

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

Cristiane Pilissão

**Aminólise enantiosseletiva do (*R,S*)-mandelato de metila e
síntese do acetato de geranoíla mediada por lipases**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Química, da Universidade Federal de Santa Catarina,
para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento

Florianópolis, fevereiro de 2006.

A toda minha família pelo amor e apoio
que deles recebi. Em especial a minha
mãe Leoni Maria Pilissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido a vida.

A meu namorado Rodrigo pela compreensão, carinho e amor em todos os momentos e principalmente pela sua paciência.

Especialmente, a professora Maria da Graça Nascimento por sua orientação, amizade, dedicação e por ter me acolhido carinhosamente.

Ao Departamento de Química da UFSC, e em especial a Graça e ao Jadir da Secretaria de Pós-Graduação por serem sempre tão prestativos e atenciosos.

A CAPES e CNPq pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

A Central de Análises do Departamento de Química da UFSC pelos serviços prestados.

A Novozymes Latin American e Amano Pharmaceutical CO pela doação das diversas lipases.

A Profa. Patrícia de Oliveira Carvalho (USF-Brag.Paulista) pela doação da lipase de *Aspergillus niger*.

Ao Prof. Jairton Dupont e ao doutorando Alexandre (IQ-UFRGS) por terem me recebido em seu laboratório para a preparação dos líquidos iônicos e pela sua doação.

A todos os professores que contribuíram até agora para a minha formação.

Aos colegas de laboratório Alexandre, Aline, Damianni, Fernanda, Marcelo, Maria Alice, Patrícia, Thiago, Tiago Augustinho e Vanessa pelo companheirismo, amizade, risadas, cafés, apoio e por terem me ensinado tantas coisas boas.

Aos grandes amigos que tiveram presença marcada nos bons momentos e também nos mais difíceis. Vocês com certeza estarão no meu coração

A todos amigos conquistados durante toda a minha carreira acadêmica.

Enfim, a todas pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho se concretizasse.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	III
SUMÁRIO.....	IV
LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABELAS	XI
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	XII
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XV
1 Introdução.....	1
1.1 Enzimas.....	1
1.2 Lipases.....	6
1.3 Estereosseletividade das enzimas.....	9
1.4 Resolução enzimática.....	11
1.5 Métodos analíticos para a determinação da pureza enantiomérica.....	12
1.5.1 Método polarimétrico.....	13
1.5.2 Cromatografia gasosa quiral	14
1.5.3 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	15
1.5.4 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio.....	16
1.6 Imobilização de enzimas.....	17
1.6.1 poli-(óxido de etileno) (PEO).....	20
1.7 Aplicações de enzimas.....	22
1.8 Líquidos iônicos na biocatálise.....	29
1.8.1 Aplicações dos líquidos iônicos na biocatálise.....	31
2 Objetivos.....	35
2.1 Objetivo geral.....	35
2.2 Objetivos específicos.....	35
3 Parte experimental.....	37
3.1 Materiais.....	37

3.2	Caracterização dos compostos.....	38
3.2.1	Espectrofotometria no infravermelho.....	38
3.2.2	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono.....	38
3.2.3	Cromatografia gasosa com fase quiral.....	38
3.3	Preparação das lipases imobilizadas.....	40
3.3.1	Imobilização de lipases em filmes de PEO.....	40
3.4	Preparação de líquidos iônicos.....	41
3.4.1	Preparação do butil metanosulfonato (CH ₃ SO ₃ Bu).....	41
3.4.2	Preparação do 1-butil-3-metil-imidazol metanosulfonato.....	42
3.4.3	Preparação do 1-butil-3-metil imidazol tetrafluorborato [BMIm][BF ₄].....	42
3.4.4	Preparação do 1-butil-3-metil imidazol hexafluorofosfato [BMIm][PF ₆].....	43
3.5	Síntese não enzimática dos reagentes racêmicos e padrões quirais.....	44
3.5.1	Preparação do (<i>R,S</i>)-mandelato de metila (17).....	44
3.5.2	Preparação do (<i>R,S</i>)- <i>N</i> -butil-2-hidróxi-2-fenilacetamida (22).....	45
3.6	Síntese via enzimática.....	46
3.6.1	Síntese de amidas derivadas do (<i>R,S</i>)-mandelato de metila (17) usando solventes orgânicos convencionais e líquidos iônicos.....	46
3.6.2	Síntese do acetato de geranoíla usando lipases.....	50
4	Resultados e Discussão.....	52
4.1	Avaliação de lipases de diferentes fontes.....	58
4.2	Efeito do solvente e temperatura	59
4.3	Efeito da variação da massa de CAL-B.....	68
4.4	Efeito de líquidos iônicos	70
4.5	Esterificação do geraniol utilizando lipases imobilizadas.....	76
5	Conclusões.....	79
6	Perspectivas.....	81
7	Referências Bibliográficas.....	82
8	Produção Científica 2004-2006.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Asp	ácido aspártico
CAL	lipase de <i>Candida antarctica</i>
CAL-B	lipase de <i>Candida antarctica</i> B
ccd	cromatografia de camada delgada
CDCl ₃	clorofórmico deuterado
CDAs	agentes derivatizantes quirais
c (%)	porcentagem de conversão
CG	cromatografia gasosa
CGQ	cromatografia gasosa com fase quiral
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
d	dublete
dd	duplo dublete
det.	detector
DMSO	dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	dimetilsulfóxido deuterado
DNA	ácido desoxirribonucleico
E	razão enantiomérica
E.C.3.1.1.3	classificação das lipases segundo UIBBM
ee _p	excesso enantiomérico do produto
ee _s	excesso enantiomérico do substrato
Fid	detector por ionização de chama
Glu	ácido glutâmico

His	histidina
Inj.	injetor
J	constante de acoplamento (Hz)
Hz	Hertz
IV	espectrofotometria no infra-vermelho
kDa	10 ³ Daltons
log P	logaritmo do coeficiente de partição
LCR	lipase de <i>Candida rugosa</i>
LPS	lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>
LRM	lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>
LTL	lipase de <i>Thermomices lanuginosus</i>
LMM	lipase de <i>Mucor miehei</i>
q	quarteto
m	múltiplo
m/z	razão massa/ carga
MAG	monoacilglicerol
MHz	mega Hertz (10 ⁶ Hertz)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	poli-(etilenoglicol)
PEO	poli-(óxido de etileno)
Pf.	ponto de fusão (°C)
ppm	partes por milhão
PS-C	lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i> imobilizada em cerâmica

PS-D	lipase de <i>Pseudomona cepacia</i> immobilizada em terra diatomácea
PVA	poli (álcool vinílico)
QTS	quitosana
RMN- ¹³ C	ressonância magnética nuclear de carbono
RMN- ¹ H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RNA	ácido ribonucléico
Ser	serina
s	singleto
t	tripleto
t.a	temperatura ambiente
T _f	temperatura final
T _i	temperatura inicial
TAG	triacilglicerol
THF	tetraidrofurano
TMS	tetrametilsilano
UIBBM	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
δ	deslocamento químico (ppm)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Representações gráficas da estrutura tridimensional da lipases de <i>Penicillium sp</i> obtida por Raio-X.....	1
Figura 2	Representação esquemática do mecanismo de ação enzimática.....	5
Figura 3	Utilização relativa de enzimas em biotransformação.....	5
Figura 4	Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de <i>Candida antarctica</i> obtida por Raio-X,.....	7
Figura 5	Mecanismo da reação de aminólise de éster catalisada por lipases baseado na “tríade catalítica”.....	8
Figura 6	Enantiômeros de substâncias cujas características biológicas são função direta de sua configuração.....	10
Figura 7	Principais métodos de imobilização de enzimas.....	18
Figura 8	Representação estrutural dos líquidos iônicos e exemplos dos mais utilizados em biocatálise.....	29
Figura 9	Líquidos iônicos em sistema trifásico.....	30
Figura 10	Espectro de RMN ¹ H comparando as áreas dos hidrogênios metilênicos do álcool com os do éster (200 MHz, CDCL ₃).....	51
Figura 11	Espectro de RMN ¹ H do (S)-mandelato de metila (19), (200 MHz, CDCL ₃).....	53
Figura 12	Espectro de RMN ¹³ C do (S)-mandelato de metila (19), (200 MHz, CDCL ₃).....	54
Figura 13	Espectro de RMN ¹ H do (S)-N-butil-2-hidróxi-2-fenilacetamida (21), (200 MHz, CDCL ₃).....	55
Figura 14	Espectro de RMN ¹³ C do (S)-N-butil-2-hidróxi-2-fenilacetamida (21), (200 MHz, CDCL ₃).....	56
Figura 15	Cromatograma de (S)-N-butil-2-hidróxi-2-fenilacetamida (21) enantiomericamente pura obtida através da síntese não enzimática, por CGQ, [Condições experimentais: Inj. = 250 ^o C, Det. = 275 ^o C, programação: 80 ^o C 5 ^o C/min. 140 ^o C 3 ^o C/min. 220 ^o C, split 100:1, Pressão do H ₂ = 75Kpa].....	57
Figura 16	Variação da conversão (%c) e da razão enantiomérica (E) em função do tempo na resolução de (R,S)-mandelato de metila (17), [CAL-B (100 mg), n-hexano (25 mL), 35 ^o C].....	60

