

Carlos Geovanni Alves Ledra

**RESOLUÇÃO DE DERIVADOS DO 1-FENILETANOL COM  
LIPASES IMOBILIZADAS EM MATERIAIS POLIMÉRICOS**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós Graduação em Química da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup>. Maria da Graça  
Nascimento

Florianópolis  
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

Ledra, Carlos Giovanni ALves

Resolução de derivados do 1-feniletanol com lipases  
imobilizadas em materiais poliméricos [dissertação] /  
Carlos Giovanni ALves Ledra ; orientadora, Maria da Graça  
Nascimento - Florianópolis, SC, 2012.

137 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.  
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Biocatálise. 3. Resolução cinética  
enzimática. I. Nascimento, Maria da Graça. II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Química. III. Título.

Carlos Geovanni Alves Ledra

**RESOLUÇÃO DE DERIVADOS DO 1-FENILETANOL COM  
LIPASES IMOBILIZADAS EM MATERIAIS POLIMÉRICOS**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “**Mestre em Química**”, e aprovada em sua forma final pelo **Programa Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 12 de dezembro de 2012.

---

Prof. Dr. Almir Spinelli  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria da Graça Nascimento  
Orientadora  
UFSC

---

Prof. Dr. Hugo O. Gallardo  
UFSC

---

Prof. Dr. Paulo César de Jesus  
FURB

---

Prof. Dr. Ricardo José Nunes  
UFSC



## AGRADECIMENTOS

Ao caos e a ordem de tudo, que movido por uma energia misteriosa, bem ou mal fez todos nós reunirmo-nos em torno deste trabalho.

A Universidade Federal de Santa Catarina, pelo apoio institucional e espaço físico fornecido.

Ao CNPQ, INCT-Catálise e CAPES, pelo suporte financeiro.

A Amano e Novozymes, pela doação das enzimas.

A Central de Análises, pelas variadas análises realizadas.

Um agradecimento muito verdadeiro a minha Profa. e Orientadora Dra. Maria da Graça Nascimento, que além de todo o trabalho realizado junto, sempre foi uma amiga e de certa forma também Mãe.

Ao Prof. Dr. Valdir Soldi, do Laboratório de Materiais Poliméricos, pela doação da proteína de soja e da  $\beta$ -ciclodextrina.

Ao Prof. Dr. Boris U. Stambuk, do Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de leveduras, pela compra de alguns reagentes.

A Profa. Elisa H. S. Moecke do DCTA-UFSC pelos ensinamentos básicos na extração e caracterização do amido de batata-aipo.

Aos Professores do Dep. de Química que contribuíram para minha formação acadêmica.

Ao Alex (Latino) por estar sempre disposto a me ajudar, quando eu pedia para fazer só uns IV's (no LaCFI, coordenado pelo Prof. Dr. Faruk Nome). E ao Vicente que sempre arranjava um tempinho a mais no RMN de H1 (Central de Análises-UFSC), para eu poder conferir meus produtos o mais rápido possível. E também aos diversos amigos mantidos e gerados neste período de mestrado, aos quais aqui não citarei nomes, pois qualquer pessoa que se sinta agraciada com estas palavras, com certeza é meu amigo.

Aos amigos do laboratório de Biocatalise: César, Cris, Damianni, Fabiola, Fernanda, Jaque, Julyetty, Mayara, Thiago e Vanessa, por dividirem pacificamente o espaço, sempre estarem dispostos a conversas e a divisão da vida.

A Aline, que além de dividir o tempo e espaço de forma integral comigo, também foi coautora e “balão” reacional da maior síntese que um ser humano pode realizar, a geração de uma vida! Estes sentimentos não podem ser medidos nem estudados com nenhum equipamento ultramoderno, apenas com corações bons e humildes. O Amor gerado

neste meio deve ser o sentimento mestre em todos os seres.

Ao Theo, mesmo não me ajudando com palavras, suas expressões e sorrisos valem mais que qualquer frase, pois sua compreensão passa primeiramente pelo coração e não pelos ouvidos.

Aos meus Pais, Carlos e Cláudia, os mais importantes nesta jornada, pois me geraram, educaram e ajudaram a criar esta minha visão de mundo. Muitas “antenas” geradas lá na criação deles, hoje são capazes fazer um “tunning” fino para captar os sentimentos e as energias de maior beleza.

## RESUMO

Neste trabalho, a lipase comercial de *Burkholderia cepacia* (LBC) foi imobilizada nas blendas de amido/PEO e proteína de soja/PEO, na presença ou ausência de  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD). Estes sistemas foram usados como catalisadores na acilação do 3-nitro-1-feniletanol [(*R,S*)-**15b**] e do 3,4-metilenodioxo-1-feniletanol [(*R,S*)-**16b**] com diferentes doadores acilas (acetato de vinila, acetato de etila, acetato de isopropenila, propionato de vinila, laurato de vinila e estearato de vinila), na presença de t-butil metil éter (MTBE). Foram avaliadas a variação molar do álcoois em relação ao acetato de vinila, uso da LBC não imobilizada ou suportada em diversos filmes, efeito da temperatura e a reação na ausência da LBC.

Todas as reações utilizando a LBC, apresentaram excelente excesso enantioméricos dos produtos ( $ee_p > 99\%$ ) e razão enantiomérica ( $E > 200$ ), no estudo da razão molar álcool: acetato de vinila. Acima da razão molar 1:2, as conversões foram similares, sendo de 31-50% para o (*R*)-éster **15c** e de 45-50% para o (*R*)-éster **16c**.

Ao utilizar a LBC imobilizada em diversos filmes, as conversões em (*R*)-éster **15c** e **16c** foram dependentes dos suportes. Foram obtidas conversões baixas (2-14%) com a LBC imobilizada em filmes de amido e carboximetil celulose (CMC). Os melhores resultados foram obtidos com a LBC imobilizada nos filmes de amido/PEO e proteína de soja/PEO, sendo de 28-50%. Na presença de  $\beta$ -CD, as conversões foram de 32-50%.

Na ausência da lipase, não foi observada a formação dos produtos, independente do suporte usado. Porém, ao usar as blendas de proteína de soja/PEO, as conversões foram de 3%. Para as reações com a LBC na forma livre, as conversões aos (*R*)-éster **15c** e (*R*)-éster **16c** foram de 4% e 18%, em 48h.

Ao usar as temperaturas de 25°, 35° e 45° C, as conversões aos produtos variaram de 16-40%, 28-50% e 26-41% para o (*R*)-éster **15c** e de 27-40%, 37-50% e 33-44% para o (*R*)-éster **16c**, respectivamente.

As lipases de *Burkholderia cepacia* (LPS-SD), de *Mucor Javanicus* (LMJ 10), de *Pseudomonas fluorescens* (LAK 20), de *Aspergillus niger* (LAN 12), de *Candida cylindracea* (LAY 30) e de *Thermomyces lanuginosus* (LTL-IM), foram imobilizadas nos filmes de amido/PEO (1/1 m/m) e proteína de soja/PEO (1/1 m/m), com ou sem  $\beta$ -CD. Estes sistemas, foram usados na reação de transesterificação do acetato de vinila com (*R,S*)-**15b**. Ao usar as lipases LAY 30, LMJ 10 e LAN 12, as conversões foram de 0-20%, com  $ee_p$  de 65-86%. Ao usar as lipases

LPS-SD, LAK 20 e LTL-IM, todos os  $ee_p$  foram >99%, e maior conversão foi obtida com o sistema LPS-SD/proteína de soja/PEO/ $\beta$ -CD (40%).

Avaliou-se o efeito do solvente orgânico na reação do acetato de vinila com (*R,S*)-**15b**, catalisada pela LBC suportada nas blendas citadas no estudo anterior. Com o uso do *t*-butanol, ciclohexano, éter diisopropílico e acetona, as conversões foram de moderadas a boas (19-50%). Na presença de THF, as conversões foram de 2-10%. Não foi observada relação direta com os valores de  $\log P$  dos solventes.

Os álcoois racêmicos 3-nitro-1-feniletanol (**15b**), 3,4-metilenodioxo-1-feniletanol (**16b**), 4-nitro-1-feniletanol (**17b**), 4-metil-1-feniletanol (**18b**), 4-bromo-1-feniletanol (**19b**) e o 4-métoxi-1-feniletanol (**20b**) foram usados em reações com acetato de vinila. Como catalisador foi utilizado a LBC imobilizada em filmes de amido/PEO (1/1 m/m) e proteína de soja/PEO (1/1 m/m), na presença ou ausência de  $\beta$ -CD. As conversões aos produtos foram maiores na presença de grupos doadores de elétrons. Em 24h, as conversões ao (*R*)- éster **17c** (4-nitro) foram de 17-29% e do (*R*)- éster **16c** (3,4-metilenodioxo) variaram de 37-45%.

A LBC, imobilizada em quatro (4) suportes diferentes, foi reutilizada após 30 e 90 dias de estocagem a temperatura ambiente em *n*-hexano, na reação do acetato de vinila com (*R,S*)-**15b** em MTBE. Após 30 dias, as conversões ao (*R*)-éster **15c** variaram de 20-43%, e após 90 dias de 11-27%.

Concluindo, os resultados obtidos mostraram que as blendas de amido/PEO (1/1 m/m) e proteína de soja/PEO (1/1 m/m) com ou sem  $\beta$ -CD puderam ser usadas como suportes para diferentes lipases. Esses sistemas foram também usados, com sucesso, na resolução de vários álcoois racêmicos derivados do 1-feniletanol sob condições brandas de reação, e puderam ser reutilizados.

**Palavras-chave:** Biocatálise. Resolução Cinética Enzimática. Lipases. Imobilização.

## ABSTRACT

In this study, commercial lipase obtained from *Burkholderia cepacia* (LBC) was immobilized in starch/PEO and soybean protein/PEO blends, in the presence or absence of  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD). These systems were used as biocatalyst in the acylation of 3-nitro-1-phenylethanol [(*R,S*)-**15b**] and 3,4-methylenedioxy-1-phenylethanol [(*R,S*)-**16b**] with various acyl donors (vinyl acetate, ethyl acetate, *isopropenyl* acetate, vinyl propionate, vinyl laurate and vinyl stearate) in the presence of methyl tert-butyl ether (MTBE). The influence of the alcohol:vinyl acetate molar ratio, the use of LBC, free or immobilized in different films (or blends) and the effect of temperature were studied. The reaction was also carried out in the absence of LBC.

In the studies on the alcohol: vinyl acetate molar ratio are used the LBC, in all reactions the enantiomeric excess of products ( $ee_p > 99\%$ ) and the enantiomeric ratio were excellent ( $E > 200$ ). The values for the conversion to products were dependent on this parameter. Using a molar ratio of 1:2 or higher, the conversion degrees were similar, these being 31-50% for (*R*)-ester **15c** and 45-50% to (*R*)-ester **15c**.

When LBC immobilized in various films was used the conversion degrees to (*R*)-esters **15c** and **16c** were dependent on the support. With the use of starch or carboxymethyl cellulose (CMC) as the support the conversions were low (2-14%). Best results were achieved when LBC was immobilized in starch/PEO or soybean protein/PEO films, these being of 28-50%. With the presence of  $\beta$ -CD in the films, the conversions were 32-50%.

In the absence of lipase, no product was detected regardless of the support used. However, when the soybean protein/PEO blends were used, the conversion was 3%. Using free LBC, the conversion degrees to (*R*)-esters **15c** and **16c** in 48h were 4% and 18%, respectively.

With the application of temperatures of 25°, 35° and 45° C the conversion degrees were 16-40%, 28-50% and 26-41% for (*R*)-ester **15c** and 27-40%, 37-50% and 33-44% for (*R*)-ester **16c**, respectively.

The lipases obtained from *Burkholderia cepacia* (LPS-SD), *Mucor Javanicus* (LMJ 10), *Pseudomonas fluorescens* (LAK 20), *Aspergillus niger* (LAN 12), *Candida cylindracea* (LAY 30) and *Thermomyces lanuginosus* (LTL-IM) were immobilized in starch/PEO(1/1 m/m) and soybean protein/PEO (1/1 m/m) blends in the presence or absence of  $\beta$ -CD. These systems were then used in the transesterification reaction of vinyl acetate with (*R,S*)-**15b**. Using LAY 30, LMJ 10 and LAN 12 lipases the conversion degrees were 0-20%, with an  $ee_p$  of 65-86%.

With the use of LPS-SD, LAK 20 and LTL-IM lipases the  $ee_p$  was >99%, and the highest conversion (40%) was obtained using the soybean protein/PEO/ $\beta$ -CD.

The solvent effect was evaluated in the reaction of vinyl acetate with (*R,S*)-**15b**, catalyzed by LBC immobilized in the blends used in the previous study. With the use of *t*-butanol, cyclohexane, di-*is*opropyl ether and acetone the conversion degrees were moderate or good (19-50%). In the presence of THF the conversion degrees were 2-10%. No direct relation with the solvent log *P* values was observed.

The racemic alcohols 3-nitro-1-phenylethanol (**15b**), 3,4-methylenedioxy -1- phenylethanol (**16b**), 4-nitro-1-phenylethanol (**17b**), 4-methyl-1-phenylethanol (**18b**), 4-bromo-1-phenylethanol (**19b**) and 4-methoxy-1-phenylethanol (**20b**) were used in the transesterification reaction of vinyl acetate with (*R,S*)-**15b**. LBC was immobilized in starch/PEO (1/1 m/m) and soybean protein/PEO (1/1 m/m) blends, in the presence or absence of  $\beta$ -CD. The conversion degrees into products were higher in the presence of electron donor groups. In 24 h the degrees of conversion to (*R*)-ester **17c** were 17-29% and to R-ester **16c** were 37-45%.

LBC immobilized in four different supports was reused after 30 and 90 days of storage at room temperature in *n*-hexane, in the reaction of vinyl acetate with (*R,S*)-**15b** in MTBE. The conversion degrees for (*R*)-ester **15c** were 20-43% after 30 days of storage and 11-27% after 90 days of storage.

In conclusion, the results obtained show that the starch/PEO (1/1 m/m) and soybean protein/PEO (1/1 m/m) blends, in the presence or absence of  $\beta$ -cyclodextrin, can be used as supports for various lipases. These systems were also used successfully in the resolution of racemic alcohols derived from 1-phenylethanol, under mild reaction conditions, and the possibility of their reused was verified.

**Keywords:** Biocatalysis. Enzymatic Kinetic Resolution. Lipases. Immobilization.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Representações gráficas das estruturas tridimensionais de uma enzima. (Adaptado da referência 7).....	2
<b>Figura 2</b> - Diagrama de energia de uma reação não catalisada (linha preta) e catalisada por enzima (linha vermelha).....	5
<b>Figura 3</b> - Modelo de encaixe induzido para a ligação do substrato à enzima. (adaptado da referência 7).....	6
<b>Figura 4</b> - Modelo de micro reator para a produção de L-2, com as paredes incrustadas de células íntegras de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ...	8
<b>Figura 5</b> - Representação esquemática da estrutura tridimensional e ampliação do sítio ativo da lipase de <i>Psychrobacter</i> sp. (Adaptado da referência 45.) .....	13
<b>Figura 6</b> - Estruturas de fármacos vendidos em sua forma enantiomérica pura.....	17
<b>Figura 7</b> – Representação esquemática do sítio ativo da lipase de <i>Candida antarctica</i> B ligado a um álcool secundário em uma reação de transesterificação. Acima à esquerda e abaixo na direita estão representados os modos produtivos.....	19
<b>Figura 8</b> – Principais métodos e matérias para imobilização de enzimas. (Adaptado da referência 8).....	22
<b>Figura 9</b> - Exemplos de tubérculos fornecedores de amido. ....	23
<b>Figura 10</b> - Observação microscópica de amidos de diferentes origens. ....	24
<b>Figura 11</b> - Estrutura da amilose (a) e da amilopectina (b). ....	25
<b>Figura 12</b> - Estruturas moleculares e dimensões das $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -CD. ....	29
<b>Figura 13</b> - Cromatograma do ( <i>R,S</i> ) 3-nitro-1-feniletanol (b) e ( <i>R,S</i> ) acetato (a). Em A são apresentados os padrões obtidos por métodos químicos e em B o de uma alíquota da reação de transesterificação de <b>15b</b> com acetato de vinila, em 15 mL de MTBE, 50 mg LBC imobilizada em filme de amido/PEO (1:1 m/m), 35 °C, 100 rpm, 24% de conversão em <i>R-15c</i> . ....	44
<b>Figura 14</b> - Espectro de IV do ( <i>R,S</i> )-3-nitro-1-feniletanol ( <b>15b</b> ), KBr. ....	49

- Figura 15** - Espectro de RMN de  $H^1$  do (*R,S*)-3-nitro-1-feniletanol (**15b**) (400MHz,  $CDCl_3$ )..... 50
- Figura 16** - Cromatograma do (*R,S*)-3-nitro-1-feniletanol (**15b**) e do acetato (**15c**). Condições experimentais: Inj e Det = 220° C, volume da amostra 0,2 uL, split 1:100, isoterma de 135° C, pressão do gás carregador 19 psi..... 50
- Figura 17** - Espectro de IV do (*R,S*) acetato de 3-nitro-1-feniletila (**15c**), KBr..... 52
- Figura 18** - Espectro de RMN de  $H^1$  do (*R,S*) acetato de 3-nitro-1-feniletanol (**15c**) (200MHz,  $CDCl_3$ )..... 53
- Figura 19** - Efeito da razão molar de **15b**:acetato de vinila na obtenção do éster (*R*)-**15c**, catalisada pelo sistema LBC/amido/PEO (1/1 m/m). [(*R,S*)-**15b** (5mmol); acetato de vinila (5-40 mmol), LBC (50 mg), MTBE (15 mL), 35° C, 100 rpm] ■ - 24h; ● - 48h; □ - ees (24h) e ○ - ees (48h)..... 56
- Figura 20** - Efeito da razão molar de **15b**:acetato de vinila na obtenção do éster (*R*)-**15c**, catalisada pelo sistema LBC/prot. soja/PEO (1/1 m/m). [(*R,S*)-**15b** (5mmol); acetato de vinila (5-40 mmol), LBC (50 mg), MTBE (15 mL), 35° C, 100 rpm] ■ - 24h; ● - 48h; □ - ees (24h) e ○ - ees (48h)..... 57
- Figura 21** - Efeito da razão molar de **16b**:acetato de vinila na obtenção do éster (*R*)-**16c**, catalisada pelo sistema LBC/amido/PEO (1/1 m/m). [(*R,S*)-**16b** (5mmol); acetato de vinila (5-40 mmol), LBC (50 mg), MTBE (15 mL), 35° C, 100 rpm] ■ - 24h; ● - 48h; □ - ees (24h) e ○ - ees (48h)..... 58
- Figura 22** - Efeito da razão molar de **16b**:acetato de vinila na obtenção do éster (*R*)-**16c**, catalisada pelo sistema LBC/prot. soja/PEO (1/1 m/m). [(*R,S*)-**16b** (5mmol); acetato de vinila (5-40 mmol), LBC (50 mg), MTBE (15 mL), 35° C, 100 rpm] ■ - 24h; ● - 48h; □ - ees (24h) e ○ - ees (48h)..... 59
- Figura 23** - Efeito da temperatura na obtenção do éster (*R*)-**15c**. [(*R,S*)-**15b** (5mmol); acetato de vinila (10 mmol), LBC (50 mg), MTBE (15 mL), 100 rpm, 24h] ■ - amido/PEO, ● - proteína de soja/PEO, ▲ - amido/PEO/ $\beta$ -CD e ▼ - proteína de soja/PEO/ $\beta$ -CD; □; ○;  $\Delta$  e  $\nabla$ - eep. .... 67
- Figura 24** - Efeito da temperatura na obtenção do éster (*R*)-**15c**. [(*R,S*)-

**15b** (5mmol); acetato de vinila (10 mmol), LBC (50 mg), MTBE (15 mL), 100 rpm, 48h]. ■ - amido/PEO, ● - proteína de soja/PEO, ▲ - amido/PEO/ $\beta$ -CD e ▼ - proteína de soja/PEO/ $\beta$ -CD; □; ○; Δ e ▽- eep.  
..... 68

**Figura 25** - Efeito da temperatura na obtenção do éster (*R*)-**16c**. [(*R,S*)-**16b** (5mmol); acetato de vinila (10 mmol), LBC (50 mg), MTBE (15 mL), 100 rpm, 24h] ■ - amido/PEO, ● - proteína de soja/PEO, ▲ - amido/PEO/ $\beta$ -CD e ▼ - proteína de soja/PEO/ $\beta$ -CD; □; ○; Δ e ▽- eep.  
..... 69

**Figura 26** - Efeito da temperatura na obtenção do éster (*R*)-**16c**. [(*R,S*)-**16b** (5mmol); acetato de vinila (10 mmol), LBC (50 mg), MTBE (15 mL), 100 rpm, 48h] ■ - amido/PEO, ● - proteína de soja/PEO, ▲ - amido/PEO/ $\beta$ -CD e ▼ - proteína de soja/PEO/ $\beta$ -CD; □; ○; Δ e ▽- eep.  
..... 70

**Figura 27** - Estruturas químicas dos derivados do (*R,S*)-1-feniletanol.83



## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Rota quimio-enzimática para obtenção da ( <i>S</i> )-rivastigmina. ....	9
<b>Esquema 2.</b> Aminoação assimétrica da cetona <b>4</b> para obtenção do precursor ( <i>S</i> )- <b>5</b> da ( <i>S</i> )-rivastigmina. ....	10
<b>Esquema 3.</b> Possíveis produtos da hidrólise 1,3-específica catalisada por lipases. (Adaptado da referência 34.).....	12
<b>Esquema 4.</b> Representação do mecanismo de ação da $\alpha,\beta$ -hidrolases. ....	14
<b>Esquema 5.</b> Transesterificação enantiosseletiva de <b>6</b> com lipases em meio orgânico. (Adaptado da referência 50). ....	15
<b>Esquema 6.</b> Preparação dos filmes de amido/PEO ou PIS/PEO e imobilização das lipases. ....	36
<b>Esquema 7.</b> Reação de transesterificação biocatalisada dos ( <i>R,S</i> )-álcoois derivados do 1-feniletanol. ....	42
<b>Esquema 8.</b> Preparação do meio reacional e análise dos produtos obtidos na resolução enzimática dos álcoois ( <i>R,S</i> )- <b>15b-20b</b> . ....	43
<b>Esquema 9.</b> Redução das acetofenonas com NaBH <sub>4</sub> .....	48
<b>Esquema 10.</b> Preparação dos ( <i>R,S</i> )-acetatos derivados do 1-feniletanol pelo método químico. ....	51
<b>Esquema 11.</b> Obtenção dos <i>R</i> -acetatos derivados do 1-feniletanol.....	54



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação das enzimas de acordo com a UIBBM .....	4
<b>Tabela 2.</b> Determinação do teor de água nos filmes de amido/PEO e proteína de soja/PEO, na presença e ausência de $\beta$ -CD, com e sem lipase. ....	47
<b>Tabela 3.</b> Influência da imobilização da LBC em diferentes filmes e blendas na obtenção de <b>R-15c</b> . ....	62
<b>Tabela 4.</b> Influência da imobilização da LBC em diferentes filmes e blendas na obtenção de <b>R-16c</b> . ....	64
<b>Tabela 5.</b> Resolução do ( <i>R,S</i> )- <b>15b</b> com acetato de isopropenila. ....	72
<b>Tabela 6.</b> Resolução do ( <i>R,S</i> )- <b>16b</b> com acetato de isopropenila. ....	73
<b>Tabela 7.</b> Influência do uso de diversas lipases na conversão ao éster <b>R-15c</b> . ....	75
<b>Tabela 8.</b> Influência do solvente orgânico na conversão ao éster <b>R-15c</b> . ....	78



**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

- [BMIm][BF<sub>4</sub>] – tetrafluor borato de 1-butil-3-metil imidazólio  
[BMIm][NTf<sub>2</sub>] – triflimida de 1-butil-3-metil imidazólio  
[BMIm][PF<sub>6</sub>] – hexafluorfosfato de 1-butil-3-metil imidazólio  
A - alanina  
Asp - aspartato  
c% - porcentagem de conversão  
c.c.d. - cromatografia de camada delgada  
CD - ciclodextrina  
CGC – cromatografia gasosa quiral  
CMC – carbóxi metil celulose  
CTAB – brometo de cetiltrimetilamônio  
d – dubleto  
Da – unidade de massa atômica, um doze avos da massa do carbono.  
dd – duplo dubleto  
DNA – ácido desoxiribonucléico  
E – razão enantiomérica  
E.C. - enzyme comission  
E<sub>a</sub> – energia de ativação  
ee<sub>p</sub> – excesso enantiomérico do produto  
ee<sub>s</sub> – excesso enantiomérico do substrato  
FID – detector de ionização em chama  
Glu - glutamato  
His - histidina  
HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência  
Hz – hertz, unidade de frequência, ciclos por segundo  
IV - infravermelho  
J – constante de acoplamento  
LAN 12 – lipase de *Aspergillus niger*  
LAK 20 – lipase de *Pseudomonas fluorescens*  
LAY 30 – lipase de *Candida cylindracea*  
LBC – lipase de *Burkholderia cepacia*  
LMJ 10 – lipase de *Mucor javanicus*  
LPS-SD – lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em terra diatomácea  
Log *P* – logaritmo do coeficiente de partição  
LTL-IM – lipase de *Thermomyces lanuginosus*  
LWG – lipase de Wheat germ  
m – múltiplo  
MTBE – éter t-butil metílico

MW – micro ondas

NAD<sup>+</sup> - nicotinamida adenina dinucleótido

p.f. - ponto de fusão

PEO – poli(óxido de etileno)

pH – potencial hidrogeniônico

PIS – proteína isolada de soja

PLE – estearase do fígado do porco

ppm – partes por milhão

q – quarteto

qui – quinteto

Rf – fator de retenção

RMN de H<sup>1</sup> – ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RNA – ácido ribonucléico

s – singleto

Ser - serina

sex – sexteto

t – tripleto

TMS – tetra metil silano

t<sub>R</sub> – tempo de retenção

UIBBM – União Internacional de Biologia e Bioquímica Molecular

W - triptofano

β-CD - β-ciclodextrina

ω-TAS - ω-transminases

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	1
1.2 - ENZIMAS.....	1
1.3 - NOMENCLATURA, CLASSIFICAÇÃO E PROPRIEDADES DAS ENZIMAS.....	3
1.4 - ENZIMAS E BIOCATÁLISE.....	6
1.5 - LIPASES.....	11
1.6 - ESTEREOSELETIVIDADE DAS ENZIMAS.....	16
1.7 - RESOLUÇÃO ENZIMÁTICA.....	17
1.8 - IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	20
1.9 - AMIDO.....	23
1.10 - PROTEÍNA DE SOJA.....	26
1.11 - CROMATOGRAFIA GASOSA QUIRAL.....	28
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	31
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
<b>3 PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>33</b>
3.1 MATERIAIS.....	33
3.2 EQUIPAMENTOS.....	34
3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS.....	34
3.4 EXTRAÇÃO DOS GRÃOS DE AMIDO DE BATATA AIPO.....	35
3.5 PREPARAÇÃO DOS FILMES DE AMIDO E DE PROTEÍNA DE SOJA E IMOBILIZAÇÃO DAS LIPASES.....	35
3.6 PREPARAÇÃO DOS ALCOÓIS E ÉSTERES RACÊMICOS POR MÉTODOS QUÍMICOS.....	36
<b>3.6.1 Procedimento geral para a redução das acetofenonas substituídas.....</b>	<b>36</b>
<b>3.6.2 Preparação dos (R,S)-acetatos de 1-feniletanol substituídos (15-20c).....</b>	<b>39</b>
3.7 PREPARAÇÃO DE ÉSTERES VIA BIOCATÁLISE.....	42
3.8 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS NAS ANÁLISES DE CGQ.....	43
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>45</b>

4.1 - EFEITO DO SOLVENTE E DA TEMPERATURA NOS FILMES DE AMIDO.....	45
4.2 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA NOS FILMES .....	46
4.3 - PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS RACÊMICOS USADOS NA RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	47
4.4 - RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA DO (R,S)-3-NITRO-1-FENILETANOL E (R,S)-3,4-METILENODIOXI-1-FENILETANOL. ....	53
<b>4.4.1 - Efeito da razão molar. ....</b>	<b>55</b>
<b>4.4.2 - Influência da imobilização da LBC em diferentes filmes e blendas poliméricas.....</b>	<b>60</b>
<b>4.4.3 - Efeito da temperatura. ....</b>	<b>66</b>
<b>4.4.4 - Influência do uso de diferentes doadores acila.....</b>	<b>71</b>
4.5 – RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA DO (R,S)-3-NITRO-1-FENILETANOL. ....	74
<b>4.5.1- Uso de lipases de diversas procedências.....</b>	<b>74</b>
<b>4.5.2 - Efeito do solvente orgânico. ....</b>	<b>77</b>
<b>4.5.3 - Reutilização dos filmes de amido/PEO e proteína de soja/PEO, com e sem <math>\beta</math>-CD.....</b>	<b>80</b>
<b>4.5.4 – Resolução enzimática de diferentes compostos com grupos doadores e retiradores de elétrons derivados do (R,S)-1-feniletanol. ....</b>	<b>82</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>87</b>
<b>6 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>89</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>91</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>101</b>

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Ao definir, de forma simples, a química como o ramo da ciência que estuda as alterações e transformações da matéria, cita-se a descoberta do fogo (entre um milhão e 500.000 mil anos atrás) como marco inicial da química. Porém é difícil situar historicamente quando o homem passou a ter consciência que praticava a química. Nos séculos decorridos após o domínio do fogo, o homem aprendeu a arte de cozinhar e preparar alimentos, da cerâmica, da metalurgia, da medicina, entre outras áreas que se sobrepõem com a química. Somente por volta do século XVII é que se registra o nascimento da química como ciência, associada muitas vezes a transformação/evolução da alquimia.<sup>1</sup>

Atualmente a química representa um setor econômico grande e crescente, e de grande importância nos produtos fundamentais à humanidade. A sua participação é facilmente observada desde os diversos combustíveis aos medicamentos mais complexos. Entretanto, a produção na indústria química gera inúmeros inconvenientes, como a formação de subprodutos tóxicos e a contaminação do ambiente e do próprio homem, expostos a estes xenobióticos.<sup>2</sup>

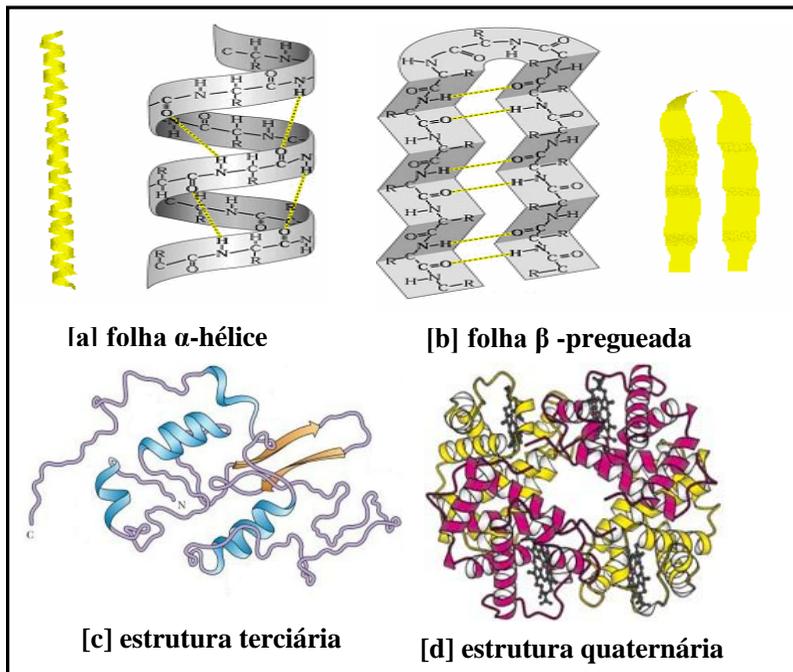
A preocupação com estes inconvenientes pode ser claramente observada com a crescente pressão sobre as indústrias químicas, tanto através da sociedade civil, como das autoridades governamentais, no sentido de aprimorar o desenvolvimento de processos cada vez menos prejudiciais ao meio ambiente. Dentre os problemas industriais mais comuns, destaca-se o grande volume de efluentes tóxicos. Porém, a emissão destes contaminantes pode ser minimizada através de diversos caminhos, tais como o emprego de reagentes alternativos apropriados, o aumento da seletividade para maximizar o uso dos materiais de partida, a utilização de catalisadores para facilitar a separação do produto final da mistura, bem como a reciclagem destes catalisadores empregados no processo.<sup>2</sup> Em concordância com todos os requisitos propostos e ocupando um lugar de destaque nas sínteses de química orgânica, ressalta-se o uso, mais recentemente, das enzimas.<sup>3</sup>

## 1.2 - ENZIMAS

Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA catalítico, todas as enzimas são proteínas que atuam nos organismos

vivos. Estas proteínas são as mais notáveis e altamente especializadas, pois desempenham a função de catalisadores, aumentando de forma considerável a velocidade das reações quando em condições favoráveis de temperatura e pH. A atividade catalítica das enzimas é extremamente dependente da integridade de sua conformação nativa, e se esta for desnaturada ou dividida em suas subunidades, perde a ação catalítica.<sup>4-6</sup>

Assim como outras proteínas, as subunidades das enzimas são os  $\alpha$ -aminoácidos ligados entre si através das ligações peptídicas formando uma extensa cadeia, com massas que normalmente variam entre 15 a 1000 KDa. A seqüência exata de aminoácidos de uma cadeia é denominada de estrutura primária, a conformação tridimensional da cadeia é chamada de estrutura secundária (**Figuras 1a e 1b**), e a disposição espacial da seqüência é denominada de estrutura terciária (**Figura 1c**). Se a estrutura for formada por duas ou mais unidades de cadeias polipeptídicas, iguais ou diferentes, a união destas caracteriza a estrutura quaternária (**Figura 1d**).<sup>4-6</sup>



**Figura 1** - Representações gráficas das estruturas tridimensionais de uma enzima. (adaptado da referência 7)

A relação entre a integridade de conformação e atividade de catálise é devido ao fato das enzimas possuírem um sítio ativo, local no qual acontece a catálise. Este sítio ativo constitui somente uma pequena porção de seu volume total e localiza-se usualmente próximo ou na superfície, sendo assim acessível às moléculas de substratos. No sítio catalítico ou ativo estão presentes determinados aminoácidos, cujas cadeias laterais são vitais a sua atividade, pois formam interações altamente específicas com o substrato.<sup>4-6</sup>

### 1.3 - NOMENCLATURA, CLASSIFICAÇÃO E PROPRIEDADES DAS ENZIMAS

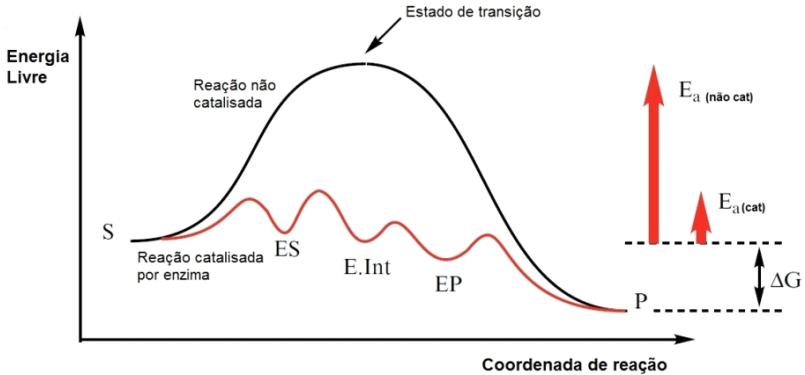
Muitas das enzimas são nomeadas com a terminação “ase” ao final do nome do substrato ou do tipo de reação ao qual catalisam. Por exemplo, a urease é a enzima que realiza a hidrólise da uréia e a DNA polimerase catalisa a polimerização dos nucleotídeos para formação do DNA. Com o crescente aumento de enzimas catalogadas a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM), sistematizou a classificação em seis grandes grupos, e cada um desses dividem-se em sub-grupos de acordo com o tipo de reação catalisada. Assim cada enzima pode ser classificada em uma combinação de 4 números, sendo o primeiro da grande classe, o segundo a sub-classe, o terceiro referente ao substrato catalisado e o último dígito para a enzima específica.<sup>4, 8, 9</sup> Um exemplo é a enzima cistationina- $\beta$ -sintetase catalogada como E.C. 4.2.1.22 (E.C.- Enzyme catalog).

A **Tabela 1**, apresenta a classificação das enzimas segundo a UIBBM, destacando as hidrolases que foram usadas neste trabalho.

