solventes orgânicos, outra vantagem das lipases consiste no amplo repertório de reações catalisadas por essas enzimas, compreendendo uma miríade de transformações químicas, dentre estas hidrólise, esterificação, alcoólise (transesterificação), acidólise, e, até mesmo, interesterificação, na qual dois ésteres reagem entre si (**Figura 3A**). Ao se sujeitar o intermediário acil-enzima, típico do mecanismo de catálise via lipases, ao ataque de diferentes nucleófilos alternativos à água (nucleófilo natural de hidrolases), como álcoois, aminas e peróxido de hidrogênio, podem ocorrer reações de alcoólise, aminólise e peridrólise, respectivamente (GOTOR-FERNÁNDEZ et al, 2006; GHANEM, 2007) (**Figura 3B**).

A)

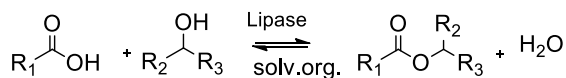
1-Hidrólise (meio aquoso)



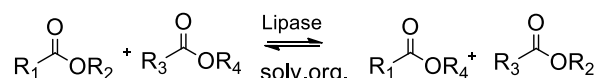
4-Acidólise



2-Esterificação (meio orgânico)



5-Interesterificação



3-Alcoólise (transesterificação)

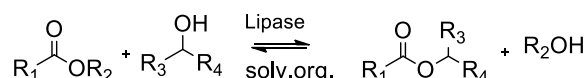
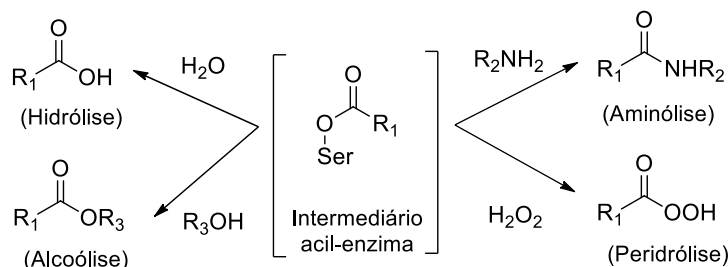
**B)**

Figura 3: A) Reações usualmente catalisadas por lipases; **B)** Ataque do intermediário acil-enzima por diferentes nucleófilos (GHANEM, 2007).

A ocorrência de diferentes reações, alternativas às que normalmente as enzimas catalisam, enquadra-se no conceito de promiscuidade enzimática. Hult e Berglund (2007) classificaram este termo em três categorias: promiscuidade de condição, promiscuidade de substrato e promiscuidade catalítica.

- Promiscuidade de condição: Enzimas possuem atividade catalítica em várias condições reacionais, diferentes daquelas em que normalmente atuam, como tipo de solvente, temperatura e pH;
- Promiscuidade de substrato: Enzimas reconhecem diferentes substratos, com estruturas diversas;
- Promiscuidade catalítica: Enzimas catalisam diversas reações químicas, passando por diferentes estados de transição, que não são observados em suas reações naturais.

Nesse contexto, as lipases se configuram como promíscuas, sendo observado um considerável número de exemplos de promiscuidade catalítica, empregando-se lipases selvagens (promiscuidade catalítica acidental). Em outros casos, por meio de mutações, via

design racional ou evolução dirigida, pode-se induzir a ocorrência de uma nova reação (promiscuidade catalítica induzida) (HULT; BERGLUND, 2007; HUMBLE; BERGLUND, 2011).

De acordo com a promiscuidade catalítica, já foram descritas diversas reações catalisadas por lipases que procedem via diferentes estados de transição e mecanismos reacionais (DWIVEDEE et al, 2018), como reações aldólicas (LI et al, 2008; GUAN et al, 2012; XIE et al, 2013), adições conjugadas (CAI et al, 2011; MONSALVE et al, 2012), reações tipo Mannich (LI et al, 2009; HE et al, 2010; WU et al, 2016), tendo-se, inclusive, estudos relatando a atividade de racemase (VONGVILAI et al, 2011).

1.2.2.1 Uso de lipases na obtenção de alcoóis enantioenriquecidos

1.2.2.1.1 Enantiosseletividade de lipases para alcoóis secundários

Uma das características das lipases é sua alta enantiosseletividade, acoplada, simultaneamente, à ampla faixa de substratos reconhecidos, principalmente no que se refere a alcoóis secundários. Existem diferentes estudos que buscam descrever os mecanismos relacionados à enantiosseletividade de lipases (EMA, 2004), sendo um dos mais famosos criado por Kazlauskas e colaboradores (1991). Na tentativa de predizer qual enantiômero de alcoóis secundários racêmicos reage mais rápido em reações catalisadas por lipases, estes pesquisadores desenvolveram um modelo empírico, com base na observação da enantiopreferência de algumas lipases (de *Pseudomonas cepacia* e de *Candida rugosa*) em reações com esse tipo de substrato.

Através do modelo de Kazlauskas e colaboradores (1991), a diferença na cinética entre os enantiômeros foi relacionada, de uma maneira simples, de acordo com os próprios autores, com a diferença de tamanho dos grupos ligados ao carbono assimétrico secundário contendo a hidroxila. Conseguiu-se melhor resolução (*E* mais altos), quando a diferença de volume entre os substituintes dos alcoóis secundários estudados era mais pronunciada. A presença de um grupo volumoso e de outro pouco volumoso na mesma estrutura desse tipo de substrato faz com que haja uma orientação (encaixe) preferencial durante a interação com a lipase. Com isso, o enantiômero que reage mais rápido é aquele que comporta o grupo mais volumoso e o menos volumoso, respectivamente, na bolsa (“*pocket*”) maior e na menor (**Figura 4**), localizadas no sítio ativo da enzima. Em contrapartida, o enantiômero mais lento é forçado a

comportar seu grupo mais volumoso na bolsa menor (GOTOR-FERNÁNDEZ et al, 2006; GHANEM, 2007).

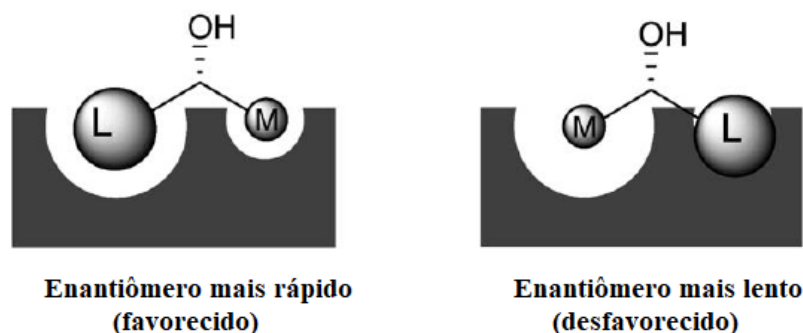


Figura 4: Modelo empírico de enantiopreferência de lipases para alcoóis secundários, desenvolvido por Kazlauskas e colaboradores. L: grupo mais volumoso e M: grupo menos volumoso (GOTOR-FERNÁNDEZ et al, 2006).

Em estudo posterior pioneiro feito por Cygler e colaboradores (1994), preteriu-se o empirismo, buscando-se investigar as bases estruturais, por meio de cristalografia, da enantiopreferência de lipases na resolução de alcoóis secundários. Adotou-se, como representante, a lipase de *Candida rugosa* (CRL), procurando-se identificar diferenças nas interações dos resíduos do sítio catalítico com cada enantiômero da substância estudada como modelo (um derivado do mentol), que foi utilizada por permitir uma simulação da formação do estado de transição (intermediário tetraédrico) que ocorre no ciclo catalítico. Uma possível explicação, ilustrada na **figura 5**, foi levantada com base na interação, via ligação de hidrogênio, entre o imidazol da histidina (N ϵ 2) da tríade catalítica com o oxigênio do álcool (O1), que se mostra ausente com um dos enantiômeros (o mais lento), provocada pela mudança de orientação do grupo isopropil (grupo mais volumoso). A presença dessa interação levaria ao colapso mais rápido do intermediário tetraédrico, contribuindo para uma maior velocidade de reação de um dos enantiômeros (o mais rápido). Outros estudos envolvendo, também, experimentos de modelagem molecular podem ser encontrados, na tentativa de se explicar a enantiosseletividade de lipases (UPPENBERG et al, 1995; HAEFFNER et al, 1998; RAZA et al 2001; EMA, 2004).

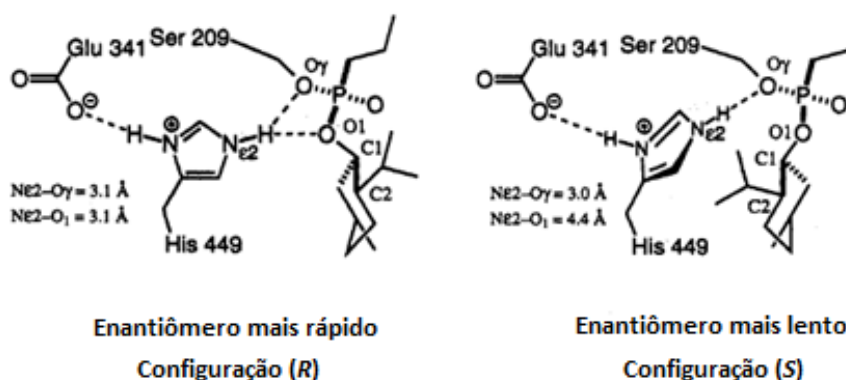


Figura 5: Dados de cristalografia evidenciando as diferenças de interação entre os enantiômeros de um derivado do mentol com a histidina catalítica da CRL (Adaptado de CYGLER et al, 1994).

De modo interessante, em estudos envolvendo a lipase CAL-B, descobriu-se que a enantiosseletividade da mesma para alcoóis secundários poderia ser alterada promovendo-se mutações em seu sítio estereosseletivo (bolsa menor), cujo fundo é delimitado pela cadeia lateral do aminoácido triptofano (Trp 104). Esse sítio comporta grupos com volume máximo correspondente a uma etila (UPPENBERG et al, 1995; ROTTICCI et al, 1998, 2001). Esta limitação estérica é a responsável pela enantiopreferência da CAL-B, pois o enantiômero mais lento é forçado a comportar seu grupo mais volumoso na bolsa menor (sítio estereosseletivo), o que é desfavorável (**Figura 6**).

Foi possível se observar que ao se substituir o Trp 104 por aminoácidos com cadeias laterais menores, como a alanina, principalmente, aumenta-se o espaço do sítio estereosseletivo. Como consequência, grupos mais volumosos (maiores que a etila) poderiam ser acomodados nesse sítio, o que, na CAL-B selvagem, não era possível. Com isso, por meio dessa única mutação sítio dirigida, observou-se uma queda drástica dos valores de seletividade (*E*) nas reações catalisadas por essa lipase, tendo-se como substratos alcoóis secundários racêmicos. Inclusive, em alguns casos, houve inversão da enantiopreferência, isto é, o enantiômero que reage mais rápido passou a ser o de configuração (*S*), ao invés do (*R*) (MAGNUSSON et al, 2005).

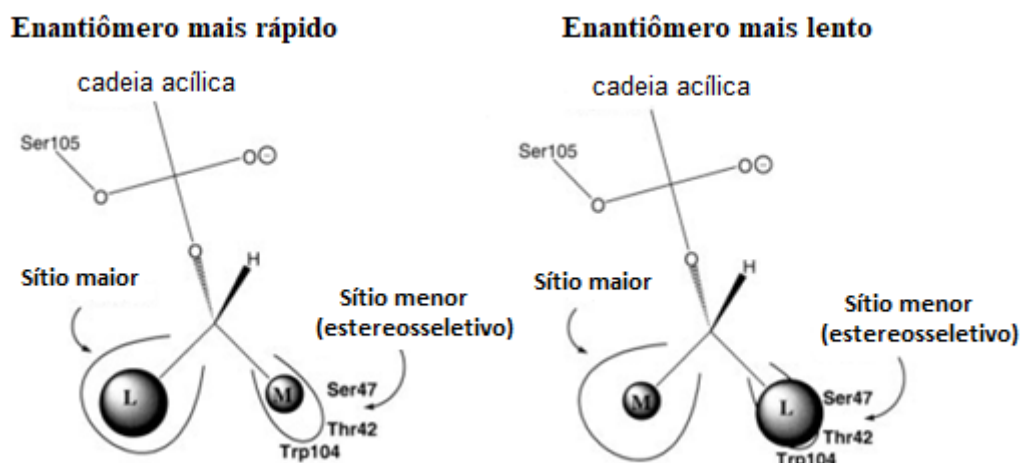


Figura 6: Modelo descritivo da enantiopreferência de CAL-B para alcoóis secundários (ROTTICCI et al, 2001).

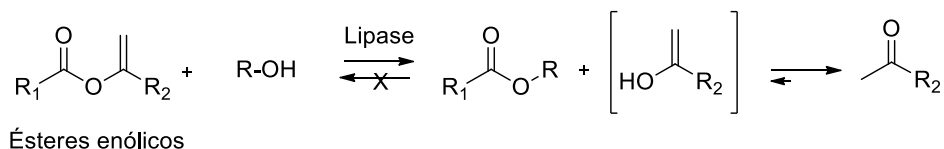
1.2.2.2 Reações de acilação enantiosseletivas via lipases

Reações de acilação via esterificação ou transesterificação são usualmente utilizadas para a obtenção de alcoóis enantioenriquecidos. Em resoluções cinéticas ideais, com fatores de seletividade (E) altos, o enantiômero que reage mais rápido é convertido a éster, enquanto o mais lento, não é convertido, sendo recuperado como álcool.

As reações de esterificação e transesterificação são caracterizadas como reversíveis, o que se configura como uma limitação para a observação de altas enantiosseletividades, além de diminuir a velocidade de reação. Com isso, condições que favoreçam reações rápidas e praticamente irreversíveis são desejáveis para uma resolução cinética eficiente. Para este fim, inicialmente, para contornar o problema da reação reversa de hidrólise, foram testados sistemas bifásicos, em que a enzima era mantida em fase aquosa e o agente acilante na fase orgânica (CAMBOU; KLIBANOV, 1984). Posteriormente, com a descoberta da estabilidade de lipases em solventes orgânicos, meios com praticamente nenhuma atividade de água, passaram a ser utilizados (ZAKS; KLIBANOV, 1984; KIRCHNER et al, 1985), assim como outras estratégias, como o uso de excesso de agente acilante e o tipo de agente acilante empregado (KIRCHNER et al, 1985; ANTHONSEN; HOFF, 1998; GHANEM, 2007; FABER, 2018).

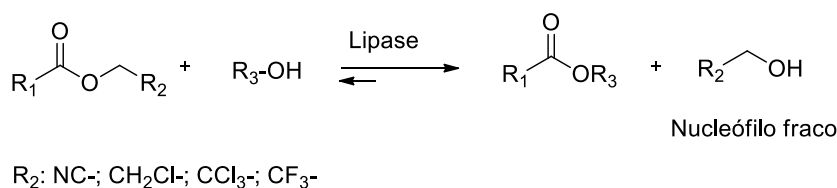
Os agentes acilantes, também chamados de doadores de acila, podem ser divididos em: reversíveis, quase-irreversíveis e irreversíveis. Estes últimos são os mais empregados em reações de acilação com lipases, nas quais se utilizam ésteres enólicos, como acetato de vinila e isopropenila. A irreversibilidade é fundamentada na liberação de um enol, como subproduto,

que tautomeriza a aldeído, no caso do acetato de vinila, ou cetona, no caso do acetato de isopropenila. Com isso, não há geração de nucleófilo para que a reação reversa (alcoólise) ocorra (KIRCHNER et al, 1985; DEGUEIL-CASTAING et al, 1987; FABER, 2018) (**Esquema 3**).



Esquema 3: Reação de alcoóis com acilantes irreversíveis via lipases (FABER, 2018).

Os doadores de acila quase-irreversíveis, ao reagirem com alcoóis (substrato), em reações de transesterificação, liberam, como grupo de saída, alcoóis com baixa nucleofilicidade. Estes possuem grupos retiradores de elétrons, como ciano e halogênios e, conseqüentemente, considera-se que a reação reversa praticamente não ocorre (KIRCHNER et al, 1985; FABER, 2018) (**Esquema 4**).



Esquema 4: Reação de alcoóis com acilantes quase-irreversíveis (FABER, 2018).

Lipases são largamente empregadas em rotas sintéticas que visam à obtenção de alcoóis enantioenriquecidos, sejam estes primários, secundários ou terciários. A enantiosseletividade observada em reações com alcoóis secundários é relativamente alta, sendo observado o uso dessas enzimas em resoluções cinéticas desse tipo de substrato, inclusive com aplicação na indústria farmacêutica (GOTOR-FERNÁNDEZ et al, 2006; SOLANO et al, 2012; SIMON et al, 2013; CARVALHO et al, 2015; ALBARRÁN-VELO et al, 2017; SUN et al, 2017).

A enantiosseletividade mais baixa observada em resoluções cinéticas envolvendo alcoóis primários é justificada, geralmente, pela distância do centro assimétrico ao local em que ocorre a reação enzimática. Não obstante, altas enantiosseletividades podem ser detectadas com esse tipo de substrato (FORRÓ et al, 2011; MACHADO et al, 2011; MARTINS et al, 2015).

1.3 Estratégias para obtenção de substâncias enantiopuras

A obtenção de substâncias enantiomericamente enriquecidas ou, idealmente, enantiopuras desperta grande interesse, seja em escala laboratorial ou industrial, buscando-se, continuamente, metodologias eficientes, mas que sejam, também, práticas. Entretanto, a escolha da estratégia a ser seguida não é uma tarefa simples, porque eficiência e praticidade dependem de um vasto número de fatores. Estes podem incluir a escala de produção, custo de reagentes, tempo de processo, número de etapas, riscos potenciais, geração de resíduos, especificações de pureza dos produtos, produtividade e disponibilidade de equipamentos (KEITH, 2001).

Com a finalidade de se obterem substâncias enantiomericamente enriquecidas, devem ser consideradas diferentes alternativas (KEITH et al, 2001; ROUF; TANEJA, 2013; LORENZ; SEIDEL-MORGESTERN, 2014) (**Figura 7**):

- “*Chiral pool*”: baseia-se na utilização de materiais de partida enantiopuros fornecidos pela natureza.
- Resolução de racemato: consiste na separação dos enantiômeros de um racemato por métodos químicos ou físicos.
- Síntese assimétrica enantiosseletiva: consiste no preparo de substâncias enantioenriquecidas a partir de precursores aquirais, utilizando-se reagentes ou catalisadores quirais para a geração de novo centro assimétrico.

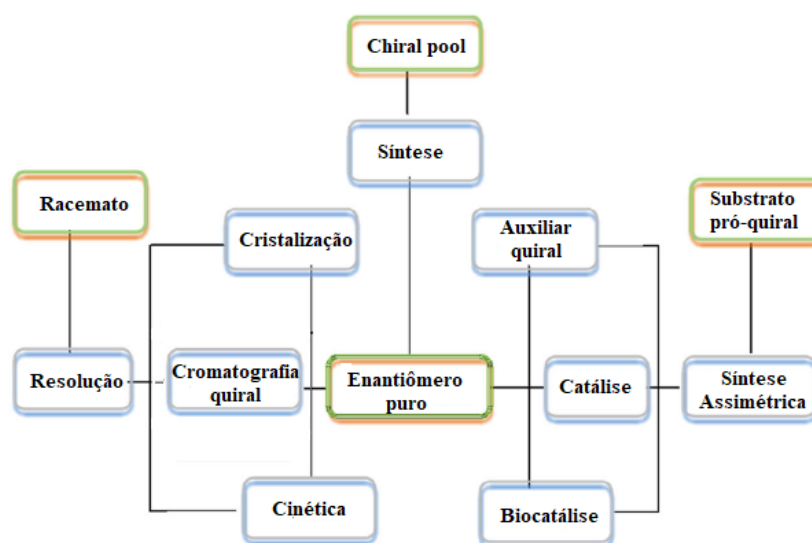


Figura 7: Estratégias para obtenção de substâncias enantiopuras (Adaptado de ROUF; TANEJA 2013).

Tradicionalmente, as técnicas de resolução de racematos figuram como centrais na preparação de substâncias enantioenriquecidas. Todavia, salvo exceções, como a resolução cinética dinâmica, apresentam a desvantagem de fornecer os enantiômeros com o rendimento máximo de 50%, visto que ambos estão presentes em proporção equimolar em um racemato. Entretanto, apesar dessa limitação, as técnicas de resolução são muito utilizadas, inclusive industrialmente, sendo obtidas por meio de cristalização, resoluções cinética e cinética dinâmica e cromatografia com fase estacionária quiral (ROUF, TANEJA, 2013; LORENZ; SEIDEL-MORGESTERN, 2014).

Um caso especial de resolução consiste na resolução cinética, ilustrada na **figura 8**. Esta se baseia na diferença de velocidades de reação dos enantiômeros de um racemato na presença de um catalisador ou reagente quiral. Quanto maior a diferença na cinética de cada enantiômero, maior é o grau de enantiosseletividade (seletividade para um enantiômero), e, consequentemente, maiores as possibilidades de se obter uma resolução eficiente, com altos excessos enantioméricos, tanto do produto, quanto do substrato remanescente (enantiômero não reagido) (KEITH et al, 2001).

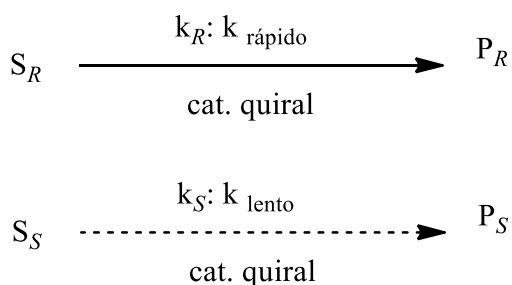


Figura 8: Mecanismo de uma resolução cinética catalisada, indicando diferença de velocidade entre os enantiômeros de um substrato (*R* e *S*) com um catalisador quiral.

Assumindo-se, pela **figura 8**, que o enantiômero *R* reaja mais rapidamente que o *S*, na presença do catalisador, ao término da resolução, espera-se que se obtenha uma mistura composta pelo produto P_R e o substrato remanescente *S*, ambos enantiomericamente enriquecidos.

Apesar da desvantagem patente das técnicas de resolução, no que tange a obtenção dos enantiômeros com rendimento máximo de 50%, metodologias como essas possuem aplicação quando o racemato é disponível ou sintetizado com baixo custo, o catalisador é altamente seletivo para um enantiômero e efetivo em baixas concentrações e, mesmo que seja caro, possa ser reciclado sem perda de enantiosseletividade. Além disso, visando-se aplicação, principalmente em escala industrial, é interessante que o produto e o substrato remanescente

sejam obtidos em altos excessos enantioméricos e separados facilmente, por procedimentos que não requeiram purificações laboriosas (KEITH et al, 2001).

Em resoluções cinéticas catalisadas, a razão das constantes de velocidade do enantiômero que reage mais rápido com o catalisador ($k_{\text{rápido}}$) e do mais lento (k_{lento}) é definida como o fator de seletividade (k_{rel} ou s). Este é ditado pela magnitude de $\Delta\Delta G^{++}$, o qual corresponde à diferença de energia entre os estados de transição diastereoisoméricos formados pela interação de cada enantiômero do racemato com o catalisador quiral (**Figura 9**). Essa é a etapa determinante de enantiosseletividade (KEITH et al, 2001).

$$k_{\text{rel}} = s = k_{\text{rápido}} / k_{\text{lento}} = e^{\Delta\Delta G^{++} / RT}$$

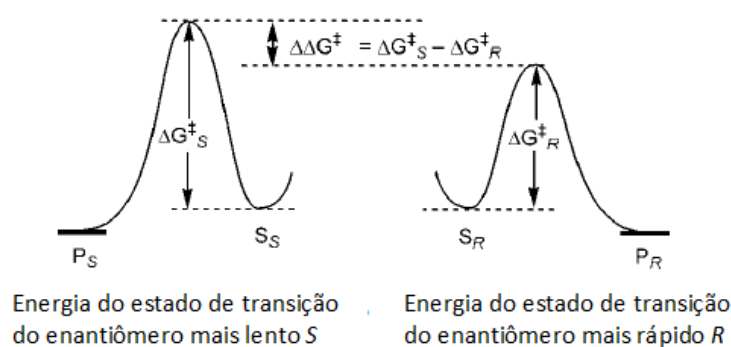


Figura 9: Diferença de energia dos estados de transição ($\Delta\Delta G^{++}$) dos enantiômeros de um racemato na presença de um catalisador quiral (Adaptado de KEITH et al, 2001). R: Constante dos gases e T: Temperatura (K).

Quanto maior os valores de k_{rel} , maiores as diferenças de energia entre os estados de transição diastereoisoméricos ($\Delta\Delta G^{++}$) e mais eficiente é a resolução cinética, visto que são maiores as possibilidades de se obterem tanto produto como substrato remanescente (enantiômero não reagido) em altos excessos enantioméricos (ee) (KEITH et al, 2001).

Em resoluções cinéticas, os valores de ee que podem ser obtidos para o produto e substrato remanescente apresentam uma relação com a conversão da reação. Observa-se que o ee do produto decai conforme se aumenta a conversão, enquanto o ee do substrato apresenta comportamento inverso, aumentando quando se atingem valores maiores de conversão (**Figura 10**). Ressalta-se que para simplificação matemática, a maioria dos gráficos que relacionam conversão com ee são plotados, levando-se em consideração que a reação catalisada apresenta cinética de primeira ordem em relação ao substrato (KEITH et al, 2001).

Uma das vantagens da resolução cinética é a possibilidade de se obter o substrato remanescente com alta pureza óptica (alto valor de ee), mesmo que o k_{rel} não seja tão alto, bastando-se, para tal, conduzir a reação a valores maiores de conversão. Nesse sentido, a desvantagem mais nítida é a queda de rendimento na obtenção do substrato enantioenriquecido. Em contrapartida, se houver interesse no produto com alto valor de ee , é fundamental que se tenha elevado valor de fator de seletividade ($k_{rel} > 50$) (KEITH et al, 2001).

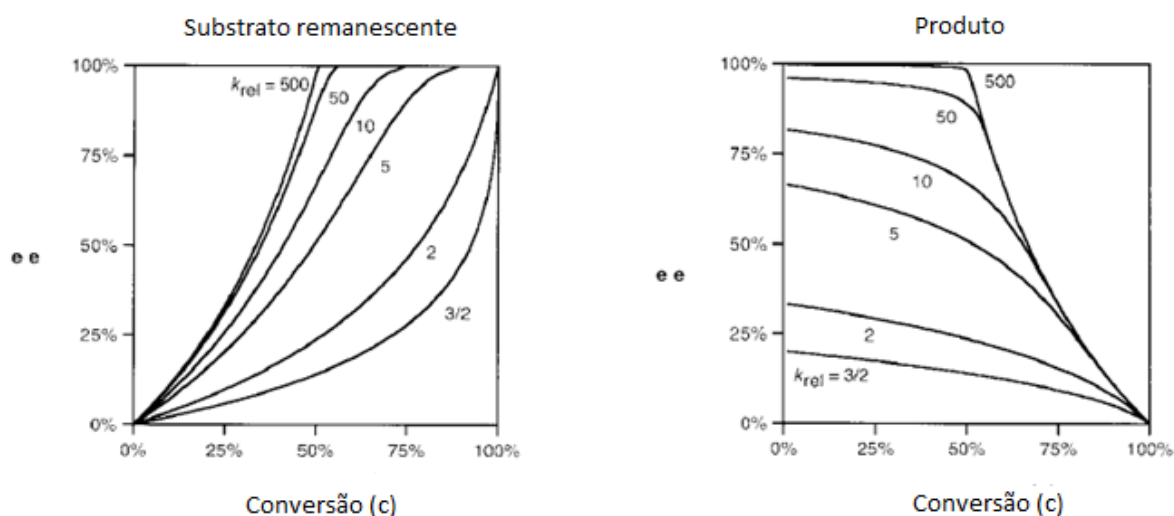


Figura 10: Relação de conversão com os excessos enantioméricos do substrato e produto (KEITH et al, 2001).

Os valores do fator de seletividade (k_{rel} ou s), largamente utilizados para se avaliar a enantiosseletividade do catalisador em uma reação assimétrica, podem ser calculados a partir de valores de conversão e excessos enantioméricos do produto (ee_p) ou substrato remanescente (ee_s), assumindo-se que a reação catalisada apresenta cinética de primeira ordem em relação ao substrato e que seja irreversível (**Equação 1**). Essas equações são utilizadas para a construção dos gráficos relacionando conversão e ee_s ou ee_p , como os da figura 15 (CHEN et al, 1982; KEITH et al, 2001; FABER, 2018).

Relação de ee_p com a conversão para um dado valor de S	Relação de ee_s com a conversão para um dado valor de S
$S = \frac{\ln [1 - c(1 + e.e.p)]}{\ln [1 - c(1 - e.e.p)]}$	$S = \frac{\ln [(1 - c)(1 - e.e.s)]}{\ln [(1 - c)(1 + e.e.s)]}$

Equação 1: Cálculo do fator de seletividade (s) a partir da conversão (c) e de ee_s ou ee_p (FABER, 2018)

Por convenção, valores de fatores de seletividade abaixo de 15 não apresentam fins práticos. Entre 15 a 30, são classificados como moderados e, acima de 30, como ideais (FABER, 2018).

Nos casos de reversibilidade, deve-se levar em consideração a constante de equilíbrio da reação (K) no cálculo do fator de seletividade (CHEN et al, 1987; FABER, 2018) (**Equação 2**).

Relação de ee_p com a conversão para um dado valor de S	Relação de ee_s com a conversão para um dado valor de S
$S = \frac{\ln [1 - (1 + K)c(1 + e.e.p)]}{\ln [1 - (1 + K)c(1 - e.e.p)]}$	$S = \frac{\ln [1 - (1 + K)(c + e.e.s\{1 - c\})]}{\ln [1 - (1 + K)(c - e.e.s\{1 - c\})]}$

Equação 2: Cálculo do fator de seletividade (s), em reações reversíveis, a partir da conversão (c) e de ee_s ou ee_p (FABER, 2018)

A peculiaridade de reações reversíveis pode ser visualizada através do gráfico relacionando conversão e excessos enantioméricos de produto e substrato (**Figura 11**). Analisando-se o gráfico, observa-se que, ao contrário de reações irreversíveis, o ee do substrato decai conforme se atingem valores de conversão mais altos. Pode-se entender esse fenômeno baseando-se no fato de que como a enantiopreferência é mantida no sentido de síntese e no sentido reverso, o mesmo enantiômero do produto e do substrato são selecionados preferencialmente pelo catalisador. Assumindo-se que o substrato A seja melhor substrato para o catalisador que B (k_1 e k_3 maiores que k_5 e k_7), a acumulação do produto P e do substrato reagente mais lento B ocorrerá. Para a reação reversa, entretanto, P será melhor substrato que Q, uma vez que possui a mesma quiralidade que A, logo, com a reversibilidade, será convertido a A mais rápido do que B é transformado em Q. Portanto, em conversões mais altas, a reversibilidade predomina e se configura como uma reação indesejada, causando a depleção de ee do substrato remanescente. Com isso, torna-se difícil a obtenção do substrato com elevado excesso enantiomérico, o que era uma vantagem de resoluções cinéticas, mesmo que as mesmas apresentassem fatores de seletividade mais modestos (FABER, 2018).

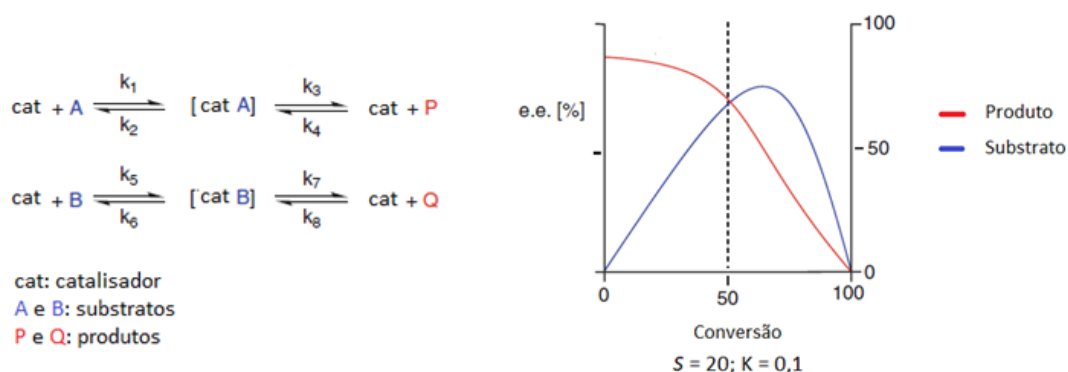


Figura 11: Relação de conversão com os excessos enantioméricos do substrato e produto em reação reversível, com $s = 20$ e $K = 0,1$ (FABER, 2018).

Um dos casos especiais de resolução cinética consiste no uso de enzimas como catalisadores quirais (biocatalisadores), configurando-se na denominada resolução cinética enzimática. Nesse tipo de resolução, refere-se, por convenção, o fator de seletividade como E , ao invés de s . O fator E , assim como o s , reflete a razão das velocidades iniciais de cada enantiômero com o catalisador quiral, no caso uma enzima (CHEN et al, 1982; FABER, 2018).

No âmbito de enzimologia, esse fator pode ser relacionado como a razão entre as constantes de Michaelis-Menten (K_M) e de turnover (k_{cat}) para cada enantiômero do racemato, sendo essa razão (k_{cat}/K_M) denominada constante de especificidade (CHEN et al, 1982; FABER, 2018) (**Equação 3**). Em sentido mais amplo, a razão entre as constantes de especificidade é um parâmetro para expressar as diferenças nas velocidades de reações de uma enzima com substratos concorrentes, dentre estes, podem-se incluir os enantiômeros (STRAATHOF; JONGEJAN, 1997).

Esse método de cálculo do fator E é pouco utilizado, entretanto, por ser laborioso, necessitando-se de estudo cinético de cada enantiômero e da disponibilidade dos mesmos, a fim de se determinarem os valores de constantes cinéticas (CHAPUT et al, 2012; KITAMOTO et al, 2015).

$$E = \frac{v_A}{v_B} = \frac{\left[\frac{k_{cat}}{K_M} \right]_A}{\left[\frac{k_{cat}}{K_M} \right]_B}$$

v_A : velocidade inicial de reação do enantiômero A

v_B : velocidade inicial de reação do enantiômero B

Equação 3: Cálculo de E a partir da constante de especificidade de cada enantiômero com uma enzima (Adaptado de KITAMOTO et al, 2015)

Devido à quiralidade do sítio ativo da enzima, um dos enantiômeros interage melhor que o outro, e, logo, é convertido em maior velocidade, conseguindo-se a resolução cinética do racemato (FABER, 2018). Devido a isso, o uso de enzimas em resoluções cinéticas, visando-se a obtenção de substâncias enantioenriquecidas, configura-se como estratégia tradicional no campo de catálise assimétrica. Além de processos enzimáticos, outras resoluções cinéticas, envolvendo metais de transição e organocatalisadores, podem ser encontradas na literatura (PELISSIER, 2011).

1.4 Métodos químicos de obtenção do propano-1,2-diol opticamente ativo

O propano-1,2-diol (propilenoglicol) é um diol com vasta aplicação, sendo utilizado como monômero em resinas de poliéster, em fluidos especiais, com a função de agente anticongelante, em detergentes líquidos, tintas, além de ser empregado nas indústrias de cosméticos, como umectante, e de alimentos. Sua produção industrial dá-se a partir da hidrólise do óxido de propileno, um dos subprodutos da exploração do petróleo. Ao se utilizarem processos não catalíticos, são requeridas altas condições de temperatura (150 – 250 °C) e pressão (acima de 100 psi), além de um grande volume de água. Geram-se, como subprodutos, dímeros (dipropilenoglicol) e trímeros de propilenoglicol (tripropilenoglicol), que necessitam de separação, rendendo ao processo desvantagens (NANDA et al, 2016).

Como alternativa mais sustentável a processos cuja matéria-prima é o óxido de propileno, e, portanto, dependentes de combustível fóssil, vêm sendo estudadas rotas de produção de propilenoglicol a partir de recursos renováveis, como o glicerol (DASARI et al, 2005; NANDA et al, 2016; FREITAS et al, 2018) e, até mesmo, a celulose (LIU et al, 2012; XIAO et al, 2013).

Devido ao estereocentro em C-2, o propano-1,2-diol é uma substância quiral, constituída por uma mistura equimolar (racemato) de seus enantiômeros (*R* e *S*), os quais são

isômeros de configuração não sobreponíveis, cada qual a imagem especular do outro (**Figura 12**).

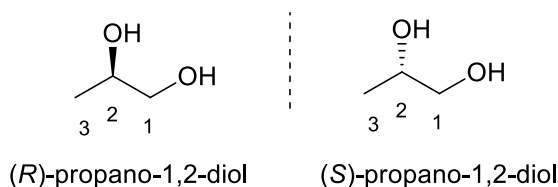
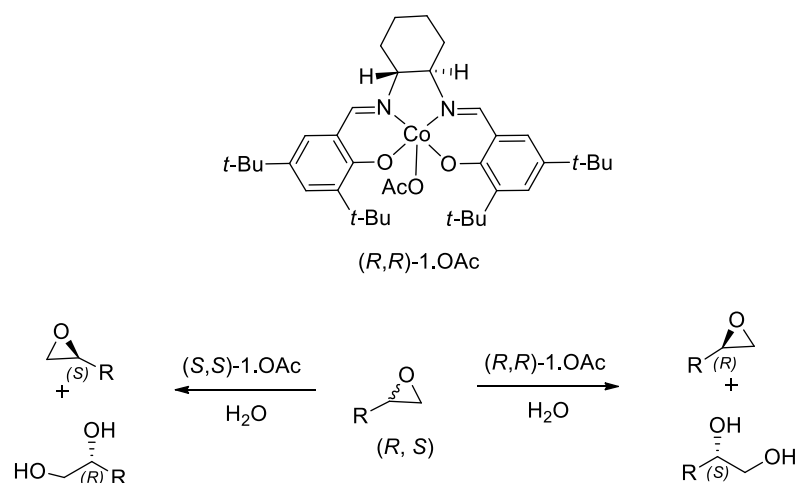


Figura 12: Enantiômeros do propano-1,2-diol.

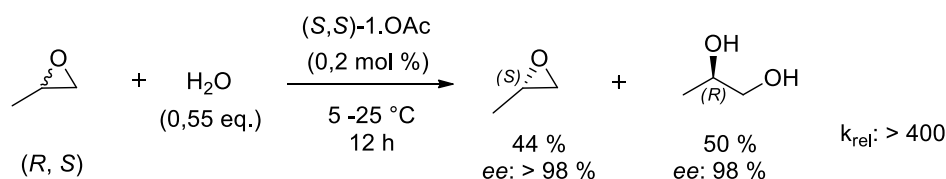
Os enantiômeros do propano-1,2-diol podem ser obtidos por meio da resolução cinética hidrolítica do óxido de propileno (**Esquema 5**). Esse processo, descoberto pelo grupo de pesquisas de Jacobsen (JACOBSEN, 2000), é largamente utilizado para a resolução cinética de epóxidos terminais. Na presença do catalisador quiral (R,R) -1.OAc, formado por um complexo de cobalto, com o ligante quiral salen (complexo Co(III)-salen), promove-se uma reação de hidrólise enantiosseletiva, gerando-se dióis (produto) e epóxidos terminais (substrato não reagido), ambos enantiomericamente enriquecidos (SCHAUS et al, 2002). Os enantiômeros do catalisador são disponíveis comercialmente, sob a forma de complexo Co(II)-salen, sendo necessária prévia oxidação a Co(III) para sua ativação, viabilizada por oxidação aeróbia na presença, por exemplo, de ácido acético (JACOBSEN, 2000; SCHAUS et al, 2002).



Esquema 5: Obtenção de ambos enantiômeros do propano-1,2-diol variando-se a configuração do catalisador, por meio de resolução cinética hidrolítica (SCHAUS et al, 2002).

O enantiômero (R) -propano-1,2-diol foi obtido com 98 % de excesso enantiomérico e rendimento de 50 %, em 12 horas de reação, através da reação do óxido de propileno

racêmico com água (0,55 eq), na presença do catalisador na configuração (S,S), em baixas concentrações (0,2 mol %). Além de gerar o referido diol com alto *ee*, o substrato remanescente, o óxido de propileno na configuração (S), foi conseguido com *ee* >98 %, configurando-se em uma resolução altamente enantiosseletiva ($k_{rel} > 400$) (TOKUNAGA et al, 1997) (**Esquema 6**). Além disso, o catalisador pôde ser reciclado por mais duas vezes, sem perda de eficiência. Mudando-se a configuração do catalisador para (R,R) é possível obter o enantiômero (S)-propano-1,2-diol, com *ee* $\geq$ 98 % (JACOBSEN, 2000; SCHAUS et al, 2002).

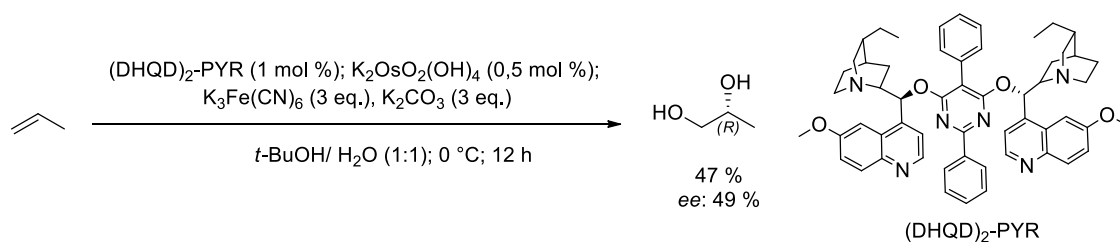


Esquema 6: Obtenção do (R)-propano-1,2-diol a partir de resolução cinética hidrolítica (TOKUNAGA et al, 1997).

Além da resolução hidrolítica do óxido de propileno, metodologias empregando, como material de partida, o glicidol enantiomericamente enriquecido, o qual pode ser obtido por diferentes metodologias (KATSUKI; SHARPLESS, 1980; GAO et al, 1987; PALOMO et al, 2005; LEI et al, 2010), podem ser adotadas para a obtenção do propano-1,2-diol enantiomericamente puro (SAJIKI et al, 1999).

A di-hidroxilação assimétrica de alcenos terminais catalisada por ósmio, segundo metodologia de Sharpless, é um dos métodos mais tradicionais para a preparação de dióis terminais vicinais opticamente ativos. Entretanto, tratando-se de alcenos terminais com substituintes pouco volumosos ligados à dupla ligação, como o propeno, que possui uma metila, o processo de oxidação enantiosseletiva é dificultada (NOE et al, 2005).

A título de ilustração, Vanhessche e Sharpless (1997) utilizaram o propeno como substrato na di-hidroxilação assimétrica, na presença do ligante quiral DHQD₂ (DHQD: diidroquinidil), contendo diferentes espaçadores (ftalazina: PHAL e pirimidina: PYR). O (R)-propano-1,2-diol foi obtido com 35 % e 49 % de *ee*, ao se empregarem DHQD₂-PHAL e DHQD₂-PYR, respectivamente (**Esquema 7**).



Esquema 7: Di-hidroxilação assimétrica do propeno para obtenção do (*R*)-propano-1,2-diol (VANHESSCHE; SHARPLESS, 1997).

A metodologia de hidrogenação enantiosseletiva de α -hidróxi-cetonas, para obtenção do propano-1,2-diol opticamente ativo, também é dificultada pela semelhança estérica dos dois grupos adjacentes à carbonila da α -hidróxi-propanona. Com substituintes mais volumosos, como em α -hidróxi-arilcetonas, há uma diferença de volume entre esses grupos (**Figura 13**) e, conseqüentemente, podem ser obtidos, com mais facilidade, melhores resultados de enantiosseletividade (KADYROV et al, 2009).

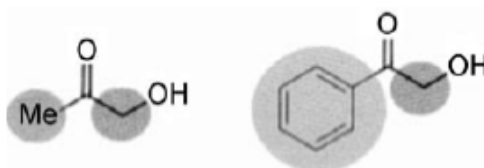
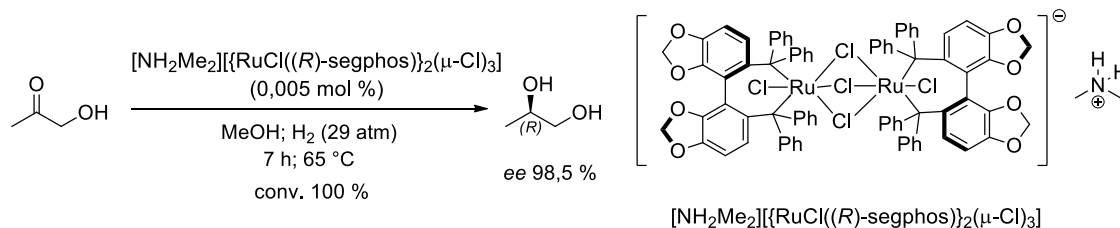


Figura 13: Comparação entre o efeito estérico dos substituintes da α -hidróxi-fenilpropanona e da α -hidróxi-propanona (KADYROV et al, 2009).

Entretanto, mesmo com a dificuldade supracitada, Saito e colaboradores (2001) desenvolveram uma série de ligantes quirais denominados SEGPHOS para utilização na redução assimétrica, catalisada por rutênio, de cetonas, dentre estas a α -hidróxi-propanona. O enantiômero (*R*)-propano-1,2-diol foi obtido com > 99 % de *ee*, com conversão completa, após 7 horas de reação, com pressão de 30 Kgf/cm² (29 atm) de H₂ e temperatura de 65 °C. O aumento da razão molar substrato/catalisador (S/C) de 3.000 para 10.000, não resultou em acréscimo do tempo reacional para se atingir 100 % de conversão, observando-se somente pequena redução no *ee* para 98,5 % (**Esquema 8**).



Esquema 8: Redução assimétrica da α -hidróxi-propanona a (*R*)-propano-1,2-diol (SAITO et al, 2001).

A hidrogenação assimétrica catalítica desenvolvida por Saito e colaboradores (2001) representou um avanço em comparação com o processo desenvolvido por Kitamura e colaboradores (1988). Neste, o (*R*)-propano-1,2-diol foi obtido com 92 % de *ee* e 100 % de rendimento, por meio de outro catalisador, composto por rutênio e o ligante (*R*)-BINAP, sendo necessários tempo reacional e pressão maiores, 32 horas e 93 atm de H_2 , respectivamente, apesar de se utilizarem temperaturas menores de 20-32 °C. Além disso, empregou-se uma menor razão molar substrato /catalisador ($S/C = 230$).

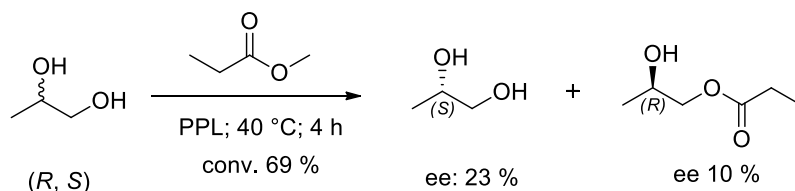
Em outro trabalho, utilizando-se, também, da hidrogenação assimétrica, mas com outro ligante quiral, Kadyrov e colaboradores (2009) sintetizaram, via catálise com rutênio, o (*R*)-propano-1,2-diol com *ee* de 95 % e rendimento de 80 %, após 17 horas de reação, com S/C de 1.000 e 80 bar de H_2 . Ao se diminuir a carga de catalisador ($S/C = 10.000$), necessitou-se de aumento do tempo reacional (48 horas), obtendo-se o respectivo diol com *ee* de 94 % e 85 % de rendimento. Em estudo mais recente, Wu e colaboradores (2017) empregaram o metal irídio com ligante quiral ($S/C = 10.000$), para a síntese enantiosseletiva de uma série de 1,2-dióis, dentre estes o (*S*)-propano-1,2-diol, que foi obtido com 99 % de rendimento e 93 % de *ee*, ao longo de 2 horas, utilizando-se 20 atm de H_2 .

Além das estratégias supracitadas, Liu e colaboradores (2018) desenvolveram um processo de resolução cinética via esterificação, por meio de catálise com carbeno N-heterocíclico quiral, para a obtenção enantiosseletiva de diversos 1,2-dióis, dentre estes o propano-1,2-diol. O (*S*)-propano-1,2-diol foi obtido com 52 % de rendimento e baixo *ee* (50 %).

1.5 Emprego do propano-1,2-diol e seus derivados como substratos de lipases

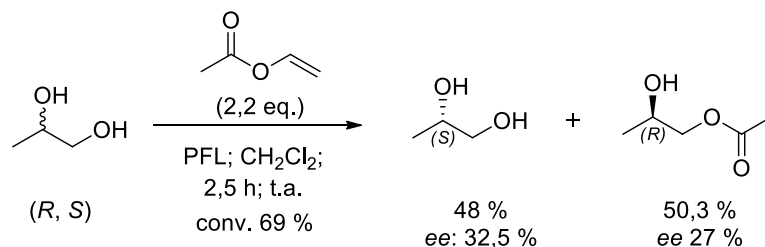
Trabalhos descrevendo a utilização do propano-1,2-diol racêmico, como substrato de resoluções cinéticas enzimáticas via lipases, podem ser encontrados na literatura. Janssen e colaboradores (1991) estudaram a régio- e enantiosseletividades da reação de transesterificação, catalisada pela lipase de pâncreas de porco (PPL), de diversos dióis com

propionato de metila, na condição de solvente e agente acilante. Obteve-se alta regioseletividade, sendo observada somente monoacilação na hidroxila primária, apesar da baixa enantiosseletividade. Tendo-se como substrato o propano-1,2-diol, obtiveram-se o enantiômero (*S*)-propano-1,2-diol com *ee* de 23 % e o produto monoacilado na configuração (*R*) com *ee* de 10 %, ao se atingir 69 % de conversão (**Esquema 9**).



Esquema 9: Resolução cinética do propano-1,2-diol com propionato de metila via PPL (JANSSEN et al, 1991).

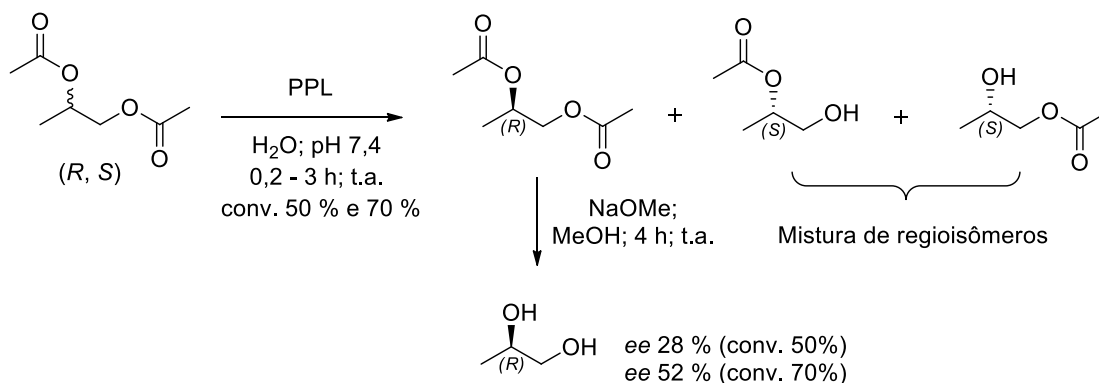
De modo semelhante, Izquierdo e colaboradores (2000) utilizaram a lipase de *Pseudomonas fluorescens* (PFL) visando à resolução cinética do propano-1,2-diol. Utilizou-se, como agente acilante, o acetato de vinila e diclorometano, como solvente. Obtiveram-se o enantiômero (*R*), monoacetilado na hidroxila primária, com 27 % de *ee* e rendimento de 50,3 % e o (*S*)-propano-1,2-diol, com 32,5 % de *ee* e rendimento de 48 % (**Esquema 10**).