Figura 17	Variação da conversão (%c) e do excesso enantiomérico do produto (ee _p) em função do tempo na resolução de (<i>R,S</i>)-mandelato de metila (17), [CAL-B (100 mg), <i>n</i> -hexano (25 mL), 35°C].....	61
Figura 18	Cromatogramas, de uma alíquota de reação de aminólise de (<i>R,S</i>)-mandelato de metila (17) com <i>t</i> -butanol, em 8h, por CGQ (a), padrão quiral da amida (<i>R</i>)- 20 (b), [Condições experimentais: Inj. = 250 ^o C, Det. = 275 ^o C, programação: 80 ^o C <u>5^oC/min.</u> 140 ^o C <u>3^oC/min.</u> 220 ^o C, split 100:1, Pressão do H ₂ = 75Kpa].....	66
Figura 19	Cromatogramas, de uma alíquota de reação de aminólise de (<i>R,S</i>)-mandelato de metila (17) com clorofórmio, em 24hh, por CGQ (a), padrão quiral da amida (<i>S</i>)- 21 (b), [Condições experimentais: Inj. = 250 ^o C, Det. = 275 ^o C, programação: 80 ^o C <u>5^oC/min.</u> 140 ^o C <u>3^oC/min.</u> 220 ^o C, split 200:1, Pressão do H ₂ = 75Kpa].....	67
Figura 20	Variação da conversão (%c) e do excesso enantiomérico do produto (ee _p) em função da massa de CAL-B na resolução de (<i>R,S</i>)-mandelato de metila(17), [<i>t</i> -butanol (25mL), 35°C, 24h.].....	68
Figura 21	Variação da conversão (%c) e da razão enantiomérica (E) em função da massa de CAL-B na resolução de (<i>R,S</i>)-mandelato de metila (17), [<i>t</i> -butanol (25mL), 35°C, 24h.].....	69
Figura 22	Cromatogramas, de uma alíquota de reação de aminólise de (<i>R,S</i>)-mandelato de metila (17) com <i>t</i> -butanol:[BMIm][BF ₄], em 48h, por CGQ (a), padrão quiral da amida (<i>R</i>)- 20 (b), [Condições experimentais: Inj. = 250 ^o C, Det. = 275 ^o C, programação: 80 ^o C <u>5^oC/min.</u> 140 ^o C <u>3^oC/min.</u> 220 ^o C, split 100:1, Pressão do H ₂ = 75Kpa].....	74
Figura 23	Conversão (%) em acetato de geranoíla em função do tempo com as lipases imobilizadas, a 35°C.....	77

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Classificação das enzimas segundo a UIBBM.....	4
Tabela 2	Aplicações de algumas enzimas termoestáveis.....	24
Tabela 3	Transesterificação enantiosseletiva catalisada por lipases em solventes orgânicos e líquidos iônicos.....	32
Tabela 4	Reutilização da CAL-B na transesterificação do 5-fenil-1-penten-3-ol (\pm).....	33
Tabela 5	Efeito da temperatura na aminólise de (<i>R,S</i>)-mandelato de metila (17) catalisada pela CAL-B em clorofórmio.....	64
Tabela 6	Efeito da temperatura na aminólise de (<i>R,S</i>)-mandelato de metila (17) catalisada pela CAL-B em <i>t</i> -butanol.....	60
Tabela 7	Efeito do [BMIm][BF ₄] ou [BMIm][PF ₆]: clorofórmio na aminólise de (<i>R,S</i>)-(17) catalisada pela CAL-B.....	71
Tabela 8	Efeito do [BMIm][BF ₄] ou [BMIm][PF ₆]: <i>t</i> -butanol na aminólise de (<i>R,S</i>)-(17) catalisada pela CAL-B.....	72
Tabela 9	Conversão do geraniol em acetato de geranoíla com sucessivas reutilizações com o sistema lípases / PEO.....	73

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1	Acetilação do (<i>R,S</i>)-mandelato de metila.....	21
Esquema 2	Resolução do (<i>R,S</i>)-2-octanol catalisada por lipases livres ou imobilizadas em PEO.....	21
Esquema 3	Produção do aspartame usando a termolisina.....	22
Esquema 4	Hidrólise da penicilina G e obtenção de seus derivados com acilase...	23
Esquema 5	Acilação enantiosseletiva de (<i>R,S</i>)-2-(1-etil-amino)-3-cloro-5-(substituído)-piridina catalisada pela CAL-B.....	25
Esquema 6	Resolução enzimática dos ácidos racêmicos catalisadas pela LCR livre ou imobilizadas em PEO.....	26
Esquema 7	Síntese do acetato de isoamila catalisada pela CAL-B.....	26
Esquema 8	Síntese enzimática de amidas opticamente puras.....	27
Esquema 9	Síntese estereosseletiva de derivados do carbamato.....	28
Esquema 10	Acetilação do (\pm)- <i>trans</i> e (\pm)- <i>cis</i> -2-fenilciclopentanamina catalisada pela CAL-B.....	28
Esquema 11	Transesterificação dos compostos 3a-d catalisada por lipases.....	31
Esquema 12	Reação de transesterificação catalisada por lipase em líquidos iônicos.....	33
Esquema 13	Acilação enantiosseletiva do 1-feniletilamina (8) e 2-fenil-1-propilamina (9) catalisada pela CAL-B.....	34
Esquema 14	Imobilização de lipases em filme de PEO.....	40
Esquema 15	Síntese de amidas derivadas do (<i>R,S</i>)-mandelato de metila (17) usando solventes orgânicos convencionais.....	47
Esquema 16	Síntese de amidas derivadas do (<i>R,S</i>)-mandelato de metila (17) usando mistura solventes orgânicos / líquido iônicos.....	48
Esquema 17	Recuperação do líquido iônico.....	49
Esquema 18	Síntese do acetato de geranoíla.....	50
Esquema 19	Aminólise enantiosseletiva do (<i>R,S</i>)-mandelato de metila (17) com <i>n</i> -butilamina catalisada por lipases.....	52
Esquema 20	Síntese do acetato de geranoíla catalisada por lipases.....	76

RESUMO

Aminas e os derivados de amidas são importantes em síntese orgânica, devido a presença destes grupos funcionais em muitos compostos farmacologicamente ativos.

Neste trabalho, lipases de várias fontes livres ou imobilizadas em poli-(óxido de etileno), PEO, foram usadas na resolução enzimática de (*R,S*)-mandelato de metila (**17**) com *n*-butilamina em solventes orgânicos (*n*-hexano, clorofórmio e *t*-butanol) e/ou mistura solvente orgânico: líquido iônico (1-butil-3-metil imidazol tetrafluorborato [BMIm][BF₄] e 1-butil-3-metil hexafluorofosfato [BMIm][PF₆]). Parâmetros tais como tempo, temperatura, massa da CAL-B e efeito do solvente foram avaliados.

A lipase de *Aspergillus niger* foi utilizada na esterificação do geraniol com acetato de vinila em *n*-hexano, e comparada com lipases de diversas procedências comerciais, tais como a CAL-B, LPS-C e LPS-D.

Inicialmente foi avaliado o uso de lipases de diferentes fontes na aminólise de (*R,S*)-mandelato de metila. As lipases de LRM, LTL, LMM, LPS, PS-D, PS-C e CAL-B foram selecionadas.

Quando as lipases de LRM, LTL, LMM, LPS, PS-D, PS-C foram empregadas em sua forma nativa ou imobilizadas em PEO, baixas conversões (0 – 5%) e nenhuma seletividade ($ee_s = 1-38\%$, $ee_p = 1-43\%$ e $E=1,1-2,7$) foram obtidas usando *n*-hexano, clorofórmio ou *t*-butanol à 35⁰C até 96 h de reação.

Os melhores resultados foram obtidos quando a lipase de *Candida antarctica* (CAL-B) foi usada, formando os produtos com conversão de 1- >99%, com valores de ee_p de 5-75% e de $E = 1,4-22$, com os solventes citados anteriormente.

Estudou-se a reação nas temperaturas de 25, 35 e 45°C. A temperatura ótima foi 35°C, usando clorofórmio e *t*-butanol como solventes. Com clorofórmio, a amida (*S*)-**21** foi formada em 26% de conversão, com valor de ee_p de 75% e E de 22, em 24 h. Com *t*-butanol, a amida (*R*)-**20** foi formada com 91% de conversão, com valor de ee_p de 51% e de E 9,7, após 24h.

A massa de CAL-B também foi avaliada, variando-se de 25-150 mg. A quantidade de 100 mg foi selecionada para continuar os estudos, por apresentar os melhores

resultados. A amida (*R*)-**20** foi obtida com conversões de 91%, e com valores de ee_p de 51% e E de 9,7, em 24h.

Usando clorofórmio ou *t*-butanol, puro ou em mistura com os líquidos iônicos, a configuração nas correspondentes amidas foi à mesma, sendo a amida (*R*)-**20** formada preferencialmente em *t*-butanol, e a amida (*S*)-**21** em clorofórmio. No entanto, o uso de mistura com líquidos iônicos resultou na formação dos produtos com maior grau de conversão, sendo de 3-48%, e maiores valores de ee_p e de E, sendo >99% e >200, respectivamente.

Na esterificação do geraniol usando as lipases PS-C, PS-D, CAL-B e a de *A. niger* imobilizadas em PEO, obtiveram boas conversões em éster, sendo de 35-93%, após 6 h. As mesmas puderam ser reutilizadas pelo menos três vezes sem perder sua atividade catalítica.

Neste trabalho, observou que dependendo do solvente ou enzima utilizadas na reação pode-se obter os compostos enantiomericamente puros e com configurações opostas. Estes resultados mostraram a viabilidade do método de biocatálise na aminólise de (*R,S*)-mandelato de metila e na obtenção do acetato de geranoíla em alta conversão.

ABSTRACT

Amines and their derivatives are important in organic synthesis due to the presence of these functional groups in a wide number of compounds with pharmaceutical activity.

In this work, lipases from different sources free or immobilized in poly (ethylene oxide) (PEO) were used for the enzymatic resolution of (*R,S*)-methyl mandelate (**17**) with *n*-butylamine in organic solvent mixtures (*n*-hexane, chloroform and *t*-butanol) and/or organic solvent:ionic liquid (1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate, [BMIm] [BF₄] and 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate [BMIm] [PF₆]). Parameters such as time, temperature, CAL-B (lipase from *Candida antarctica*) amount and solvent effects were evaluated.

Lipase from *Aspergillus niger* was used for the esterification of geraniol with vinyl acetate in *n*-hexane, and compared with commercial lipases from different sources such as from *Candida antarctica* (CAL-B) and *Pseudomonas* sp. (PSL-C and PSL-D).

Firstly, the use of lipases from different sources in the aminolysis of (*R,S*)-methyl mandelate was evaluated. RML, TLL, MML, PSL, PSL-D, PSL-C and CAL-B were selected for this study. When RML, TLL, MML, PSL, PSL-D and PSL-C were employed in their native form or immobilized in PEO, lower conversions (0-5%) and no selectivity ($ee_s = 1-38\%$, $ee_p = 1-43\%$ and $E = 1.1-2.7$) were obtained using *n*-hexane, chloroform or *t*-butanol, at 35°C during 96 h of reaction.

Better results were obtained when CAL-B was used, forming the products in the range of 1-99% of conversion, with ee_p values of 5-75% and $E = 1.4-22$ using the solvents mentioned above.

The reaction was studied at the temperatures of 25, 35 and 45°C. The optimum temperature was 35°C, using chloroform and *t*-butanol as solvents. Using chloroform, the amide (*S*)-**21** was formed with 26% of conversion, with $ee_p = 75\%$ and $E = 22$, in 24 h. With *t*-butanol, the amide (*R*)-**20** was formed with 91% of conversion, with $ee_p = 51\%$ and $E = 9.7$, after 24 h.