**Tabela 1.** Classificação das enzimas de acordo com a UIBBM <sup>4,8,9</sup>

Número	Classe	Tipo de reação catalisada	Subclasse
1	Oxirredutases	Tranferência de elétrons ou remoção de hidrogênio	Hidrogenases, oxidases, peroxidases, redutases
2	Tranferases	Reações de transferência de grupos	Transaldolases, transcetolases.
3	<b>Hidrolases</b>	Reações de hidrólise	Esterases, <b>lipases</b> , peptidases, fosfatases.
4	Liases	Reações de adição de grupos a dupla ligação ou formação de duplas ligações por remoção de grupos	Descarboxilases, cetoácidas, hidroliase.
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro da molécula para produzir isômeros	Racemases, epimerases, mutases.
6	Ligases	Formação e clivagem de ligações C-C, C-S, C-O e C-N e ésteres de fosfato	Sintetases

O processo de catálise consiste na diminuição da energia de ativação ( $E_a$ ) de uma reação e conseqüente aceleração em sua velocidade, devido ao uso de um aditivo que será recuperado ao fim do processo. <sup>4, 6, 8, 10</sup> A **Figura 2** mostra um gráfico da variação da energia livre para uma reação não catalisada e catalisada por enzima.

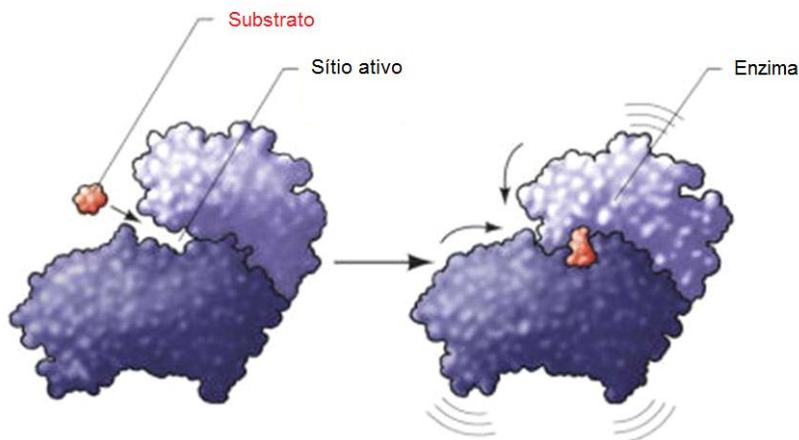


**Figura 2** - Diagrama de energia de uma reação não catalisada (linha preta) e catalisada por enzima (linha vermelha).<sup>11</sup>

Os aditivos que realizam a catálise são os chamados catalisadores e as enzimas por serem de origem biológica são catalisadores naturais. Em seu meio original, nos organismos, as enzimas atuam normalmente em pH próximos ao neutro, temperaturas brandas e meio aquoso.<sup>4-6, 8</sup> Mesmo neste meio pouco energético, são altamente eficientes, aumentando a velocidade das reações na ordem de  $10^6$  a  $10^{11}$  vezes, que as mesmas não catalisadas.<sup>4, 12</sup>

Dois efeitos principais são responsáveis pela diminuição da  $E_a$  nas reações catalisadas por enzimas, e são originadas pelas interações altamente específicas que o substrato realiza com o biocatalisador. Estes efeitos são configurados pela orientação exata na qual o reagente é inserido no sítio ativo e também pela proximidade dos átomos que irão participar das reações. Esta orientação e proximidade são essenciais para o encaixe induzido.<sup>6</sup>

O modelo de ligação do substrato à enzima baseado no encaixe induzido, descreve que a estrutura tridimensional do sítio ativo será complementar ao estado de transição. Portanto quando o substrato se aloja no sítio ativo, a enzima sofre uma mudança conformacional para se adequar ao substrato (**Figura 3**).



**Figura 3** - Modelo de encaixe induzido para a ligação do substrato à enzima. (adaptado da referência 7)

Por causa desta característica a enzima é capaz de aceitar substratos com grupos laterais de tamanhos diferentes.<sup>4, 6, 8</sup> Apesar de possuir múltiplas interações com o reagente, a enzima irá realizar uma maior interação com o estado de transição da reação ao qual catalisa, e esta propriedade será a força motriz para a catálise.<sup>4, 13, 14</sup>

Devido à catálise realizada pelas enzimas ser altamente específica, ou seja, cada enzima poderá hidrolisar ou sintetizar apenas uma classe de compostos, gerou interesse dos químicos orgânicos que, a partir do século anterior, passaram a utilizá-las em sínteses, originando a biocatálise na química.<sup>8, 12, 15, 16</sup>

#### 1.4 - ENZIMAS E BIOCATÁLISE

O termo biocatálise ou biotransformação pode ser aplicado para o uso de sistemas biológicos (enzimas ou células intregas) na conversão de uma estrutura química em outra. Em biotransformação, um catalisador biológico é utilizado para converter um substrato em um número limitado de etapas enzimáticas, diferentemente do que ocorre em processos de fermentação, onde o substrato é convertido em produtos através de um caminho metabólico bastante complexo na célula.<sup>15, 17-19</sup>

O atrativo para o uso de enzimas em sínteses orgânicas não é apenas a alta eficiência, elas chamam muito atenção devido a sua alta

especificidade, como mencionado anteriormente. As enzimas além de específicas são também bastante seletivas, apresentando três dessas especificidades.<sup>8, 20, 21</sup>

quimiosseletividade - podem atuar em somente um tipo de grupo funcional mesmo na presença de outros grupos reativos;<sup>6, 8</sup>

regio e diastereosseletividade - podem distinguir entre grupos funcionais situados em diferentes regiões do mesmo substrato;<sup>6, 8</sup>

enantioseletividade - são catalisadores quirais e sua especificidade pode ser explorada para sínteses seletivas e assimétricas.<sup>6, 8</sup>

Por todas estas características especiais aliadas às necessidades globais de tecnologias limpas e gestão de produtos e subprodutos menos tóxicos, as enzimas têm atraído cada vez mais a atenção da indústria. Os produtos desenvolvidos sobre esta óptica apresentam maior valor agregado, contribuindo significativamente para uma melhor qualidade de vida.<sup>2, 3, 22</sup>

As utilizações dos biocatalisadores em transformações químicas buscam segurança, eficiência, economia de átomos e de energia em procedimentos que não agridam o meio ambiente. O seu uso fez surgir uma química biotecnológica de interface com oportunidades para a melhoria e inovação em alguns problemas recorrentes, como o uso de grupos protetores para a superação da não seletividade e reatividades incompatíveis na síntese de biomiméticos.<sup>23</sup>

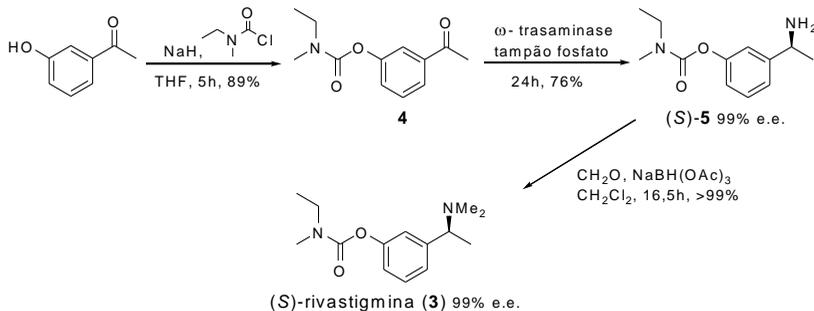
Iniciando por materiais de partida simples e com um número mínimo de etapas, evitando proteção-desproteção e com orientação para formação apenas do produto de interesse, a biocatálise vem contribuindo para soluções destes desafios.<sup>2</sup> O uso destes biocatalisadores nas sínteses orgânicas pode ser efetuado de duas formas, como células íntegras ou extratos enzimáticos puros ou parcialmente puros (enzimas isoladas), cada qual com suas desvantagens e vantagens.<sup>8, 24</sup>

As células íntegras apresentam como desvantagens a ocorrência de reações paralelas, resultantes do metabolismo celular, reversibilidade, e baixa tolerância a substratos e solventes orgânicos, inativando o sistema. Porém, são vantajosas devido ao baixo custo, em geral, e especialmente interessantes para a aplicação em sistemas que necessitam da regeneração de cofator, pois a própria célula tem os mecanismos para promover a regeneração. Cofatores são compostos orgânicos de baixa massa molar (como vitaminas) ou metais necessários para a atuação eficiente da atividade catalítica das enzimas.<sup>8, 24</sup>

As desvantagens associadas ao uso de enzimas isoladas são os



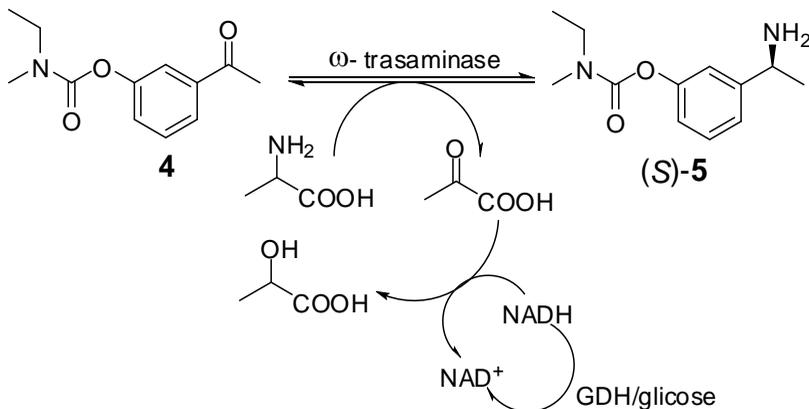
aminoácido (ex. alanina) para uma cetona, gerando um centro quiral importante na obtenção do fármaco. **Esquema 1.**<sup>26</sup>



**Esquema 1.** Rota químio-enzimática para obtenção da (S)-rivastigmina.

Porém, estas enzimas têm o equilíbrio deslocado para o lado alanina/cetona o que faz com que estas reações tenham baixo rendimento, quando não se utiliza uma técnica que remova o co-produto piruvato. Para obter conversões sinteticamente mais aceitáveis, foi utilizada a lactato desidrogenase que reduz o piruvato a lactato, mas esta enzima necessita do cofator  $\text{NAD}^+$  que por sua vez é regenerado *via* glicose desidrogenase.<sup>26</sup> **Esquema 2.**

Para a etapa enzimática foram usadas diferentes células de microorganismos cultivadas que continham  $\omega$ -TAs e também duas células de origem comercial. Os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou as células de *Paracoccus denitrificans* que converteram 83% da cetona (**4**) em amina (**5**). Para a síntese total do fármaco realizou-se a biotransformação em escala preparativa, obtendo-se 66% de rendimento total para a síntese em quatro etapas.<sup>26</sup> Porém a necessidade de uso de cofator e de regeneração para o mesmo torna a reação mais cara e dispendiosa.



**Esquema 2.** Aminoação assimétrica da cetona **4** para obtenção do precursor **(S)-5** da *(S)*-rivastigmina.

As enzimas hidrolíticas (proteases, celulases, amilases e lipases), por não necessitarem da regeneração de co-fatores, terem alta estabilidade e atividade com relação a vários substratos, baixo custo e capacidade de atuar em condições suaves de sínteses, são as mais usadas na química orgânica.<sup>8, 24</sup>

Rhman e col. utilizaram, para a preparação de derivados de ácidos graxos, a lipase de *Candida rugosa* (CRL) revestida ou não com novos líquidos iônicos (LI) baseados em aminoácidos. Os sais de histidinato de trimetil amônio ( $[\text{N}_{2222}][\text{his}]$ ) e asparaginato de trimetil amônio ( $[\text{N}_{2222}][\text{asn}]$ ) foram fundidos, a lipase foi misturada aos LIs e deixada de repouso para solidificação e uso posterior. Na esterificação do álcool oléico com diferentes ácidos graxos (C6 a C18), as maiores conversões foram obtidas com as lipases revestidas de líquido iônico e com cadeias médias de ácido graxo (C12 – 84% e C14 – 80%).<sup>27</sup>

Pesquisadores suecos publicaram há poucos meses o uso de uma enzima com modificação genética planejada derivada da lipase de *Candida antarctica B* (CALB). Nesta enzima o triptofano (W) presente no sítio ativo, mas sem fazer parte do sistema catalítico, foi substituído por uma alanina (A) na posição 104 da estrutura primária (CALB W104A). Esta modificação é de interesse, pois a enzima nativa não consegue acomodar dois grupos volumosos de um álcool secundário e resolvê-lo cineticamente.<sup>28</sup>

A CALB W104A foi capaz de realizar a transesterificação de diaril metanóis com um dos grupos fenólicos contendo substituintes em

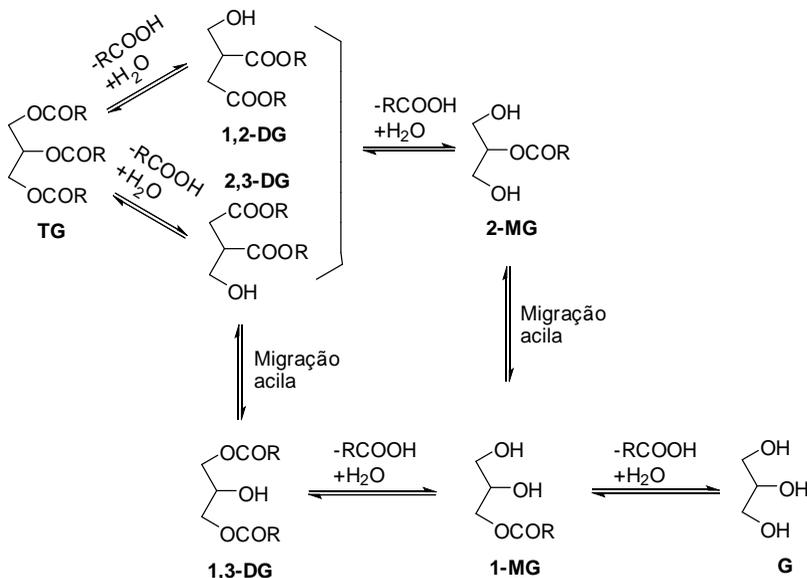
conversões de moderadas a boas (4-45%) e  $ee_p$  de médios a altos (34-96%), dependendo do substituinte em até 24h de reação. Os pesquisadores também testaram efeitos eletrônicos na resolução, substituindo um grupo arila por piridila e também utilizando grupos arilas substituídos com piridilas. O melhor resultado foi obtido quando o substrato 4-bifenil(2-piridil) metanol reagiu com o acetato de vinila para formar o correspondente acetato em 38%, com  $ee_p$  de 98% e razão enantiomérica (E) de 180, em 24h.<sup>28</sup>

Exemplos recentes de aplicação de lipases em reações orgânicas, principalmente em resoluções cinéticas, e até de mutações dirigidas são extremamente comuns. Devido ao baixo custo, disponibilidade de serem obtidas das mais variadas fontes, apresentarem seletividade para diversos substratos e relativa estabilidade em solventes orgânicos, as lipases transformaram-se na classe de enzimas mais utilizada em biocatálise.<sup>29-34</sup>

## 1.5 - LIPASES

As lipases (E.C.3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas de origem animal (pancreática, hepática e gástrica), microbiana (fungos e bactérias) e vegetal, com diferentes propriedades catalíticas. São, em sua maioria, extracelulares, favorecendo a extração, isolamento e purificação.<sup>19, 35, 36</sup> Podem ser facilmente obtidas através da fermentação de microrganismos, tais como os fungos de *Aspergillus mucor*; *Rhizopus penicillium*, de leveduras *Tulopsis* sp e *Candida* sp e também de bactérias tais como as de *Pseudomonas* sp e *Staphylococcus* sp.<sup>34, 37</sup>

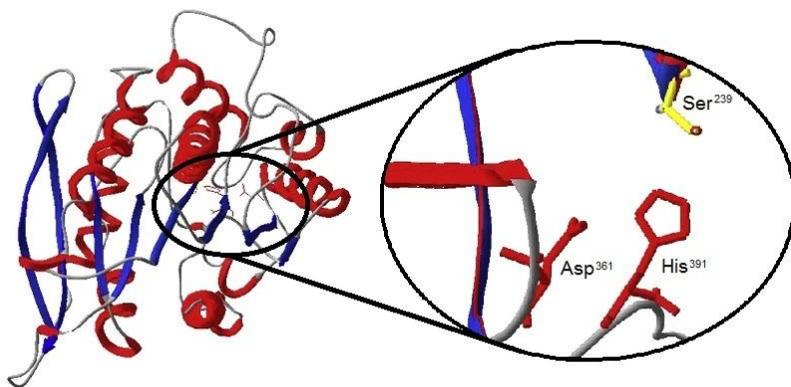
Como as enzimas são nomeadas pelas reações as quais catalisam, as lipases em seu ambiente natural catalisam a hidrólise de lipídeos, principalmente os triacilgliceróis (**TG**) em di e mono-acilglicerídeos (**DG** e **MG**), ácidos graxos (**AG**) e glicerol (**G**) (**Esquema 3**).<sup>21, 34-36, 38</sup> Além das funções metabólicas, as lipases possuem um papel importante em biotecnologia principalmente na indústria de óleos e de alimentos, no desenvolvimento de aromas, detergentes, na hidrólise de óleos e gorduras, síntese de biosurfactantes, manutenção de queijos, produção de bebidas alcoólicas e tratamento de resíduos oleosos oriundos da indústria de couro e de papel.<sup>34, 37, 39-41</sup>



**Esquema 3.** Possíveis produtos da hidrólise 1,3-específica catalisada por lipases. (adaptado da referência 34.)

Além das aplicações citadas acima, lipases de diversas fontes, principalmente as oriundas de *Candida antarctica* e de *Thermomyces lanuginosus* tem sido usadas na produção de biodiesel.<sup>42, 43</sup>

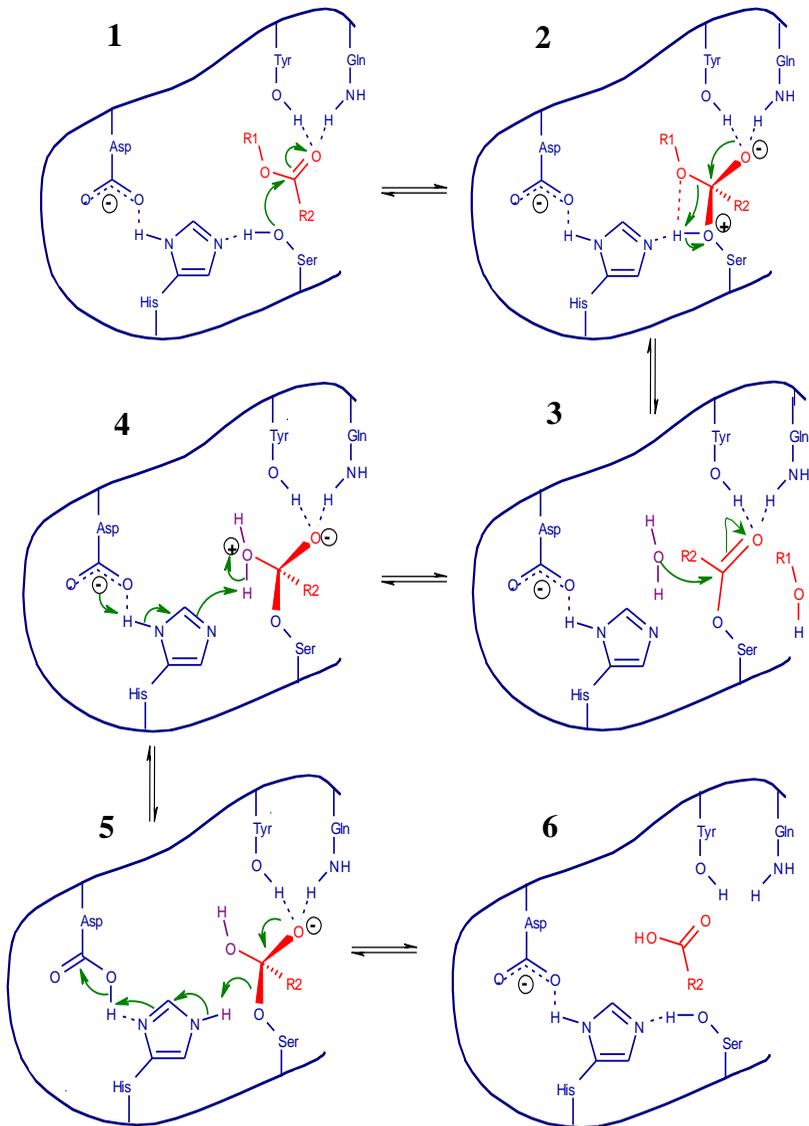
Uma maior compreensão sobre os mecanismos de ação das lipases foi obtida somente após 1900, quando as primeiras estruturas foram resolvidas por cristalografia de raios-X.<sup>44</sup> Todas as lipases cujas estruturas estão elucidadas fazem parte da família  $\alpha, \beta$ -hidrolases com uma arquitetura comum composta de uma sequência de fitas  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -pregueada. Estas enzimas hidrolisam as ligações as quais são capazes, através de uma tríade catalítica composta de um resíduo de serina nucleofílica, ativado por ligações de hidrogênio em conjunto com a histidina, aspartato ou glutamato (Ser-His-Asp/Glu).<sup>4, 8, 44</sup> (**Figura 5**).



**Figura 5** - Representação esquemática da estrutura tridimensional e ampliação do sítio ativo da lipase de *Psychrobacter* sp. (adaptado da referência 45.)

Os membros da família de estruturas  $\alpha,\beta$ -hidrolases possuem um mecanismo comum de hidrólise de ésteres, que consiste nas seguintes etapas e está representado no **Esquema 4**.<sup>21, 46</sup>

1. Ligação ao substrato éster;
2. Formação do primeiro intermediário tetraédrico por ataque nucleofílico da serina catalítica com o oxianion estabilizado por 2 ou 3 ligações de hidrogênio, conhecida como cavidade oxianion;
3. Quebra da ligação éster e saída da porção alcoólica;
4. Hidrólise do intermediário acil-enzima;
5. Formação do segundo intermediário tetraédrico;
6. Formação do produto e regeneração do sítio ativo.



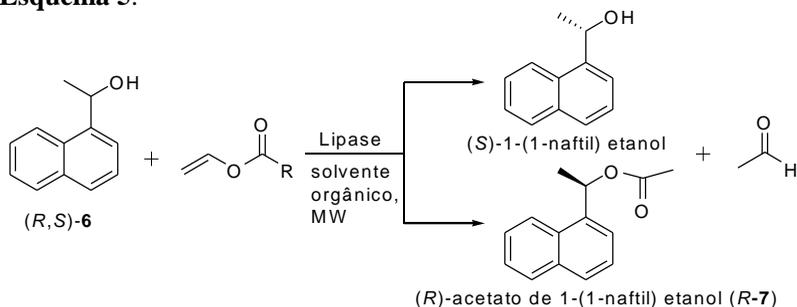
**Esquema 4.** Representação do mecanismo de ação da  $\alpha,\beta$ -hidrolases.<sup>21, 46</sup>

A terceira etapa na qual ocorre a formação do intermediário acil-enzima é determinante para a catálise. Em solventes orgânicos, as lipases catalisam a transferência de grupos acilas de compostos

doadores para vários compostos receptores diferentes da água. Dependendo do tipo de doador acila e do substrato, as reações catalisadas por lipases incluem esterificação, tioesterificação, amidação, transesterificação, síntese de peptídeos e formação de perácidos.<sup>8, 21, 47, 48</sup> Os perácidos podem ser utilizados em síntese orgânica, como por exemplo, para a formação de éoxidos a partir de compostos insaturados.<sup>49</sup>

Yadav e Devendran realizaram a resolução cinética enzimática do (R,S)-1-(1-naftil) etanol (6) via transesterificação em micro-ondas (MW) com vários doadores acila. Para as reações foram utilizadas três diferentes lipases de origem comercial (Novozym 435, RMIM e TLIM) imobilizadas em materiais diferentes (resinas e sílica, respectivamente).

### Esquema 5.



**Esquema 5.** Transesterificação enantiosseletiva de 6 com lipases em meio orgânico. (adaptado da referência 50).

Foram testados diversos parâmetros reacionais como origem da lipase, doador acila e sua concentração, solvente orgânico, agitação e quantidade de catalisador.<sup>50</sup>

Dentre os diversos parâmetros experimentais avaliados, inicialmente observou-se que o aquecimento da reação a 60° C por micro-ondas era mais eficiente que da forma convencional. A Novozym 435 juntamente com acetato de vinila em *n*-heptano, como meio reacional, foi o sistema mais eficiente, obtendo-se a maior conversão (47%) e também excesso enantiomérico (*ee*) do substrato (90%). Em ciclo-hexano e *n*-hexano os resultados foram menores (44% e 45%), e em tolueno a conversão ao produto *R-7* foi baixa (6%).<sup>50</sup>

Nos testes do efeito da agitação e temperatura, usou-se 100-500 rpm e 40-70° C, com o sistema Novozym 435/ac. vinila/*n*-heptano, e os melhores resultados foram obtidos a 60 °C com 400 rpm. Para os estudos de quantidade de catalisador e razão molar do substrato/doador

acila, os maiores valores de conversão foram alcançados utilizando-se de 20mg da Novozym 435 e razão molar 1:1. Quando o experimento foi realizado usando-se os melhores parâmetros durante 3 horas, a maior conversão foi de 47%, podendo este sistema ser reutilizado por três vezes sem perda significativa na conversão (4744%).<sup>50</sup>

As lipases como toda a classe das hidrolases são extremamente estereosseletivas. Esta característica aliada à baixa especificidade pelo substrato tornou-as importantes ferramentas na síntese orgânica quirais. Utilizando-se de lipases é possível preparar compostos enantiomericamente puros a partir de racematos, substituindo assim a resolução clássica por cristalização.<sup>14, 51</sup>

## 1.6 - ESTEREOSELETIVIDADE DAS ENZIMAS

Em 1815, quando o físico Francês Jean Baptiste Biot descobriu que certas substâncias eram hábeis para desviar o plano da luz polarizada, fenômeno chamado de atividade óptica, iniciou-se a quiralidade na química orgânica. Estudos posteriores foram realizados por Louis Pasteur, que separou os cristais de um racemato de sal de ácido tartárico e reconheceu que as imagens não sobreponíveis desviavam a luz plano polarizada em direções opostas.<sup>52-54</sup>

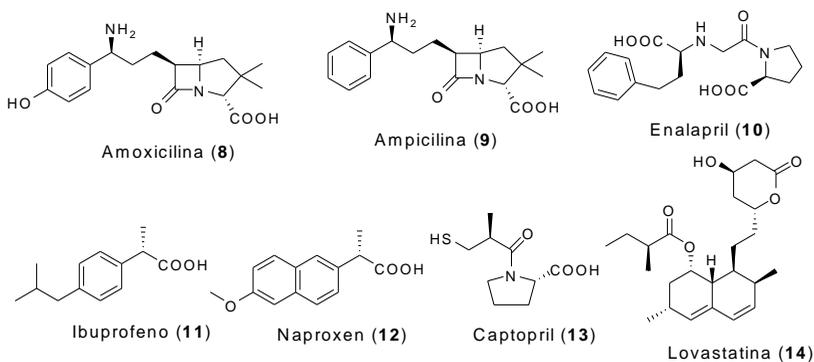
As moléculas que não podem sobrepor-se as respectivas imagens em um espelho plano são chamadas quirais. A maioria das moléculas presentes na estrutura dos organismos vivos são quirais, tais como o ácido desoxiribonucléico (DNA), aminoácidos, hormônios e anticorpos. Por esta razão, observa-se a relevância da quiralidade em organismos vivos. Quiralidade é condição necessária e suficiente para a existência de enantiômeros. Estes possuem propriedades químicas e físicas (ponto de ebulição, fusão, solubilidade) semelhantes, porém o sentido da rotação do plano da luz polarizada é o contrário. A mistura formada por quantidades equimolares dos enantiômeros é chamada de mistura racêmica ou racemato.<sup>53-56</sup>

Os enantiômeros podem apresentar atividade biológica completamente diferente, pois interagem de maneira distinta com outros sistemas quirais ou aquirais. Por exemplo, o (*S,S*)-aspartato possui um sabor adocicado, enquanto seu enantiômero (*R,R*)-aspartato têm sabor amargo. A distinção no paladar ocorre porque os receptores também são constituídos de moléculas quirais e reconhecem a diferença nos enantiômeros.<sup>52, 53</sup>

Nos fármacos quirais, ocorre situação semelhante, sendo que geralmente um dos enantiômeros é o responsável pela atividade de

interesse e em certos casos o outro pode ser prejudicial ou inativo. Há inclusive casos na história da química biológica que mostraram a importância de se usar compostos enantiomericamente puros, por exemplo, o caso da talidomida cujo enantiômero (*S*) é teratogênico e o enantiômero (*R*) é sedativo.<sup>55, 56</sup>

Atualmente, na indústria farmacêutica mais da metade dos fármacos comerciais são enantiomericamente puros e entre os restantes 88% são vendidos na forma racêmica.<sup>57</sup> Entre os remédios vendidos na sua forma opticamente pura, encontram-se os antibióticos tais como a amoxicilina e ampicilina, antiinflamatórios a base de ibuprofeno e naproxen, controladores de pressão como captopril e enalapril e também reguladores de colesterol cujo fármaco é a lovastatina.<sup>58</sup> A **Figura 6** mostra a estrutura molecular destes medicamentos.



**Figura 6** - Estruturas de fármacos vendidos em sua forma enantiomérica pura.<sup>58</sup>

Por esta razão compostos enantiomericamente puros são de importância na indústria farmacêutica, de alimentos, agroquímica, sabores e de fragrâncias.<sup>16, 19, 48, 59</sup> A resolução de racematos ainda é a metodologia mais importante para a síntese de produtos enantiopuros. Os métodos para a resolução incluem a cinética química ou enzimática, por cristalização preferencial ou separação de diastereoisômeros.<sup>55, 56, 60</sup>

## 1.7 - RESOLUÇÃO ENZIMÁTICA

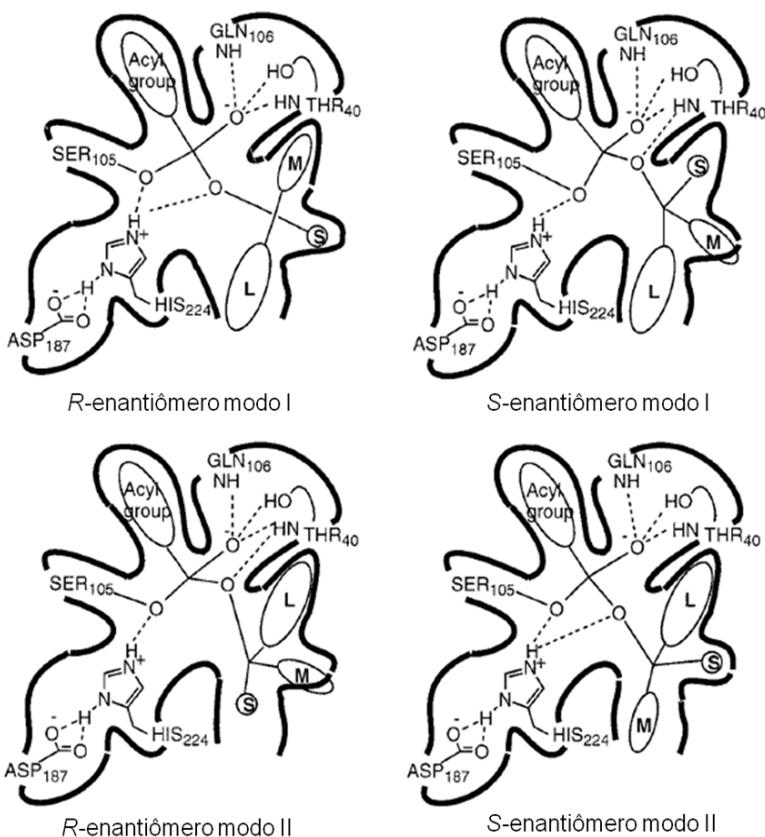
Quando um substrato racêmico é submetido a uma reação enzimática, este sofre discriminação entre os enantiômeros. De acordo com a preferência da enzima, o enantiômero que melhor se ajusta em seu sítio ativo reage a uma velocidade maior. Para assegurar uma alta

seletividade para ambos os enantiômeros, a diferença na velocidade da reação de cada um individualmente deve ser a maior possível. Em alguns casos ideais, a velocidade é tão extrema, que o enantiômero reativo é transformado rapidamente enquanto o outro não é convertido. Então, na resolução de um racemato a reação enzimática cessaria automaticamente em 50% de conversão, quando já não existe o enantiômero reativo. Como consequência, cada enantiômero pode ser obtido somente com 50% de conversão em uma resolução enzimática.<sup>8</sup>

Como a classe de enzimas mais utilizada em biocatálise e por serem extremamente estereosseletivas, as lipases são muito utilizadas na resolução de racematos principalmente de aminas, alcoóis primários e secundários e ésteres.<sup>14, 33, 46</sup> A base da preferência de um enantiômero sobre outro ao utilizar as lipases, está na conformação dos estados de transição que cada um deles forma com a enzima. Assim os estados fundamentais termodinâmicos do racemato são iguais para ambas as formas, mas a diferença na energia livre para os estados de transição é a responsável pela enantiosseletividade.<sup>61</sup>

Na **Figura 7**, observa-se uma representação esquemática do sítio ativo de uma  $\alpha,\beta$ -hidrolase, a lipase de *Candida antarctica B*, que tem sido utilizada com eficiência para a resolução de alcoóis e aminas secundárias. A combinação da cinética enzimática e a modelagem molecular foram usadas para construir um modelo de como um álcool secundário se liga ao sítio ativo desta enzima durante a reação de transesterificação. Os dois enantiômeros do álcool secundário são mostrados ligando-se ao sítio ativo por duas orientações diferentes. Apenas o *R*-enantiômero modo I e o *S*-enantiômero modo II produzem ligações com a enzima capaz de formar o produto.<sup>61</sup>

Porém o *R*-enantiômero é o reagente mais rápido devido ao fato do grupo de maior volume (L) estar fora do sítio ativo, enquanto que no *S*-enantiômero este grupo está no interior da cavidade. Quando o grupo mais volumoso é maior que um radical etila a seletividade aumenta excessivamente, pois não há espaço suficiente para acomodá-lo no interior do sítio ativo. Assim a taxa de conversão do reagente rápido não é afetada, porque o grupo volumoso está fora do sítio ativo, e não causa interações estéricas desfavoráveis com a lipase.<sup>61</sup>



**Figura 7** - Representação esquemática do sítio ativo da lipase de *Candida antarctica* B ligado a um álcool secundário em uma reação de transesterificação. Acima à esquerda e abaixo na direita estão representados os modos produtivos.  
61

Em 1982, Sih e col. sob a base teoria de Sharpless e Fajans descreveu os cálculos da dependência da conversão ( $c$ ), excesso enantiomérico do substrato ( $ee_s$ ) e excesso enantiomérico do produto ( $ee_p$ ) na resolução cinética enzimática.<sup>8, 62</sup>

O parâmetro que indica a discriminação de uma enzima entre dois enantiômeros foi introduzido como razão enantiomérica ( $E$ ).<sup>8</sup>

Holmberg e Karlsson utilizando as equações propostas por Sih e col. distinguiram entre razão enantiomérica do substrato ( $E_s$ ) e do

produto ( $E_p$ ), onde  $E_s$  e  $E_p$  podem ser calculados de acordo com as **Equações 1 e 2**.<sup>8, 63</sup>

$$E_s = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_s)]}{\ln[(1-c)(1+ee_s)]}$$

**Eq. 1**

$$E_p = \frac{\ln[(1-c)(1+ee_s)]}{\ln[(1-c)(1-ee_p)]}$$

**Eq. 2**

$$\text{Sendo: } c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p}$$

Valores de razão enantiomérica menores que 15 são inaceitáveis para propósitos práticos de separações. Podem ser considerados moderados a bons valores entre 15-30, e acima deste valor excelentes. Deve ser enfatizado que  $E > 200$  não pode ser determinado com precisão, devido às imprecisões oriundas dos métodos da determinação do excesso enantiomérico, onde uma pequena variação do  $ee_s$  ou  $ee_p$  pode causar uma mudança significativa no valor numérico de  $E$ .<sup>8</sup>

É possível usar lipases na forma livre em solventes orgânicos. Mas estas enzimas nem sempre são os catalisadores ideais neste meio visando possíveis aplicações industriais, pois são geralmente instáveis, não podem ser utilizadas em temperaturas elevadas e são caras de recuperar do meio reacional ao final do processo.<sup>14, 64</sup> Desde modo, a fim de tornar o uso das enzimas mais econômico e eficiente, o desenvolvimento de técnicas de imobilização de enzimas tem sido objeto de crescente interesse, já que estas proporcionam a reutilização das enzimas, facilitam a separação dos produtos, reduzem a inibição pelo meio ou produtos e aumentam a estabilidade em solventes orgânicos.<sup>14, 65-67</sup>

## 1.8 - IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

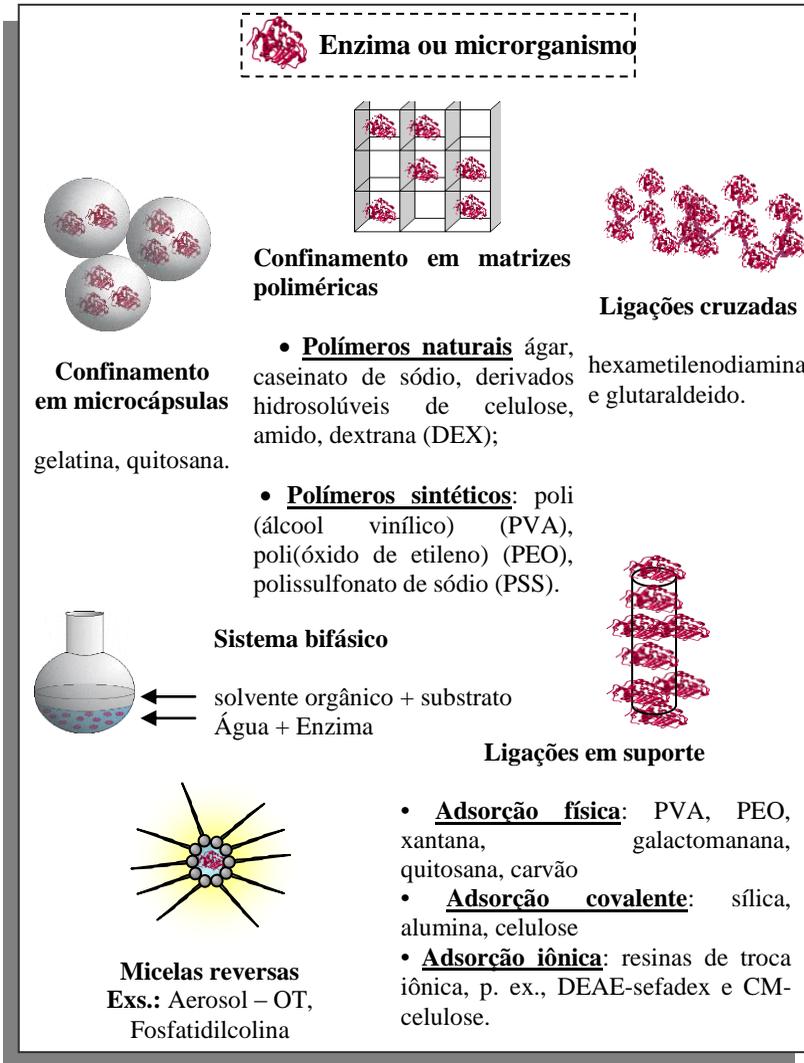
O principal objetivo em imobilizar enzimas é obter um biocatalisador com estabilidade e atividade após o processo. Na forma ideal, a enzima imobilizada deverá apresentar uma atividade catalítica igual ou superior à forma livre. Também, não deverão ocorrer alterações estruturais, nem modificações no sítio ativo. Entretanto, a imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, não existindo uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o

processo de imobilização.<sup>8, 68</sup>

Os métodos de imobilização de enzimas são processos que oferecem vantagens considerando que, em geral, aumentam a estabilidade do biocatalisador e são economicamente viáveis. As técnicas de imobilização consistem no confinamento de enzimas ou microrganismos em um determinado material (suporte ou biorreator), conferindo aos mesmos uma maior resistência à temperatura, solventes de baixa polaridade e a mudanças no pH.<sup>8, 14, 66, 68, 69</sup>

Este processo pode ocorrer de diferentes formas e cada um envolve diferentes graus de complexibilidade e eficiência. Os diversos métodos de imobilização utilizados podem ser divididos em duas categorias principais, métodos químicos quando a enzima é fixada em um suporte por ligação covalente ou ligação cruzada com auxílio de reagentes bi-ou multifuncionais e métodos físicos quando a enzima fica retida no interior de um gel insolúvel, fibras porosas, materiais adsorventes ou microencapsuladas neste suporte. Através destes processos o biocatalisador pode ser facilmente recuperado e reutilizado.<sup>8, 9, 14, 68, 69</sup> A **Figura 8** mostra os principais métodos e materiais usados na imobilização de enzimas.