Esquema 10: Resolução cinética do propano-1,2-diol com acetato de vinila via PFL (IZQUIERDO et al, 2000).

Alternativamente à acilação enzimática direta do propano-1,2-diol, a qual não resultou em boa enantiosseletividade, Poppe e colaboradores (1993) partiram de derivados diacetilados de dióis, dentre estes, o diacetato de propano-1,2-diol, investigando-se a enantiosseletividade em reações de hidrólise via lipase de pâncreas de porco (PPL). Nessas reações, observou-se a ocorrência de desacetilação tanto na hidroxila primária, quanto na secundária, gerando mistura de regioisômeros monoacetilados com a mesma configuração. Após hidrólise básica do diacetato de propano-1,2-diol remanescente, o (*R*)-propano-1,2-diol foi obtido com *ee* de

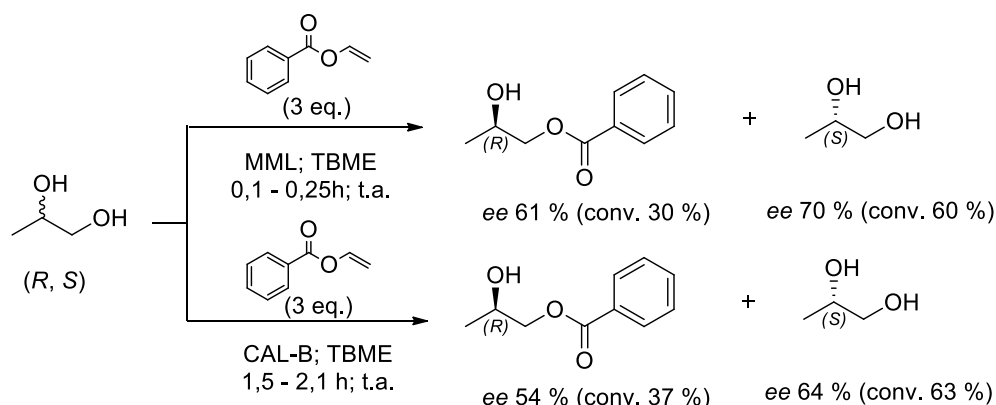
28 %, em 50 % de conversão. O *ee* é aumentado para 52 %, ao se atingir 70 % de conversão na reação de hidrólise (**Esquema 11**).



Esquema 11: Obtenção do (R)-propano-1,2-diol a partir da hidrólise do diacetato de propano-1,2-diol via PPL (POPPE et al, 1993).

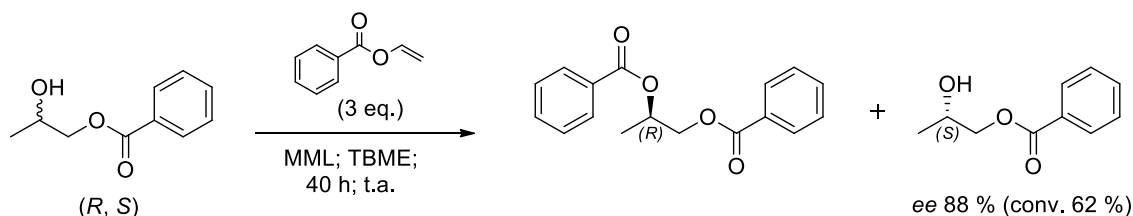
Comparando-se o trabalho supracitado (POPPE et al, 1993) com o de acilação direta de dióis catalisada pela mesma lipase (PPL) (JANSSEN et al, 1991), observa-se maior enantiosseletividade nas reações de hidrólise dos derivados diacilados, porém, com menor regioseletividade, tendo-se em vista que houve desacilação enzimática tanto da hidroxila primária, quanto da secundária. Entretanto, apesar da menor regioseletividade, observou-se que os produtos das desacilações, possuem a mesma configuração, demonstrando que a lipase PPL manteve a mesma enantiopreferência (POPPE et al, 1993).

Em trabalho mais recente, Ciuffreda e colaboradores (2003) estudaram a enantiosseletividade de lipases na reação de transesterificação do propano-1,2-diol com benzoato de vinila em TBME. As lipases mais enantiosseletivas foram as de *Rhizomucor miehei* (MML) e a CAL-B (N435), obtendo-se o produto monobenzoilado na configuração (R) com *ee* de 61 %, em conversão de 30 %, com MML. Com a CAL-B (N435), o *ee* foi de 54%, em conversão de 37 %. Ao se atingirem conversões mais altas, ocorre enantioenriquecimento do substrato, no caso o propano-1,2-diol, que foi obtido na configuração (S), com *ee* de 70 %, em 60 % de conversão, via MML, e com *ee* de 64 %, em 63 % de conversão, via CAL-B (**Esquema 12**).



Esquema 12: Resolução cinética do propano-1,2-diol com benzoato de vinila via MML e CAL-B (CIUFFREDA et al, 2003).

Comparativamente, ao se utilizar como substrato o benzoato de 2-hidroxipropila, ao invés do propano-1,2-diol, na acilação com benzoato de vinila com catálise de MML em TBME, observou-se um aumento na enantiosseletividade, demonstrando um melhor reconhecimento do substrato pela lipase. Obteve-se o monobenzoato enantioenriquecido na configuração (S), com *ee* de 88 %, em 62 % de conversão (CIUFFREDA et al, 2003) (Esquema 13).

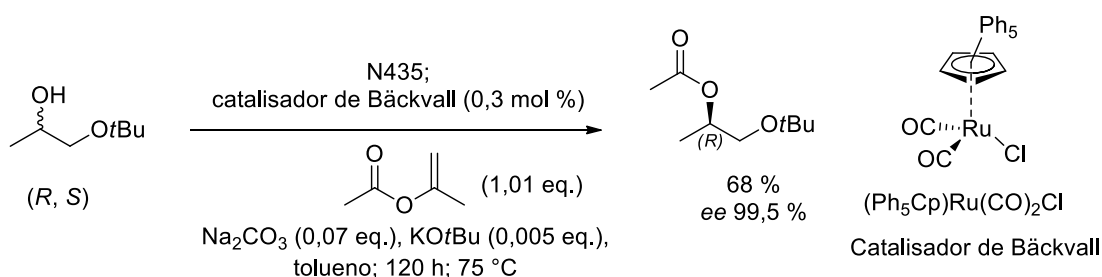


Esquema 13: Resolução cinética do benzoato de 2-hidroxipropila com benzoato de vinila via MML (CIUFFREDA et al, 2003).

1.5.1 Resolução cinética enzimática de derivados éteres do propano-1,2-diol

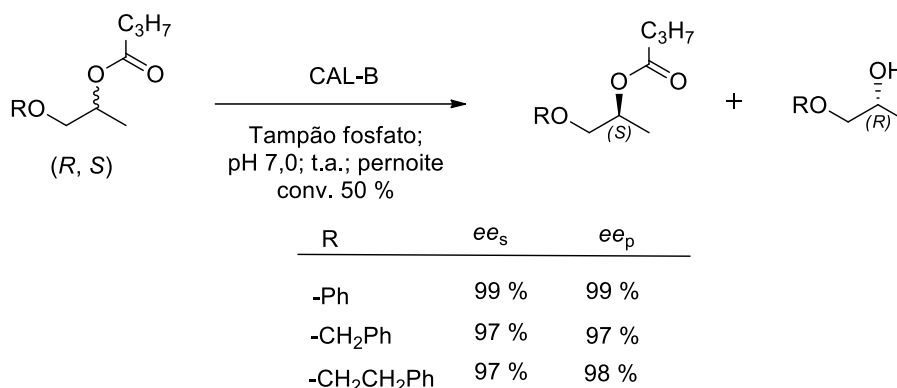
Em alternativa ao emprego do propano-1,2-diol diretamente como substrato em resoluções via lipase, alguns trabalhos reportam o uso de derivados éteres do propano-1,2-diol. Estes podem ser obtidos através de monoalquilação seletiva, utilizando-se o óxido de dibutilestanileno e haletos de alquila, como o iodeto de benzila. Observou-se que a adição de sais de fluoreto, como o fluoreto de cézio, possui efeito considerável, viabilizando que a reação ocorra a temperaturas mais baixas (NAGASHIMA; OHNO, 1991). A proteção da hidroxila primária restringe a hidroxila secundária, que é ligada ao carbono assimétrico, para reações de transesterificação, por exemplo.

Nesse contexto, Shuklov e colaboradores (2014) utilizaram o 1-tertbutoxi-2-propanol, para a resolução cinética dinâmica enzimática. Este é um tipo de resolução na qual ocorre a formação de um único enantiômero a partir de um racemato (deracemização), apresentando a vantagem, em relação à resolução cinética, de não possuir a limitação de rendimento máximo de 50 % na obtenção dos enantiômeros. Para tal, torna-se necessária uma etapa adicional de racemização, na qual o substrato é continuamente racemizado, não levando ao acúmulo do enantiômero mais lento (VERHO; BÄCKVALL, 2015, FABER, 2018). A lipase N435 foi empregada, juntamente com o acetato de isopropenila, como agente acilante, e o catalisador de Bäckvall, com a função de promover a racemização constante do substrato. Conseguiu-se obter o produto monoacetilado, com configuração (*R*), com *ee* de 99 %, mesmo em alta conversão de 92 %. O derivado éter acetilado enantiopuro foi obtido com 68 % de rendimento e 99,5 % de *ee* (**Esquema 14**). Este pode ser convertido ao (*R*)-propano-1,2-diol através de desacilação e desproteção do grupo éter (SHUKLOV et al, 2014).



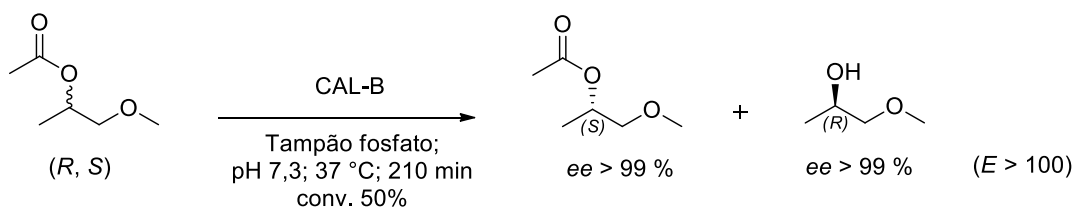
Esquema 14: Resolução cinética dinâmica do 1-tertbutoxi-2-propanol com acetato de isopropenila via N435 (SHUKLOV et al, 2014).

Hoff e colaboradores (1996) estudaram a resolução cinética de derivados 2-butanoato-1-éteres do propano,1,2-diol, através da reação de hidrólise catalisada por lipases. Foram avaliadas as lipases de *Pseudomonas cepacia* (PCL), *Rhizomucor miehei* (RM), lipase de pâncreas de porco (PPL) e a lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B). Os melhores resultados foram obtidos com a CALB, reportando-se altos excessos enantioméricos (*ee* $\geq$ 97 %), para o produto e substrato, em 50 % de conversão, o que reflete excelentes valores de *E* (*E* > 100) (**Esquema 15**).



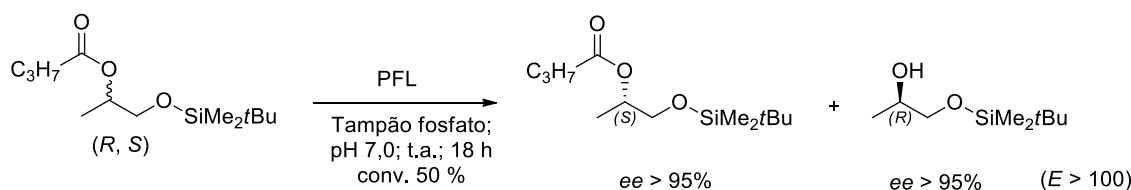
Esquema 15: Hidrólise de derivados 2-butanoato-1-éteres do propano,1,2-diol via CAL-B (HOFF et al, 1996).

Baumann e colaboradores (2000) avaliaram a capacidade de diversas hidrolases em resolver cineticamente substratos racêmicos, classificados, segundo os autores, como “difíceis de resolver”, dentre estes, o acetato de 1-metóxi-2-propanila. Esta substância apresenta um grupo éter menos volumoso em comparação com as estudadas por Hoff e colaboradores (1996). Em escala preparativa, a hidrólise desse substrato catalisada pela CAL-B apresentou um valor de $E > 100$, fornecendo o produto (1-metóxi-2-propanol), na configuração (*R*), e o substrato remanescente, na configuração (*S*), ambos com ee acima de 99 % (**Esquema 16**).



Esquema 16: Hidrólise do acetato de 1-metóxi-2-propanila via CalB (BAUMANN et al, 2000).

Goergens e Schneider (1991) reportaram a resolução enzimática de diversos dióis, dentre estes o propano-1,2-diol. Primeiramente, foi realizada a proteção da hidroxila primária através de sililação utilizando-se o *t*-butildimetilsilil (TBDMS), o qual proporcionaria, conforme sugerido pelos autores, uma enantiodiferenciação, pelo fato de ser um grupo volumoso. O derivado sililéter foi acetilado por via química e submetido à reação de hidrólise catalisada pela lipase de *Pseudomonas fluorescens* (PFL). A hidrólise do éster, em 50 % de conversão, gerou o enantiômero (*R*) do propano-1,2-diol sililado na posição 1, com ee acima de 95 % (**Esquema 17**). Este pode ser convertido a (*R*) do propano-1,2-diol após hidrólise ácida.

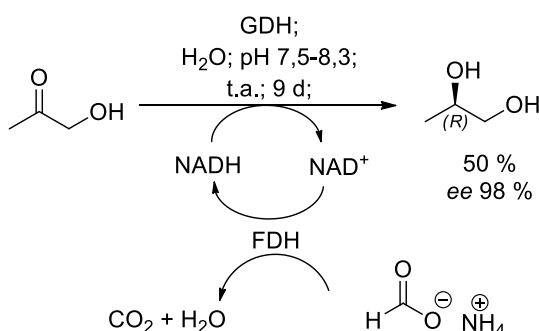


Esquema 17: Hidrólise do butirato de 1-butildimetilsililóxi-2-propanila via PFL (GOERGENSE; SCHNEIDER, 1991).

Outras alternativas mais recentes foram estudadas por Petursson e colaboradores, utilizando derivados 1-éteres do propano-1,2-diol, como substratos para lipases em reações de transesterificação com acetato de vinila (PETURSSON, 2009; PETURSSON et al, 2012).

1.6 Bioeduções e bioeduções para obtenção dos enantiômeros do propano-1,2-diol

Lee e Whitesides (1986) reportaram a redução enantiosseletiva da α -hidróxiopropanona a (*R*)-propano-1,2-diol catalisada pela enzima comercial glicerol desidrogenase (GDH) de *Enterobacter aerogens*, uma oxirredutase dependente de NADH. Adicionaram-se ao meio o formiato de amônio, a formiato desidrogenase (FDH) e NAD^+ para a regeneração do cofator NADH. A reação permaneceu em atmosfera de argônio, para evitar a oxidação dos grupos tióis da GDH, por 9 dias. O (*R*)-propano-1,2-diol foi obtido com rendimento de 50 % e 98 % de *ee* (**Esquema 18**).

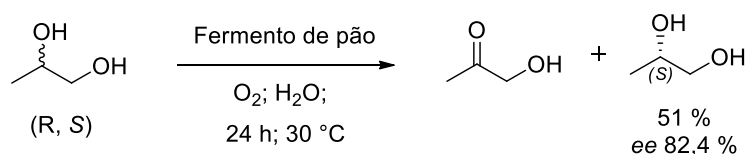


Esquema 18: Bioedução enantiosseletiva da α -hidróxiopropanona via GDH (LEE; WHITESIDES, 1986).

Bioeduções e oxidações catalisadas por fungos, como alternativa ao emprego de enzimas isoladas, mostraram-se promissoras como rotas industriais para obtenção dos enantiômeros do propano-1,2-diol. Ao invés da enzima GDH, conforme o trabalho de Lee e Whitesides (1986), Kometani e colaboradores (1993) utilizaram fermento de pão (*Saccharomyces cerevisiae*) para desenvolver um processo em larga escala (10 L) de redução

assimétrica do acetol (α -hidróxiopropanona), visando à obtenção do (*R*)-propano-1,2-diol. Utilizou-se etanol como fonte de energia, ao invés de carboidratos, e, também, para regeneração do cofator necessário à bioedução (NADH). Este foi gerado a partir de NAD^+ , por meio da oxidação do etanol. O processo foi desenvolvido em reator com aeração controlada e operando sob batelada alimentada de acetol e etanol. Após 38 horas a 30 °C, mais de 95 % de acetol foi convertido a (*R*)-propano-1,2-diol, com *ee* acima de 98 % e rendimento, após purificação, de 55 %.

Seguindo estratégia semelhante, os mesmos autores utilizaram o mesmo microorganismo, fermento de pão (*Saccharomyces cerevisiae*), em um processo de resolução cinética por oxidação aeróbia do propano-1,2-diol. Além do custo do catalisador (fermento) ser baixo e o meio reacional ser a água, outra vantagem do processo é a fácil remoção do acetol, o produto da reação de oxidação, por evaporação. Obteve-se o enantiômero (*S*) com 51 % de rendimento e *ee* de 82,4 % (**Esquema 19**). Visando-se aumentar o excesso enantiomérico (enantioenriquecimento), procedeu-se com uma segunda resolução, na qual se partiu do (*S*)-propano-1,2-diol (*ee* de 82,4 %), conseguindo-se 71 % de rendimento e 98 % de *ee* (KOMETANI, 1993b). Com isso, através do mesmo biocatalisador, conseguiu-se obter ambos os enantiômeros do propano-1,2-diol, sendo um por oxidação (KOMETANI et al, 1993b) e o outro por redução (KOMETANI et al, 1993).



Esquema 19: Resolução cinética oxidativa do propano-1,2-diol via *Saccharomyces cerevisiae* (KOMETANI, 1993b).

Baseando-se na tecnologia de DNA recombinante, Yamada-Onodera e colaboradores (2004) utilizaram, como biocatalisadores, células modificadas geneticamente de *Escherichia coli*, contendo o gene da enzima glicerol desidrogenase de *Hansenula polymorpha* DL-1. Esta enzima promoveu a oxidação seletiva do enantiômero (*R*) do propano-1,2-diol, obtendo-se 50 mM de (*S*)-propano-1,2-diol a partir de 100 mM de seu racemato, com 98 % de *ee*, após 24 h de incubação a 30 °C. Além disso, empregaram-se células de *E. coli* transformadas com plasmídeo de expressão contendo ambos os genes de glicose desidrogenase e glicerol desidrogenase, com a finalidade de se obter o (*R*)-propano-1,2-diol a partir do acetol. Utilizou-se a glicose desidrogenase, proveniente de *Bacillus subtilis*, em meio contendo

glicose, para viabilizar a regeneração de NADH, cofator importante para a bioedução enantiosseletiva almejada. Em escala maior, partindo-se de 800 mM de acetol, obteve-se, após 33 h de incubação a 30 °C, 550 mM de (*R*)-propano-1,2-diol, com *ee* > 99 %.

1.7 Obtenção de propano-1,2-diol opticamente ativo por fermentação

Apesar de menos usual, o propano-1,2-diol também pode ser gerado por meio de rotas fermentativas. Cameron e colaboradores (1986) obtiveram o enantiômero (*R*)-propano-1,2-diol através da fermentação com cepas de *Clostridium thermosaccharolyticum*, um microorganismo anaeróbio estrito, utilizando-se vários açúcares como substratos, incluindo D-glicose e D-xilose. A possível rota metabólica levantada pelos autores para a formação de propano-1,2-diol envolve a conversão da dihidroxi-acetona a metilglioxal, o qual é reduzido primeiramente a acetol e, posteriormente, enantiosseletivamente, a (*R*)-propano-1,2-diol. A fermentação da glicose com a cepa HG-8 (ATCC 31960) gerou 7,9 g/ L de (*R*)-propano-1,2-diol no tempo final de fermentação (aproximadamente 100 horas), com *ee* acima de 99 % e com o melhor rendimento de 0,27g/ g de glicose, obtido em 30,7 horas de fermentação. O rendimento decai após esse tempo, atingindo o valor de 0,19 g/ g de glicose, no tempo final.

1.8 Métodos de obtenção do carbonato de propileno

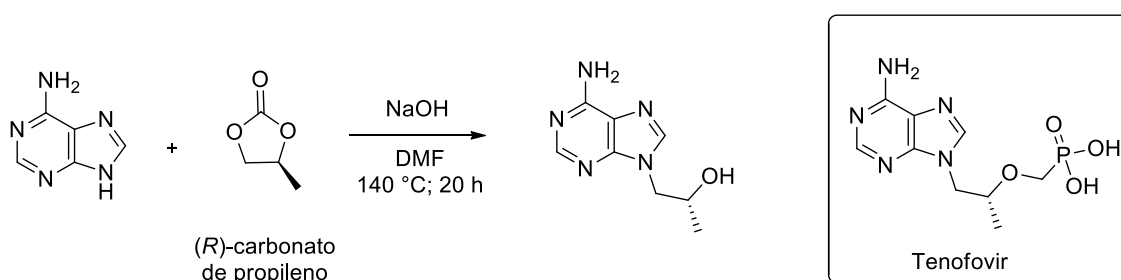
Carbonatos cíclicos orgânicos, como o carbonato de propileno, possuem diferentes aplicações industriais, como solventes apróticos, precursores de resinas de policarbonato, eletrólitos em pilhas de lítio, e também, como intermediários sintéticos em síntese orgânica (SAKAKURA; KOHNO, 2009; HONDA et al., 2014; MARTÍN et al., 2015). Convencionalmente, carbonatos cíclicos podem ser sintetizados empregando-se fosgênio, entretanto, este processo possui desvantagens advindas da toxicidade desse reagente e da coprodução de grandes quantidades de ácido clorídrico, necessitando-se de etapa de neutralização para tratamento do resíduo (SAKAKURA; KOHNO, 2009; PEARSON et al, 2011; HONDA et al., 2014; YASIR et al, 2017).

Metodologias alternativas ao uso de fosgênio são descritas na literatura, como a oxidação de olefinas com CO₂ (EGHBALI; LI, 2007; WU et al, 2014; KUMAR et al, 2015), carbonilação oxidativa de dióis (DORO et al, 2011; PEARSON et al, 2011), cicloadição de CO₂ a epóxidos (KLEIJ et al, 2010; MARTÍN et al, 2015; BÜTTNER et al, 2017), condensação de dióis com uréia (YASIR et al, 2017; INDRAN et al, 2016; PEÑA-LÓPEZ et

al, 2016), carboxilação de dióis (HUANG et al, 2008; WANG et al, 2011; HONDA et al., 2014; LIM et al, 2014; GREGORY et al, 2015) e transesterificação (transalquilação) de dióis com carbonatos orgânicos (SANDERS et al, 2010; SELVA et al, 2014), podendo esta ser realizada através de biocatálise, com o uso de lipases (YADAV et al, 2015).

1.8.1 Obtenção de carbonato de propileno enantioenriquecido por resolução do óxido de propileno

No âmbito da síntese assimétrica, carbonatos cíclicos enantiomericamente enriquecidos podem ser empregados como blocos de construção de intermediários quirais. Destaca-se o carbonato de propileno, o qual seu enantiômero (*R*) é utilizado na rota sintética de obtenção do fármaco antirretroviral tenofovir (SCHULTZE et al, 1998) (**Esquema 20**).



Esquema 20: Utilização do (*R*)-carbonato de propileno na síntese do tenofovir (Adaptado de SCHULTZE et al, 1998).

Na literatura, são descritas algumas metodologias para a obtenção dos enantiômeros do carbonato de propileno, com destaque para a resolução cinética de epóxidos, utilizando-se CO₂ e catalisadores quirais, por meio de reação de cicloadição (WU et al, 2016).

Visto que o acoplamento direto de CO₂ com epóxidos é desfavorável, devido à alta barreira energética dessa transformação, um sistema catalítico é requerido, utilizando-se, normalmente, complexos de metais (ácidos de Lewis) com ligantes quirais, além de pressões e temperaturas mais altas. Em metodologias de resolução, um dos enantiômeros dos epóxidos é ativado pela interação do oxigênio do anel com o eletrófilo quiral (ácido de Lewis). Em seguida, ocorre o ataque de um nucleófilo (rota a), ou do dióxido de carbono ativado por nucleófilo (rota b), com posterior abertura do epóxido. O carbonato é formado via eliminação intramolecular cíclica (**Figura 14**). Através de uma resolução eficiente, podem ser obtidos epóxidos (substratos remanescentes) e carbonatos cíclicos (produtos) com alta pureza óptica (LU et al, 2004; WU et al, 2016).

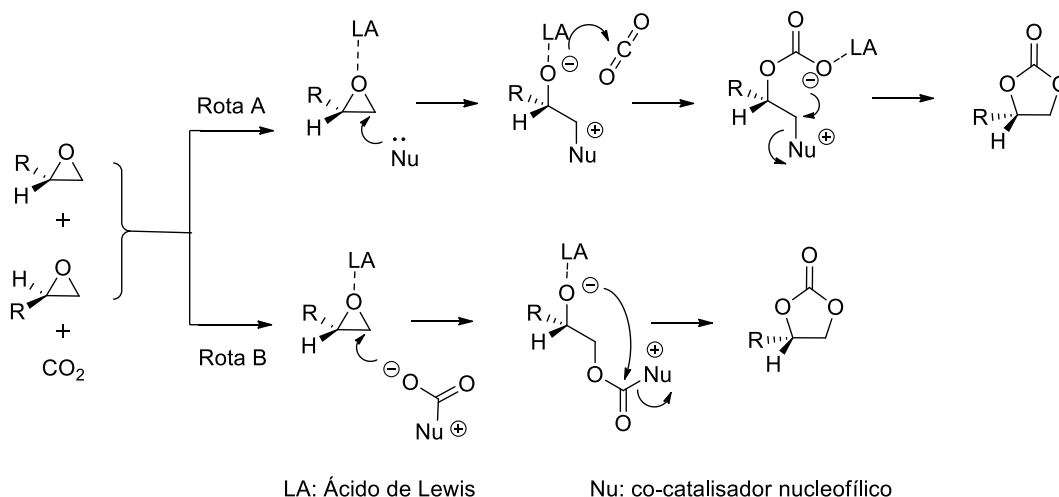
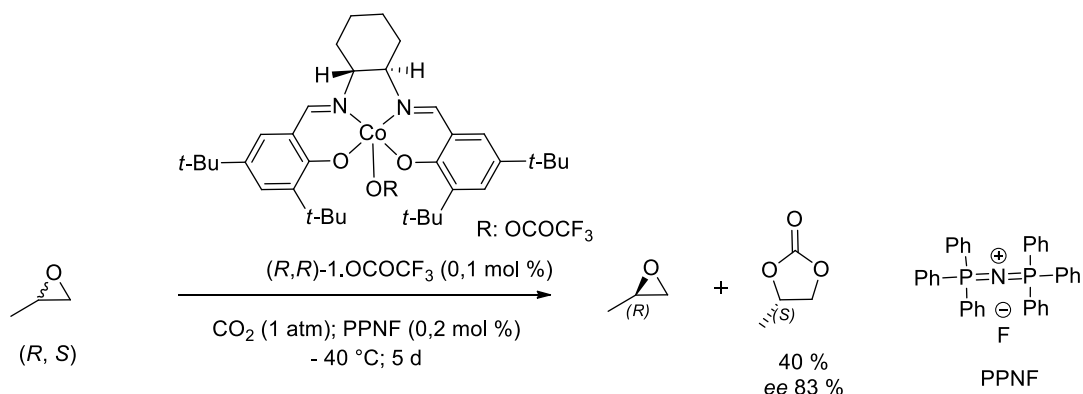


Figura 14: Mecanismos de acoplamento de CO_2 a epóxidos (Adaptado de WU et al, 2016).

Estudos pioneiros visando à resolução cinética de epóxidos com o uso de catalisadores metálicos, com a função de ácido de Lewis, dentre estes titânio e zircônio, em conjunto com ligantes quirais, foram desenvolvidos pelo grupo de pesquisa de Vogt (BRUNNER et al, 1993). Todavia, observou-se baixa enantiosseletividade, tendo como melhor resultado um valor de s de 2,6.

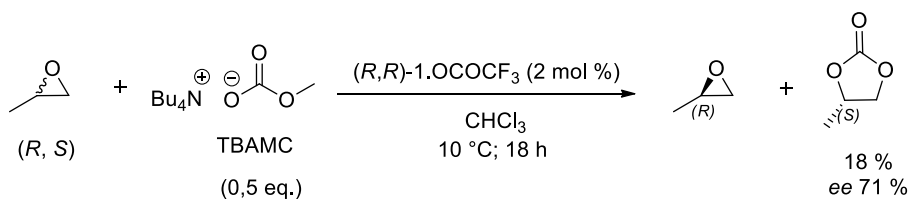
Posteriormente, estudos mais promissores acerca da resolução cinética de epóxidos, sobretudo do óxido de propileno, foram desenvolvidos pelo grupo de pesquisa de Nguyen (PADDOCK; NGUYEN, 2004) e por Lu e colaboradores (2004). Ambos utilizaram complexo Co(III) -salen como catalisador, mas de modo geral, baixos fatores de seletividade foram alcançados, com $s = 4,8$ e $9,0$, respectivamente, nos melhores resultados.

Berkessel e colaboradores (2006) estudaram a influência de diversos parâmetros na resolução cinética do óxido de propileno via cicloadição de CO_2 , como o contra-íon ligado ao catalisador metálico, assim como o próprio metal e a temperatura da reação. O melhor fator de seletividade ($s = 18,7$) foi observado com o catalisador Co(III) -salen contendo o contra íon trifluoroacetato ligado ao metal [(R,R) -1. OCOCF_3], na presença do nucleófilo PPNF (fluoreto de bis-trifenilfosforanilideno amônio) e na temperatura de -40°C . O (*S*)-carbonato de propileno foi obtido com 40% de rendimento e ee de 83 %. Destaca-se que o processo não necessitou de solventes e foi conduzido à pressão atmosférica (1 atm), ao longo de 5 dias, às custas da utilização de baixa temperatura (**Esquema 21**).



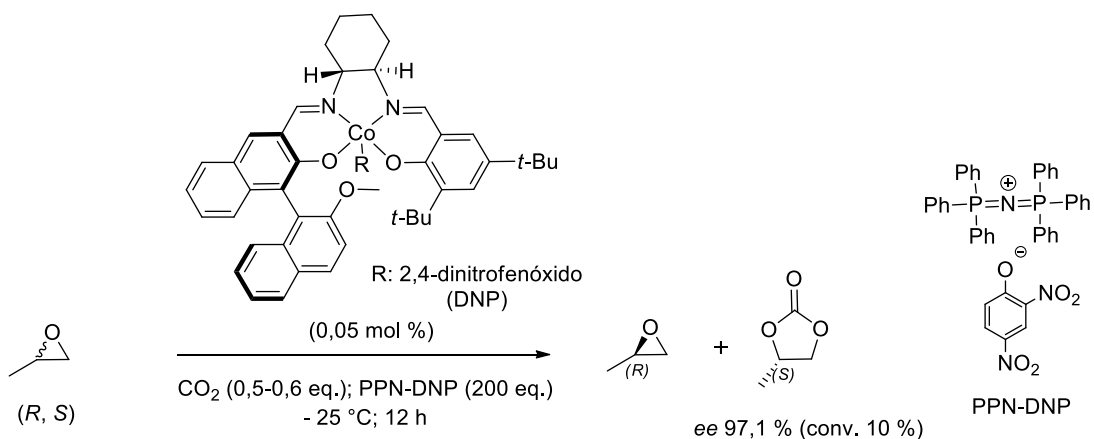
Esquema 21: Resolução cinética do óxido de propileno com CO_2 via complexo Co(III)-salen e PPNF (BERKESSEL et al, 2006).

Como alternativa ao uso do gás CO_2 , o mesmo grupo estudou a possibilidade de se empregar carbonato aniônico, adicionado ao meio reacional sob a forma de sal (TBAMC). No melhor dos resultados o (S)-carbonato de propileno foi obtido com 71 % de *ee* e 18 % de rendimento, com 18 h de reação a 10 °C (**Esquema 22**). Não houve necessidade de adição de nucleófilo, pois o próprio sal do carbonato adquire essa função adicional, porém, houve necessidade de adição de solvente para a solubilização do mesmo (BERKESSEL et al, 2006).



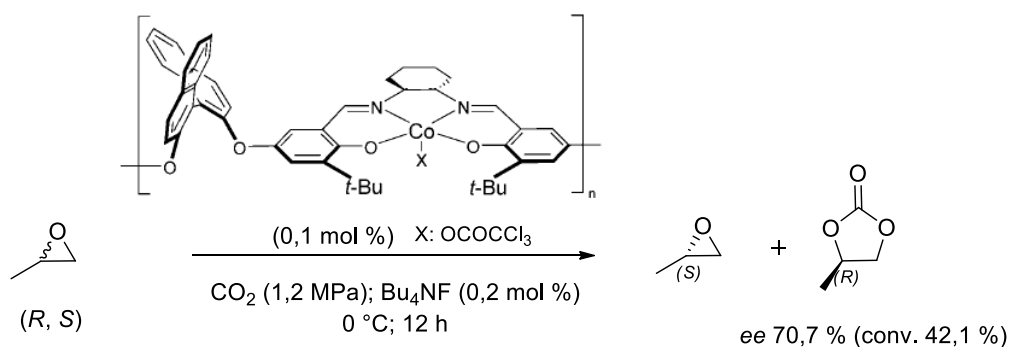
Esquema 22: Resolução cinética do óxido de propileno com TBAMC via complexo Co(III)-salen (BERKESSEL et al, 2006).

Em um trabalho mais recente e de destaque, tendo-se em vista a alta enantiosseletividade observada, Ren e colaboradores (2012) reportaram a obtenção do (S)-carbonato de propileno com alto *ee* (97,1 %) e com elevado fator de seletividade ($s = 75,8$), apesar do baixo valor de conversão (10 %). Conduziu-se a resolução cinética em baixa temperatura (-25 °C) e com excesso de 200 equivalentes de nucleófilo PPN-DNP (2,4-dinitrofenóxido de bis-trifenilfosforanilideno amônio) em relação ao epóxido e 0,05 mol % de catalisador Co(III)-salen, contendo o contra-íon 2,4-dinitrofenóxido ligado ao metal (**Esquema 23**).



Esquema 23: Resolução cinética do óxido de propileno com CO₂ via complexo Co(III)-salen e PPN-DNP (REN et al, 2012).

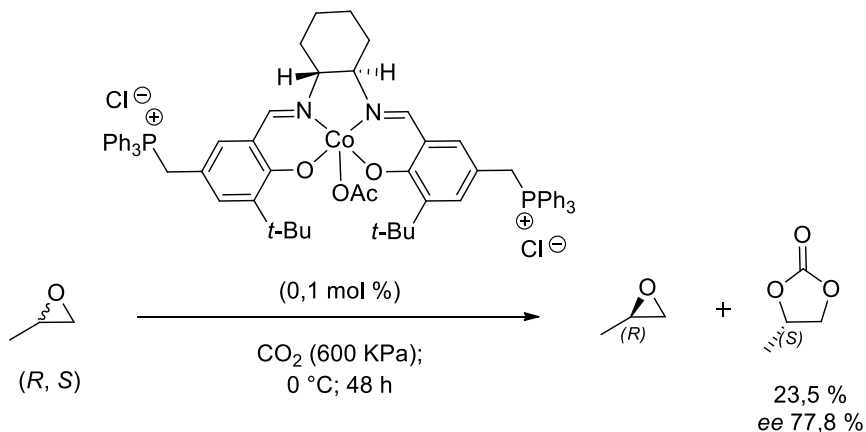
Yan e Jing (2009) desenvolveram catalisadores quirais poliméricos contendo complexo formado por Co(III)-salen e BINOL para a adição enantiosseletiva de CO₂ ao óxido de propileno. O aspecto promissor desse estudo resulta da possibilidade de reuso do catalisador, por mais de dez vezes, sem perda de sua atividade e enantiosseletividade, no que diz respeito ao excesso enantiomérico do carbonato de propileno formado. O melhor resultado foi conseguido utilizando-se fluoreto de tetrabutilamônio (Bu₄NF) como co-catalisador nucleofílico, obtendo-se o (R)-carbonato de propileno com 71,7 % de ee, com 42,1 % de conversão (s = 10,1), ao longo de 12 horas a 0 °C (**Esquema 24**).



Esquema 24: Resolução cinética do óxido de propileno com CO₂ via complexo polimérico de Co(III)-salen e Bu₄NF (YAN; JING, 2009).

Na literatura também podem ser encontrados trabalhos descrevendo a síntese e uso de catalisadores bifuncionais tipo Co(III)-salen para a cicloadição de CO₂ a epóxidos, não havendo necessidade da presença de co-catalisadores nucleofílicos. Na própria estrutura do catalisador encontra-se ancorada uma unidade nucleofílica, composta por sais de amônio ou fósforo (MIAO et al, 2008; CHANG et al, 2009; ROY et al, 2013). Nesse intuito, Chang e colaboradores (2009) obtiveram êxito na obtenção do (S)-carbonato de propileno

enantioenriquecido, tendo-se, como melhor resultado, rendimento de 23,5 % e *ee* de 77,8 % (*s* = 10,1), com 48 horas de reação a 0 °C (**Esquema 25**), podendo-se reciclar o catalisador por 5 vezes, sem seu comprometimento.



Esquema 25: Resolução cinética do óxido de propileno com CO₂ via complexo Co(III)-salen bifuncional (CHANG et al, 2009).

Roy e colaboradores (2013) estudaram outro catalisador bifuncional polimérico do tipo Co(III)salen para resolução do óxido de propileno, em que a nucleofilicidade é conferida por heterociclos nitrogenados piperazina e triazina contidos em sua estrutura. Conduzindo-se a reação a 0°C, obteve-se o (*S*)-carbonato de propileno com 40,3% de rendimento e 74% de *ee* (*s* = 11,2), em 48 horas de reação. Destacam-se, como pontos positivos, o fato de reação ocorrer com pressão baixa de CO₂ (1 atm) e a reciclagem do catalisador, utilizado na concentração de 0,1 mol %, por mais de dez vezes sem perda significativa de atividade e enantiosseletividade.

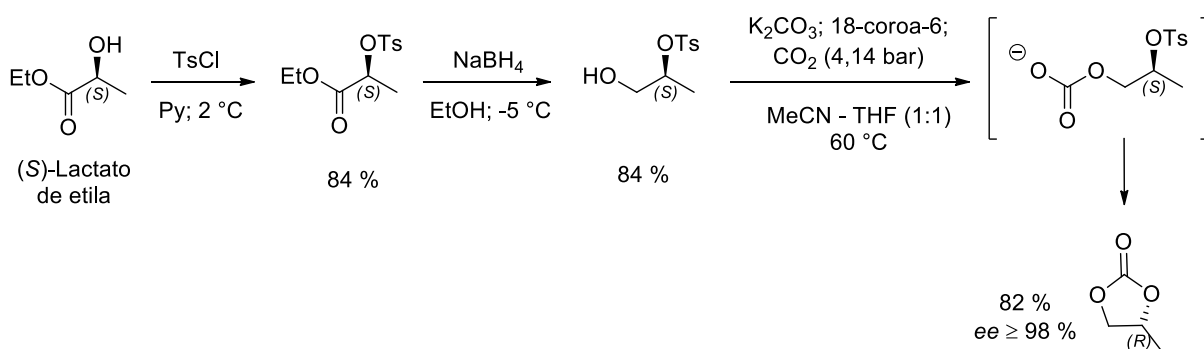
1.8.2 Outras estratégias para a obtenção do carbonato de propileno opticamente ativo

Outra estratégia catalítica que vem se configurando como alternativa, ainda que de maneira incipiente, para a fixação de CO₂, sobretudo por meio da adição a epóxidos, consiste no emprego de catalisadores híbridos heterogêneos, contendo componentes orgânicos e inorgânicos, denominados redes metaloorgânicas (MOFs). Estes possuem estrutura cristalina, altamente porosa e com grande área superficial, o que contribui para a adsorção de gases, dentre estes o CO₂. Podem ser encontrados trabalhos recentes descrevendo a utilização desse tipo de material para obtenção do carbonato de propileno a partir do seu precursor óxido, com

altas conversões (GAO et al, 2014; GUILLERM et al, 2014), apesar de processos enantiosseletivos serem mais escassos na literatura (REN et al, 2013).

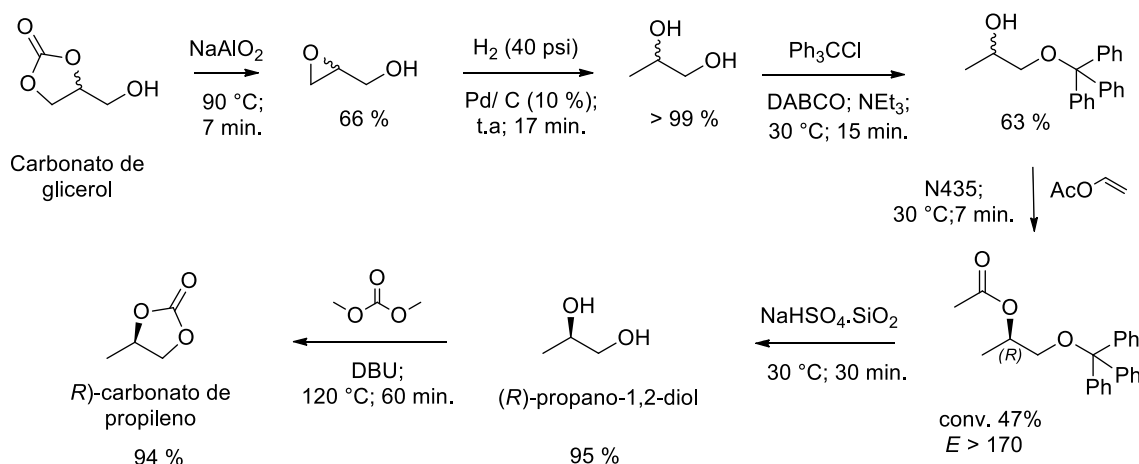
Pode-se constatar a dificuldade em se desenvolver catalisadores que promovam a cicloadição enantiosseletiva de CO₂ a epóxidos, via resolução cinética, tendo-se poucos trabalhos em que foram observados altos valores de fatores de seletividade, como o de Ren e colaboradores (2012) ($s = 75,8$). Com isso, o carbonato de propileno enantiomericamente enriquecido ou enantiopuro pode ser sintetizado utilizando-se os enantiômeros do propano-1,2-diol ou os enantiômeros do óxido de propileno como materiais de partida. Ambos podem ser obtidos, por exemplo, através da resolução cinética hidrolítica de epóxidos, a qual é uma metodologia largamente empregada e que fornece, usualmente, melhores resultados, em termos de enantiosseletividade, quando comparada à inserção de CO₂ a epóxidos (SCHULTZE et al, 1998; JANG et al, 2012).

Seguindo outra estratégia, Whitaker e colaboradores (2008) reportaram a síntese do (*R*)-carbonato de propileno, através de um processo de três etapas, utilizando-se como material de partida o (*S*)-lactato de etila. A rota abrange a tosilação da hidroxila desse éster quiral, com posterior redução do grupo éster com borohidreto de sódio. A etapa chave consiste na carbonatação da hidroxila gerada, com dióxido de carbono, na presença de base (carbonato de potássio) e catalisador de transferência de fase (18-coroa-6), e posterior ciclização, levando à remoção do grupo tosiloxi e inversão de configuração (**Esquema 26**). Deve-se atentar para esta etapa, a fim de se evitar a formação do epóxido, ao invés do carbonato cíclico, devido ao ataque intramolecular da hidroxila ao carbono vizinho, que é ligado ao grupo tosiloxi, previamente à carbonatação.



Esquema 26: Síntese do (*R*)-carbonato de propileno a partir do (*S*)-lactato de etila (WHITAKER et al, 2008).

Recentemente, baseando-se em metodologias já descritas, Suveges e colaboradores (2018) descreveram uma nova estratégia de processo, objetivando a síntese do (*R*)-carbonato de propileno, com a inovação de ser desenvolvido inteiramente em fluxo contínuo. A rota possui como material de partida o carbonato de glicerol, o qual foi convertido a glicidol, na presença de aluminato de sódio (NaAlO_2) como catalisador. Seguiu-se com a hidrogenólise do glicidol a propano-1,2-diol, o qual foi protegido regiosseletivamente via cloreto de trifenilmetila (Ph_3CCl), segundo metodologia de Petursson e coladores (2009, 2011). Este derivado 1-éter foi submetido à resolução cinética enzimática com a lipase CAL-B (N435) e acetato de vinila. O produto (*R*)-acilado foi submetido à desproteção de ambas as hidroxilas, gerando-se o (*R*)-propano-1,2-diol, que foi convertido ao produto de interesse, (*R*)-carbonato de propileno (**Esquema 27**).



Esquema 27: Síntese quimioenzimática do (*R*)-carbonato de propileno a partir do carbonato de glicerol em fluxo contínuo (SUVEGES et al, 2018).

2. Justificativa

A busca por novas metodologias para a obtenção de dióis enantiomericamente puros, assim como seus derivados carbonatos, é justificada, no campo de síntese orgânica, pelo emprego dessas substâncias como blocos de construção quiral, os quais são utilizados como reagentes para a geração de novos centros assimétricos na estrutura molecular, sobretudo de substâncias com atividade farmacológica. Nesse sentido, pode-se destacar a importância do propano-1,2-diol e do carbonato de propileno, ambos enantiomericamente puros, na configuração (*R*), na rota sintética do fármaco antirretroviral tenofovir. Este atua como inibidor nucleotídico da enzima transcriptase reversa do HIV, disponibilizado na forma de pró-fármaco (tenofovir desoproxila), sendo este metabolizado a sua forma ativa no organismo. Seu uso é indicado na primeira linha de tratamento de adultos e crianças acima de 12 anos, na profilaxia pós-exposição de risco à infecção pelo HIV, assim como na, na mais recente, profilaxia pré-exposição ao vírus, segundo protocolo e diretrizes terapêuticas do Ministério da Saúde, o que demonstra sua importância terapêutica. Mais recentemente, outro pró-fármaco do tenofovir foi liberado para comercialização em coformulação com outros antirretrovirais, pela Agência Federal Americana *Food and Drug Administration* (FDA), denominado tenofovir alafenamida, o que pode acarretar em maior demanda por sua síntese e, conseqüentemente, dos insumos necessários à mesma, como o (*R*)-carbonato de propileno.

No que tange a disponibilidade de metodologias através das quais são gerados os enantiômeros do carbonato de propileno, com alta pureza ótica, pode-se observar um vasto número de pesquisas pelas quais se busca realizar a incorporação de CO₂ a epóxidos de maneira enantiosseletiva, por meio de resolução cinética química. Apesar do viés ambiental, na tentativa de reduzir a concentração desse gás estufa na atmosfera, são raros os trabalhos em que foi alcançada alta enantiosseletividade. Portanto, pode-se inferir que, na maioria dos casos, faz-se uso de seu precursor, o propano-1,2-diol enantiomericamente puro.

Na literatura, os métodos disponíveis para a obtenção dos enantiômeros do propano-1,2-diol baseiam-se, principalmente sob o ponto de vista industrial, na resolução cinética hidrolítica do óxido de propileno, pela qual altos excessos enantioméricos são obtidos tanto para o substrato epóxido, quanto para o produto, o referido diol. Apesar de, indiscutivelmente, ser conseguido alto valor de enantiosseletividade, essa metodologia apresenta a inconveniência figurada pelo emprego do óxido de propileno, substância gasosa e com conhecida toxicidade. Outra possibilidade configura-se em processos de hidrogenação

assimétrica, em que se conseguem altos excessos enantioméricos, tendo-se, inclusive, aplicação industrial. Entretanto, o uso de hidrogênio gasoso, em altas pressões, e de catalisadores metálicos são pontos a serem discutidos.

Alternativas empregando tanto rotas fermentativas, como reações biocatalisadas são também disponíveis. Em relação às últimas, trabalhos mais recentes fazem uso, principalmente, de derivatização química do propilenoglicol racêmico e sua posterior resolução cinética via lipases. Apesar de alguns resultados expressivos em termos de enantiosseletividade, a etapa de derivatização, sobretudo pela dificuldade em se conseguir regiosseletividade e pela necessidade, em alguns casos, de purificações mais laboriosas, cria margem para possíveis tentativas de melhoria de processo.

Nesse âmbito, são válidos os esforços que visam à obtenção do carbonato de propileno e do propano-1,2-diol, ambos com alta pureza ótica, por métodos mais brandos, em termos de temperatura e condições menos danosas ao meio ambiente, como, por exemplo, via resoluções cinéticas biocatalisadas. Além disso, a praticidade do processo químioenzimático também é destacável, no que concerne a protocolos mais simples de purificação e de derivatização do propilenoglicol.

Portanto, é justificável a tentativa de se empregar o carbonato de propileno como substrato de resoluções cinéticas enzimáticas via lipases, tendo-se em vista o ineditismo da proposta, de acordo com o levantamento bibliográfico feito pelo autor deste trabalho. Além disso, é de igual importância, no que se refere à obtenção dos enantiômeros do propilenoglicol, avaliar a possibilidade de se proteger regiosseletivamente esse diol de maneira simples e com grupo funcional que permita, não só o seu uso como substrato em acilações enzimáticas, o que é mais convencional, como também em reações de desproteção, como alcoólises, catalisadas por enzimas.

3. Objetivo geral

Desenvolver processo quimioenzimático prático, baseado em resolução cinética enzimática, para obtenção do carbonato de propileno, com alta pureza ótica.

3.1 Objetivos específicos

- Utilizar lipases como catalisadores em diversos tipos de reações, como transesterificação, esterificação, hidrólise, alcoólise e aminólise, visando-se a obtenção de carbonato de propileno, com alta pureza ótica;
- Estabelecer metodologia analítica para a determinação da conversão e do excesso enantiomérico nas reações enzimáticas
- Analisar viabilidade de processo simples de purificação dos enantiômeros, por meio de extração, preferencialmente, para as resoluções cinéticas enzimáticas.