The CAL-B amount was also evaluated, ranging from 25-150 mg. The amount of 100 mg was selected to continue the studies, as it provided the better results. The amide (*R*)-**20** was obtained with 91% conversion, with $ee_p = 51\%$ and $E = 9.7$ in 24h.

Using chloroform or *t*-butanol, pure or in a mixture with the ionic liquids, the configuration of the correspondent amides was the same, and the amide (*R*)-**20** was mainly formed in *t*-butanol while the (*S*)-**21** was formed in chloroform. However, the use of the solvent mixed with the ionic liquids resulted in higher conversion degree (3-48%), and ee_p and E values, these being $>99\%$ and $>200\%$, respectively.

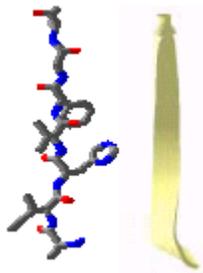
Using PSL -C, PSL-D, CAL-B and *A. niger* lipases immobilized in PEO, in the geraniol esterification good conversions in esters were obtained, these being 35 to 93%, after 6h. These enzymes could be re-used, at least three times with little change in their catalytic activity.

In this work, it was observed that depending on the solvent or lipase source, enantiomeric pure compounds with opposite configurations could be obtained. These results showed the feasibility of this methodology for the biocatalytic aminolysis of (*R*-*S*)-methyl mandelate, and for the production of geraniol acetate in higher conversions ($>90\%$).

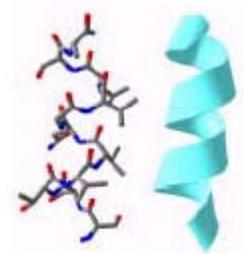
1. Introdução

1. 1. Enzimas

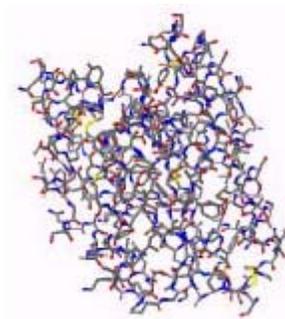
As enzimas, em geral, são catalisadores de natureza protéica, produzida por organismos vivos.^{1,2} Elas são formadas por uma longa cadeia de aminoácidos ligados através de ligações peptídicas, e a seqüência exata de aminoácidos da cadeia protéica é denominada estrutura primária. A conformação tridimensional dessa seqüência é chamada estrutura secundária (**Figuras 1a e 1b**), e a disposição espacial destas estruturas é denominada estrutura terciária (**Figura 1c**).²



[a] folha β -pregueada



[b] folha α -hélice



[c] estrutura terciária

Figura 1 – Representações gráficas da estrutura tridimensional da lipase de *Penicillium sp* obtida por Raio-X.³

As enzimas contêm um sítio ativo, o que constitui somente uma pequena proporção de seu volume total e está usualmente próximo ou na superfície. Portanto, esta acessível às moléculas de substratos. O sítio ativo contém aminoácidos cujas cadeias laterais formam uma superfície tridimensional complementar ao substrato. A conformação e composição química do sítio ativo da enzima determinam a especificidade da catálise enzimática.⁴ As enzimas são catalisadores versáteis, existindo para cada tipo de reação orgânica um processo enzimático equivalente.⁵

As enzimas apresentam diversas propriedades que as tornam atrativas como catalisadores. Diversos processos no metabolismo animal são regidos por enzima. As vantagens de utilizá-las como catalisadores são:⁵

✓ **Alta velocidade de reação:** as velocidades de reações catalisadas por enzimas podem ser de 10^6 a 10^{14} vezes mais rápidas que as correspondentes não catalisadas.

✓ **Atuam em condições suaves:** as reações ocorrem em condições suaves de temperatura, abaixo de 100°C , sob pressão atmosférica e num meio de pH e concentração salina praticamente constante. Estas condições minimizam problemas de isomerização, racemização e rearranjos, que freqüentemente ocorrem na metodologia tradicional.

✓ **Apresentam diversos tipos de seletividade como:**

- Quimiosseletividade: enzimas podem atuar em somente um tipo de grupo funcional mesmo na presença de outros grupos reativos.
- regiosseletividade e diastereosseletividade: enzimas podem distinguir entre grupos funcionais somente com a mudança do meio reacional.
- enantiosseletividade: enzimas são catalisadores quirais e sua especificidade pode ser explorada para sínteses seletivas e assimétricas.

✓ **Alto grau de especificidade:** as reações raramente formam produtos laterais ou secundários.

✓ **Capacidade de regular processos:** a atividade catalítica de muitas enzimas varia dependendo da concentração de outras substâncias que não são seus substratos.

✓ **Catalisam um grande número de reações:** aceleram a velocidade da reação sem alterar o equilíbrio termodinâmico, e podem catalisar um grande número de reações.

Porém, existem algumas desvantagens no uso destes biocatalisadores, tais como:

- Os aminoácidos são encontrados na natureza somente com uma forma enantiomérica, a forma L.
- Requerem parâmetros de operação específicos, tais como temperatura e pH.
- Apresentam sua atividade catalítica máxima em água.
- São propensos a sofrer inibição por agentes químicos e físicos.

Estas desvantagens têm sido amenizadas nos últimos tempos pelo desenvolvimento e aperfeiçoamento de diversas técnicas nas reações biocatalíticas. Quando o processo não for satisfatoriamente seletivo, modificações simples nas condições experimentais podem influenciar tanto a estereoquímica como a enantiosseletividade. As modificações mais empregadas são o uso de solventes orgânicos, adição de inibidores, técnicas de imobilização e utilização de enzimas mais resistentes (extremoenzimas).⁶

No Banco de Dados de Proteínas (PDB), encontram-se catalogados 34420 tipos de macromoléculas (entre proteínas, peptídeos, vírus, carboidratos, ácidos nucleicos e complexos proteína/ácido nucleico), sendo que destas 31444 são proteínas. Várias enzimas têm sua seqüência de aminoácidos e estrutura tridimensional determinadas através de cristalografia de raios-X e RMN-2D.^{7,8}

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM), classifica as enzimas em seis grupos, e cada uma delas em sub-grupos de acordo com o tipo de reações que catalisam.^{5,7} (**Tabela 1**)

Para a identificação individual todas enzimas possuem um código **EC A.B.C.D**, onde **EC** é a abreviatura de “Enzyme Comission”, **A** representa a classe, **B** indica a sub-

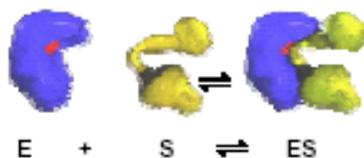
classe, **C** indica a sub-subclasse e **D** é o número individual da enzima em sua sub-subclasse.

Tabela 1. Classificação das enzimas segundo a UIBMB. ^{5,7}

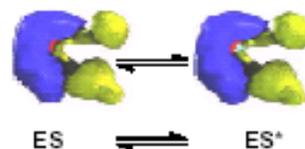
Número	classes	Tipo de reação catalisada	Subclasse
1	oxidoreduases	transferência de elétrons ou remoção de hidrogênio	hidrogenases, oxidases, peroxidases
2	transferases	reações de transferência de grupos	transaldolases, transcetolases
3	hidrolases	reações de hidrólise	esterases, lipases , peptidases, fosfatases
4	liases	reações de adição de grupos a dupla ligação ou formação de duplas ligações por remoção de grupos.	descarboxilases, fosfatases
5	isomerasas	transferência de grupos dentro da molécula para produzir isômeros.	racemases, epimerases, oxireduases, mutase
6	ligases	formação e clivagem de ligações C-C, C-S, C-O, C-N e ésteres de fosfato.	sintetases

A função de um catalisador é diminuir a barreira de energia entre os reagentes e produtos. Esta habilidade ocorre devido à capacidade de aproximar os substratos em uma orientação tal que favoreça a formação do complexo enzima-substrato (ES), para posteriormente formar os produtos (**Figura 2**).⁷

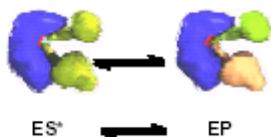
Formação do complexo enzima/substrato



Formação do estado de transição ES*



Formação do complexo enzima/produto



Formação do produto

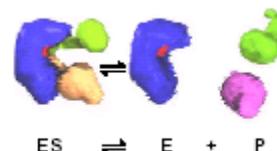


Figura 2 – Representação esquemática do mecanismo de ação enzimática.⁷

As enzimas hidrolíticas são os biocatalisadores mais comumente usados em síntese orgânica. Nesta classe estão incluídas as amidases, proteases, nitrilases, fosfatases, epoxidases sendo de particular e grande interesse as lipases.⁵ (**Figura 3**)

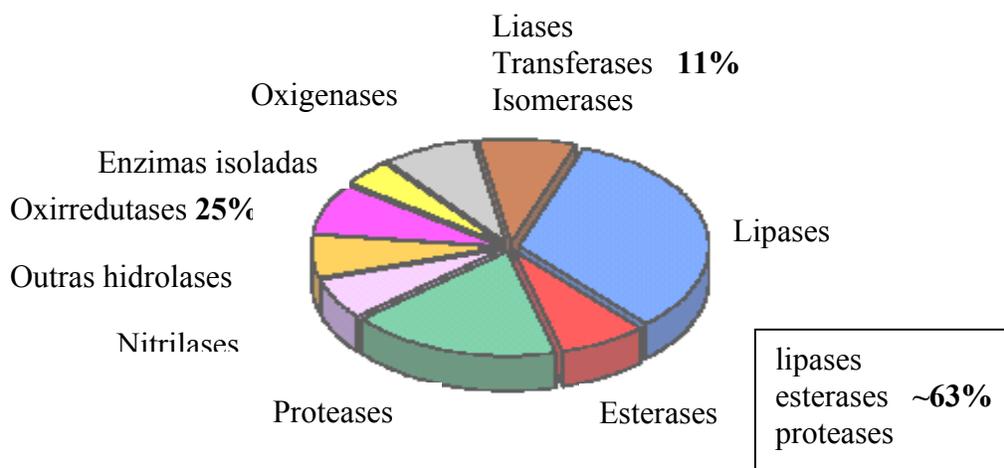


Figura 3 – Utilização relativa de enzimas em biotransformação.⁵

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases E.C.3.1.1.3) são enzimas da família das hidrolases que, em seu meio natural, hidrolisam triacilgliceróis aos correspondentes ácidos carboxílicos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e gliceróis.⁹