As interações entre os biocatalisadores e os suportes utilizados são muito importantes, pois estas podem influenciar diretamente na estabilidade e nos efeitos cinéticos da catálise. A escolha da matriz é fundamental para uma boa atuação do sistema com a enzima imobilizada. As características desejáveis para um bom suporte são a área superficial grande; boa permeabilidade; características hidrofílicas; estabilidade química, mecânica e térmica; alta rigidez; forma e tamanhos adequados; resistência ao ataque de microrganismos e possibilidade de reutilização.<sup>8, 9, 14, 66, 68, 69</sup>



**Figura 8** - Principais métodos e matérias para imobilização de enzimas. (adaptado da referência 8)

A utilização de filmes produzidos a partir de proteínas ou polissacarídeos tem contribuído para que haja um aumento da biocompatibilidade entre o suporte e biocatalisador, gerando um micro-ambiente favorável, e beneficiando desta forma a atividade enzimática.

Dentre as vantagens de utilizar estes biofilmes como suportes para biocatalisadores em síntese orgânica, destacam-se suas boas propriedades mecânicas, resistência a solvente de baixa polaridade, hidrofiliçidade, atoxicidade, e o fato de serem biodegradáveis e de baixo custo.<sup>66, 69, 70</sup>

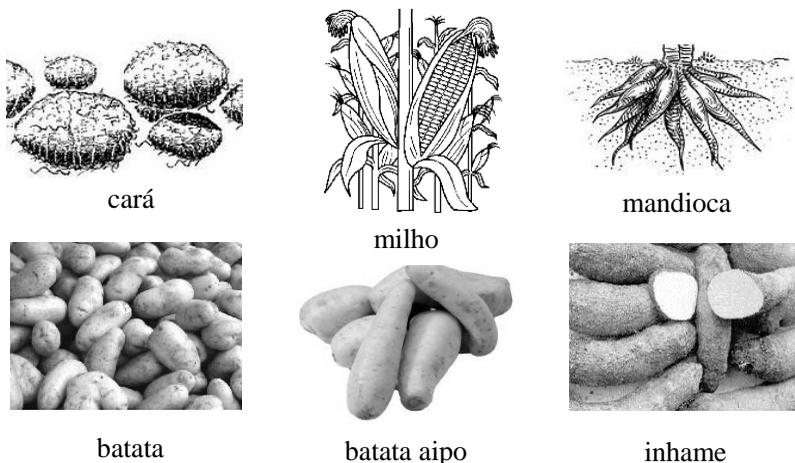
A escolha do suporte é baseada em função das propriedades desejadas e do biopolímero selecionado. Além disso, por serem biodegradáveis e solúveis em água, estes suportes tornam os processos econômicos e ambientalmente favoráveis, preenchendo desta forma os requisitos necessários para o desenvolvimento de uma “química limpa”.<sup>66, 69, 70</sup>

Neste trabalho, foram usados o amido e a proteína de soja (descritos a seguir) como biopolímeros, além de alguns polímeros sintéticos (CMC, PEO) para preparação de filmes e posterior uso na imobilização de lipases.

### 1.9 - AMIDO

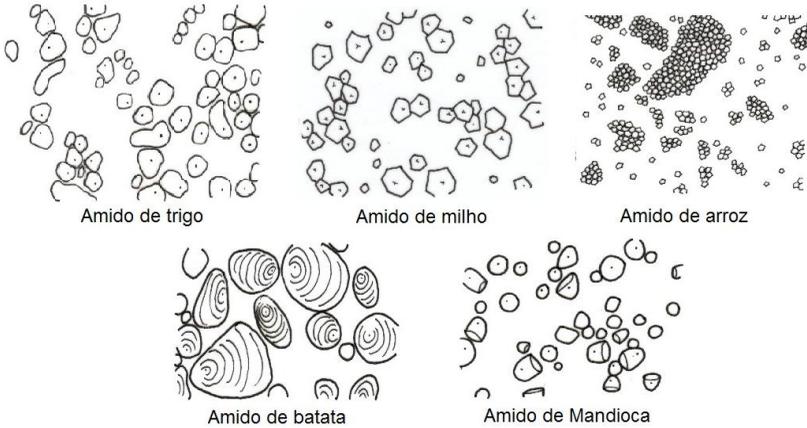
O amido é o constituinte mais importante na reserva de nutrientes de todas as plantas superiores, ocorrendo principalmente em sementes, tubérculos, rizomas, bulbos e inclusive em algas. Pelo fato de ser facilmente hidrolisado e digerido é uma das substâncias mais importantes na alimentação do homem e dos animais.<sup>71-73</sup>

Na **Figura 9**, são mostrados alguns tubérculos e um cereal (milho) comuns no Brasil, e que são fontes de amido.<sup>74-79</sup>



**Figura 9** - Exemplos de tubérculos fornecedores de amido.

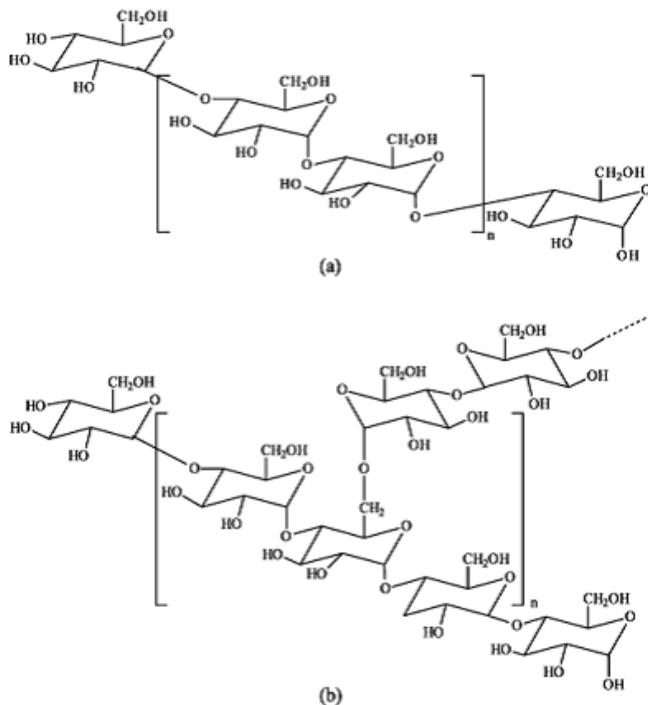
O amido presente nas plantas é sintetizado nos amidooplastos, na forma de grânulos, pela polimerização da glicose resultante da fotossíntese. No início possuem a forma esférica, tornando-se alongados ou achatados de acordo com o crescimento. Características presentes nos grânulos de amido como: birrefringência, composição, forma e tamanho são geneticamente controlados, e por isso sua observação no microscópio é suficiente para distinguir os amidos provenientes de diferentes plantas<sup>71-73</sup>, como mostrado na **Figura 10**.



**Figura 10** - Observação microscópica de amidos de diferentes origens.<sup>80</sup>

O amido é constituído essencialmente por uma mistura de dois polissacarídeos, amilose e amilopectina, **Figura 11**. As proporções dos componentes são dependentes da genética do vegetal e de seu tempo de maturação, mas, de maneira geral, a relação é de 17% a 28% de amilose e 73% a 82% de amilopectina.<sup>71-73</sup>

A amilose é constituída por 500 a 2 mil monômeros de D-glicose unidos entre si por ligações do tipo  $\alpha$ 1-4, formando uma cadeia linear, que na sua forma cristalina apresenta uma conformação helicoidal. Esta conformação possibilita a formação de complexos de inclusão com iodo (utilizado como indicador quantitativo de amilase e da presença de amido), n-butanol, entre outros.<sup>71-73</sup>



**Figura 11** - Estrutura da amilose (a) e da amilopectina (b). <sup>71, 81</sup>

A amilopectina é a fração altamente ramificada do amido. É formada também por unidades de D-glicose ligadas de forma  $\alpha$ 1-4, porém com cadeias laterais unidas a principal de forma  $\alpha$ 1-6 a cada 24-30 resíduos de glicose. Pela forma a qual está organizada, sua conformação espacial é esférica. <sup>71-73</sup> Pelo fato do amido ser de fontes naturais, possuir baixo custo, abundância e alta aplicabilidade, impulsionou variados estudos de empregos e propriedades. <sup>81, 82</sup>

O conhecimento das estruturas moleculares e granular, bem como as propriedades físico-químicas do amido, levou a modificações dessas estruturas para usos específicos. Estas transformações podem ser físicas, enzimáticas ou mais comumente, químicas e resultam no amido modificado. <sup>71-73</sup> A utilização do amido ou derivados ocorre em indústrias de adesivos, agroquímicos, cosméticos, detergentes e surfactantes, médica, metalúrgicas, plásticos, mineração, cosmética, farmacêutica, papel e papelão, têxtil, entre outras e principalmente na manufatura de alimentos. <sup>83, 84</sup>

Entre as utilidades do amido, destaca-se o seu uso como espessante, propriedade esta obtida quando os grãos são suspensos em água, aquecidos e atingem determinado intervalo de temperatura. Este intervalo é também chamado de temperatura de gelatinização e é específica para amidos de diferentes origens. Ao atingirem a temperatura de gelatinização as ligações de hidrogênio mais fracas entre as cadeias de amilose e amilopectina são rompidas, os grãos intumescem e a solução fica consideravelmente mais viscosa, formando uma espécie de gel.<sup>71-73</sup>

Os géis de amido podem ser combinados com polióis (glicerol e/ou sorbitol), com outros polímeros e/ou proteínas, e a mistura destes componentes forma uma massa amorfa que pode ser transformada em filmes e plásticos. Os géis, após desidratados originam películas rígidas e transparentes, brilhantes e resistentes, que são biodegradáveis e são chamados de biofilmes, quando não se utiliza outro polímero não fragmentável em sua obtenção. O uso de polióis é importante para fornecer ao filme maleabilidade, melhorando a rigidez e as propriedades mecânicas do filme.<sup>82, 85</sup>

Na formação do gel, a amilose e amilopectina formam ligações físicas cruzadas inter e intramolecular para gerar uma rede macromolecular. Estas ligações são compostas principalmente por domínios microcristalinos de amilose.<sup>86</sup> A rede formada nos filmes pode ser explorada para o “aprisionamento” de enzimas. Entre as diversas técnicas empregadas para imobilização de enzimas, o aprisionamento pode ser uma boa escolha, por que resulta em um ambiente relativamente inerte a água dentro da matriz e causa relativamente poucos danos à estrutura tridimensional da enzima.<sup>66, 69, 87</sup>

### 1.10 - PROTEÍNA DE SOJA

A soja é um alimento de cultivo industrial, utilizado para o fornecimento de óleo e proteína. Apesar do baixo teor de óleo na semente (20% da massa seca) a soja é a maior fonte de óleo comestível de sementes do mundo (52%). A cada tonelada de óleo de soja bruto, é produzida cerca de 4,5 toneladas de farelo de soja (teor de proteína 44%).<sup>88</sup> A proteína isolada de soja (PIS) é o tipo mais refinado de proteína, inclusive quando comparado com proteína de soja concentrada ou texturizada. Portanto, seu processo de produção pode ser considerada o mais complexo, uma vez que visa atingir um produto com teores de proteína superior a 90%.<sup>89</sup>

A proteína isolada de soja é um aglomerado das proteínas de

armazenamento da soja, um grupo de macromoléculas com diferentes formas, estruturas e massas molares, variando entre 8 e 600 kDa.<sup>89</sup> As globulinas 7S e 11S representam cerca de 70% das proteínas de armazenamento. Ambas frações são extraordinariamente complexas, e constituídas por várias subunidades, que facilmente associam e se dissociam sob diferentes condições de pH, força iônica e temperatura.<sup>90</sup>

A partir 1920, as proteínas de soja foram utilizadas em produtos industriais, tais como adesivos para madeira e papel, pastas em revestimentos, tintas e como emulsionantes em produtos de borracha coloidal. Outros produtos industriais à base de soja surgiram na década de 30 e 40 incluindo fibras têxteis, espumas de extintores de incêndio, plásticos e lubrificantes. No entanto, na década de 50 a disponibilidade de petróleo a um custo menor freiou o desenvolvimento dos usos industriais da proteína soja.<sup>88</sup>

Atualmente, a proteína de soja tem apelo na indústria devido ao seu sabor muito suave, baixo custo, alto valor nutritivo e propriedades funcionais interessantes.<sup>90</sup> Pelo fato de possuir também outros benefícios como, redução do colesterol e prevenção de doenças do coração, a indústria de alimentos tem intensificado o interesse no desenvolvimento de uma grande diversidade de produtos de soja. Muitos destes produtos são compostos de PIS, como bebidas, barras nutricionais, suplementos alimentares, cereais, biscoitos, molhos, chocolates e snacks.<sup>89</sup>

Entre suas propriedades funcionais, a capacidade de formar géis ou modificar a qualidade de um solvente, também desperta grande interesse industrial.<sup>90</sup> Somente após um lapso de quase 50 anos, é que a necessidade de materiais “ambientalmente amigáveis”, utilizando recursos renováveis tem sido discutida, pois os recursos do petróleo são finitos e estão se tornando limitados. Pesquisas já disponibilizaram no mercado polímeros, adesivos, filmes, plásticos, materiais compostos e elastômeros oriundos da soja para aplicações em equipamentos agrícolas, automóveis, infra-estrutura marítima e engenharia civil.<sup>88</sup>

Apesar do interesse público e comercial considerável nos produtos de soja, a proporção de proteína consumida diretamente na alimentação humana e no uso industrial é muito restrito, apontando uma necessidade de buscar novos usos da proteína.<sup>88</sup>

Além dos diversos usos citados, a proteína de soja também pode ser usada para preparar filmes e imobilizar enzimas, mais especificamente as lipases.

Nas últimas décadas, a possibilidade do uso de enzimas, imobilizadas ou não, aliada a necessidade e ao aumento das sínteses

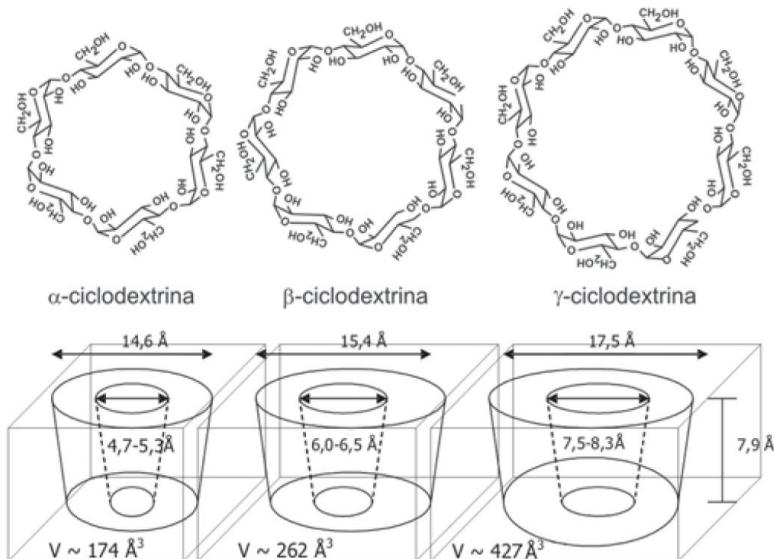
assimétricas, só se tornou possível devido ao desenvolvimento dos métodos analíticos. Estes possibilitam a avaliação da pureza enantiomérica dos produtos obtidos. Entre os métodos mais comuns citam-se o polarimétrico, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia gasosa quiral (CGQ), que será descrita a seguir.

### 1.11 - CROMATOGRAFIA GASOSA QUIRAL

A cromatografia gasosa com fase quiral é um dos métodos mais utilizados para a análise de enantiômeros. Esse método sensível não é afetado por traços de impurezas e na maioria das vezes é rápido e simples de ser realizado. Está baseado em associações moleculares que podem levar a um reconhecimento quiral suficiente que resulte em uma resolução enantiomérica. A razão dos picos fornece uma medida da composição enantiomérica da amostra precisa e quantitativa. Tais medidas podem ser realizadas com alto grau de precisão.<sup>91, 92</sup>

As ciclodextrinas (CD) são um grupo de sacarídeos estruturalmente relacionados, que são produzidos pela ciclização enzimática do amido catalisada pela enzima ciclodextrina-glicosil-transferase, formando uma espiral helicoidal de unidades de glicose unidas por ligações  $\alpha$ -(1-4). Devido à falta de rotação livre em volta das ligações das unidades de glicose, as CDs não são moléculas cilíndricas, tendo a forma tronco-cônica. Podem conter entre 6 e 8 unidades de glicose, denominando-se respectivamente,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD.<sup>93, 94</sup> (**Figura 12**)

As ciclodextrinas vêm sendo aplicadas com muita ênfase na separação de enantiômeros na cromatografia líquida ou gasosa, através do desenvolvimento de colunas com fases estacionárias quirais.<sup>93, 94</sup> Nesta técnica utiliza-se uma fase estacionária quiral (ex.  $\beta$ -CD), a qual tem um agente de alta pureza enantiomérica que auxilia na resolução.<sup>92, 95</sup>



**Figura 12** - Estruturas moleculares e dimensões das α-, β-, γ-CD. <sup>96</sup>

O enantiômero a ser analisado é submetido a interações diastereoisoméricas rápidas e reversíveis com a fase estacionária e, portanto, pode ser eluído em diferentes velocidades. A resolução dos enantiômeros pela cromatografia baseia-se na diferença entre energias livres de formação dos intermediários diastereoisoméricos transitórios formados durante a eluição. A designação da configuração absoluta, portanto, envolverá a correlação da configuração molecular com a ordem da eluição do enantiômero. <sup>91, 92, 95</sup>

Através da **Equação 3**, é calculado o ee, e a conversão é calculada pela razão das áreas dos picos referentes ao reagente e aos produtos.

$$ee = \frac{(\text{área do isômero maior}) - (\text{área do isômero menor})}{(\text{área do isômero maior}) + (\text{área do isômero menor})} \quad \text{Eq. 3}$$

Certamente existem limitações para este método, algumas das quais são características para a cromatografia gasosa. As amostras deverão ser suficientemente voláteis e termicamente estáveis e, é claro, deverá ser quantitativamente resolvida na fase quiral do CG. <sup>92</sup>



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Imobilizar lipases em blendas de diferentes composições de amido/PEO e de proteína de soja/PEO, principalmente contendo  $\beta$ -ciclodextrina ou não, e utilizar estes sistemas como catalisadores na resolução de álcoois racêmicos derivados do 1-feniletanol.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair, separar e purificar o amido proveniente da batata aipo (*Arracacia xanthorrhiza*).

- Preparar filmes de amido e proteína de soja, (polímeros naturais) com poli(óxido de etileno) (PEO) entre outros, com e sem lipases e com ou sem  $\beta$ -ciclodextrina.

- Avaliar a estabilidade dos filmes em função de solventes orgânicos e da temperatura.

- Preparar e purificar os álcoois racêmicos derivados da 3-nitro-acetofenona, 3,4-metilenodioxo-acetofenona, 4-nitro-acetofenona, 4-metil-acetofenona, 4-bromo-acetofenona e a 4-métoxi-acetofenona (**15a** - **20a**) com borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), (usados como padrões nas análises de CGQ).

- Preparar e purificar os correspondentes acetatos derivados dos álcoois racêmicos 3-nitro-1-feniletanol, 3,4-metilenodioxo-1-feniletanol, 4-nitro-1-feniletanol, 4-metil-1-feniletanol, 4-bromo-1-feniletanol e o 4-métoxi-1-feniletanol (**15b** - **20b**) *via* química com o anidrido acético (usados como padrões nas análises de CGQ).

- Caracterizar todos os compostos racêmicos (álcoois e ésteres) por técnicas espectrométricas de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de  $\text{H}^1$ ) e cromatografia gasosa com fase estacionária quiral (CGQ), e comprovar a pureza por cromatografia em camada delgada (c.c.d.).

- Monitorar as reações de resolução dos álcoois racêmicos derivados do 1-feniletanol por c.c.d. e CGQ;

- Avaliar a influência da razão molar nas reações de transesterificação do acetato de vinila com os álcoois racêmicos 3-nitro-1-feniletanol e 3,4-metilenodioxo-1-feniletanol.

- Verificar a influência da imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* (LBC) em diferentes filmes e blendas na reação de transesterificação do acetato de vinila com os álcoois derivados do 1-

feniletanol com os substituintes 3-nitro e 3,4-metilenodioxí.

- Investigar o efeito da temperatura na resolução dos álcoois racêmicos 3-nitro e 3,4-metilenodioxí-1-feniletanol com acetato de vinila, bem como avaliar a reação na ausência da LBC ou o uso da mesma não imobilizada.

- Avaliar a utilização de diferentes doadores acilas nas reações de transesterificação com os álcoois racêmicos 3-nitro e 3,4-metilenodioxí-1-feniletanol.

- Verificar a eficiência das lipases de *Burkholderia cepacia* (LPS-SD), *Mucor javanicus* (LMJ 10), *Pseudomonas fluorescens* (LAK 20), *Aspergillus niger* (LAN 12), *Candida cylindracea* (LAY 30) e de *Thermomyces lanuginosus* (LTL-IM,) na resolução do álcool racêmico 3-nitro-1-feniletanol com acetato de vinila.

- Avaliar o efeito da utilização de diferentes solventes orgânicos na reação de transesterificação do acetato de vinila com o (*R,S*)-3-nitro-1-feniletanol a 35° C.

- Avaliar o efeito de grupos retiradores ou doadores de elétrons nos derivados do (*R,S*)-1-feniletanol na reação de transesterificação com acetato de vinila utilizando a LBC imobilizada em filmes de amido/PEO (1:1 m/m) e de proteína de soja/PEO (1:1 m/m).

- Verificar a reutilização dos filmes de amido/PEO e de proteína de soja/PEO, na presença ou ausência de  $\beta$ -ciclodextrina, na resolução do 3-nitro-1-feniletanol com acetato de vinila, a 35° C.

- Comparar os resultados obtidos com outros já reportados na literatura.

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 MATERIAIS

Para a preparação dos suportes foi utilizado amido proveniente da batata aipo (*Arracacia xanthorrhiza*). Este foi extraído conforme está descrito no item 3.4, pág. 34.

Foram utilizadas as seguintes lipases:

Lipase de *Burkholderia cepacia* – (LBC) (Amano, 30.000 U/g)\*

lipase de *Mucor javanicus* – (LMJ 10) (Amano, 10.000 U/g)

lipase de *Pseudomonas fluorescens* – (LAK 20) (Amano, 25.000 U/g);

lipase de *Aspergillus niger* – (LAN 12) (Amano, 120.000 U/g);

lipase de *Candida cylindracea* – (LAY 30) (Amano, 30.000 U/g);

lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em terra diatomácea – (LPS-SD) (Amano, 23.000 U/g)

lipase de *Thermomyces lanuginosus* – (LTL-IM) (Novozymes, 10.000 U/g)

\*Uma unidade de atividade lipolítica está definida como a quantidade de enzima a qual libera um  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto. Como substrato foi usado o óleo de oliva.

Solventes: acetato de etila (Grupo Química, 99%), hexano (Synth, 98,5%), *t*-butanol (Vetec), diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) (Synth, 99,5%), éter *t*-butilmetílico (MTBE) (Vetec, 99,9%), clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) (Vetec 99,8%), ciclohexano (Vetec, 99%), éter di-*isopropílico* (Vetec, 99%), tetrahidrofurano (Maia, 99%).

Reagentes: acetato de vinila (Fluka, 99%), 4-bromo-acetofenona (Aldrich, 98%), 4-metoxi-acetofenona (Merck, 98%), 4-nitro-acetofenona (Acros, 97%), 3-nitro-acetofenona (Acros, 98%), 3,4-metilenodioxo-acetofenona (Aldrich, 98%), 4-metil-acetofenona (Aldrich 99%), Ácido bórico (Vetec, 99,5%), borohidreto de sódio (Aldrich, 98%), acetato de *isopropenila* (Fluka, 99%), propionato de vinila (Aldrich, 99%), laurato de vinila (Aldrich, 99%), estearato de vinila (Aldrich, 95%), sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ) (Vetec, 99,5%), glicerol (Vetec, 99,5%), sorbitol (Vetec, 99%), poli-óxido de etileno

(PEO) (Acros, M.M.=300.000),  $\beta$ -ciclodextrina (Wacker, grau farmacéutico), proteína isolada de soja (Solae Company).

### 3.2 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos que foram utilizados neste trabalho estão descritos a seguir:

Espectrômetro de RMN<sup>1</sup>H<sup>1</sup> (Varian AC 400F, 400MHz e 200MHz);

Espectrofotômetro de infravermelho (FTIR da Perkin Elmer 16C);

Estes equipamentos estão localizados na Central de Análises, e os seguintes disponíveis nos laboratórios 301/306, ambos do DQ – UFSC.

Cromatógrafo a gás GC Agilent Technologies 7820 A, com as colunas quirais Chrompack – BetaDex – 30mX0,25mmX0,25 $\mu$ m e Supelco – BetaDex 110 – 30mX0,25mmX0,25 $\mu$ m.

Agitador com banho termostatzado (Technal TE-0532);

Balanças analíticas (Sartorius basic e Ek-200i)

Rota-evaporador (Büchi 461 water bath);

Agitadores magnéticos (Dist);

Chapas de aquecimentos (Dist, Microquimica)

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

Os compostos, alcoóis e ésteres racêmicos, foram caracterizados por análises espectrométricas de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN- <sup>1</sup>H), polarimetria e por cromatografia gasosa com fase quiral (CGQ) por comparação com padrões.

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro FTIR da Perkin Elmer 16C, em pastila de KBr ou filme.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN- <sup>1</sup>H) foram obtidos no espectrômetro Varian 400 ou 200 MHz, utilizando como referência interna o tetrametilsilano (TMS,  $\delta = 0,00$ ). O

solvente utilizado foi o clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ).

As constantes de acoplamento ( $J$ ) foram medidas em Hertz (Hz) e os sinais caracterizados como; singleto (s), dubleto (d), duplo dubleto (dd), tripleto (t), quarteto (q), quinteto (qui), sexteto (sex) e multiplete (m).

Os excessos enantioméricos dos substratos e produtos formados nas reações de biocatálise foram monitorados no cromatógrafo gasoso da marca Agilent Technologies 7820 A. As colunas capilares utilizadas foram a Chrompack – BetaDex – 30m X 0,25mm X 0,25 $\mu\text{m}$  e a Supelco – BetaDex 110 – 30mX0,25mmX0,25 $\mu\text{m}$ .

A programação utilizada para separar os enantiômeros dos substratos e produtos será descrita no item **3.8**, pág 42.

### 3.4 EXTRAÇÃO DOS GRÃOS DE AMIDO DE BATATA AIPO

Cerca de 1,0 Kg de tubérculos de batata aipo (baroa ou mandioquinha, *Arracacia xanthorrhiza*) foram selecionados para a extração do amido. Os tubérculos foram lavados, descascados e posteriormente picados e colocados em um liquidificador comercial com aproximadamente 500 mL de água para 500 g de batata. A seguir foram triturados, peneirados e lavados com água corrente por diversas vezes para que o amido desprendesse das fibras.

O filtrado contendo o amido foi deixado em repouso por 48h para decantar. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e o amido colocado na estufa a 60 °C por 24h para secagem. Após o tempo de secagem, obteve-se 113 g de amido, que foi triturado, peneirado e usado posteriormente para preparar os filmes e imobilizar as diversas lipases.

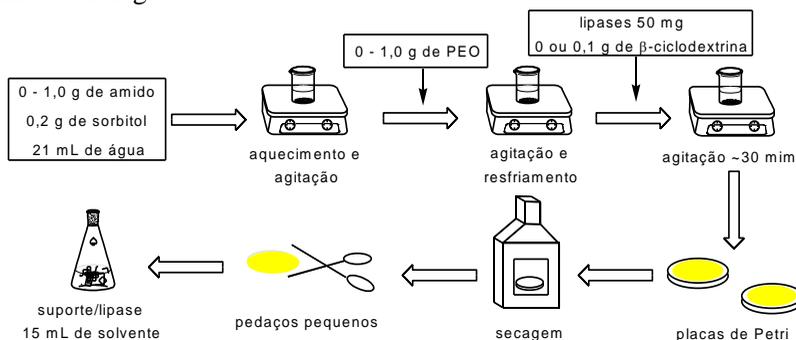
### 3.5 PREPARAÇÃO DOS FILMES DE AMIDO E DE PROTEÍNA DE SOJA E IMOBILIZAÇÃO DAS LIPASES

Para a imobilização das lipases nos filmes de amido foram solubilizados de 0 – 1,0 g de amido de batata aipo com 0,2 g de sorbitol em 21 mL de água destilada. A solução foi aquecida sob agitação magnética até o intumescimento dos grãos de amido, sendo então retirado do aquecimento, mas mantido sob agitação. Para preparar as blendas de amido/PEO, foram utilizadas diferentes massas de PEO, mantendo-se o total de 1,0 g.

Após o resfriamento da solução foi adicionado 50 mg das lipases LPS, LM10, LAK 20, LAN 12, LAY 30 diluídas em 4 mL de água, com ou sem adição de 0,1 g de  $\beta$ -ciclodextrina. O sistema foi mantido em

agitação por mais 30 minutos, sendo posteriormente transferido para uma placa de Petri e colocado na capela para evaporação do solvente. Os filmes com as lipases imobilizadas foram cortados em pequenos pedaços ( $\sim 0,1\text{cm}^2$ ) e transferidos para um erlenmeyer de 250 mL, para serem empregados nas reações biocatalisadas. **Esquema 6.**

As blendas poliméricas feitas a partir da proteína isolada de soja seguiram a mesma metodologia, porém não era necessário aquecimento e a massa total de polímeros (PIS + PEO) foi de 1,2 g. Os filmes de carboximetil celulose (CMC) com e sem  $\beta$ -CD foram preparados de modo análogo.



**Esquema 6.** Preparação dos filmes de amido/PEO ou PIS/PEO e imobilização das lipases.

Foram também preparados filmes de amido e proteína de soja sem adição de lipases. Estes foram usados nos estudos de estabilidade em diversos solventes orgânicos, de termoestabilidade e em alguns testes reacionais (reação na ausência do biocatalisador).

## 3.6 PREPARAÇÃO DOS ALCOÓIS E ÉSTERES RACÊMICOS POR MÉTODOS QUÍMICOS

### 3.6.1 Procedimento geral para a redução das acetofenonas substituídas

As 3-nitro; 3,4-metilenodioxo; 4-nitro; 4-metil; 4-bromo e 4-metóxiacetofenonas (**15a - 20a**) foram reduzidas para obtenção de seus respectivos alcoóis. Para estas reações utilizou-se  $\text{NaBH}_4$  como agente redutor e dois métodos já reportados na literatura.

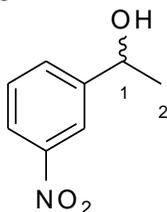
**Método em fase sólida**<sup>97</sup>: em um almofariz adicionaram-se as acetofenonas 3-nitro ou 3,4-metilenodioxi (5g; 30mmol), NaBH<sub>4</sub> (1,15g; 30mmol) e H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (1,9g; 30mmol) e macerou-se com o pistilo, até a completa redução das acetofenonas. A formação dos alcoóis racêmicos foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (ccd), tendo como eluente *n*-hexano:acetato de etila (7:3 ou 8:2 v/v).

Após o término da maceração a “calda” restante foi lavada com diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) e então filtrada e colocada em um balão de 100 mL para evaporação do solvente. O óleo resultante foi dissolvido novamente em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para precipitação total dos boranos, seco com sal secante, filtrado e rotaevaporado. Os produtos obtidos foram analisados por IV e RMN-<sup>1</sup>H.

**Método com SiO<sub>2</sub> em etanol**<sup>98</sup>: em um erlenmeyer de 250 mL foram adicionadas as acetofenonas, 4-nitro (5g, 30mmol), 4-metóxi (5g, 33mmol), 4-bromo (5g, 25mmol) ou 4-metil (5g, 37mmol) com NaBH<sub>4</sub> (2,3-2,8g; 60-74mmol), SiO<sub>2</sub> (5g), H<sub>2</sub>O (1,5g) e etanol (25-30mL). A solução foi agitada até completa redução das cetonas e formação dos respectivos alcoóis racêmicos. A obtenção dos mesmos também foi monitorada por ccd, utilizando-se como eluente *n*-hexano:acetato de etila (7:3 ou 8:2 v/v).

Após o término das reações de redução, as soluções foram filtradas em um balão de 100 mL para evaporação do solvente. O precipitado foi solubilizado em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25-30mL), seco com sal secante (MgSO<sub>4</sub>), filtrado e novamente rotaevaporado. Os produtos foram caracterizados por IV e RMN-<sup>1</sup>H, pf e a pureza comprovada por ccd.

**15b**



**Rend:** 91% (4,55 g),  
sólido amarelado

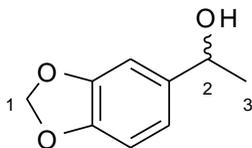
**Rf** = 0,34 (*n*-hexano:acetato de etila 8:2 v/v).

**Pf** = 62-63 °C

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ 8,19 (s, 1H, C-H aromático); 8,07-8,05 (d, 1H, J=8 Hz, C-H aromático); 7,70-7,68 (d, 1H, J=8 Hz, C-H aromático); 7,51-7,49-7,47 (t, 1H, J=8 Hz, C-H aromático); 5,01-5,00-4,98-4,96 (q, 1H, J=6,7 Hz, H-1); 1,51-1,49 (d, 3H, J=8 Hz, H-2).