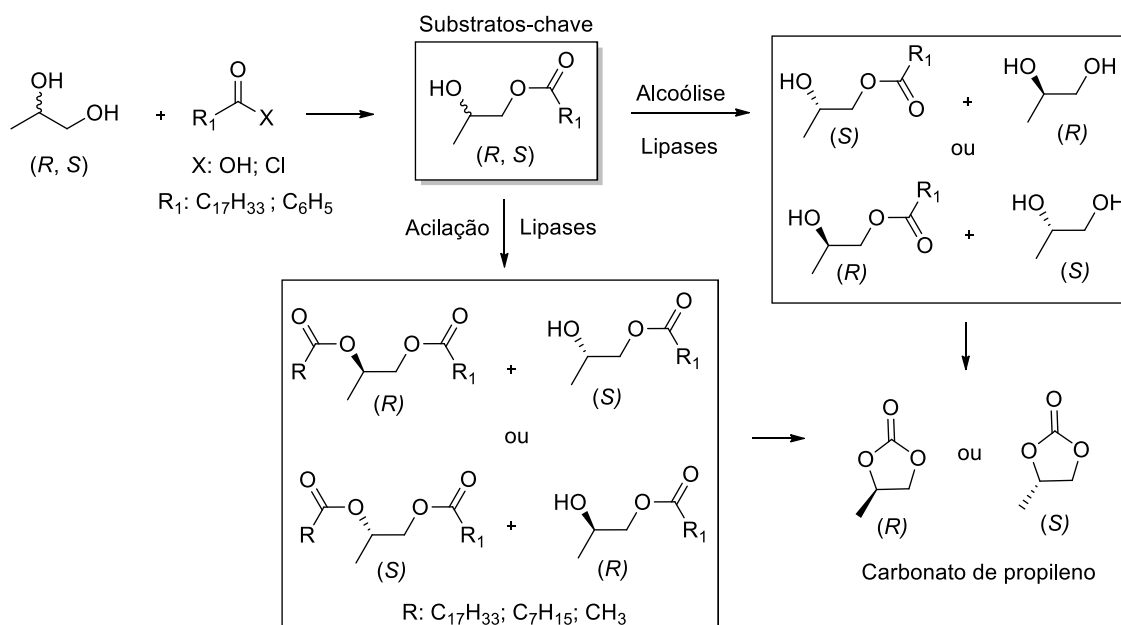
4. Estratégias

Para a realização dos objetivos desse trabalho, foram visualizadas três estratégias

4.1 Estratégia 1: Resolução de 1-O-acil propano-1,2-diois via lipases

Seguindo-se esta estratégia (**Esquema 28**), 1-O-acil propano-1,2-diois seriam sintetizados e utilizados como substratos para lipases em reações de acilação de sua hidroxila e de alcoólise de seu grupamento éster. Na acilação, tanto o enantiômero remanescente do substrato (não acilado), quanto o acilado necessitariam de etapa de desproteção, por via química, para a conversão a propilenoglicol, o qual seria convertido a carbonato de propileno. A ênfase seria dada a reações de acilação através de esterificação com ácidos graxos de cadeia longa, como ácidos caprílico e oléico.

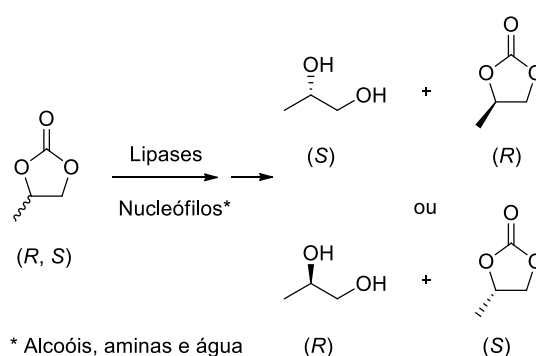
Em relação ao uso dos monoésteres de propilenoglicol como substratos em reações de alcoólise, há a vantagem de se gerar, prontamente, como produto, o propilenoglicol, o qual poderia ser isolado, por processo prático de extração, e convertido a carbonato de propileno. Em contrapartida, o enantiômero remanescente do substrato necessitaria de etapa posterior de desproteção, por via química, para a obtenção do outro enantiômero do referido diol e sua posterior conversão a carbonato de propileno.



Esquema 28: Estratégia de resolução dos substratos-chave propostos, ilustrando-se as possíveis configurações de produto e substrato remanescente de cada reação enzimática.

4.2 Estratégia 2: Abertura enantiosseletiva do carbonato de propileno racêmico por nucleófilos catalisada por lipases

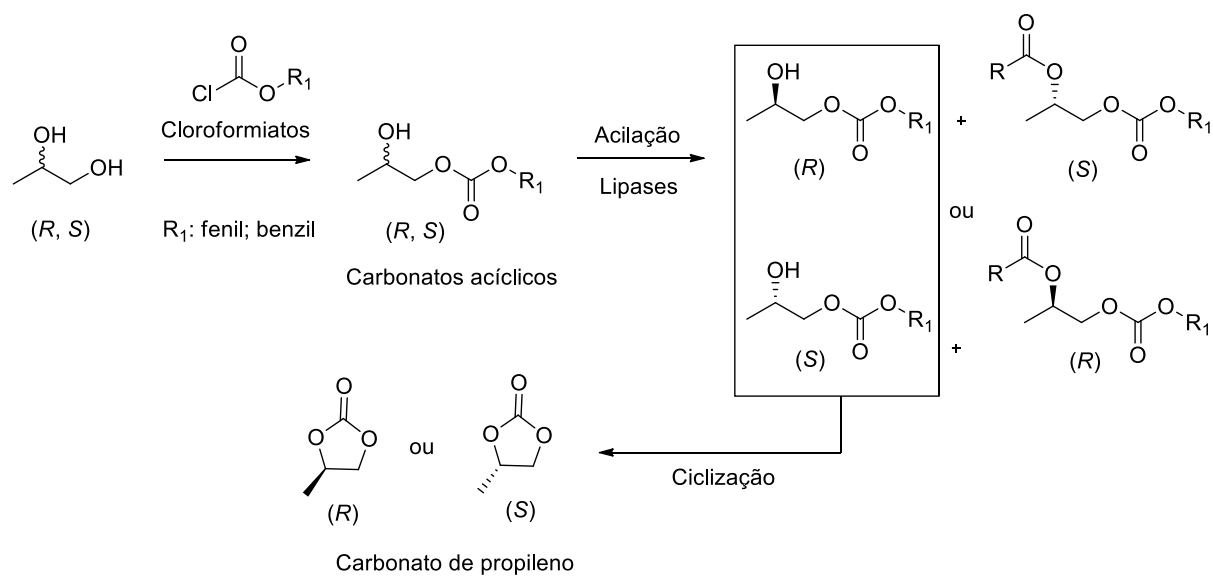
Vislumbrou-se a possibilidade de utilizar o carbonato de propileno racêmico como substrato para lipases em reações de alcoólise, hidrólise e aminólise, com a finalidade de resolvê-lo cineticamente (**Esquema 29**). Em caso de reconhecimento do substrato, dois cenários seriam possíveis ilustrados no **esquema 29**, nos quais haveria a possibilidade de se gerar o propano-1,2-diol enantiomericamente enriquecido, como produto não imediato das reações, resultando na maneira mais rápida de atingir o objetivo deste trabalho.



Esquema 29: Estratégia de abertura enantiosseletiva do carbonato de propileno com diversos nucleófilos.

4.3 Estratégia 3: Resolução de carbonatos acíclicos do propano-1,2-diol via lipases

Levantou-se a hipótese de carbonatos acíclicos derivados do propilenoglicol, obtidos a partir de reações com cloroformatos, dentre estes os de fenila e benzila, serem resolvidos cineticamente através de acilação via lipases (**Esquema 30**). Dependendo da enantiopreferência das lipases, pela rota mais rápida, o enantiômero não reagido do substrato (não acilado) poderia ser convertido a um dos enantiômeros do carbonato de propileno, através de ciclização intramolecular.



Esquema 30: Estratégia de resolução dos carbonatos acíclicos do propano-1,2-diol, mostrando as possíveis configurações de produto e substrato remanescente, destacando-se a ciclização deste para a obtenção do carbonato de propileno.

5. Parte experimental

5.1 Materiais e métodos gerais

As reações foram realizadas em vials (frascos com tampa de rosca revestida com selo de PTFE) ou, em maior escala, em balões de fundo redondo fechados com septos de borracha, sob agitação magnética, através do uso de barras metálicas (magnetos) revestidas por teflon, em placas de agitação e aquecimento com sonda de temperaturas (IKA). Experimentos com necessidade de emprego de baixas temperaturas foram conduzidos em banho de gelo e água ou banho de etanol e nitrogênio líquido. No caso de aquecimento, a temperatura foi mantida por meio de óleo mineral.

Sempre que necessário, o solvente diclorometano foi seco através de destilação na presença do agente secante hidreto de cálcio (CaH_2), sob atmosfera de argônio. Quando não mencionado, os materiais de partida utilizados foram adquiridos comercialmente.

O acompanhamento das reações foi feito por meio de cromatografia em camada fina (CCF), em cromatofolhas com sílica gel 60 F₂₅₄ suportada em placa de alumínio (Merck ou Silicycle). A revelação das frações foi realizada em câmara de ultravioleta (UV) e, quando necessário, por solução básica de permanganato de potássio (KMnO_4 / NaOH 2,5 %/ K_2CO_3) com posterior aquecimento com pistola de alta temperatura.

As purificações cromatográficas em coluna seguiram a metodologia de cromatografia *flash*, sendo utilizada sílica gel 60, com tamanho de partícula de 0,040 – 0,063 mm. A concentração de amostra por evaporação de voláteis se deu em evaporadores rotatórios, com pressão reduzida, através de bomba de membrana (Edwards). Os traços de solventes foram retirados com o auxílio de bomba de alto vácuo (Edwards).

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos nos espectrômetros Bruker DRX-400, Varian RMN MR-400 (400 MHz) e VNMRSYS-500 (500 MHz). Os deslocamentos químicos (δ) foram referenciados pelo sinal do tetrametilsilano (TMS) (0 ppm) no espectro de RMN de ^1H .

As lipases comercialmente imobilizadas (lipase B de *Candida Antarctica* - Novozyme 435, de *Rhizomucor miehei* - Lipozyme RM-IM e de *Thermomyces lanuginosus* - TL-IM) foram adquiridas da empresa Novo Nordisk. As lipases liofilizadas de *Pseudomonas cepacia* (PS Amano), de *Candida rugosa* (AY Amano 30), *Aspergillus niger* (A Amano 12), *Rhizopus*

oryzae (FAP-15) foram obtidas da empresa Amano. A lipase liofilizada de pâncreas de porco (PPL) foi obtida da empresa Sigma Aldrich.

As análises de cromatografia gasosa foram realizadas em cromatógrafo de marca Shimadzu modelo GC-2010 Plus equipado com detector por ionização de chama e coluna capilar de (5 %-fenil)-metilpolisiloxano (Agilent DB-5, 30 m x 0,32 mm, 0,5 µm de espessura de filme). O gás carreador foi hélio. A temperatura do injetor e detector foram, respectivamente, 270 °C e 300 °C. Os métodos de análise empregaram *split* de 10 e temperatura inicial de 60 °C com rampa de aquecimento de 10 °C por minuto até 300 °C, sendo mantida esta temperatura por tempo variável.

As medidas de rotação específica foram obtidas através do polarímetro de marca Anton Paar, modelo MCP 300. Esta análise foi realizada com o intuito de se identificar o sentido de desvio da luz plano polarizada, para determinação da configuração do estereocentro e, não, para cálculo de pureza óptica. Os valores de rotação foram obtidos de modo automático, pelo próprio equipamento, a 25 °C e concentração de 10 mg/ mL.

5.2 Procedimento geral de *screenings* enzimáticos

Os experimentos de *screening* enzimático foram realizados em vials, contendo 5 - 7 mg de substratos, em 0,7 - 2,0 mL de meio reacional. A massa de lipases imobilizadas e liofilizadas foi correspondente a 1 - 6 vezes a de substrato. A faixa de temperatura empregada variou de temperatura ambiente a 45 °C. As reações foram acompanhadas por CCF, e submetidas à análise por cromatografia gasosa, em seu término. Para isto, o conteúdo dos vials foi filtrado em algodão, para a retirada das enzimas, e refiltrado em filtro de seringa de PVDF (0,45 µm) (Whatman), avolumando-se com 1,0 mL de diclorometano, previamente à injeção no cromatógrafo gasoso.

5.3 Procedimento experimental para as cinéticas de conversão

As cinéticas de conversão foram realizadas na escala de 40 mg de substrato, em 6,0 mL de solvente, com a adição de padrão interno (acetofenona). As lipases utilizadas foram empregadas com uma massa de 12,5 % a 3 vezes a de substrato. As reações foram conduzidas à temperatura ambiente.

Imediatamente antes da adição das lipases ao meio reacional, foi retirada uma alíquota de 0,1 mL, correspondente ao tempo inicial de reação. As reações foram acompanhadas por

CCF e, mediante sua análise, foram retiradas novas alíquotas de 0,1 mL, referentes aos tempos subseqüentes. As alíquotas foram submetidas à análise por cromatografia gasosa, sendo previamente filtradas em filtro de seringa de PVDF (0,45 µm) e avolumadas a 1,0 mL, com diclorometano.

O cálculo de percentagem de conversão foi realizado considerando-se a relação da razão área do substrato/ área do padrão interno ao longo do tempo, em que Tf se refere ao tempo final e Ti, ao tempo inicial, segundo a **equação 4**:

$$\left[1 - \left(\frac{\text{Área do substrato } Tf}{\text{Área do padrão interno } Tf} \right) \div \left(\frac{\text{Área do substrato } Ti}{\text{Área do padrão interno } Ti} \right) \right] \times 100$$

Equação 4: Cálculo de conversão do substrato.

5.4 Procedimento para análises de HPLC com fase estacionária quiral

As análises de cromatografia líquida com fase estacionária quiral, para obtenção de dados de excesso enantiomérico, foram conduzidas em cromatógrafo de marca Shimadzu, com bomba LC-20 AT, detector na região UV-Visível SPD-M20A, forno de coluna CTO-20A, auto-injetor SIL-20A, controlador de sistema CBM-20A e degaseificador DGU-20A, equipado com coluna com fase estacionária quiral AD-H (Chiralpak) (4,6 mm x 250 mm, 5 µm de tamanho de partícula). Utilizou-se como fase móvel uma mistura de 10 % isopropanol/hexano, com fluxo de 0,8 mL/ minuto em modo isocrático. Previamente à injeção, as amostras foram filtradas em filtro de seringa de PVDF (0,45 µm) (Whatman) e diluídas com diclorometano. O *software* para edição dos cromatogramas foi o *LabSolutions*.

5.5 Procedimento para análise de excesso enantiomérico de substrato remanescente (*ee*_s) e produto (*ee*_p) das cinéticas enzimáticas

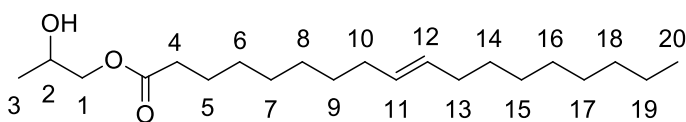
Os substratos remanescentes provenientes de reações de esterificação, alcoxicarbonilação e transesterificação foram separados dos produtos de reação por meio de cromatografia em coluna. Nos casos de benzoato de 2-hidroxipropila e *p*-anisoato de 2-hidroxipropila, estes tiveram seus excessos enantioméricos determinados por HPLC com fase estacionária quiral (Chiralpak AD-H).

No caso específico dos substratos capriloato e oleato de 2-hidroxipropila, que possuem baixa detecção por UV, foi realizado um procedimento padrão de derivatização.

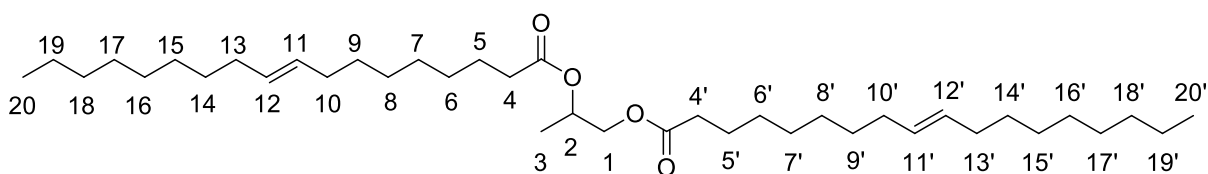
Primeiramente, em vial, procedeu-se com uma reação de metanólise com DBU em excesso (3 gotas), sendo o metanol adicionado na condição de reagente e solvente (0,8 mL) a 80 °C por 3 horas, fornecendo conversão total. Posteriormente, evaporou-se o metanol, substituindo-se o meio por DMC (0,8 mL) e levou-se a aquecimento, por 80 °C, por 8 horas, a fim de converter totalmente o 1,2-propanodiol gerado na etapa prévia a carbonato de propileno, possibilitando a determinação de ee_s por cromatografia gasosa com fase estacionária quiral. Este mesmo procedimento de derivatização foi realizado para o *p*-anisoato de 2-hidroxipropila a fim de se determinar a configuração do estereocentro. No caso do benzoato de 2-hidróxxipropila, este mesmo processo foi realizado somente com o objetivo de se sintetizar o carbonato de propileno.

Para as reações de alcoólise de todos os substratos sintetizados, realizou-se protocolo específico. Primeiramente, ao resíduo obtido após filtração da enzima e evaporação do meio reacional, realizou-se extração com 0,4 mL de diclorometano e 0,1 mL de água destilada em microtubo. A fase orgânica, contendo o substrato, foi retirada e submetida à nova lavagem com mesmo volume de água. A fase aquosa dessas extrações, contendo o 1,2-propanodiol, foi transferida para vial e levada à secura com sulfato de magnésio. Adicionou-se acetato de etila e submeteu-se à agitação magnética, com aquecimento de 80 °C por 20 minutos. A fase líquida foi retirada, repetindo-se a adição de acetato de etila e o procedimento posterior por mais duas vezes. Evaporaram-se as frações orgânicas recolhidas. Ao resíduo gerado, formado por 1,2-PDO, foi adicionado DBU em excesso (3 gotas) e DMC como solvente e reagente (0,8 mL), para converter o 1,2-PDO a carbonato de propileno. Este teve seu excesso enantiomérico determinado por cromatografia gasosa com fase estacionária quiral.

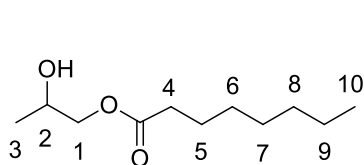
5.6 Substâncias sintetizadas como padrões de análise e substratos enzimáticos ou isoladas de reações de cinéticas enzimáticas



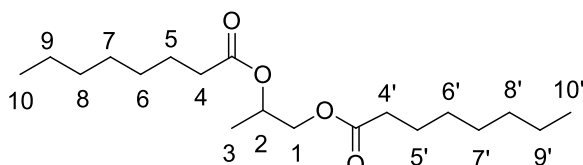
Oleato de 2-hidroxipropila



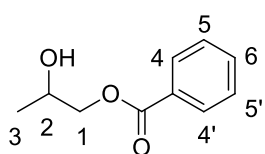
Oleato de 2-oleoiloxipropila



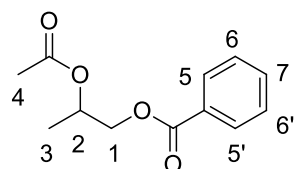
Capriloato de 2-hidroxipropila



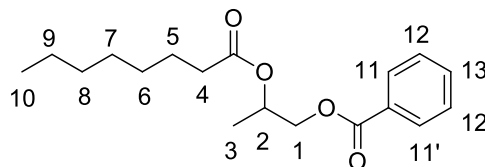
Capriloato de 2-capriloiloxipropila



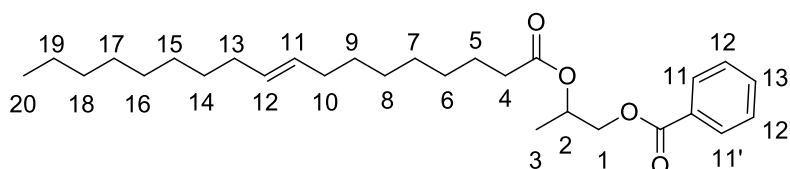
Benzoato de 2-hidroxipropila



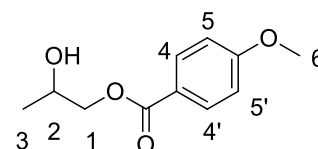
Benzoato de 2-acetoxipropila



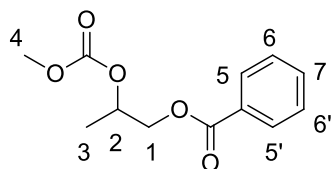
Benzoato de 2-capriloiloxipropila



Benzoato de 2-oleiloxipropila



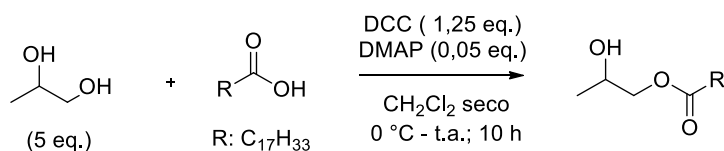
p-Anisoato de 2-hidroxipropila



Benzoato de 2-metoxicarboniloxipropila (produto isolado)

5.7 Procedimentos experimentais de síntese de padrões de análise e substratos enzimáticos

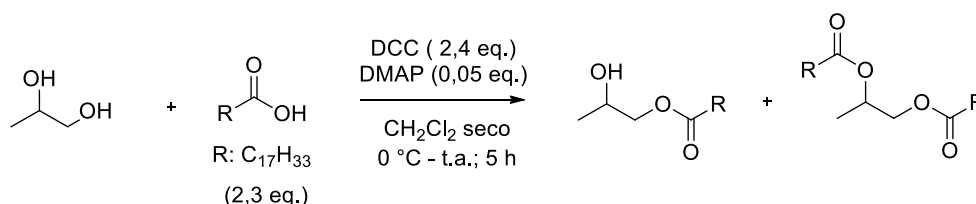
5.7.1 Síntese do oleato de 2-hidroxipropila



A um vial contendo 0,091 g de DCC (0,44 mmol; 206,33 g/ mol), em banho de gelo, adicionou-se, sob agitação, uma solução contendo 0,100 g de ácido oléico (0,35 mmol; 282,46 g/ mol) em 1,0 mL de CH₂Cl₂ seco e, em seguida, 0,135 g de propano-1,2-diol (1,77 mmol;

76,09 g/ mol) diluídos em 0,5 mL de CH_2Cl_2 seco. Posteriormente, foi feita a adição de 0,002 g de DMAP (0,018 mmol; 122,17 g/ mol) e avolumou-se o meio com 0,5 mL de CH_2Cl_2 seco. A mistura foi deixada atingir a temperatura ambiente, permanecendo sob agitação por 10 horas. Ao término, o conteúdo do vial foi vertido em uma solução de 10 mL de 10 % de acetato de etila em hexano e submetido à filtração, para retirada dos subprodutos de reação sólidos. Evaporou-se o solvente e realizou-se a purificação por cromatografia em coluna, utilizando-se gradiente variando de 10 % a 25 % de acetato de etila em hexano. Foi obtido 0,086 g de oleato de 2-hidroxipropila (72 % de rendimento).

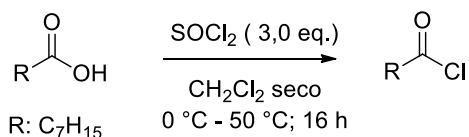
5.7.2 Síntese de oleato de 2-hidroxipropila e oleato de 2-oleoiloxipropila



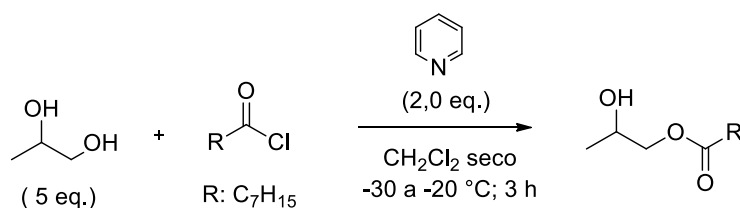
A um vial contendo 0,326 g de DCC (1,58 mmol; 206,33 g/ mol), em banho de gelo, adicionou-se, sob agitação, uma solução contendo 0,427 g de ácido oléico (1,51 mmol; 282,46 g/ mol) em 2,0 mL de CH_2Cl_2 seco e, em seguida, 0,05 g de propano-1,2-diol (0,66 mmol; 76,09 g/ mol) diluídos em 1,0 mL de CH_2Cl_2 seco. Posteriormente, foi feita a adição de 0,004 g de DMAP (0,033 mmol; 122,17 g/ mol) e avolumou-se o meio com 1,0 mL de CH_2Cl_2 seco. A mistura foi deixada atingir a temperatura ambiente, permanecendo sob agitação por 5 horas. Ao término, o conteúdo do vial foi vertido em uma solução de 10 mL de 10 % de acetato de etila em hexano e submetido à filtração, para retirada dos subprodutos de reação sólidos. Evaporou-se o solvente e realizou-se a purificação por cromatografia em coluna, utilizando-se gradiente variando de 2 % a 15 % de acetato de etila em hexano. Foram obtidos 0,195 g de oleato de 2-oleoiloxipropila (49 % de rendimento) e 0,038 g de oleato de 2-hidroxipropila (17 % de rendimento).

5.7.3 Síntese do capriloato de 2-hidroxipropila

Inicialmente, foi sintetizado o cloreto de capriloíla, através da reação com cloreto de tionila:

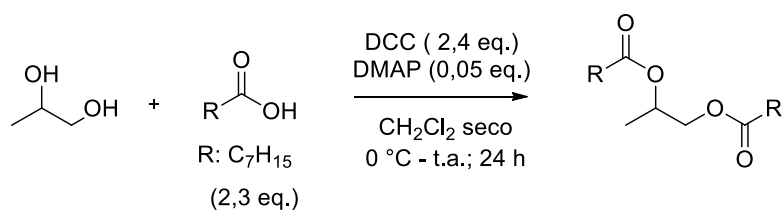


A um vial contendo 0,200 g (1,39 mmol; 144,21 g/ mol) de ácido caprílico em 2,0 mL de CH₂Cl₂ seco, adicionou-se 0,302 mL (4,16 mmol; 118,97 g/ mol) de SOCl₂, gota a gota, em banho de gelo e sob agitação. A reação foi deixada atingir a temperatura de 50 °C, permanecendo por 16 horas. Ao término, evaporaram-se os voláteis e procedeu-se com a etapa seguinte.



Ao resíduo obtido na etapa anterior, adicionaram-se, em banho de etanol com nitrogênio líquido, uma solução contendo 0,528 g (6,94 mmol; 76,09 g/ mol) de propano-1,2-diol em 2,0 mL de CH₂Cl₂ seco e 0,22 mL de piridina (2,77 mmol; 79,101 g/ mol). A reação permaneceu na faixa de temperatura de -30 a -20 °C por 3 horas. Após evaporação dos voláteis, o resíduo obtido foi submetido à purificação por cromatografia em coluna, utilizando-se gradiente variando de 15 % a 30 % de uma mistura acetato de etila em hexano. Foi obtido 0,139 g de capriloato de 2-hidroxipropila (45 % de rendimento).

5.7.4 Síntese do capriloato de 2-capriloiloxipropila

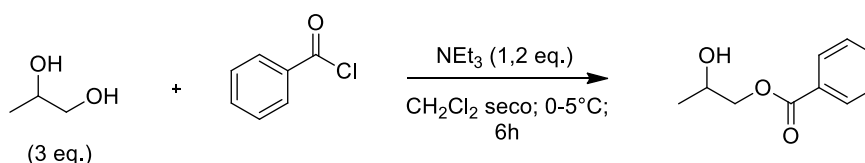


A um vial contendo 0,326 g de DCC (1,58 mmol; 206,33 g/ mol), em banho de gelo, adicionou-se, sob agitação, uma solução contendo 0,218 g de ácido caprílico (1,51 mmol; 144,21 g/ mol) em 2,0 mL de CH₂Cl₂ seco e, em seguida, 0,05 g de propano-1,2-diol (0,66 mmol; 76,09 g/ mol) diluídos em 1,0 mL de CH₂Cl₂ seco. Posteriormente, foi feita a adição de

0,004 g de DMAP (0,033 mmol; 122,17 g/ mol) e avolumou-se o meio com 1,0 mL de CH_2Cl_2 seco. A mistura foi deixada atingir a temperatura ambiente, permanecendo sob agitação por 24 horas. Ao término, o conteúdo do vial foi vertido em uma solução de 10 ml de 10 % de acetato de etila em hexano e submetido à filtração, para retirada dos subprodutos de reação sólidos. Evaporou-se o solvente e realizou-se a purificação por cromatografia em coluna, utilizando-se gradiente variando de 2 % a 35 % de acetato de etila em hexano. Foi obtido 0,111 g de capriloato de 2-capriloiloxipropila (51 % de rendimento).

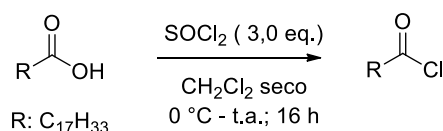
5.7.5 Síntese do benzoato de 2-hidroxipropila

Em balão de 10 mL, adicionou-se 0,588 g de propano-1,2-diol (7,73 mmol; 76, 09 g/ mol) e 6,0 mL de CH_2Cl_2 seco. Manteve-se a solução em banho de gelo e adicionaram-se, sob agitação, 0,30 mL de cloreto de benzoíla (2,30 mmol; 140,57 g/ mol) e 0,43 mL de trietilamina (3,08 mmol; 101,19 g/ mol). A mistura foi mantida nessas condições por 6 horas. Ao término da reação, realizou-se extração com solução saturada de NaHCO_3 (1 x 2,0 mL) e água destilada (2 x 2,0 mL), para retirada do excesso de propano-1,2-diol. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 , filtrada e o resíduo obtido após evaporação dos voláteis foi submetido à purificação por cromatografia em coluna. Utilizou-se gradiente variando de 20 % a 30 % de acetato de etila em hexano, obtendo-se, ao final da purificação, 0,328 g de benzoato de 2-hidroxipropila (70 % de rendimento).

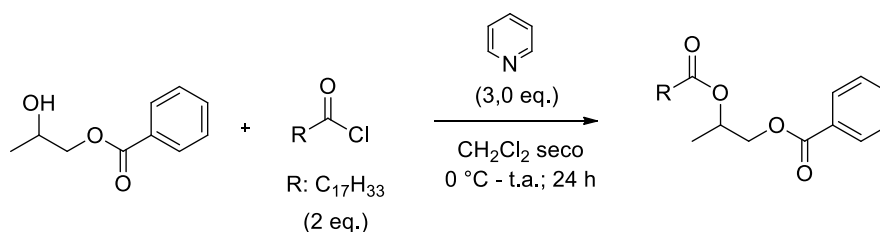


5.7.6 Síntese do benzoato de 2-oleoiloxipropila

Inicialmente, foi sintetizado o cloreto de oleíla, através da reação com cloreto de tionila:



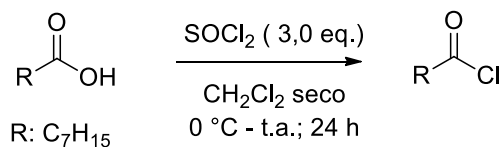
A um vial contendo 0,157 g (0,56 mmol; 282,46 g/ mol) de ácido oléico em 2,0 mL de CH_2Cl_2 seco, adicionou-se 0,12 mL (1,66 mmol; 118,97 g/ mol) de SOCl_2 , gota a gota, em banho de gelo e sob agitação. A reação foi deixada atingir a temperatura ambiente, permanecendo por 16 horas. Ao término, evaporaram-se os voláteis e procedeu-se com a etapa seguinte.



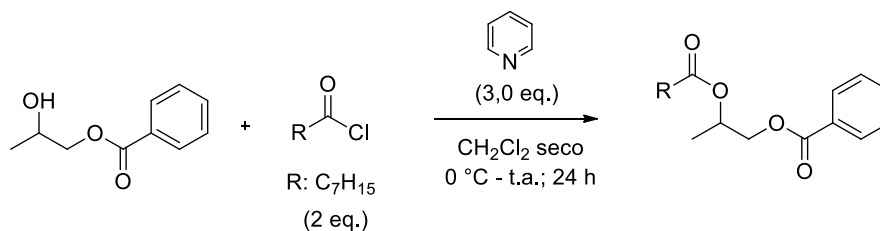
Ao resíduo obtido na etapa anterior, adicionaram-se, em banho de gelo e sob agitação, uma solução contendo 0,05 g (0,277 mmol; 180,20 g/ mol) de benzoato de 2-hidroxipropila em 2,0 mL de CH_2Cl_2 seco e 0,07 mL de piridina (0,83 mmol; 79,101 g/ mol). A reação foi deixada atingir temperatura ambiente, na qual permaneceu por 24 horas. Após evaporação dos voláteis, o resíduo obtido foi submetido à purificação por cromatografia em coluna, utilizando-se gradiente variando de 2 % a 5 % de uma mistura acetato de etila em hexano. Foi obtido 0,069 g de benzoato de 2-oleoiloxipropila (54 % de rendimento).

5.7.7 Síntese do benzoato de 2-capriloiloxipropila

Inicialmente, foi sintetizado o cloreto de capriloila, através da reação com cloreto de tionila:

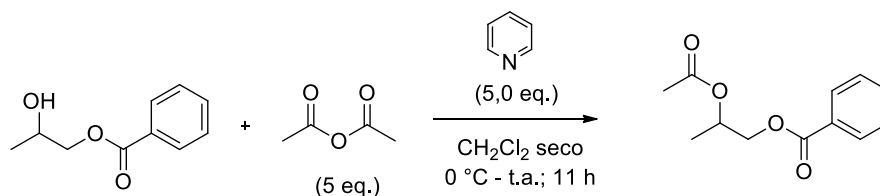


A um vial contendo 0,08 g (0,56 mmol; 282,46 g/ mol) de ácido caprílico em 2,0 mL de CH_2Cl_2 seco, adicionou-se 0,12 mL (1,66 mmol; 118,97 g/ mol) de SOCl_2 , gota a gota, em banho de gelo e sob agitação. A reação foi deixada atingir a temperatura ambiente, permanecendo por 24 horas. Ao término, evaporaram-se os voláteis e procedeu-se com a etapa seguinte.



Ao resíduo obtido na etapa anterior, adicionaram-se, em banho de gelo e sob agitação, uma solução contendo 0,05 g (0,277 mmol; 180,20 g/ mol) de benzoato de 2-hidroxipropila em 2,0 mL de CH₂Cl₂ seco e 0,07 mL de piridina (0,83 mmol; 79,101 g/ mol). A reação foi deixada atingir temperatura ambiente, na qual permaneceu por 24 horas. Após evaporação dos voláteis, o resíduo obtido foi submetido à purificação por cromatografia em coluna, utilizando-se gradiente variando de 2 % a 5 % de uma mistura acetato de etila em hexano. Foi obtido 0,069 g de benzoato de 2-capriloiloxipropila (81 % de rendimento).

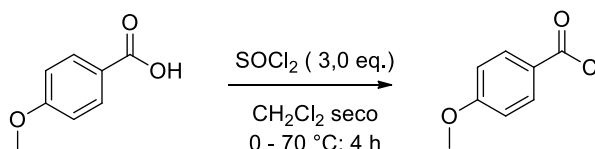
5.7.8 Síntese do benzoato de 2-acetoxipropila



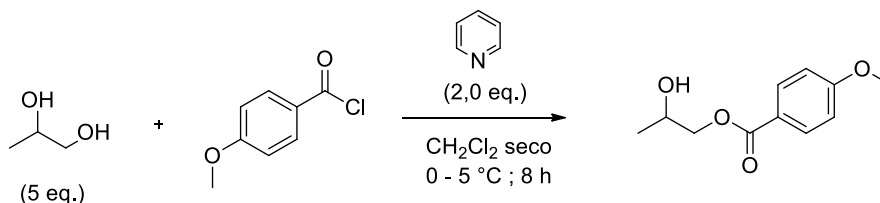
A um vial adicionou-se 0,05 g (0,277 mmol; 180,20 g/ mol) de benzoato de 2-hidroxipropila e 1,5 mL de CH₂Cl₂. Em banho de gelo e sob agitação, adicionaram-se 0,07 mL de piridina (0,83 mmol; 79,101 g/ mol) e 0,08 mL de anidrido acético (0,83 mmol; 102,09 g/ mol). A reação foi deixada atingir temperatura ambiente, permanecendo por 4 horas. Ao término desse tempo, foi feita nova adição de 0,05 mL de anidrido acético e 0,05 mL de piridina. A reação foi deixada por 7 horas à temperatura ambiente. Ao término da reação, adicionou-se 3,0 mL de CH₂Cl₂ e realizou-se extração com água destilada (2 x 2,0 mL). Foi obtido 0,038 g de benzoato de 2-acetoxipropila (62 % de rendimento).

5.7.9 Síntese do *p*-anisoato de 2-hidroxipropila

Inicialmente, foi sintetizado o cloreto de *p*-anisoila, através da reação com cloreto de tionila:



A um balão contendo 0,500 g (3,29 mmol; 152,15 g/ mol) de ácido *p*-anísico em 5,0 mL de CH₂Cl₂ seco, adicionou-se 0,72 mL (9,86 mmol; 118,97 g/ mol) de SOCl₂, gota a gota, em banho de gelo e sob agitação. A reação foi aquecida à temperatura de 70 °C, permanecendo por 4 horas. Ao término, evaporaram-se os voláteis e procedeu-se com a etapa seguinte.



Ao resíduo obtido na etapa anterior, adicionaram-se, em banho de gelo e sob agitação, 5,0 mL de CH₂Cl₂ seco, 1,20 mL (16,4 mmol; 76,09 g/ mol) de propano-1,2-diol e 0,53 mL (6,58 mmol; 79,101 g/ mol) de piridina. A reação permaneceu em banho de gelo e água ambiente por 8 horas. Após evaporação dos voláteis, o resíduo obtido foi submetido à extração com solução de NaHCO₃ saturada (3 x 1,0 mL) e água destilada (5 x 1,0 mL). Posteriormente, realizou-se a cristalização do produto através de uma mistura de diclorometano e hexano. Foi obtido 0,345 g de *p*-anisoato de 2-hidroxipropila (50 % de rendimento).

6. Resultados e Discussão

6.1 Síntese química dos derivados 1-O-acilados do 1,2-PDO a partir de ácidos graxos

Explorando-se a estratégia 1 (seção 4.1), primeiramente, estudaram-se metodologias sintéticas a fim de se obterem regiosseletivamente os derivados 1-O-acilados do propilenoglicol. Estes são os substratos a serem submetidos às resoluções cinéticas via lipases. A síntese dos mesmos é dificultada pelo fato de o substituinte ligado a hidroxila secundária do referido diol ser um grupo metila, o que leva a uma diferença pequena de tensão estérica, quando se comparam as duas hidroxilas (primária e secundária) para reações com eletrófilos, como a de acilação (**Figura 15**).

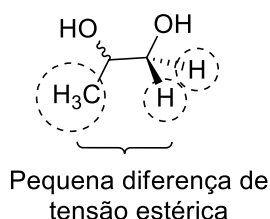
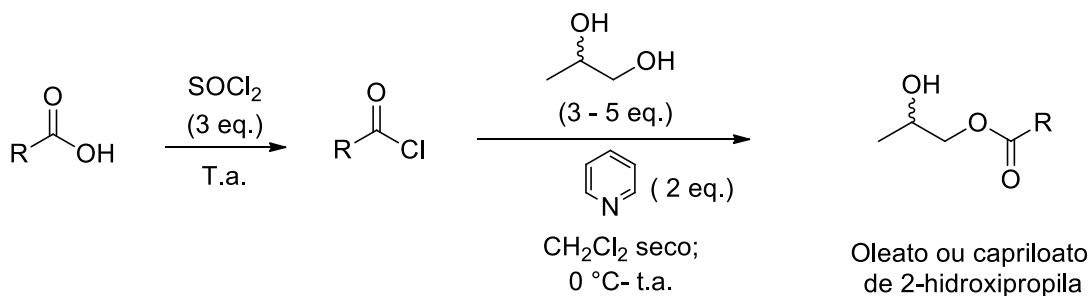
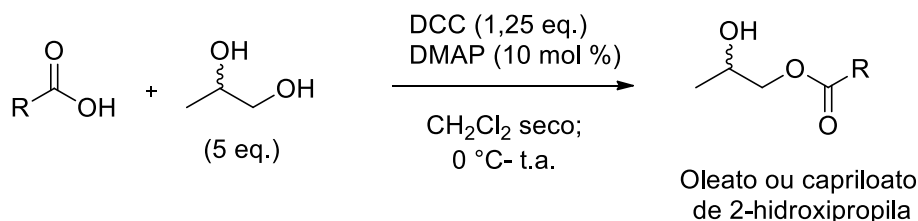


Figura 15: Dificuldade natural de se obter regiosseletividade em reações com propano-1,2-diol.

Inicialmente, foi dada ênfase às reações de acilação, por via química, do propilenoglicol com ácidos graxos, como o oléico e caprílico. Para tal, foram estudadas duas metodologias. A primeira baseou-se na síntese dos cloretos desses ácidos, por meio de reação com cloreto de tionila (SOCl_2) e, posteriormente, adição de propilenoglicol (**Esquema 31**). A segunda, por meio da reação de Steglich, utilizando-se *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) e 4-dimetilaminopiridina (DMAP), em quantidade catalítica (**Esquema 32**). Com o intuito de proporcionar a acilação regiosseletiva na hidroxila primária, foi empregado excesso de propano-1,2-diol.



Esquema 31: Mono-O-acilação regiosseletiva do 1,2-propanodiol com cloretos de acila.



Esquema 32: Mono-O-acilação regioseletiva do 1,2-propanodiol via reação de Steglich.

A regioseletividade das reações foi avaliada, principalmente, por meio de ressonância magnética nuclear de próton (RMN de ^1H), considerando-se ideal a ausência dos sinais dos hidrogênios metílicos, metilênicos diastereotópicos e metino da cadeia propílica do outro regioisômero, proveniente de esterificação da hidroxila secundária.

Em relação à síntese do oleato de 2-hidroxipropila, conseguiu-se melhor rendimento, através da metodologia de Steglich (**Esquema 32**), obtendo-se esse monoéster regioseletivamente (**seção 5.7.1**), conforme análise por ressonância magnética nuclear de próton (^1H) (**seção 9.3**).

Houve maior dificuldade na síntese do capriloato de 2-hidroxipropila, gerando-se, em ambas as metodologias, os dois regioisômeros, possivelmente pelo fato da cadeia acílica conter menos carbonos, o que acarreta em menor efeito estérico. Para contornar esse problema, manteve-se o meio reacional a temperaturas negativas, entre -20 e -30°C , com o intuito de explorar a barreira energética reduzida em detrimento da reação na hidroxila secundária, mais impedida. Ademais, permaneceu-se com o excesso de propano-1,2-diol (5 eq.). Esta estratégia logrou êxito, obtendo-se o capriloato de 2-hidroxipropila de modo regioseletivo (**seção 5.7.3**), mediante análise de RMN de ^1H (**seção 9.3**).

6.2 Síntese enzimática dos derivados 1-O-acilados do 1,2-PDO a partir de ácidos graxos

Diante da dificuldade encontrada na síntese, principalmente, do capriloato de 2-hidroxipropila, conseguindo-se regioseletividade apenas em temperaturas negativas (-30 a -20°C), estudou-se a possibilidade de se usar a catálise de lipases para promover a síntese regioseletiva de derivados 1-O-acilados do 1,2-PDO, a partir dos ácidos oléico e caprílico. Além disso, sendo exitosa neste aspecto, essa metodologia conferiria maior praticidade de processo, principalmente, na etapa de purificação, em que vislumbriaria um simples processo de extração líquido-líquido.

Estudou-se o potencial uso das lipases na capacidade de catalisar a acilação regioseletiva do propilenoglicol, por meio de esterificação, empregando-se os ácidos caprílico e oléico. Salienta-se que, por si só, a obtenção de monoésteres do propilenoglicol contendo cadeias acílicas provenientes de ácidos graxos desperta interesse industrial, diante do uso dos mesmos, com a função principal de emulsificantes nas indústrias de cosméticos e de alimentos.

A utilização do propilenoglicol como substrato para lipases em reações com ácidos graxos e seus derivados (ésteres, anidridos e triglicerídeos) é descrita na literatura. Shaw e colaboradores (1994) estudaram a influência desses doadores de acila e de outros parâmetros, como solventes orgânicos, temperatura, atividade de água, pH e tempo reacional na obtenção de monoésteres de 1,2-PDO. Foram empregados os ácidos láurico, mirístico, palmítico, esteárico e oléico, assim como seus derivados supramencionados. Foram avaliadas as diferenças entre as lipases quanto ao rendimento e conversão, não se atendo à regioseletividade dos monoésteres formados. Preconizou-se o uso de hexano como solvente, devido ao maior rendimento obtido com o mesmo, observando-se que, além dos monoésteres, foram detectados, também, os diésteres em todas as reações com os diferentes agentes acilantes, entretanto, em alguns casos, em concentrações significativamente menores que as dos monoésteres.

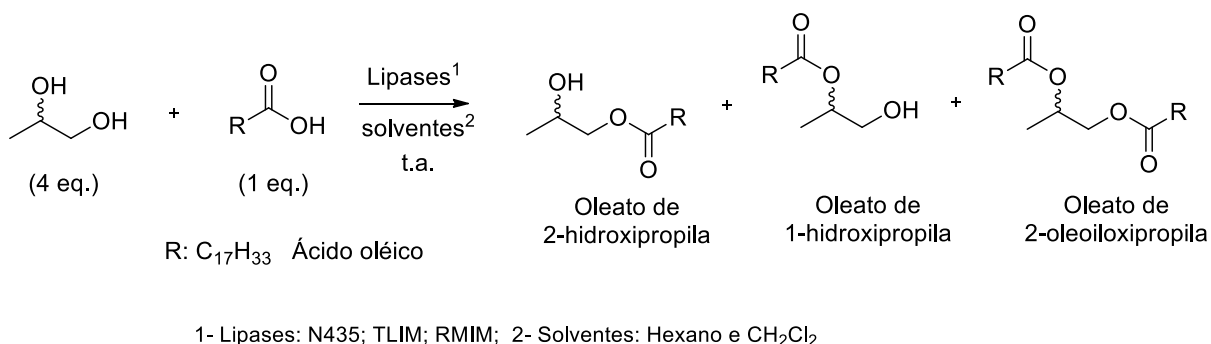
6.2.1 Screening sobre a regioseletividade da esterificação do 1,2-PDO com ácidos graxos via lipases

Baseando-se na referida literatura (SHAW et al, 1994), buscou-se avaliar, primeiramente, a síntese de oleato de 2-hidroxipropila, a partir do ácido oléico, empregando-se diferentes lipases imobilizadas e solventes.

Inicialmente, reproduziu-se, em pequena escala, a reação de esterificação do 1,2-PDO em hexano. Ao invés da estequiometria de 10:1 e 30 °C (SHAW et al., 1994), utilizou-se 4:1 de 1,2-PDO em relação ao ácido oléico e temperatura ambiente. Comparou-se o efeito dos solventes diclorometano e hexano na formação dos produtos esperados (monoésteres e diésteres de ácidos graxos), sendo empregadas as lipases imobilizadas N435, TLIM e RMIM (**Esquema 33**). Esta última já havia sido estudada no referido artigo, sob a nomenclatura comercial de Lipozyme.

Foram empregados nos *screenings* (**seção 5.2**) 5 mg de 1,2-PDO (4 eq.) e 5,4 mg de ácido oléico (1 eq.) em 0,7 mL de hexano e à temperatura ambiente, com 30 mg das lipases

supramencionadas. As reações foram acompanhadas por CCF, comparando-se com a eluição dos referidos padrões sintéticos dos produtos esperados. Estes padrões foram sintetizados de acordo com o descrito na seção experimental (**seção 5.7.2**). A amostra bruta, obtida após filtração das lipases, foi analisada por CG e, comparando-se com os cromatogramas dos referidos padrões sintéticos.



Esquema 33: *Screening* de esterificação do 1,2-propanodiol com ácido oléico via lipases, mostrando os produtos possíveis de reação.

Analisando-se os cromatogramas das esterificações realizadas em hexano, tomando-se como exemplo a reação com N435 (**Figura 16**), pôde-se observar, com todas as lipases, a presença de dois picos, em 38 min e 33 min, aproximadamente, relacionados ao oleato de 2-oleoiloxipropila, sendo o minoritário provavelmente devido a alguma impureza não determinada, e um pico em 19 min, aproximadamente, referente ao oleato de 2-hidroxiopropila. Salienta-se que a observação de 2 picos relacionados ao de 2-oleoiloxipropila foram também observados no padrão sintético desta substância (**seção 9.1**), o que pode ser gerado por alguma impureza do próprio ácido oléico, utilizado na síntese.

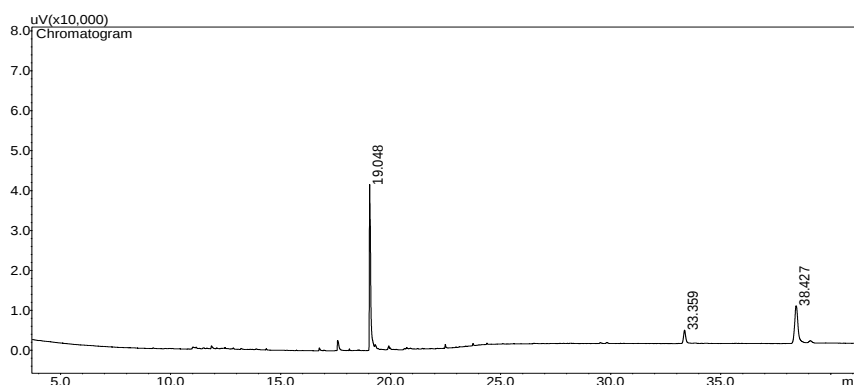


Figura 16: Cromatograma da esterificação do 1,2-PDO com ácido oléico (4:1), catalisada por N435 em hexano; 18 h de reação à t.a. Oleato de 2-hidroxiopropila (19 min.) e oleato de 2-oleoiloxipropila (33-38 min.).

Destaca-se que mesmo que o propilenoglicol seja insolúvel em hexano, observa-se a formação de produtos, os quais são uma mistura de mono e diésteres de 1,2-PDO. A razão de áreas observada (diéster/ monoéster) foi de 1,1.

Alternativamente ao hexano, avaliou-se a esterificação do 1,2-PDO em diclorometano, solvente não mencionado por Shaw e colaboradores (1994) e com menor log *P*. Mantiveram-se as mesmas condições das reações realizadas em hexano.

Observou-se que, bastando-se alterar o solvente de reação para diclorometano, ao invés de hexano, não se detectam os dois picos relacionados ao oleato de 2-oleoiloxipropila em nenhuma das reações catalisadas com as lipases testadas. Isto pode ser ilustrado mediante o cromatograma de esterificação com N435 (**Figura 17**).