1.2 Lipases

As lipases são enzimas hidrolíticas presentes em diversos organismos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias. São, em sua maioria, extracelulares, favorecendo a sua extração, isolamento e purificação.^{6,10}

Em seu ambiente natural estas enzimas possuem a função de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis aos correspondentes ácidos graxos e glicerol. Além das funções metabólicas, as lipases possuem um papel importante em biotecnologia principalmente na indústria de óleo e de alimentos, e em síntese orgânica de compostos enantiomericamente enriquecidos.^{11, 12, 13}

As vantagens de trabalhar com lipases são principalmente ao baixo custo, e a alta versatilidade catalítica destas enzimas. Além disso, não exigem cofatores, atuam em faixa de pH bastante ampla, são estereosseletivas e regioseletivas.¹⁴⁻¹⁸

Em solvente orgânico, as lipases catalisam a transferência de grupos acilas de compostos doadores para uma ampla variedade de compostos aceptores diferentes da água. Dependendo do tipo do doador acila e doceptor, as reações catalisadas por lipases incluem esterificação, tioesterificação, amidação, transesterificação, síntese de peptídeos e formação de perácidos.^{5, 19-20} Estes últimos podem ser utilizados na síntese de epóxidos a partir de compostos insaturados.²¹

Uma maior compreensão sobre os mecanismos de ação das lipases somente foi obtida a partir de 1900 quando as duas primeiras estruturas foram resolvidas por cristalografia de raios-X.²² Todas as lipases cujas estruturas têm sido elucidadas são membros da família α,β -hidrolase pregueada com uma arquitetura comum composta de uma seqüência de fitas α -hélice e β -pregueada. Hidrolisam as ligações de ésteres e/ou amidas através de uma tríade catalítica composta de um resíduo de serina nucleofílico ativado por ligação de hidrogênio, em conjunto com histidina, aspartato ou glutamato (Ser-His-Asp/Glu).⁷

Na **Figura 4**, pode-se observar a representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de *Candida antarctica* (CAL-B) com a ampliação do sitio ativo formado pelas cadeias laterais da histidina, serina e aspartato.⁸

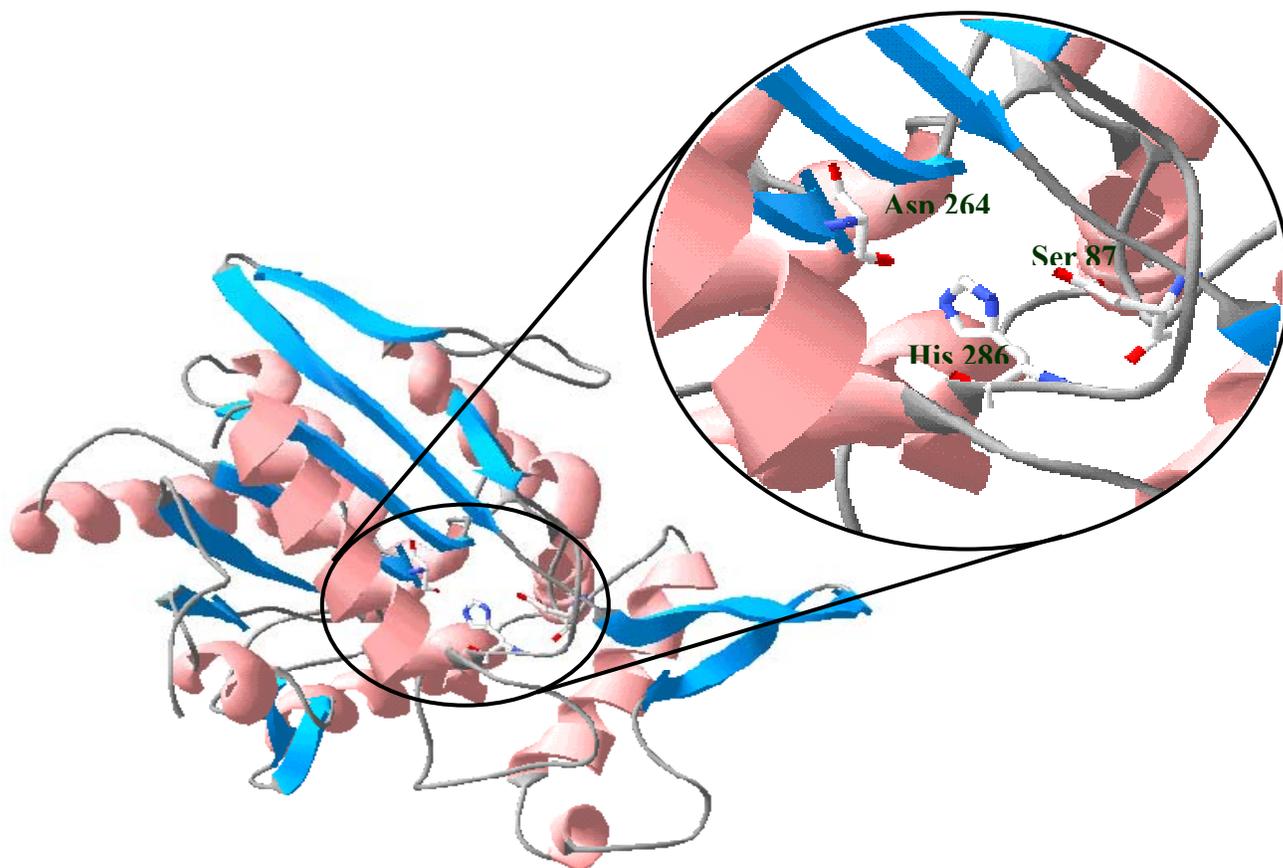


Figura 4 - Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de *Candida antarctica* obtida por raio-X.⁸

O mecanismo da ação catalítica de uma lipase na aminólise de um éster consiste em cinco etapas e está exemplificado na **Figura 5**:²

1. Ligação ao substrato éster;
2. Formação do primeiro intermediário tetraédrico por ataque nucleofílico da serina catalítica, com oxiânion estabilizado por duas ou três ligações de hidrogênio, a chamada “cavidade oxiânion”;
3. Quebra da ligação éster;
4. Saída da porção alcoólica;
5. Aminólise do intermediário acil-enzima

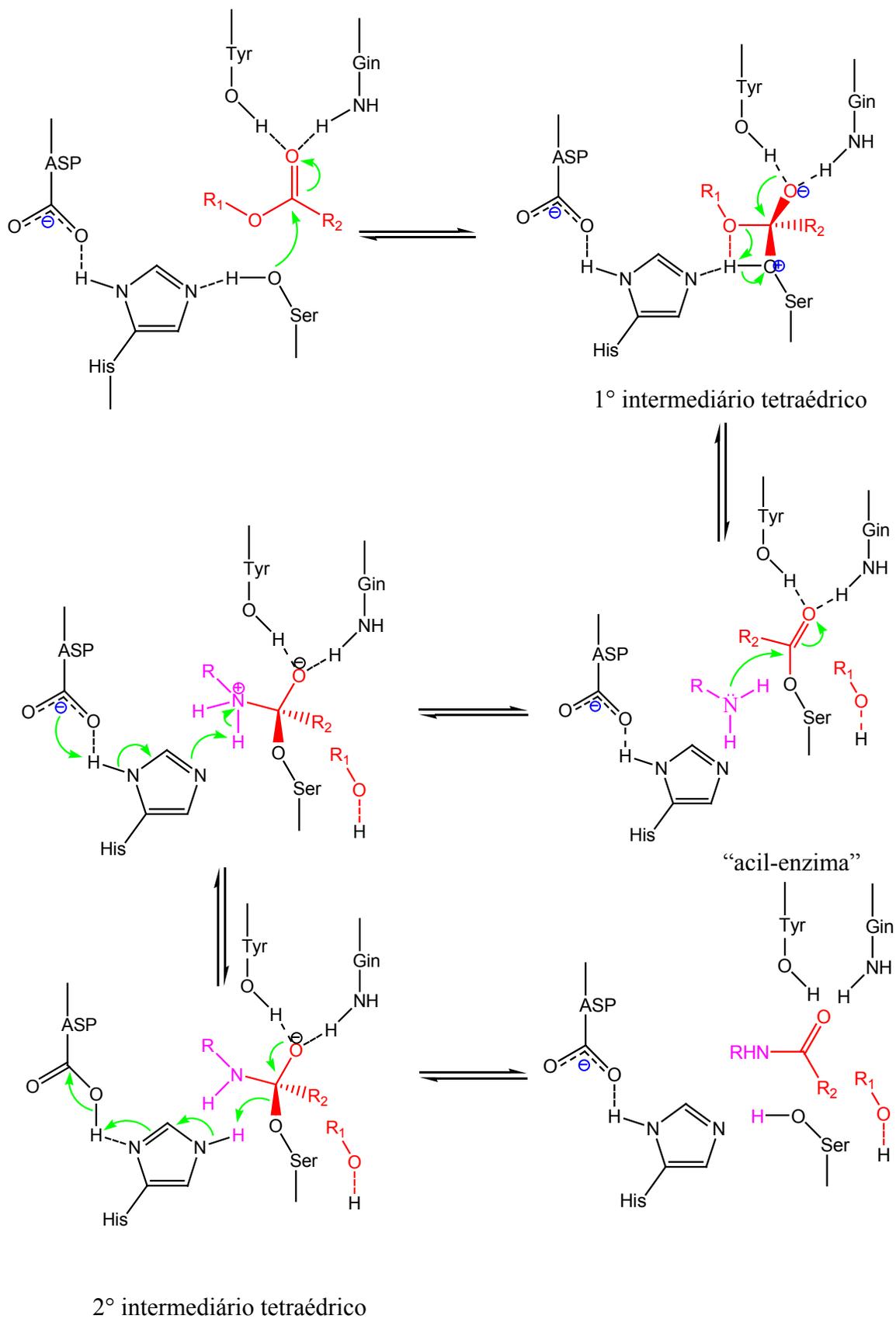


Figura 5 - Mecanismo da reação de aminólise de éster catalisada por lipases baseado na “tríade catalítica”. (adaptado da ref. 2)

1.3 Estereosseletividade das enzimas

A história da quiralidade na química orgânica começou em 1815 quando o físico francês Jean Baptiste Biot descobriu que certas substâncias foram hábeis para desviar o plano da luz polarizada, um fenômeno chamado atividade ótica. Parte do enigma foi resolvido quando Louis Pasteur separou os cristais de um racemato de um sal de ácido tartárico e reconheceu que as imagens não sobreponíveis desviavam a luz plano polarizada em direções opostas.²³

As moléculas que não podem sobrepor-se às respectivas imagens em um espelho plano são chamadas de quirais. A maioria das moléculas presente na estrutura dos organismos vivo são quirais, tais como o ácido desoxiribonucléico (DNA), enzimas, hormônios e anticorpos. Por esta razão observa-se a relevância da quiralidade em organismos vivo. Quiralidade é a 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 contrário. A mistura formada por quantidades equimolares dos enantiômeros é chamada de mistura racêmica ou racemato.^{24,25}

Os enantiômeros podem apresentar atividade biológica completamente diferente, pois interagem de maneira distinta com outros sistemas quirais ou aquirais. Por exemplo, o (*R*)-limoneno possui aroma de laranja e seu enantiômero (*S*)-limoneno têm aroma de limão. A distinção no odor ocorre porque os receptores também são constituídos de moléculas quirais e reconhecem a diferença nos enantiômeros.