**IV-** (KBr, cm<sup>-1</sup>) 3377 [ν (OH)]; 2987-2872 [ν (C-H)]; 1535 e 1355 [ν (NO<sub>2</sub>)]; 1075 [ν (C-O)].

## 16b



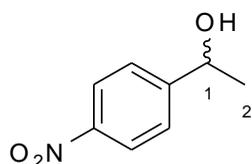
**Rend:** 83% (4,15 g),  
óleo rosado

**Rf** = 0,36 (*n*-hexano:acetato de etila 8:2 v/v).

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ 6,79 (s, 1H, C-H aromático); 6,71-6,70-6,69 (dd, 2H, J=4 Hz, C-H aromático); 5,84 (s, 2H, H-1); 4,72-4,69-4,66-4,63 (q, 1H, J=12 Hz, H-2); 1,37-1,34 (d, 3H, J=12 Hz, H-3).

**IV-** (KBr, cm<sup>-1</sup>) 3400 [ν (OH)]; 2978-2889 [ν (C-H)]; 1040 [ν (C-O)].

## 17b



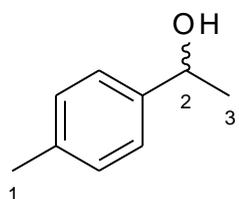
**Rend:** 86% (4,3 g),  
óleo amarelado

**Rf** = 0,37 (*n*-hexano:acetato de etila 8:2 v/v).

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ 8,14-8,12 (d, 2H, J=8 Hz, C-H aromático); 7,53-7,51 (d, 2H, J=8 Hz, C-H aromático); 5,02-5,00-4,99-4,97 (q, 1H, J=4 Hz, H-1); 1,50-1,49 (d, 3H, J=4 Hz, H-2).

**IV-** (KBr, cm<sup>-1</sup>) 3421 [ν (OH)]; 2978-2853 [ν (C-H)]; 1517 e 1350 [ν (NO<sub>2</sub>)]; 1091 [ν (C-O)].

## 18b

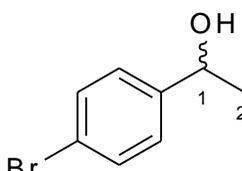


**Rend:** 84% (4,2 g),  
óleo amarelado

**Rf** = 0,69 (*n*-hexano:acetato de etila 7:3 v/v).

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,21-7,17 (d, 2H, J=8 Hz, C-H aromático); 7,11-7,07 (d, 2H, J=8 Hz, C-H aromático); 4,78-4,75-4,72-4,69 (q, 1H, J=6 Hz, H-2); 2,31 (s, 3H, H-1), 1,41-1,37 (d, 3H, J=6 Hz, H-3).

**IV-** (KBr, cm<sup>-1</sup>) 3370 [ν (OH)]; 2977-2925 [ν (C-H)]; 1094 [ν (C-O)].

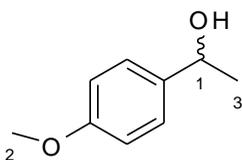
**19b**

**Rend:** 67% (3,35 g),  
óleo amarelado

**Rf**= 0,68 (*n*-hexano:acetato de etila 7:3 v/v).

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,41-7,37 (d, 2H, J=8 Hz, C-H aromático); 7,15-7,11 (d, 2H, J=8 Hz, C-H aromático); 4,75-4,72-4,69-4,66 (q, 1H, J=6 Hz, H-1); 1,37-1,34 (d, 3H, J=6 Hz, H-2).

**IV-** (KBr, cm<sup>-1</sup>) 3370 [ν (OH)]; 2977-2873 [ν (C-H)]; 1082 [ν (C-O)].

**20b**

**Rend:** 85% (4,25 g),  
óleo amarelado

**Rf**= 0,45 (*n*-hexano:acetato de etila 8:2 v/v).

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,22-7,20 (d, 2H, J=8 Hz, C-H aromático); 6,83-6,81 (d, 2H, J=12 Hz, C-H aromático); 4,75-4,74-4,72-4,71 (q, 1H, J=8 Hz, H-1); 3,73 (s, 3H, H-2); 1,40-1,38 (d, 3H, J=8 Hz, H-3).

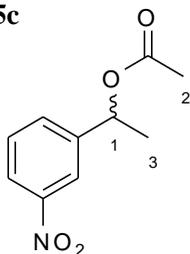
**IV-** (KBr, cm<sup>-1</sup>) 3394 [ν (OH)]; 2975-2826 [ν (C-H)]; 1091 [ν (C-O)].

### 3.6.2 Preparação dos (*R,S*)-acetatos de 1-feniletanol substituídos (15-20c)

Em um balão de 250 mL adicionou-se 1 g de um dos alcoóis racêmicos (5,0-7,4 mmol), anidrido acético (1,02-1,50 g), diclorometano (30 mL) e algumas gotas de ácido acético para atuar como catalisador.

O sistema foi mantido em refluxo por tempos de 24-48h, a formação do produto foi acompanhada por ccd, utilizando como eluente *n*-hexano/acetato de etila (7:3 ou 8:2 v/v). Após a comprovação da formação do éster (por ccd), a solução foi transferida para um funil de separação e lavada com água (3x 25 mL), seguida por solução aquosa de bicarbonato de sódio (3x 25 mL) até a remoção de todo ácido acético. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro (MgSO<sub>4</sub>), filtrada e em seguida rota-evaporada. Os compostos obtidos foram analisados por técnicas espectroscópicas de RMN-<sup>1</sup>H e IV. A pureza de cada um deles foi também comprovada por ccd.

15c



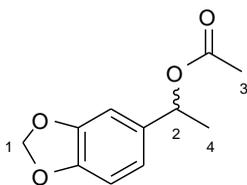
**Rend:** 67% (0,84 g),  
óleo amarelado

**Rf**= 0,53 (*n*-hexano:acetato de etila 8:2 v/v).

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ 8,23-8,18-8,13 (t, 2H, J=10Hz, C-H aromático); 7,70-7,66 (d, 3H, J=8 Hz, C-H aromático); 7,57-7,53-7,50 (t, 1H, J=8 Hz, C-H aromático); 5,99-5,96-5,92-5,89 (q, 1H, J=6 Hz, H-1); 5,01-5,00-4,98-4,96 (q, 1H, J=6,7 Hz, H-1); 2,12 (s, 3H, H-2); 1,60-1,56 (d, 3H, J=8 Hz, H-3).

**IV-** (KBr, cm<sup>-1</sup>) 2978-2872 [ν (C-H)]; 1730 [ν (C=O)]; 1530 e 1355 [ν (NO<sub>2</sub>)];

16c



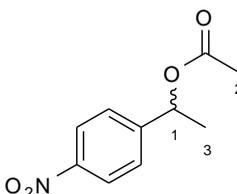
**Rend:** 65% (0,81 g),  
óleo rosado

**Rf**= 0,56 (*n*-hexano:acetato de etila 8:2 v/v).

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ 6,82 (s, 1H, C-H aromático); 6,76-6,73-6,99 (t, 2H, J=6 Hz, C-H aromático); 5,87 (s, 2H, H-1); 5,80-5,77-5,74-5,71 (q, 1H, J=6 Hz, H-2); 2,00 (s, 3H, H-3); 1,47-1,44 (d, 3H, J=6 Hz, H-4).

**IV-** (KBr, cm<sup>-1</sup>) 2976-2894 [ν (C-H)]; 1744 [ν (C=O)]; 1044 [ν (C-O)].

17c

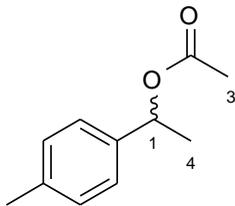


**Rend:** 63% (0,79 g),  
óleo amarelado

**Rf**= 0,52 (*n*-hexano:acetato de etila 8:2 v/v).

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ 8,24-8,19 (d, 2H, J=10 Hz, C-H aromático); 7,54-7,49 (d, 2H, J=10 Hz, C-H aromático); 5,98-5,95-5,91-5,88 (q, 1H, J=8 Hz, H-1); 2,12 (s, 3H, H-2); 1,58-1,54 (d, 3H, J=8 Hz, H-3).

**IV-** (KBr, cm<sup>-1</sup>) 2993-2928 [ν (C-H)]; 1738 [ν (C=O)]; 1527 e 1343 [ν (NO<sub>2</sub>)].

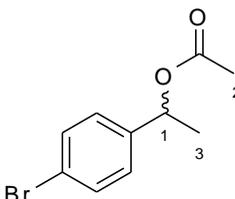
**18c**

**Rend:** 69% (0,90 g),  
 óleo amarelado

**Rf**= 0,82 (*n*-hexano:acetato de etila 7:3 v/v).

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ 6,81-6,67 (m, 4H, C-H aromático); 4,75-4,73-4,72-4,70 (q, 1H, J=8 Hz, H-1); 2,46 (s, 6H, H-2 e H-3); 1,39-1,37 (d, 3H, J=8 Hz, H-4).

**IV-** (KBr, cm<sup>-1</sup>) 2972-2900 [ν (C-H)]; 1674 [ν (C=O)]; 1041 [ν (C-O)].

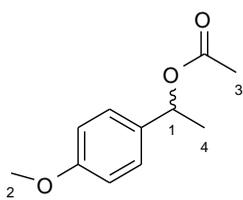
**19c**

**Rend:** 81% (0,98 g),  
 óleo amarelado

**Rf**= 0,83 (*n*-hexano:acetato de etila 7:3 v/v).

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,45-7,43 (d, 2H, J=8 Hz, C-H aromático); 7,22-7,20 (d, 2H, J=8 Hz, C-H aromático); 5,83-5,81-5,79-5,78 (q, 1H, J=8 Hz, H-1); 2,04 (s, 3H, H-2); 1,49-1,48 (d, 3H, J=8 Hz, H-3).

**IV-** (KBr, cm<sup>-1</sup>) 2986-2927 [ν (C-H)]; 1733 [ν (C=O)]; 1068 [ν (C-O)].

**20c**

**Rend:** 72% (0,91 g),  
 óleo amarelado

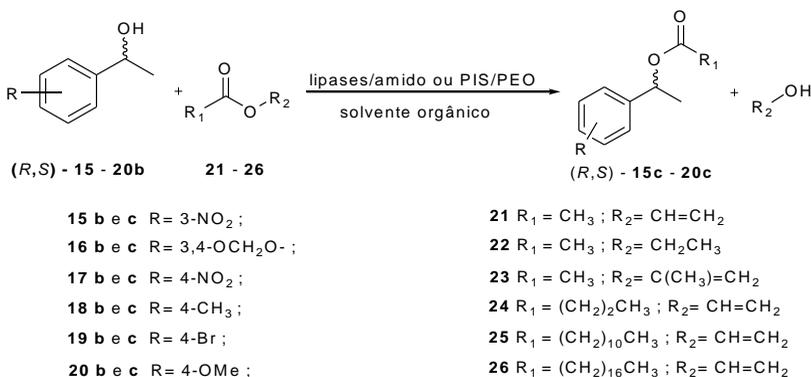
**Rf**= 0,54 (*n*-hexano:acetato de etila 8:2 v/v).

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,31-7,27 (d, 2H, J=8 Hz, C-H aromático); 7,22-7,17 (d, 2H, J=8 Hz, C-H aromático); 5,89-5,86-5,83-5,80 (q, 1H, J=6 Hz, H-1); 3,80 (s, 3H, H-2); 2,04 (s, 3H, H-3); 1,53-1,50 (d, 3H, J=6 Hz, H-4).

**IV-** (KBr, cm<sup>-1</sup>) 2976-2936 [ν (C-H)]; 1729 [ν (C=O)]; 1037 [ν (C-O)].

### 3.7 PREPARAÇÃO DE ÉSTERES VIA BIOCATALÍSE

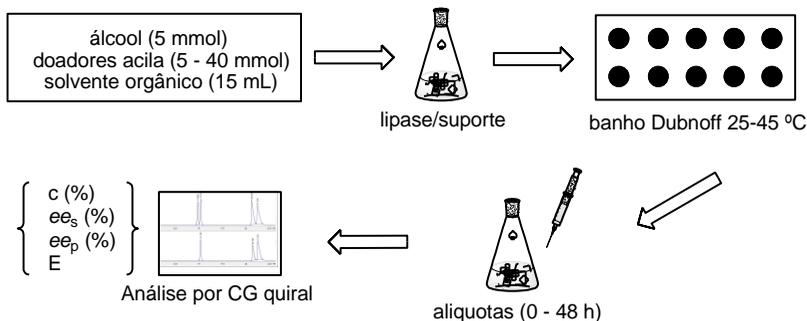
As reações de transesterificação dos alcoóis racêmicos derivados do 1-feniletanol foram realizadas conforme o **Esquema 7**, utilizando diferentes lipases imobilizadas ou não em filmes de amido/PEO ou PIS/PEO, em diversos solventes orgânicos, diversos doadores acila e nas temperaturas de 25, 35 e 45 °C.



**Esquema 7.** Reação de transesterificação biocatalisada dos (R,S)-álcoois derivados do 1-feniletanol.

Em um erlenmeyer de 250 mL, contendo 15 mL de solvente orgânico e um dos sistemas de imobilização das lipases, adicionou-se um dos alcoóis **15-20b** (5mmol). A seguir foi adicionado um dos doadores acila (5-40mmol). A seguir o meio reacional foi colocado sob agitação em um banho tipo Dubnoff, onde periodicamente (0 - 48h) eram retiradas alíquotas para serem analisadas por cromatografia gasosa com fase quiral. **Esquema 8.**

Os detalhes experimentais para cada reação estudada, e as variações específicas, serão apresentados e discutidos nos resultados e discussão.



**Esquema 8.** Preparação do meio reacional e análise dos produtos obtidos na resolução enzimática dos álcoois (*R,S*)-**15b-20b**.

### 3.8 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS NAS ANÁLISES DE CGQ

As condições de análise de CGQ foram determinadas para cada reagente e produto. Inicialmente, os padrões sintetizados por métodos químicos foram submetidos à CGQ para obtenção das melhores condições de separação dos enantiômeros. Posteriormente, os produtos das sínteses enzimáticas foram analisados sob as mesmas condições.

As condições de análises utilizadas foram: pressão do gás carregador 19 psi; Temp. do injetor (Split 1/100) – 220 °C; temp. do detector (FID) 220 °C; volume da amostra – 0,2 µL.

Todas as análises cromatográficas foram realizadas em isotermas, as temperaturas utilizadas e os tempos de retenção serão especificados para cada composto.

135 °C - (*R,S*)-3-nitro-1-feniletanol (**15b**): 20,6 e 21,3 mim;  
 (*R,S*)-acetato de 3-nitro-1-feniletila (**15c**): 14,9 e 15,3 mim.

125 °C - (*R,S*)-3,4-metilenodioxo-1-feniletanol (**16b**): 9,3 e 9,6 mim;  
 (*R,S*)-acetato de 3,4-metilenodioxo-1-feniletila (**16c**): 11,2 e 11,5 mim.

135 °C - (*R,S*)-4-nitro-1-feniletanol (**17b**): 15,5 e 16,4 mim;  
 (*R,S*)-acetato de 4-nitro-1-feniletila (**17c**): 12,4 e 13,2 mim.

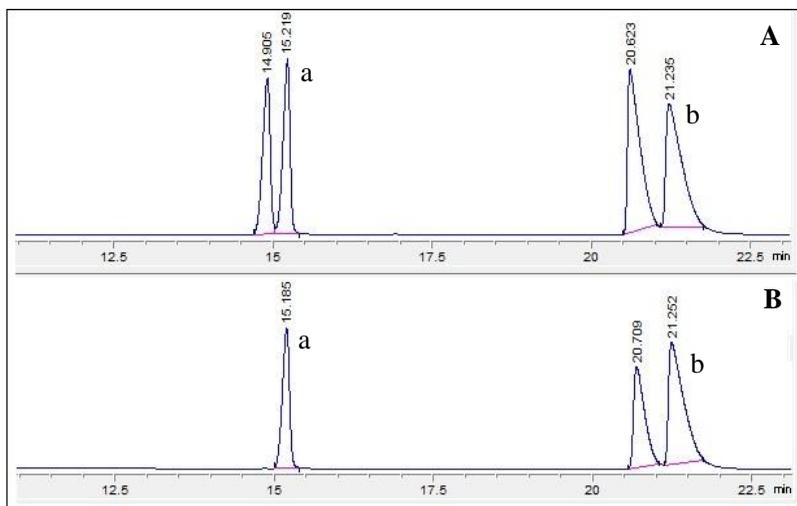
105 °C - (*R,S*)-4-metil-1-feniletanol (**18b**): 12,9 e 13,9 mim;  
 (*R,S*)-acetato de 4-metil-1-feniletila (**18c**): 16,1 e 17,0 mim.

115 °C - (*R,S*)-4-Br-1-feniletanol (**19b**): 12,9 e 14,0 mim; (*R,S*)-  
 acetato de 4-Br-1-feniletila (**19c**): 16,1 e 17,0 mim.

115 °C - (*R,S*)-4-metóxi-1-feniletanol (**20b**): 20,2 e 20,9; (*R,S*)-acetato de 4-metóxi-1-feniletila (**20c**): 26,8 e 27,4 mim.

As porcentagens de conversão (c%) foram calculadas por comparação da área dos picos dos produtos e reagentes. O excesso enantiomérico (*ee*) foi calculado através da **Equação 3** (pág 29), e a razão enantiomérica (*E*) por um programa para o cálculo da seletividade de resolução cinética que está disponível na internet ([www.orgc.tugraz.at](http://www.orgc.tugraz.at)).

A **Figura 13** mostra os cromatogramas dos padrões químicos do (*R,S*)-3-nitro-1-feniletanol (b) e do (*R,S*)-acetato-3-nitro-1-feniletanol (a) (**A**) e o de uma alíquota da reação de transesterificação do (*R,S*)-3-nitro-1-feniletanol com acetato de vinila (**B**).



**Figura 13** - Cromatograma do (*R,S*) 3-nitro-1-feniletanol (b) e (*R,S*) acetato (a). Em **A** são apresentados os padrões obtidos por métodos químicos e em **B** o de uma alíquota da reação de transesterificação de **15b** com acetato de vinila, em 15 mL de MTBE, 50 mg LBC imobilizada em filme de amido/PEO (1:1 m/m), 35 °C, 100 rpm, 24% de conversão em *R-15c*.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho lipases de diferentes procedências foram imobilizadas em filmes de amido de batata aipo e de proteína isolada de soja ambos com PEO. Estes suportes foram utilizados para a resolução cinética enzimática de alcoóis racêmicos derivados do (*R,S*)-1-feniletanol.

Os padrões racêmicos (alcoóis e ésteres) foram sintetizados por métodos químicos e caracterizados por IV, RMN de  $H^1$  e CGQ. Os produtos obtidos nas reações enzimáticas foram monitorados por ccd, caracterizados e comparados com os padrões racêmicos em análises de CGQ. As conversões aos produtos foram determinadas pela comparação da área dos produtos e reagentes.

Os primeiros testes foram realizados para determinar as propriedades das blendas poliméricas como estabilidade térmica e em diversos solventes orgânicos. Determinou-se também a quantidade de água nos filmes pelo método de titulação Karl-Fisher. Os próximos itens apresentarão e discutirão os resultados obtidos.

### 4.1 - EFEITO DO SOLVENTE E DA TEMPERATURA NOS FILMES DE AMIDO

Conforme descrito no item 3.4 (pág 34), utilizou-se a batata aipo como fonte natural para a extração dos grãos de amido, da qual a partir de 1 Kg obteve-se 113g de amido. O amido obtido foi triturado e peneirado para ser utilizado na preparação dos filmes. As blendas de proteína de soja, que foi obtida comercialmente, e de amido foram preparadas conforme descrito no item 3.5 (pág 34) para posteriormente serem utilizadas nos diversos estudos.

Os filmes de amido de batata aipo e de proteína de soja sem as lipases imobilizadas foram submetidos aos testes de temperatura e de estabilidade em diversos solventes orgânicos. [por ex. clorofórmio, acetona, éter *t*-butil metílico (MTBE)]

A influência da temperatura foi analisada para observar se ocorreria ou não decomposição dos filmes em valores mais elevados que a do ambiente. Os filmes foram aquecidos com *n*-hexano, em banho-maria até ~55-60 °C por 30 min. Após este tempo não houve mudanças significativas no aspecto macroscópico, verificando assim que estes são resistentes em temperaturas mais altas.

Os solventes utilizados para verificar a estabilidade dos filmes foram o *n*-heptano, etanol, acetonitrila, diclorometano, clorofórmio, éter

etílico, éter *t*-butil metílico (MTBE), 1,4-dioxano, propanona (acetona), ciclohexano, éter di-*is*opropílico e tetrahidrofurano.

Os filmes foram cortados em pedaços pequenos ( $\sim 5 \text{ mm}^2$ ) e colocados em tubos de ensaio com  $\sim 1 \text{ mL}$  dos solventes citados acima, por 24 h a temperatura ambiente (t.a.). Os filmes contidos nos tubos de ensaio com os solventes acetonitrila, diclorometano e clorofórmio sofreram modificação macroscópica, sendo classificados como inapropriados para estudos posteriores. Na presença dos outros solventes, os filmes permaneceram estáveis, e assim estes puderam ser usados nos estudos subsequentes para avaliar o efeito do meio orgânico na reação de resolução do 3-nitro-1-feniletanol.

#### 4.2 – DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA NOS FILMES

O teor de água nas blendas de amido/PEO e proteína de soja/PEO, com ou sem  $\beta$ -ciclodextrina, foi determinado pelo método de titulação Karl-Fischer. Os filmes preparados com 50 mg de LBC e sem a mesma apresentaram 7,05 - 10,19% de água. Estes valores estão mostrados na **Tabela 2**.

Os resultados apresentados na **Tabela 2** estão de acordo com alguns descritos na literatura, pois já está estabelecido que as enzimas necessitam de uma quantidade mínima de água para a manutenção da conformação nativa, e assim de sua atividade catalítica.<sup>8, 18</sup>

A presença de certa quantidade de água nas blendas poliméricas, após a imobilização, contribui para a manutenção da atividade catalítica da enzima, que poderá ser melhor testada quando estes sistemas forem empregados nas reações de transesterificação.

**Tabela 2.** Determinação do teor de água nos filmes de amido/PEO e proteína de soja/PEO, na presença e ausência de  $\beta$ -CD, com e sem lipase.

Sistemas <sup>(a)</sup>	Porcentagem de água (%) <sup>(b)</sup>
Amido/PEO	7,48 +- 1,11
Amido/PEO/ $\beta$ -CD	7,05 +- 0,46
Prot. soja/PEO	10,19 +- 1,18
Prot. soja/PEO/ $\beta$ -CD	8,29 +- 0,03
Amido/PEO/LBC	7,92 +- 0,87
Amido/PEO/ $\beta$ -CD/LBC	7,89 +- 1,23
Prot. soja/PEO/LBC	9,63 +- 0,94
Prot. soja/PEO/ $\beta$ -CD/LBC	9,34 +- 1,05

(a) Filmes de amido: 0,5 g de amido, 0,5 g de PEO, 0,10 g de  $\beta$ -CD, 50 mg de LBC. Filmes de proteína de soja: 0,6 g de PIS, 0,6 g de PEO, 0,12 g de  $\beta$ -CD, 50 mg de LBC.

(b) Determinado pelo método de Karl-fischer.

#### 4.3 - PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS RACÊMICOS USADOS NA RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA

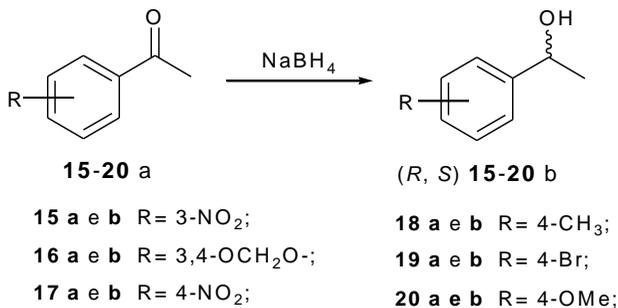
Foram estudadas as reações de transesterificação do acetato de vinila, acetato de etila, acetato de *iso*-propenila, propionato de vinila, laurato de vinila e estearato de vinila com os alcoóis 3-nitro-1-feniletanol e 3,4-metilenodioxo-1-feniletanol. Estudou-se também as reações de transesterificação do acetato de vinila com os alcoóis racêmicos 4-nitro-1-feniletanol, 4-métoxi-1-feniletanol, 4-Br-1-feniletanol e 4-metil-1-feniletanol.

As lipases LBC, LMJ 10, LAK 20, LAN 12, LAY 30, LPS-SD e LTL-IM foram imobilizadas em filmes de amido/PEO e de proteína de soja/PEO, e estes suportes usados como catalisadores nas reações de transesterificação (**Esquema 7**, pág 40). Foram usados filmes contendo as lipases citadas anteriormente na presença e ausência de  $\beta$ -ciclodextrina. Diversos parâmetros experimentais foram avaliados nestas reações, tais como razão molar dos reagentes, temperatura e doador acila entre outros. Os resultados serão apresentados, discutidos e comparados com outros já reportados na literatura.

Primeiramente, foram preparados e caracterizados os alcoóis racêmicos **15b** a **20b**, derivados das acetofenonas comerciais **15a** a **20a**, que foram usados como padrões racêmicos. Para estas reações, não biocatalisadas, foram utilizadas as metodologias descritas no item 3.6.1, pág 36.

Os padrões racêmicos foram usados para determinar os tempos de retenção ( $t_R$ ) e a estereoquímica dos acetatos derivados dos álcoois 1-feniletanol substituídos nas reações catalisadas por lipases. Estas comparações foram realizadas por cromatografia gasosa de fase quiral.

Todos os álcoois **15b** a **20b** foram preparados por métodos não enzimáticos, usando da reação de redução em fase sólida ou em etanol, foram analisados e caracterizados por c.c.d., e por técnicas espectroscópicas de infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de  $H^1$ ). **Esquema 9**.

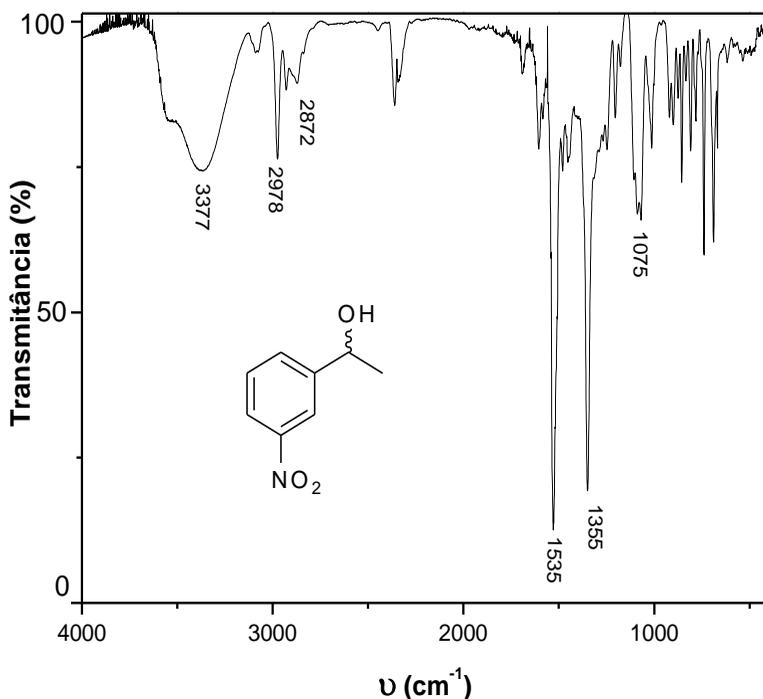


**Esquema 9.** Redução das acetofenonas com NaBH<sub>4</sub>.

A seguir serão apresentados e discutidos as principais bandas na região do IV e picos (RMN de  $H^1$ ) referentes aos espectros obtidos do (R,S) 3-nitro-1-feniletanol. Todos os demais espectros estão nos anexos e os valores de c.c.d estão citados no item 3.6.1, pág 37 e 38.

Pelas análises das cromatografias em camada delgada, os compostos **15b** a **20b** foram classificados como puros. Após, foram realizadas as análises de IV, possibilitando uma primeira identificação dos produtos obtidos. Posteriormente realizaram-se as análises de RMN de  $H^1$ , resultando numa identificação mais detalhada dos álcoois racêmicos. Por fim utilizou-se a cromatografia gasosa de fase quiral para observação das formas racêmicas dos produtos **15b** a **20b**. As **Figuras 14, 15 e 16** mostram os espectros de IV, RMN de  $H^1$  e o cromatograma do álcool (R,S) 3-nitro-1-feniletanol (**15b**), respectivamente.

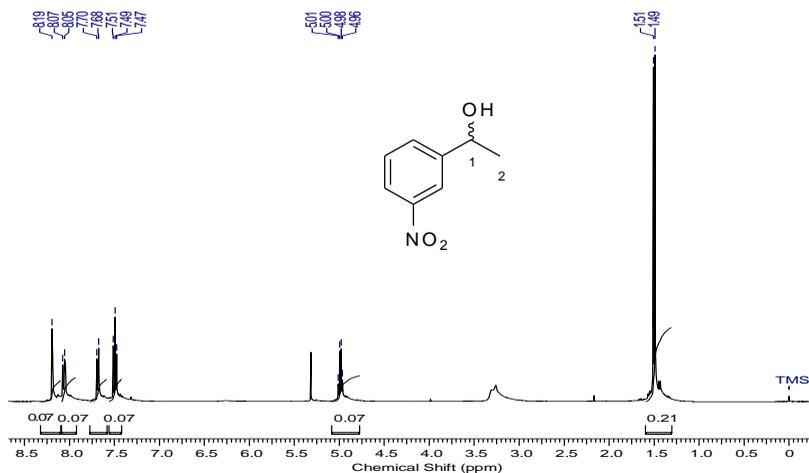
Através da observação e identificação das bandas do espectro de IV do (*R,S*)-3-nitro-1-feniletanol, é possível confirmar a formação do álcool de interesse, tendo conhecimento que o reagente de partida era a 3-nitro-acetofenona. Na **Figura 14**, pode-se observar a presença de uma banda larga em  $3377\text{ cm}^{-1}$ , referente ao grupo O-H de álcoois, e a ausência da banda de carbonila ( $\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ ) presente em todas acetofenonas. A presença desta banda característica confirma a formação deste álcool. No espectro de IV, observam-se também as bandas em  $1535$  e  $1355\text{ cm}^{-1}$ , que são devido as vibrações assimétrica e simétrica do grupo nitro. Resultados similares foram obtidos para os outros álcoois (Anexo I, **Figuras 29, 31, 33, 35, 37 e 39**).



**Figura 14** - Espectro de IV do (*R,S*)-3-nitro-1-feniletanol (**15b**), KBr.

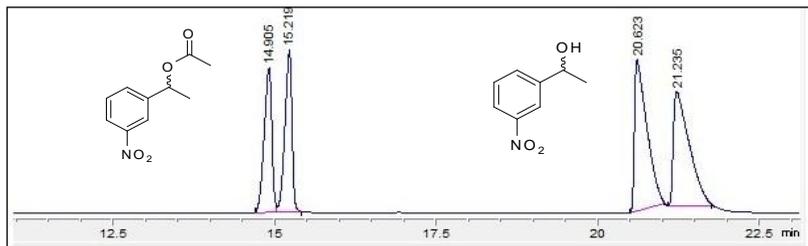
Uma caracterização mais completa do álcool (*R,S*)-3-nitro-1-feniletanol foi obtida com o espectro de RMN de  $\text{H}^1$  (**Figura 15**). Os picos na região entre  $8,19$ - $7,47\text{ ppm}$  (4H) são referentes aos hidrogênios do anel aromático de **15b**. O quarteto entre  $5,01$ - $4,96\text{ ppm}$  (1H), é referente ao H1 presente na molécula do álcool. Se a acetofenona não

houvesse sido convertida ao álcool, este pico estaria ausente. Observa-se também um duplete em 1,51-1,49 ppm (3H), que é referente aos hidrogênios da metila (H-2). Resultados similares foram obtidos para os demais alcoóis estudados. (Anexos I, **Figuras 28, 30, 32, 34, 36 e 38**)



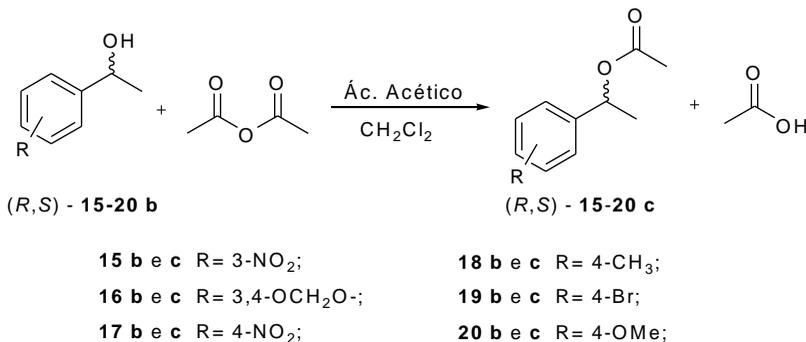
**Figura 15** - Espectro de RMN de  $\text{H}^1$  do (R,S)-3-nitro-1-feniletanol (**15b**) (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

A **Figura 16** mostra um cromatograma do (R,S)-3-nitro-1-feniletanol e do correspondente acetato, obtidos *via* química. O tempo de retenção para os enantiômeros do éster são de 14,9 e 15,2 min, e para o álcool são de 20,6 e 21,2 min.



**Figura 16** - Cromatograma do (R,S)-3-nitro-1-feniletanol (**15b**) e do acetato (**15c**). Condições experimentais: Inj e Det =  $220^\circ\text{C}$ , volume da amostra 0,2  $\mu\text{L}$ , split 1:100, isoterma de  $135^\circ\text{C}$ , pressão do gás carregador 19 psi.

Os outros padrões sintetizados foram os ésteres **15c** a **20c**, que são derivados dos álcoois **15b** a **20b**. Para estas sínteses foi utilizada a metodologia descrita no item 3.6.2 (Pág 38), com o anidrido acético como doador acetila. **Esquema 10**.

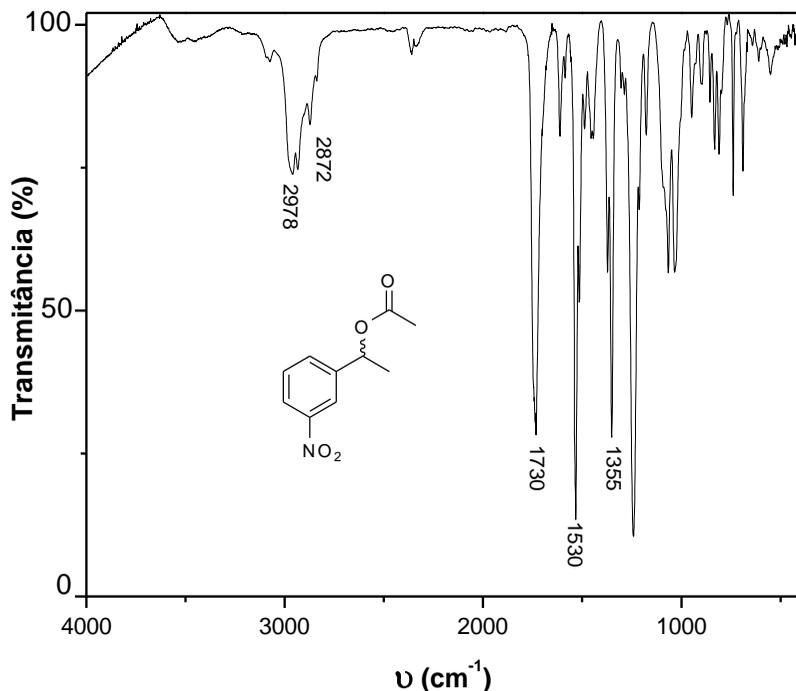


**Esquema 10.** Preparação dos (*R,S*)-acetatos derivados do 1-feniletanol pelo método químico.

Todos os produtos foram caracterizados por c.c.d., espectroscopia de infravermelho (IV) e de ressonância magnética nuclear (RMN de H<sup>1</sup>). Na sequência, será discutida a caracterização do (*R,S*)-acetato de 3-nitro-1-feniletila (**15c**), e os valores de c.c.d. estão apresentados no item 3.6.2.

Através das análises de c.c.d., verificou-se que os compostos **15c** a **20c** estavam puros. A seguir, **15c** foi caracterizado por IV e RMN de H<sup>1</sup>. Estas análises comprovaram a obtenção do produto de acetilação. As **Figuras 17** e **18** mostram os espectros de IV e de RMN de H<sup>1</sup> do (*R,S*)-acetato de 3-nitro-1-feniletila (**15c**), respectivamente.

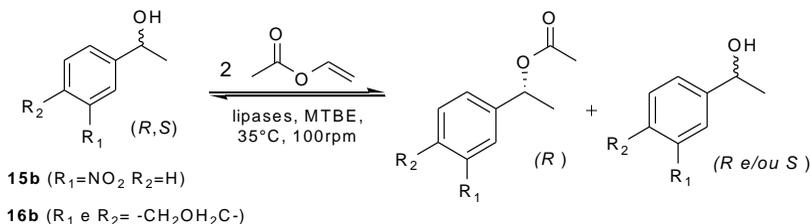
O espectro de IV do (*R,S*) acetato de 3-nitro-1-feniletila (**Figura 17**) mostra as bandas características para este composto. Por exemplo, a banda em 1730 cm<sup>-1</sup> é referente a carbonila do éster. A ausência de uma banda larga na região de 3500 cm<sup>-1</sup> também evidência a formação do acetato, pois mostra que não há mais o grupo O-H na molécula. Outras bandas características do composto são as de estiramentos, assimétrico em 1530 cm<sup>-1</sup> e simétrico em 1355 cm<sup>-1</sup>, devido à presença do grupo nitro. Observam-se também as bandas em 2978 e 2872 cm<sup>-1</sup>, referentes às vibrações de estiramento das ligações C-H. Os espectros dos demais acetatos e suas principais bandas são mostradas no Anexo I (**Figuras 41, 43, 45, 47, 49, e 51**).