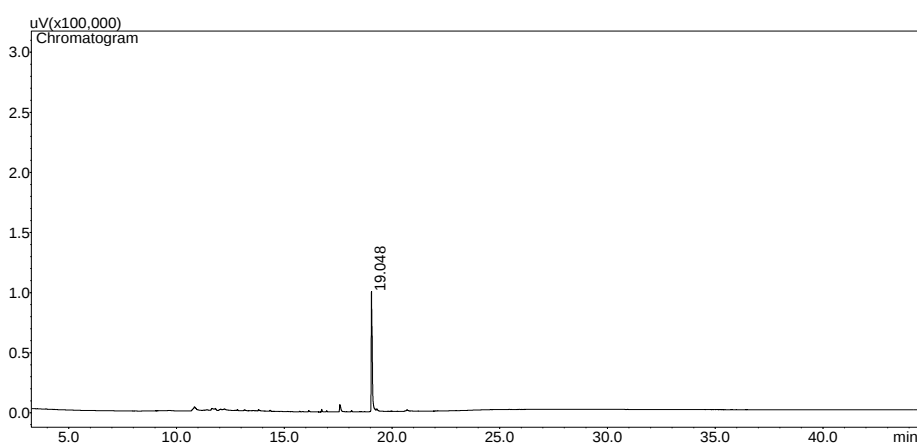


Figura 17: Cromatograma de esterificação do 1,2-PDO com ácido oléico (4:1), catalisada por N435 em diclorometano; 18 h de reação à t.a. Oleato de 2-hidroxipropila (19 min.).

O efeito do solvente na esterificação com ácido oléico pode ser ilustrado, também, pela análise de CCF das reações em hexano e diclorometano (**Figura 18**).

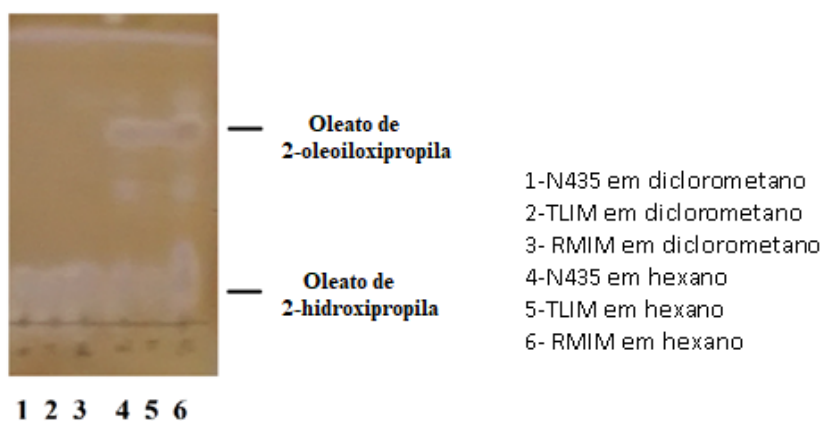


Figura 18: CCF da reação de esterificação do 1,2-PDO com ácido oléico (4:1), à t.a., em hexano (19 h) e diclorometano (18 h); massa lipase/ massa 1,2-PDO = 6; Eluente: 15 % AcOEt/ hexano.

O efeito da polaridade de solventes na esterificação do 1,2-propanodiol e outros alcoóis com ácidos graxos já havia sido estudada anteriormente (SHAW et al 1994; FEVRIER et al, 2001). Inclusive, o 1,2-propanodiol foi empregado em esterificação com ácido caprílico, segundo estequiometria de 1:1, observando-se que o uso de solventes mais polares (menor log *P*) acarreta na formação de monoéster em maior proporção que diéster, apesar da possibilidade de ocorrer comprometimento da atividade catalítica com solventes muito polares, como acetonitrila e acetona, resultando em menores conversões (FEVRIER et al, 2001).

Em hexano, em virtude da não solubilização do 1,2-propanodiol, cogita-se que haja um favorecimento, por efeito de partição, da reação do monoéster gerado com nova molécula de ácido graxo, no caso o oléico, formando o derivado dioleato. Em diclorometano, tendo-se em vista a solubilidade do 1,2-PDO neste solvente, o excesso deste diol contribui, provavelmente, na formação exclusiva de monoéster.

6.2.2 Estudo em maior escala da regioseletividade da esterificação do 1,2-PDO com ácidos graxos via lipases

Diante dos resultados de *screening*, as referidas reações de esterificação foram realizadas em maior escala, a fim de melhor caracterizar os produtos por RMN, principalmente para a eventual identificação dos regioisômeros dos monoésteres de ácidos graxos formados. Priorizou-se o estudo em diclorometano, uma vez que neste não houve detecção de diéster na reação de *screening* com ácido oléico.

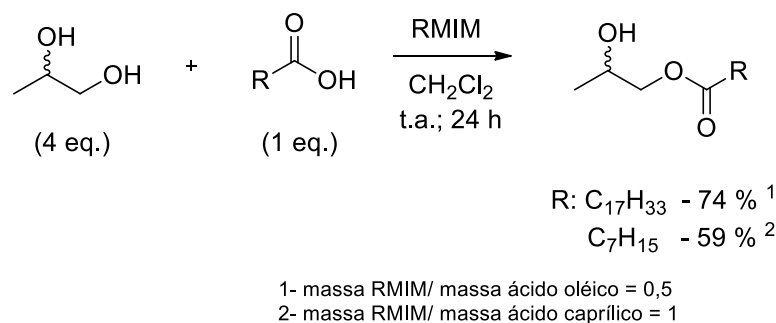
Manteve-se, nessas reações em maior escala, excesso de 1,2-PDO (2 - 4 eq.), com o intuito de contribuir para a regioseletividade das reações realizadas, de deslocar o equilíbrio para o sentido dos produtos (sentido de esterificação) e por entender que seu excesso não é um aspecto negativo, uma vez que esse álcool pode ser removido facilmente na etapa de purificação, por meio de extração com água.

Empregaram-se 50 mg dos ácidos graxos, oléico e caprílico, e optou-se pelo uso da lipase RMIM, tendo-se em vista a melhor regioseletividade desta lipase, utilizada sob a nomenclatura comercial IM60, na esterificação do 1,2-PDO com ácido caprílico, conforme descrito por Fevrier e colaboradores (2001).

Ao contrário dos referidos autores, não foram utilizadas condições equimolares de 1,2-PDO e ácido graxo, por motivos supracitados. Com excesso de 4 eq. de 1,2-PDO em relação

ao ácido caprílico e proporção de 1:1 entre a massa de lipase e a massa de ácido caprílico, não houve detecção do regioisômero secundário (derivado 2-O-acilado) e de diéster, através de análise de RMN de ^1H (**Esquema 34**). Esse fato também é válido para o ácido oléico, obtendo-se o oleato de 2-hidroxipropila, na ausência do outro regioisômero (derivado 2-O-acilado) e de diéster, com o mesmo excesso de 1,2-PDO e 50 % de massa de lipase em relação a de ácido oléico (**Esquema 34**).

Destaca-se que a purificação de ambos monoésteres obtidos por rota biocatalisada, via lipase RMIM, consistiu de apenas extração com água do meio reacional, para retirada do 1,2-PDO em excesso. Os espectros de RMN de ^1H mostraram-se iguais aos dos padrões sintéticos, obtidos por via química, sendo que estes necessitaram de cromatografia em coluna para sua purificação.

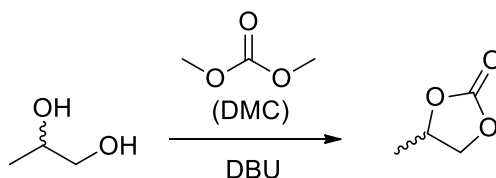


Esquema 34: Síntese regioseletiva de oleato e capriloato de 2-hidroxipropila via RMIM.

6.3 Resolução enzimática dos derivados 1-O-acilados de ácidos graxos via lipases

6.3.1 Screening de alcoólise

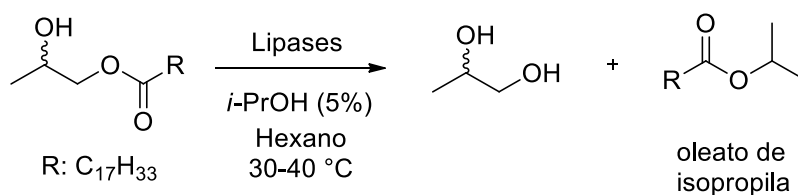
Conforme ilustrado no esquema da estratégia 1 (**seção 4.1**), as reações de alcoólise de derivados monoésteres do propano-1,2-diol oferecem a vantagem de ser gerado prontamente o propano-1,2-diol, como um dos produtos de reação. Este fato proporciona uma avaliação mais rápida da viabilidade de se obter o carbonato de propileno enantiomericamente enriquecido, uma vez que o mesmo pode ser obtido a partir de derivatização do 1,2-PDO em única etapa, reagindo-se com DMC (**Esquema 35**).



Esquema 35: Derivatização do 1,2-propanodiol a carbonato de propileno.

Portanto, realizaram-se reações de isopropanólise (**Esquema 36**) em pequena escala (*screening*) do oleato de 2-hidroxipropila catalisadas por diferentes lipases, tanto liofilizadas (PS e AY Amano 30), quanto imobilizadas (N435, RMIM e TLIM). Os *screenings* foram realizados com 5 mg de substrato e 30 mg de lipases em 1 ml de meio reacional (5 % de isopropanol em hexano), a 30 °C, segundo descrito na **seção 5.2**.

Acompanhando-se a reação por cromatografia em camada fina (CCF), pode-se perceber que nas reações catalisadas com as lipases imobilizadas N435, RMIM e TLIM houve consumo praticamente completo do substrato em 24 horas a 30 °C. Observou-se formação de produto, com alto fator de retenção (*R_f*), condizente com a baixa polaridade esperada para um dos produtos dessa reação (oleato de isopropila). A presença desta substância foi confirmada submetendo-se a amostra à análise por CG/ MS. Em contrapartida, nas reações com as lipases liofilizadas (PS e AY Amano 30), houve baixa conversão. Mesmo ao aumentar a temperatura para 40 °C, por 24 horas, passadas 48 horas a 30 °C, foi observado, ainda, substrato remanescente nessas duas reações (**Figura 19**).



Esquema 36: Isopropanólise do oleato de 2-hidroxipropila via lipases.

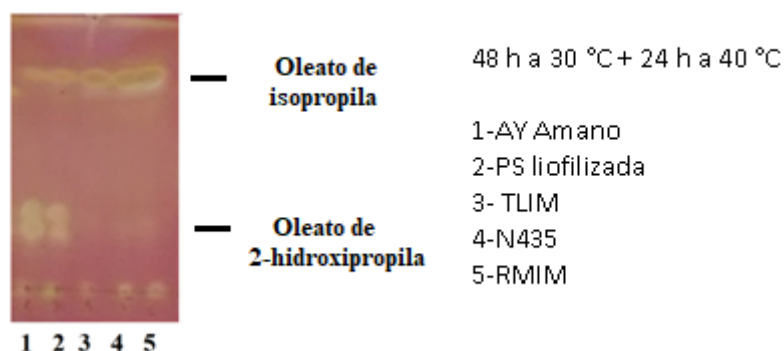


Figura 19: Análise por CCF do screening de isopropanólise em hexano (5 % *i*-PrOH) do oleato de 2-hidroxipropila; massa lipase/ massa substrato = 6; volume de reação: 1,0 mL Eluente: 15 % AcOEt/ Hexano.

Conforme observado, conseguiram-se altas conversões com as lipases imobilizadas, reportadas por CCF e CG. Em situação ideal de resolução cinética, com alto fator de seletividade, o catalisador quiral, no caso a lipase, apresenta uma grande diferença de velocidade de reação com cada enantiômero do substrato racemato, conseguindo-se conversões próximas a no máximo 50 %, com altos excessos enantioméricos de substrato e produto. No caso específico da reação estudada, constatou-se que as lipases reconhecem ambos os enantiômeros, conseguindo-se conversões completas (consumo total do substrato), o que é um indicativo de baixa enantiosseletividade. Isto não é impeditivo, todavia, de serem conseguidos altos excessos enantioméricos, sendo somente necessário monitorar com maior rigor a reação, a fim de se chegarem a valores ideais de conversão.

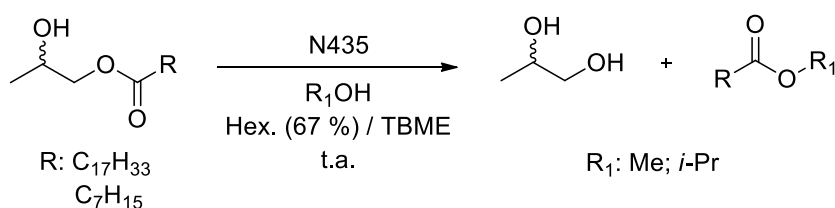
Diante do reconhecimento do substrato pelas lipases e com a finalidade de se estudar a enantiosseletividade dessas reações, avaliou-se a viabilidade da separação (resolução) dos enantiômeros do oleato de 2-hidroxipropila, o substrato ensaiado, por cromatografia líquida com fase estacionária quiral. Entretanto, nenhuma das colunas quirais testadas foi capaz de resolver o substrato racêmico. Além disso, o próprio substrato apresenta a dificuldade de ser pouco detectado por UV, o que dificulta a obtenção de uma boa relação sinal/ ruído.

Em virtude da dificuldade encontrada, uma alternativa para avaliar a enantiosseletividade dessas reações consiste na derivatização de produto ou substrato remanescente a carbonato de propileno (**seção 5.5**). A determinação do *ee* desta substância é reportada, na literatura, por meio de cromatografia gasosa com coluna quiral (REN et al, 2012). Esta possibilidade oferece a vantagem advinda do fato de o produto de derivatização (carbonato de propileno) já ser a própria substância de interesse do referido trabalho.

6.3.2 Cinéticas de alcoólise dos derivados 1-O-acilados de ácidos graxos

Considerando-se que houve êxito na síntese dos derivados 1-ésteres de 1,2-PDO, sobretudo de modo prático, via lipase, utilizando-se os ácidos oléico e caprílico, além de se observar conversão no *screening* de isopropanólise do oleato de 2-hidroxipropila, decidiu-se realizar reações de alcoólise desses substratos em maior escala para estudo de cinética (**Esquema 37**). Diante do comportamento aparentemente similar das lipases imobilizadas no *screening* realizado, optou-se por empregar a N435 nos ensaios de cinética. O procedimento seguido, assim como o cálculo de conversão, encontra-se descrito na **seção 5.3**.

Destaca-se que nesse tipo de reação, priorizou-se atingir valores de conversão abaixo de 50 %, a fim de se avaliar a possibilidade de se obter o 1,2-propanodiol em alto excesso enantiomérico, uma vez que o mesmo é um dos produtos da reação. Isto porque em resoluções cinéticas, o *ee* do produto (*ee_p*) decai conforme se atingem maiores conversões.



Esquema 37: Alcoólises dos derivados 1-O-acilados de ácidos graxos.

Inicialmente foram estudadas reações de metanólise desses substratos. Utilizando-se o oleato de 2-hidroxipropila, observou-se que com um valor de massa de N435 correspondente a 3 vezes a do substrato e com uma quantidade de metanol referente a 10 % de volume do meio, atingiu-se conversão completa em aproximadamente 30 minutos de reação.

Diante do rápido consumo do substrato, decidiu-se retardar a cinética, reduzindo-se a carga de lipase, o volume, assim como o próprio álcool. Ao invés de metanol, optou-se por utilizar um nucleófilo mais fraco, como o isopropanol, o qual confere a vantagem adicional de ser menos tóxico. Os novos ensaios foram realizados com uma massa de N435 correspondente a 12,5 % em relação a de oleato de 2-hidroxipropila e volume de isopropanol referente a 11 eq. Com essas mudanças, conseguiu-se reduzir a taxa de consumo do substrato, obtendo-se 38 % de conversão após 40 minutos de reação (**Quadro 2**).

Quadro 2: Conversão conforme o tempo da reação do oleato de 2-hidroxiopropila com isopropanol (11 eq.), com 12,5 % m/ m de N435, à t.a.

Tempo	20 min.	40 min.
Conversão	27 %	38 %

Empregando-se as mesmas condições descritas no **quadro 2**, realizou-se a isopropanólise do capriloato de 2-hidroxiopropila (**Quadro 3**). Além desta reação, estudou-se, também, a metanólise deste substrato, mantendo-se as mesmas condições reacionais (**Quadro 4**). Priorizou-se de certa forma o derivado capriloato, pelo fato de a grande diferença de massa molecular entre o oleato de 2-hidroxiopropila e do propano-1,2-diol (produto) limitar mais a massa que pode ser obtida deste diol com essa reação.

Quadro 3: Conversão conforme o tempo da reação do capriloato de 2-hidroxiopropila com isopropanol (11 eq.), com 12,5 % m/ m de N435, à t.a.

Tempo	20 min.	33 min.
Conversão	23 %	41 %

Quadro 4: Conversão conforme o tempo da reação do capriloato de 2-hidroxiopropila com metanol (11 eq.), com 12,5 % m/ m de N435, à t.a.

Tempo	20 min.	30 min.
Conversão	30 %	37 %

Os resultados, de um modo geral, reportaram a ocorrência de reações em que houve rápido consumo dos substratos, mesmo com baixa carga de lipase (12,5 % m/ m). Isto dificultou a observação de uma eventual diferença de velocidade de consumo do substrato ao longo do tempo, o que pode ser um indicativo de baixa enantiosseletividade.

Interromperam-se as reações de isopropanólise do oleato e do capriloato de 2-hidroxiopropila nas conversões de 38 e 41 % e a de metanólise do capriloato de 2-hidroxiopropila, em 37 %. Os cromatogramas correspondentes aos tempos iniciais e finais dessas reações encontram-se na **seção 9.2.1, 9.2.2 e 9.2.3**, respectivamente.

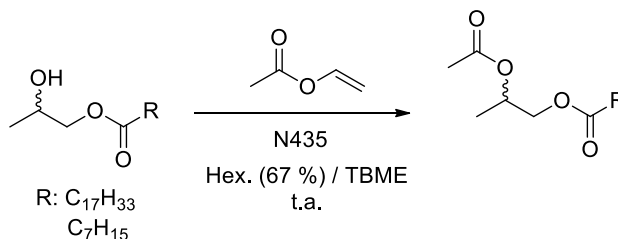
Prosseguiu-se com a extração do 1,2-propanodiol gerado nessas reações, por meio de extração com água, e de sua derivatização a carbonato de propileno, para determinação de *ee* (**seção 5.5**). Destaca-se que o procedimento de extração, com água, do referido diol foi

eficiente, conseguindo-se particionar totalmente o substrato remanescente na fase orgânica (diclorometano), evitando-se o uso de cromatografia em coluna para separação física dos enantiômeros. A CCF da reação de derivatização reportou conversão total ao carbonato.

6.3.3 Cinéticas de transesterificação dos derivados 1-O-acilados de ácidos graxos

Além das reações de alcoólise descritas na seção anterior, os derivados 1-O-acilados de ácidos graxos foram testados como substratos em reações de transesterificação com acetato de vinila, um agente acilante irreversível (**Esquema 38**). Buscou-se a O-acetilação enantiosseletiva do carbinol secundário desses substratos. Neste tipo de reação, priorizou-se atingir valores de conversão próximos ou acima de 50 %, na tentativa de se obterem os substratos remanescentes em altos excessos enantioméricos. Isto porque em resoluções cinéticas, o *ee* do substrato (*ee_s*) aumenta conforme se atingem maiores conversões.

O procedimento seguido para o estudo de conversão, assim como o seu cálculo, encontra-se descrito na **seção 5.3**.



Esquema 38: Transesterificação dos derivados 1-O-acilados de ácidos graxos.

Assim como nas reações de alcoólise, empregou-se somente a lipase N435. Para o estudo dessa reação, utilizou-se uma massa de enzima correspondente a 25 % em relação a dos substratos oleato e capriloato de 2-hidroxipropila. O acetato de vinila foi adicionado ao meio em excesso (5 eq.).

Os valores de conversão ao longo do tempo para o oleato e capriloato de 2-hidroxipropila são ilustrados nos **quadros 5 e 6**, respectivamente.

Quadro 5: Conversão conforme o tempo da reação do oleato de 2-hidroxipropila com acetato de vinila (5 eq.), com 25 % m/ m de N435, à t.a.

Tempo	2 h	3 h	4 h
Conversão	21 %	30 %	42 %

Quadro 6: Conversão conforme o tempo da reação do capriloato de 2-hidroxipropila com acetato de vinila (5 eq.), com 25 % m/ m de N435, à t.a.

Tempo	22 min.	32 min.	1 h	2 h
Conversão	22 %	36 %	52 %	69 %

Os cromatogramas correspondentes aos tempos inicial e final das reações de transesterificação realizadas encontram-se na **seção 9.2.4 e 9.2.5**. Comparando-se os dois substratos, pôde-se constatar que a reação com o oleato de 2-hidroxipropila procedeu com uma cinética mais lenta em relação ao capriloato de 2-hidroxipropila. Observou-se que, mesmo com 4 horas de reação, não foi atingida conversão de 50 %. Possivelmente, a longa cadeia acíclica deste derivado (18 carbonos) causa uma dificuldade na interação com o sítio catalítico da lipase.

Com relação aos dois tipos de reações realizadas (alcoólise e transesterificação) com os derivados 1-*O*-acilados de ácidos graxos, observa-se uma nítida diferença de reatividade desses substratos. Observou-se conversão mais rápida nas alcoólises em comparação com a transesterificação, por, provavelmente, se assemelharem estruturalmente com os substratos naturais das lipases (ésteres de ácidos graxos). Logo, os derivados sintetizados comportam-se melhor como acilantes da serina catalítica da lipase, no caso N435, do que propriamente como nucleófilos.

Com os valores de conversão de 42 e 69 %, referentes aos substratos oleato e capriloato de 2-hidroxipropila, respectivamente, as reações foram interrompidas, separando-se fisicamente o produto, enantiômero acetilado, do substrato remanescente, por meio de cromatografia em coluna. Este último foi derivatizado a carbonato de propileno para determinação do *ee*, por meio de duas etapas, consistindo de metanólise mediada por DBU, seguida de reação com DMC, conforme descrito na **seção 5.5**. Destaca-se que o procedimento de 2 etapas é simples, sendo realizado em único pote, bastando-se trocar o meio de reação de metanol para DMC, sem necessidade de nova adição de DBU.

6.4 Síntese química do benzoato e *p*-anisoato de 2-hidroxipropila

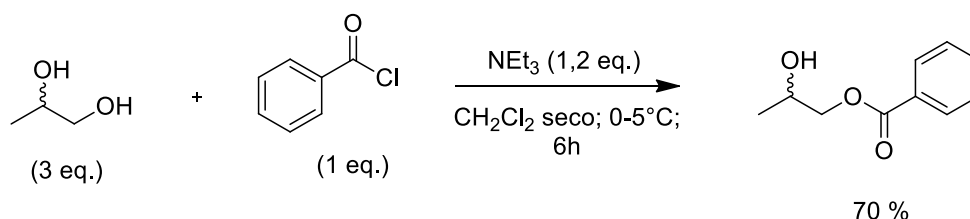
Com a finalidade de contornar o problema decorrente da baixa detecção e não resolução direta dos substratos 1-*O*-acilados de ácidos graxos de 1,2-PDO por HPLC com fase estacionária quiral, estudou-se a possibilidade de síntese de substratos monoésteres alternativos. Desse modo, buscou-se sintetizar regiosseletivamente o benzoato e o *p*-anisoato

de 2-hidroxipropila, pelo fato destes conterem grupo éster com cadeia acila volumosa (facilitando a enantiodiscriminação do racemato) e que absorve na região do UV.

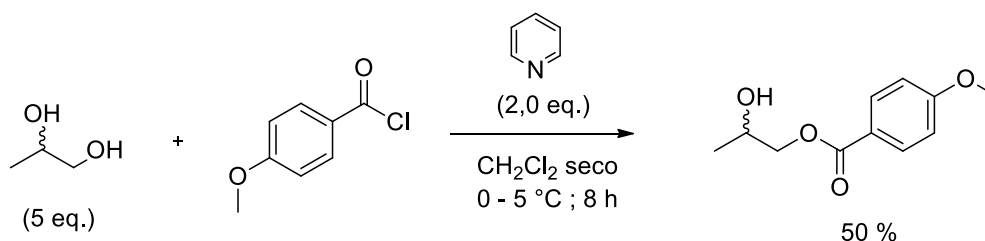
É conveniente destacar que o benzoato de 2-hidroxipropila já foi utilizado em resoluções cinéticas com lipases, em reação de transesterificação com benzoato de vinila, por outro grupo de pesquisa (CIUFFREDA et al, 2003). Entretanto, a avaliação da enantiosseletividade das reações não foi feita por cromatografia com fase estacionária quiral e, sim, por RMN.

Obteve-se êxito com a metodologia sintética empregando-se baixas temperaturas (0-5 °C) e excesso de 1,2-PDO (3 eq.) em relação ao cloreto de benzoila (**Esquema 39**) (seção 5.7.5), conseguindo-se alta regioseletividade, conforme espectro de RMN de ^1H (seção 9.3), observando-se, praticamente, somente um sinal referente aos hidrogênios de metila da cadeia propílica.

A síntese do *p*-anisoato de 2-hidroxipropila seguiu a mesma metodologia, via cloreto do ácido *p*-anísico (**Esquema 40**). Entretanto, esta reação possui as vantagens de não necessitar de cromatografia em coluna para purificação, tendo-se em vista que o *p*-anisoato de 2-hidroxipropila cristaliza mediante adição de uma mistura de hexano e diclorometano. Além disso, não são necessárias baixas temperaturas para o controle da regioseletividade, podendo-se manter a reação à temperatura ambiente (seções 5.7.9 e 9.3).



Esquema 39: Mono-*O*-acilação regioseletiva do 1,2-propanodiol com cloreto de benzoila.



Esquema 40: Mono-*O*-acilação regioseletiva do 1,2-propanodiol com cloreto de *p*-anisoila.

6.5 Resolução enzimática do benzoato de 2-hidroxiopropila via lipases

6.5.1 Screenings de esterificação com ácidos graxos

Tendo-se êxito na síntese regioseletiva do benzoato de 2-hidroxiopropila, decidiu-se investigar o seu uso como substrato de lipases em reações de esterificação com os ácidos caprílico e oléico. Na literatura, em resoluções cinéticas de substratos alcoóis catalisadas por lipases, são, normalmente, empregados ésteres enólicos, como agentes acilantes em transesterificações. Reações de esterificação são menos utilizadas com essa finalidade, ainda mais com o uso de ácidos graxos, como os propostos por esse trabalho.

Para uma avaliação inicial qualitativa a respeito de conversão, foram realizados *screenings* (seção 5.2), utilizando-se as lipases N435, TLIM e RMIM. As reações foram acompanhadas por CCF, comparando-se com a eluição dos referidos padrões sintéticos dos produtos esperados. Estes padrões foram sintetizados de acordo com o descrito na seção experimental (seção 5.7.6 e 5.7.7).

No *screening* com ácido caprílico, utilizaram-se 5 mg de substrato e 1 gota de ácido caprílico (0,005 mL) em hexano (0,7 mL) a 30°C. A proporção massa de lipase/ massa de substrato foi de 1:1. As reações foram filtradas para retirada das lipases e submetidas à análise por CG, comparando-se com os cromatogramas dos referidos padrões sintéticos.

Mediante análise dos cromatogramas de CG, tomando-se como referência o da reação com N435 (**Figura 20**), observa-se, em todas as reações com as lipases, a formação do produto diéster benzoato de 2-capriloiloxipropila, no tempo de retenção próximo a 17 minutos, quando comparado ao padrão sintético dessa substância (seção 9.1).

Mesmo que o *screening* tenha sido feito para se ter uma avaliação qualitativa, pôde-se inferir um maior consumo do substrato, com maior formação do produto esperado na reação com N435.

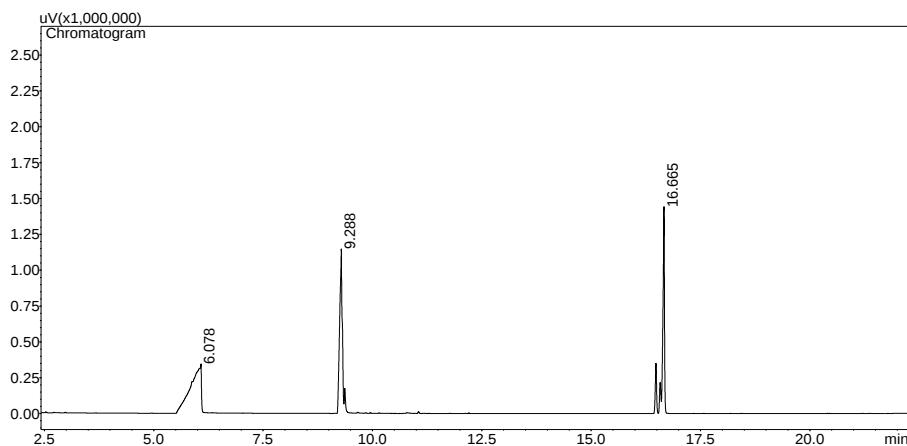


Figura 20: Cromatograma de esterificação do benzoato de 2-hidroxipropila com ácido caprílico, catalisada por N435 em hexano; 5 h a 30 °C. Ácido caprílico (6 min.); benzoato de 2-hidroxipropila (9 min.); benzoato de 2-capriloiloxipropila (17 min.).

Para o *screening* com ácido oléico, utilizaram-se 7 mg de substrato e 1 gota de ácido oléico (0,005 mL) em hexano (0,7 mL) a 30°C. A razão massa de lipase/massa de substrato foi de 1:1.

Analizando-se os cromatogramas, como, por exemplo, o da reação com N435 (**Figura 21**), observa-se, que, em todas as reações com as lipases, houve formação do produto diéster benzoato de 2-oleoiloxipropila, no tempo de retenção entre 23 e 24 minutos, aproximadamente, quando comparado ao padrão sintético dessa substância (**seção 9.1**).

Assim como no *screening* com ácido caprílico, pôde-se inferir uma maior conversão do substrato na reação com N435.

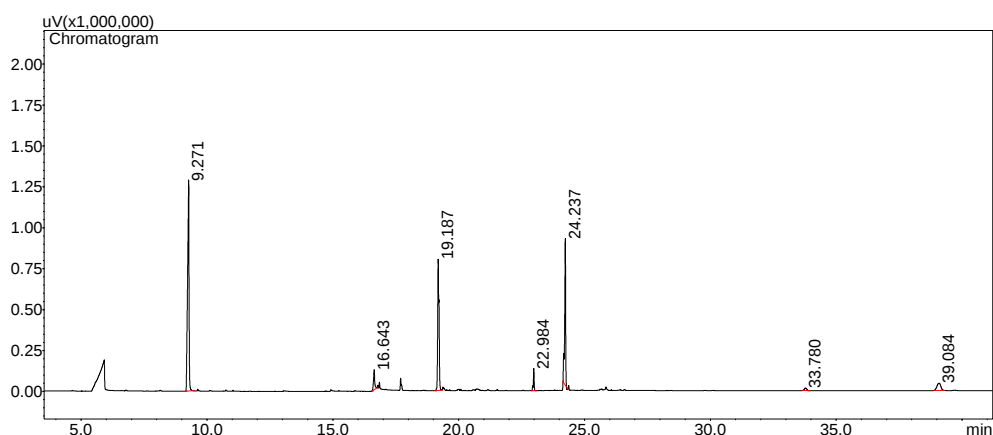


Figura 21: Cromatograma de *screening* de esterificação do benzoato de 2-hidroxipropila com ácido oléico catalisada por N435 em hexano; 24 h a 30 °C. Benzoato de 2-hidroxipropila (9 min.); ácido oléico (16 min.); benzoato de 2-oleoiloxipropila (23-24 min.).

Testou-se a possibilidade de resolução do substrato (benzoato de 2-hidroxipropila), por meio de cromatografia com fase estacionária quiral. Ressalta-se que embora este substrato já tenha sido utilizado em outro estudo (CIUFFREDA et al, 2003), não se empregou cromatografia para a determinação de excesso enantiomérico.

A separação dos enantiômeros do substrato foi possível por meio do uso da coluna quiral AD-H (Chiralpak) (**Figura 22**).

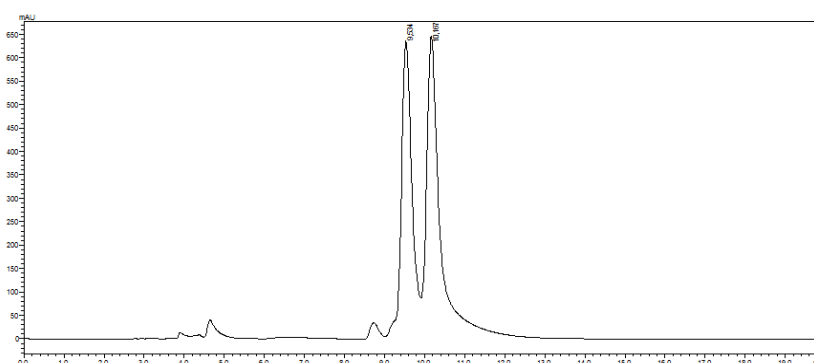


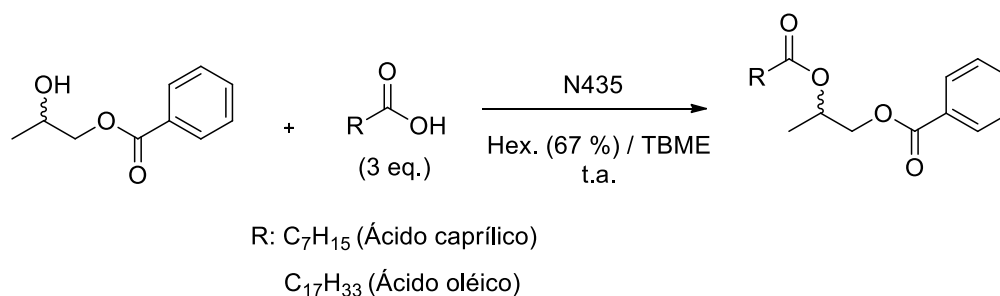
Figura 22: Cromatograma do benzoato de 2-hidroxipropila racêmico em coluna quiral (AD-H). Fluxo: 0,8 mL min. (10 % *i*-PrOH/ hexano); 232 nm.

Apesar de a resolução não ser a ideal, pois as bandas referentes a cada enantiômero não se encontram totalmente separadas, esta foi a melhor condição de análise utilizada. Foi testada outra coluna, a OD-H (Chiralpak), mas não houve resolução do substrato.

6.5.2 Cinética de esterificação com ácidos graxos

Diante da possibilidade de se averiguar diretamente a enantiosseletividade dessas reações, por meio do substrato benzoato de 2-hidroxipropila, buscou-se realizar as reações de esterificação em maior escala, com os ácidos graxos oléico e caprílico (**Esquema 41**). Utilizou-se, principalmente, a lipase N435, devido à, aparentemente, maior conversão durante o *screening*. O procedimento seguido para as cinéticas, assim como o cálculo de conversão, são descritos na **seção 5.2**.

Procurou-se atingir, idealmente, valores acima de 50 %, na tentativa de se obter o substrato remanescente com alto excesso enantiomérico. Isto porque não foi conseguida a resolução dos produtos de esterificação com os ácidos graxos (caprílico e oléico) na coluna quiral AD-H, utilizada para a resolução do substrato, o que justificaria interromper a reação em baixas conversões, diante da possibilidade de se obter alto *ee_p*.



Esquema 41: Esterificação do benzoato de 2-hidroxipropila com os ácidos oléico e caprílico.

Nesses ensaios, utilizou-se a lipase N435 na proporção de 3:1 m/m em relação ao substrato. Com relação à esterificação com ácido oléico, os valores de conversão ao longo do tempo estão dispostos no **quadro 7**, sendo os cromatogramas dos tempos inicial e final dispostos na **seção 9.2.6**. Com o valor de conversão de 52 %, a reação foi interrompida e o substrato remanescente foi purificado por cromatografia em coluna a fim de se avaliar o excesso enantiomérico (**seções 5.4 e 5.5**).

Quadro 7: Conversão conforme o tempo da reação do benzoato de 2-hidroxipropila com ácido oléico (3 eq.), com massa de N435/ massa de substrato = 3, à t.a.

Tempo	3 h	6 h	9 h
Conversão	30 %	43 %	52 %

Mesmo com conversões acima de 50 %, pôde-se constatar que o substrato remanescente foi obtido com valor muito baixo de excesso enantiomérico (15 % de ee_s) (**Figura 23**). Isto forneceu um indicativo de que a reação apresenta baixo fator de seletividade ($E = 1,5$).

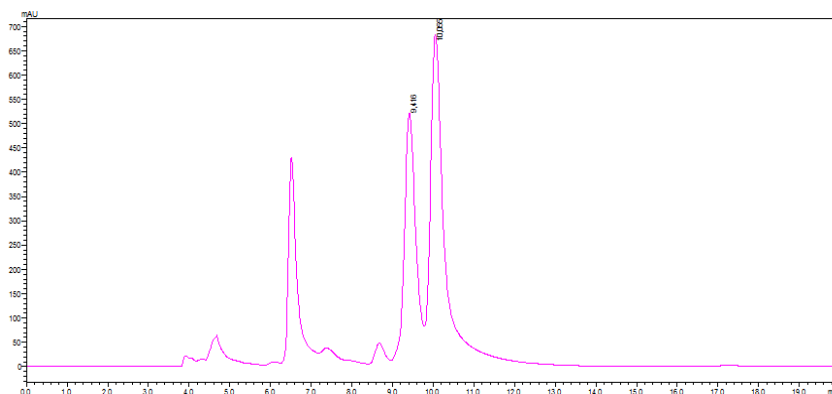


Figura 23: Cromatograma do substrato remanescente da esterificação com ácido oléico (coluna chiralpak AD-H; fluxo 0,8 mL/ min; 10 % *i*-PrOH/Hexano; 232 nm); 52 % de conversão; 15 % de ee_s .

Com base no resultado obtido na esterificação com ácido oléico, decidiu-se averiguar se mesmo com conversões mais altas, acima de 80 %, o substrato seria obtido com baixo excesso enantiomérico. Para tal, optou-se, também por modificar o ácido graxo, empregando-se o ácido caprílico.

Analisando-se os cromatogramas dessa esterificação, pôde-se observar o aparecimento de dois picos próximos ao do substrato, em 9,2 e 9,3 minutos, com o decorrer do tempo de reação. Estes se tornam mais nítidos (melhor separados do pico referente ao substrato) em valores mais altos de conversão (**Figura 24**) (**seção 9.2.7**). Este fato foi um obstáculo ao cálculo de conversão, tendo-se em vista a dificuldade em se delimitar o pico do substrato, e, conseqüentemente, a variação de sua área ao longo do tempo. Não obstante, valores aproximados de conversão foram calculados (**Quadro 8**).

Quadro 8: Conversão conforme o tempo da reação do benzoato de 2-hidroxipropila com ácido caprílico (3 eq.), com massa de N435/ massa de substrato = 3, à t.a.

Tempo	3 h	6 h	10 h	14 h
Conversão	58 %	70 %	78 %	83 %

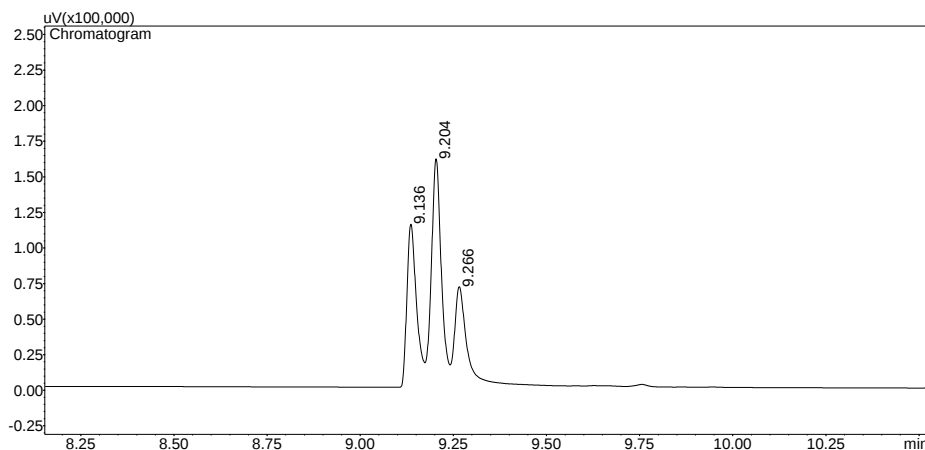


Figura 24: Expansão do cromatograma da reação de esterificação do benzoato de 2-hidroxipropila com ácido caprílico via N435 em 67 % hexano/ TBME à t.a; 83 % de conversão. Expansão na região do tempo de retenção do substrato, mostrando os picos dos regioisômeros do monocaprilato de 1,2-propanodiol (9,2 e 9,3 min.) e do substrato (9,1 min.).

Mediante análise por CG/ MS, pôde-se relacionar os dois picos próximos ao substrato com os regioisômeros caprilato de 2-hidroxipropila e caprilato de 1-hidroxipropila (ilustrados no **esquema 33**), ao se comparar com o padrão de fragmentação com o de uma amostra contendo esses dois regioisômeros. Esta amostra foi proveniente de tentativas não exitosas de síntese regiosseletiva do caprilato de 2-hidroxipropila, em que se obtiveram ambos regioisômeros. Cogita-se que a presença dessas substâncias possa ser proveniente de reação de acidólise do substrato mediada pela lipase. Este tipo de reação pode ser catalisada por lipases e consiste na troca das cadeias acílicas entre um ácido e um éster, como por exemplo, um ácido graxo e o substrato estudado. Neste caso, o destaque, sob o ponto de vista químico, desse tipo de reação configura-se na função de nucleófilo desempenhada pelo ácido carboxílico, o que não é algo usual.

Na região do cromatograma próximo ao tempo de retenção do produto esperado para esta reação (benzoato de 2-capriloiloxipropila), pôde-se observar também a presença de outro pico com intensidade semelhante, em 16,4 minutos (**Figura 25**). Mediante análise de CG/ MS e comparação com o padrão sintético do caprilato de 2-capriloiloxipropila, relacionou-se esse pico com esta substância.

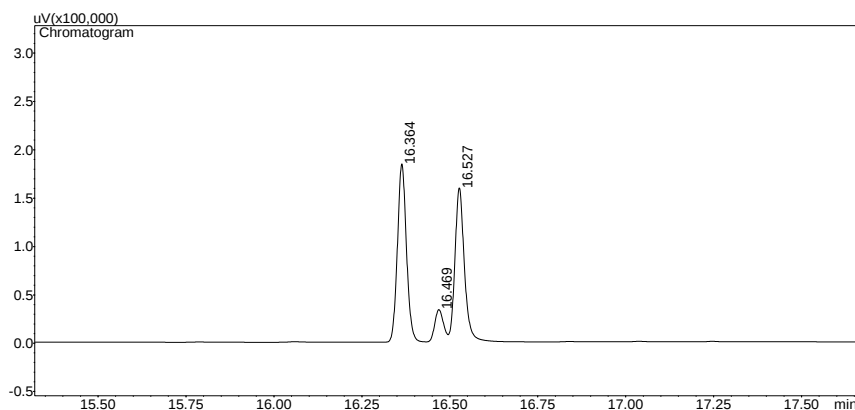


Figura 25: Expansão do cromatograma da reação de esterificação do benzoato de 2-hidroxipropila com ácido caprílico via N435 em 67 % hexano/ TBME à t.a; 83 % de conversão. Expansão na região do tempo de retenção do produto, mostrando o pico referente ao capriloato de 2-capriloiloxipropila (16,4 min.).

Com o valor de conversão de 83 %, a reação foi interrompida. Após purificação do substrato, analisou-se seu excesso enantiomérico (**Figura 26**) (**seções 5.4 e 5.5**). Observa-se que o ee_s é moderado (50 %), mesmo com alta conversão. O E calculado, de acordo com a **equação 1**, foi de 1,8, sendo semelhante ao da esterificação com ácido oléico.

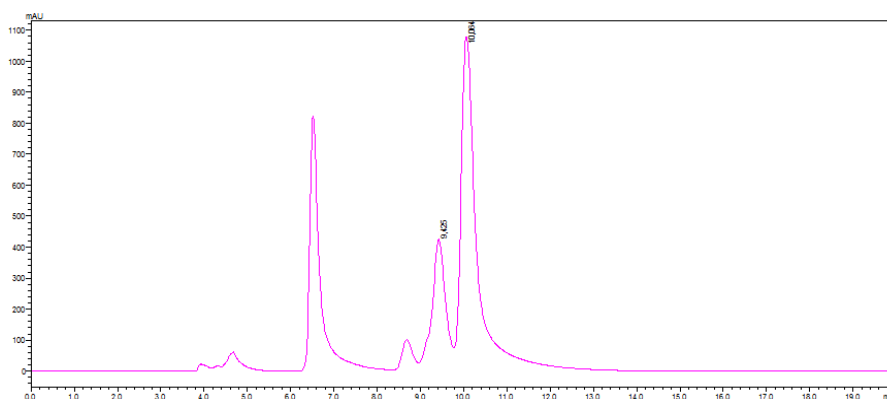


Figura 26: Cromatograma do substrato remanescente da esterificação com ácido caprílico (coluna chiralpak AD-H; fluxo 0,8 mL/ min; 10 % *i*-PrOH/Hexano; 232 nm); 83 % de conversão; 50 % de ee_s .

Cogita-se que a dificuldade para se conseguir alto ee_s , mesmo com alta conversão, possa ser causada pela reversibilidade da reação de esterificação. Buscou-se evitar tal fenômeno por meio do uso de excesso de ácido graxo, entretanto, esta estratégia não foi eficiente.

6.5.3 Screening de transesterificação com acetato de vinila

Considerando-se os baixos valores de excesso enantiomérico do substrato obtidos nas reações esterificação com os ácidos oléico e caprílico, estudou-se utilizar o acetato de vinila, um éster enólico, como doador de acila na resolução cinética do benzoato de 2-hidroxiopropila. Destaca-se que, na literatura, foi descrito o emprego de benzoato de vinila na transesterificação do benzoato de 2-hidroxiopropila catalisada pela lipase MML (*Mucor miehei*), em diferentes solventes. Observou-se uma cinética mais rápida na presença de hexano, obtendo-se o substrato remanescente com *ee* de 88 %, em 62 % de conversão (4 horas de reação), ao passo que com solventes mais polares, como tetraidrofurano e clorofórmio, as conversões foram mais baixas (menores que 30 %) após 168 horas de reação (CIUFFREDA et al, 2003).

Inicialmente, foi feito um *screening* (seção 9.2) da reação de transesterificação com acetato de vinila catalisada pelas lipases comerciais N435, TLIM e RMIM. Foram utilizados 5 mg de substrato e 0,013 mL de acetato de vinila (5 eq.) em hexano (1,0 mL) à t.a. A proporção de massa de lipase em relação à massa de substrato foi de 3:1. As reações foram monitoradas por CCF e analisadas por CG, após filtração das enzimas, comparando-se o cromatograma com o padrão sintético do produto esperado (seção 9.1).

Mediante os resultados de *screening* de transesterificação do benzoato de 2-hidroxiopropila, pôde-se observar que a reação catalisada pela lipase N435 apresentou cinética mais rápida, com conversão total do substrato em 24 horas, com aparecimento de um pico em 10,6 minutos, referente ao benzoato de acetoxiopropila (Figura 27). Em contrapartida, com as lipases TLIM e RMIM, observou-se baixa conversão. Diante disso, optou-se por utilizar somente a lipase N435 em estudos posteriores em maior escala, visando-se calcular a conversão e a obtenção de dados referentes à enantiosseletividade da reação.

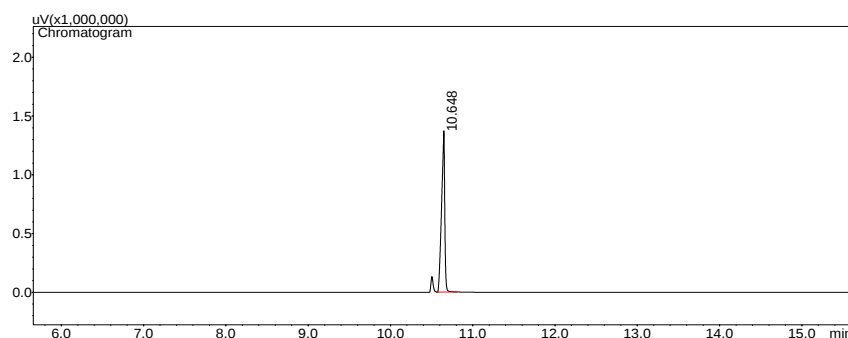
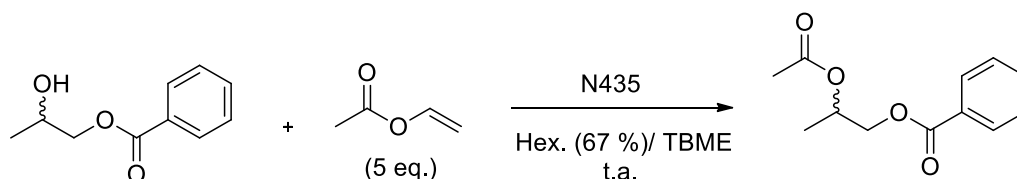


Figura 27: Cromatograma da transesterificação do benzoato de 2-hidroxiopropila com acetato de vinila catalisada por N435. Benzoato de 2-acetoxiopropila (10,6 min.).

6.5.4 Cinéticas de transesterificação com acetato de vinila

Com a finalidade de se calcular a conversão, as reações de transesterificação com acetato de vinila (**Esquema 42**) foram realizadas em escala maior. As cinéticas e o cálculo de conversão foram realizados de acordo com o descrito na **seção 5.3**. Buscou-se atingir valores de conversão acima de 50 %, na tentativa de se obterem altos valores de ee_s .



Esquema 42: Transesterificação do benzoato de 2-hidroxipropila com acetato de vinila.

Inicialmente, utilizou-se a lipase N435, com uma proporção de 3:1 m/m em relação ao substrato. Nessas condições, observou-se um rápido consumo do substrato. Em 20 minutos de reação, atingiu-se 70 % de conversão. A reação foi interrompida neste tempo, para análise do ee_s , após purificação do substrato por cromatografia em coluna.

Mediante análise do cromatograma (**Figura 28**), pôde-se observar que o substrato remanescente apresentou alto valor de ee (97 %). Apesar do alto valor de excesso, a enantiosseletividade não foi alta, obtendo-se um valor de E de 9,1. Com isso, ilustra-se que, mesmo que o valor de E não seja tão alto, pode-se conseguir alto ee_s , através de maiores conversões (> 50 %). Ademais, curiosamente, o enantiômero enriquecido é o oposto ao das reações de esterificação realizadas anteriormente (**Figuras 23 e 26**).