Nos fármacos quirais, somente um dos enantiômeros é o responsável pela atividade de interesse e em certos caso o outro enantiômero pode ser prejudicial ou inativo. O exemplo mais expressivo que marcou a história da química biológica foi à tragédia da talidomida, a qual era prescrita na forma racêmica. O enantiômero *R* era efetivo contra náusea matutina de mulheres grávidas, enquanto que o *S* teve efeitos devastadores que causaram a má formação em muitos fetos. Esta teoria está sendo questionada, particularmente, porque os dois enantiômeros da talidomida podem ser facilmente interconvertidos no organismo.²⁵

As estruturas dos enantiômeros do limoneno, talidomida e de outras substâncias que apresentam características distintas em função direta de sua configuração estão mostradas na **Figura 6**.

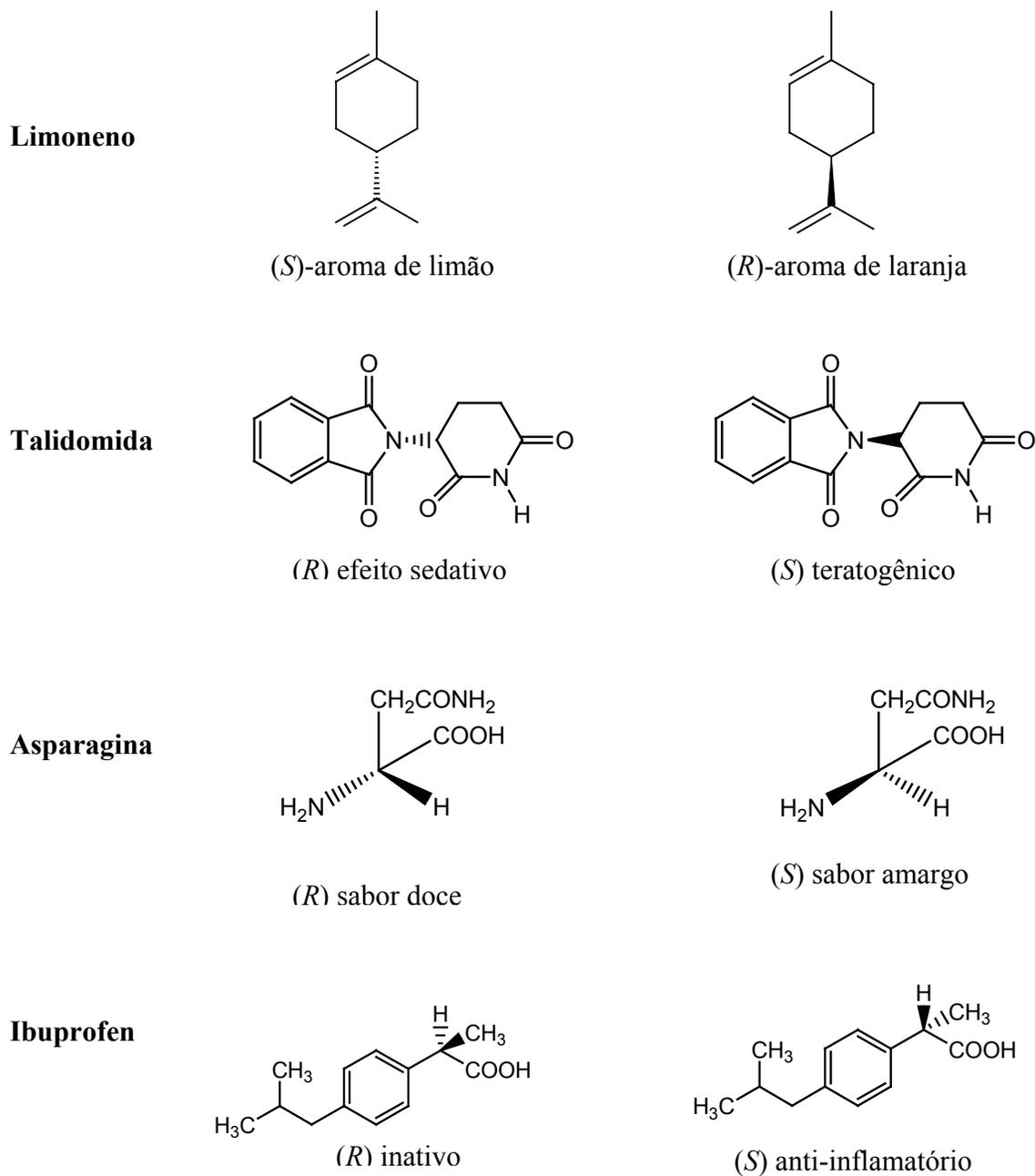


Figura 6 – Enantiômeros de substâncias cujas características biológicas são função direta de sua configuração.

Os compostos enantiomericamente puros são de importância crescente na indústria farmacêutica, agroquímica, sabores e fragrâncias. Antes de 1980 já havia uma tendência em aumentar a produção para introduzir no mercado os fármacos quirais composta de um único enantiômero ativo. Esta tendência tem diversas razões, entre elas:

- ✓ A atividade biológica é restringida freqüentemente a um dos enantiômeros;
- ✓ Um dos enantiômeros pode exercer efeitos indesejáveis;
- ✓ O registro de novos fármacos requer a produção do enantiômero puro no formulário.

Dessa forma, tem-se uma necessidade absoluta de produzir novos fármacos com pureza ótica elevada, sendo que as lipases têm sido extensivamente usadas em resoluções racêmicas devido sua ação estereoespecífica.^{10,26,27}

A resolução de racematos ainda é a metodologia mais importante para a síntese industrial de produtos enantiopuros.^{28,29} Os métodos para resolução incluem resolução cinética química ou enzimática, ou a clássica via cristalização preferencial ou separação de diastereoisômeros.

1.4 Resolução enzimática

Quando um substrato racêmico é submetido a uma reação enzimática, este sofre discriminação quiral entre os enantiômeros. Devido a quiralidade da enzima, o enantiômero que melhor se ajusta no seu sitio ativo sofre reação em uma velocidade mais alta. Para assegurar uma alta seletividade para ambos os enantiômeros, a diferença na velocidade de reação dos enantiômeros individuais deve ser a maior possível. Em alguns casos ideais a velocidade é tão extrema, que o “bom” enantiômero é transformado rapidamente e o outro não é convertido. Então, na resolução do racemato a reação enzimática cessaria automaticamente em 50% de conversão (**Equação 1**), quando já não existe mais o enantiômero reativo. Como consequência, cada enantiômero pode ser obtido somente com 50% de rendimento em uma resolução enzimática.⁵

Um tratamento muito útil das resoluções cinéticas enzimáticas, e que descreve a dependência da conversão (c), excesso enantiomérico do substrato (ee_s) e excesso enantiomérico do produto (ee_p) foi desenvolvido por Sih em 1982 sob a base teórica de Sharpless e K. Fajans.³⁰ O parâmetro que indica a discriminação de uma enzima entre dois enantiômeros foi introduzido como razão enantiomérica (E).⁵

A conversão, pode ser calculada de acordo com a **Equação 1** e pode ser obtida a partir de valores do ee_s e ee_p , com o uso das **Equações 2 e 3**, respectivamente.⁵

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \quad \text{Equação 1}$$

$$E = \frac{\ln[(1-c)(1- ee_s)]}{\ln[(1-c)(1+ ee_s)]} \quad \text{Equação 2}$$

$$E = \frac{\ln[(1-c)(1+ ee_s)]}{\ln[(1-c)(1- ee_p)]} \quad \text{Equação 3}$$

Valores de razão enantiomérica menores que 15 são inaceitáveis para propósitos práticos. Podem ser consideradas moderadas a bons de 15-30, e acima deste valor excelentes. Deve ser enfatizado que $E > 200$ não pode ser determinado com precisão, devido às imprecisões emergidas dos métodos da determinação do excesso enantiomérico (RMN, CLAE ou CGQ), onde uma pequena variação do ee_s ou ee_p pode causar uma mudança significativa no valor numérico de E .⁵

1.5 Métodos analíticos para a determinação da pureza enantiomérica

O desenvolvimento de métodos de análise estereoquímica sensível, especialmente os cromatográficos de alta resolução para a determinação da pureza enantiomérica, foi fundamental para o desenvolvimento da síntese assimétrica, pois permite a avaliação precisa do grau de seletividade obtido em uma determinada reação.^{31,32}

Um excesso enantiomérico de 100% corresponde a um composto enantiomericamente puro. A reação que fornece esta pureza é chamada de enantioespecífica e representa uma situação ideal que raramente é atingida na prática.