**Figura 17-** Espectro de IV do (*R,S*) acetato de 3-nitro-1-feniletila (**15c**), KBr.

No espectro de RMN de  $\text{H}^1$  do (*R,S*) acetato de 3-nitro-1-feniletila todos os picos foram analisados e estão em concordância com a estrutura proposta. Em 8,23-7,50 ppm estão os picos referentes aos hidrogênios do anel aromático (4H). O quarteto centrado em 5,94 ppm foi atribuído ao H-1 da molécula, e observa-se que houve um deslocamento em relação ao mesmo quarteto do álcool em quase 1 ppm (de 4,99 para 5,94 ppm), o que comprova a presença do grupo acetila no composto. Observa-se também um singleto em 2,12 ppm, que é referente aos hidrogênios da metila vizinha a carbonila (H-2) e um dubleto em 1,60-1,56 ppm, que corresponde aos hidrogênios do outro grupo metila (H-3). (**Figura 18**). Resultados similares foram obtidos para os demais alcoóis estudados. (Anexos I, **Figuras 40, 42, 44, 46, 48 e 50**)



$\beta$ -CD. Esquema 11.**Esquema 11.** Obtenção dos *R*-acetatos derivados do 1-feniletanol.

Na ausência do biocatalisador, não foi detectada a formação de produtos ao usar os filmes de amido/PEO. Ao usar os filmes de proteína de soja/PEO, os acetatos foram obtidos com conversões de 3%, em 48h (detectado por CGQ).

As conversões mínimas obtidas ao usar os filmes de proteína de soja, podem ser devido a alguma estearase ou mesmo lipase presente neste preparado isolado. É comum algumas sementes possuem estas proteínas, que na germinação participam das etapas para a síntese de compostos de interesse.<sup>100</sup>

A seguir, para avaliar se a imobilização da LBC tem influência na conversão aos produtos, a reação de transesterificação do acetato de vinila com (*R,S*)-**15b** ou (*R,S*)-**16b**, foi realizada na presença da lipase não imobilizada. As reações foram feitas em MTBE, a 35° C por 48h em banho Dubnoff. As conversões em éster foram de 4% para a reação com o substituinte 3-nitro (*R*-**15c**) e de 18% para o substituinte 3,4-metilenodioxo (*R*-**16c**).

Através destes resultados observa-se que a imobilização, além de possibilitar a reutilização e facilitar a separação dos biocatalisadores do meio reacional, também pode aumentar a estabilidade da lipase no solvente orgânico utilizado. No mesmo tempo reacional, e ao usar a LBC imobilizada, as conversões em acetatos aumentaram de 4% para no mínimo 31% para o substrato (*R,S*)-**15b**, e de 18% para no mínimo 44% na reação com (*R,S*)-**16b** (estes dados serão apresentados e discutidos com detalhes nos próximos itens).

Ao usar a LBC não imobilizada, os *R*-ésteres foram obtidos com excesso enantiomérico do produto >99% e razão enantiomérica >200, salientando que a enantiosseletividade não foi alterada.

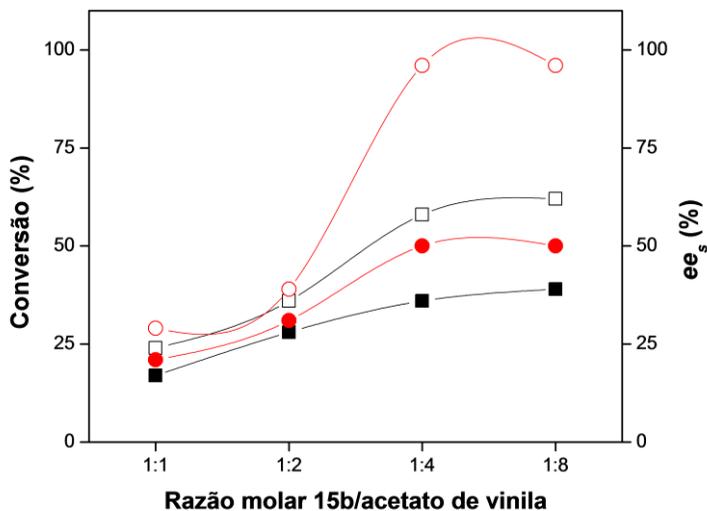
#### 4.4.1 - Efeito da razão molar.

Um dos fatores de grande importância para a formação do intermediário “acil-enzima” está na afinidade que o doador do grupo acila possui com a lipase. Devido as suas características, e principalmente a alta reatividade e irreversibilidade, os ésteres enólicos ativados como, por exemplo os acetatos de vinila e de *iso*-propenila, são muito utilizados em reações de transesterificação biocatalisadas.<sup>101</sup>

A razão molar entre o álcool e o doador acila é também um dos parâmetros mais importantes investigados nas reações de transesterificação enzimática, pois como a reação é reversível, espera-se que o aumento na concentração de doador acila desloque o equilíbrio para a formação dos produtos.

Para investigar este efeito na resolução do (*R,S*)-3-nitro-1-feniletanol (**15b**) ou do (*R,S*)-3,4-metilenodioxo-1-feniletanol (**16b**), foram utilizadas as diferentes razões molares de 1:1; 1:2; 1:4; e 1:8 entre estes substratos e o acetato de vinila, respectivamente. Como catalisador da reação foi utilizada a LBC imobilizada em filmes de amido/PEO ou proteína de soja/PEO.

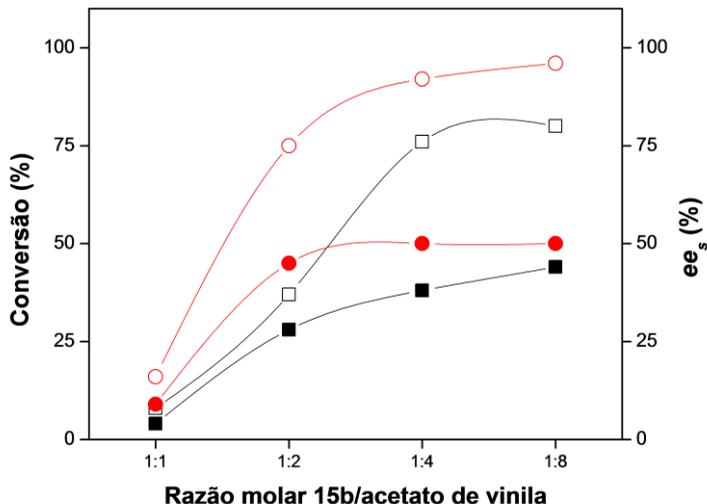
A **Figura 19** mostra os resultados de conversão (%) e  $ee_s$  (%) obtidos na resolução do (*R,S*)-**15b** com diferentes razões molares, e catalisada pela LBC imobilizada.



**Figura 19** - Efeito da razão molar de **15b**:acetato de vinila na obtenção do éster (*R*)-**15c**, catalisada pelo sistema LBC/amido/PEO (1/1 m/m). [(*R,S*)-**15b** (5mmol); acetato de vinila (5-40 mmol), LBC (50 mg), MTBE (15 mL), 35° C, 100 rpm] ■ - 24h; ● - 48h; □ -  $ee_s$  (24h) e ○ -  $ee_s$  (48h).

A conversão em *R*-**15c** aumentou gradativamente conforme as razões molares aumentaram, porém o  $ee_p$  e a razão enantiomérica (*E*) foram constantes, >99% e >200, respectivamente (resultados não mostrados na **Figura 19**). Na proporção 1:1 dos reagentes, a conversão em produto foi de 21% em 48h, e para as outras razões molares, foi de 31% (1:2) e 50% (1:4 e 1:8) no mesmo tempo reacional. Ao usar as razões molares 1:4 e 1:8, observou-se que um acréscimo de acetato de vinila (de 20 para 40 mmol) não alterou significativamente as conversões, sendo iguais em 48h (50%) e semelhantes em 24h (36% e 39%, respectivamente). Os excessos enantioméricos do substrato ( $ee_s$ ) variaram de 24-96%. No Anexo I, está apresentado um gráfico similar a **Figura 19**, porém com os valores de conversão (%) e  $ee_p$  (**Figura 52**, p.112).

A seguir, foi usada a LBC imobilizada em filmes de proteína de soja/PEO (1/1 m/m) na resolução do (*R,S*)-**15b** com as diferentes razões molares. Os resultados de conversão (%) e  $ee_s$  (%) estão apresentados na **Figura 20**.



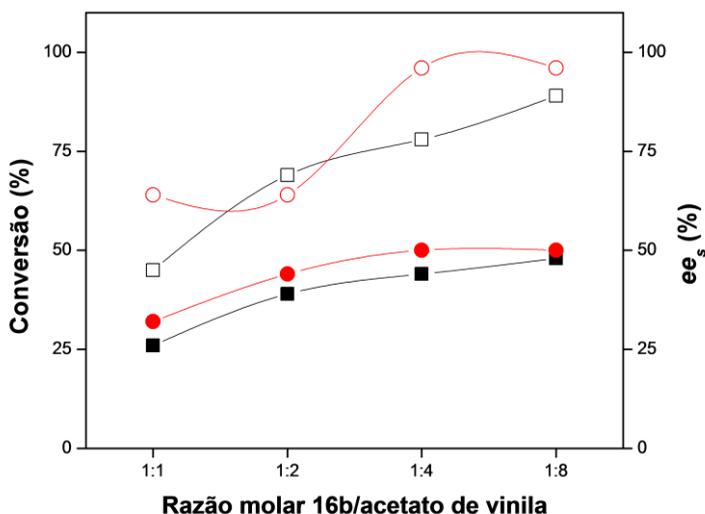
**Figura 20** - Efeito da razão molar de **15b**:acetato de vinila na obtenção do éster (*R*)-**15c**, catalisada pelo sistema LBC/prot. soja/PEO (1/1 m/m). [(*R,S*)-**15b** (5mmol); acetato de vinila (5-40 mmol), LBC (50 mg), MTBE (15 mL), 35° C, 100 rpm] ■ - 24h; ● - 48h; □ - ee<sub>s</sub>(24h) e ○ - ee<sub>s</sub>(48h).

Em todas as reações estudadas, o correspondente acetato foi obtido com  $ee_p > 99\%$ , resultando em  $E > 200$ , e os valores de  $ee_s$  variaram de 8-96%. Os resultados apresentados na **Figura 20** mostram que houve uma variação na obtenção de *R*-**15c** em função da razão molar. Ao usar a menor proporção (1:1), a conversão foi de 9% e para as razões molares maiores, os valores de conversão foram de 45% (1:2) e 50% (1:4 e 1:8) em 48h de reação. Neste estudo, as conversões aumentaram com a razão molar, e foram crescentes em 24h de reação (28%, 38% e 44%). Porém, obteve-se um patamar após 48h, e as conversões foram similares (45-50%).

Uma comparação entre os resultados obtidos nas **Figuras 19** e **20**, permite estabelecer algumas diferenças entre a imobilização da LBC nas duas blendas poliméricas utilizadas. De forma geral, as conversões em *R*-**15c** foram semelhantes. Uma diferença maior entre estes suportes foi notável apenas ao se utilizar a razão molar 1:1, na qual ao usar a blenda de proteína de soja/PEO, obteve-se uma conversão menor (9%) ao éster *R*-**15c**. Nas demais proporções, o sistema LBC imobilizada no

filme de proteína de soja converteu o substrato a valores maiores ou iguais aos obtidos com o suporte amido/PEO.

A seguir, foi estudada a variação da razão molar do 3,4-metilenodioxo-1-feniletanol [(*R,S*)-**16b**] com o acetato de vinila nas mesmas proporções que para o composto (*R,S*)-**15b**. Os resultados utilizando a LBC imobilizada nos filmes de amido/PEO estão apresentados na **Figura 21**.

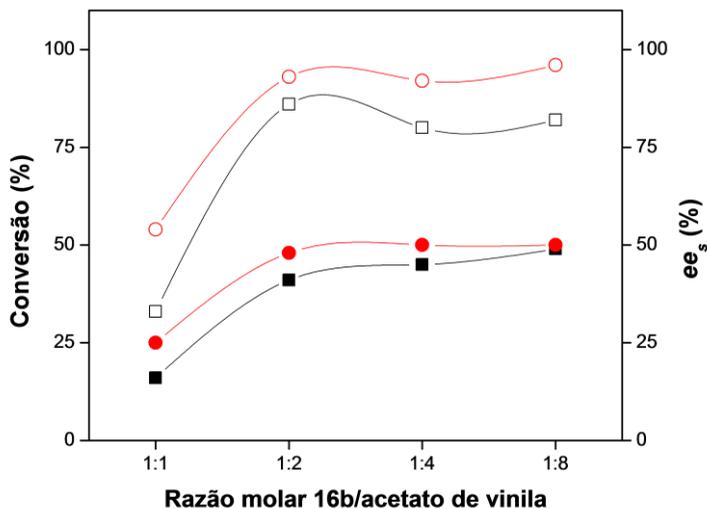


**Figura 21** - Efeito da razão molar de **16b**:acetato de vinila na obtenção do éster (*R*)-**16c**, catalisada pelo sistema LBC/amido/PEO (1/1 m/m). [(*R,S*)-**16b** (5mmol); acetato de vinila (5-40 mmol), LBC (50 mg), MTBE (15 mL), 35° C, 100 rpm] ■ - 24h; ● - 48h; □ - ee<sub>s</sub> (24h) e ○ - ee<sub>s</sub> (48h).

Nos resultados mostrados na **Figura 21**, todas as reações apresentaram uma variação no ee<sub>s</sub> de 45-99%. Após 24h, as conversões ao éster *R*-**16c** aumentaram de 26-48%, com o aumento da razão molar de 1:1 a 1:8. Em 48h, os valores de conversão foram também dependentes das razões molares, sendo de 32% (1:1), 44% (1:2) e 50% (1:4 e 1:8). Novamente é possível observar que não houve uma variação significativa nos valores de conversão a partir da razão molar 1:2. Salienta-se que o ee<sub>p</sub> foi >99%, resultando em valores de E >200, indicando a excelente enantiosseletividade do processo de resolução.

Os últimos testes da razão molar foram realizados usando a LBC imobilizada no filme de proteína de soja/PEO (1/1 m/m) para a resolução do (*R,S*)-**16b** com o acetato de vinila. Os valores de conversão (%) e  $ee_s$  (%) estão apresentados na **Figura 22**.

Todas as reações biocatalisadas apresentaram  $ee_p > 99\%$  e  $E > 200$ . Os valores de  $ee_s$  variaram de 33-96%. Como mostra a **Figura 22**, na razão molar 1:1, a obtenção de *R*-**16c** mostrou bons resultados, sendo de 16% e 25% em 24h e 48h, respectivamente. Nas demais proporções, após 48h, as conversões do substrato tornaram-se semelhantes, sendo de 48% na razão 1:2 e de 50% com as razões 1:4 e 1:8. Nota-se que um aumento de 4 vezes na quantidade de acetato de vinila (1:2 – 1:8), não alterou significativamente a conversão ao produto (48% e 50%).



**Figura 22** - Efeito da razão molar de **16b**:acetato de vinila na obtenção do éster (*R*)-**16c**, catalisada pelo sistema LBC/prot. soja/PEO (1/1 m/m). [(*R,S*)-**16b** (5mmol); acetato de vinila (5-40 mmol), LBC (50 mg), MTBE (15 mL), 35° C, 100 rpm] ■ - 24h; ● - 48h; □ -  $ee_s$  (24h) e ○ -  $ee_s$  (48h).

Cientistas da Universidade de Maribor, na Eslovênia, estudaram a resolução do 1-feniletanol em líquidos iônicos utilizando a lipase B de *Candida antarctica*, conhecida comercialmente como Novozym 435. Foram testados os líquidos iônicos tetrafluorborato de 1-butil-3-metil

imidazólio [BMIm][BF<sub>4</sub>], triflimida de 1-etil-3-metil imidazólio [BMIm][NTf<sub>2</sub>] e o hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil imidazólio [BMIm][PF<sub>6</sub>], este último reportado como melhor meio para a reação. Usando [BMIm][PF<sub>6</sub>], Knez e *col.* avaliaram o efeito da razão molar entre doador acila e o substrato. Foi utilizado como doador acila o acetato de vinila e a razão molar mais adequada foi de 2:1 de doador acila/álcool. Nesta proporção todo o substrato foi convertido ( $c = 50\%$ ) ao produto enantiopuro *R*-acetato de 1-feniletila com  $ee_s > 99\%$  em apenas 3h de reação.<sup>102</sup> Resultados similares foram obtidos neste trabalho com relação a razão molar do substrato: agente acilante.

É importante ressaltar que nas reações realizadas com o acetato de etila, nas mesmas condições estudadas para o acetato de vinila e com a razão molar do álcool/acetato de etila 1:4, não houve formação do éster tanto para o álcool **15b** como para o **16b**. Este resultado destaca a importância da interação entre o doador acila e a enzima, evidenciando que o emprego do acetato de vinila mostrou excelente afinidade com a LBC. Neste caso também há uma diferença no subproduto formado nos dois casos. Quando o acetato de vinila é usado, o subproduto é o acetaldeído, que não participa na reação inversa. Ao usar o acetato de etila, o subproduto é o etanol, um nucleófilo que pode reagir no sentido inverso da reação de interesse.

Nos estudos subsequentes optou-se por utilizar a razão molar álcool/acetato de vinila 1:2, pois as conversões em ésteres ao usar esta proporção foram consideradas boas (28-48%) e apresentaram pouca diferença com o uso de razões molares maiores (1:4 e 1:8). Utilizando-se da LBC, que foi enantiosseletiva e a razão molar entre os reagentes de 1:2, as conversões não alcançaram o máximo (50%), mesmo após 48h. Entretanto, este fato pode ser positivo, pois nos estudos posteriores será possível uma melhor comparação dos outros parâmetros avaliados, nos diferentes tempos selecionados (24 e 48h).

#### **4.4.2 - Influência da imobilização da LBC em diferentes filmes e blendas poliméricas.**

A mistura de dois ou mais polímeros são chamadas de blendas poliméricas. Estas podem apresentar propriedades intermediárias ou superiores as dos componentes puros que as constituem. Essas modificações podem fazer com que este novo material adquira propriedades específicas de interesse, com um custo menor que a síntese de um polímero inovador.<sup>103</sup>

Portanto, avaliou-se o efeito da utilização diversos materiais e

misturas destes, em diferentes proporções, especialmente para os filmes que usam PEO como um dos componentes. Estas blendas foram usadas como suportes para a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* (LBC), e posterior aplicação na resolução de dois derivados do (*R,S*)-1-feniletanol, (*R,S*)-**15b** e (*R,S*)-**16b**.

Os resultados de conversão (%) e  $ee_s$  (%) obtidos para as reações de transesterificação de (*R,S*)-**15b** com acetato de vinila, utilizando a LBC imobilizada em diferentes suportes são apresentados na **Tabela 3**.

Analisando-se os dados da **Tabela 3**, nota-se a influência da utilização dos vários polímeros e blendas, para imobilização da LBC, na obtenção do produto *R*-**15c** (2% a 50%). Esta variação na conversão não alterou a enantiosseletividade da enzima, e todas as reações apresentaram  $ee_p > 99\%$  e razão enantiomérica  $> 200$ . As maiores conversões ao produto (50%), em 48h de reação, foram obtidas usando a LBC imobilizada no filme de PEO (Entrada 6) ou na blenda de proteína de soja e PEO (1/1 m/m) com 10% de  $\beta$ -ciclodextrina (Entrada 10).

Ao usar os filmes preparados com o amido da batata aipo (Entradas 1 e 2), sem a adição de um outro polímero, estes foram menos eficientes como suportes e o produto foi obtido com conversões de 4-10%. Para a imobilização da LBC, usando o filme formado somente com amido (Entrada 2) obteve-se 7% de *R*-**15c**, enquanto que com adição de 5% m/m de  $\beta$ -CD (Entrada 1), a conversão aumentou para 10%, em 48h de reação.

Estes resultados mostraram a necessidade de se testar novos polímeros ou de usar misturas, a fim de preparar filmes e/ou blendas que possam ser utilizadas como suporte para a LBC ou outras lipases, promovendo maiores conversões aos produtos.

Neste sentido as blendas de amido/PEO foram avaliadas em diferentes proporções destes polímeros. A variação de PEO nos filmes foi de 0, 30, 50, 70 e 100% em função da massa de amido, e os resultados obtidos mostram uma relação direta entre o aumento da conversão e o acréscimo de PEO nas blendas. A utilização da LBC suportada nos filmes contendo 0 ou 30% de PEO, resultou em conversões semelhantes ao produto *R*-**15c**, sendo de 7% e 8% em 48h, respectivamente. Quando foram usadas as blendas contendo mais PEO para a imobilização da LBC, a formação do produto aumentou significativamente, sendo de 31% (1/1 m/m, Entrada 4), 48% (3/7 m/m, Entrada 5) e 50% (0/1 m/m, Entrada 6) (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Influência da imobilização da LBC em diferentes filmes e blendas na obtenção de *R-15c*.

Entrada	Suportes	Tempo			
		24h		48h	
		c (%)	ee <sub>s</sub> (%)	c (%)	ee <sub>s</sub> (%)
1	Amido/ β-CD 5%	6	11	10	14
2	Amido/ PEO (1/0 m/m)	4	4	7	7
3	Amido/ PEO (7/3 m/m)	5	6	8	9
4	Amido/ PEO (1/1 m/m)	28	36	31	39
5	Amido/ PEO (3/7 m/m)	35	56	48	91
6	Amido/ PEO (0/1 m/m)	39	69	50	99
7	Amido/ PEO (1/1 m/m)/ β-CD 10%	32	46	44	69
8	Amido/ PEO (1/1 m/m)/ β-CD 20%	31	44	43	70
9	Prot. Soja/PEO (1/1 m/m)	28	37	45	75
10	Prot. Soja/PEO (1/1 m/m)/ β-CD 10%	46	59	50	90
11	Prot. Soja/PEO (64/36 m/m)	21	28	21	28
12	CMC	3	5	4	16
13	CMC/ β-CD 5%	3	9	5	12
14	CMC/ β-CD 10%	4	6	4	12
15	CMC/ β-CD 15%	3	10	5	12
16	CMC/ sorbitol 30%	11	21	14	21
17	CMC/ sorbitol/ β-CD 10%	9	14	12	19
18	CMC/ glicerol 30%	2	8	3	13
19	CMC/ glicerol/ β-CD 10%	2	6	3	7

(*R,S*)-**15b** (5mmol); acetato de vinila (10 mmol), LBC (50 mg), MTBE (15 mL), 35° C, 100 rpm.

Com as blendas preparadas com amido/PEO (1/1 m/m), testou-se a adição de 10% ou 20% de β-CD m/m. Ao usar os suportes contendo β-CD, houve um aumento na conversão do substrato (*R,S*)-**15b** em 48h, ao *R*-éster. Porém, com maior quantidade de β-CD, não houve aumento na conversão ao produto. Utilizando a LBC imobilizada na blenda com

10% de  $\beta$ -CD, a conversão ao acetato foi de 44%, e com a blenda com 20% de  $\beta$ -CD, a conversão foi um pouco menor, 43%, ambas após 48h de reação (Entradas 7 e 8, respectivamente).

A proteína de soja foi outro polímero usado como base para preparar as blendas, e imobilizar a LBC. Ao usar uma maior concentração de PEO nos filmes com proteína de soja (36%- 50%, m/m), resultou em uma maior conversão ao produto *R-15c*, sendo de 21% (Entrada 11) para 45% (Entrada 9) após 48h. A **Tabela 3** mostra que o uso de 10%  $\beta$ -CD m/m na blenda de proteína de soja/PEO (1/1 m/m), aumentou a conversão ao produto para 50% em 48h (Entrada 10), fato ocorrido também com os filmes de amido. Resultados similares foram observados com a LBC imobilizada nos filmes de amido/PEO.

Utilizando as blendas de carbóximetil celulose (CMC) para a imobilização da LBC, o substrato (*R,S*)-**15b** foi convertido ao acetato na faixa de 3-14%. Adições de  $\beta$ -ciclodextrina de 5%, 10% e 15% m/m em relação a CMC (Entradas 13, 14 e 15), não alteraram as conversões após 48h (4-5%). O melhor resultado de conversão ao produto (14%) usando os sistemas LBC/CMC, continha 30% de sorbitol (Entrada 16). Pelos baixos valores de conversão obtidos quando se utilizou a LBC imobilizada nas blendas de CMC, estes sistemas foram usados apenas nas reações com (*R,S*)-**15b**.

A seguir, o substrato (*R,S*)-**16b** foi usado em reações de transesterificação com acetato de vinila usando como sistema catalítico a LBC imobilizada em vários filmes e blendas. Os valores de conversão (%) e  $ee_s$  (%) obtidos neste estudo estão apresentados na **Tabela 4**.

Assim como para o substrato (*R,S*)-**15b**, as reações com o 3,4-metilenodioxo-1-feniletanol [(*R,S*)-**16b**] foram enantiosseletivas ( $ee_p > 99\%$  e  $E > 200$ ). Uma comparação inicial entre os dados das **Tabelas 3 e 4**, mostra que os valores de conversão em acetato são, de modo geral, maiores nas reações com o (*R,S*)-**16b**. A utilização de 5 blendas diferentes, como suportes para LBC, resultou na total conversão (50%) ao produto *R-16c* (**Tabela 4**, Entradas 5, 6, 7, 8, e 10). As conversões ao produto *R-15c*, foram de 50% com o uso de 2 blendas, após 48h (**Tabela 3**, Entradas 6 e 10).

**Tabela 4.** Influência da imobilização da LBC em diferentes filmes e blendas na obtenção de *R-16c*.

Entrada	Suportes	Tempo			
		24h		48h	
		c (%)	<i>ee<sub>s</sub></i> (%)	c (%)	<i>ee<sub>s</sub></i> (%)
1	Amido/ $\beta$ -CD 5%	28	35	32	33
2	Amido/ PEO (1/0 m/m)	11	13	19	23
3	Amido/ PEO (7/3 m/m)	28	37	40	66
4	Amido/ PEO (1/1 m/m)	39	69	44	64
5	Amido/ PEO (3/7 m/m)	40	72	50	99
6	Amido/ PEO (0/1 m/m)	42	81	50	99
7	Amido/ PEO (1/1 m/m)/ $\beta$ -CD 10%	45	93	50	99
8	Amido/ PEO (1/1 m/m)/ $\beta$ -CD 20%	43	91	50	99
9	Prot. Soja/ PEO (1/1 m/m)	41	86	48	93
10	Prot. Soja/ PEO (1/1 m/m)/ $\beta$ -CD 10%	37	83	50	96
11	Prot. Soja/ PEO (64/36 m/m)	34	50	43	76

(*R,S*)-**16b** (5mmol); acetato de vinila (10 mmol), LBC (50 mg), MTBE (15 mL), 35° C, 100 rpm.

Quando a LBC foi imobilizada no filme preparado somente com amido de batata aipo, e este sistema usado para a resolução de (*R,S*)-**16b**, obteve-se somente 19% do produto em 48h (**Tabela 4**, Entrada 2). A adição no filme de amido de 5% de  $\beta$ -CD m/m, aumentou a conversão em éster para 32% após 48h (**Tabela 4**, Entrada 1). Ao usar as blendas de amido com as proporções de 0, 30%, 50% e 70% de PEO, as conversões do substrato (*R,S*)-**16b** aumentaram com o aumento de PEO, sendo de 19%, 40%, 44% e 50% em 48h, respectivamente (**Tabela 4**, Entradas 2 a 5). Comparando-se os suportes amido/PEO 3/7 m/m e PEO puro, nas reações em 24h, o sistema LBC/PEO foi mais adequado, convertendo 42% do substrato, e usando a blenda amido/PEO 7/3 m/m, a conversão foi de 40% (**Tabela 4**, Entradas 5 e 6). Nas reações utilizando os filmes de amido/PEO, os *ee<sub>s</sub>* variaram de 13-99%. As influências relatadas para os filmes de amido/PEO na conversão do

substrato (*R,S*)-**16b**, foram semelhantes as apresentadas para a conversão de (*R,S*)-**15b**, aos respectivos acetatos. Após 48h de reação, *R-16c* foi obtido com 50% de conversão.

Utilizando-se da LBC imobilizada nas blendas de amido/PEO (1/1 m/m) com 10% e 20% de  $\beta$ -CD m/m, as conversões ao produto *R-16c* aumentaram em relação ao mesmo filme sem  $\beta$ -CD, sendo de 44% para 50% em 48h de reação. Porém a adição de uma quantidade maior de  $\beta$ -CD não resultou em conversão maior em acetato. Nas reações realizadas em 24h, a utilização do sistema com 10% de  $\beta$ -CD, formou o produto em 45% (**Tabela 4**, Entrada 7), enquanto que com o sistema com 20% de  $\beta$ -CD obteve-se 43% (**Tabela 4**, Entrada 8). Resultados semelhantes foram também observados com o substrato (*R,S*)-**15b**.

A utilização da LBC imobilizada nas blendas de proteína de soja/PEO mostrou-se eficiente nas reações de resolução do substrato (*R,S*)-**16b** (**Tabela 4**, Entradas 9-11). O aumento de PEO nestes filmes, também resultou em maior conversão ao éster *R-16c*. Usando LBC suportada na blenda de proteína de soja com 36% de PEO, foi formado 43% do produto, e utilizando a blenda com 50% de PEO a conversão foi de 48%, após 48h. O uso de 10% de  $\beta$ -CD no filme proteína de soja/PEO (1/1 m/m), também aumentou a formação do acetato em relação ao uso da blenda sem este aditivo, sendo de 48% para 50%, após 48h de reação.

Pesquisadores da Universidade de Dalian, na China, recentemente imobilizaram a lipase de *Burkholderia cepacia* (LBC) em partículas de zirconia, mineralizadas por indução com protamina. Estes sistemas foram utilizados como catalisadores nas reações de resolução do álcool 1-feniletanol com acetato de vinila. Vários parâmetros foram analisados tais como solvente, temperatura, massa de lipase imobilizada e tempo de reação. Os melhores resultados foram obtidos na temperatura de 45° C, em octano. Com relação à massa de lipase, a partir de 70 mg as conversões não aumentaram significativamente. Usando as seguintes condições, octano como solvente, 50° C, 70 mg de lipase imobilizada, 180 rpm e razão molar 1:2 álcool/acetato de vinila, o (*R*)-acetato de 1-feniletanol foi obtido com 49,9% de conv. e  $ee_p > 99\%$ , após 48h.<sup>104</sup>

Analisando-se os resultados de conversão e  $ee_p$ , apresentados nas **Tabelas 3** e **4**, observa-se que, em geral, houve um aumento da conversão em éster à medida que se elevava a quantidade de PEO nas blendas. Este aumento na conversão pode ser atribuído a maior porosidade das blendas, efeito proporcionado pela adição de PEO nas mesmas.<sup>99</sup> Portanto, considerando estes resultados, optou-se por usar

quantidades iguais dos polímeros para avaliar quais outros parâmetros experimentais influenciam nestas reações.

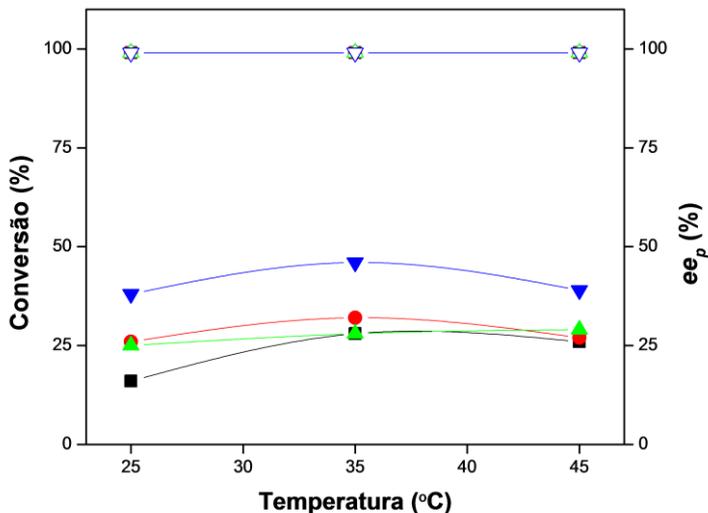
Nos estudos subsequentes foram usadas 4 blendas para a imobilização da LBC e de outras lipases, sendo estas de amido/PEO (1/1 m/m) e de proteína de soja/PEO (1/1 m/m), e ambas com  $\beta$ -CD 10% m/m.

#### 4.4.3 - Efeito da temperatura.

A temperatura, em geral, tem grande influência nas reações de resolução catalisadas por enzimas, e este parâmetro pode influenciar a atividade, seletividade e estabilidade do biocatalisador, bem como o equilíbrio da reação. Para avaliar esta influência nas reações de transesterificação do acetato de vinila com o *(R,S)*-**15b** e *(R,S)*-**16b** foram utilizadas as temperaturas de 25°, 35° e 45° C. Como citado, a LBC foi imobilizada em blendas de amido/PEO e proteína de soja/PEO, com ou sem  $\beta$ -CD.

Os valores de conversão (%) e  $ee_p$  (%) para as reações com o *(R,S)*-**15b** são mostrados nas **Figuras 23** e **24**, e para *(R,S)*-**16b** nas **Figuras 25** e **26**. As **Figuras 23** e **25** são referentes aos valores obtidos em 24h, e as **Figuras 24** e **26** em 48h de reação. Com pode ser observado e independente da temperatura, todas as reações e apresentaram  $ee_p > 99\%$  e  $E > 200$ .

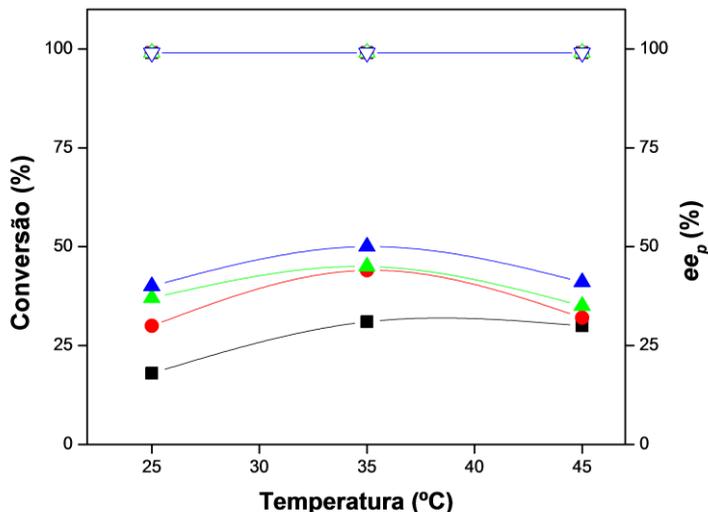
Os resultados de conversão (%) e  $ee_p$  (%), em função da temperatura, usando o substrato 3-nitro-1-feniletanol [*(R,S)*-**15b**] e a LBC imobilizada em diferentes suportes, estão apresentados na **Figura 23**.



**Figura 23** - Efeito da temperatura na obtenção do éster *(R)*-**15c**. [(*R,S*)-**15b** (5mmol); acetato de vinila (10 mmol), LBC (50 mg), MTBE (15 mL), 100 rpm, 24h] ■ - amido/PEO, ● - proteína de soja/PEO, ▲ - amido/PEO/β-CD e ▼ - proteína de soja/PEO/β-CD; □; ○; △ e ▽  $ee_p$ .

Na **Figura 23** é possível observar que a maior conversão ao éster (46%) foi obtida utilizando a LBC imobilizada na blenda de proteína de soja/PEO com 10% de β-CD, a 35° C. Para cada filme estudado, os melhores resultados foram obtidos para as reações realizadas a 35° C, variando entre 28-46% a conversão ao produto *R*-**15c**. Quando a temperatura de 25° C foi utilizada, as conversões ao éster foram as menores, independente do sistema de imobilização para a LBC, sendo de 16-38%. As reações a 45° C não apresentaram vantagens consideráveis, pois os valores de conversão foram similares aos obtidos nas reações a 35° C, sendo de 26-39%.

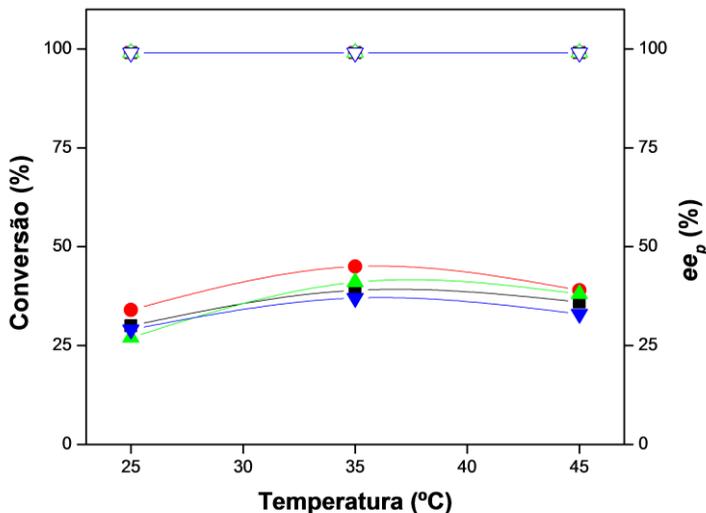
A **Figura 24** apresenta os valores de conversão (%) e  $ee_p$  (%), em 48h, para a obtenção de *R*-**15c**.