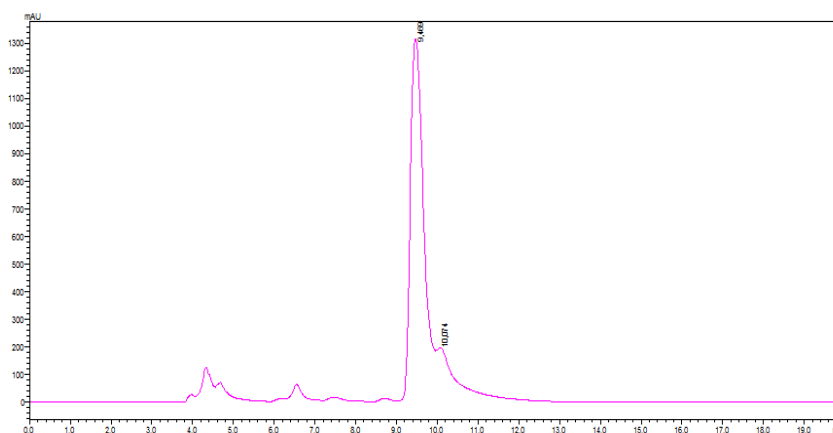


Figura 28: Cromatograma do substrato remanescente da transesterificação com acetato de vinila (coluna chiralpak AD-H; fluxo 0,8 mL/ min; 10 % *i*-PrOH/Hexano). 70 % de conversão; 97 % de ee_s .

Tendo-se em vista que a cinética de conversão foi rápida, vislumbrou-se a viabilidade de se empregar menor carga de lipase. Reduziu-se, portanto, seu valor para um valor de 25 % em relação à massa do substrato. Os valores de conversão encontram-se no **quadro 9**.

Quadro 9: Conversão conforme o tempo da reação do benzoato de 2-hidroxipropila com acetato de vinila (5 eq.), à t.a, com 25 % m/m de N435.

Tempo	10 min.	20 min.	40 min.	70 min.	80 min.
Conversão	24 %	37 %	59 %	65 %	66 %

Os cromatogramas referentes aos tempos inicial e final dessa cinética encontram-se na **seção 9.2.8**. Nota-se que, acima de 50 % de conversão, o consumo de substrato torna-se aparentemente mais lento, o que poderia ser um indício de uma melhor enantiosseletividade. A fim de se averiguá-la, a reação foi interrompida com 66 % de conversão, para análise do ee_s , sendo seu valor calculado em 93 % (**seções 5.4 e 5.5**). Com isso, conclui-se que mesmo reduzindo-se a carga de lipase utilizada não interferiu na enantiosseletividade ($E = 8,9$).

Considerando-se o maior valor de ee_s obtido com este tipo de reação, realizou-se medida de rotação específica, uma vez que dados polarimétricos do (*R*)-benzoato de 2-hidroxipropila são disponíveis ($[\alpha]^{25}_D$: $-11,5^\circ$ (c. 0,041, CHCl_3)) (CIUFFREDA et al, 2003). Este estudo foi conduzido a fim de se concluir a respeito da configuração do estereocentro (*R* ou *S*), por meio do sentido de desvio da luz plano polarizada e não com o intuito de se calcular a pureza óptica. O resultado forneceu um indicativo de que a configuração do substrato remanescente enriquecido é *S*, devido ao sinal oposto de rotação ($[\alpha]^{25}_D$: $7,1^\circ$ (c. 0,01, CHCl_3)). Com isso, conclui-se que a configuração do substrato remanescente enriquecido nas reações de esterificação (**seção 6.5.2**) é *R*.

Os substratos remanescentes com ee_s de 93 % e 96 % foram convertidos a carbonato de propileno, segundo a **seção 5.5**.

6.5.5 Screening de alcóxicarbonilação com carbonato de dimetila (DMC)

O uso de carbonatos orgânicos para fins de resolução cinética enzimática de alcoóis e aminas é mais escasso na literatura. Alguns exemplos podem ser encontrados, utilizando-se lipases como catalisadores de reações de alcóxicarbonilação (POZO; GOTOR, 1993, 1995; GONZALO et al., 2003).

Nesse contexto, vislumbrou-se a possibilidade de se utilizar o carbonato de dimetila, com o intuito de se conseguir a resolução cinética do benzoato de 2-hidroxipropila catalisada por lipases.

Inicialmente foram realizados *screenings* (seção 5.2) com as lipases N435, RMIM e TLIM, a fim de se avaliar qualitativamente a conversão. Empregou-se 5 mg de substrato, 15 mg das referidas lipases e 1,0 mL de meio reacional (10 % de DMC em hexano), à t.a.

Observou-se que, somente com a lipase N435, houve consumo do substrato. Ao término de 24 horas, houve conversão quase completa, observando-se, via CG, um pico com alta intensidade no cromatograma referente à reação com esta enzima (**Figura 29**). Curiosamente, este pico, mediante análise de CG/ MS, foi relacionado ao benzoato de metila.

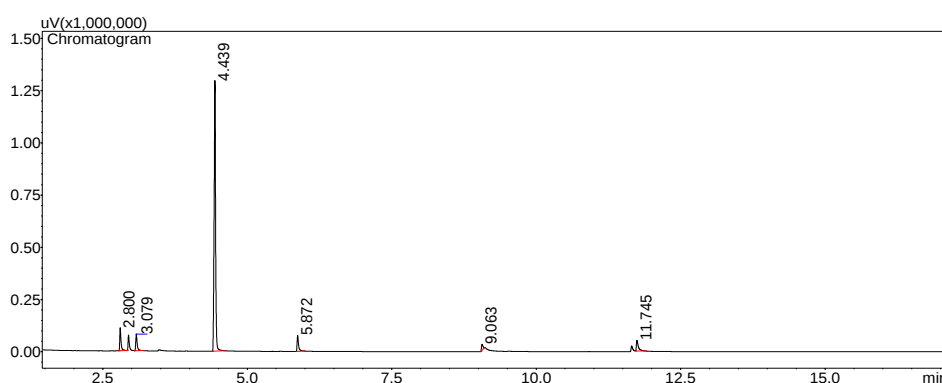
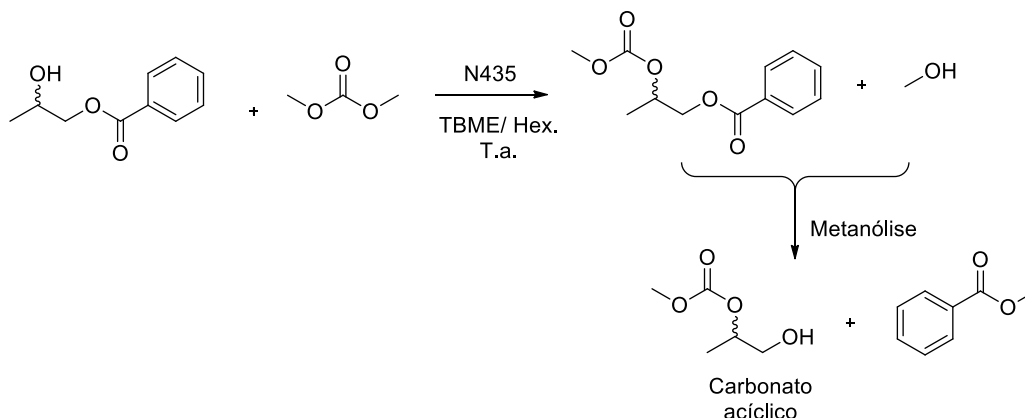


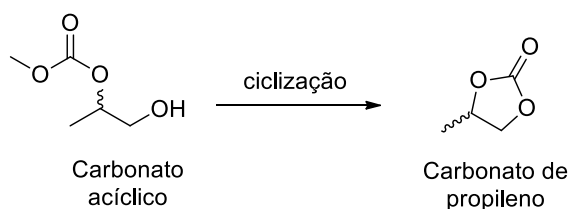
Figura 29: Cromatograma da alcoxycarbonilação do benzoato de 2-hidroxipropila com DMC catalisada por N435, à t.a.; 24 h. Benzoato de metila (4,44 min.); benzoato de 2-hidroxipropila (9,06 min.); carbonato de propileno (3,08 min.).

Esse resultado, à primeira vista, imprevisto, por conta de não se esperar esse éster, como produto dessa reação, encontrou explicação pelo fato de, a cada alcoxycarbonilação do substrato, ser liberado metanol. Este, por sua vez, devido a uma reação de alcoólise do produto alcoxycarbonilado ou do próprio substrato, catalisada pela lipase, libera o benzoato de metila (**Esquema 43**).



Esquema 43: Hipótese mais provável de formação de benzoato de metila a partir da reação de alcoxycarbonilação do benzoato de 2-hidroxipropila.

Ademais, outro dado curioso foi o aparecimento de 3 picos entre 2,80 e 3,08 min. (**Figura 29**), sendo o de menor intensidade, em 3,08 min., referente ao carbonato de propileno, conforme o padrão de fragmentação, obtido com o auxílio de CG/ MS. Esta observação vem a corroborar com a hipótese supracitada, tendo-se em vista a possibilidade de, após a metanólise, ocorrer uma ciclização do carbonato acíclico do **esquema 43**, levando à formação do carbonato de propileno (**Esquema 44**).



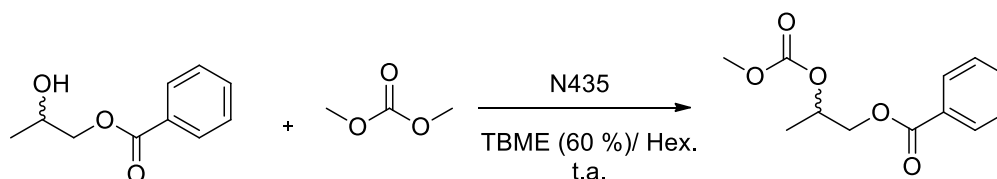
Esquema 44: Hipótese de formação do carbonato de propileno a partir do carbonato acíclico.

Devido a isso, supostamente a detecção do produto direto da reação de alcoxycarbonilação estudada, o carbonato acíclico, dos esquemas **43** e **44**, é mais intensa mais cedo durante esta reação, o que foi investigado na próxima seção.

6.5.6 Cinética de alcoxycarbonilação com carbonato de dimetila (DMC)

A reação do benzoato de 2-hidroxipropila com DMC foi realizada em maior escala, a fim de se avaliar sua conversão e melhor caracterização dos produtos de reação. As cinéticas e o cálculo de conversão foram realizados conforme descrito na **seção 5.3**. Utilizou-se a lipase

N435 na proporção de 3:1 m/m em relação ao substrato. O carbonato de dimetila foi empregado como co-solvente, na proporção de 17 % (53 eq.) (**Esquema 45**).



Esquema 45: Alcoxycarbonilação do benzoato de 2-hidroxipropila com DMC.

Mediante análise dos cromatogramas eferentes ao tempo inicial e final da reação (**seção 9.2.9**), pôde-se observar o rápido consumo do substrato, conforme o **quadro 10**.

Quadro 10: Conversão conforme o tempo da reação do benzoato de 2-hidroxipropila com DMC (53 eq.), à t.a, com massa de N435/massa de substrato = 3.

Tempo	2 h	4 h
Conversão	66 %	77 %

Assim como suposto pelo resultado de *screening* dessa reação, a formação do produto esperado, o carbonato acíclico (benzoato de 2-metoxycarboniloxipropila) se dá em eventos iniciais da reação, apresentando tempo de retenção próximo a 12 minutos. Como o cromatograma referente a esta reação apresentou outros picos, optou-se por melhor elucidar este produto esperado, por meio de sua purificação por cromatografia em coluna e análise por RMN de ¹H (**seção 9.3**).

Mais de 50 % do substrato foi consumido em 4 horas, sem que o pico do benzoato de metila fosse o de maior intensidade no cromatograma (**seção 9.2.9**). O substrato remanescente correspondente à conversão de 77%, foi purificado por cromatografia em coluna, sendo o *ee*_s calculado em 59 %. Assim como na reação de transesterificação com acetato de vinila (**seção 6.5.4**), pode-se observar que a configuração do substrato remanescente enriquecido é *S*. Entretanto, este enantioenriquecimento é menor, mesmo com maior conversão (**Figura 30**). O *E* calculado foi de 2,4, sendo levemente maior que nas reações de esterificação.

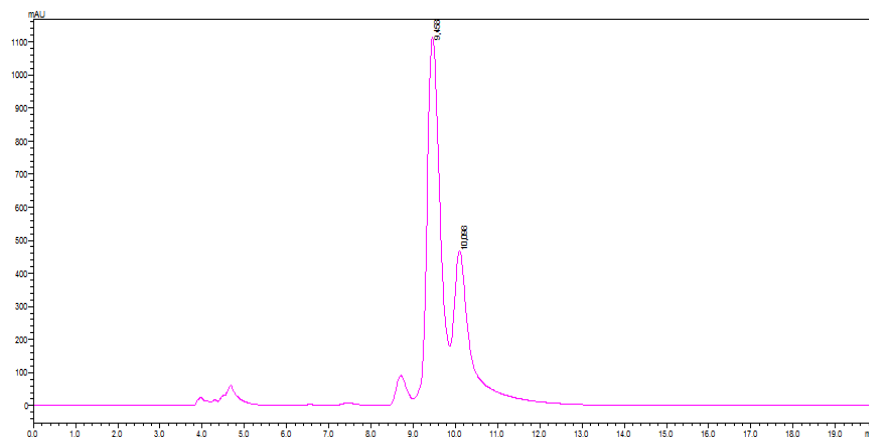


Figura 30: Cromatograma do substrato remanescente da reação de alcoxicarbonilação (coluna AD-H; fluxo 0,8 mL/ min; 10 % *i*-PrOH/Hexano; 232 nm). 77 % de conversão; 59 % de *ee*_s.

Aumentando-se o tempo de reação, para 24 horas (90 % de conversão), obteve-se um cromatograma semelhante ao de *screening* (**Figura 29**), podendo-se observar a diminuição da intensidade do pico do produto alcoxicarbonilado, em 12 minutos, e aumento do pico do benzoato de metila, em 4,5 minutos, além da presença do pico referente ao carbonato de propileno. Uma vez que esta é a substância alvo do trabalho, procurou-se melhor caracterizá-la, vislumbrando-se sua eventual purificação, uma vez que a reação foi feita em maior escala.

Valendo-se do caráter hidrofílico do carbonato de propileno, realizou-se simples procedimento de extração do meio reacional com água. Posteriormente, procedeu-se com *salting-out* da fase aquosa com sulfato de sódio anidro e nova extração com acetato de etila para particionar o carbonato para o solvente orgânico.

Paralelamente, comparou-se esse protocolo com o de purificação por cromatografia em coluna. O produto obtido de ambos os procedimentos foi analisado por CG e por RMN de ¹H, obtendo-se perfil semelhante de resultados. Puderam ser percebidas impurezas nas amostras, evidenciado também por CG (**Figura 31**), dificultando a obtenção de um espectro de RMN mais característico do carbonato de propileno. Salienta-se, também, que o fato de o mesmo ser gerado com subproduto de reação causa um empecilho adicional, devido à pouca massa gerada durante o processo.

Mesmo que o valor de conversão para o substrato tenha sido alto (90 %), o que impediria que produtos de resolução cinética fossem obtidos com alto excesso enantiomérico, cogita-se que o carbonato de propileno, por não ser um produto direto da reação, possa ainda apresentar enantioenriquecimento. Isto, se a etapa que leve a sua formação, como a da hipótese ilustrada no **esquema 44**, for catalisada pela lipase.

Alternativamente ao ilustrado no **esquema 43**, o carbonato de propileno poderia ser formado por metanólise do substrato, gerando o 1,2-propanodiol, seguida da reação deste com DMC. Neste caso, haveria competição entre a reação de alcóxicarbonilação e a de metanólise pelo consumo de substrato. Entretanto, acredita-se que esta hipótese seja menos provável, pelo fato de haver rápida formação do carbonato acíclico logo nas primeiras horas de reação, e, posteriormente, consumo do mesmo, com pouca detecção desta substância após 24 horas, e, em contrapartida, aumento da detecção do carbonato de propileno.

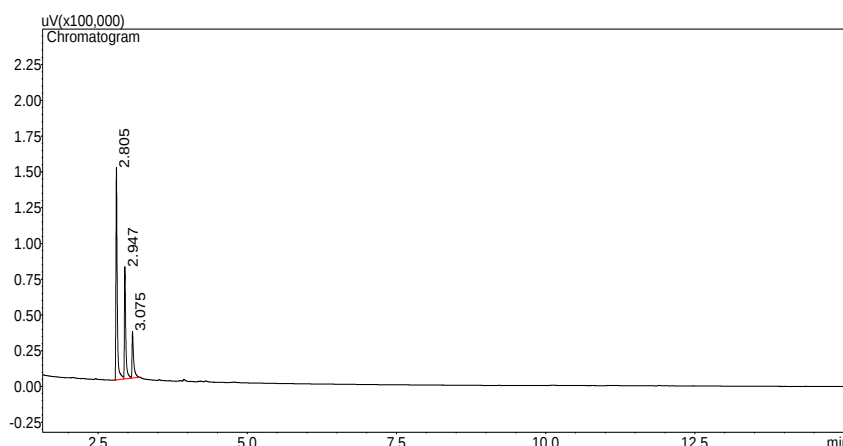
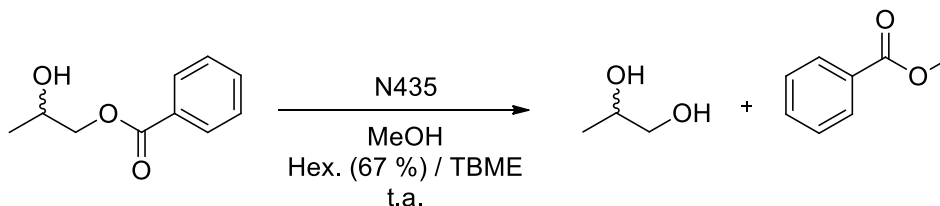


Figura 31: Cromatograma da fração obtida por coluna cromatográfica contendo o carbonato de propileno (pico de menor intensidade, em 3,08 min.).

6.5.7 Cinética de Metanólise

Considerando-se a característica eletrofílica apresentada pelo substrato, devido à presença do grupo éster primário, avaliou-se a possibilidade de serem testadas reações de alcoólise em resoluções cinéticas. Com isso, ao invés de explorar a hidroxila secundária do substrato, a qual é ligada ao carbono assimétrico, como vinha sido feito, buscou-se estudar a enantiosseletividade de reações que possuem como alvo um sítio remoto ao estereocentro, como as alcoólises.

Estudou-se a metanólise benzoato de 2-hidroxipropila, empregando-se a lipase N435 (**Esquema 46**) na proporção de 3:1 m/m em relação ao substrato, enquanto o metanol foi utilizado com excesso de 11 equivalentes. As cinéticas e o cálculo de conversão foram realizados de acordo com o descrito na **seção 5.3**.



Esquema 46: Metanólise do benzoato de 2-hidroxipropila

Os valores de conversão ao longo do tempo de reação são descritos no **quadro 11**. Pôde-se observar que ao se comparar com os derivados 1-*O*-acilados de ácidos graxos do 1,2-propanodiol, o consumo do benzoato de 2-hidroxipropila foi nitidamente mais lento, mesmo com o triplo de massa de lipase em relação a de substrato. Os cromatogramas referentes aos tempos inicial e final da reação encontram-se na **seção 9.2.10**.

Quadro 11: Conversão conforme o tempo da reação do benzoato de 2-hidroxipropila com metanol (11 eq.), à t.a, com massa de N435/massa de substrato = 3.

Tempo	14 h	25 h	30 h	48 h
Conversão	43 %	64 %	70 %	75 %

O substrato remanescente da reações com conversão de 43 % e 75 % foram submetidos à análise de excesso enantiomérico (**seção 5.4**). Observou-se enantioenriquecimento considerável somente com o maior valor de conversão (80 % de ee_s) (**Figura 32**). Entretanto, o E calculado, de acordo com a **equação 1**, foi de 3,8, sendo representativo de baixa enantiosseletividade.

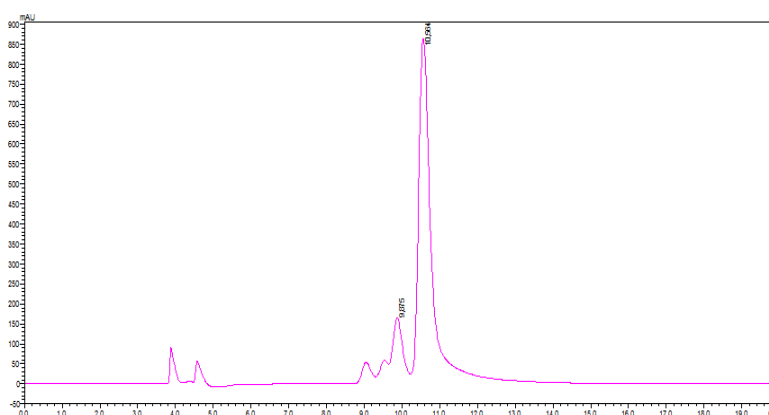


Figura 32: Cromatograma do substrato remanescente de metanólise (coluna Chiralpack AD-H; fluxo 0,8 mL/ min; 10 % *i*-PrOH/Hexano; 232 nm). 75 % de conversão; 80 % de ee_s .

Considerando-se o maior valor de ee_s obtido, realizou-se medida de rotação específica, assim como feito na seção 6.5.4. O resultado forneceu um indicativo de que a configuração do substrato remanescente enriquecido é *R*, devido ao sinal de rotação ($[\alpha]^{25}_D$: - 5,6 ° (c. 0,01, CHCl_3)). O substrato remanescente com ee_s de 80 % foi convertido a carbonato de propileno, segundo a derivatização descrita na seção 5.5.

6.6 Resolução enzimática do *p*-anisoato de 2-hidroxiopropila via lipases

Considerando-se as reações de metanólise e transesterificação com acetato de vinila como as que forneceram os melhores resultados mais promissores obtidos com o benzoato de 2-hidroxiopropila, vislumbrou-se a possibilidade de estudá-las empregando-se o *p*-anisoato de 2-hidroxiopropila, como substrato para a lipase N435.

Assim como os benzoato de 2-hidroxiopropila, a separação dos enantiômeros do anisoato de 2-hidroxiopropila também foi conseguida com o uso da coluna quiral chirapak AD-H (**Figura 33**). Obteve-se uma melhor resolução, visto que foi observada melhor separação das bandas referentes a cada enantiômero.

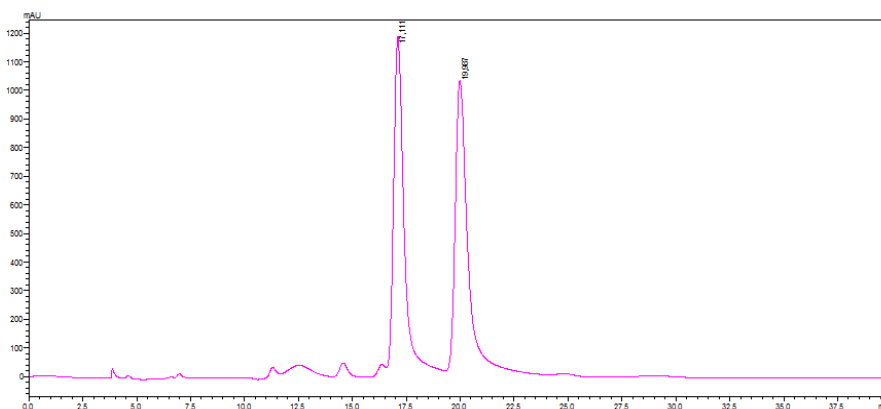
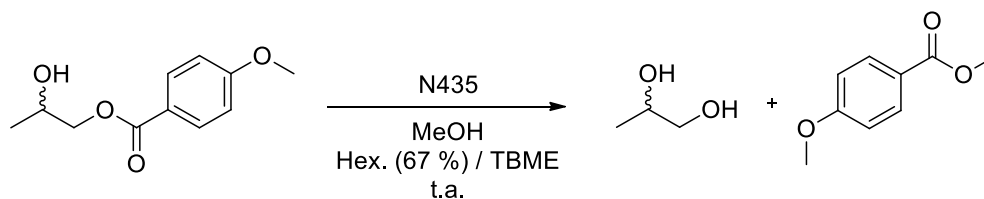


Figura 33: Cromatograma do *p*-anisoato de 2-hidroxiopropila racêmico em coluna quiral (Chiralpak AD-H). Fluxo: 0,8 mL min. (10 % *i*-PrOH/ hexano); 252 nm.

6.6.1 Cinética de Metanólise

Para estas reações (**Esquema 47**), optou-se por permanecer com a lipase N435 na proporção de 3:1 m/m em relação ao substrato e o metanol (11 eq.), a título de comparação com a reação com o benzoato de 2-hidroxiopropila. As cinéticas e o cálculo de conversão foram realizados de acordo com o descrito na seção 5.3.



Esquema 47: Metanólise do *p*-anisoato de 2-hidroxipropila

Os valores de conversão ao longo do tempo de reação são descritos no **quadro 12**.

Quadro 12: Conversão conforme o tempo da reação do *p*-anisoato de 2-hidroxipropila com metanol (11 eq.), à t.a, com massa de N435/massa de substrato = 3.

Tempo	28 h	48 h	72 h	96 h
Conversão	15 %	25 %	30 %	50 %

Comparando-se com a metanólise do benzoato de 2-hidroxipropila, pôde-se observar que a conversão ao longo do tempo foi nitidamente mais lenta. Este resultado pode ser advindo de uma reatividade mais baixa do próprio substrato para esse tipo de reação ou por uma diferença de interação com a lipase. A justificativa para a primeira hipótese consiste no efeito de doação do par de elétrons do oxigênio do grupo metóxi ao anel aromático, levando à desativação do substrato para esse tipo de reação.

O ee_s correspondente à conversão de 50 % foi de 33 % (**Figura 34**), fornecendo um valor de E de 2,7, de acordo com a **equação 1**. Possivelmente haveria um enantioenriquecimento, com maiores valores de conversão, entretanto não se prosseguiu com a reação, tendo-se em vista a cinética lenta, mesmo com o triplo de massa de lipase em relação ao substrato.

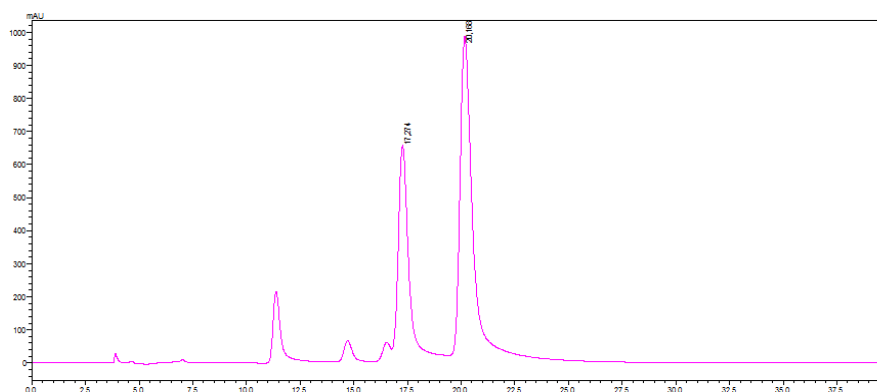
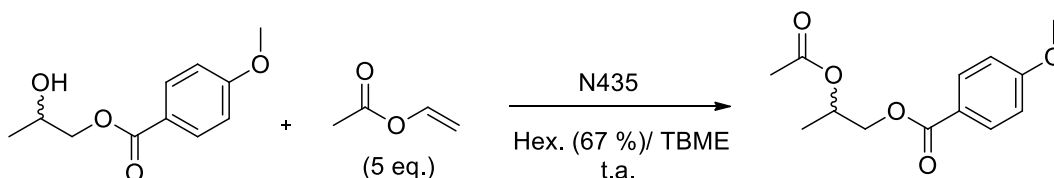


Figura 34: Cromatograma do substrato remanescente de metanólise (coluna Chiralpak AD-H; fluxo 0,8 mL/ min; 10 % *i*-PrOH/Hexano; 252 nm). 50 % de conversão; 33 % de ee_s .

O substrato remanescente com ee_s de 33 % foi convertido a carbonato de propileno, segundo a derivatização descrita na **seção 5.5**, a fim de se determinar a configuração do estereocentro do substrato enriquecido.

6.6.2 Cinética de Transesterificação com acetato de vinila

Para estas reações (**Esquema 48**), optou-se por permanecer com a lipase N435 na proporção de 25 % m/m em relação ao substrato e o acetato de vinila (5 eq.), a título de comparação com a reação com o benzoato de 2-hidroxipropila. As cinéticas e o cálculo de conversão foram realizados de acordo com o descrito na **seção 5.3**.



Esquema 48: Transesterificação do *p*-anisoato de 2-hidroxipropila com acetato de vinila.

Os valores de conversão ao longo do tempo de reação são descritos no **quadro 13**.

Quadro 13: Conversão conforme o tempo da reação do *p*-anisoato de 2-hidroxipropila com acetato de vinila (5 eq.), à t.a, com massa de N435/massa de substrato = 3.

Tempo	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
Conversão	26 %	46 %	54 %	59 %

Analisando-se o **quadro 13**, observa-se que após 50 % de conversão, são necessários intervalos mais longos de tempo para se aumentar o consumo do substrato. Ilustra-se isto pelo fato de ter ocorrido variação de 5 % no valor de conversão entre 90 e 120 minutos, ao passo que nos 30 minutos iniciais, esse foi de 26 %. Esta diferença poderia ser um indicativo de melhor enantiosseletividade.

Analisando-se o ee_s , calculou-se o seu valor em 84 % (**Figura 35**), correspondente à conversão de 59 %. O valor de E calculado, de acordo com a **equação 1**, foi de 9,6. Comparando-se com a transesterificação do benzoato de 2-hidroxipropila (**seção 6.5.4**), observa-se um maior valor de E , mesmo que a diferença seja pequena.

Assim como ocorrido com o benzoato de 2-hidroxipropila, ao se comparar as reações de metanólise e transesterificação, conclui-se que estas apresentam enantiodireção oposta.

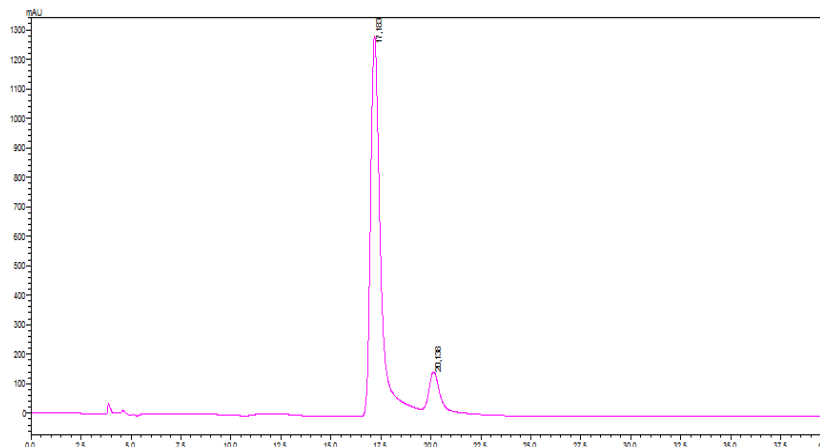


Figura 35: Cromatograma do substrato remanescente de transesterificação com acetato de vinila (coluna Chiralpak AD-H; fluxo 0,8 mL/ min; 10 % *i*-PrOH/Hexano; 252 nm). 59 % de conversão; 84 % de ee_s .

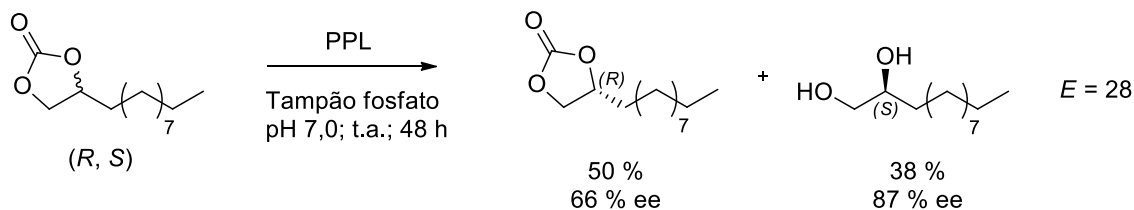
O substrato remanescente com ee_s de 84 % foi convertido a carbonato de propileno, segundo a derivatização descrita na **seção 5.5**, a fim se determinar a configuração do estereocentro do enantiômero enriquecido.

6.7 Resolução enzimática do carbonato de propileno via lipases

Conforme explicitado na estratégia 2 (**seção 4.2**), a resolução cinética via lipases do carbonato de propileno racêmico se configuraria na maneira mais rápida de o objetivo deste trabalho ser alcançado, contanto que fossem observadas altas enantiosseletividades.

Carbonatos cíclicos orgânicos já foram descritos, na literatura, como substratos de biocatalisadores, em reações de hidrólise. Dentre estes, enzimas isoladas, como lipases, especificamente, a lipase de pâncreas de porco - PPL (KAWASHIMA et al, 1993; MATSUMOTO et al, 1995, 1996a,b, 1997, 2002) e esterases, como a esterase de fígado de porco - PLE (BARTON; PAGE, 1992), assim como microorganismos (células inteiras) (MATSUMOTO et al, 2000; NOGAWA et al, 2006; CHANG et al, 2010).

Em estudos iniciais, já foi observado que, no caso de carbonatos cíclicos monossustituídos, tal como o carbonato de propileno, a enantiosseletividade de reações de hidrólise é maior conforme a cadeia alquílica do substituinte aumenta. Até certo número de carbonos (10), atinge-se E máximo de 28 (**Esquema 49**), decrescendo ao se ultrapassá-lo (KAWASHIMA et al, 1993).



Esquema 49: Hidrólise de carbonato cíclico via PPL (KAWASHIMA et al, 1993).

Além disso, reportou-se, também, que o acréscimo de co-solventes ao meio aquoso possui a capacidade de aumentar tanto a conversão da reação de hidrólise de carbonatos cíclicos, como sua enantiosseletividade. De modo interessante, esse efeito foi maior com a adição de éter isopropílico, que é parcialmente miscível em água, na proporção de 10 % v/ v. (MATSUMOTO et al, 1995, 1996a,b).

No caso do carbonato de propileno, há escassez de artigos científicos relatando seu uso como substrato de enzimas, como o de Yang e colaboradores (1998). Entretanto, não houve conclusão a respeito da enantiosseletividade da reação.

Nesse sentido, foram testadas diferentes lipases imobilizadas (N435, RMIM e TLIM) e liofilizadas (A-Amano e PS), em reações de alcoólise, tendo-se como substrato o carbonato de propileno. Os *screenings* (seção 5.2) foram realizados com 5 μ L de substrato e 30 mg de lipases, em 2 mL de meio, de acordo com as condições expostas no **quadro 14**. As reações foram acompanhadas por CCF.

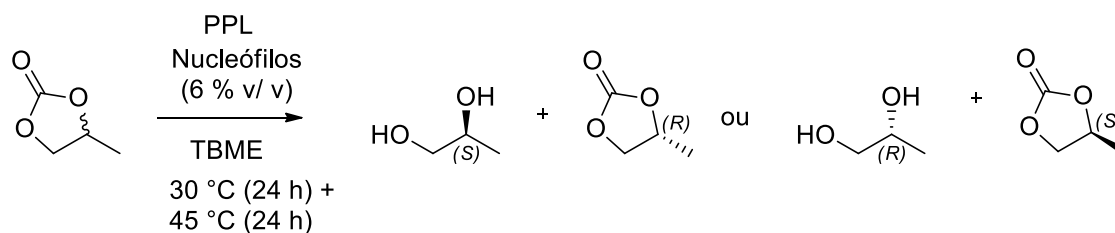
Quadro 14: Condições testadas de alcoólise do carbonato de propileno via lipases.

Nucleófilo	Concentração (v/v)	Solvente	Temperatura e tempo
EtOH	0,5 %	TBME	30 °C (24 h) + 40 °C (24 h)
	1%	AcOEt	30 °C (48 h)
		THF	30 °C (24 h) + 40 °C (24 h)
	25 %	Hexano	30 °C (24 h) + 40 °C (24 h)
<i>t</i> -BuOH	25 %	Hexano	30 °C (24 h) + 40 °C (24 h) + 45 °C (24 h)
BnOH	6 %	TBME	30 °C (24 h) + 40 °C (24 h)
OctOH	6 %	TBME	30 °C (24 h) + 40 °C (24 h)

Foi feito um maior número de tentativas com o etanol como nucleófilo, no que se refere sua concentração no meio, assim como o solvente empregado. Em relação a este aspecto, buscou-se variar a polaridade do mesmo com o intuito de avaliar um possível efeito na conversão, utilizando-se solventes de baixa polaridade (hexano), média polaridade (TBME e THF) e alta polaridade (AcOEt). Entretanto, não foi observada formação de produto por CCF em nenhuma dessas condições.

Diante disso, procurou-se variar o nucleófilo álcool, com o intuito de avaliar o efeito do volume de sua cadeia carbônica. Portanto, utilizou-se o t-BuOH, um álcool terciário, e outros alcoóis primários com cadeias volumosas, como o álcool benzílico e o octanol. Porém, não houve detecção de produto por CCF.

Tendo-se em vista que a lipase de pâncreas de porco foi a única capaz de catalisar reações (de hidrólise) contendo, como substratos, carbonatos cíclicos orgânicos, foram realizados *screenings* específicos para avaliar esta lipase em alcoólises, de acordo com o **esquema 50**. Todavia, em nenhuma das reações foi observada formação de produto por CCF.



Nucleófilos: EtOH; t-BuOH; OctOH; BnOH; s-BuOH

Esquema 50: Reações de alcoólises testadas com o carbonato de propileno como substrato.

Diante da ausência de conversão do substrato nas reações de alcoólise, optou-se por estudar a hidrólise do carbonato de propileno. Diferentemente da literatura, empregou-se meio reacional contendo menor proporção, em volume de meio (TBME), de água (6 % v/ v). Utilizaram-se as mesmas lipases descritas anteriormente, inclusive a PPL. As reações foram conduzidas com 5 µL de substrato e 30 mg de lipases em 2,0 mL de meio. Após 24 h a 30 °C e 24 h a 40 °C. Não foi observada formação de propano-1,2-diol por CCF.

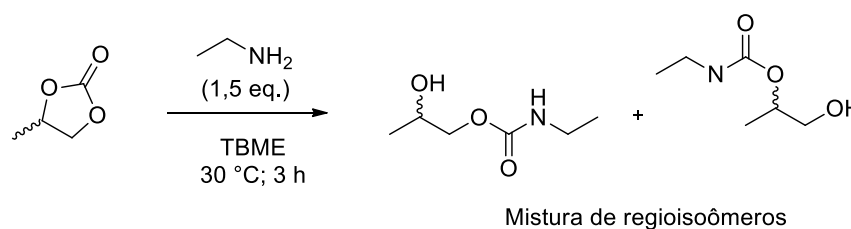
Na tentativa de aumentar a conversão, realizou-se a reação com a lipase mais promissora, PPL, em meio composto somente por água e com 20 % v/ v de TBME em água. Além disso, reduziu-se o volume de meio para 1,0 mL, mantendo-se a mesma quantidade de substrato (5 µL), porém diminuindo a massa de enzima utilizada para 3 vezes em relação a do

carbonato de propileno. Apesar disso, em 78 h de reação à temperatura ambiente, não foi detectada conversão por CCF.

Tendo-se em vista que as reações de alcoólise e hidrólise não reportaram formação de produto, avaliou-se a utilização de aminas como reagentes nucleofílicos para promoção da abertura do carbonato de propileno. Já é descrito na literatura que aminas são capazes de reagir com carbonatos, como o próprio carbonato de propileno, sem a presença de catalisadores, como ácidos de Lewis e organocatalisadores (BLAIN et al, 2014), o que seria um empecilho à estratégia vislumbrada.

Entretanto, mesmo assim, optou-se por estudar a viabilidade de se realizarem aminólises do carbonato de propileno via lipases, com a finalidade de resolvê-lo cineticamente. Foram testadas reações do carbonato de propileno com etilamina (amina primária) e dietilamina (amina secundária), para se checar a reatividade. Ao contrário do observado com alcoóis, ambas as aminas estudadas foram capazes de reagir com o carbonato de propileno, até mesmo, a dietilamina, que possui menor nucleofilicidade.

A título ilustrativo, na reação com etilamina (**Esquema 51**), a análise de RMN de ^1H , mostrou o desaparecimento dos sinais referentes ao carbonato de propileno e surgimento de sinais referentes aos regioisômeros do carbamato formado, ilustrados no **esquema 51**, principalmente sinais de prótons metílicos em 1,15 e 1,18 ppm (**Figura 36**).



Esquema 51: Aminólise do carbonato de propileno com etilamina.

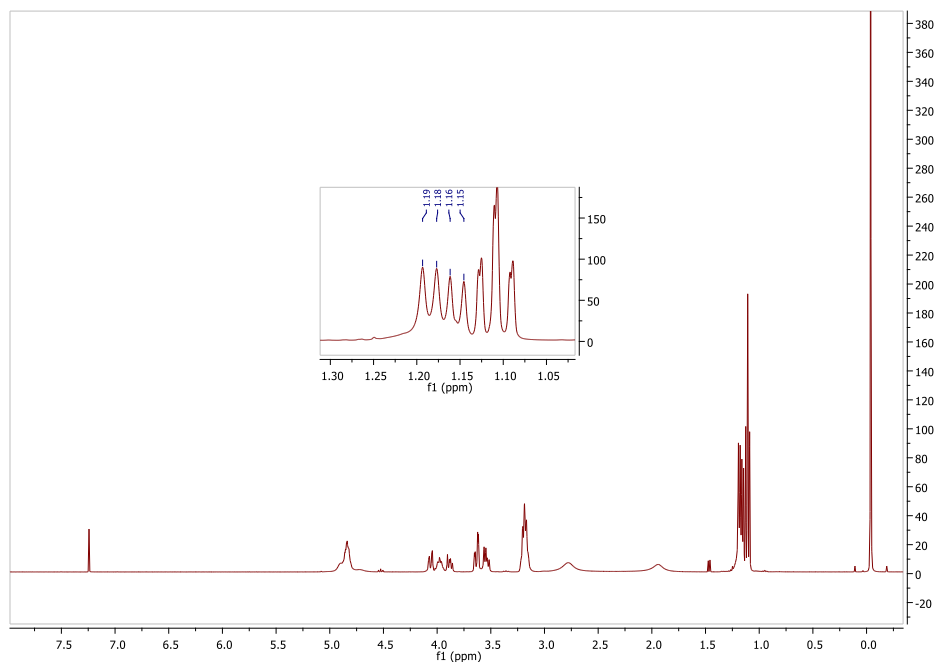


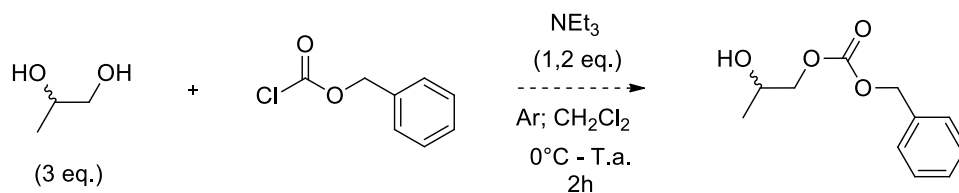
Figura 36: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do produto isolado do **Esquema 51**, mostrando sinais dos regioisômeros do carbamato formado.

Sendo assim, optou-se por não dar continuidade com esta estratégia, tendo-se em vista que ocorre abertura do carbonato de propileno (aminólise) sem necessidade de catálise. Com isso, mesmo que alguma lipase catalisasse esta reação, haveria prejuízo na obtenção de um *ee* fidedigno, caso a catálise fosse enantiosseletiva.

6.8 Resolução enzimática via lipases dos derivados obtidos de cloroformiatos

Considerando-se a estratégia 3 (**seção 4.3**), realizaram-se reações do 1,2-propanodiol com cloroformiatos comerciais, a fim de serem gerados carbonatos acíclicos como potenciais substratos para lipases. Foram utilizados os cloroformiatos de benzila e fenila e excesso de 1,2-PDO, com o intuito de promover o ataque regioseletivo da hidroxila primária do diol.

Na reação com cloroformiato de benzila (**Esquema 52**), mediante análise por CCF, pôde-se inferir a presença de carbonato de propileno como único produto de reação. A possível explicação para sua formação seria a ciclização intramolecular do produto direto da reação, o carbonato acíclico ilustrado no **esquema 52**. Dados de RMN de ^1H (**Figura 37**) corroboram com o observado, podendo-se identificar sinais referentes a esta substância, como os prótons metílicos (1,46 ppm), metilênicos diastereotópicos (3,99 e 4,52 ppm) e metínico (4,82 ppm).



Esquema 52: Reação do 1,2-propanodiol com cloroformato de benzila, na tentativa de se gerar o derivado carbonato acíclico de interesse.

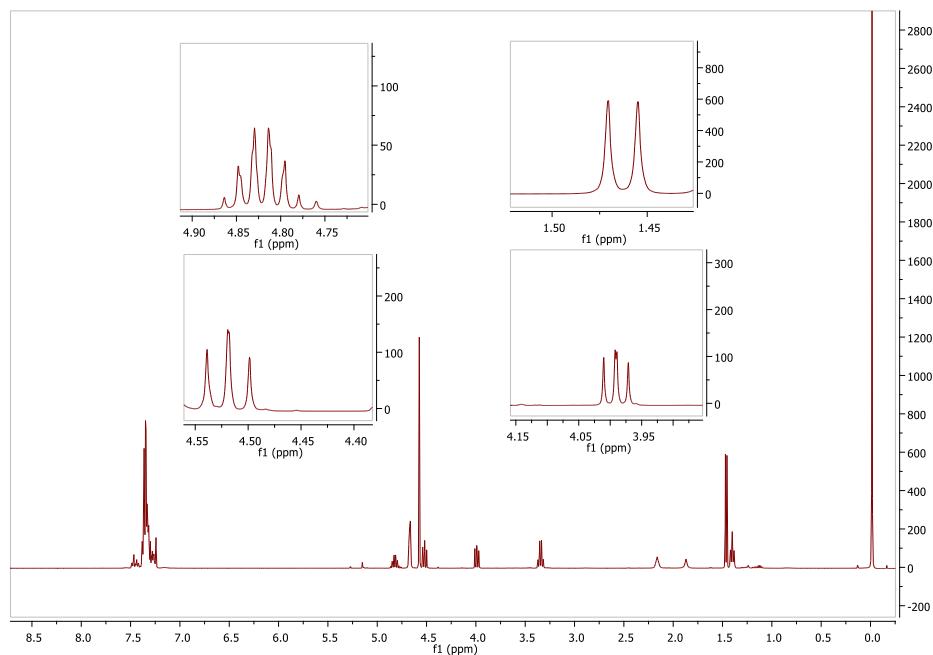
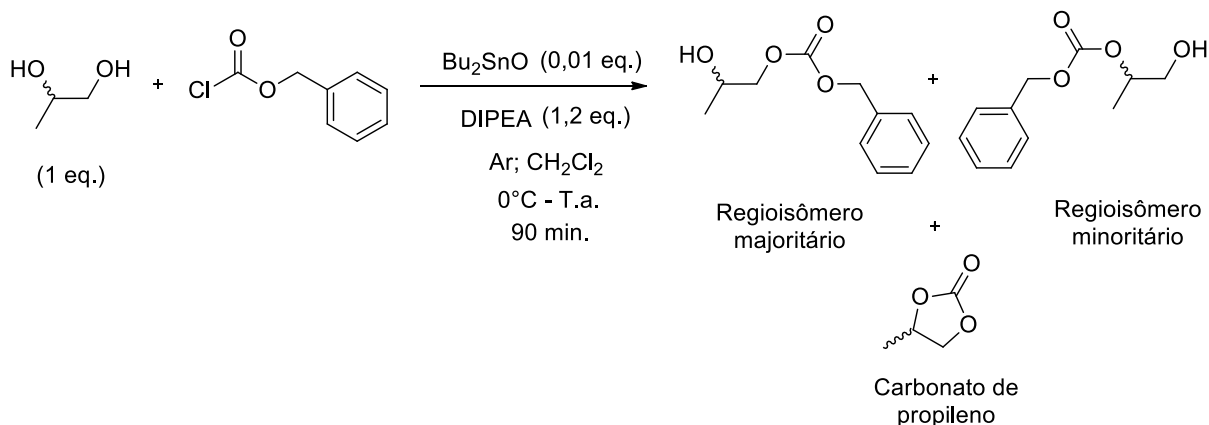


Figura 37: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do produto isolado do **esquema 52**, mostrando sinais do carbonato de propileno.

Na tentativa de sintetizar o carbonato acíclico, estudou-se a possibilidade de se adicionar ao meio o óxido de dibutilestanho (Bu_2SnO) em proporções catalíticas. Este é reportado na literatura como um catalisador para promoção de regioseletividade em reações de diversos dióis. Cogitou-se que seu uso poderia surtir efeito positivo. Além disso, optou-se por reduzir o tempo de permanência da reação à temperatura ambiente e trocar a trietilamina por uma base menos nucleofílica, como DIPEA.

Ao se realizar a reação ilustrada no **esquema 53**, pôde-se observar, por RMN de ^1H (**Figura 38**), a presença de sinais do carbonato acíclico, principalmente os sinais dos prótons metílicos da cadeia propílica. Entretanto, estes mesmos sinais acusam que houve formação de regioisômeros, sendo o primário o majoritário, em uma proporção calculada em 5:1. Além disso, pode-se identificar, também, os sinais dos prótons da metila do carbonato de propileno, que aparecem como mais desblindados (1,46 ppm) em relação aos das demais substâncias.

Salienta-se que, mantidas estas condições, mas sendo adicionando excesso de 3 equivalentes de 1,2-propanodiol, na presença de Bu_2SnO , ainda houve detecção do regioisômero minoritário e do carbonato de propileno.



Esquema 53: Reação do 1,2-propanodiol com cloroformiato de benzila, gerando os regioisômeros do carbonato acíclico esperado, além do carbonato de propileno.