O excesso enantiomérico de 0% corresponde a uma mistura (1:1) de enantiômeros, conhecida como mistura racêmica ou racemato, denotada pelo prefixo (\pm).⁵

1.5.1 Método polarimétrico

O método clássico para determinar o excesso enantiomérico de uma amostra é medir sua pureza ótica através de um polarímetro. A rotação ótica específica $[\alpha]$, é uma grandeza característica de cada composto óticamente ativo, sendo calculada pela **Equação 4**.

$$[\alpha]_D^T = \frac{\alpha}{l \cdot c} \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

α = rotação ótica observada

l = comprimento da cela polarimétrica, em dm

D = comprimento da linha de emissão de sódio (589 nm)

c = concentração da solução, em g de soluto por cm^3 de solvente

t = temperatura (grau Celsius)

A medida da rotação ótica de uma amostra deve ser realizada sob condições definidas de temperatura, solvente, concentração e em um dado comprimento de onda de incidência da luz plano polarizada. Estes valores podem ser comparados com rotações conhecidas de amostras enantiomericamente puras de alguns compostos, medidos sob condições idênticas. Este valor é denominado de “pureza ótica”. Se a medida for realizada sob condições controladas rigorosamente e calibrações apropriadas, o valor pode ser comparado com o da “pureza enantiomérica”.³³

A rotação da luz plana polarizada é igual para ambos enantiômeros, mas com sinal contrário. Na literatura encontram-se valores de $[\alpha]$ para vários compostos opticamente ativos. Esse dado não só é utilizado como critério de identificação de uma substância, mas também para avaliar a pureza óptica ou a sua porcentagem em uma mistura. A pureza enantiomérica, também chamada de excesso enantiomérico (ee), e pode ser calculada pela **Equação 5**.³⁴

$$ee = \frac{\text{rotação específica observada}}{\text{rotação específica do enantiômero puro}} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Embora este método seja uma técnica geralmente usada para determinar a pureza enantiomérica, apresenta algumas desvantagens. A amostra sob a análise deve ser homogênea, destituída de traços de impurezas quirais e deve ser isolada de uma mistura reacional sem enriquecimento enantiomérico acidental.³⁴

As medidas de rotação óticas são particularmente sensíveis à temperatura e concentração. Desta forma, os erros nas medidas de rotação destes efeitos combinados, são estimados em $\pm 4\%$.

1.5.2 Cromatografia gasosa quiral (CGQ)

Um método atrativo para a análise de misturas enantioméricas é o uso da cromatografia gasosa (CG) com fase estacionária quiral (CGQ). Este método sensível não é afetado por traços de impurezas, é rápido e relativamente 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 um alto grau de precisão ($\pm 0,05\%$).

O método usa uma fase estacionária quiral que contém um agente de resolução auxiliar de alta pureza enantiomérica. Os enantiômeros sofrem interações diastereoméricas rápidas e reversíveis com a fase estacionária, sendo eluído em velocidades diferentes. A

amostra deve ser suficientemente volátil e estável termicamente, e ser resolvida quantitativamente sobre a fase quiral.^{32,35}

As ciclodextrinas ou seus derivados (α , β , γ) têm sido aplicada com sucesso na separação de enantiômeros pela cromatografia líquida ou gasosa, através do desenvolvimento de colunas com fases estacionárias quirais.^{36,37}

A razão dos picos, fornece a pureza enantiomérica da amostra (**Equação 6**).

$$ee = \frac{(\text{área do isômero maior}) - (\text{área do isômero menor})}{(\text{área do isômero maior}) + (\text{área do isômero menor})} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

Ethur, preparou três novos derivados de β -ciclodextrina: 6-O-*isobutiril*-2,3-di-O-pentil, 6-O-*t*-butildimetilsilil-2,3-di-O-*isobutiril*, 6-O-*t*-butildimetilsilil-2-O-pivaloil. Além desses novos derivados de γ -ciclodextrinas: octaquis 6-O-etil-2,3-di-O-pentil, 6-O-*isobutiril*-2,3-di-O-pentil, 2,3-di-O-pentil-6-O-pivaloil, 6-O-*t*-butildimetilsilil-2,3-de-O-*isobutiril*, 6-O-*t*-butildimetilsilil-2-O-pivaloil e 3-O-*isobutiril*-2,6-di-O-pentil. A coluna quiral 6-iBc-2,3-Pe- β -CD/OV 1701 (1:1) apresentou bons resultados nas separações enantiomérica de (\pm)-limoneno, (\pm)-linalol, (\pm)-mentol entre outros produtos racêmicos. A coluna 6-TBDMS-2,3-iBc- β -CD/OV 1701 (1:1) foi eficiente na resolução dos racematos de (\pm)- α -pineno, (\pm)- β -pineno e (*R,S*)-2,6,6-trimetil-2,4-heptadien-1-ol.³⁷

A coluna CP-chirasil Dex CB apresentou bons resultados na separação dos enantiômeros (*R,S*)-hidróxi(fenil)acetato de metila e (*R,S*)-acetiloxi(fenil)acetato de metila.³⁸

1.5.3 Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

A separação dos enantiômeros por CLAE como na CG, requer um agente quiral. O método mais direto e preferido é induzir interações diastereoméricas dos dois enantiômeros com a fase quiral estacionária. Os complexos diastereoméricos formados terão estabilidades diferentes, e portanto eluem em tempos diferentes. Uma outra alternativa é usar suporte aquiral e eluir com solvente quiral.³²

Com o uso de um aditivo quiral, um composto enantiomericamente puro é adicionado continuamente à fase móvel do CLAE e a separação dos complexos diastereoisoméricos formados pode então ser feita com CLAE convencional ou de fase reversa.³⁵

Contudo, a metodologia que tem se mostrado mais atrativa é a separação direta com o uso de uma fase quiral estacionária. A resolução direta de enantiômeros é possível desde que exista reconhecimento quiral entre a mistura racêmica e o seletor quiral.^{32,35}

1.5.4 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio

Os enantiômeros não podem ser identificados em um meio aquiral por seu espectro de RMN porque possuem deslocamentos químicos equivalentes. Em contraste, os diastereoisômeros podem ser diferenciados porque os deslocamentos químicos não são equivalentes.

A determinação da pureza enantiomérica requer a intervenção de um auxiliar quiral para converter os enantiômeros em diastereoisômeros. A integração apropriada dos sinais dos diastereoisômeros fornece uma medida da composição diastereoisomérica, podendo ser diretamente relacionada à composição enantiomérica da mistura original.

Alguns auxiliares quirais amplamente usados formam diastereoisômeros (agentes derivatizantes quirais-CDAs) enquanto outros formam complexos diasteroméricos *in situ* com os enantiômeros dos substratos (agentes de solvatação quiral – CSAs e reagentes de deslocamento lantanídeos quirais – CLSRs).³¹

A magnitude do deslocamento químico não equivalente é proporcional ao campo magnético aplicado. Com a diminuição da temperatura, na qual o espectro é registrado, pode-se acentuar a anisotropia entre os diastereoisômeros. O uso de solventes pouco polar tal como clorofórmio- d_3 e, em particular solventes aromáticos tais como benzeno- d_6 ou tolueno- d_8 oferece consideráveis vantagens. Isto efetivamente exclui a aplicação de métodos de RMN para análise da pureza enantiomérica dos substratos que são somente solúveis em solventes polares como DMSO- d_6 .

Queiroz estudou o potencial de discriminação enantiomérica de seletores quirais para o ácido (\pm)-2-bromoexadecanóico. Na presença dos complexos calix [4]/S-PEA (calix

[4]/(S)-(-)-1 feniletilamina), calix [6]/S-PEA (calix [6]/(S)-(-)-1 feniletilamina), e β -CDPM (β -ciclodextrinas permetiladas) em CD_3OD/D_2O , ocorreu à discriminação do H_α do racemato. Foi também observado que, no experimento com o complexo calix [6]/S-PEA à temperatura de 25°C, há uma sobreposição entre o sinal discriminado de (\pm)-2-bromoexadecanóico e o sinal do grupo metilênico do calix [6], em δ de 3,8 a 4,0ppm. Porém, aumentando a temperatura de 25 para 45°C, foi possível separar satisfatoriamente o sinal discriminado do sinal do seletor.³⁸

1.6 Imobilização de enzimas

Muitas enzimas são cataliticamente ativas em ambientes hidrofóbicos, com eficiência similar àquela encontrada em solução aquosa. Porém, estes catalisadores estão sujeitos à inativação em meio orgânico, por fatores químicos, físicos ou biológicos. Visando protegê-los das interações com o solvente, técnicas de imobilização têm sido desenvolvidas.^{5,39,40}

O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos.^{39,41}

O principal interesse em imobilizar, é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não foram alterados durante o processo em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer modificações estruturais, bem como de seu sítio ativo.³⁹ A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que confirme a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização.⁴²

A imobilização pode ocorrer através de diferentes métodos, tais como, a adsorção em materiais insolúveis, confinamento dentro de géis poliméricos, encapsulamento em membranas, ligação cruzada com reagentes bifuncional ou multifuncional e ligação a um suporte insolúvel.^{5,40,43}

A escolha da matriz é muito importante para uma boa atuação do sistema com a enzima imobilizada. As características desejáveis para um bom suporte são: área

superficial grande, boa permeabilidade, características hidrofílicas, estabilidade química, mecânica e térmica, alta rigidez, forma e tamanhos adequados, resistência ao ataque de microorganismos e poder ser reutilizado.

Na **Figura 7** é mostrada, esquematicamente, a classificação dos métodos para imobilização de enzimas.