**Figura 24** - Efeito da temperatura na obtenção do éster *(R)*-**15c**. [*(R,S)*-**15b** (5mmol); acetato de vinila (10 mmol), LBC (50 mg), MTBE (15 mL), 100 rpm, 48h]. ■ - amido/PEO, ● - proteína de soja/PEO, ▲ - amido/PEO/β-CD e ▼ - proteína de soja/PEO/β-CD; □; ○; △ e ▽  $ee_p$ .

Os resultados de conversão em 48h apresentaram perfil semelhante aos obtidos em 24h. A maior conversão em *R*-**15c** (50%), foi novamente obtida utilizando o sistema LBC/proteína de soja/PEO com 10% de β-CD a 35° C. Para as reações realizadas a 25° C, foram obtidas as menores conversões ao produto, independente do sistema usado na imobilização da LBC, sendo de 18-40%. Valores intermediários de conversão em acetato foram obtidos a 45° C, variando de 30-41%. Os maiores valores foram obtidos a 35°C, sendo de 31-50%.

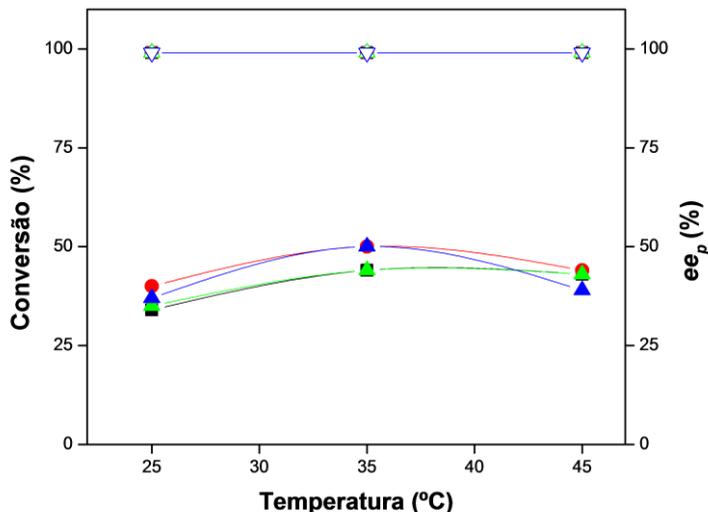
Para o substrato 3,4-metilenodioxil-1-feniletanol [*(R,S)*-**16b**], os valores de conversão (%) e  $ee_p$  (%) em função da temperatura e em 24h, estão apresentados na **Figura 25**.



**Figura 25** - Efeito da temperatura na obtenção do éster (*R*)-**16c**. [(*R,S*)-**16b** (5mmol); acetato de vinila (10 mmol), LBC (50 mg), MTBE (15 mL), 100 rpm, 24h] ■ - amido/PEO, ● - proteína de soja/PEO, ▲ - amido/PEO/β-CD e ▼ - proteína de soja/PEO/β-CD; □; ○; △ e ▽  $ee_p$ .

As reações realizadas a 35° C com o substrato (*R,S*)-**16b**, alcançaram as maiores conversões, sendo de 37-45%. A maior conversão ao éster *R*-**16c**, em 24h (45%), foi obtida utilizando a LBC imobilizada na blenda de amido/PEO com 10% de β-CD. As menores conversões foram obtidas a 25° C, independente do suporte usado para a imobilização da LBC, e variaram de 27-34%. A 45° C, as conversões em éster diminuíram um pouco em relação a 35° C, e foram de 33-39%.

A **Figura 26** apresenta os valores de conversão (%) em *R*-**16c** e  $ee_p$  (%) após 48h de reação.



**Figura 26** - Efeito da temperatura na obtenção do éster (*R*)-**16c**. [(*R,S*)-**16b** (5mmol); acetato de vinila (10 mmol), LBC (50 mg), MTBE (15 mL), 100 rpm, 48h] ■ - amido/PEO, ● - proteína de soja/PEO, ▲ - amido/PEO/β-CD e ▼ - proteína de soja/PEO/β-CD; □; ○; △ e ▽  $ee_p$ .

A tendência observada nas reações em 24h foi mantida após 48h. As conversões em éster para as reações a 25° C, foram as menores, variando entre 34-40%, independente do suporte. Os valores de conversão ao produto *R-16c* nas reações a 45° C foram de 39-44%. As reações realizadas a 35° C apresentaram as maiores conversões ao produto *R-16c*, sendo de 44-50%. Ao usar a LBC suportada nas blendas de amido/PEO e proteína de soja/PEO ambas com 10% de β-CD, obteve-se o enantiomero *R* do produto com 50%, sendo este um bom resultado.

De modo geral, usando a LBC imobilizada no filme de amido/PEO sem β-CD foram obtidas as menores conversões aos produtos *R-15c* e *R-16c* a 25° C, bem como a 35° C e 45° C. Com as demais blendas estudadas os valores de conversão foram semelhantes, nas três temperaturas. Os dados mostraram que os suportes foram eficientes para a imobilização da LBC.

Pan e *col.* imobilizaram, por absorção, a lipase LIP2 de *Yarrowia*

*lipolytica* em nanotubos de carbono multi - paredes, funcionalizados com amino- $\beta$ -ciclodextrina. Este sistema foi utilizado como catalisador nas reações de transesterificação do acetato de vinila com o 1-feniletanol, usando como solvente *n*-heptano e [BMIm][PF<sub>6</sub>] puro ou em mistura. Utilizando o *n*-heptano como solvente, foram avaliadas as temperaturas de 35-60° C. Com a lipase livre, as conversões foram menores em comparação com a mesma imobilizada. Sem a imobilização, as conversões ao acetato de 1-feniletila, após 5h, variaram de 24% (35° C) a 35% (55° C), e com a LIP2 imobilizada, as conversões foram de 46% (35° C) e 50% (50° C), todas com  $ee_p > 99\%$ . Estes resultados destacam que cada lipase tem uma temperatura ótima de atuação, e que o suporte também deve ser considerado.<sup>105</sup>

Os resultados obtidos neste estudo, mostraram que a temperatura de 35° C foi a mais adequada, independente do tempo de reação.

Estes dados demonstram que as reações biocatalisadas, em geral dependem da temperatura. A diminuição na conversão, a 45° C, pode estar relacionada a desnaturação ou inibição da lipase (LBC), resultante da redução nas forças iônicas e/ou ligações de hidrogênio, que estabilizam a estrutura tridimensional das enzimas e que é necessária para a manutenção da atividade catalítica das mesmas.<sup>8</sup> Em temperaturas maiores há uma maior possibilidade de evaporação do acetato de vinila que possui ponto de ebulição relativamente baixo (72° C).

Portanto, a partir destes resultados a temperatura de 35° C foi selecionada para dar continuidade aos estudos. Dentre estes, serão avaliados diferentes doadores acila, solventes orgânicos e lipases de diversas procedências.

#### 4.4.4 - Influência do uso de diferentes doadores acila.

No item 4.4.1. foi citado que um dos fatores de relevância nas reações de transesterificação enzimática, são as interações realizadas entre o biocatalisador e o agente de esterificação, responsáveis pela formação do complexo “acil-enzima”. O acetato de vinila, utilizado nos estudos anteriores, mostrou-se eficiente, enquanto o acetato de etila foi menos efetivo para doar o grupo acetila aos álcoois usados.

Para as reações de transesterificação dos álcoois (*R,S*)-**15b** e (*R,S*)-**16b**, além dos doadores acila descritos anteriormente, foi usado o acetato de *isopropenila*. Outros doadores acila foram também usados nas reações com os dois álcoois, sendo estes o propionato, laurato e estearato de vinila, que são considerados ésteres ativados.

Nas reações de (*R,S*)-**15b** e (*R,S*)-**16b** com o propionato, laurato e estearato de vinila foram utilizadas as razões molares álcool:doador acila 1:2, a 35° C em 15 mL de MTBE. Como catalisador utilizou-se a LBC imobilizada nos filmes de amido/PEO (1/1 m/m) e proteína de soja/PEO (1/1 m/m), com ou sem  $\beta$ -CD. Ao usar o laurato ou estearato de vinila, não foi observada a formação dos produtos, independente do filme utilizado. Com o propionato de vinila, não foi possível uma separação adequada dos reagentes e produtos nas análises de cromatografia gasosa quiral, impossibilitando a quantificação dos mesmos.

Nas reações de transesterificação usando o acetato de isopropenila, utilizou-se a razão molar de 1:4. Para a imobilização da LBC foram usadas as blendas de amido/PEO (1/1 m/m) e proteína de soja/PEO (1/1 m/m), ambos com 10% m/m de  $\beta$ -CD.

Os resultados de conversão em éster (%) e de  $ee_s$  (%), em 24 e 48h, para as reações utilizando o álcool (*R,S*)-**15b**, com diferentes suportes para a LBC são apresentados na **Tabela 5**.

**Tabela 5.** Resolução do (*R,S*)-**15b** com acetato de isopropenila.

Entrada	Suportes	Tempo			
		24h		48h	
		c (%)	$ee_s$ (%)	c (%)	$ee_s$ (%)
1	Amido/ PEO (1/1 m/m)	9	9	11	10
2	Amido/ PEO (1/1 m/m)/ $\beta$ -CD 10%	29	39	40	53
3	Prot. Soja/ PEO (1/1 m/m)	15	15	25	39
4	Prot. Soja/ PEO (1/1 m/m)/ $\beta$ -CD 10%	29	35	42	59

(*R,S*)-**15b** (5mmol); acetato de isopropenila (20 mmol), LBC (50 mg), MTBE (15 mL), 35° C, 100 rpm.

Em todas as reações estudadas, obteve-se  $ee_p > 99\%$  e  $E > 200$ . Os resultados apresentados na **Tabela 5** evidenciam uma diferença nos valores de conversão quando é utilizado a  $\beta$ -CD nas blendas. Ao utilizar a LBC imobilizada na blenda de amido/PEO, as conversões em *R-15c* aumentaram de 11% para 40%, na ausência e presença de  $\beta$ -CD, respectivamente (**Tabela 5**, Entradas 1 e 2). Com a LBC suportada no filme de proteína de soja, a adição da  $\beta$ -CD aumentou a conversão ao produto de 25% para 42%, em 48h (**Tabela 5**, Entradas 3 e 4). A menor

conversão (11%) ao produto foi observada ao usar a blenda de amido/PEO em 48h. A maior conversão (42%) em éster foi obtida com a LBC imobilizada no suporte de proteína de soja/PEO/ $\beta$ -CD (**Tabela 5**, Entrada 4).

A **Tabela 6** apresenta os valores de conversão (%) e  $ee_s$  (%), em 24h e 48h, para as reações com (*R,S*)-**16b** utilizando como sistema a LBC imobilizada em quatro blendas diferentes.

**Tabela 6.** Resolução do (*R,S*)-**16b** com acetato de *isopropenila*.

Entrada	Suportes	Tempo			
		24h		48h	
		c (%)	$ee_s$ (%)	c (%)	$ee_s$ (%)
1	Amido/ PEO (1/1 m/m)	10	15	18	33
2	Amido/ PEO (1/1 m/m)/ $\beta$ -CD 10%	33	64	50	>99
3	Prot. Soja/ PEO (1/1 m/m)	28	55	35	71
4	Prot. Soja/ PEO (1/1 m/m)/ $\beta$ -CD 10%	39	79	50	>99

(*R,S*)-**16b** (5mmol); acetato de *isopropenila* (20 mmol), LBC (50 mg), MTBE (15 mL), 35° C, 100 rpm.

Em todas as reações com o substrato (*R,S*)-**16b**, obteve-se  $ee_p$  >99%,  $E >200$  e o  $ee_s$  variou de 15->99%. Ao utilizar como suportes para a LBC os filmes de amido/PEO e proteína de soja/PEO com 10% m/m de  $\beta$ -CD, foram obtidas as maiores conversões ao produto (50%) (**Tabela 6**, Entradas 2 e 4). A menor conversão em éster foi obtida em 48h (18%) ao usar o filme de amido/PEO como suporte para a LBC (**Tabela 6**, Entradas 1).

Comparando-se os dados das **Tabelas 5 e 6**, nota-se que com o uso do acetato de *isopropenila*, as conversões ao produto foram maiores nas reações com o substrato (*R,S*)-**16b**. Resultados semelhantes foram obtidos quando utilizou-se o acetato de vinila como doador acila. Este aumento na conversão pode estar associado a efeitos eletrônicos do substrato, que no caso do substituinte 3,4-metilenodioxi apresenta um efeito de carga indutivo, tornando o grupo álcool mais nucleofílico. O substituinte 3-nitro apresenta efeito retirador de elétrons do anel aromático, tornando o oxigênio do álcool menos nucleofílico.

Andrade e *col.* estudaram a resolução cinética do 2-bromo-1-feniletanol com a LBC imobilizada em nanopartículas

superparamagnéticas, e testaram 3 doadores acilas diferentes. Assim como neste trabalho, ao utilizar o acetato de etila não houve a formação do produto de interesse. Com o uso do acetato de isoprenila, as conversões em éster foram de 4% em MTBE e 5% em tolueno, após 24h. Neste mesmo tempo, ao se utilizar o acetato de vinila, as conversões foram de 10% (MTBE) e 13% (tolueno). Em todas as reações, o  $ee_p$  do S-acetato foi >99%.<sup>106</sup>

Os resultados apresentados e discutidos neste estudo mostraram que a estrutura do doador acila, do substrato e a composição dos filmes podem influenciar na resolução dos alcoóis estudados, porém estes parâmetros não alteraram a seletividade da lipase (LBC).

#### 4.5 – RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA DO (R,S)-3-NITRO-1-FENILETANOL.

##### 4.5.1- Uso de lipases de diversas procedências.

O interesse na exploração da biodiversidade e utilização de lipases de diferentes procedências como biocatalisadores, tem aumentado constantemente. O uso de lipases comerciais ou não, torna-se uma alternativa mais “limpa” ao emprego de métodos catalíticos químicos.<sup>35, 107</sup>

A **Tabela 7**, apresenta os resultados obtidos de conversão ao éster **R-15c** com o uso de lipases de diversas procedências imobilizadas nos filmes de amido/PEO (1/1 m/m) e proteína de soja/PEO (1/1 m/m), com e sem  $\beta$ -CD, nas reações de transesterificação com (R,S)-**15b**. Utilizou-se o acetato de vinila, e as mesmas foram realizadas a 35° C e 100 rpm.

Foram usadas as lipases de *Burkholderia cepacia* (LBC e LPS-SD), *Pseudomonas fluorescens* (LAK 20), *Thermomyces lanuginosus* (LTL-IM), *Aspergillus niger* (LAN 12), *Mucor javanicus* (LMJ 10) e de *Candida cylindracea* (LAY 30).

**Tabela 7.** Influência do uso de diversas lipases na conversão ao éster *R-15c*.<sup>(a)</sup>

Ent.	Suportes	Lipases <sup>(b)</sup> Conversão <sup>(c)</sup> (%)						
		LBC	LPS-SD	LAK 20	LTL-IM	LAN 12	LMJ 10	LAY 30
1	Amido/PEO <sup>(d)</sup>	28	15	1	9	7	0	1
2	Amido/PEO/ $\beta$ -CD <sup>(d)</sup>	32	27	1	3	5	0	1
3	Prot.Soja/PEO <sup>(d)</sup>	28	26	35	11	15	4	2
4	Prot.Soja/PEO/ $\beta$ -CD <sup>(d)</sup>	46	36	17	5	15	5	4

(a) (*R,S*)-**15b** (5mmol); acetato de vinila (10 mmol), lipases (50 mg), MTBE (15 mL), 35° C, 100 rpm, 24h.

(b) Atividades (U/g): LBC - 30.000, LPS-SD - 23.000, LAK - 25.000, LTL-IM - 10.000, LAN 12 - 120.000, LMJ 10 - 10.000 e LAY 30 - 30.000.

(c) Determinado por CG-quiral.

(d) Composição dos filmes: amido/PEO (1/1 m/m); amido/PEO/ $\beta$ -CD (1/1 m/m) 10% m/m de  $\beta$ -CD; prot. soja/PEO (1/1 m/m); prot. soja/PEO/ $\beta$ -CD (1/1 m/m) 10% m/m de  $\beta$ -CD.

Usando 7 lipases diferentes, foi observado uma grande variação na conversão ao éster, independente do suporte. Ao usar as lipases LBC, LPS-SD, LAK 20 e LTL-IM obteve-se  $ee_p > 99\%$ , e com as lipases LAN 12, LMJ 10 e LAY 30 os  $ee_p$  foram de 65-86%. Independente dos valores de  $ee_p$ , as maiores conversões foram obtidas com a lipase de *Burkholderia cepacia* (LBC). Com o uso da LBC, as conversões variaram de 28-46% e ao usar a LPS-SD duplamente imobilizada (esta é comercializada imobilizada em terra diatomácea), os valores foram de 15-36%. As maiores conversões com a LBC, podem estar relacionadas com a atividade desta lipase (30.000 U/g) que é maior em relação à LPS-SD (23.000 U/g). Com o uso da LBC e da LPS-SD, nas reações utilizando os suportes contendo  $\beta$ -CD, as conversões foram maiores, sendo de 32% e 27%, e de 46% e 36%, respectivamente (**Tabela 7**, Entradas 2 e 4).

Com o uso das lipases LAK 20, LTL-IM e LAN 12 imobilizadas obteve-se, em geral, conversões baixas e moderadas e apenas com a

lipase LAK 20 suportada na blenda de prot. Soja/PEO a conversão foi alta (35%). Ao usar estas três lipases imobilizadas em blenda de amido/PEO, com ou sem  $\beta$ -CD, as conversões ao éster *R-15c* não foram superiores a 10%. Ao usar a LAK 20, o produto foi obtido em apenas 1% (**Tabela 7**, Entradas 1 e 2). Com a utilização das lipases LAK 20, LTL-IM e LAN 12 imobilizadas nas blendas de proteína de soja/PEO, na ausência ou presença de  $\beta$ -CD, as conversões foram maiores, variando de 5-35% (**Tabela 7**, Entradas 3 e 4). Não foi observada uma mudança significativa nos valores de conversão após a incorporação de  $\beta$ -CD nos filmes. Apesar das conversões obtidas terem sido similares, as lipases possuem atividades bem distintas, tendo a LAN 12 o maior valor (120.000 U/g), seguido da LAK 20 (25.000 U/g) e da LTL-IM (10.000 U/g).

Quando as lipases de *M. javanicus* (LMJ 10) e de *C. cylindracea* (LAY 30) foram usadas, as conversões ao produto apresentaram os menores valores. A utilização dos filmes com  $\beta$ -CD não se mostrou positiva, mantendo os valores de conversão iguais. Ao usar como suporte as blendas de amido/PEO, as conversões foram muito baixas (1%) ou não foi detectado o produto (**Tabela 7**, Entradas 1 e 2). Ao usar os filmes de prot. Soja/PEO, as conversões não foram significativamente maiores, sendo de apenas 2-5% (**Tabela 7**, Entradas 3 e 4). As duas lipases possuem valores de atividades distintos entre si, mas similares aos das demais lipases utilizadas, sendo de 10.000 U/g para a LMJ 10 e de 30.000 U/g para a LAY 30.

Para todas as reações em 24h o  $ee_s$  variou bastante, devido este parâmetro ter relação com a conversão, e foram de 1-51%. As conversões utilizando estas 7 lipases não se alteraram após 48h de reação, aumentando no máximo 4%, ou mantendo os valores obtidos em 24h. Por exemplo, com as lipases LAK 20 e LTL-IM, os valores mantiveram-se iguais, enquanto que os maiores aumentos foram observados com a LPS-SD. O  $ee_p$  para estas reações em um tempo maior (48h), foi mantido na mesma faixa, 65-86% para as lipases LAN 12, LMJ 10 e LAY 30 e >99% ao usar a LBC, LPS-SD, LAK 20 e LTL-IM.

Cheong e *col.* investigaram o uso de 11 lipases diferentes na resolução de derivados do 2-fenil-1-propanol com propionato de vinila, a 30° C em MTBE. Com o substrato 2-(3,4,5-trimetóxi)fenil-1-propanol, os maiores valores de conversão ao produto em 48h, foram obtidos com as lipases de pancreas de porco (69%,  $ee_p$  46%) e de *Burkholderia cepacia* (62%,  $ee_p$  59%). Com as lipases PLE (esterase do fígado do porco) e LWG (lipase *Wheat germ*), no mesmo tempo de reação, não foi

observado a formação do éster.<sup>108</sup>

Ao usar as 7 lipases diferentes, imobilizadas nos 4 filmes, obteve-se conversões de 1-50% e  $ee_p$  de 65->99%. Com as lipases LBC, LPS-SD, LMJ 10 e LAY 30, os melhores resultados foram obtidos com estas lipases imobilizadas nos suportes que continham  $\beta$ -CD. Os suportes de proteína de soja/PEO se mostraram melhores que os de amido/PEO. Com as demais lipases (LAK 20, LTL-IM e LAN 12), os filmes de proteína de soja/PEO também foram mais eficientes, porém os melhores resultados foram obtidos sem a  $\beta$ -CD.

Para todas as reações foi possível observar que a procedência da lipase, bem como o suporte, influenciaram na conversão ao produto *R-15c*. Algumas lipases apresentaram relação direta com sua atividade, mas com a LAN 12 não foi observada esta relação. Os diferentes valores de conversão podem estar associados as diferentes formas que cada tipo de lipase possui na cavidade de seu sítio ativo. Estes permitem um encaixe melhor com certos substratos que outros, e muitas vezes a atividade não tem relação direta, devido também à estrutura do substrato.<sup>109</sup>

#### 4.5.2 - Efeito do solvente orgânico.

Dentre os critérios mais importantes para a seleção do solvente orgânico em reações catalisadas por enzimas estão a capacidade de solubilizar os substratos e o produto, bem como a biocompatibilidade. Entretanto, outras características são desejáveis, entre elas a estabilidade química e térmica, baixa tendência de formar emulsão com a água, não biodegradabilidade, entre outros.<sup>33</sup>

O solvente orgânico e o conteúdo de água influenciam fortemente na seletividade de uma enzima, pois estes parâmetros podem alterar a conformação nativa das mesmas e, portanto a atividade catalítica dos biocatalisadores. No entanto, ainda não há consenso sobre os principais parâmetros que influenciam na reação enzimática, e o mais frequentemente usado é o  $\log P$  (coeficiente de partição, que indica a hidrofobicidade do solvente, e é determinado pela razão entre a concentração do solvente em 1-octanol sobre a concentração em água).<sup>101, 110</sup>

Os solventes hidrofóbicos com  $\log P \geq 4$  são considerados os mais adequados para as reações biocatalisadas. Solventes com  $\log P$  entre 2 e 4 são considerados moderados, e os polares com  $\log P < 2$  são frequentemente ineficientes para as reações catalisadas por enzimas. Esta correlação entre polaridade e atividade está relacionada ao fato de

que o solvente poder alterar a quantidade de água que estabiliza o biocatalisador. Embora os valores de  $\log P$  não determinem a eficiência da síntese enzimática, esta é uma boa informação para a seleção de solventes.<sup>8, 101, 110</sup>

Para a avaliação destes efeitos, foi verificada a influência do uso do terc-butanol ( $\log P$  0,35), cicloexano ( $\log P$  3,44), éter diisopropílico ( $\log P$  1,52), tetrahidrofurano ( $\log P$  0,46) e da acetona ( $\log P$  -0,24) como solventes nas reações de transesterificação do acetato de vinila com (*R,S*)-**15b**. A LBC foi imobilizada nos filmes de amido/PEO (1/1 m/m) e proteína de soja/PEO (1/1 m/m), com ou sem  $\beta$ -CD.

A **Tabela 8** apresenta os valores de conversão (%) ao éster (*R,S*)-**15b**.

**Tabela 8.** Influência do solvente orgânico na conversão ao éster *R-15c*.<sup>(a)</sup>

Ent.	Supor-tes <sup>(d)</sup>	Solventes ( $\log P$ ) <sup>(b)</sup> / Conversão <sup>(c)</sup> (%)					
		c.hex. (3,44)	éter di <i>i</i> .pro. (1,52)	MTBE (0,94)	THF (0,46)	<i>t</i> -BuOH (0,35)	Ace. (-0,24)
1	Amido /PEO	28	36	28	6	42	37
2	Amido /PEO/ $\beta$ -CD	19	28	32	7	38	42
3	prot. Soja/ PEO	26	32	28	4	30	31
4	prot. Soja/ PEO/ $\beta$ -CD	20	18	46	2	30	10

(a) (*R,S*)-**15b** (5mmol); acetato de vinila (10 mmol), LBC (50 mg), solventes (15 mL), 35° C, 100 rpm, 24h.

(b) Valores das referências<sup>110-112</sup>

(c) Determinado por CG-quiral.

(d) Composição dos filmes: amido/PEO (1/1 m/m); amido/PEO/ $\beta$ -CD (1/1 m/m) 10% m/m de  $\beta$ -CD; prot. soja/PEO (1/1 m/m); prot. soja/PEO/ $\beta$ -CD (1/1 m/m) 10% m/m de  $\beta$ -CD.

No estudo com os vários solventes, observou-se que a enantiosseletividade da lipase de *Burkholderia cepacia* (LBC) não foi alterada e obteve-se  $ee_p > 99\%$  e  $E > 200$ . Os valores de  $ee_s$  variaram de 2% a 96%.

Quando a reação foi realizada nos solventes com  $\text{Log } P > 1,5$ , tais como ciclohexano (3,44) e éter di-*isopropílico* (1,52), as conversões ao éster **R-15c** foram de moderadas a boas. Usando como suporte para a LBC os filmes de amido/PEO e amido/PEO/ $\beta$ -CD, em éter di-*isopropílico*, as conversões foram maiores (36% e 28%) que em ciclohexano (28% e 19%), respectivamente (**Tabela 8**, Entradas 1 e 2). Valores de conversão semelhantes foram obtidos nestes solventes quando utilizou-se a LBC imobilizada nas blendas de prot. soja/PEO (26% e 32%) e prot. soja/PEO/ $\beta$ -CD (20% e 18%) (**Tabela 8**, Entradas 3 e 4). Para as reações usando os filmes preparados com  $\beta$ -CD, as conversões ao produto foram menores (**Tabela 8**, Entradas 2 e 4).

Com o uso dos solventes de  $\text{log } P$  intermediário entre 0 e 1, tais como MTBE (0,94), THF (0,46) e *t*-butanol (0,35), obteve-se conversões ao éster bastante variadas. Usando THF os valores de conversão foram baixos e similares, independente do suporte usado e variou de 2-7% (**Tabela 8**, Entradas 1 a 4). Com o MTBE e *t*-butanol, as conversões foram boas, com valores entre 28%-46% e 30%-42%, respectivamente. Os valores de conversão obtidos não apresentaram relação com a presença ou ausência de  $\beta$ -CD nos filmes. A maior conversão, entre todos os solventes, foi obtida ao se utilizar a LBC imobilizada no filme de prot. Soja/PEO/ $\beta$ -CD, em MTBE, sendo de 46% (**Tabela 8**, Entrada 4).

Usando o único solvente com  $\text{Log } P < 0$ , a acetona (-0,23), as conversões foram, de modo geral, boas. Com a LBC suportada nas blendas de amido/PEO, amido/PEO/ $\beta$ -CD e prot. soja/PEO, os valores de conversão foram próximos, sendo de 31%-42% (**Tabela 8**, Entradas 1 a 3). Quando foi utilizado o filme de prot. soja/PEO/ $\beta$ -CD, obteve-se a menor conversão em acetona, sendo de apenas 10% (**Tabela 8**, Entrada 4). O uso ou não de  $\beta$ -CD nos filmes, não mostrou relação com as conversões.

Observou-se neste estudo que não houve uma relação direta do coeficiente de partição ( $\text{Log } P$ ) dos solventes orgânicos com os valores de conversão em éster. Por exemplo, utilizando como solvente a acetona ( $\text{Log } P$  -0,23) os valores de conversão ao éster **R-15b** variaram de 10-42%, com o éter di-*isopropílico* ( $\text{Log } P$  1,5) de 18-36% e com o ciclohexano ( $\text{Log } P$  3,2) de 19-28%. Estes dados demonstram que independente do  $\text{Log } P$  destes solventes, os valores de conversão foram

de moderados a bons, sendo mais dependentes do suporte usado para a LBC.

Para as reações em um tempo maior (48h), as conversões mantiveram o mesmo perfil que em 24h (aumentando na mesma proporção das apresentadas na **Tabela 8**). Os valores foram de ~ 3%, para a reação em THF com a blenda de prot. soja/PEO/ $\beta$ -CD. Conversões de 50%, foram obtidas utilizando o éter di-*isopropílico* e a acetona com a LBC imobilizada nas blendas de amido/PEO e amido/PEO/ $\beta$ -CD.

O  $ee_p$  para estas reações foi > 99% e o  $ee_s$  variou de 3-96%.

Em um trabalho realizado por pesquisadores chineses, o solvente não só teve relação com a conversão, que foi crescente à medida que o Log  $P$  aumentou como também alterou a enantiosseletividade da enzima. Na resolução do 1-feniletanol com acetato de vinila, foi usada a LBC imobilizada em sílica funcionalizada. Foram utilizados os solventes acetato de etila (Log  $P$  0,68), benzeno (Log  $P$  2,00), tolueno (Log  $P$  2,50), hexano (Log  $P$  3,50) e heptano (Log  $P$  4,00). A conversão em *R*-acetato aumentou de 28,6 a 50,8%, porém com o uso do hexano e heptano, o  $ee_p$  diminuiu de >99% para 96%.<sup>113</sup>

Através dos resultados apresentados e discutidos é possível observar que o solvente orgânico utilizado influencia na conversão ao *R*-éster, em reações biocatalisadas. O solvente pode afetar não apenas nas conversões, mas também a enantiosseletividade do biocatalisador. Porém, neste trabalho e como já citado, a enantiosseletividade foi mantida em todos os solventes usados.

#### 4.5.3 - Reutilização dos filmes de amido/PEO e proteína de soja/PEO, com e sem $\beta$ -CD.

Uma das principais vantagens da utilização de métodos de imobilização, para as enzimas, em reações biocatalisadas é a possibilidade de reutilização destes sistemas catalíticos. Nas reações de reutilização, avaliou-se a manutenção da atividade catalítica da lipase de *Burkholderia cepacia* (LBC) imobilizada nos filmes de amido/PEO (1/1 m/m) e proteína de soja/PEO (1/1 m/m), com ou sem 10% m/m de  $\beta$ -CD. Estes sistemas foram utilizados, após 30 e 90 dias de armazenamento em *n*-hexano a t.a., na reação do acetato de vinila com o 3-nitro-1-feniletanol [(*R,S*)-**15b**], em MTBE a 35° C.

A **Tabela 9** mostra os resultados de conversão (%) e  $ee_s$  (%) para a 1ª reutilização dos sistemas catalíticos, na reação descrita acima.

**Tabela 9.** Efeito da reutilização da LBC imobilizada, na reação de resolução do (*R,S*)-**15b**.

Entrada	Suportes	Tempo			
		24h		48h	
		c (%)	<i>ee<sub>s</sub></i> (%)	c (%)	<i>ee<sub>s</sub></i> (%)
1	Amido/ PEO (1/1)	22	47	29	61
2	Amido/ PEO (1/1)/ β-CD 10%	25	52	37	69
3	Prot. Soja/ PEO (1/1)	20	41	36	66
4	Prot. Soja/ PEO (1/1)/ β-CD 10%	33	67	43	81

(*R,S*)-**15b** (5mmol); acetato de vinila (10 mmol), LBC (50 mg), MTBE (15 mL), 35° C, 100 rpm, tempo de estocagem: 30 dias.

A enantiosseletividade da lipase não foi alterada com o armazenamento, mantendo o valor do *ee<sub>p</sub>* >99% e de *E* >200. O *ee<sub>s</sub>* variou de 41-81% e os valores de conversão foram similares aos da 1ª utilização (28%-50%). Com a LBC suportada nos filmes de amido/PEO e proteína de soja/PEO contendo β-CD, foram obtidas as maiores conversões em 48h, sendo de 37% e 43%, respectivamente. Quando foi utilizada a blenda de amido/PEO, a conversão ao éster *R-15c* foi de 29%, e com a blenda de proteína de soja/PEO foi de 36%, ambos em 48h.

A **Tabela 10** mostra os resultados de conversão (%) e *ee<sub>s</sub>* (%) para a 2ª reutilização dos sistemas, na reação de transesterificação do acetato de vinila com o álcool (*R,S*)-**15b**, após 90 dias de estocagem.

Um tempo maior de armazenamento e o fato dos filmes já terem sido utilizados 2 vezes, não modificou o *ee<sub>p</sub>* das reações catalisadas pela LBC, sendo de >99% e *E* >200.

Neste segundo re-uso dos suportes, os sistemas se mostraram menos eficientes convertendo o substrato (*R,S*)-**15b** na faixa de 20-27%. Novamente, obtiveram-se resultados similares ao primeiro re-uso, e as maiores conversões foram de 25% e 27%, em 48h. Nestas condições, o acréscimo de β-CD nos filmes foi vantajoso, havendo um aumento na conversão em relação aos mesmos filmes sem a β-CD.

**Tabela 10.** Efeito da reutilização da LBC imobilizada, na reação de resolução do (*R,S*)-**15b**.

Entrada	Suportes	Tempo			
		24h		48h	
		c (%)	<i>ee<sub>s</sub></i> (%)	c (%)	<i>ee<sub>s</sub></i> (%)
1	Amido/ PEO (1/1)	11	14	20	25
2	Amido/ PEO (1/1)/ β-CD 10%	14	19	25	35
3	Prot. Soja/ PEO (1/1)	13	15	25	31
4	Prot. Soja/ PEO (1/1)/ β-CD 10%	15	20	27	34

(*R,S*)-**15b** (5mmol); acetato de vinila (10 mmol), LBC (50 mg), MTBE (15 mL), 35° C, 100 rpm, tempo de estocagem 90 dias.

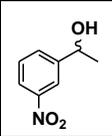
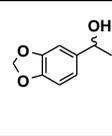
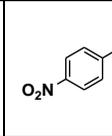
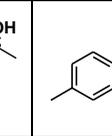
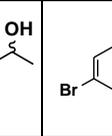
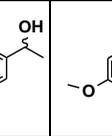
Os resultados apresentados neste estudo mostraram a possibilidade de reutilização da LBC mesmo após 3 meses de estocagem a t.a., evidenciando uma vantagem da imobilização com os 4 filmes testados. A atividade catalítica da LBC, apesar de ter diminuído, deve ter sido mantida devido a proteção do suporte e a presença de certa quantidade de água nos filmes (7,05-10,19%). Conforme discutido no item 4.2, a presença de água nos filmes e blendas é importante para preservar a estrutura terciária da lipase, bem como a do sítio ativo.

Outros trabalhos, também relataram a possibilidade de reutilização da lipase de *Burkholderia cepacia*, imobilizada em filmes de amido de inhame e cará, na síntese do acetato de geranoíla, em *n*-hexano.<sup>114</sup>

#### 4.5.4 – Resolução enzimática de diferentes compostos com grupos doadores e retiradores de elétrons derivados do (*R,S*)-1-feniletanol.

Neste estudo, foram utilizados diversos álcoois derivados do (*R,S*)-1-feniletanol com diferentes grupos doadores e/ou retiradores de elétrons para avaliar o efeito eletrônico nestas reações. A LBC foi imobilizada nas blendas de amido/PEO (1/1 m/m) e proteína de soja/PEO (1/1 m/m), na ausência e presença de β-CD. Estes sistemas foram utilizados nas reações de transesterificação do acetato de vinila com os álcoois (*R,S*)-4-nitro-1-feniletanol (**17b**), (*R,S*)-4-metil-1-feniletanol (**18b**), (*R,S*)-4-Br-1-feniletanol (**19b**) e (*R,S*)-4-métoksi-1-feniletanol (**20b**), em MTBE, a 35°C. Foram incluídos os resultados obtidos com os álcoois (*R,S*)-**15b** e (*R,S*)-**16b**, para fins comparativos.

A **Figura 27** mostra as estruturas e a numeração dos alcoóis utilizados no trabalho.

					
( <i>R,S</i> )- <b>15b</b>	( <i>R,S</i> )- <b>16b</b>	( <i>R,S</i> )- <b>17b</b>	( <i>R,S</i> )- <b>18b</b>	( <i>R,S</i> )- <b>19b</b>	( <i>R,S</i> )- <b>20b</b>

**Figura 1.** Estruturas químicas dos derivados do (*R,S*)-1-feniletanol.

A **Tabela 11** mostra a os resultados de conversão (%) em 24h, para as reações do acetato de vinila com os álcoois (*R,S*)-**15b** a **20b**, utilizando a LBC imobilizada nos filmes de amido/PEO e proteína de soja/PEO, sem e com  $\beta$ -CD.