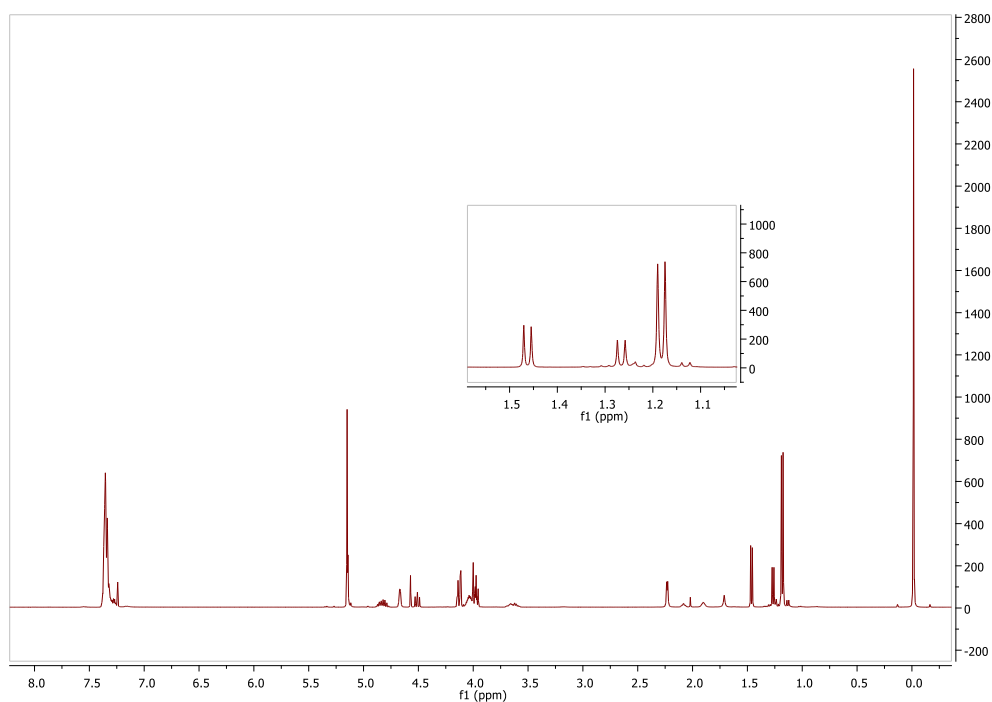


Figura 38: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do produto isolado do **esquema 53**, mostrando os sinais dos prótons metílicos dos regioisômeros do carbonato acíclico (1,18 e 1,27 ppm) e do carbonato de propileno (1,46 ppm).

O fato de ser gerado o carbonato de propileno demonstra uma instabilidade do carbonato acíclico planejado como substrato para as lipases (**seção 4.3**). Com isso, haveria uma diminuição do excesso enantiomérico do carbonato de propileno obtido, caso o carbonato acíclico fosse submetido à resolução via lipases. Isto porque, a ciclização intramolecular, por ser um processo espontâneo geraria o carbonato de propileno racêmico, competindo com o processo biocatalisado possivelmente enantiosseletivo, ilustrado na **seção 4.3**.

No caso das reações com cloroformiato de fenila, já seria esperado que a instabilidade proveniente da ciclização do produto direto da reação (carbonato acíclico) fosse mais preponderante, tendo-se em vista a melhor natureza do íon fenóxido como grupo de saída.

Assim como o ocorrido na reação com cloroformiato de benzila, na ausência do Bu_2SnO , houve somente formação do carbonato de propileno. Entretanto, mesmo na presença deste organoestanho, observou-se uma grande instabilidade do carbonato acíclico, não conseguindo isolá-lo.

Portanto, diante dos empecilhos gerados pelas sínteses dos substratos propostos segundo essa estratégia (**seção 4.3**), não se prosseguiu com a mesma.

7. Conclusão

Foram estudadas três estratégias sintéticas na tentativa de se obter o carbonato de propileno enantiomericamente puro por catálise enzimática, via lipases. A mais promissora baseou-se na resolução cinética de derivados 1-*O*-acilados do propano-1,2-diol, como etapa chave determinante da enantiosseletividade. Foram testados quatro destes derivados, com perfil diferente de cadeia acíclica. Estes foram utilizados como substratos em diversas reações enzimáticas, fazendo-se valer tanto da presença da hidroxila secundária ligada ao carbono assimétrico, quanto do grupamento éster de sua estrutura.

A resolução dos derivados monoésteres com cadeia acíclica aromática foi conseguida por meio HPLC com fase estacionária quiral, o que permitiu pronta avaliação da enantiosseletividade da reação, por meio de excesso enantiomérico do substrato remanescente. No caso de reações empregando como substratos derivados de ácidos graxos, esse tipo de resolução direta não foi conseguida. Com isso foi desenvolvido protocolo de derivatização, baseando-se na conversão do produto ou substrato remanescente a carbonato de propileno. Obteve-se êxito com este procedimento, sendo necessária análise de excesso enantiomérico por meio de cromatografia gasosa com fase estacionária quiral.

Utilizando-se os substratos aromáticos (benzoato de 2-hidroxipropila e *p*-anisoato de 2-hidroxipropila), ênfase maior foi dada a reações de alcoólise e transesterificação via lipase N435. Sob o ponto de vista prático, a primeira seria mais vantajosa, diante da possibilidade da separação física dos enantiômeros (reagido e não reagido) por meio de extração com água, evitando o uso de cromatografia em coluna. Apesar disso, baixas enantiosseletividades foram observadas nas reações de alcoólise ($E = 2,7 - 3,8$).

Com estes substratos, observou-se que a enantiodireção é oposta, quando se comparam as reações de alcoólise e transesterificação. As transesterificações com acetato de vinila do benzoato de 2-hidroxipropila e do *p*-anisoato de 2-hidroxipropila forneceram ee_s de 93 % e 84 %, respectivamente, enquanto que, com as metanólises, foram conseguidos ee_s de 80 % e 33 %, respectivamente. Observou-se cinética muito lenta com o derivado *p*-anisoato, sendo necessários 4 dias para se alcançar 50 % de conversão.

Portanto, mediante uso do benzoato de 2-hidroxipropila e, através de transesterificação com acetato de vinila e metanólise, reações estas não exploradas anteriormente na literatura, conseguiram-se obter ambos os enantiômeros do carbonato de propileno, por meio de derivatização simples de duas etapas, em um pote, a partir do substrato remanescente.

8 Referências:

- Albarrán-Velo, J.; González-Martínez, D.; Gotor-Fernández, V. Stereoselective biocatalysis: A mature technology for the asymmetric synthesis of pharmaceutical building blocks. *Biocatalysis and Biotransformation*, 36, 1-29, 2017. DOI: 10.1080/10242422.2017.1340457.
- Anthonsen, T.; Hoff, B. H. Resolution of derivatives of 1,2-propanediol with lipase B from *Candida Antarctica* Effect of substrate structure, medium, water activity and acyl donor on enantiomeric ratio. *Chemistry and Physics of Lipids*, 93, 199–207, 1998. DOI: 10.1016/S0009-3084(98)00043-7.
- Aouf, C.; Durand, E.; Lecomte, J.; Figueroa-Espinoza, M-C.; Dubreucq, E.; Fulcrand, H.; Villeneuve, P. The use of lipases as biocatalysts for the epoxidation of fatty acids and phenolic compounds. *Green Chem.*, 16, 1740-1754, 2014. DOI: 10.1039/C3GC42143K.
- Adlercreutz, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. *Chem. Soc. Rev.*, 42, 6406-6436, 2013. DOI: 10.1039/c3cs35446f.
- Anobom, C. D.; Pinheiro, A. S.; de Andrade, R. A.; Aguiéiras, E. C. G.; Andrade, G. C.; Moura, M. V.; Almeida, R. V.; Freire, D. M. From Structure to Catalysis: Recent Developments in the Biotechnological Applications of Lipases. *BioMed Research International*, 2014. DOI: 10.1155/2014/684506.
- Barton, P.; Page, M., I. The resolution of racemic 1,2-diols by the esterase catalysed hydrolysis of the corresponding cyclic carbonate. *Tetrahedron*, 48, 7731-7734, 1992. DOI: 10.1016/S0040-4020(01)90383-7.
- Baumann, M.; Hauer, B. H.; Bornscheuer, U. T. Rapid screening of hydrolases for the enantioselective conversion of 'difficult-to-resolve' substrates. *Tetrahedron: Asymmetry*, 11, 4781–4790, 2000. DOI: 10.1016/S0957-4166(00)00465-1.
- Berglund, P. Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis. *Biomolecular engineering*, 18, 13-22, 2001. DOI: 10.1016/S1389-0344(01)00081-8.
- Berkessel, A.; Brandenburg, M. Catalytic Asymmetric Addition of Carbon Dioxide to Propylene Oxide with Unprecedented Enantioselectivity. *Org. Lett.*, 8, 2006. 10.1021/ol061501d.
- Blain, M.; Jean-Gérard, L.; Auvergne, R.; Benazet, D.; Caillol, S.; Andrioletti, B. Rational investigations in the ring opening of cyclic carbonates by amines. *Green Chem.*, 2014, 16, 4286-4291. DOI: 10.1039/c4gc01032a.
- Bordes, F.; Barbe, S.; Escalier, P.; Mourey, L.; André, I.; Marty, A.; Tranier, S. Exploring the Conformational States and Rearrangements of *Yarrowia lipolytica* Lipase. *Biophysical Journal*, 99, 2225-2234, 2010. DOI: 10.1016/j.bpj.2010.07.040.

Bornscheuer, U. T.; Huisman, G. W.; Kazlauskas, R. J.; Lutz, S.; Moore, J. C.; Robins, K. Engineering the thirdwave of biocatalysis. *Nature*, 485, 185-194, 2012. DOI: 10.1038/nature11117.

Bruggink, A.; Roos, E. C.; de Vroom, E. Penicillin Acylase in the Industrial Production of β -Lactam Antibiotics. *Organic Process Research & Development*, 2, 128-133, 1998. DOI: 10.1021/op9700643.

Büttner, H.; Longwitz, L.; Steinbauer, J.; Wulf, C.; Werner, T. Recent Developments in the Synthesis of Cyclic Carbonates from Epoxides and CO₂. *Top Curr Chem (Z)*, 375, 50, 2017. DOI: 10.1007/s41061-017-0136-5.

Cai, J.-F.; Guan, Z.; He, Y.-H. The lipase-catalyzed asymmetric C–C Michael addition. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68, 240–244, 2011. DOI: 10.1016/j.molcatb.2010.11.011.

Cambou, B.; Klivanov, A. M. Preparative Production of Optically Active Esters and Alcohols Using Esterase-Catalyzed Stereospecific Transesterification in Organic Media. *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 2687-2692, 1984. DOI: 10.1021/ja00321a033.

Cameron, C. D.; Cooney, C. L. A Novel Fermentation: The Production of *R*(–)-1,2-Propanediol and Acetol by *Clostridium thermosaccharolyticum*. *Nature Biotechnology*, 4, 651-654, 1986. DOI: 10.1038/nbt0786-651.

Carvalho, A. C. L. M.; Fonseca, T. S.; de Mattos, M. C.; de Oliveira, M. C. F.; de Lemos, T. L. G.; Molinari, F.; Romano, D.; Serra, I. Recent Advances in Lipase-Mediated Preparation of Pharmaceuticals and Their Intermediates. *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 29682–29716, 2015. DOI: 10.3390/ijms161226191.

Chang, L.; Ouyang, L.-M.; Xu, Y.; Pan, J.; Xu, J.-H. Highly enantioselective hydrolysis of phenyl-1,2-ethanediol cyclic carbonates by newly isolated *Bacillus* sp. ECU0015. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 66, 95–100, 2010. DOI: 10.1016/j.molcatb.2010.03.011.

Chang, T.; Jin, L.; Jing, H. Bifunctional Chiral Catalyst for the Synthesis of Chiral Cyclic Carbonates from Carbon Dioxide and Epoxides. *ChemCatChem*, 1, 379-383, 2009. DOI: 10.1002/cctc.200900135.

Chaput, L.; Sanejouand, Y.-H.; Balloumi, A.; Tran, V.; Graber, A. Contribution of both catalytic constant and Michaelis constant to CALB enantioselectivity: Use of FEP calculations for prediction studies. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 76, 29-36, 2012. DOI: 10.1016/j.molcatb.2011.11.020.

Chen, C.-S.; Fujimoto, Y.; Girdaukas, G.; Sih, C. J. Quantitative Analyses of Biochemical Kinetic Resolutions of Enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.*, 104, 1294-1299, 1982. DOI: 10.1021/ja00389a064.

Chen, C.-S.; Wu, S.-H.; Girdaukas, G.; Sih, C. J. Quantitative Analyses of Biochemical Kinetic Resolution of Enantiomers. 2. Enzyme- Catalyzed Esterifications in Water-Organic

Solvent Biphasic Systems. J. Am. Chem. Soc. 109, 2812-2817, 1987. DOI: 10.1021/ja00243a040.

Chen, K.; Arnold, F. H. Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: Sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. Proc. Natl. Acad. Sci., 90, 5618-5622, 1993.

Choi, J-M.; Han, S-S.; Kim, H-S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. Biotechnology Advances, 33, 1443-1454, 2015. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.02.014.

Ciuffreda, P.; Alessandrini, L.; Terraneo, G.; Santaniello, E. Lipase-catalyzed selective benzoylation of 1,2-diols with vinyl benzoate in organic solvents. Tetrahedron: Asymmetry, 14 3197–3201, 2003. DOI: 10.1016/j.tetasy.2003.07.003.

Cygler, M.; Grochulski, P.; Kazlauskas, R. J.; Schrag, J. D.; Bouthillier, F.; Rubin, B.; Serreji, A. N.; Gupta, A. K. A Structural Basis for the Chiral Preferences of Lipases. J. Am. Chem. Soc. 116, 3180-3186, 1994. DOI: 10.1021/ja00087a002.

Dasari, M. A.; Kiatsimkul, P-P.; Sutterlin, W. R.; Suppes, G. J. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. Applied Catalysis A: General 281, 225–231, 2005. DOI: 0.1016/j.apcata.2004.11.033.

De Gonzalo, G.; Brieva, R.; Sánchez, V. M.; Bayod, M.; Gotor, V. Enzymatic alkoxyacylation reactions on the intermediate in the synthesis of (–)-paroxetine, *trans-N*-benzyloxycarbonyl-4-(4'-fluorophenyl)-3-hydroxymethylpiperidine. Tetrahedron: Asymmetry 14, 1725–1731, 2003. DOI: 10.1016/S0957-4166(03)00311-2.

Degueil-Castaing, M.; De jeso, B; Drouillard, S.; Maillard, B. Enzymatic Reactions In Organic Synthesis : 2- Ester Interchange Of Vinyl Esters. Tetrahedron Letters, 28, 953-954, 1987. DOI: 10.1016/S0040-4039(00)95884-2.

Desai, A. A.; Sitagliptin Manufacture: A Compelling Tale of Green Chemistry, Process Intensification, and Industrial Asymmetric Catalysis. Angew. Chem., 50, 1974-1976, 2011. DOI: 10.1002/anie.201007051.

De Souza, R. O. M. A.; Miranda, L. S. M.; Bornscheuer, U. T. A Retrosynthesis Approach for Biocatalysis in Organic Synthesis. Chem. Eur. J., 23, 12040-12063, 2017. DOI: 10.1002/chem.201702235.

Doro, F.; Winnertz, P.; Leitner, W.; Prokofieva, A.; Müller, T. E. Adapting a Wacker-type catalyst system to the palladium-catalyzed oxidative carbonylation of aliphatic polyols. Green Chem., 13, 292-295, 2011. DOI: 10.1039/c0gc00817f.

Dwivedee, B. P.; Soni, S.; Sharma, M.; Bhaumik, J.; Laha, J. K.; Banerjee, U. C. Promiscuity of Lipase-Catalyzed Reactions for Organic Synthesis: A Recent Update. Chemistry Select, 3, 2441 – 2466, 2018. DOI: 10.1002/slct.201702954.

Eghbali, N.; Li, C.-J. Conversion of carbon dioxide and olefins into cyclic carbonates in water. *Green Chem.*, 9, 213–215, 2007. DOI: 10.1039/b615612f.

Ema, T. Mechanism of Enantioselectivity of Lipases and Other Synthetically Useful Hydrolases. *Current Organic Chemistry*, 8, 1009-1025, 2004. DOI: 10.2174/1385272043370230.

Eş, I.; Vieira, J. D. G.; Amaral, A. C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99, 2065-2082, 2015. DOI: 10.1007/s00253-015-6390-y.

Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry-A textbook*. 7ª Edição, Springer, 2018.

Ferrato, F.; Carriere, F.; Sarda, L.; Verger, R. A Critical Reevaluation of the Phenomenon of Interfacial Activation. *Methods In Enzymology*, 286, 327-347, 1997. DOI: 10.1016/S0076-6879(97)86018-1.

Fevrier, P.; Guégan, P.; Yvergnaux, F.; Callegari, J. P.; Dufossé, L.; Binet, A. Evaluation of regioselectivity of lipases based on synthesis reaction conducted with propyl alcohol, isopropyl alcohol and propylene glycol. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11, 445–453, 2001. DOI: 10.1016/S1381-1177(00)00165-X.

Forró, E.; Schönstein, L.; Fülöp, F. Total synthesis of crispine A enantiomers through a *Burkholderia cepacia* lipase-catalysed kinetic resolution. *Tetrahedron: Asymmetry*, 22, 1255–1260, 2011. DOI: 10.1016/j.tetasy.2011.06.026.

Freitas, I. C.; Manfro, R. L.; Souza, M. M. V. M. Hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol in continuous system without hydrogen addition over Cu-Ni catalysts. *Applied Catalysis B: Environmental*, 220, 31-41, 2018. DOI: 10.1016/j.apcatb.2017.08.030.

Henzler-Wildman, K.; Kern, D. Dynamic personalities of proteins. *Nature*, 450, 964-972, 2007. DOI: 10.1038/nature06522.

Gal, J. The Discovery of Biological Enantioselectivity: Louis Pasteur and the Fermentation of Tartaric Acid, 1857-A Review and Analysis 150 Yr Later. *Chirality*, 20, 5-19, 2007. DOI: 10.1002/chir.20494.

Ganjalikhany, M. R.; Ranjbar, B.; Taghavi, A. H.; Moghadam, T. T. Functional Motions of *Candida antarctica* Lipase B: A Survey through Open-Close Conformations. *PLoS One*, 7, 1-11, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0040327.

Gao, Y.; Hanson, R. M.; Klunder, J. M.; Ko, S. Y.; Masamune, H.; Sharpless, K. B. Catalytic Asymmetric Epoxidation and Kinetic Resolution: Modified Procedures Including in Situ Derivatization. *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 5165-5180, 1987. DOI: 10.1021/ja00253a032.

Ghanem, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron*, 63, 1721-1754, 2007. DOI: 10.1016/j.tet.2006.09.110.

Goergens, U.; Schneider, M. P. Enzymatic Preparation of Enantiomerically Pure and Selectively Protected 1,2- and 1,3-Diols. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1066-1068, 1991. DOI: 10.1039/C39910001066.

Gotor-Fernández, V.; Brieva, R.; Gotor, V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 40, 111–120, 2006. DOI: 10.1016/j.molcatb.2006.02.010.

Gregory, G. L.; Ulmann, M.; Buchard, A. Synthesis of 6-membered cyclic carbonates from 1,3-diols and low CO₂ pressure: a novel mild strategy to replace phosgene reagents. *RSC Adv.*, 5, 39404-39408, 2015. DOI: 10.1039/c5ra07290e.

Griengl, H.; Schwab, H.; Fechter, M. The synthesis of chiral cyanohydrins by oxynitrilases. *Trends Biotechnol.*, 18, 252-256, 2000. DOI: 10.1016/S0167-7799(00)01452-9.

Grochulski, P.; Li, Y.; Schrag, J. D.; Cygler, M. Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Science*, 3, 82-91, 1994. DOI: 10.1002/pro.5560030111.

Guan, Z.; Fu, J.-P.; He, Y.-H. Biocatalytic promiscuity: lipase-catalyzed asymmetric aldol reaction of heterocyclic ketones with aldehydes. *Tetrahedron Letters*, 53, 4959–4961, 2012. DOI: 10.1016/j.tetlet.2012.07.007.

Guillerm, V.; Weseliński, L. J.; Belmabkhout, Y.; Cairns, A. J.; D'Elia, V.; Wojtas, L.; Adil, K.; Eddaoudi, M. Discovery and introduction of a (3,18)-connected net as an ideal blueprint for the design of metal–organic frameworks. *Nature Chemistry*, 6, 673–680, 2014. DOI: 10.1038/nchem.1982.

Hult, K.; Berglund, P. Enzyme promiscuity: mechanism and applications. *Trends in Biotechnology*, 25, 231-238, 2007. DOI: 10.1016/j.tibtech.2007.03.002.

He, T.; Li, K.; Wu, M.-Y.; Feng, X.-W.; Wang, N.; Wang, H.-Y.; Li, C.; Yu, X.-Q. Utilization of biocatalytic promiscuity for direct Mannich reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 67, 189–194, 2010. DOI: 10.1016/j.molcatb.2010.08.004.

Haefner, F.; Norin, T.; Hult, K. Molecular modeling of the enantioselectivity in lipase-catalyzed transesterification reactions. *Biophys. J.*, 74, 1251-1262. DOI: 10.1016/S0006-3495(98)77839-7.

Hoff, B. H.; Waagen, V.; Anthonsen, T. Resolution of 1-phenoxy-, 1-phenylmethoxy- and 1-(2-phenylethoxy)-2-propanol and their butanoates by hydrolysis with lipase B from *Candida antarctica*. *Tetrahedron: Asymmetry*, 7, 3181-3186, 1996. DOI: 10.1016/0957-4166(96)00420-X.

Hoff, B. H.; Anthonsen, H. W.; Anthonsen, T. The enantiomer ratio strongly depends on the alkyl part of the acyl donor in transesterification with lipase B from *Candida antarctica*. *Tetrahedron: Asymmetry*, 7, 3187-3192, 1996. DOI: 10.1016/0957-4166(96)00421-1.

Honda, M.; Tamura, M.; Nakao, K.; Suzuki, K.; Nakagawa, Y.; Tomishige, T. Direct Cyclic Carbonate Synthesis from CO₂ and Diol over Carboxylation/Hydration Cascade Catalyst of CeO₂ with 2- Cyanopyridine. *ACS Catal.*, 4, 1893–1896, 2014. DOI: 10.1021/cs500301d.

Huang, S.; Ma, J.; Li, J.; Zhao, N.; Wei, W.; Sun, Y. Efficient propylene carbonate synthesis from propylene glycol and carbon dioxide via organic bases. *Catalysis Communications*, 9, 276–280, 2008. DOI: 10.1016/j.catcom.2007.06.008.

Hasan, F.; Shah, A. A.; Hameed, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 235-251, 2006. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.10.016.

Hills, G. Industrial use of lipases to produce fatty acid esters. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 105, 601-607, 2003. DOI: 10.1002/ejlt.200300853.

Hirose, Y.; Kariya, K.; Sasaki, I.; Kurono, Y.; Ebiike, H.; Achiwa, K. Drastic Solvent Effect On Lipase-Catalyzed Enantioselective Hydrolysis Of Prochiral 1,4-Dihydropyridines. *Tetrahedron Letters*, 33, 7157-7160, 1992. DOI: 10.1016/S0040-4039(00)60861-4.

Holmquist, M. Alpha/Beta-Hydrolase Fold Enzymes: Structures, Functions and Mechanisms. *Current Protein and Peptide Science*, 1, 209-235, 2000. DOI: 10.2174/1389203003381405.

Houde, A.; Kademi, A.; Leblanc, D. Lipases and Their Industrial Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118, 155-170, 2004. DOI: 10.1385/ABAB:118:1-3:155.

Hughes, G. J.; Lewis, J. C. Introduction: Biocatalysis in Industry. *Chem. Rev.*, 118, 1-3, 2018. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00741.

International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB). Disponível em: <http://www.sbc.sqmul.ac.uk/iubmb/>. Acesso em out. 2018.

Indran, V. P.; Saud, A. S. H.; Maniam, G. P.; Yusoff, M. M.; Taufiq-Yap, Y. H.; Ab. Rahim, H. M. Versatile Boiler Ash Containing Potassium Silicate for the Synthesis of Organic Carbonates. *RSC Adv.*, 6, 34877-34884, 2016. DOI: 10.1039/C5RA26286K.

Izquierdo, I.; Plaza, M. T.; Rodríguez, M.; Tamayo, J. Lipase-mediated partial resolution of 1,2-diol and 2-alkanol derivatives: towards chiral building-blocks for pheromone synthesis. *Tetrahedron: Asymmetry*, 11, 1749-1756, 2000. DOI: 10.1016/S0957-4166(00)00117-8.

Jaeger, K.-E.; Dijkstra, B. W.; Reetz, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.*, 53, 315-351, 1999. DOI: 10.1146/annurev.micro.53.1.315.

Jaeger, K.-E.; Eggert, T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 390-397, 2002. DOI: 10.1016/S0958-1669(02)00341-5.

Jang, D. Y.; Jang, H. G.; Kim, G. R.; Kim, G.-J. Synthesis of chiral propylene carbonate via asymmetric ring opening of racemic propylene oxide by carbon dioxide on immobilized

cobalt salen catalyst. *Catalysis Today*, 185, 306–312, 2012. DOI: 10.1016/j.cattod.2011.08.013.

Janssen, A. J. M.; Klunder, A. J. H.; Zwanenburg, B. PPL-catalyzed resolution of 1,2- and 1,3-diols in methyl propionate as solvent. An application of the tandem use of enzymes. *Tetrahedron*, 47, 7409-7416, 1991. DOI: 10.1016/S0040-4020(01)89742-8.

Jensen, V. J.; Rugh, S. Industrial scale production and application of immobilized glucose isomerase. *Methods Enzymol.*, 136, 356-370, 1987. DOI: 10.1016/S0076-6879(87)36035-5.

Kadyrov, R.; Koenigs, R. M.; Brinkmann, C.; Voigtlaender, D.; Rueping, M. Efficient Enantioselective Synthesis of Optically Active Diols by Asymmetric Hydrogenation with Modular Chiral Metal Catalysts. *Angew. Chem.*, 48, 7556–7559, 2009. DOI: 10.1002/anie.200902835.

Katsuki, T.; Sharpless, K. B. The First Practical Method for Asymmetric Epoxidation. *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 5974-5976, 1980. DOI: 10.1021/ja00538a077.

Kawashima, M.; Horikawa, Y. Enantioselective Hydrolysis Of Cyclic Carbonates By Porcine Pancreatic Lipase To Afford Optically Active 1,2-Alkanediols. *Biotechnology Letters*, 15, 1039-1042, 1993. DOI: 10.1007/BF00129934.

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*. *J. Org. Chem.*, 56, 2656-2665, 1991. DOI: 10.1021/jo00008a016.

Keith, J. M.; Larrow, J. F.; Jacobsen, E. N. Practical Considerations in Kinetic Resolution Reactions. *Adv. Synth. Catal.*, 343, 5-26, 2001. DOI: 10.1002/1615-4169(20010129)343:1<5::AID-ADSC5>3.0.CO;2-I.

Khan, F. I.; Lan, D.; Durrani, R.; Huan, W.; Zhao, Z.; Wang, Y. The Lid Domain in Lipases: Structural and Functional Determinant of enzymatic Properties. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 5, 1-13, 2017. DOI: 10.3389/fbioe.2017.00016.

Kirchner, G.; Scollar, M. P.; Klibanov, A. M. Resolution of Racemic Mixtures via Lipase Catalysis in Organic Solvents. *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 1012-1016, 1985. DOI: 10.1021/ja00310a052.

Kirk, O.; Christensen, M. W. Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin. *Organic Process Research & Development*, 6, 446-451, 2002. DOI: 10.1021/op0200165.

Kitamoto, Y.; Kuruma, Y.; Suzuki, K.; Hattori, T. Effect of Solvent Polarity on Enantioselectivity in *Candida antarctica* Lipase B Catalyzed Kinetic Resolution of Primary and Secondary Alcohols. *J. Org. Chem.*, 80, 521-527, 2015. DOI: 10.1021/jo502521e.

Kometani, T.; Yoshii, H.; Takeuchi, Y.; Matsuno, R. Large-Scale Preparation of (*R*)-1,2-Propanediol through Baker's Yeast-Mediated Bioreduction. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76, 414–415, 1993. DOI: 10.1016/0922-338X(93)90036-8.

Kometani, T.; Morita, Y.; Furui, H.; Yoshii, H.; Matsuno, R. Preparation of Chiral 1,2-Alkanediols with Baker's Yeast-Mediated Oxidation. *Chemistry Letters*, 12, 2123–2124, 1993. DOI: 10.1246/cl.1993.2123.

Kitamura, M.; Ohkuma, T.; Inoue, S.; Sayo, N.; Kumobayashi, H.; kutagawa, S. A.; Ohta, T.; Takaya, H.; Noyori, R. Homogeneous Asymmetric Hydrogenation of Functionalized Ketones. *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 629–631, 1988. DOI: 10.1021/ja00210a070.

Kleij, A. W.; Decortes, A.; Castilla, A. M. Salen-Complex-Mediated Formation of Cyclic Carbonates by Cycloaddition of CO₂ to Epoxides. *Angew. Chem. Int. Ed*, 49, 9822 – 9837, 2010. DOI: 10.1002/anie.201002087.

Kumar, A.; Dhar, K.; Kanwar, S. S.; Arora, P. K. Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications. *Biological Procedures Online*, 18, 1–11, 2016. DOI 10.1186/s12575-016-0033-2.

Kumar, S.; Singhal, N.; Singh, R. K.; Gupta, P.; Singh, R.; Jain, S. L. Dual catalysis with magnetic chitosan: direct synthesis of cyclic carbonates from olefins with carbon dioxide using isobutyraldehyde as sacrificial reductant. *Dalton Trans.*, 44, 11860–11866, 2015.

Lee, L. G.; Whitesides, G. M. Preparation of Optically Active 1,2-Diols and α -Hydroxy Ketones Using Glycerol Dehydrogenase as Catalyst: Limits to Enzyme-Catalyzed Synthesis due to Noncompetitive and Mixed Inhibition by Product. *J. Org. Chem.*, 51, 25–36, 1986. DOI: 10.1021/jo00351a005.

Li, C.; Feng, X.-W.; Wang, N.; Zhou, Y.-J.; Yu, X.-Q. Biocatalytic promiscuity: the first lipase-catalysed asymmetric aldol reaction. *Green Chem.*, 10, 616–618, 2008. DOI: 10.1039/b803406k.

Li, K.; He, T.; Li, C.; Feng, X.-W.; Wang, N.; Yu, X.-Q. Lipase-catalysed direct Mannich reaction in water: utilization of biocatalytic promiscuity for C–C bond formation in a “one-pot” synthesis. *Green Chem.*, 11, 777–779, 2009. DOI: 10.1039/b817524a.

Lim, Y. N.; Lee, C.; Jang, H.-Y. Metal-Free Synthesis of Cyclic and Acyclic Carbonates from CO₂ and Alcohols. *Eur. J. Org. Chem.*, 1823–1826, 2014. DOI: 10.1002/ejoc.201400031.

Liu, Y.; Luo, C.; Liu, H. Tungsten Trioxide Promoted Selective Conversion of Cellulose into Propylene Glycol and Ethylene Glycol on a Ruthenium Catalyst. *Angew. Chem.*, 124, 3303–3307, 2012. DOI: 10.1002/ange.201200351.

Liu, B.; Yan, J.; Huang, R.; Wang, W.; Jin, Z.; Zanoni, G.; Zheng, P.; Yang, S.; Chi, Y. R.; Kinetic Resolution of 1,2-Diols via NHC-Catalyzed Site-Selective Esterification. *Org. Lett.*, 20, 3447–3450, 2018. DOI: 10.1021/acs.orglett.8b01029.

Lorenz, H.; Seidel-Morgenstern, A. Processes To Separate Enantiomers. *Angew. Chem.*, 53, 1218 – 1250, 2014. DOI: 10.1002/anie.201302823.

Lu, X.-B.; Liang, B.; Zhang, Y.-J.; Tian, Y.-Z.; Wang, Y.-M.; Bai, C.-X.; Wang, H.; Zhang, R. Asymmetric Catalysis with CO₂: Direct Synthesis of Optically Active Propylene Carbonate from Racemic Epoxides. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 3732-3733, 2004. DOI: 10.1021/ja049734s.

Ma, S. K.; Gruber, J.; Davis, C.; Newman, L.; Gray, D.; Wang, A.; Grate, J.; Huisman, G. W.; Sheldon, R. A. A green-by-design biocatalytic process for atorvastatin intermediate. *Green Chem.*, 12, 81-86, 2010. DOI: 10.1039/b919115c.

Machado, A. C. O.; da Silva, A. A. T.; Borges, C. P.; Simas, A. B. C.; Freire, D. M. G. Kinetic resolution of (R,S)-1,2-isopropylidene glycerol (solketal) ester derivatives by lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 69, 42-46, 2011. DOI: 10.1016/j.molcatb.2010.12.008.

Magnusson, A. O.; Takwa, M.; Hamberg, A.; Hult, K. An S-Selective Lipase Was Created by Rational Redesign and the Enantioselectivity Increased with Temperature. *Angew. Chem.*, 44, 4582–4585, 2005. DOI: 10.1002/anie.200500971.

Manoel, E. A.; Robert, J. M.; Pinto, M. C. C.; Machado, A. C. O.; Besteti, M. D.; Coelho, M. A. Z.; Simas, A. B. C.; Fernandez-Lafuente, R.; e Pinto, J. C.; Freire, D. M. G. Evaluation of the performance of differently immobilized recombinant lipase B from *Candida antarctica* preparations for the synthesis of pharmacological derivatives in organic media. *RSC Adv.*, 6, 4043-4052, 2016. DOI: 10.1039/c5ra22508f.

Martín, C.; Fiorani, G.; Kleij, A. W. Recent Advances in the Catalytic Preparation of Cyclic Organic Carbonates. *ACS Catal.*, 5, 2, 1353-1370, 2015. DOI: 10.1021/cs5018997.

Martinelle, M.; Holmquist, M.; Hult, K. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1258 272-276, 1995. DOI: 10.1016/0005-2760(95)00131-U.

Martins, R. S.; Ahmad, A.; Silva Jr., L. F.; Andrade, L. H. Exploiting sequential lipase-catalyzed reactions to achieve enantiomerically pure chiral primary alcohols. *RSC Adv.*, 5, 56599-56605, 2015. DOI: 10.1039/C5RA06469D.

Matsumoto, K.; Sato, Y.; Fuwa, S.; Kitajima, H. Enzyme-mediated enantioselective hydrolysis of cyclic carbonates. *Tetrahedron Letters*, 36, 6499-6502, 1995. DOI: 10.1016/0040-4039(95)01300-7.

Matsumoto, K.; Fuwa, S.; Shimojo, M.; Kitajima, H. Preparation of Optically Active Diol Derivatives by the Enzymatic Hydrolysis of Cyclic Carbonates. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 69, 2977-2987, 1996. DOI: 10.1246/bcsj.69.2977.

Matsumoto, K.; Shimojo, M.; Kitajima, H.; Hatanaka, M. Enzyme-Catalyzed Enantioselective Hydrolysis of 6-Membered Cyclic Carbonates Using Water-Immiscible Co-Solvent System. *Synlett*, 1996, 1085-1086, 1996. DOI: 10.1055/s-1996-5696.

Matsumoto, K.; Shimojo, M.; Hatanaka, M. Synthesis of Optically Active Diols Bearing a Long Chain via Enzymatic Hydrolysis of Cyclic Carbonates. *Chemistry Letters*, 26, 1151-1152, 1997. DOI: 10.1246/cl.1997.1151.

Matsumoto, K.; Sato, Y.; Shimojo, M.; Hatanaka, M. Highly enantioselective preparation of C₂-symmetrical diols: microbial hydrolysis of cyclic carbonates. *Tetrahedron: Asymmetry*, 11, 1965-1973, 2000. DOI: 10.1016/S0957-4166(00)00144-0.

Matsumoto, K.; Nakamura, Y.; Shimojo, M.; Hatanaka, M. Enzyme-mediated enantioselective hydrolysis of cyclic carbonate bearing an unsaturated substituent. *Tetrahedron Letters*, 43, 6933-6936, 2002. DOI: 10.1016/S0040-4039(02)01628-3.

Miao, C.-X.; Wang, J.-Q.; Wu, Y.; Du, Y.; He, L.-N. Bifunctional Metal-Salen Complexes as Efficient Catalysts for the Fixation of CO₂ with Epoxides under Solvent-Free Conditions. *ChemSusChem*, 1, 236-241, 2008. DOI: 10.1002/cssc.200700133.

Miao, Y.; Rahimi, M.; Geertsema, E. M.; Poelarends, G. J. Recent developments in enzyme promiscuity for carbon-carbon bond-forming reactions. *Current Opinion in Chemical Biology*, 25, 115-123, 2015. DOI: 10.1016/j.cbpa.2014.12.020.

Monsalve, L. N.; Gillanders, F.; Baldessari, A. Promiscuous Behavior of *Rhizomucor miehei* Lipase in the Synthesis of N-Substituted β -Amino Esters. *Eur. J. Org. Chem.*, 6, 1164-1170, 2012. DOI: 10.1002/ejoc.201101624.

Nagasawa, T.; Nakamura, T.; Yamada, H. Production of acrylic acid and methacrylic acid using *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrilase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 34, 322-324, 1990. DOI: 10.1007/BF00170051

Nagasawa, T.; Shimizu, H.; Yamada, H. The superiority of the third-generation catalyst, *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrile hydratase, for industrial production of acrylamide. *Appl Microbiol Biotechnol*, 40, 189-195, 1993. DOI: 10.1007/BF00170364.

Nagashima, N.; Ohno, M. Selective Monoalkylation of Acyclic Diols by Means of Dibutyltin Oxide and Fluoride Salts. *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 1972-1982, 1991. DOI: 10.1248/cpb.39.1972.

Nanda, M. R.; Yuan, Z.; Qin, W.; Xu, C. Recent advancements in catalytic conversion of glycerol into propylene glycol: A review. *Catalysis Reviews*, 58, 309-336, 2016. DOI: 10.1080/01614940.2016.1166005.

Nardini, M.; Dijkstra, B. W. α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current Opinion in Structural Biology*, 9, 732-737, 1999. DOI: 10.1016/S0959-440X(99)00037-8.

Nestl, B. M.; Hammer, S. C.; Nebel, B. A.; Hauer, B. New Generation of Biocatalysts for Organic Synthesis. *Angew. Chem.*, 53, 3070-3095, 2014.

Ni, Y.; Holtmann, D.; Hollmann, F. How Green is Biocatalysis? To Calculate is To Know. *ChemCatChem*, 6, 930-943, 2014. DOI: 10.1002/cctc.201300976.

Noe, M. C.; Letavic, M. A.; Snow, S. L. Asymmetric Dihydroxylation of Alkenes. *Org. React.*, 66, cap. 2, 2005. DOI: 10.1002/0471264180.or066.02.

Nogawa, M.; Sugawara, S.; Iizuka, R.; Shimojo, M.; Ohta, H.; Hatanaka, M.; Matsumoto, K. Enantioselective microbial hydrolysis of dissymmetrical cyclic carbonates with disubstitution. *Tetrahedron*, 62, 12071–12083, 2006. DOI: 10.1016/j.tet.2006.09.066.

Paddock, R. L.; Nguyen, S.-B. T. Chiral (salen)Co^{III} catalyst for the synthesis of cyclic carbonates. *Chem. Commun.*, 1622–1623, 2004. DOI: 10.1039/B401543F.

Palomo, J. M.; Segura, R. L.; Mateo, C.; Terreni, M.; Guisana, J. G.; Fernández-Lafuente, R. Synthesis of enantiomerically pure glycidol via a fully enantioselective lipase-catalyzed resolution. *Tetrahedron: Asymmetry*, 16, 869–874, 2005. DOI: 10.1016/j.tetasy.2004.12.027.

Pearson, D. M.; Conley, N. R.; Waymouth, R. M. Palladium-Catalyzed Carbonylation of Diols to Cyclic Carbonates. *Adv. Synth. Catal.*, 353, 3007–3013, 2011. DOI: 10.1002/adsc.201100240.

Pelissier, H. Catalytic non-enzymatic kinetic resolution. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 353, 1613–1666, 2011. DOI: 10.1002/adsc.201100111.

Peña-López, M.; Neumann, H.; Beller, M. Iron-Catalyzed Synthesis of Five-Membered Cyclic Carbonates from Vicinal Diols: Urea as Sustainable Carbonylation Agent. *Eur. J. Org. Chem.* 3721–3727, 2016. DOI: 10.1002/ejoc.201600476.

Petursson, S. Highly regioselective primary etherification of racemic propane-1,2-diol by the tin(II) bromide-catalyzed reaction with diazo[bis(4-methoxyphenyl)]methane and the resolution of enantiomers with the help of *Pseudomonas cepacia* lipase. *Tetrahedron: Asymmetry*, 20, 887–891, 2009. DOI: 10.1016/j.tetasy.2009.03.003.

Petursson, S.; Jonsdottir, S. Mono-etherification of racemic propane-1,2-diol by a tin(II) bromide catalyzed reaction with diazofluorene and a study of the *Pseudomonas cepacia* lipase catalyzed acetylation of the mono-ethers. *Tetrahedron: Asymmetry*, 23, 157–163, 2012. DOI: 10.1016/j.tetasy.2012.01.013.

Poppe, L.; Novák, L.; Kajtár-Peredy, M.; Szántayab, C. Lipase-Catalyzed Enantiomer Selective Hydrolysis of IA-Did Diacetata. *Tetrahedron: Asymmetry*, 4, 2211–2217, 1993. DOI: doi.org/10.1016/S0957-4166(00)80071-3.

Porter, J. L.; Rusli, R. A.; Ollis, D. L. Directed Evolution of Enzymes for Industrial Biocatalysis. *ChemBioChem*, 17, 197–203, 2016. DOI: 10.1002/cbic.201500280.

Pozo, M.; Gotor, V. Chiral Carbamates through an Enzymatic Alkoxy-carbonylation Reaction. *Tetrahedron*, 49, 4321–4326, 1993. DOI: 10.1016/S0040-4020(01)85748-3.

Pozo, M.; Gotor, V. Double Enantioselective Enzymic Synthesis of Carbonates and Urethanes. *Tetrahedron: Asymmetry*, 6, 2797–2802, 1995. DOI: 10.1016/0957-4166(95)00369-Z.

Raza, S.; Fransson, L.; Hult, K. Enantioselectivity in *Candida antarctica* lipase B: A molecular dynamics study. *Protein Science*, 10, 329–338, 2001. DOI: 10.1110/ps.33901.

Reetz, M. T. Biocatalysis in Organic Chemistry and Biotechnology: Past, Present, and Future. *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 12480–12496, 2013. DOI: 10.1021/ja405051f.

Reetz, M. T. Laboratory Evolution of Stereoselective Enzymes: A Prolific Source of Catalysts for Asymmetric Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 138–174, 2011. DOI: 10.1002/anie.201000826.

Ren, W.-M.; Wu, G.-P.; Lin, F.; Jiang, J.-Y.; Liu, C.; Luo, Y.; Lu, X.-B. Role of the co-catalyst in the asymmetric coupling of racemic epoxides with CO₂ using multichiral Co(III) complexes: product selectivity and enantioselectivity. *Chem. Sci.*, 3, 2094, 2012. DOI: 10.1039/c2sc20068f.

Ren, Y.; Cheng, X.; Yang, S.; Qi, C.; Jiang, H.; Mao, Q. A chiral mixed metal–organic framework based on a Ni(saldpen) metalloligand: synthesis, characterization and catalytic performances. *Dalton Trans.*, 42, 9930–9937, 2013. DOI: 10.1039/c3dt50664a.

Rotticci, D.; Hæffner, F.; Orrenius, C.; Norin, T.; Hult, K. Molecular recognition of sec-alcohol enantiomers by *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 5, 267–272, 1998. DOI: 10.1016/S1381-1177(98)00047-2.

Rotticci, D.; Rotticci-Mulder, J. C.; Denman, S.; Norin, T.; Hult, K. Improved Enantioselectivity of a Lipase by Rational Protein Engineering. *ChemBioChem*, 2, 766–770, 2001. DOI: 10.1002/1439-7633(20011001)2:10<766::AID-CBIC766>3.0.CO;2-K.

Rouf, A.; Taneja, S. C. Synthesis of Single-enantiomer Bioactive Molecules: A Brief Overview. *Chirality*, 26, 63–78, 2014. DOI: 10.1002/chir.

Roy, T.; Kureshy, R. I.; Khan, N. H.; Abdi, S. H. R.; Bajaj, H. C. Asymmetric Cycloaddition of CO₂ and Epoxide using Bi-functional Polymeric Co(III) Salen Complexes. *Catal. Sci. Technol.*, 3, 2661–2667, 2013. DOI: 10.1039/C3CY00325F.

Saito, T.; Yokozawa, T.; Ishizaki, T.; Moroi, T.; Sayo, N.; Miura, T.; Kumobayashi, H. New Chiral Diphosphine Ligands Designed to Have a Narrow Dihedral Angle in the Biaryl Backbone. *Adv. Synth. Catal.*, 343, 2001. DOI: 10.1002/1615-4169(20010330)343:3<264::AID ADSC264>3.0.CO;2-T.

Sajiki, H.; Hattori, K.; Hirota, K. Pd/C(en)-catalyzed regioselective hydrogenolysis of terminal epoxides to secondary alcohols. *Chem. Commun.*, 1041–1042, 1999. DOI: 10.1039/A902213I.

Sakakura, T.; Kohno, K. The synthesis of organic carbonates from carbon dioxide. *Chem. Commun.*, 1312–1330, 2009. DOI: 10.1039/b819997c.

Sanders, D. P.; Fukushima, K.; Coady, D. J.; Nelson, A.; Fujiwara, M.; Yasumoto, M.; Hedrick, J. L. A Simple and Efficient Synthesis of Functionalized Cyclic Carbonate

Monomers Using a Versatile Pentafluorophenyl Ester Intermediate. *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 14724–14726, 2010. DOI: 10.1021/ja105332k.

Sarda, L.; Desnuelle, P. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochimica et Biophysica Acta*, 30, 513-521, 1958

Savile, C.; Janey, J. M.; Mundorff, E. C.; Moore, J. C.; Tam, S.; Jarvis, W. R.; Colbeck, J. C.; Krebber, A.; Fleitz, F. J.; Brands, J.; Devine, P. N.; Huisman, G. W.; Hughes, G. J. Biocatalytic Asymmetric Synthesis of Chiral Amines from Ketones Applied to Sitagliptin Manufacture. *Science*, 329, 305-309, 2010. DOI: 10.1126/science.1188934.

Schaus, S. E.; Brandes, B. D.; Larrow, J. F.; Tokunaga, M.; Hansen, K. B.; Gould, A. E.; Furrow, M. E.; Jacobsen, E. N. Highly Selective Hydrolytic Kinetic Resolution of Terminal Epoxides Catalyzed by Chiral (salen)Co^{III} Complexes. Practical Synthesis of Enantioenriched Terminal Epoxides and 1,2-Diols. *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 1307-1315, 2002. DOI: 10.1021/ja016737l.

Schrag, J. D.; Cygler, M. Lipases and α/β -hydrolase fold. *Methods in Enzymology*, 284, 85-107, 1997. DOI: 10.1016/S0076-6879(97)84006-2.

Schultze, L. M.; Chapman, H. H.; Dubree, N. J. P.; Jones, R. J.; Kent, K. M.; Lee, T. T.; Louie, M. S.; Postich, M. J.; Prisbe, E. J.; Rohloff, J. C.; Yu, R. H. Practical Synthesis of the anti-HIV Drug, PMPA. *Tetrahedron Letters*, 39, 1853-1856, 1998. DOI: 10.1016/S0040-4039(98)00131-2.

Schwartz, T. J.; Shanks, B. H.; Dumesic, J. A. Coupling chemical and biological catalysis: a flexible paradigm for producing biobased chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*, 38, 54-62, 2016. DOI: 10.1016/j.copbio.2015.12.017.

Shaw, J.-F.; Lo, S. Production of Propylene Glycol Fatty Acid Monoesters by Lipase-Catalyzed Reactions in Organic Solvents. *J Am Oil Chem Soc.*, 71, 715-719, 1994. DOI: 10.1007/BF02541427.

Sheldon, R. A.; Woodley, J. M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chem. Rev.*, 118, 801-838, 2017. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00203.

Sheldon, R. A.; Pereira, P. C. Biocatalysis engineering: the big Picture. *Chem. Soc. Rev.*, 46, 2678-2691, 2017. DOI: 10.1039/c6cs00854b.

Sheldon, R. A. The *E* factor 25 years on: the rise of green chemistry and sustainability. *Green Chem.*, 19, 18-43, 2017. DOI: 10.1039/c6gc02157c.

Sheldon, R.A. Biocatalysis and Biomass Conversion in Alternative Reaction Media. *Chem. Eur. J.*, 22, 1 – 17, 2016. DOI: 10.1002/chem.201601940.

Sheldon, R. A.; Brady, D. The Limits to Biocatalysis: Pushing the Envelope. *Chem. Comm.*, 54, 6088-6104, 2018. DOI: 10.1039/C8CC02463D.

Sheldon, R. A.; van Pelt, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem. Soc. Rev.*, 42, 6223-6235, 2013. DOI: 10.1039/c3cs60075k.

Shuklov, I. A.; Dubrovina, N. V.; Schulze, J.; Tietz, W.; Börner, A. Synthesis of (*R*)-propane-1,2-diol from lactides by dynamic kinetic resolution. *Tetrahedron Letters*, 55, 3495–3497, 2014. DOI: 10.1016/j.tetlet.2014.04.097.

Selva, M.; Caretto, A.; Noè, M.; Perosa, A. Carbonate phosphonium salts as catalysts for the transesterification of dialkyl carbonates with diols. The competition between cyclic carbonates and linear dicarbonate products. *Org. Biomol. Chem.*, 12, 4143-4155, 2014. DOI: 10.1039/C4OB00655K.

Simon, R. C.; Mutti, F. G.; Kroutil, W. Biocatalytic synthesis of enantiopure building blocks for pharmaceuticals. *Drug Discovery Today: Technologies*, 10, 37-44, 2013. DOI: 10.1016/j.ddtec.2012.08.002.

Skjøl, M.; De Maria, L.; Chatterjee, R.; Svendsen, A.; Patkar, S. A.; Østergaard, P. R.; Brask, J. Understanding the Plasticity of the α/β Hydrolase Fold: Lid Swapping on the *Candida antarctica* Lipase B Results in Chimeras with Interesting Biocatalytic Properties. *ChemBioChem*, 10, 520 – 527, 2009. DOI: 10.1002/cbic.200800668.

Solano, D. M.; Hoyos, P.; Hernáiz, M. J.; Alcántara, A. R.; Sánchez-Montero, J. M. Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. *Bioresource Technology*, 115, 196–207, 2012. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.11.131.

Stauch, B.; Fisher, S. J.; Ciani, M. Open and closed states of *Candida antarctica* Lipase B: protonation and the mechanism of interfacial activation. *J. Lipid Res.*, 56, 2348-2358, 2015. DOI: 10.1194/jlr.M063388.

Stemmer, W. P. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature*, 370, 389-391, 1994. DOI: 10.1038/370389a0.

Straathof, A. J. J.; Jongejan, J. A. The enantiomeric ratio: origin, determination and prediction. *Enzyme and Microbial Technology*, 21, 559-571, 1997. DOI: 10.1016/S0141-0229(97)00066-5.