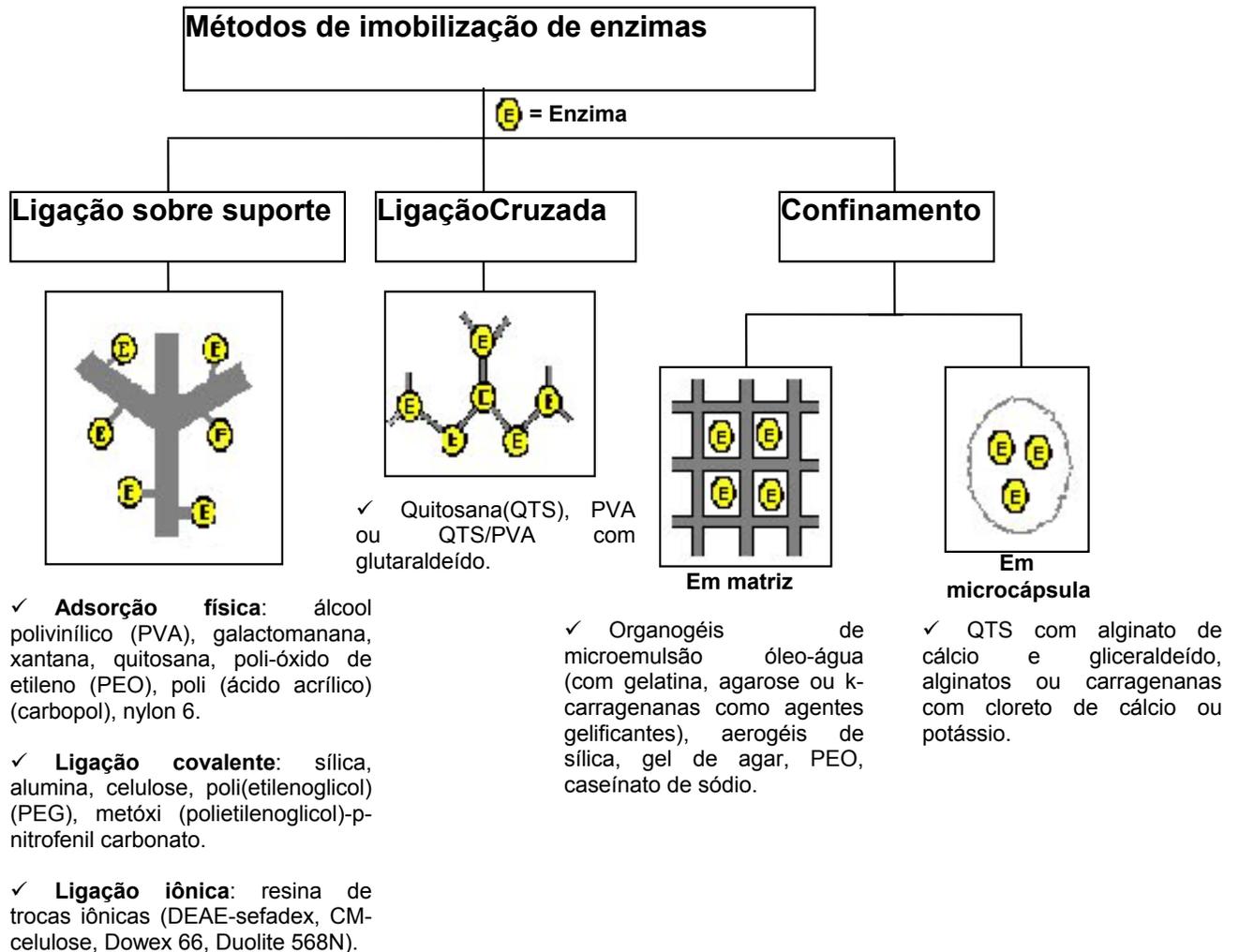


Figura 7 – Principais métodos de imobilização de enzimas. (adaptado da ref.5)

Os métodos de imobilização estão divididos em três categorias, conforme descrito na **Figura 7**.

✓ **Ligação em suporte:** este método está subdividido em adsorção física, ligação covalente e iônica.

O procedimento de adsorção de uma proteína é simples, e é um dos métodos mais utilizados. A enzima é imobilizada em um suporte sólido por ligações de baixa energia tais como interação de van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas, entre outras. Vários materiais podem ser usados, e a escolha deles depende de suas propriedades, como força mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção da enzima e custo.^{43,44}

Crespo⁴⁵ estudou a reação de esterificação do ácido láurico com *n*-pentanol, catalisada por lipases de diferentes fontes imobilizadas em poli-(óxido de etileno) (PEO), poli-(ácido acrílico)(carbopol) e blendas PEO/carbopol. Parâmetros como tempo e temperatura de reação, concentração da enzima no suporte e no meio reacional foram avaliados.

Dalla-Vecchia e col.⁴⁰ imobilizaram 10 lipases em carboximetil-celulose (CMC) e poli (álcool vinílico) (PVA) e na mistura de CMC / PVA. Estes biocatalisadores imobilizados foram usados nas reações de esterificação do ácido láurico com *n*-pentanol. As maiores conversões, > 99%, foram obtidas com as lipases de *Rhizopus oryzae* (LRO) e de *Mucor javanicus* (LMJ) imobilizadas.

✓ **Ligação cruzada:** as enzimas após formarem ligações cruzadas tornam-se macromoléculas insolúveis em água e são produzidas pela reação com reagentes bifuncionais sendo o glutaraldéido, o mais comum e usado. Os dois grupos aldeídicos do glutaraldéido formam Bases de Schiff com os grupos amino livres dos resíduos de aminoácidos. Este processo é também conhecido como reticulação.

Tan e col.⁴⁶ obtiveram monoglicerídeos (MG) por hidrólise do óleo de palma utilizando lipases imobilizadas em membranas de quitosana (QTS), poli (álcool vinílico) (PVA) e QTS/PVA reticuladas com glutaraldéido ou epicloridrina. A lipase de *R. oryzae* (LRO) imobilizada na membrana QTS/PVA foi a mais ativa na reação de hidrólise quando comparada com a LRO imobilizada nas membranas de QTS e PVA. As conversões em MG foram de 35-52%.

Kilinç e col.⁴⁷ imobilizaram a lipase pancreática do porco (LPP) em uma matriz obtida por ligações cruzadas entre o poli (álcool vinílico) (PVA) e dicloreto de adipofila, e utilizaram este sistema no estudo da reação de hidrólise da tributirina. Foram avaliados parâmetros como atividade da enzima (em diferentes pHs e temperaturas) e estabilidade (térmica, operacional e estocagem). Foi verificado que a atividade específica original da lipase manteve-se em 63%. Porém, o pH ótimo foi modificado de 8,5 para 9,0 e a temperatura de 30 para 37⁰C, após a imobilização.

✓ **Confinamento:** este método está dividido em imobilização em matriz e microcápsula. A imobilização da enzima via inclusão ou microencapsulação consiste em “prender” uma proteína em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula. Este é um processo similar ao de inclusão, embora neste caso a enzima seja envolvida totalmente pelo sistema.

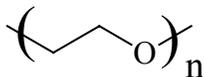
A vantagem de utilizar esta técnica é que a enzima interage quimicamente com o polímero, evitando assim a desnaturação. Entretanto, a transferência de massa através da membrana pode ser um problema. A velocidade de difusão dos substratos e produtos através da membrana é um fator limitante, e geralmente concentrações altas dos substratos são necessárias a fim de limitar esta influência. As enzimas encapsuladas apresentam melhor atividade com substratos pequenos do que com grandes, por estes não serem capazes de vencer a barreira imposta pela membrana e se aproximar do sítio ativo do biocatalisador.^{5,44}

Nagayama e col estudaram a esterificação do ácido láurico com *n*-butanol catalisada pela lipase de *Candida antarctica* imobilizada em organo-gel de lecitina (MBG). A gelatina também foi usada na composição do MBG. A atividade da lipase foi avaliada em função da água, gelatina e concentração da lecitina no gel.⁴⁸

A velocidade máxima da reação foi obtida em GLw (fração de volume em água em MBG) de 75% v/v, conteúdo de gelatina de 18,5% w/v e a concentração de lecitina de 18mM. A velocidade de reação foi influenciada pela mudança na composição de MBG. A lipase imobilizada foi reutilizada e a atividade foi totalmente preservada por 720 h.⁴⁸

1.6.1 Poli-(óxido de etileno) (PEO)

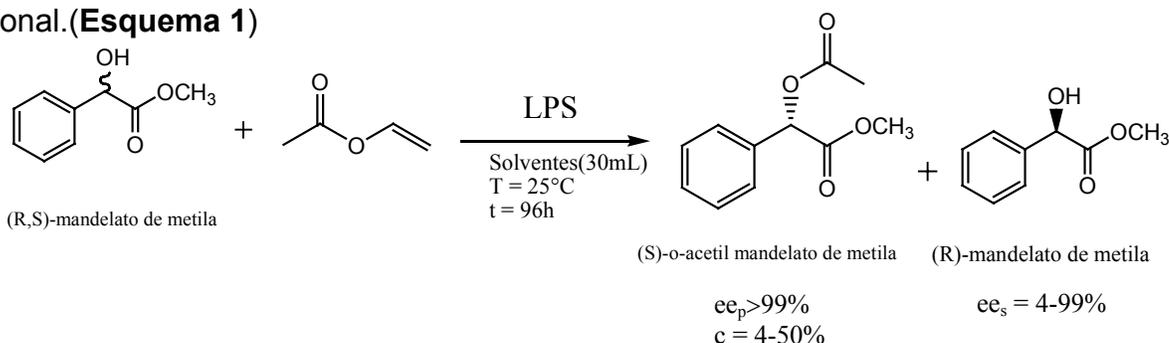
O poli-(óxido de etileno) (PEO) é um polímero formado por unidades monoméricas de óxido etileno (-CH₂CH₂O-), e de massa molar ~100.000 Daltons.



Monômero do PEO

1

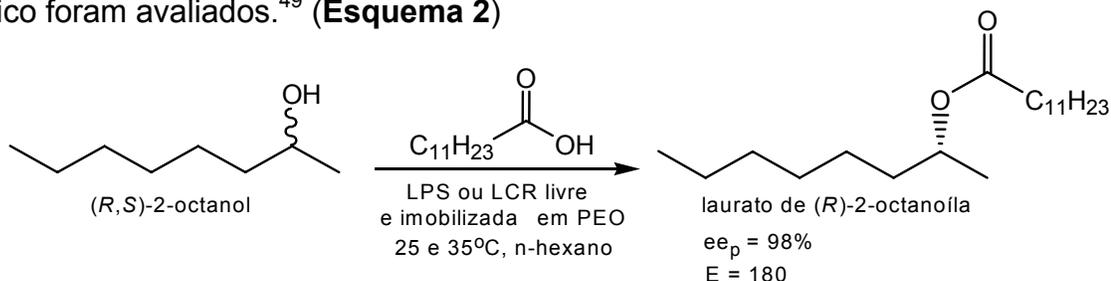
Queiroz e Nascimento¹¹ estudaram a acilação de (*R,S*)-mandelato de metila com acetato de vinila, catalisada pela lipase de *Pseudomonas sp.* imobilizada em PEO e em gel de ágar em éter *isopropílico*, *n*-hexano, *t*-butanol e acetona como meio reacional. (**Esquema 1**)



Esquema 1 – Acetilação de (*R,S*)-mandelato de metila.

A resolução cinética de (*R,S*)-mandelato de metila apresentou os melhores resultados com a lipase LPS imobilizada em filme de PEO. O grau de conversão foi de 50% e ambos os enantiômeros foram obtidos com pureza óptica $ee > 99\%$.

As lipases de *Candida rugosa* (LCR) e de *Pseudomonas sp* (LPS) imobilizadas em PEO foram usadas na reação de esterificação do ácido láurico com (*R,S*)-2-octanol. Parâmetros como massa do biocatalisador, tempo, temperatura, e efeito do solvente orgânico foram avaliados.⁴⁹ (**Esquema 2**)



Esquema 2 - Resolução do (*R,S*)-2-octanol catalisada por lipases livres ou imobilizada em PEO

O grau de esterificação aumentou em função do tempo, temperatura e massa do biocatalisador.