**Tabela 11.** Influência do grupo substituinte na resolução dos alcoóis (*R,S*)-**15b-20b**.<sup>(a)</sup>

Ent.	Suportes <sup>(c)</sup>	Alcoóis / Conversão <sup>(b)</sup> (%)					
		<b>15b</b>	<b>16b</b>	<b>17b</b>	<b>18b</b>	<b>19b</b>	<b>20b</b>
1	amido/PEO	28	39	17	29	20	36
2	amido/PEO/ $\beta$ -CD	32	45	23	33	27	42
3	prot. Soja/PEO	28	41	20	34	26	37
4	prot. Soja/PEO/ $\beta$ -CD	46	37	29	34	31	41

(a) (*R,S*)-**15b-20b** (5mmol); acetato de vinila (10 mmol), LBC (50 mg), MTBE (15 mL), 35° C, 100 rpm, 24h.

(b) Determinado por CG-quiral.

(c) Composição dos filmes: amido/PEO (1/1 m/m); amido/PEO/ $\beta$ -CD (1/1 m/m) 10% m/m de  $\beta$ -CD; prot. soja/PEO (1/1 m/m); prot. soja/PEO/ $\beta$ -CD (1/1 m/m) 10% m/m de  $\beta$ -CD.

Nas reações estudadas e com todos os álcoois, o  $ee_p$  e E, foram de >99% e >200, respectivamente. O  $ee_s$  variou bastante, sendo de 22-99%.

Ao observar os dados apresentados na **Tabela 11**, é possível verificar a influência dos grupos ligados ao anel aromático nas conversões aos respectivos ésteres. Em geral, os maiores valores de

conversão aos ésteres foram obtidos com os substratos que tem grupos doadores de elétrons, tais como *p*-CH<sub>3</sub>, *p*-OMe e 3,4-metilenodioxi. Por exemplo, com estes substituintes as conversões variaram de 29%-34%, 36%-41% e de 37%-45%, respectivamente.

Para os álcoois com grupos retiradores de elétrons, as conversões foram menores, sendo de 17%-29% com o *p*-NO<sub>2</sub>, de 20%-31% com o *p*-Br e de 28%-46% com o *m*-NO<sub>2</sub>. Na reação com o substrato (*R,S*)-**17b** as conversões foram as menores, sendo que o grupo nitro na posição 4 é o substituinte que exerce o maior efeito retirador de elétrons no anel aromático. Com o grupo 3,4-metilenodioxi que possui dois oxigênios, a indução de carga sobre o anel é bastante intensa, sendo que as conversões foram as mais elevadas.

De maneira geral às conversões foram um pouco maiores quando foram utilizadas as blendas de prot. soja/PEO, em comparação com as de amido/PEO, como suporte da LBC. O uso de  $\beta$ -CD nestes filmes também teve uma relação direta com as conversões, sendo que em geral foram maiores na presença deste aditivo. Por exemplo, a maior conversão ao produto foi obtida com o uso da LBC imobilizada na blenda de proteína de soja/PEO/ $\beta$ -CD, sendo de 46%. Ao usar o filme de amido/PEO, obteve-se a menor conversão ao éster (17%), na reação com o substrato (*R,S*)-**17b**.

Em 48h, foi observada a tendência das reações em 24h, onde com os grupos retiradores de elétrons foram obtidos menores valores e com grupos doadores estes foram mais elevados. Neste tempo de reação as conversões ao *R*-éster, utilizando como substrato (*R,S*)-**19b** variaram de 29%-43%, enquanto com o substrato (*R,S*)-**20b** estes valores foram de 42%-50%.

Andrade e *col.* avaliaram o uso de diversos álcoois derivados incluindo o (*R,S*)-1-feniletanol em reações de transesterificação com o acetato de vinila, utilizando a lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) como catalisador. As reações foram realizadas em MTBE e a 32° C, e as lipases foram imobilizadas em um suporte nanoparticulado e supermagnético. Para os substratos (*R,S*)-1-feniletanol, (*R,S*)-**17b** e (*R,S*)-**20b**, em 24 h de reação, as conversões aos produtos foram de 32%, 32% e 36%, respectivamente. Utilizando os substratos (*R,S*)-*p*-Cl-1-feniletanol, (*R,S*)-**19b** e (*R,S*)-**18b**, em 6 h, obteve-se 17%, 25% e 26% dos produtos, respectivamente. Observando-se estes resultados não foi verificada uma relação direta entre os grupos substituintes e as conversões, uma vez que com um grupo fortemente retirador como o *p*-NO<sub>2</sub> a conversão foi igual ao álcool sem grupo substituinte e similar ao substrato com um grupo fortemente doador de elétrons, tal como o

metóxi. Este fato foi observado também para os álcoois com os grupos *p*-Br e *p*-metil, que apresentaram conversões praticamente iguais 25% e 26%, mesmo tendo efeitos eletrônicos bem distintos.<sup>51</sup>

Através dos resultados apresentados e analisados é possível observar que a estrutura do substrato, influenciou as conversões aos produtos. Estes dados podem ou não ser devido aos efeitos eletrônicos dos substituintes (doador ou retirador de elétrons). A estrutura do substrato (ou seja, o efeito estéreo) é também importante nas reações biocatalisadas devido ao encaixe no sítio ativo da enzima, fatos também discutidos no item 4.5.1.



## 5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, as principais são:

- A extração do amido de batata aipo (*Arracacia xanthorrhiza*) mostrou-se viável, sendo possível obter 113g de amido a partir de 1Kg do tubérculo.

- Os filmes de amido de batata aipo/PEO (1/1 m/m) e de proteína de soja/PEO (1/1 m/m) foram preparados na presença e ausência de  $\beta$ -CD, e foram eficientes para imobilizar as lipases LBC, LAK 20, LAY 30, LMJ 10, LAN 12, LPS-SD e LTL-IM.

- Estes suportes (filmes) foram estáveis em diversos solventes e temperaturas de até 55° C. A quantidade de água nos filmes com e sem LBC, variou de 7,05-10,19%, contribuindo para a manutenção da atividade catalítica da enzima.

- Os álcoois racêmicos 3-nitro-1-feniletanol (**15b**), 3,4-metilenodioxo-1-feniletanol (**16b**), 4-nitro-1-feniletanol (**17b**), 4-metil-1-feniletanol (**18b**), 4-bromo-1-feniletanol (**19b**) e o 4-métoxi-1-feniletanol (**20b**) e os correspondentes acetatos (**15c-20c**), foram preparados, purificados (ccd) e caracterizados por técnicas de IV e RMN de  $H^1$ . Estes foram usados como padrões nas análises de CG-quiral.

- Na resolução dos álcoois (*R,S*)-**15b** e (*R,S*)-**16b** com a LBC imobilizada nos filmes de amido/PEO e de proteína de soja/PEO, com ou sem  $\beta$ -CD, obteve-se apenas o enantiômero *R* ( $ee_p > 99\%$  e  $E > 200$ ).

- Nas reações do acetato de vinila com (*R,S*)-**15b** e (*R,S*)-**16b**, os melhores resultados foram obtidos com as razões molares álcool/acetato de vinila maiores que 1:2 (31-50%, em 48h).

- Na imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* (LBC) em diferentes filmes, as maiores conversões ao produto foram obtidas ao usar os filmes de amido/PEO e proteína de soja/PEO (7-50%, em 48h). Em quantidades maiores que 50% de PEO nos filmes, as conversões aumentaram (28-50%).

- A temperatura mais adequada para a resolução dos álcoois racêmicos **15b** e **16b**, com acetato de vinila, foi de 35° C.

- Nas reações realizadas na ausência de lipases, não foi observado a formação de *R*-**15c** e *R*-**16c** (blendas de amido/PEO) ou foram <3% (blendas de prot. soja/PEO).

- Ao usar a LBC na forma livre nas reações do acetato de vinila com (*R,S*)-**15b** e (*R,S*)-**16b**, as conversões em éster foram menores em comparação com a LBC suportada (4-18%, em 48h).

- Nas reações com diferentes doadores acilas, não foi observada a

formação de produtos com o estearato e laurato de vinila. Com o acetato de *isopropenila* as conversões foram de moderadas a boas (11-50%, em 48h).

- Ao usar as lipases LAN 12, LAY 30 e LMJ 10 suportadas nos filmes de amido/PEO e de proteína de soja/PEO, na presença ou ausência de  $\beta$ -CD, as conversões em **R-15c** foram de baixas a moderadas (0-20%) com  $ee_p$  de 65-86%. Ao usar as lipases LAK 20, LTL-IM e LPS-SD, as reações foram enantiosseletivas ( $ee_p >99\%$ ), e os valores de conversão foram de baixos a bons (1-40%).

- O uso de diversos solventes não alterou a enantiosseletividade da LBC, porém as conversões foram dependentes do meio reacional. Usando *t*-butanol, ciclohexano, éter di-*isopropílico* e acetona as conversões em **R-15c** foram de moderadas a boas (18-50%), e em THF de 2-10%.

- Ao usar diferentes álcoois nas reações de transesterificação com acetato de vinila, as maiores conversões foram obtidas para os compostos com grupos doadores de elétrons. Com os grupos 3-nitro, 4-nitro e 4-Br as conversões variaram de 17-50%, e com os grupos 3,4-metilenodioxí, 4-metóxi e 4-metila foram de 29-50%.

- Os sistemas da LBC com filmes de amido/PEO e de proteína de soja/PEO, com ou sem  $\beta$ -ciclodextrina, foram reutilizados duas vezes (após 30 e 90 dias). Observou-se uma diminuição na conversão em **R-15c** em relação ao 1º uso (20-43%), bem como no segundo reuso (11-27%).

- Todos as blendas testadas nos estudos se mostraram estáveis para a imobilização das diferentes lipases. Os sistemas com a LBC foram os mais eficientes, e com a utilização destes, foram obtidas as melhores conversões, sempre com  $ee_p >99\%$ .

- Para finalizar, salienta-se que os suportes utilizados mostraram-se eficientes para a imobilização de diversas lipases e que podem ser usados na resolução de álcoois derivados do 1-feniletanol, em meio orgânico.

## 6 PERSPECTIVAS

- Caracterizar os filmes utilizados como suportes no trabalho, utilizando as técnicas de microscopia de transmissão eletrônica (MET), de área superficial e do tamanho dos poros pelo método B.E.T.
- Imobilizar simultaneamente duas ou mais lipases no mesmo suporte. Esse método é chamado “coquetel enzimático”.
- Avaliar a influência do uso de líquidos iônicos (LIs) como solvente ou em misturas com outros solventes, na resolução dos álcoois derivados do 1-feniletanol.
- Avaliar a presença de glicerol no meio reacional, para verificar se este aditivo aumenta a seletividade ou conversão, nas reações com as lipases.
- Utilizar as blendas de amido/PEO e de proteína de soja/PEO para a imobilização de outras lipases, e usar estes sistemas na resolução de outros álcoois racêmicos, tais como o (*R,S*)-mentol e o (*R,S*)-2-octanol.
- Avaliar o uso dos filmes em um sistema contínuo de reação, que é conhecido como “micro reator”.



## 7 REFERÊNCIAS

1. Chassot, A. I. Alquimiando a química. *Química Nova na Escola*, 1, 20-22, **1995**.
2. Prado, A. G. S. Química verde, os desafios da química do novo milênio. *Química Nova*, 26, (5), **2003**.
3. Silva, F. M.; Lacerda, P. S. B.; Jones, J. J. Desenvolvimento sustentável e química verde. *Química Nova*, 28, (1), 103-110, **2005**.
4. Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger: Principles of Biochemistry*. 3ª Ed. Worth Publishers: New York. **2000**.
5. Murray, R. K.; Granner, D. K. *Harper: Bioquímica*. 6ª Ed. Atheneus: São Paulo. **1990**.
6. Campbell, M. K. *Biochemistry*. 3ª Ed. Saunders College Publication: New York. **1999**.
7. Campbell, M. K.; Shawn, O. F. *Biochemistry*. 7ª Ed. Cengage Learning: Versão eletrônica do livro. **2012**.
8. Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*. 3ª Ed. Springer-Verlag: New York. **1997**.
9. Cabral, J. M. S.; Aires-Barros, M. R.; Gama, M. *Engenharia Enzimática*. 1ª Ed. Lidel: Lisboa. **2003**.
10. Rodoti, I. *Dicionário Houaiss de Física*. 1ª Ed. Objetiva: Rio de Janeiro. **2005**.
11. Bugg, T. D. H. *Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry*. 2ª Ed. Blackwell Publishing: Oxford. **2004**.
12. Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W. *Fundamentos de Bioquímica*. 3ª Ed. Artmed: Porto Alegre. **2000**.
13. Silverman, R. B. *The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions*. 1ª Ed. Academic Press: California. **2000**.
14. Drauz, K.; Waldmann, H. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*. 2ª Ed. Wiley-VCH: Weinheim. **2002**.
15. Marsaioli, A.; Porto, A. L. M. *Biocatálise e Biotransformação Vol 1*. 1ª Ed. Schoba: São Paulo. **2010**.
16. Ghanem, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to

- enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron*, 63, (8), 1721-1754, **2007**.
17. Whittall, J.; Sutton, P. W. *Practical Methods to Biocatalysis and Biotransformations*. 1<sup>a</sup> Ed. John Wiley & Sons: Wiltshire. **2010**.
  18. Dalla-Vecchia, R.; Nascimento, M. G.; Soldi, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, 27, (4), **2004**.
  19. Roberts, S. M. *Biocatalysts for Fine Chemicals Synthesis*. 1<sup>a</sup> Ed. John Wiley & Sons: Chichester. **1999**.
  20. Roberts, S. M.; Turner, N. J.; Willetts, A. J.; Turner, M. K. *Introduction to Biocatalysis Using Enzymes and Micro-Organisms*. 1<sup>a</sup> Ed. Cambridge: New York. **1995**.
  21. Wong, C. H.; Whitesides, G. M. *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*. 1<sup>a</sup> Ed. Pergamon: Trowbridge. **1995**.
  22. Clark, J. H. Chemistry goes green. *Nature Chemistry*, 1, (1), 12-13, **2009**.
  23. Young, I. S.; Baran, P. S. Protecting-group-free synthesis as an opportunity for invention. *Nature Chemistry*, 1, (3), 193-205, **2009**.
  24. Oliveira, L. G.; Mantovani, S. M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. *Química Nova*, 32, (3), **2009**.
  25. Stojkovič, G.; Žnidaršič-Plazl, P. Continuous synthesis of l-malic acid using whole-cell microreactor. *Process Biochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 47, (7), 1102-1107, **2012**.
  26. Fuchs, M.; Koszelewski, D.; Tauber, K.; Sattler, J.; Banko, W.; Holzer, A. K.; Pickl, M.; Kroutil, W.; Faber, K. Improved Chemoenzymatic asymmetric synthesis of (S)-Rivastigmine. *Tetrahedron*, **2012**.
  27. Abdul Rahman, M. B.; Jumbri, K.; Mohd Ali Hanafiah, N. A.; Abdulmalek, E.; Tejo, B. A.; Basri, M.; Salleh, A. B. Enzymatic esterification of fatty acid esters by tetraethylammonium amino acid ionic liquids-coated *Candida rugosa* lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 79, 61-65, **2012**.
  28. Engström, K.; Vallin, M.; Hult, K.; Bäckvall, J.-E. Kinetic

- resolution of diarylmethanols using a mutated variant of lipase CALB. *Tetrahedron*, **2012**.
29. Gotor, V. Non-conventional hydrolase chemistry: Amide and carbamate bond formation catalyzed by lipases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 7, (10), 2189-2197, **1999**.
  30. Davis, G. B.; Boyer, V. Biocatalysis and enzymes in organic synthesis. *Natural Product Reports*, 18, (6), 618-640, **2001**.
  31. Ballesteros, A.; Plou, F. J.; Iborra, F. J.; Halling, P. J. *Stability and Statilization of Biocatalysts*. 1<sup>a</sup> Ed. Elsevier Science: Eastbourne. **1998**.
  32. Gotor-Fernández, V.; Vicente, G. Use of lipases in organic synthesis. *Industrial Enzymes*. 301-315, **2007**.
  33. Costa, V. E. U.; Amorim, H. L. N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. *Química Nova*, 22, (6), 863-873, **1999**.
  34. Kapoor, M.; Gupta, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, 47, (4), 555-569, **2012**.
  35. Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19, (8), 627-662, **2001**.
  36. Houde, A.; Kademi, A.; Leblanc, D. Lipases and Their Industrial Applications: An Overview. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118, (1-3), 155-170, **2004**.
  37. Hasan, F.; Shah, A. A.; Hameed, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 27, (6), 782-798, **2009**.
  38. Haki, G. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, 89, (1), 17-34, **2003**.
  39. Rodrigues, R. C.; Fernandez-Lafuente, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66, (1-2), 15-32, **2010**.
  40. Dabdoub, M. J.; Bronzel, J. L.; Rampin, M. A. Biodiesel: visão

crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. *Química Nova*, 32, (3), **2009**.

41. Dandavate, V.; Keharia, H.; Madamwar, D. Ethyl isovalerate synthesis using *Candida rugosa* lipase immobilized on silica nanoparticles prepared in nonionic reverse micelles. *Process Biochemistry*, 44, (3), 349-352, **2009**.
42. Yücel, Y. Optimization of biocatalytic biodiesel production from pomace oil using response surface methodology. *Fuel Processing Technology*, 99, 97-102, **2012**.
43. Hughes, S. R.; Moser, B. R.; Robinson, S.; Cox, E. J.; Harmsen, A. J.; Friesen, J. A.; Bischoff, K. M.; Jones, M. A.; Pinkelman, R.; Bang, S. S.; Tasaki, K.; Doll, K. M.; Qureshi, N.; Liu, S.; Saha, B. C.; Jackson, J. S.; Cotta, M. A.; Rich, J. O.; Caimi, P. Synthetic resin-bound truncated *Candida antarctica* lipase B for production of fatty acid alkyl esters by transesterification of corn and soybean oils with ethanol or butanol. *Journal of Biotechnology*, 159, (1-2), 69-77, **2012**.
44. Schmid, R. D.; Verger, R. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 37, (12), 1608-1633, **1998**.
45. De Santi, C.; Tutino, M. L.; Mandrich, L.; Giuliani, M.; Parrilli, E.; Del Vecchio, P.; de Pascale, D. The hormone-sensitive lipase from *Psychrobacter* sp. TA144: New insight in the structural/functional characterization. *Biochimie*, 92, (8), 949-957, **2010**.
46. Woolley, P.; Petersen, S. B. *Lipases Their Structure, Biochemistry and Application*. 1<sup>a</sup> Ed. Cambridge University Press: Cambridge. **1994**.
47. Cygler, M.; Grochulski, P.; Kazlauskas, R. J.; Schrag, J. D.; Bouthillier, F.; Rubin, B.; Serreqi, A. N.; Gupta, A. K. A Structural Basis for the Chiral Preferences of Lipases. *Journal of the American Chemical Society*, 116, (8), 3180-3186, **1994**.
48. Hasan, F.; Shah, A. A.; Hameed, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, (2), 235-251, **2006**.
49. Moreira, M. A.; Bittencourt, T. B.; Nascimento, M. G. Optimization of chemo-enzymatic epoxidation of ciclohexene

- mediated by lipases. *Synthetic Communications*, 35, (15), 2107-2114, **2005**.
50. Yadav, G. D.; Devendran, S. Lipase catalyzed kinetic resolution of ( $\pm$ )-1-(1-naphthyl) ethanol under microwave irradiation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 81, 58-65, **2012**.
  51. Netto, C. G. C. M.; Andrade, L. H.; Toma, H. E. Enantioselective transesterification catalysis by *Candida antarctica* lipase immobilized on superparamagnetic nanoparticles. *Tetrahedron: Asymmetry*, 20, (19), 2299-2304, **2009**.
  52. Bagatin, O.; Simplício, F. I.; Santin, S. M. O.; Filho, O. S. Rotação de luz polarizada por moléculas quirais: uma abordagem histórica com proposta de trabalho em sala de aula. *Química Nova na Escola*, 21, 34-38, **2005**.
  53. Mc Murry, J. *Química Orgânica*. 1ª Ed. Pioneira Thomson Learning: São Paulo. **2006**.
  54. Prelog, V. *Nobel Lectures in Chemistry (1971-1980)*. 1ª Ed. World Scientific Publishing: Singapore. **1994**.
  55. Lima, V. L. E. Os fármacos e a quiralidade: uma breve abordagem. *Química Nova*, 20, (6), 657-663, **1997**.
  56. Pilli, R. A. Catálise assimétrica e o prémio nobel de química de 2001. Novos paradigmas e aplicações práticas. *Química Nova na Escola*, 14, 16-25, **2001**.
  57. Nguyen, L. A.; He, H.; Pham-Huy, C. Chiral drugs. An overview. *International Journal of Biomedical Science*, 2, (2), 85-100, **2006**.
  58. Coelho, F. A. S. Fármacos e quiralidade. *Química Nova na Escola*, 3, 23-32, **2001**.
  59. Gotor-Fernández, V.; Brieva, R.; Gotor, V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 40, (3-4), 111-120, **2006**.
  60. Fumio, T. *Enantiomer Separation fundamentals and practical methods*. 1ª Ed. Kluwer Academic Publishers: Netherlands. **2004**.
  61. Haeffner, F.; Norin, T.; Hult, K. Molecular modeling of the enantioselectivity in lipase-catalyzed transesterification

- reactions. *Biophys Journal*, 74, (3), 1251-62, **1998**.
62. Chen, C. S.; Fujimoto, Y.; Girdaukas, G.; Sih, C. J. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *Journal of the American Chemical Society*, 104, (25), 7294-7299, **1982**.
63. Holmberg, P.; Karlsson, J.; Gogoll, A. Enzymatic kinetic resolution of 1-(3-furyl)-3-buten-1-ol. *Tetrahedron: Asymmetry*, 16, (14), 2397-2399, **2005**.
64. Magnan, E. Immobilization of lipase on a ceramic membrane: activity and stability. *Journal of Membrane Science*, 241, (1), 161-166, **2004**.
65. Mendes, A. A.; Oliveira, P. C.; Castro, H. F.; Giordano, R. I. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Química Nova*, 34, (5), 831-840, **2001**.
66. Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, (6), 1451-1463, **2007**.
67. Boscolo, B.; Trotta, F.; Ghibaudi, E. High catalytic performances of *Pseudomonas fluorescens* lipase adsorbed on a new type of cyclodextrin-based nanosponges. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62, (2), 155-161, **2010**.
68. Villeneuve, P.; Muderhwa, J. M.; Graille, J.; Haas, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 9, (4-6), 113-148, **2000**.
69. Gonçalves, R. A. C.; Oliveira, A. J. B.; Gonçalves, J. E. *Biocatálise e Biotransformação Vol 2*. 1ª Ed. Schoba: São Paulo. **2012**.
70. Clark, A. H.; Ross-Murphy, S. B. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Advances in Polymer Science*, 83, 107-115, **1987**.
71. Bobbio, F. O.; Bobbio, P. A. *Introdução a Química de Alimentos*. 1ª Ed. Fundação Cargill: Campinas. **1985**.
72. Araújo, W. M. C.; Montebello, N. P.; Botelho, R. B. A.; Borgo,

- L. A. *Alquímica química*. 1ª Ed. Senac: Brasília. **2009**.
73. Wrigley, C.; H., C.; Walker, C. *Encyclopedia of Grain Science*. 1ª Ed. Academic Press: Sydney. **2004**.
74. <http://bernardao.com.br/index.php/cara-kg.html>. Acessado em 19 de junho de **2012**.
75. [http://www.blancodesigns.com.br/desenhos\\_riscos-alimentos2.htm](http://www.blancodesigns.com.br/desenhos_riscos-alimentos2.htm). Acessado em 19 de junho de **2012**.
76. [http://pt.wikibooks.org/wiki/Mandioca/A\\_Planta](http://pt.wikibooks.org/wiki/Mandioca/A_Planta). Acessado em 19 de junho de **2012**.
77. <http://www.clictribuna.com.br/noticias/batata-forca-alta-da-cesta-basica-em-cachoeirinha/>. Acessado em 19 de junho de **2012**.
78. <http://www.hippo.com.br/hortifrutigranjeiros/batata-salsa.html>. Acessado em 19 de junho de **2012**.
79. <http://www.soniahirsch.com/2009/05/inhame-cru-tem-acido-oxalico-mas-nem.html>. Acessado em 19 de junho de **2012**.
80. <http://sbfgnosia.org.br/Ensino/amido.html>. Acessado em 19 de junho de **2012**.
81. Corradini, E.; Lotti, C.; Medeiros, E. S. d.; Carvalho, A. J. F.; Curvelo, A. A. S.; Mattoso, L. H. C. Estudo comparativo de amidos termoplásticos derivados do milho com diferentes teores de amilose. *Polímeros*, 15, (4), **2005**.
82. Silva, W. A. d.; Pereira, J.; Carvalho, C. W. P. d.; Ferrua, F. Q. Determinação da cor, imagem superficial topográfica e ângulo de contato de biofilmes de diferentes fontes de amido. *Ciência e Agrotecnologia*, 31, (1), 154-163, **2007**.
83. <http://www.abam.com.br/revista/revista7/riquezas.php>. Acessado em 19 de junho de **2012**.
84. Ellis, R. P.; Cochrane, M. P.; Dale, M. F. B.; Duffus, C. M.; Lynn, A.; Morrison, I. M.; Prentice, R. D. M.; Swanston, J. S.; Tiller, S. A. Starch production and industrial use. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, (3), 289-311, **1998**.
85. Shimazu, A. A.; Mali, S.; Grossmann, V. E. Efeitos plastificante e antiplastificante do glicerol e do sorbitol em filmes biodegradáveis de amido de mandioca. *Semina: Ciências*

- Agrárias*, 28, (1), 79-88, **2007**.
86. Talja, R. A.; Helén, H.; Roos, Y. H.; Jouppila, K. Effect of various polyols and polyol contents on physical and mechanical properties of potato starch-based films. *Carbohydrate Polymers*, 67, (3), 288-295, **2007**.
87. Matto, M.; Husain, Q. Calcium alginate–starch hybrid support for both surface immobilization and entrapment of bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57, (1-4), 164-170, **2009**.
88. Kumar, R.; Choudhary, V.; Mishra, S.; Varma, I. K.; Mattiason, B. Adhesives and plastics based on soy protein products. *Industrial Crops and Products*, 16, (3), 155-172, **2002**.
89. Cassini, A. S.; Tessaro, I. C.; Marczak, L. D. F.; Pertile, C. Ultrafiltration of wastewater from isolated soy protein production: A comparison of three UF membranes. *Journal of Cleaner Production*, 18, (3), 260-265, **2010**.
90. Pires Vilela, J. A.; Cavallieri, Â. L. F.; Lopes da Cunha, R. The influence of gelation rate on the physical properties/structure of salt-induced gels of soy protein isolate–gellan gum. *Food Hydrocolloids*, 25, (7), 1710-1718, **2011**.
91. Canevarolo, S. V. *Técnicas de Caracterização de Polímeros*. 1ª Ed. Artliber: São Paulo. **2004**.
92. Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. *Fundamentos de cromatografia*. 1ª Ed. Unicamp: Campinas. **2006**.
93. Biwer, A.; Antranikian, G.; Heinzle, E. Enzymatic production of cyclodextrins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, (6), 609-617, **2002**.
94. Szejtli, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews*, 98, (5), 1743-1753, **1998**.
95. Machida, Y.; Nishi, H.; Nakamura, K.; Nakai, H.; Sato, T. Enantiomer separation of amino compounds by a novel chiral stationary phase derived from crown ether. *Journal of Chromatography A*, 805, (1-2), 85-92, **1998**.
96. Venturini, C. G.; Nicolini, J.; Machado, C.; Machado, V. G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. *Química Nova*, 31, (2), 360-368, **2008**.

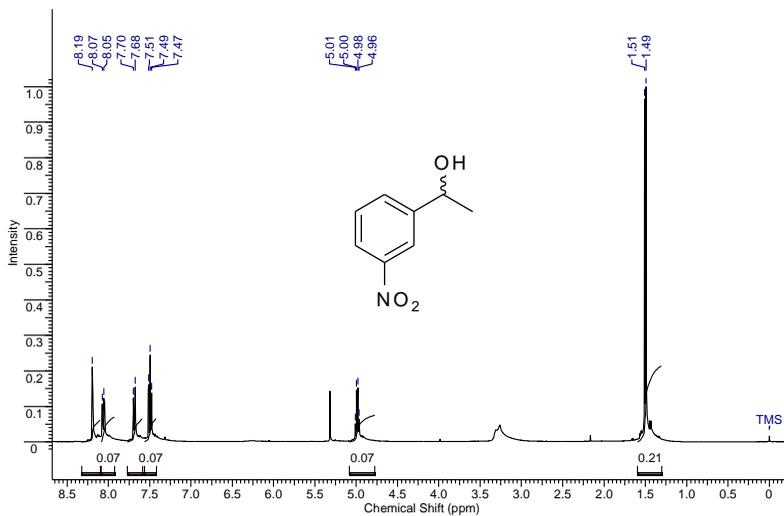
97. Cho, B. T.; Kang, S. K.; Kim, M. S.; Ryu, S. R.; An, D. K. Solvent-free reduction of aldehydes and ketones using solid acid-activated sodium borohydride. *Tetrahedron*, 62, (34), 8164-8168, **2006**.
98. Zeynizadeh, B.; Behyar, T. Fast and efficient method for reduction of carbonyl compounds with NaBH<sub>4</sub> /wet SiO<sub>2</sub> under solvent free condition. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16, (6a), 1200-1209, **2005**.
99. Hoffmann, I.; Silva, V. D.; Nascimento, M. G. Enantioselective resolution of (R,S)-1-phenylethanol catalyzed by lipases immobilized in starch films. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22, (8), 1559-1567, **2011**.
100. Wang, S. M.; Huang, A. H. C. Inhibitors of Lipase Activities in Soybean and Other Oil Seeds. *Plant Physiology*, 76, (4), 929-934, **1984**.
101. Wen, S.; Tan, T.; Yu, M. Immobilized lipase YILip2-catalyzed resolution of (±)α-phenylethyl amine in a medium with organic cosolvent. *Process Biochemistry*, 43, (11), 1259-1264, **2008**.
102. Habulin, M.; Knez, Ž. Optimization of (R,S)-1-phenylethanol kinetic resolution over *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58, (1-4), 24-28, **2009**.
103. Akcelrud, L. Fundamentos da Ciência dos Polímeros. *Manole*, 1ª Ed, (São Paulo), **2007**.
104. Wang, J.-Y.; Ma, C.-L.; Bao, Y.-M.; Xu, P.-S. Lipase entrapment in protamine-induced bio-zirconia particles: Characterization and application to the resolution of (R,S)-1-phenylethanol. *Enzyme and Microbial Technology*, 51, (1), 40-46, **2012**.
105. Li, L.; Feng, W.; Pan, K. Immobilization of lipase on amino-cyclodextrin functionalized carbon nanotubes for enzymatic catalysis at the ionic liquid–organic solvent interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 124-129, **2013**.
106. Andrade, L. H.; Rebelo, L. P.; Netto, C. G. C. M.; Toma, H. E. Kinetic resolution of a drug precursor by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized by different methodologies on superparamagnetic nanoparticles. *Journal of Molecular*

- Catalysis B: Enzymatic*, 66, (1-2), 55-62, **2010**.
107. Pilissão, C.; Carvalho, P. O.; Nascimento, M. G. Potential application of native lipases in the resolution of (RS) - phenylethylamine. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21, (6), 973-977, **2010**.
108. Sharif Mohammed Shafioul, A.; Cheong, C. S. Lipase catalyzed kinetic resolution of rac-2-phenylpropan-1-ol derivatives as building block for phenolic sesquiterpenes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 74, (3-4), 199-203, **2012**.
109. Pleiss, J.; Fischer, M.; Schmid, R. D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chemistry and Physics of Lipids*, 93, (1-2), 67-80, **1998**.
110. Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veeger, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnology and Bioengineering*, 30, (1), 81-87, **1987**.
111. Sangster, J. Octanol-Water Partition Coefficients of Simple Organic Compounds. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 18, (3), 1111, **1989**.
112. Paravidino, M.; Sorgedraeger, M. J.; Orru, R. V. A.; Hanefeld, U. Activity and Enantioselectivity of the Hydroxynitrile Lyase MeHNL in Dry Organic Solvents. *Chemistry - A European Journal*, 16, (25), 7596-7604, **2010**.
113. Xue, P.; Yan, X. H.; Wang, Z. Lipase immobilized on HOOC-MCF: A highly enantioselective catalyst for transesterification resolution of (R,S)-1-phenylethanol. *Chinese Chemical Letters*, 18, (8), 929-932, **2007**.
114. Hoffmann, I. *Imobilização de Lipases em Filmes de Amido: Preparação de Ésteres de Aroma Derivados do Geraniol e Resolução Enzimática do (R,S)-1-Feniletanol*, Dissertação de Mestrado- UFSC. **2010**.