Sun, H.; Zhang, H.; Ang, E. L.; Zhao, H. Biocatalysis for the Synthesis of Pharmaceuticals and Pharmaceutical Intermediates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26, 1275-1284, 2017. DOI: 10.1016/j.bmc.2017.06.043.

Suveges, N. S.; Rodriguez, A. A.; Diederichs, C. C.; de Souza, S. P.; Leão, R. A. C.; Miranda, L. S. M.; Horta, B. A. C.; Pedraza, S. F.; de Carvalho, O. V.; Pais, K. C.; Terra, J. H. C.; de Souza, R. O. M. A. Continuous-flow Synthesis of (*R*)-Propylene Carbonate: An Important Intermediate in the Synthesis of Tenofovir. *Eur. J. Org. Chem.*, 23, 2931-2938, 2018. DOI: 10.1002/ejoc.201800345.

Tokunaga, M.; Larrow, J. F.; Kakiuchi, F.; Jacobsen, E. N. Asymmetric Catalysis with Water: Efficient Kinetic Resolution of Terminal Epoxides by Means of Catalytic Hydrolysis. *Science*, 277, 936-938, 1997. DOI: 10.1126/science.277.5328.936.

Trost, B. M. The Atom Economy- A Search for Synthetic Efficiency. *Science*, 254, 1471-1477, 1991. DOI: 10.1126/science.1962206.

Truppo, M. D. Biocatalysis in the Pharmaceutical Industry – The Need for Speed. *ACS Med. Chem. Lett.*, 8, 476-480, 2017. DOI: 10.1021/acsmmedchemlett.7b00114.

Uppenberg, J.; Hansen, M. T.; Patkar, S.; Jones, T. A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure*, 2, 293-308, 1994. DOI: 10.1016/S0969-2126(00)00031-9.

Uppenberg, J.; Öhrner, 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. DOI: 10.1021/bi00051a035.

Vanhessche, K. P. M.; Sharpless, K. B. Catalytic Asymmetric Synthesis of New Halogenated Chiral Synthons. *Chem. Eur. J.*, 3, 1997. DOI: 10.1002/chem.19970030406.

Verger, R. ‘Interfacial activation’ of lipases: facts and artifacts. *Trends in Biotechnology*, 15, 32-38, 1997. DOI: 10.1016/S0167-7799(96)10064-0.

Verho, O.; Bäckvall, J.-E. Chemoenzymatic Dynamic Kinetic Resolution: A Powerful Tool for the Preparation of Enantiomerically pure Alcohols and Amines. *J. Am. Chem. Soc.*, 137, 12, 3996–4009, 2015. DOI: 10.1021/jacs.5b01031.

Vongvilai, P.; Linder, M.; Sakulsombat, M.; Humble, M. S.; Berglund, P.; Brinck, T.; Ramström, O. Racemase Activity of *B. cepacia* Lipase Leads to Dual-Function Asymmetric Dynamic Kinetic Resolution of α -Aminonitriles. *Angew. Chem.*, 50, 6592–6595, 2011. DOI: 10.1002/anie.201007373.

Wang, H.; Wu, L.-X.; Zhao, J.-Q.; Li, R. N.; Zhang, A. J.; Kajiura, H.; Li, Y.-M.; Lu, J.-X. Synthesis of cyclic carbonates from CO₂ and diols via electrogenerated cyanomethyl anion. *Greenhouse Gas Sci Technol.*, 2, 59–65, 2012. DOI: 10.1002/ghg.

Whitaker, J. M.; Ronald, R. C. Enantioselective Synthesis of (*R*)-Propylene Carbonate from Ethyl (*S*)-Lactate. *Synthesis*, 8, 403–404, 2009. DOI: 10.1055/s-0028-1088015.

Wu, J.; Kozak, J. A.; Simeon, F.; Hatton, T. A.; Jamison, T. F. Mechanism-guided design of flow systems for multicomponent reactions: conversion of CO₂ and olefins to cyclic carbonates. *Chem. Sci.*, 5, 1227-1231, 2014. DOI: 10.1039/c3sc53422g.

Wu, L.-L.; Xiang, Y.; Yang, D.-C.; Guan, Z.; He, Y.-H. Biocatalytic asymmetric Mannich reaction of ketimines using wheat germ lipase. *Catal. Sci. Technol.*, 6, 3963-3970, 2016. DOI: 10.1039/c5cy01923k.

Wu, X.; Castro-Osma, J. A.; North, M. Synthesis of Chiral Cyclic Carbonates via Kinetic Resolution of Racemic Epoxides and Carbon Dioxide. *Symmetry*, 8, 2016. DOI: 10.3390/sym8010004.

Wu, W.; Xie, Y.; Li, P.; Li, X.; Liu, Y.; Dong, X.-Q.; Zhang, X. Asymmetric Hydrogenation of α -Hydroxy Ketones with Iridium/f-Amphox Catalyst: Efficient Access to Chiral 1,2-Diol. *Org. Chem. Front.*, 4, 555-559, 2017. DOI: 10.1039/C6QO00810K.

Xiao, Z.; Jin, S.; Pang, M.; Liang, C. Conversion of highly concentrated cellulose to 1,2-propanediol and ethylene glycol over highly efficient CuCr catalysts. *Green Chem.*, 15, 891-895, 2013. DOI: 10.1039/C3GC40134K.

Xie, Z.-B.; Wang, N.; Zhou, L.-H.; Wan, F.; He, T.; Le, Z.-G.; Yu, X.-Q. Lipase-Catalyzed Stereoselective Cross-Aldol Reaction Promoted by Water. *ChemCatChem*, 5, 1935-1940, 2013. DOI: 10.1002/cctc.201200890.

Yadav, G. D.; Hude, M. P.; Talpade, A. D. Microwave assisted process intensification of lipase catalyzed transesterification of 1,2 propanediol with dimethyl carbonate for the green synthesis of propylene carbonate: Novelties of kinetics and mechanism of consecutive reactions. *Chemical Engineering Journal*, 281, 199–208, 2015. DOI: 10.1016/j.cej.2015.06.036.

Yamada-Onodera, K.; Kawahara, N.; Yani, Y.; Yamamoto, H. Synthesis of Optically Active Diols by *Escherichia coli* Transformant Cells that Express the Glycerol Dehydrogenase Gene of *Hansenula polymorpha* DL- 1. *Engineering in Life Sciences*, 4, 413-417, 2004. DOI: 10.1002/elsc.200410045.

Yan, P.; Jing, H. Catalytic Asymmetric Cycloaddition of Carbon Dioxide and Propylene Oxide Using Novel Chiral Polymers of BINOL-Salen-Cobal(III) Salts. *Adv. Synth. Catal.*, 351, 1325 – 1332, 2009. DOI: 10.1002/adsc.200900137.

Yang, J.-K.; Liu, L.-Y.; Dai, J.-H.; Li, Q. *de novo* Design and Synthesis of *Candida antarctica* Lipase B Gene and a-Factor Leads to High-Level Expression in *Pichia pastoris*. *PLoS One*, 8, 1-8, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0053939.

Yang, Y. L.; Ramaswamy, S. G.; Jakoby, W. B. Enzymatic Hydrolysis of Organic Cyclic Carbonates. *The Journal Of Biological Chemistry*, 273, 7814–7817, 1998. DOI: 10.1074/jbc.273.14.7814.

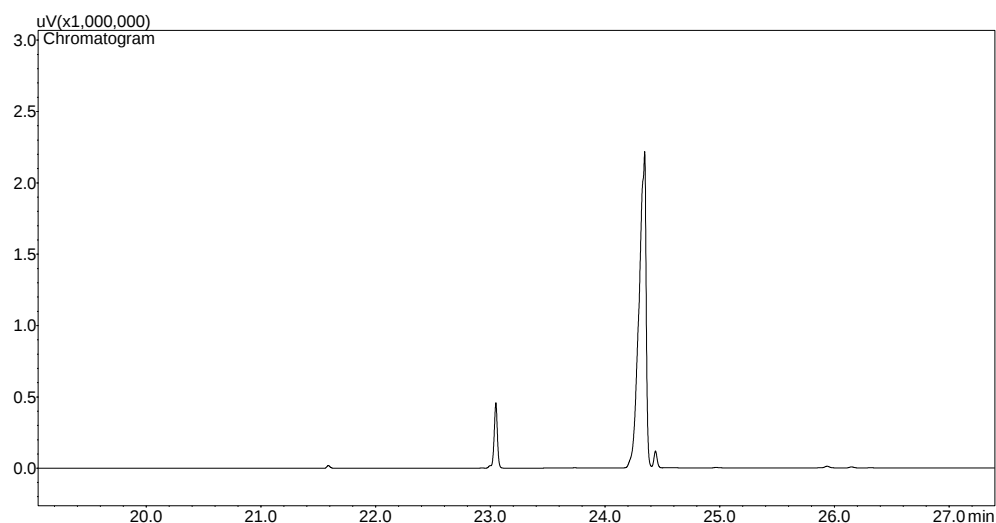
Yasir, A.; Shukla, K.; Srivastava, V. C. Synthesis of Propylene Carbonate from Propane-1,2-diol and Urea Using Hydrotalcite-Derived Catalysts. *Energy Fuels*, 31, 9890–9897, 2017. DOI: 10.1021/acs.energyfuels.7b01330.

Zaks, A.; Klibanov, A. M. Enzymatic Catalysis in Organic Media at 100 °C. *Science*, 224, 1249-1251, 1984. DOI: 10.1126/science.6729453.

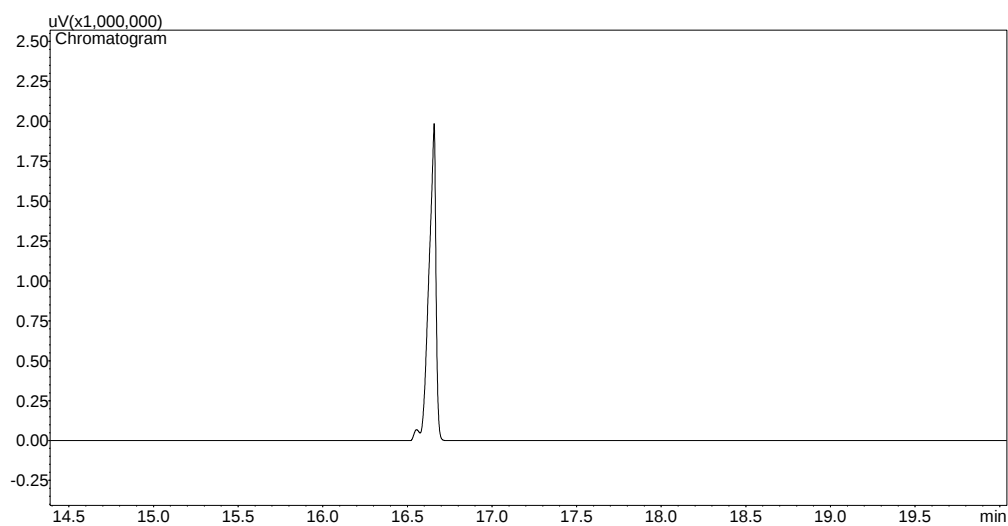
Zisis, T.; Freddolino, P. L.; Turunen, P.; van Teeseling, M. C. F.; Rowan, A. E.; Blank, K. G. Interfacial activation of *Candida antarctica* lipase B: combined evidence from experiment and simulation. *Biochemistry*, 54, 5969-5979, 2015. DOI: 10.1021/acs.biochem.5b00586.

9. Anexos

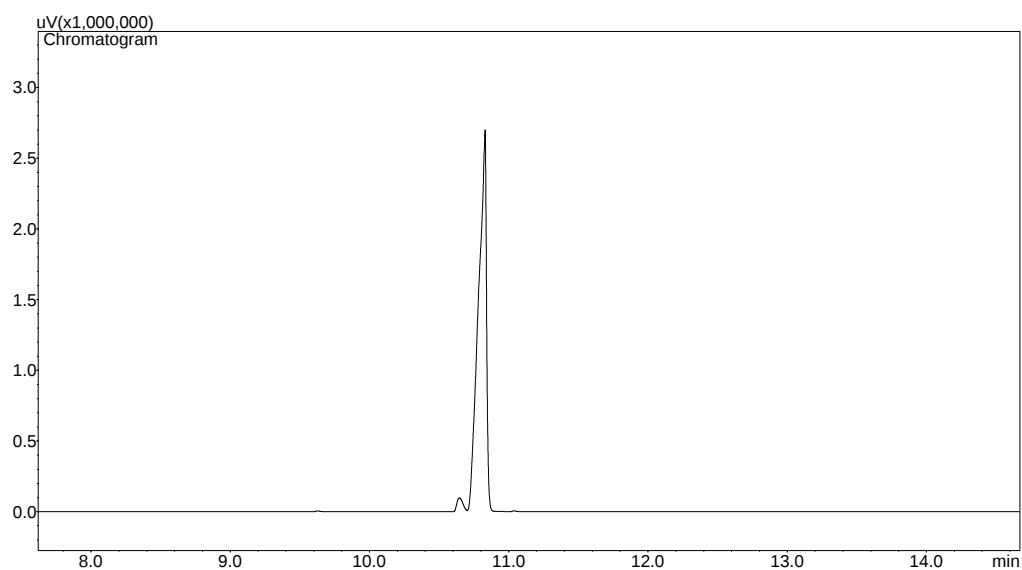
9.1 Cromatogramas de CG das substâncias sintetizadas como padrões de análise e substratos enzimáticos



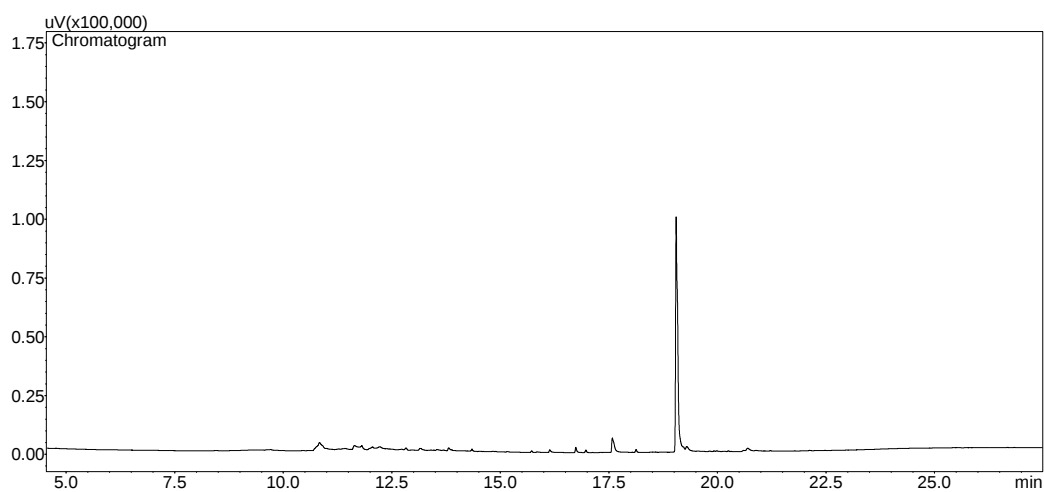
Padrão benzoato de-2-oleoiloxipropila
 t_R : 23,048 min. (8% de área); t_R : 24,345 min. (88% de área)



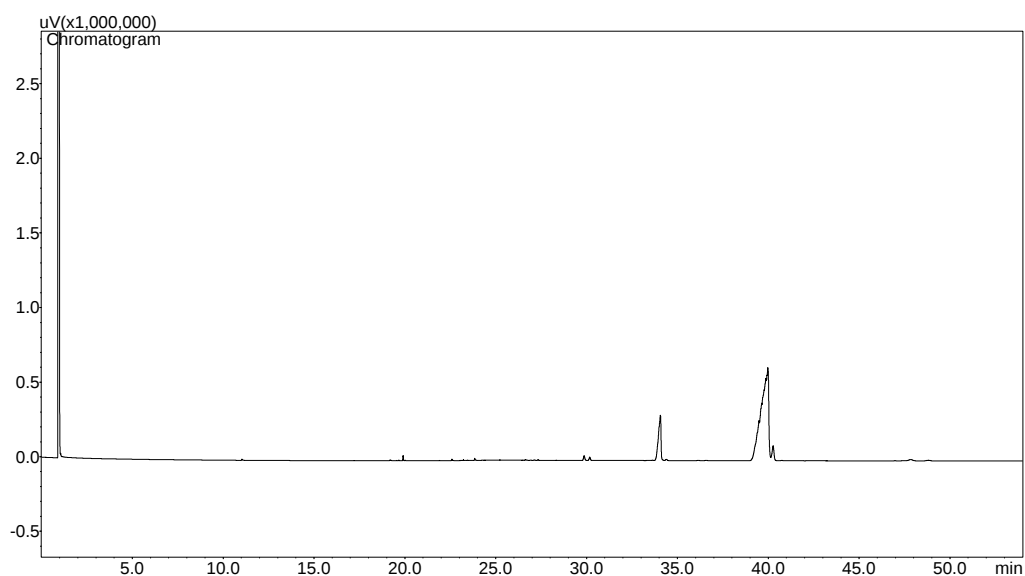
Padrão benzoato de 2-capriloiloxipropila
(t_R : 16,657 min.; 97% de área)



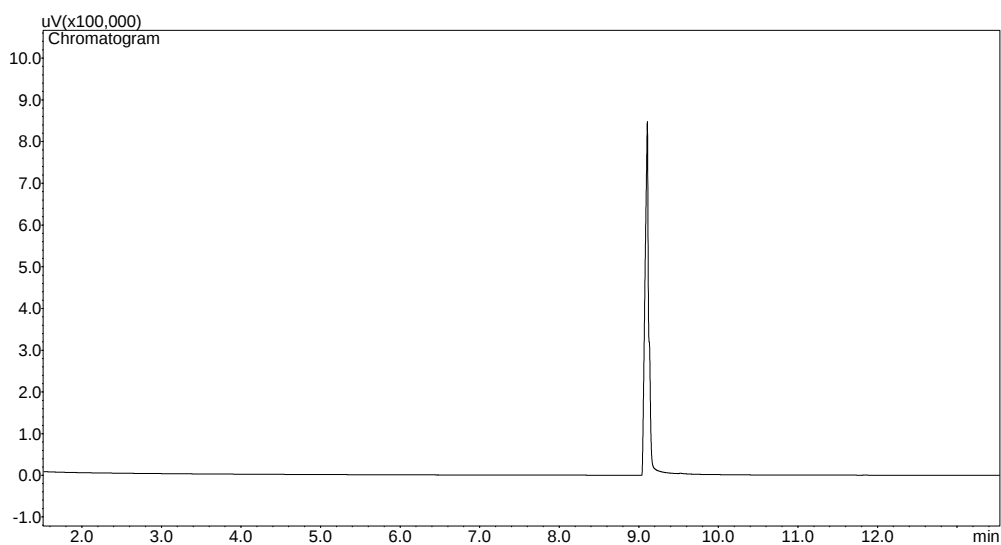
Padrão benzoato de 2-acetoxipropila
(t_R : 10,829 min; 97% de área)



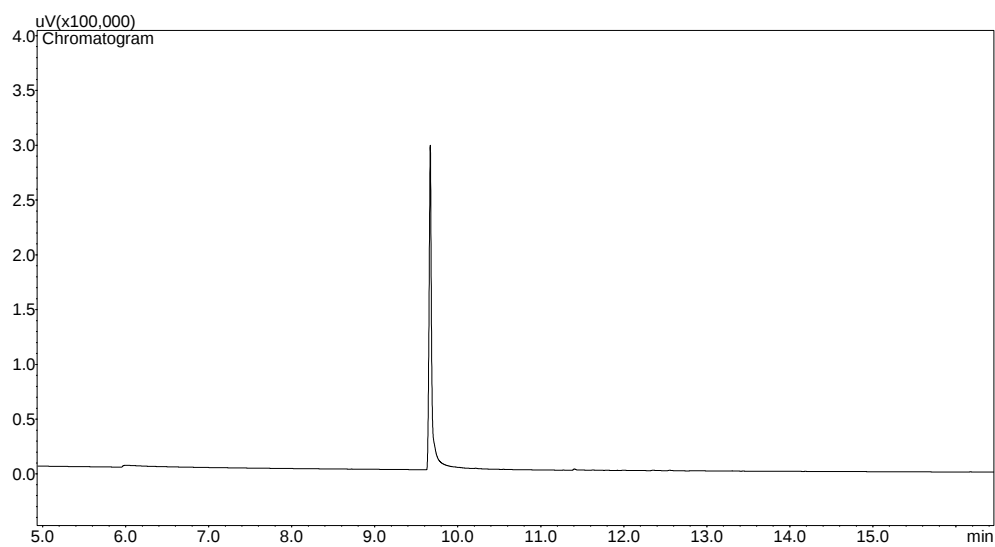
Padrão oleato de 2-hidroxipropila
(t_R : 19,048 min; 93 % de área)



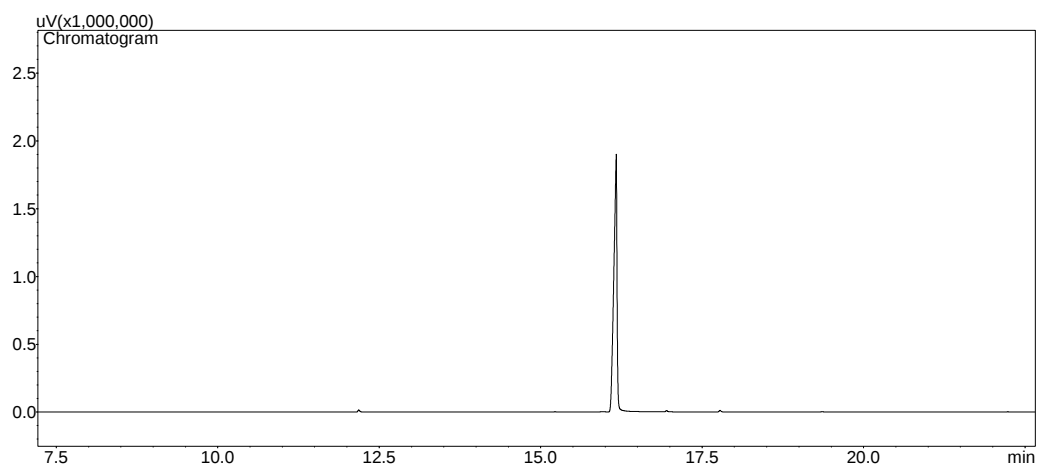
Padrão oleato de 2-oleoiloxipropila
(t_R : 34,062 min.; 15 % de área) e (t_R : 39,975 min.; 81 % de área)



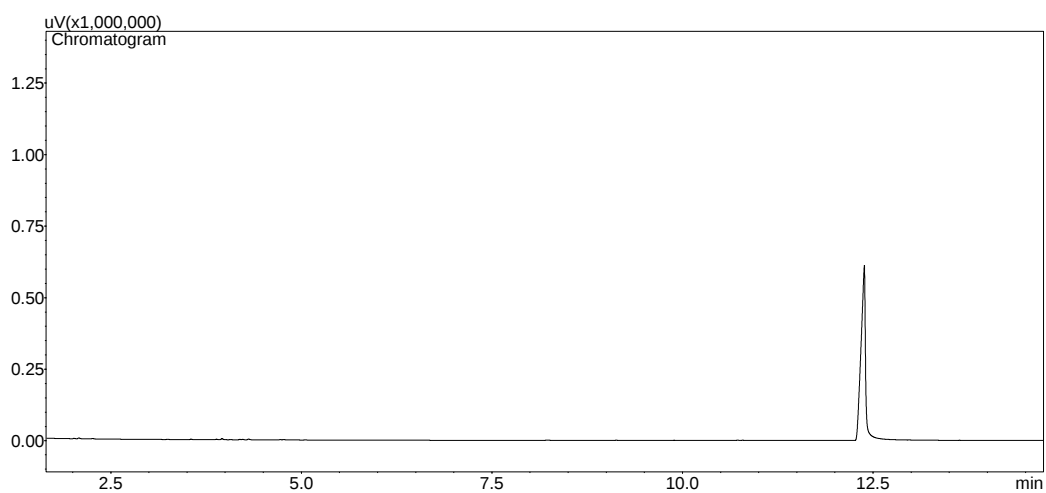
Padrão benzoato de 2-hidroxipropila (t_R : 9,107 min.)



Padrão capríloato de 2-hidroxipropila (t_R : 9,669 min.)



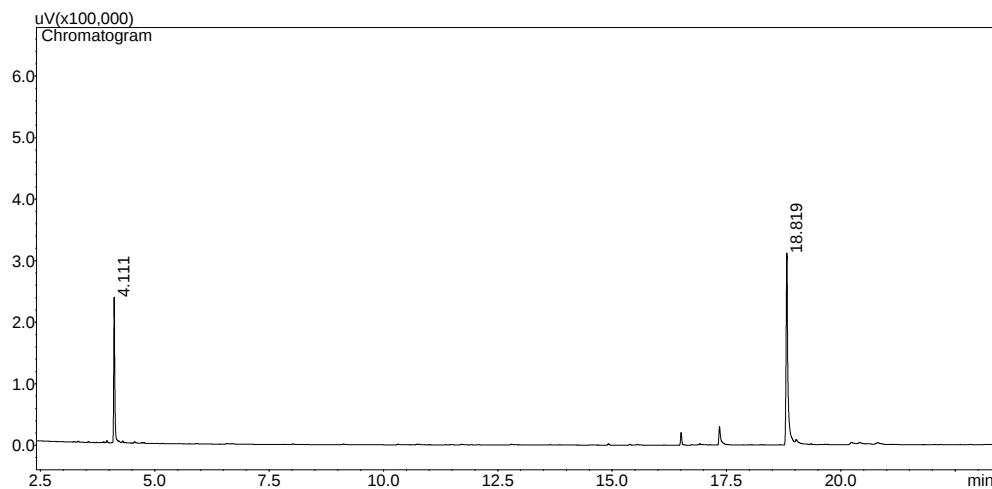
Padrão capríloato de 2-capríloiloxipropila (t_R : 16,169 min.)



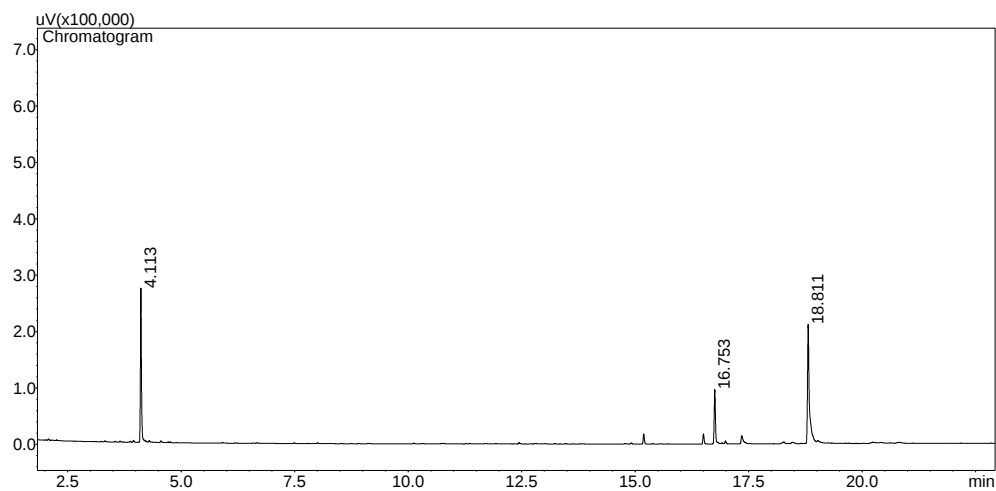
Padrão *p*-anisoato de 2-hidroxiopropila (t_R : 12,385 min.)

9.2 Cromatogramas das cinéticas realizadas

9.2.1 Isopropanólise do oleato de 2-hidroxiopropila

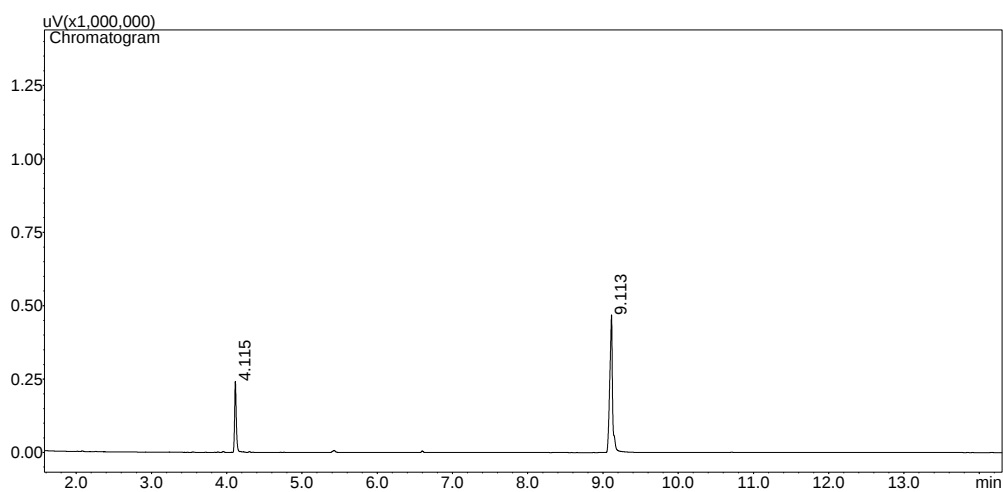


Cromatograma da reação de isopropanólise do oleato de 2-hidroxiopropila via N435 em 67 % hexano/TBME à t.a; tempo inicial. Oleato de 2-hidroxiopropila (18,82 min.); acetofenona (4,11 min.).

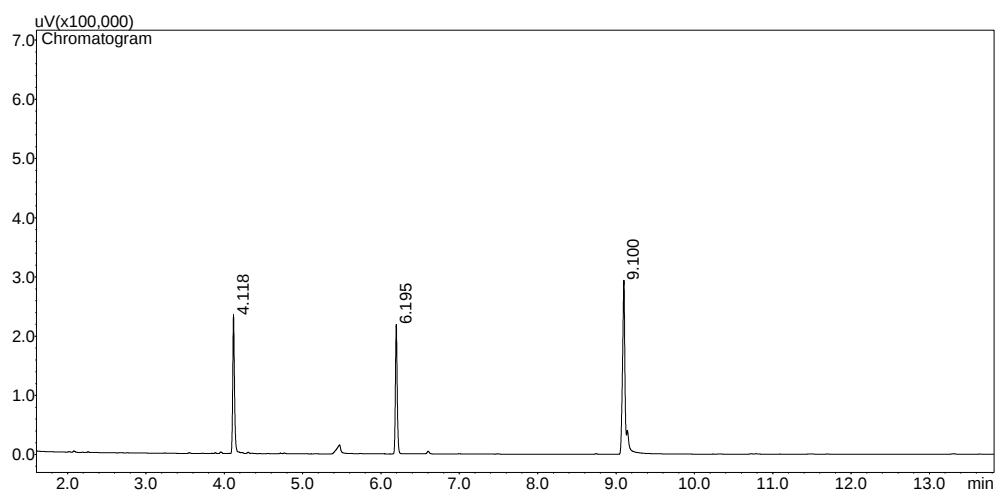


Cromatograma da reação de isopropanólise do oleato de 2-hidroxiopropila via N435 em 67 % hexano/ TBME à t.a; 38 % conversão. Oleato de 2-hidroxiopropila (18,81 min.);oleato de isopropila (16,75 min.); acetofenona (4,11 min.).

9.2.2 Isopropanólise do capriloato de 2-hidroxiopropila

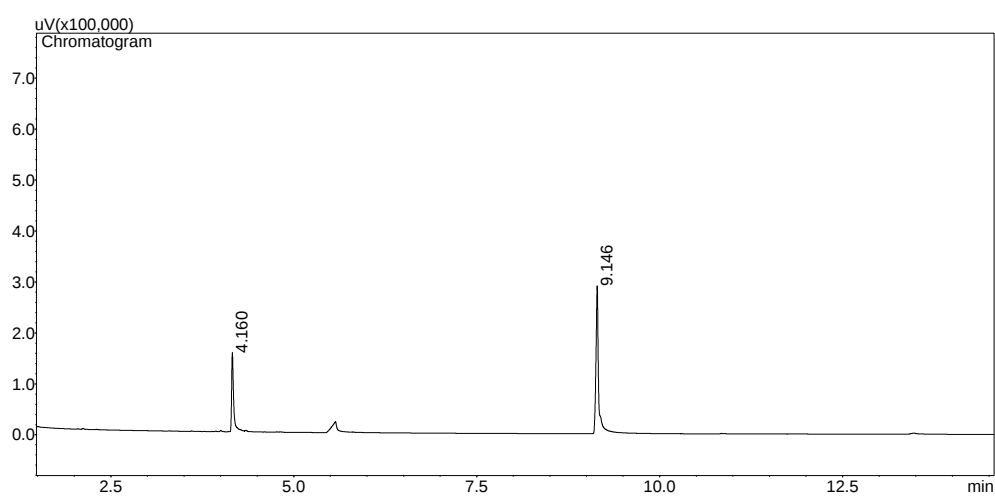


Cromatograma da reação de isopropanólise do capriloato de 2-hidroxiopropila via N435 em 67 % hexano/ TBME à t.a; tempo inicial. Capriloato de 2-hidroxiopropila (9,11 min.); acetofenona (4,11 min.).

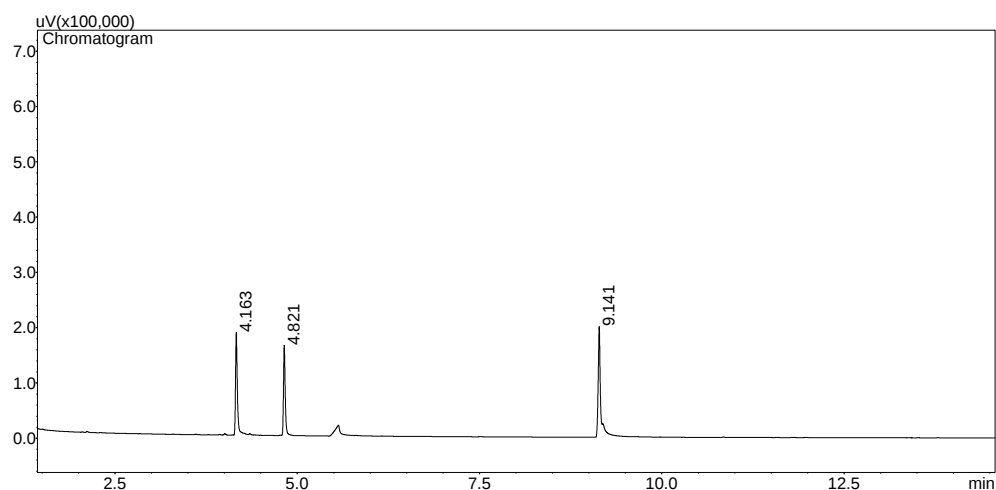


Cromatograma da reação de isopropanólise do capriloato de 2-hidroxiopropila via N435 em 67 % hexano/ TBME à t.a; 41 % conversão. Capriloato de 2-hidroxiopropila (9,01 min.); capriloato de isopropila (6,19 min.); acetofenona (4,11 min.).

9.2.3 Metanólise do capriloato de 2-hidroxiopropila

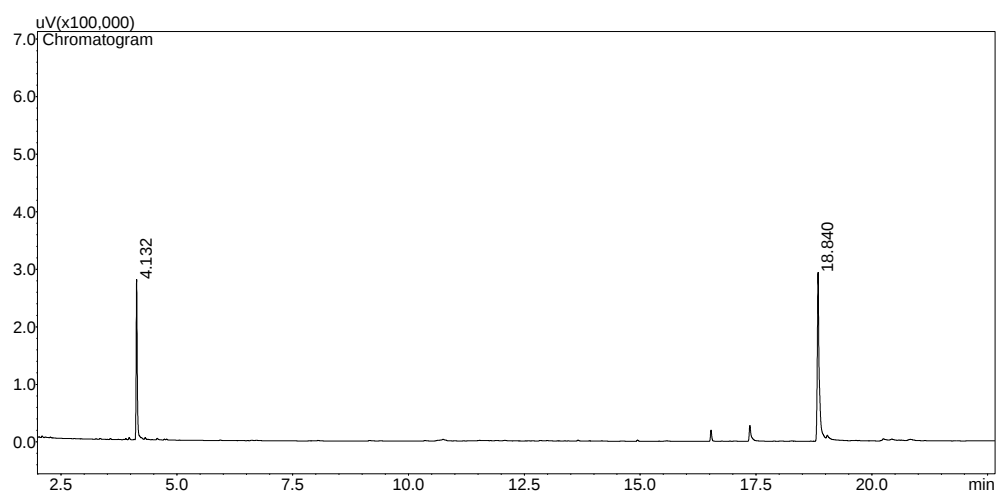


Cromatograma da reação de metanólise do capriloato de 2-hidroxiopropila via N435 em 67 % hexano/ TBME à t.a; tempo inicial. Capriloato de 2-hidroxiopropila (9,15 min.); acetofenona (4,16 min.).

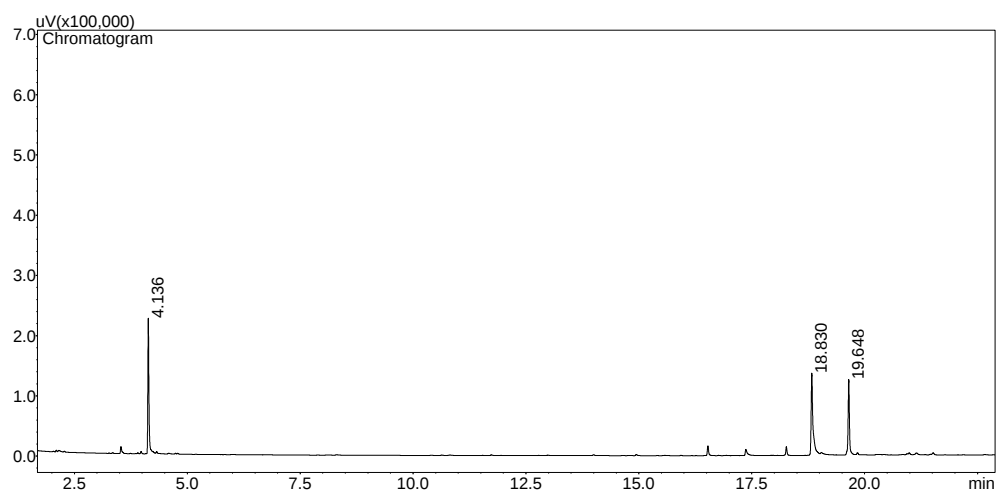


Cromatograma da reação de metanólise do caprilato de 2-hidroxipropila via N435 em 67 % hexano/ TBME à t.a; 37 % conversão. Caprilato de 2-hidroxipropila (9,14 min.); caprilato de metila (4,82 min.); acetofenona (4,16 min.).

9.2.4 Transesterificação do oleato de 2-hidroxipropila

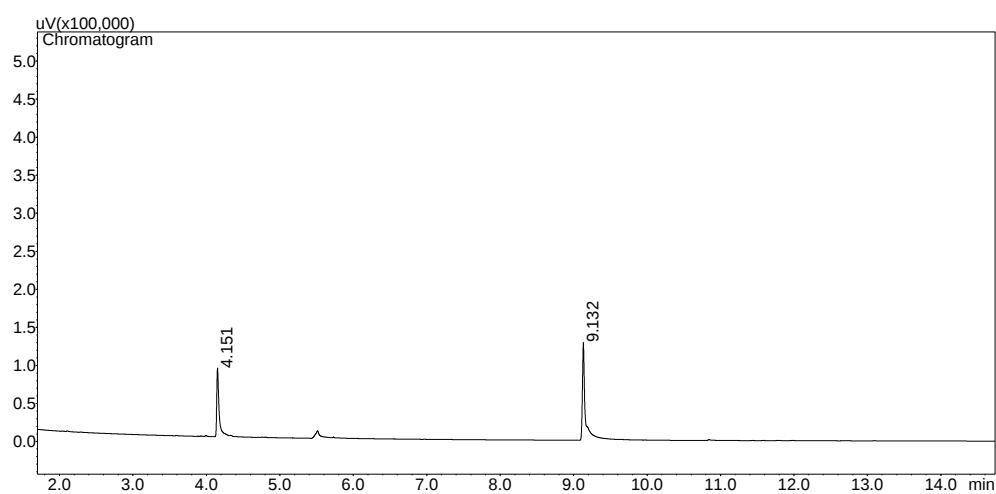


Cromatograma da reação de transesterificação do oleato de 2-hidroxipropila com acetato de vinila via N435 em 67 % hexano/ TBME à t.a; tempo inicial. Oleato de 2-hidroxipropila (18,84 min.); acetofenona (4,13 min.).

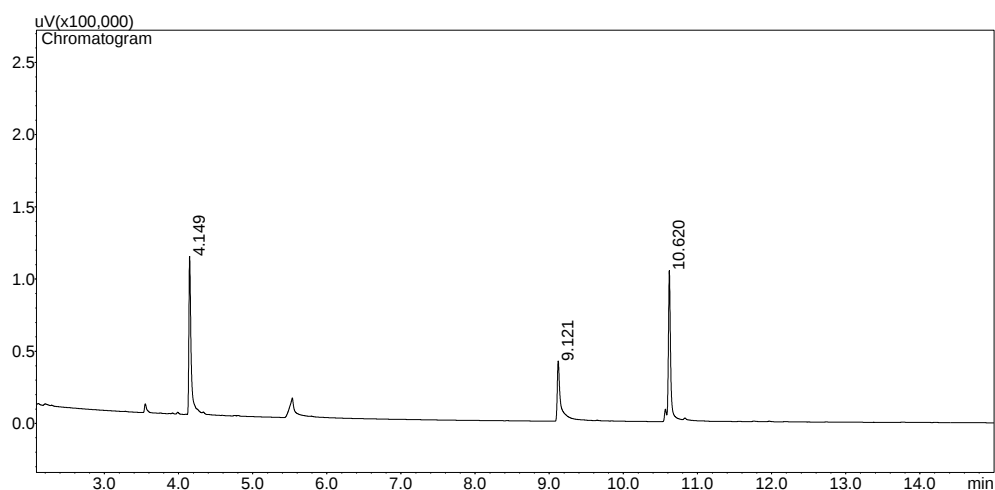


Cromatograma da reação de transesterificação do oleato de 2-hidroxipropila com acetato de vinila via N435 em 67 % hexano/ TBME à t.a; 42 % conversão. Oleato de 2-hidroxipropila (18,84 min.); oleato de 2-acetoxipropila (19,65 min.); acetofenona (4,14 min.).

9.2.5 Transesterificação do capriloato de 2-hidroxipropila

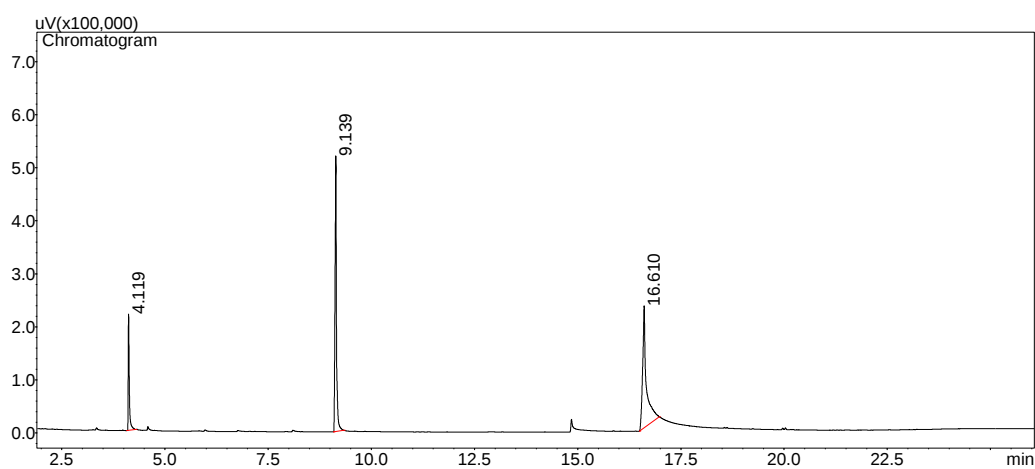


Cromatograma da reação de transesterificação do capriloato de 2-hidroxipropila via N435 em 67 % hexano/ TBME à t.a; tempo inicial. Capriloato de 2-hidroxipropila (9,13 min.); acetofenona (4,15 min.).

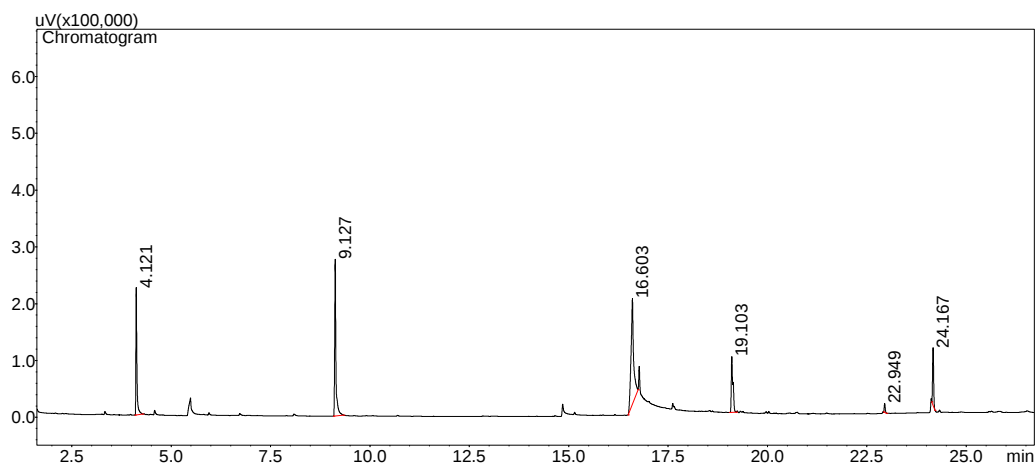


Cromatograma da reação de transesterificação do caprilato de 2-hidroxipropila com acetato de vinila via N435 em 67 % hexano/ TBME à t.a; 69 % de conversão. Caprilato de 2-hidroxipropila (9,12 min.); caprilato de 2-acetoxipropila (10,62 min.); acetofenona (4,15 min.).

9.2.6 Esterificação do benzoato de 2-hidroxipropila com ácido oléico

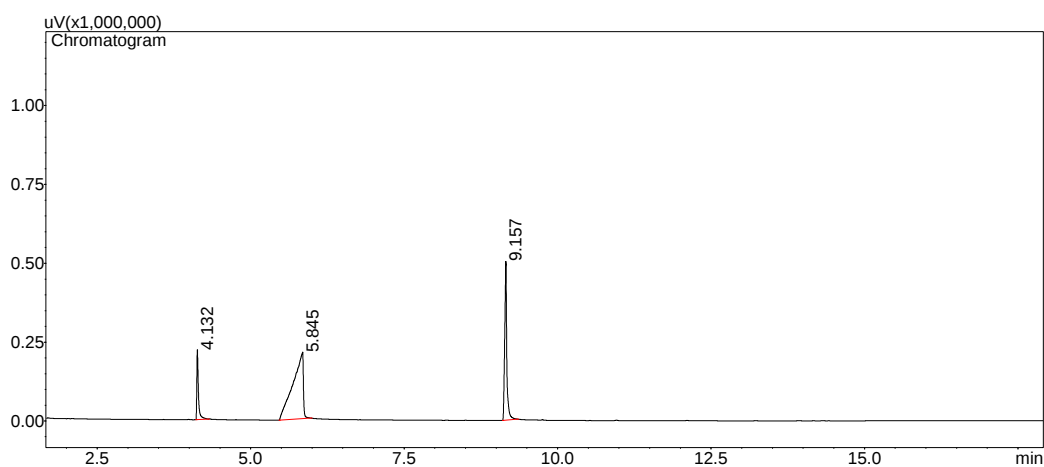


Cromatograma da reação de esterificação do benzoato de 2-hidroxipropila com ácido oléico via N435 em 67 % hexano/ TBME à t.a; tempo inicial. Benzoato de 2-hidroxipropila (9,14 min.); ácido oléico (16, 61 min.); acetofenona (4, 12 min.).

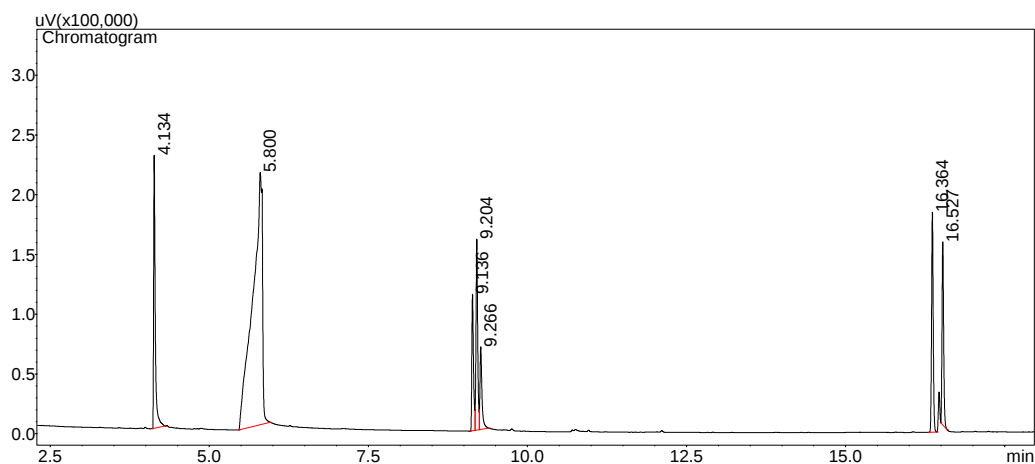


Cromatograma da reação de esterificação do benzoato de 2-hidroxipropila com ácido oléico via N435 em 67 % hexano/ TBME à t.a; 52 % de conversão. Benzoato de 2-hidroxipropila (9,13 min.); ácido oléico (16, 60 min.); benzoato de 2-oleoiloxipropila (22,95-24,17 min.); acetofenona (4, 12 min.).

9.2.7 Esterificação do benzoato de 2-hidroxipropila com ácido caprílico

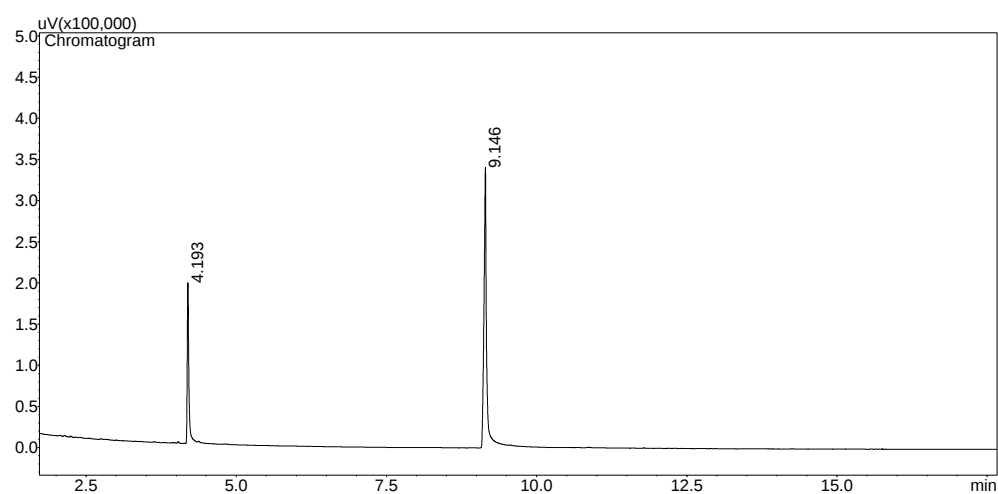


Cromatograma da reação de esterificação do benzoato de 2-hidroxipropila com ácido caprílico via N435 em 67 % hexano/ TBME à t.a; tempo inicial. Benzoato de 2-hidroxipropila (9,16 min.); ácido caprílico (5,84 min.); acetofenona (4,13 min.).

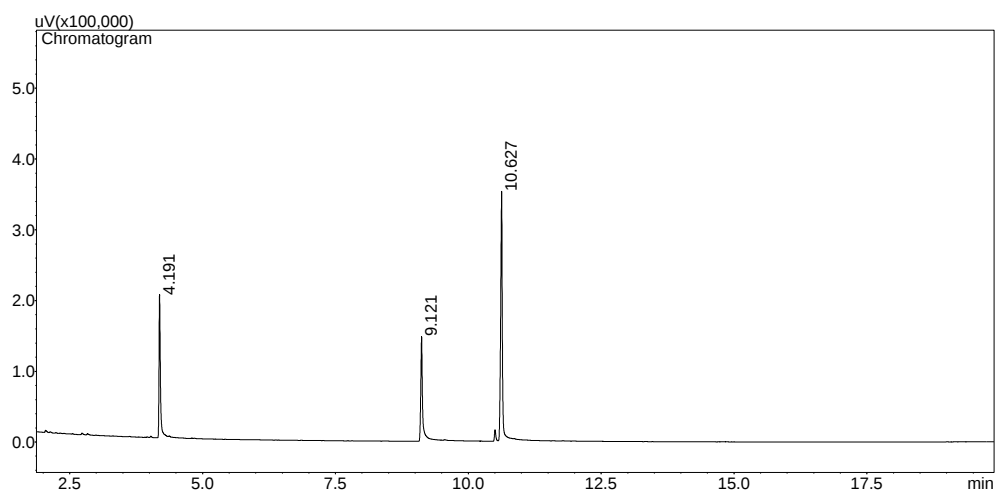


Cromatograma da reação de esterificação do benzoato de 2-hidroxipropila com ácido caprílico via N435 em 67 % hexano/ TBME à t.a; 83 % de conversão. Benzoato de 2-hidroxipropila (9,14 min.); ácido caprílico (5,80 min.); benzoato de 2-capriloiloxipropila (16,53 min.); acetofenona (4,13 min.).

9.2.8 Transesterificação do benzoato de 2-hidroxipropila com acetato de vinila

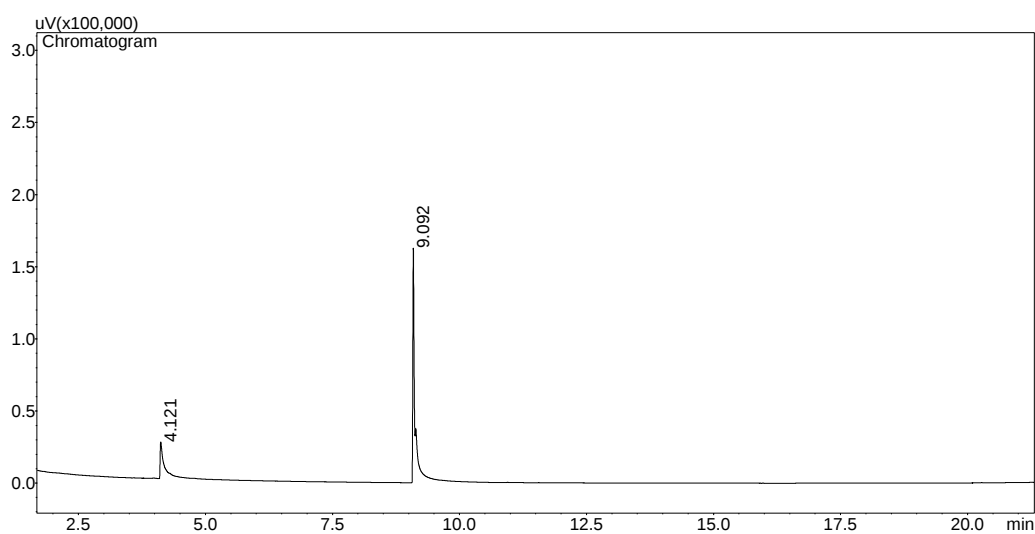


Cromatograma da reação de transesterificação do benzoato de 2-hidroxipropila com acetato de vinila via N435 em 67 % hexano/ TBME à t.a; tempo inicial. Benzoato de 2-hidroxipropila (9,15 min.); acetofenona (4,19 min.).

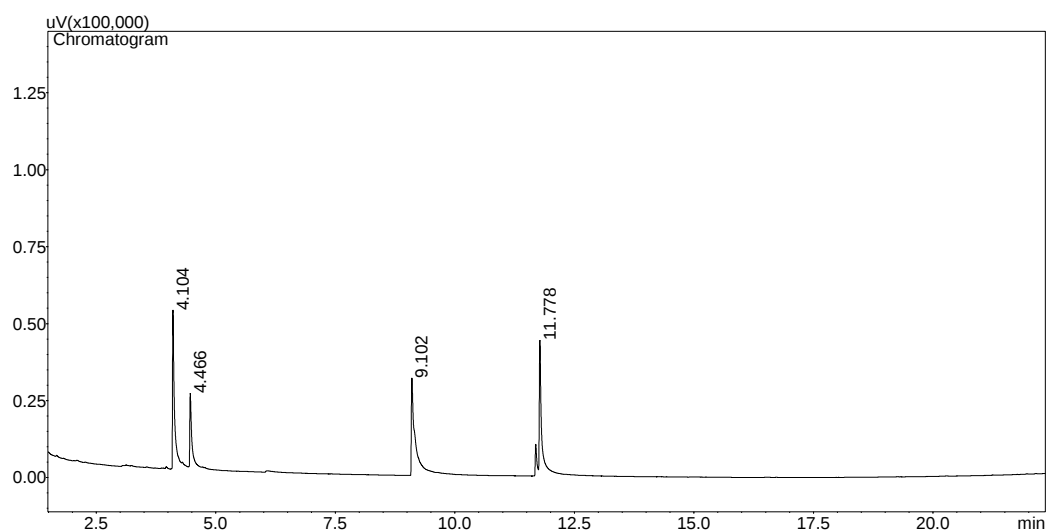


Cromatograma da reação de transesterificação do benzoato de 2-hidroxiopropila com acetato de vinila via N435 em 67 % hexano/ TBME à t.a; 66 % de conversão. Benzoato de 2-hidroxiopropila (9,12 min.); benzoato de 2-acetoxiopropila (10,63 min); acetofenona (4,19 min.).

9.2.9 Alcoxycarbonilação do benzoato de 2-hidroxiopropila

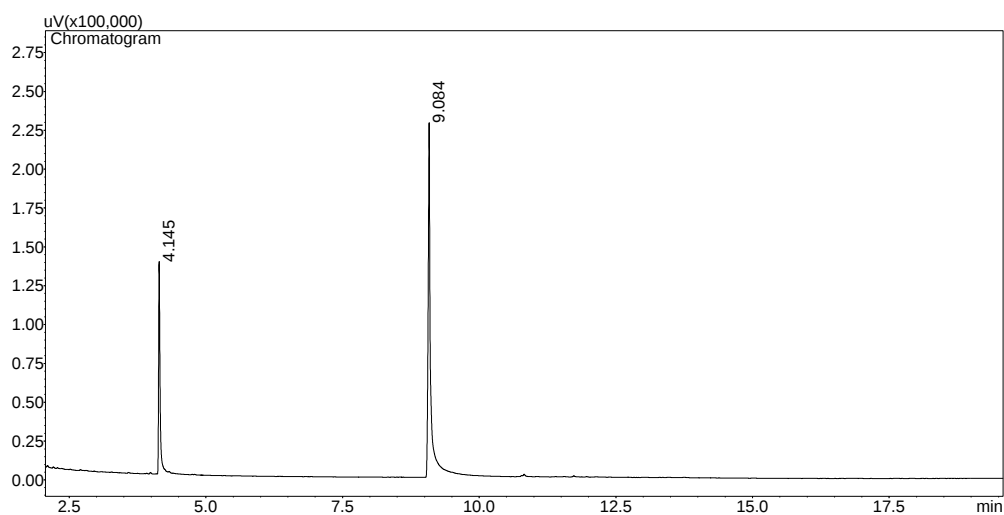


Cromatograma da reação de alcoxycarbonilação do benzoato de 2-hidroxiopropila com DMC via N435 em 60 % TBME/hexano à t.a; tempo inicial. Benzoato de 2-hidroxiopropila (9,09 min.); acetofenona (4,12 min.)

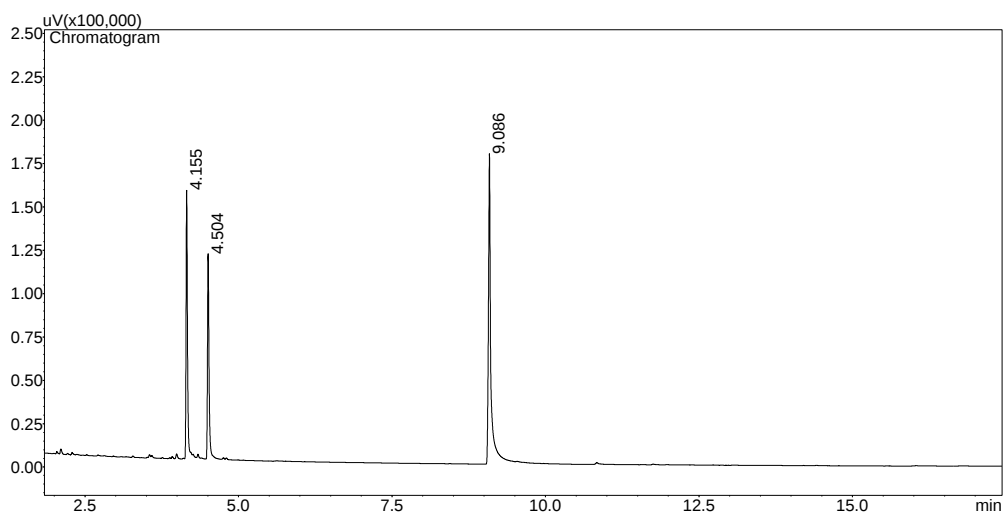


Cromatograma da reação de transesterificação do oleato de 2-hidroxipropila com acetato de vinila via N435 em 60 % TBME/ hexano à t.a; 77 % conversão. Benzoato de 2-hidroxipropila (9,10 min.); acetofenona; benzoato de 2-metoxicarboniloxipropila (11,78 min.); benzoato de metila (4,47 min.); acetofenona (4,10 min.)

9.2.10 Metanólise do benzoato de 2-hidroxipropila

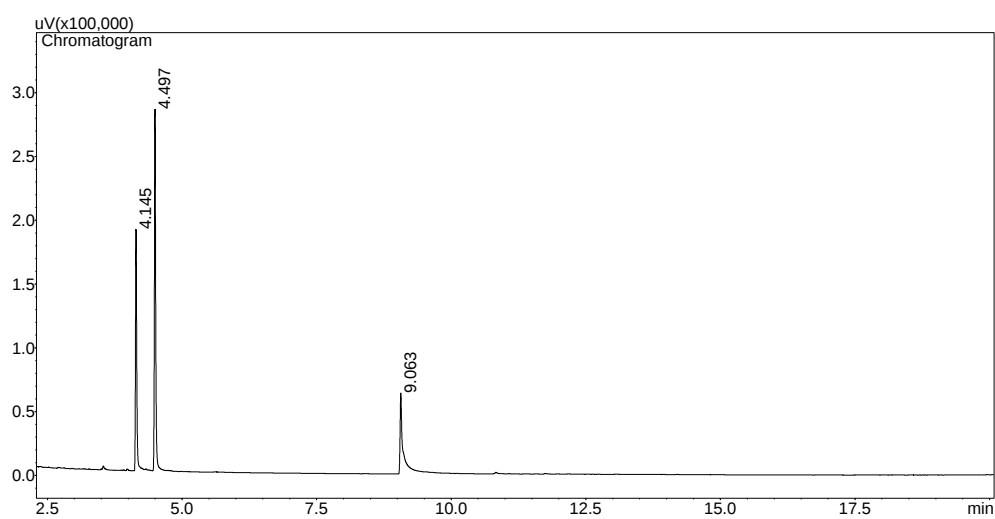


Cromatograma da reação de metanólise do benzoato de 2-hidroxipropila via N435 em 67 % hexano/ TBME à t.a; tempo inicial. Benzoato de 2-hidroxipropila (9,08 min.); acetofenona (4,14 min.).



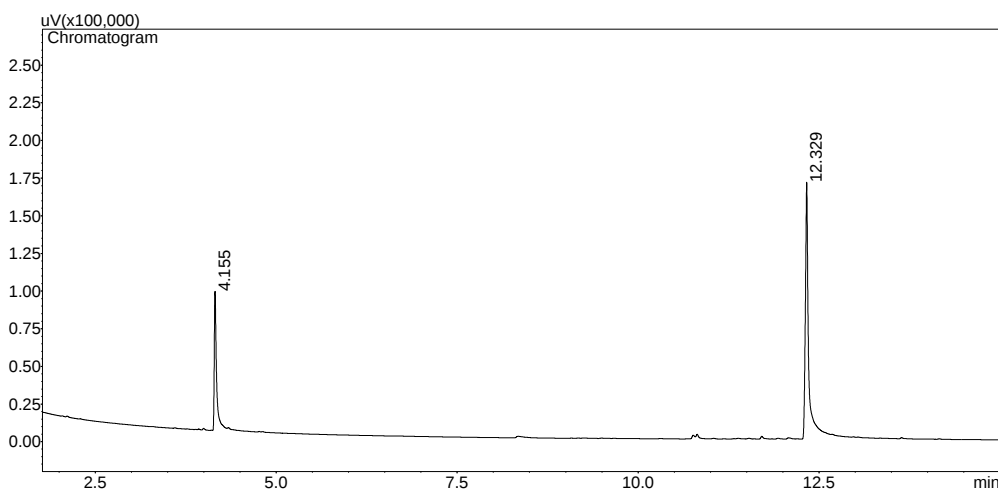
Cromatograma da reação de metanólise do benzoato de 2-hidroxipropila via N435 em 67 % hexano/TBME à t.a; 43 % conversão. Benzoato de 2-hidroxipropila (9,08 min.); benoato de metila (4,50 min.); acetofenona (4,16 min.).

.

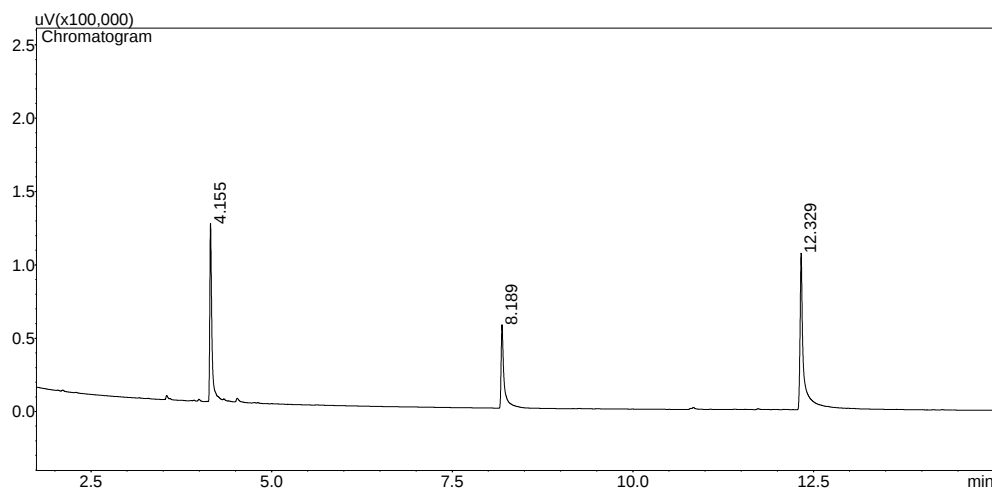


Cromatograma da reação de metanólise do benzoato de 2-hidroxipropila via N435 em 67 % hexano/TBME à t.a; 75 % conversão. Benzoato de 2-hidroxipropila (9,06 min.); benoato de metila (4,50 min.); acetofenona (4,14 min.).

9.2.11 Metanólise do *p*-anisoato de 2-hidroxipropila

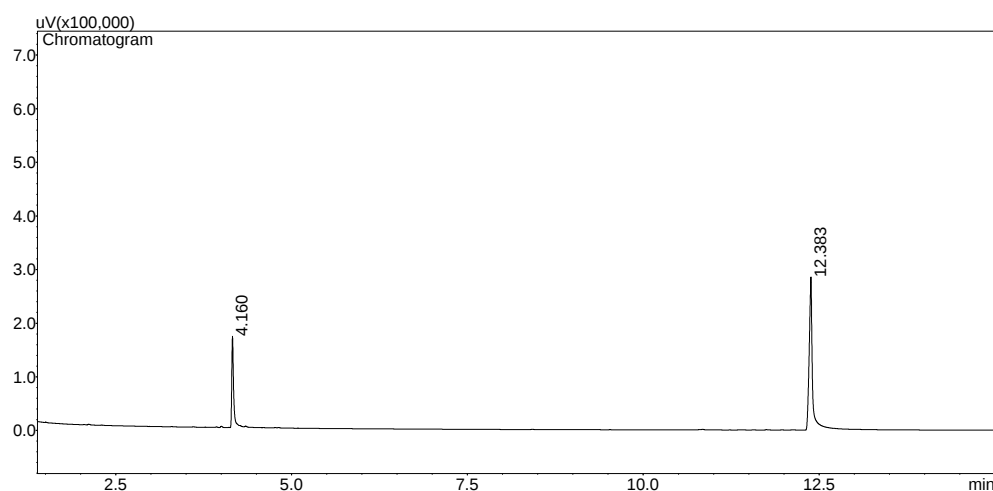


Cromatograma da reação de metanólise do *p*-anisoato de 2-hidroxipropila via N435 em 67 % hexano/TBME à t.a; tempo inicial. *p*-Anisoato de 2-hidroxipropila (12,33 min.); acetofenona (4,16 min.).

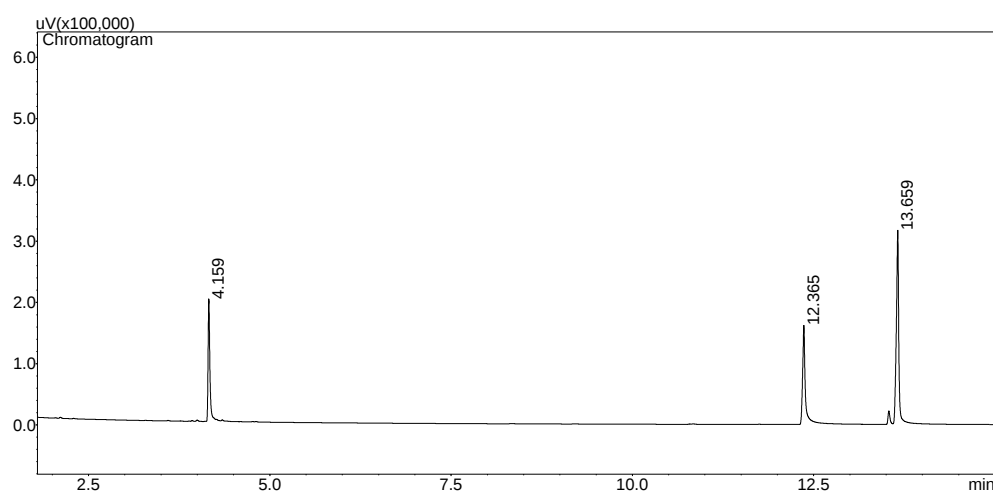


Cromatograma da reação de metanólise do *p*-anisoato de 2-hidroxipropila via N435 em 67 % hexano/TBME à t.a; 50 % de conversão. *p*-Anisoato de 2-hidroxipropila (12,33 min.); *p*-anisoato de metila (8,19 min.); acetofenona (4,16 min.).

9.2.12 Transesterificação do *p*-anisoato de 2-hidroxiopropila

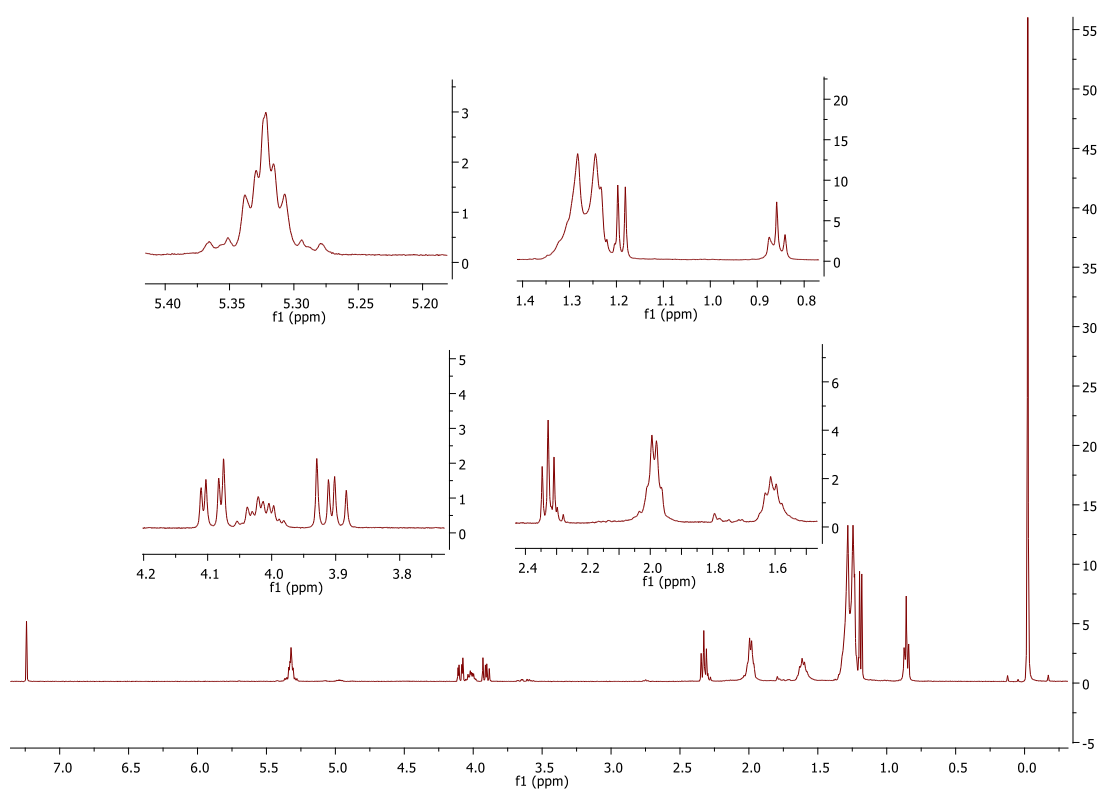


Cromatograma da reação de transesterificação do *p*-anisoato de 2-hidroxiopropila com acetato de vinila via N435 em 67 % hexano/ TBME à t.a; tempo inicial. *p*-Anisoato de 2-hidroxiopropila (12,38 min.); acetofenona (4,16 min.).

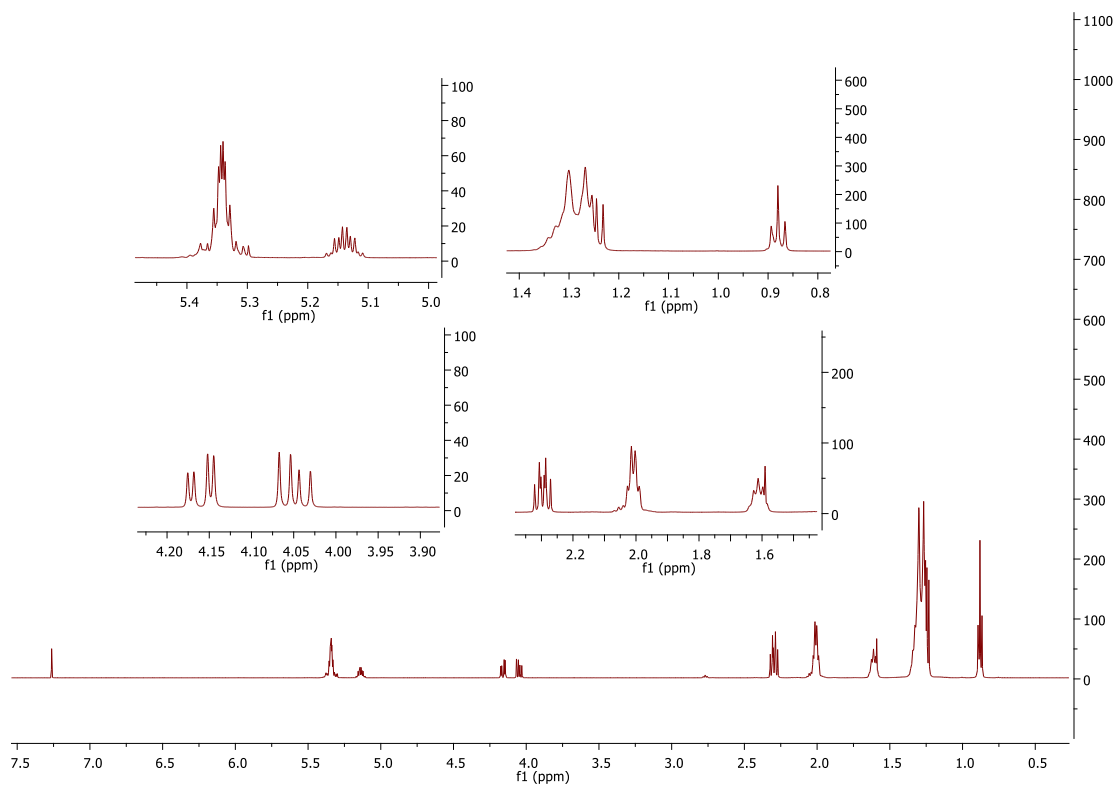


Cromatograma da reação de transesterificação do *p*-anisoato de 2-hidroxiopropila com acetato de vinila via N435 em 67 % hexano/ TBME à t.a; 59 % conversão. *p*-Anisoato de 2-hidroxiopropila (13,66 min.); *p*-anisoato de 2-acetoxiopropila (13,66 min.); acetofenona (4,16 min.).

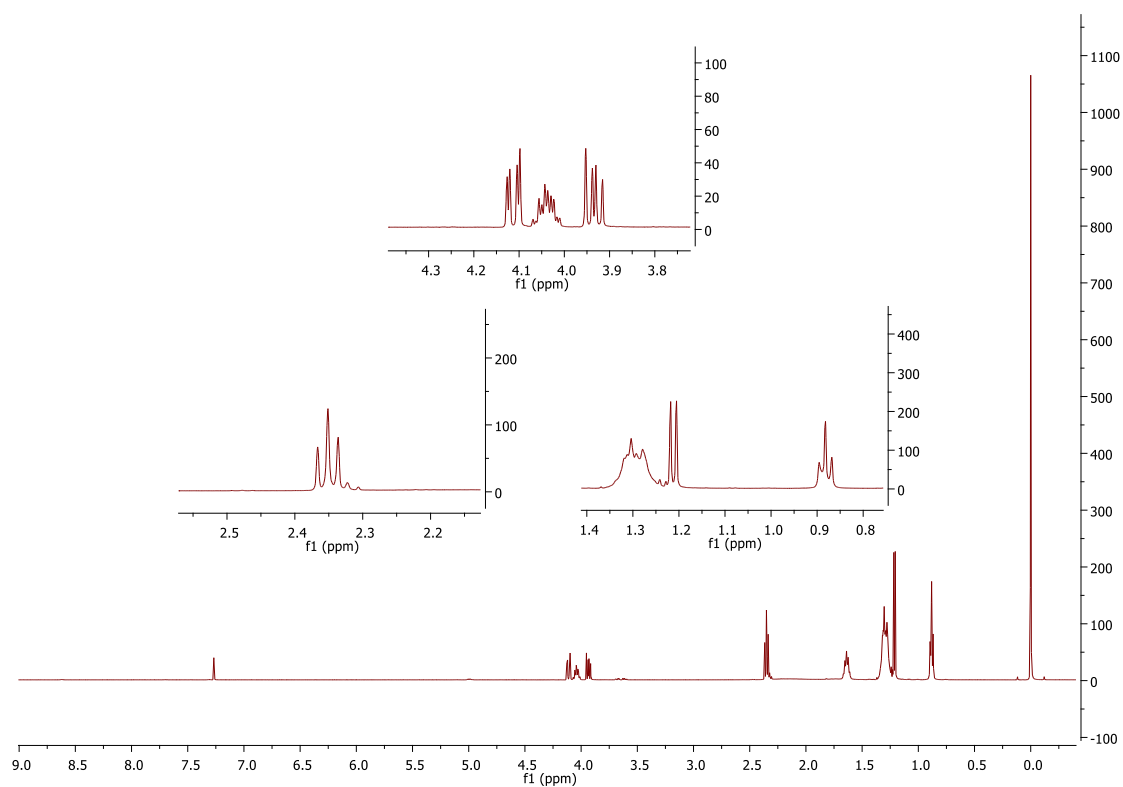
9.3 Espectros de RMN de ^1H das substâncias sintetizadas como padrões de análise e substratos enzimáticos ou isoladas das reações de cinéticas enzimáticas



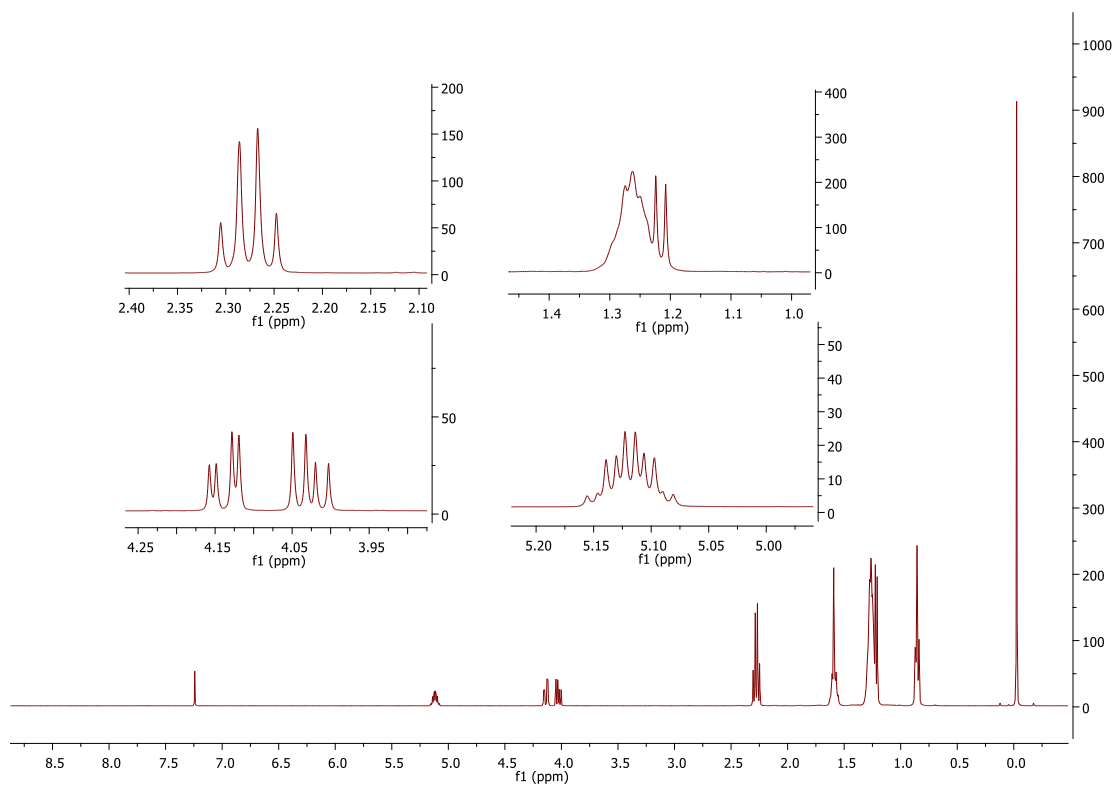
Espectro de RMN de ^1H (400 MHz; CDCl_3) do oleato de 2-hidroxipropila.



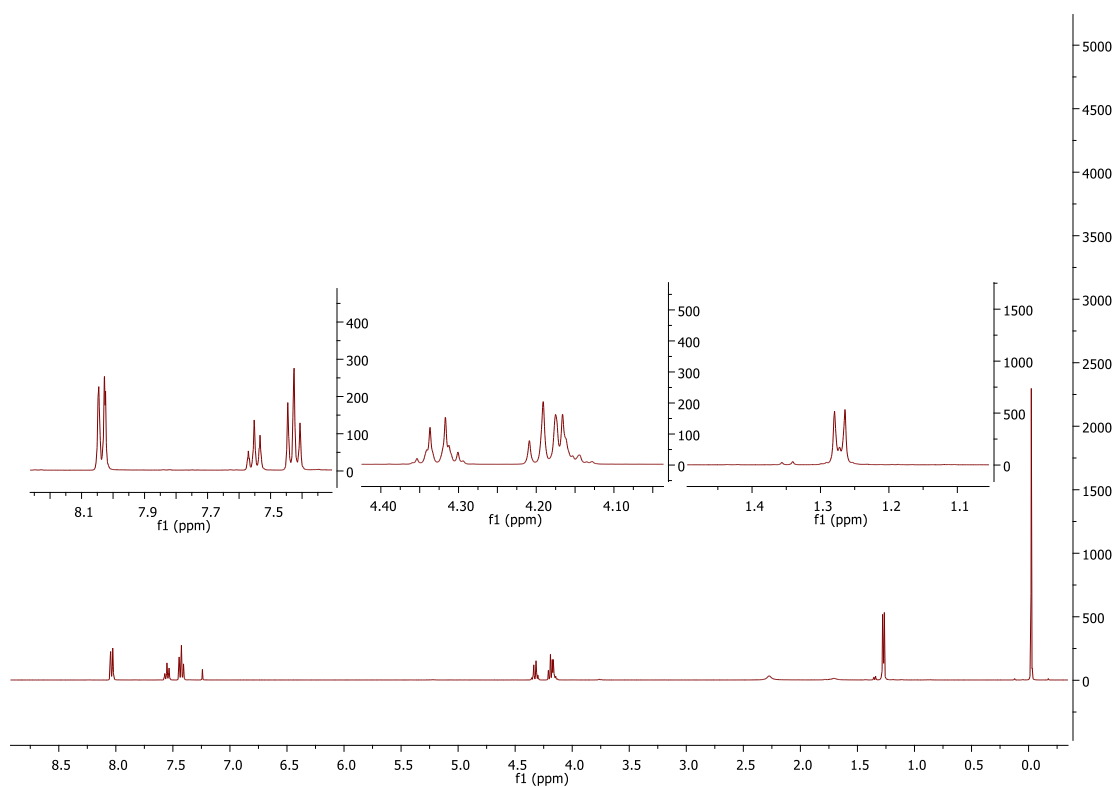
Espectro de RMN de ^1H (400 MHz; CDCl_3) do oleato de 2-oleoiloxipropila.



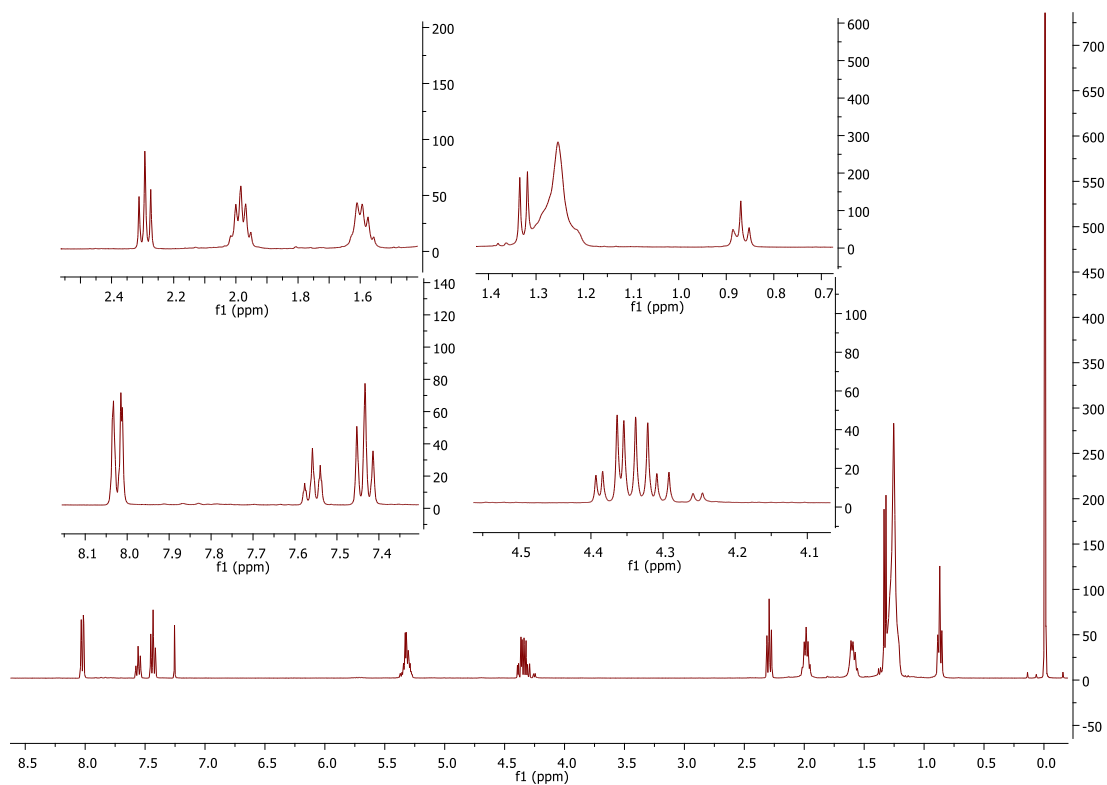
Espectro de RMN de ^1H (400 MHz; CDCl_3) do capriloato de 2-hidroxipropila.



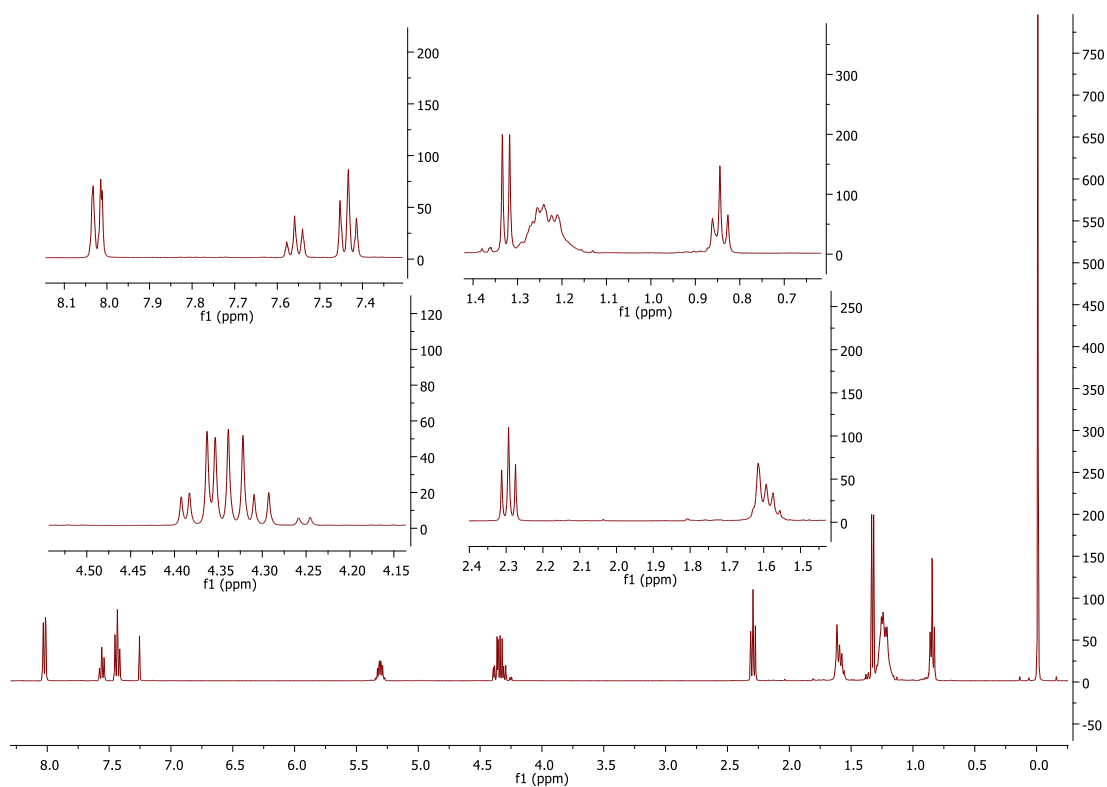
Espectro de RMN de ^1H (400 MHz; CDCl_3) do capriloato de 2-capriloioxipropila.



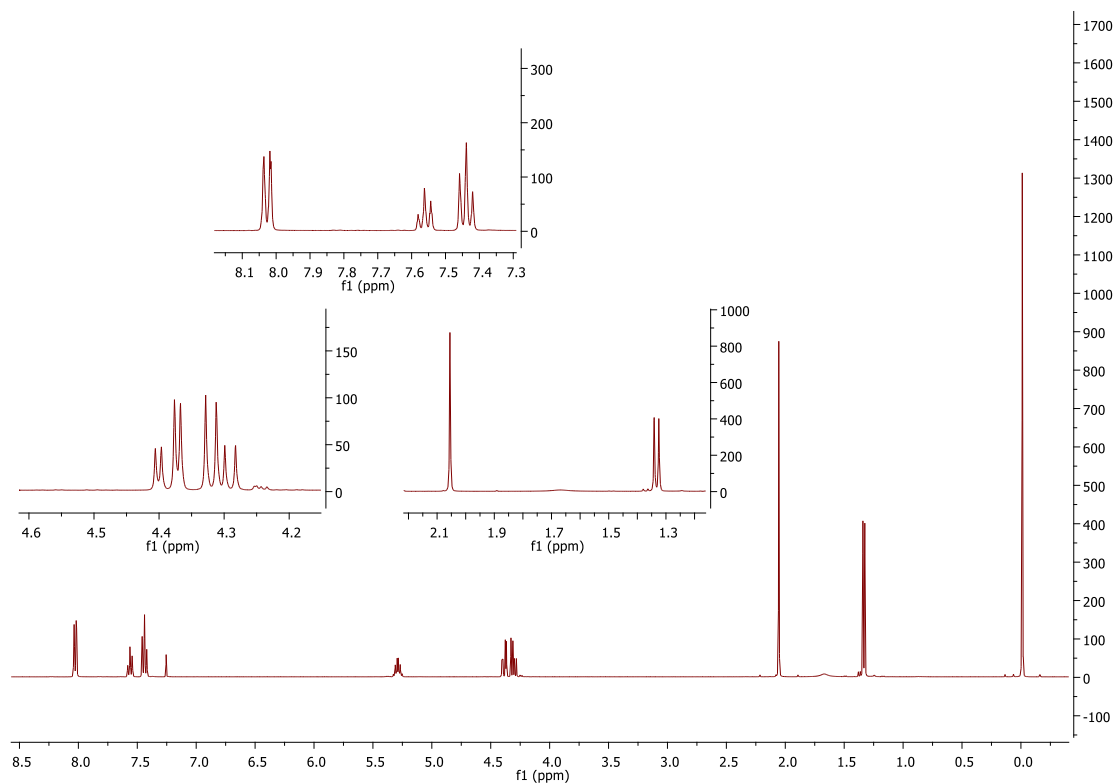
Espectro de RMN de ^1H (400 MHz; CDCl_3) do benzoato de 2-hidroxipropila.



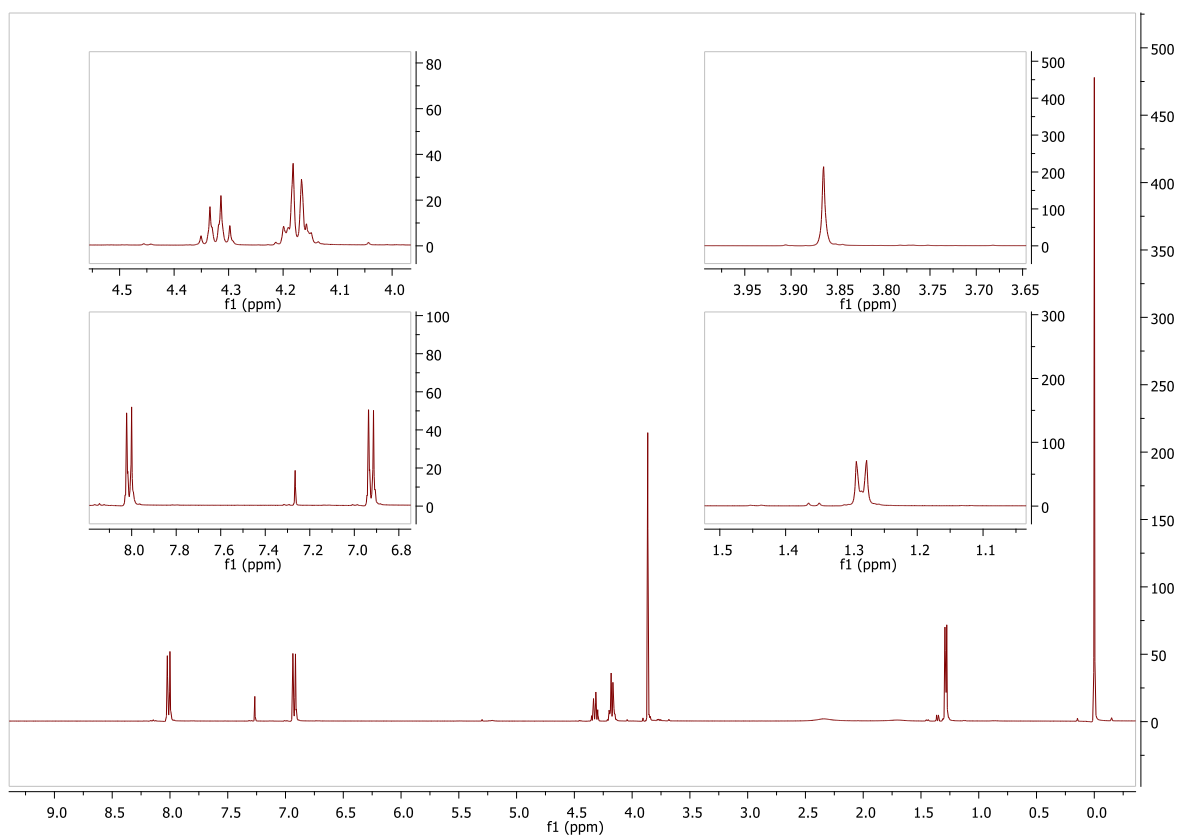
Espectro de RMN de ^1H (400 MHz; CDCl_3) do benzoato de 2-oleoiloxipropila.



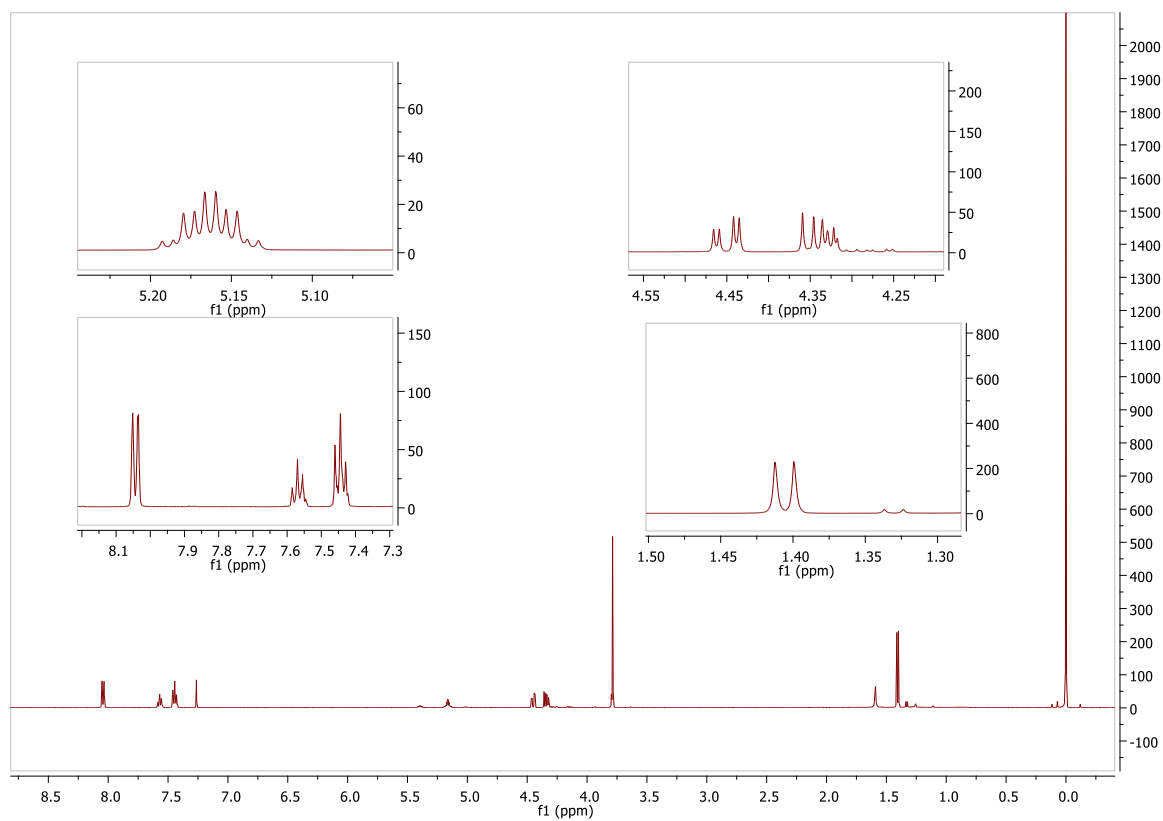
Espectro de RMN de ^1H (400 MHz; CDCl_3) do benzoato de 2-capriloloxipropila.



Espectro de RMN de ^1H (400 MHz; CDCl_3) do benzoato de 2-acetoxipropila.



Espectro de RMN de ^1H (400 MHz; CDCl_3) do *p*-anisoato de 2-hidroxipropila.



Espectro de RMN de ^1H (400 MHz; CDCl_3) do benzoato de 2-metoxicarboniloxipropila.