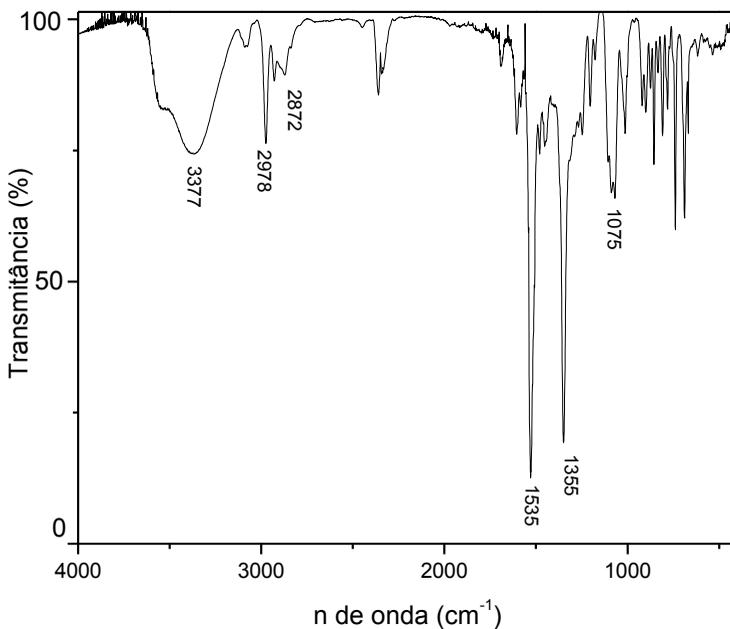
## ANEXOS I

<b>Figura 28</b> - Espectro de RMN- <sup>1</sup> H do ( <i>R,S</i> )-3-nitro-1-feniletanol ( <b>15b</b> ) [400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ]	<b>103</b>
<b>Figura 29</b> - Espectro de IV do ( <i>R,S</i> )-3-nitro-1-feniletanol ( <b>15b</b> ) [pastilha]	<b>103</b>
<b>Figura 30</b> - Espectro de RMN- <sup>1</sup> H do ( <i>R,S</i> )-3,4-metilenodioxo-1-feniletanol ( <b>16b</b> ) [400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ]	<b>104</b>
<b>Figura 31</b> - Espectro de IV do ( <i>R,S</i> )-3,4-metilenodioxo-1-feniletanol ( <b>16b</b> ) [pastilha]	<b>104</b>
<b>Figura 32</b> - Espectro de RMN- <sup>1</sup> H do ( <i>R,S</i> )-4-nitro-1-feniletanol ( <b>17b</b> ) [400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ]	<b>105</b>
<b>Figura 33</b> - Espectro de IV do ( <i>R,S</i> )-4-nitro-1-feniletanol ( <b>17b</b> ) [pastilha]	<b>105</b>
<b>Figura 34</b> - Espectro de RMN- <sup>1</sup> H do ( <i>R,S</i> )-4-metil-1-feniletanol ( <b>18b</b> ) [200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ]	<b>106</b>
<b>Figura 35</b> - Espectro de IV do ( <i>R,S</i> )-4-metil-1-feniletanol ( <b>18b</b> ) [pastilha]	<b>106</b>
<b>Figura 36</b> - Espectro de RMN- <sup>1</sup> H do ( <i>R,S</i> )-4-Br-1-feniletanol ( <b>19b</b> ) [200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ]	<b>107</b>
<b>Figura 37</b> - Espectro de IV do ( <i>R,S</i> )-4-Br-1-feniletanol ( <b>19b</b> ) [pastilha]	<b>107</b>
<b>Figura 38</b> - Espectro de RMN- <sup>1</sup> H do ( <i>R,S</i> )-4-métoxi-1-feniletanol ( <b>20b</b> ) [400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ]	<b>108</b>
<b>Figura 39</b> - Espectro de IV do ( <i>R,S</i> )-4-métoxi-1-feniletanol ( <b>20b</b> ) [pastilha]	<b>108</b>
<b>Figura 40</b> - Espectro de RMN- <sup>1</sup> H do ( <i>R,S</i> )-acetato-3-nitro-1-feniletala ( <b>15c</b> ) [200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ]	<b>109</b>
<b>Figura 41</b> - Espectro de IV do ( <i>R,S</i> )-acetato-3-nitro-1-feniletala ( <b>15c</b> ) [pastilha]	<b>109</b>
<b>Figura 42</b> - Espectro de RMN- <sup>1</sup> H do ( <i>R,S</i> )-acetato-3,4-metilenodioxo-1-feniletala ( <b>16c</b> ) [200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ]	<b>110</b>
<b>Figura 43</b> - Espectro de IV do ( <i>R,S</i> )-acetato-3,4-metilenodioxo-1-feniletala ( <b>16c</b> ) [pastilha]	<b>110</b>
<b>Figura 44</b> - Espectro de RMN- <sup>1</sup> H do ( <i>R,S</i> )-acetato-4-nitro-1-feniletala ( <b>17c</b> ) [200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ]	<b>111</b>

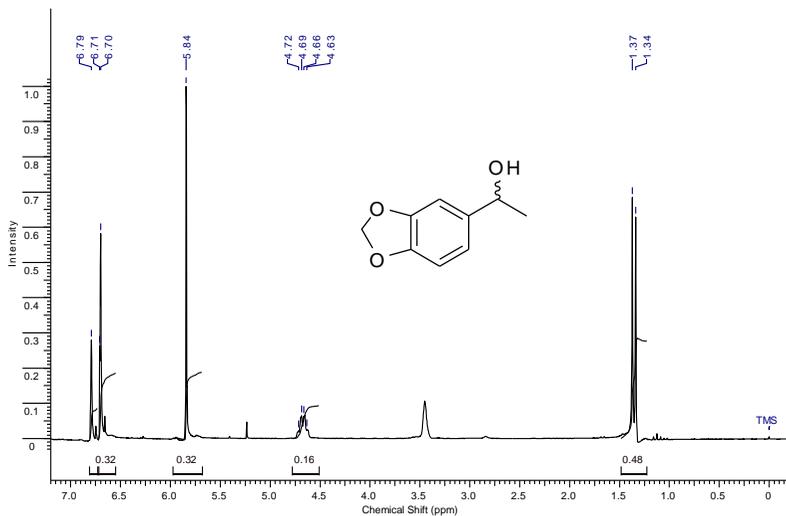
<b>Figura 45</b> - Espectro de IV do ( <i>R,S</i> )-acetato-4-nitro-1-feniletila ( <b>17c</b> ) [pastilha].....	<b>111</b>
<b>Figura 46</b> - Espectro de RMN- <sup>1</sup> H do ( <i>R,S</i> )-acetato-4-metil-1-feniletila ( <b>20c</b> ) [400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ].....	<b>112</b>
<b>Figura 47</b> - Espectro de IV do ( <i>R,S</i> )-acetato-4-metil-1-feniletila ( <b>18c</b> ) [pastilha].....	<b>112</b>
<b>Figura 48</b> - Espectro de RMN- <sup>1</sup> H do ( <i>R,S</i> )-acetato-4-Br-1-feniletila ( <b>19c</b> ) [400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ].....	<b>113</b>
<b>Figura 49</b> - Espectro de IV do ( <i>R,S</i> )-acetato-4-Br-1-feniletila ( <b>19c</b> ) [pastilha].....	<b>113</b>
<b>Figura 50</b> - Espectro de RMN- <sup>1</sup> H do ( <i>R,S</i> )-acetato-4-métoxi-1-feniletila ( <b>20c</b> ) [200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ].....	<b>114</b>
<b>Figura 51</b> - Espectro de IV do ( <i>R,S</i> )-acetato-4-métoxi-1-feniletila ( <b>20c</b> ) [pastilha].....	<b>114</b>
<b>Figura 52</b> - Exemplo de um gráfico da conversão (%) e <i>ee<sub>p</sub></i> pela razão molar de <b>15b</b> /acetato de vinila, com a LBC imobilizada em filme de amido/PEO.....	<b>115</b>



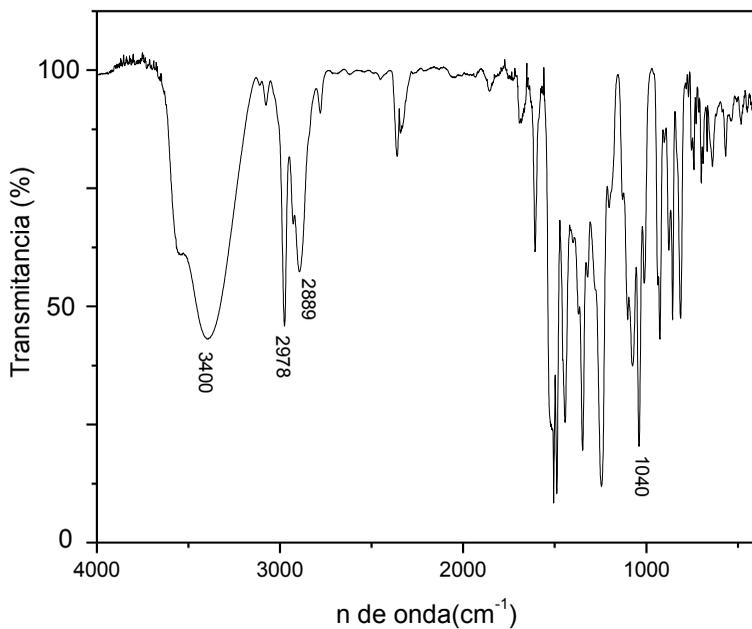
**Figura 28** - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do *(R,S)*-3-nitro-1-feniletanol (**15b**) [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>].



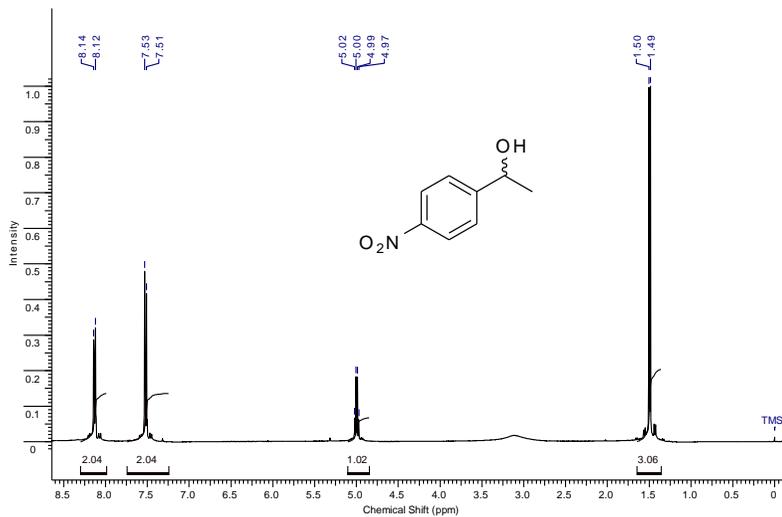
**Figura 29** - Espectro de IV do *(R,S)*-3-nitro-1-feniletanol (**15b**) [pastilha].



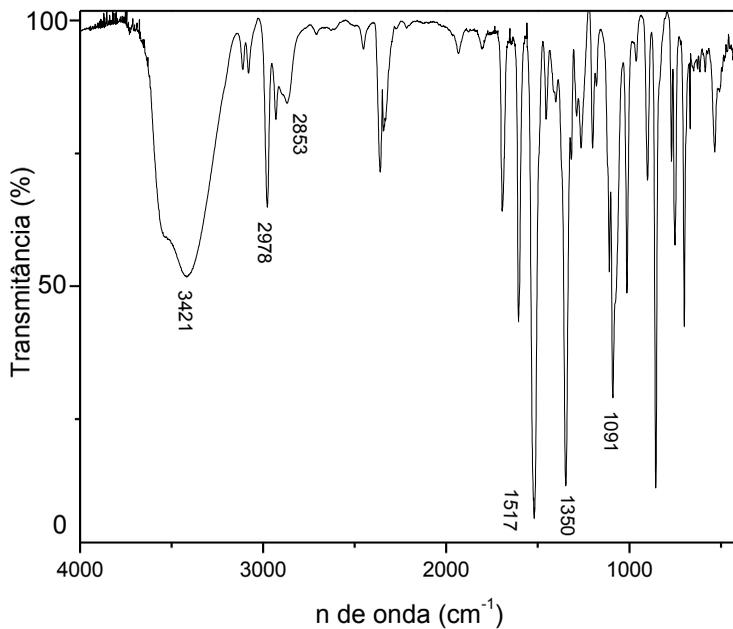
**Figura 30** - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do (*R,S*)-3,4-metilenodioxo-1-feniletanol (**16b**) [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>].



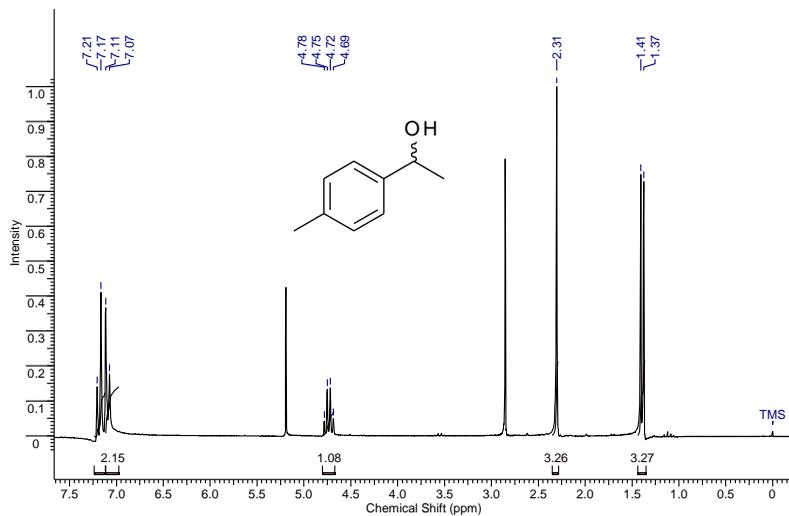
**Figura 31** - Espectro de IV do (*R,S*)-3,4-metilenodioxo-1-feniletanol (**16b**) [pastilha].



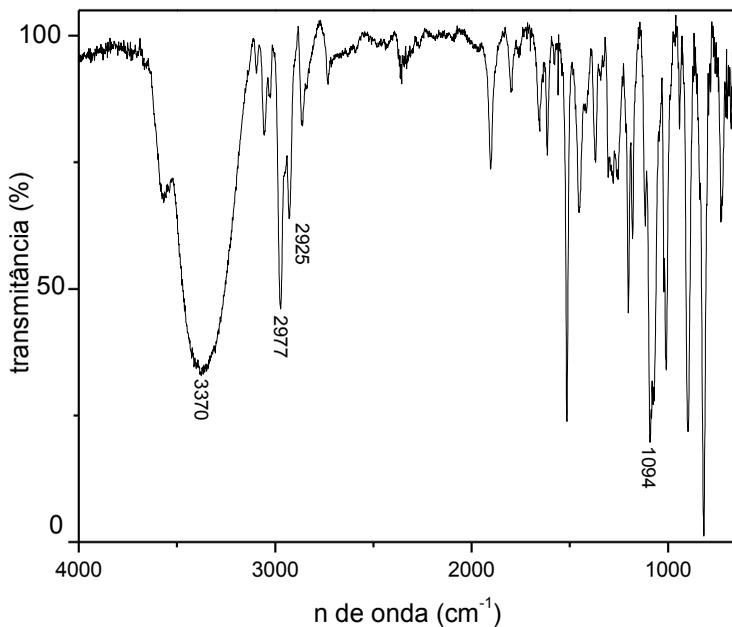
**Figura 32** - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do *(R,S)*-4-nitro-1-feniletanol (**17b**) [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>].



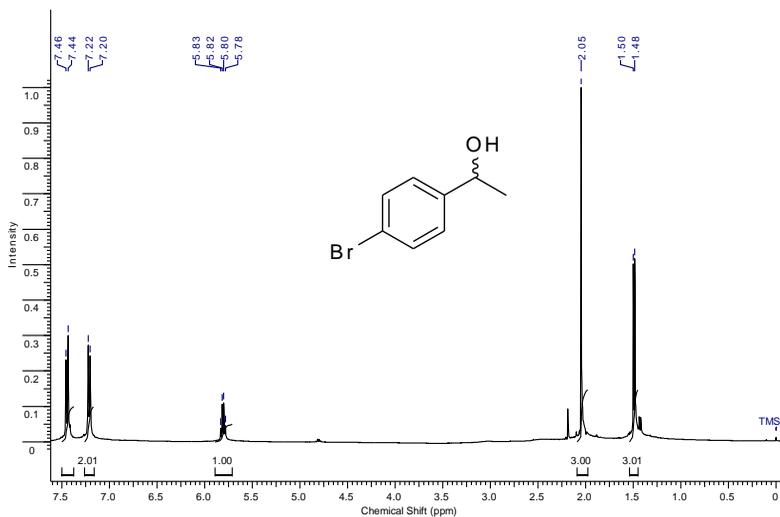
**Figura 33** - Espectro de IV do *(R,S)*-4-nitro-1-feniletanol (**17b**) [pastilha].



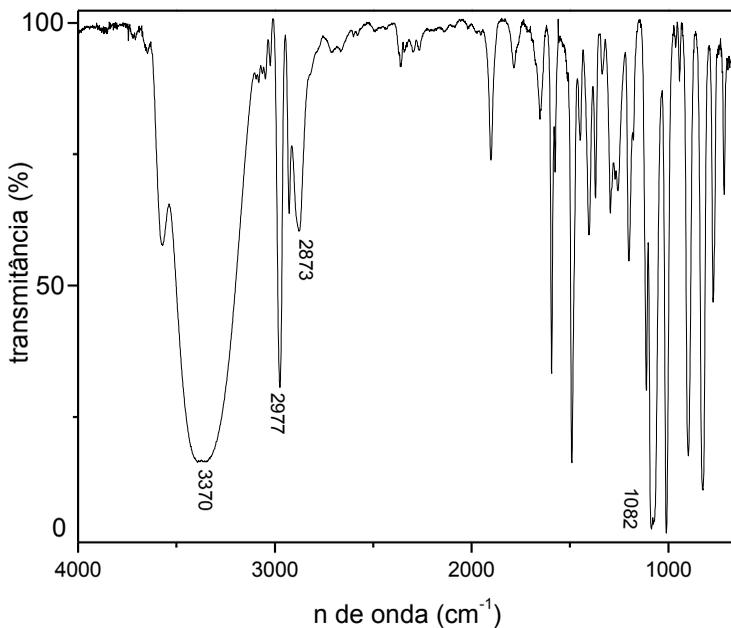
**Figura 34** - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do *(R,S)*-4-metil-1-feniletanol (**18b**) [200 MHz, CDCl<sub>3</sub>].



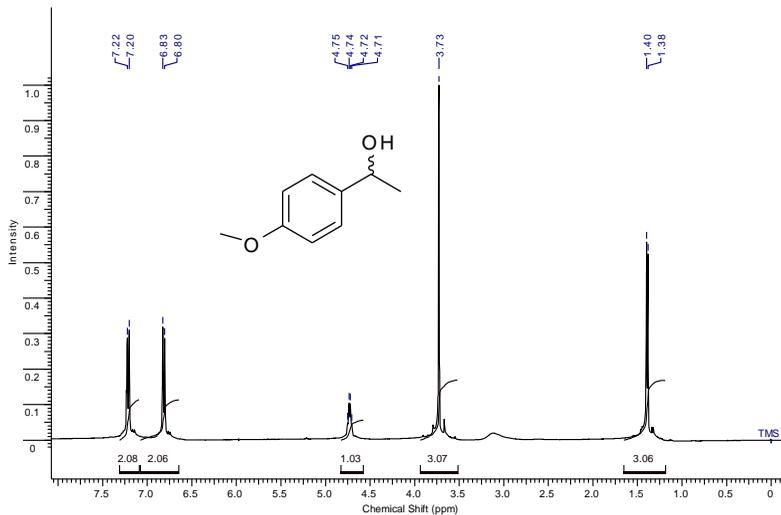
**Figura 35** - Espectro de IV do *(R,S)*-4-metil-1-feniletanol (**18b**) [pastilha].



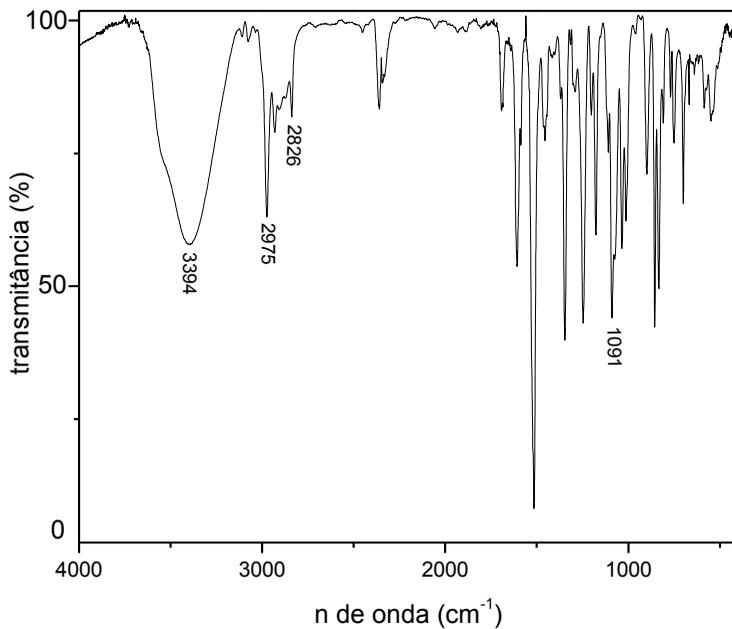
**Figura 36** - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do *(R,S)*-4-Br-1-feniletanol (**19b**) [200 MHz, CDCl<sub>3</sub>].



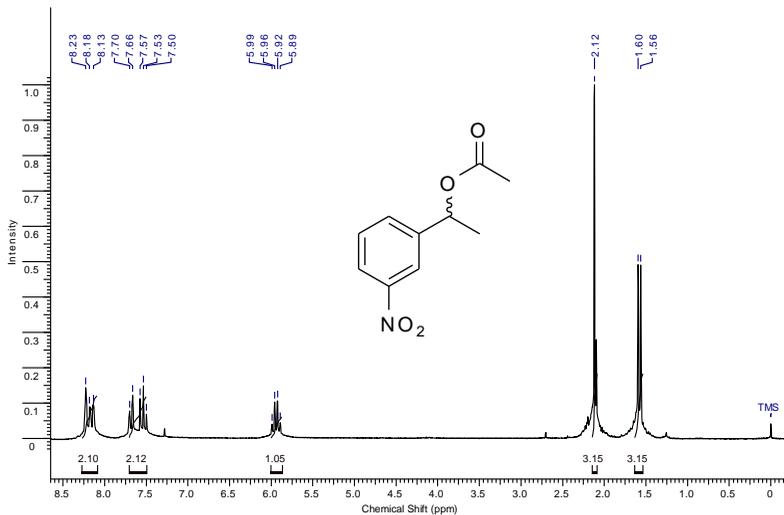
**Figura 37** - Espectro de IV do *(R,S)*-4-Br-1-feniletanol (**19b**) [pastilha].



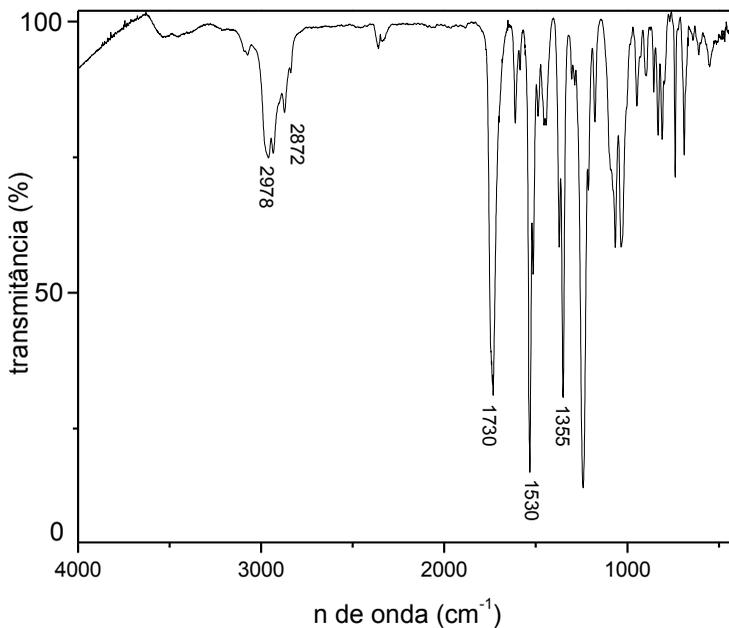
**Figura 38** - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do *(R,S)*-4-métoxi-1-feniletanol (**20b**) [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>].



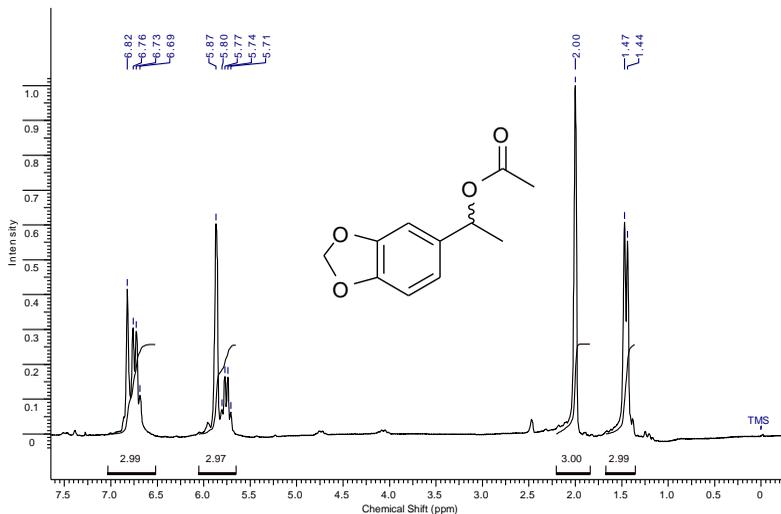
**Figura 39** - Espectro de IV do *(R,S)*-4-métoxi-1-feniletanol (**20b**) [pastilha].



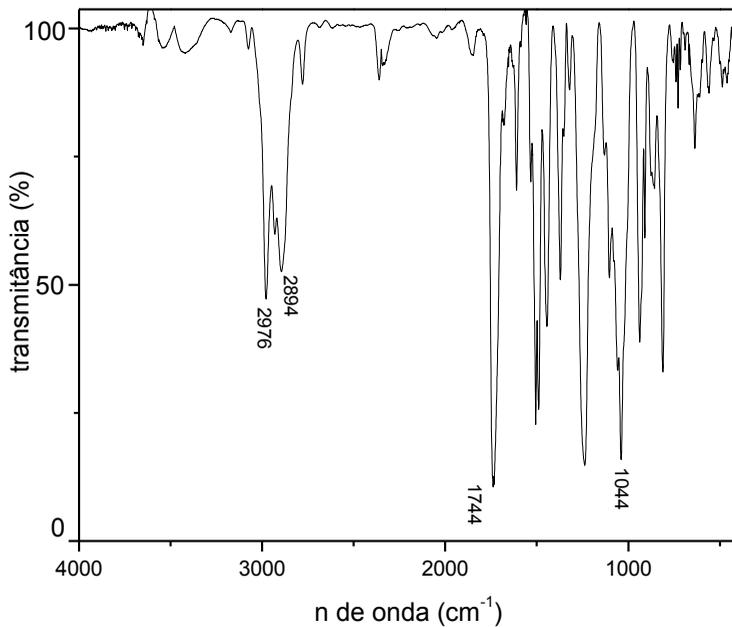
**Figura 40** - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do *(R,S)*-acetato-3-nitro-1-feniletila (**15c**) [200 MHz, CDCl<sub>3</sub>].



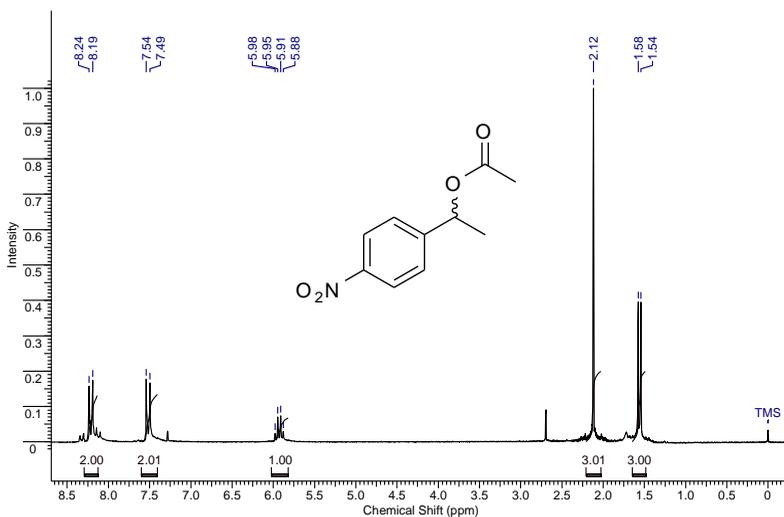
**Figura 41** - Espectro de IV do *(R,S)*-acetato-3-nitro-1-feniletila (**15c**) [pastilha].



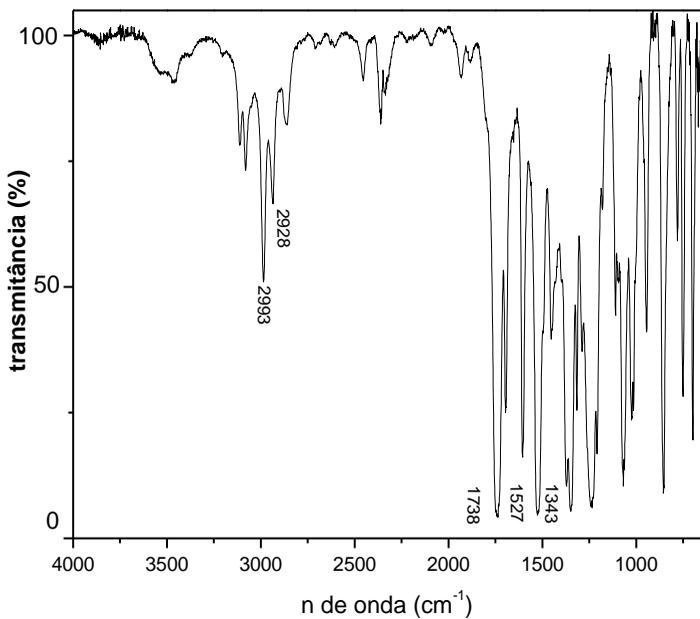
**Figura 42** - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do (*R,S*)-acetato-3,4-metilenodioxi-1-feniletila (**16c**) [200 MHz, CDCl<sub>3</sub>].



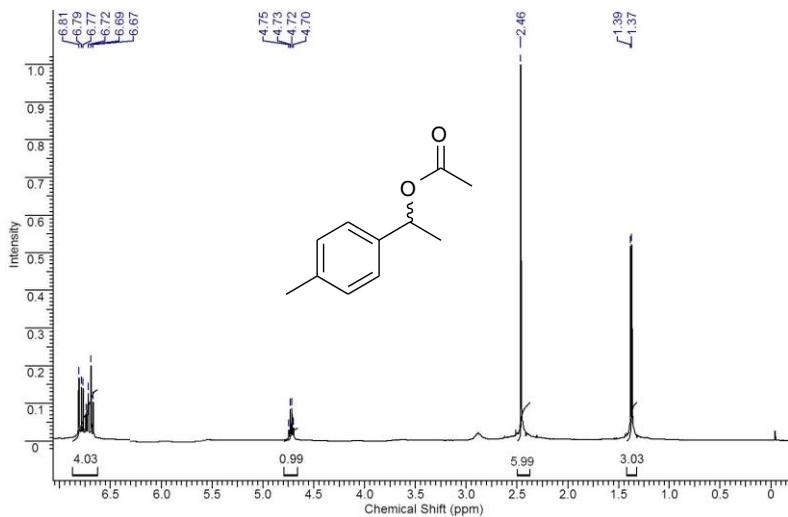
**Figura 43** - Espectro de IV do (*R,S*)-acetato-3,4-metilenodioxi-1-feniletila (**16c**) [pastilha].



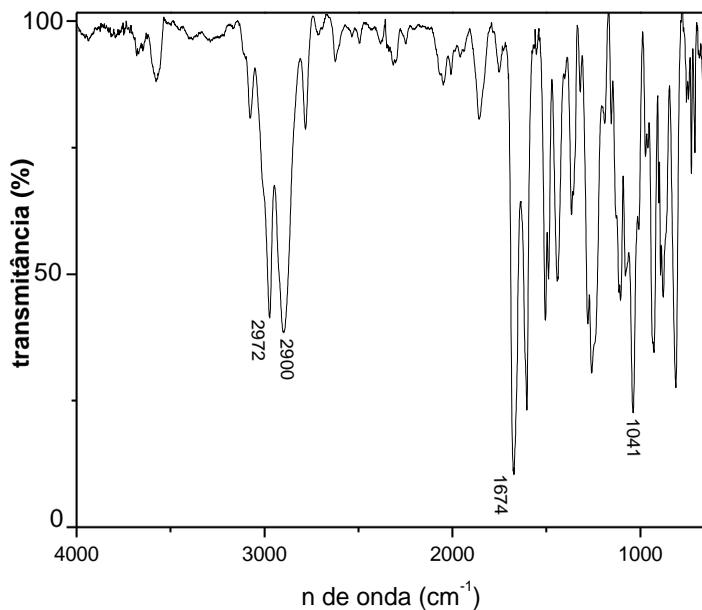
**Figura 44** - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do *(R,S)*-acetato-4-nitro-1-feniletila (17c) [200 MHz, CDCl<sub>3</sub>].



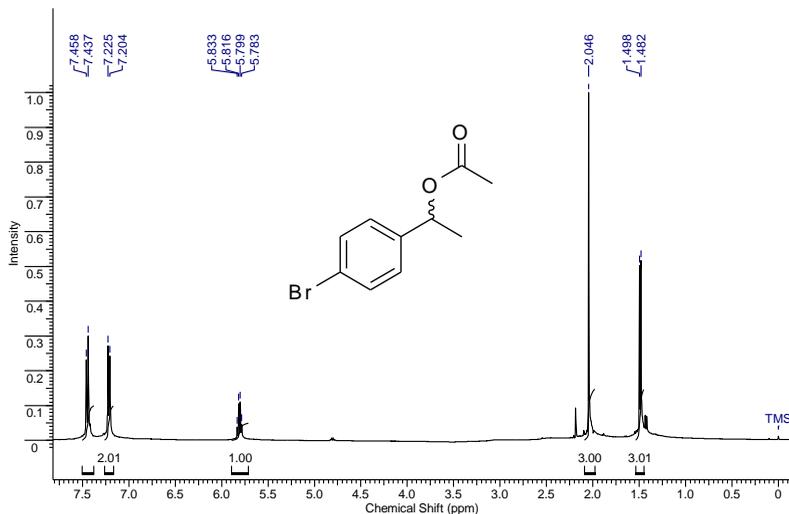
**Figura 45** - Espectro de IV do *(R,S)*-acetato-4-nitro-1-feniletila (17c) [pastilha].



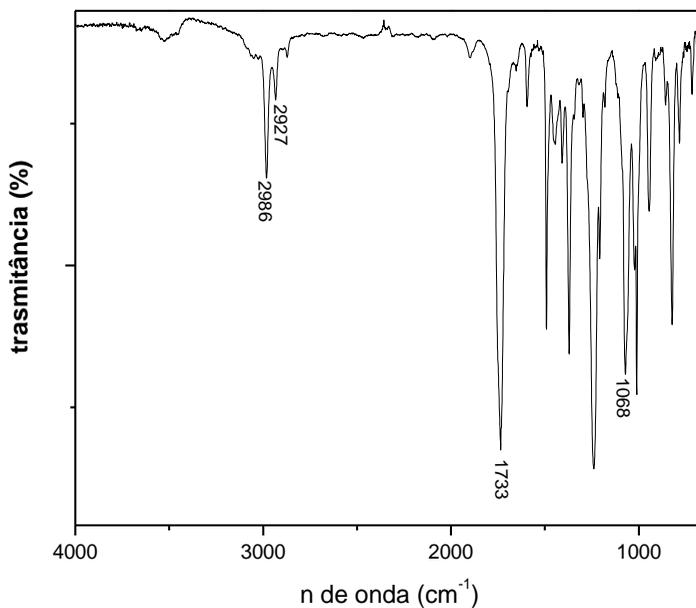
**Figura 46** - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do *(R,S)*-acetato-4-metil-1-feniletila (**20c**) [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>].



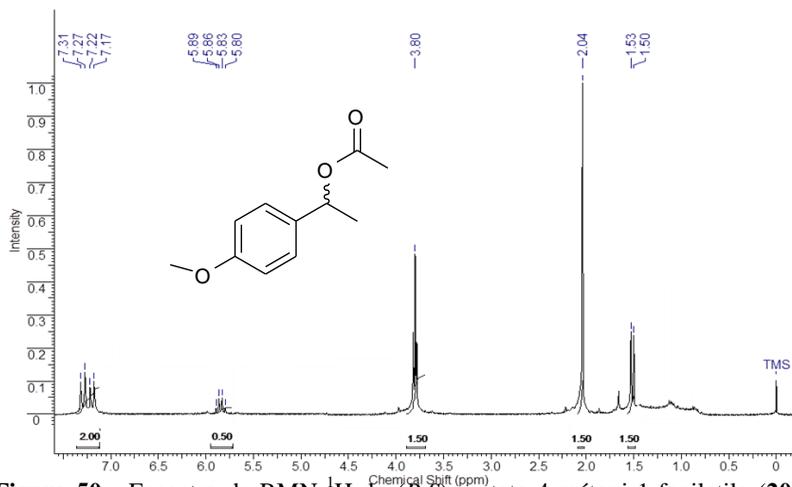
**Figura 47** - Espectro de IV do *(R,S)*-acetato-4-metil-1-feniletila (**18c**) [pastilha].



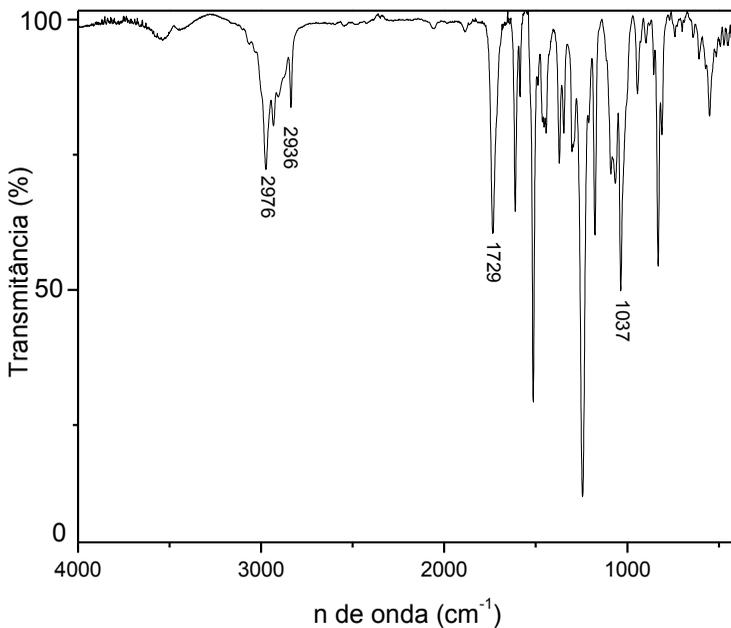
**Figura 48** - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do *(R,S)*-acetato-4-Br-1-feniletila (**19c**) [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>].



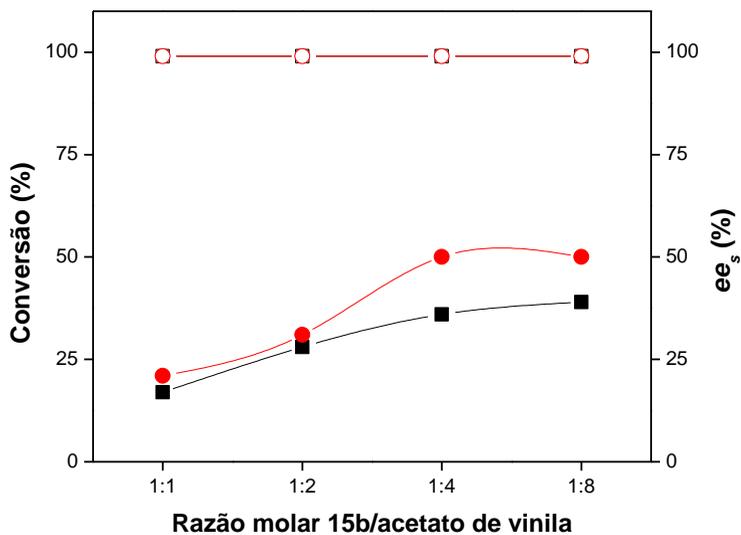
**Figura 49** - Espectro de IV do *(R,S)*-acetato-4-Br-1-feniletila (**19c**) [pastilha].



**Figura 50** - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do *(R,S)*-acetato-4-métoxi-1-feniletila (**20c**) [200 MHz, CDCl<sub>3</sub>].



**Figura 51** - Espectro de IV do *(R,S)*-acetato-4-métoxi-1-feniletila (**20c**) [pastilha].



**Figura 52** - Exemplo de um gráfico da conversão (%) e  $ee_p$  pela razão molar de **15b**/acetato de vinila, com a LBC imobilizada em filme de amido/PEO.