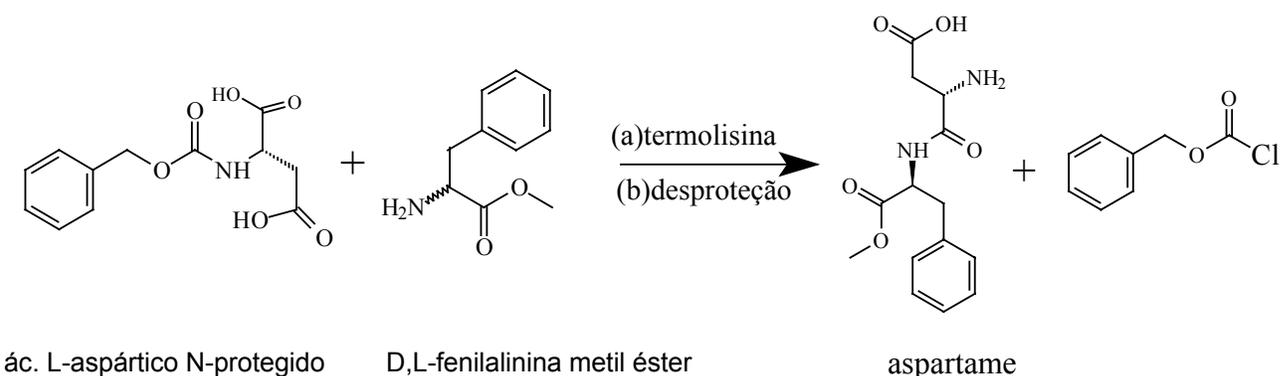
Em comparação com outros suportes, tais como, sílica, alumina ou celite, os polímeros hidrofóbicos como o poli-(óxido de etileno) e poli-propileno, levam a um aumento da atividade das enzimas. Nestes suportes, as enzimas são facilmente adsorvidas.^{49,50,51}

Estudos de microscopia eletrônica de varredura (MEV) realizada por Crespo, mostraram que não há diferença na morfologia de fratura do filme de PEO puro e com enzimas. Entretanto, a morfologia da superfície do filme de PEO puro e com enzimas revelaram que estes biocatalisadores estão localizados preferencialmente na superfície do material polimérico.^{45,49}

1.7 Aplicações de enzimas

O emprego crescente de enzimas na indústria justifica-se pela especificidade e eficiência com que estas catalisam as diferentes reações.^{52,53} O seu uso como catalisadores em reações sintéticas iniciou-se no século XX.^{54,55}

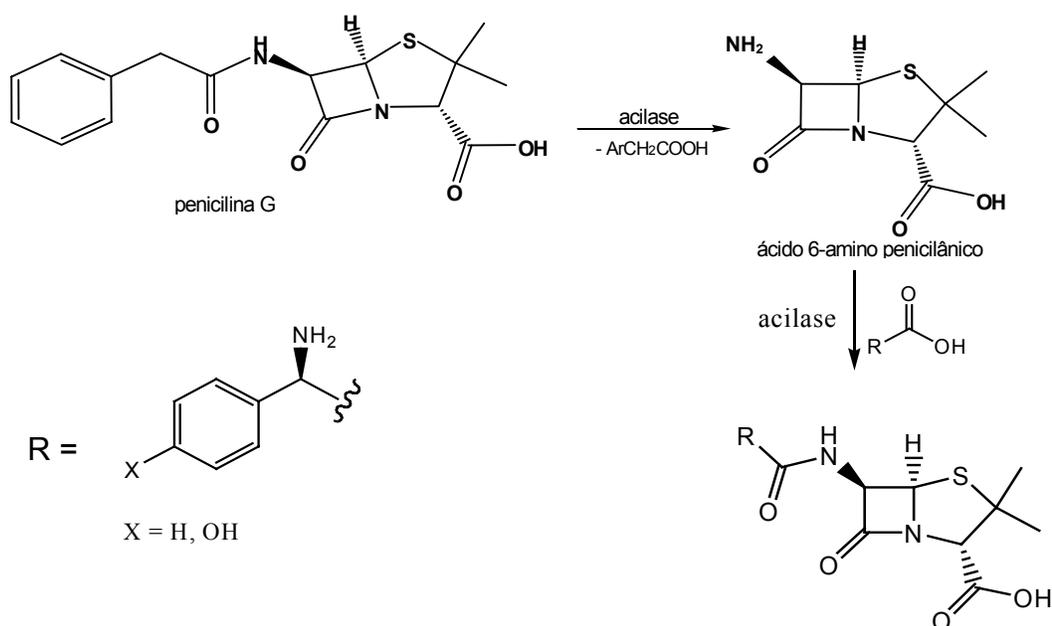
A Holland Sweetener Company produz o aspartame (éster metílico de L- α -aspartil-L-fenilalanina) usando uma enzima proteolítica, a termolisina que catalisa a formação deste dipeptídeo a partir do ácido L-aspartico *N*-protegido e éster metílico da D,L-fenilalanina (**Esquema 3**). O aspartame é um adoçante de baixo teor calórico.⁵³



Esquema 3 – Produção do aspartame usando a termolisina.

Outra aplicação de enzimas na indústria envolve a produção da penicilina G/V por processo de fermentação usando cepas de *Penicillium chrysogenum*, ou ainda cepas melhoradas através de engenharia genética.⁵³

Muitas das penicilinas, por exemplo, a penicilina G pode ser convertida por acilase aos correspondentes ácidos 6-aminopenicilânicos que atuam como materiais para a síntese de penicilinas semi-sintéticas, resultando na obtenção de vários derivados de penicilina com diferentes propriedades antibióticas (**Esquema 4**).



Esquema 4 – Hidrólise da penicilina G e obtenção de derivados com acilase.

Haki e Rakshit⁵⁶ revisaram os trabalhos que reportam o uso de enzimas termoestáveis em processos industriais, salientando os microorganismos extremófilos dos quais derivam estas proteínas.

A **Tabela 2** mostra algumas aplicações industriais de enzimas termoestáveis.

Tabela 2 – Aplicações de algumas enzimas termoestáveis.⁵⁶

Enzima	Faixa de temp. (°C)	Bioconversões	Aplicações
α -amilase (de bactéria)	90-100	amido→xaropes de dextrose	hidrólises de amido, preparo de bebidas fermentadas, cozimentos, detergentes
α -amilase (de fungo)	50-60	amido→xaropes de dextrose	produção de maltose
pululanase	50-60	amido→xaropes de dextrose	produção de xaropes de glicose
xilanase	45-65,105 ^a	poupa tratada→ xilana + lignina	indústria de polpa e papel
quitinase	65-75 ^b	quitina→quitobiase quitina→N-acetilglicosamina (quitibiase) N-acetilglicosamina→glicosamina (deacetilação) quitina→quitosana (deacetilase)	alimentos, cosméticos, farmacêuticos, agroquímicos
celulase	45-55,95 ^c	celulose→ glicose	hidrólise de celulose, degradação de polímeros em detergentes
protease	65-85	proteína→aminoácidos e peptídeos	preparo de bebidas fermentadas, cozimentos, detergentes, Indústria de couro
Lípase	30-70	remoção de gordura, hidrólises, interesterificações, alcoólises, aminólises	laticínios, óleos, detergentes, polpa, farmacêuticos, cosméticos. e indústria de couro
DNA polimerase	90-95	amplificações de DNA	engenharia genética/PCR

^aXilanase de *Thermotoga* sp; ^bDentro desta faixa, a atividade enzimática foi alta; ^cCelulases de *Thermotoga* sp.

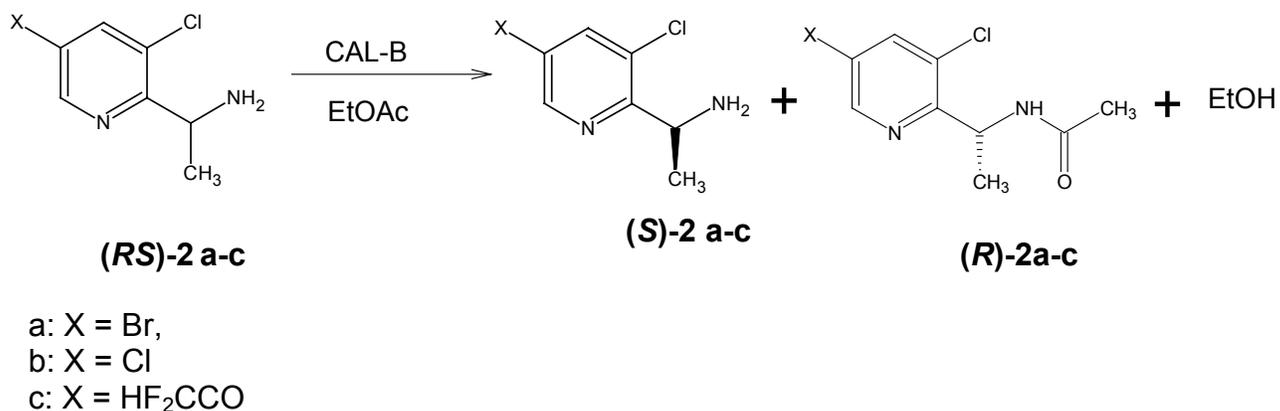
Conforme já mencionado, as enzimas hidrolíticas (lipases, proteases, amilases e celulases) são as mais freqüentes usadas em síntese orgânica, e devido às suas propriedades e vantagens na utilização, as lipases têm sido amplamente investigadas.^{40,43}

A seguir serão mostradas algumas aplicações adicionais das lipases, em especial em sínteses enantiosseletivas.

Yadav e Sivakumar⁵⁷ utilizaram as lipases Novozym 435 (lipase de *Candida antarctica*, CAL-B), lipozyme RM IM (lipase de *Rhizomucor miehei*) e lipozyme TL IM (lipase de *Thermomyces lanuginosus*) na resolução de (*R,S*)-mandelato de metila via hidrólise, para obter o (*R*)-(-) ácido mandélico, o qual é um intermediário importante na indústria farmacêutica. A Novozym 435 foi a mais efetiva na hidrólise de *R*-(-) mandelato

de metila, formando o produto com pureza óptica de 78% em 24 h. Parâmetros como velocidade de agitação, concentração do substrato e temperatura foram estudados.

Di Cosimo e col.⁵⁸ estudaram a acilação enantiosseletiva de vários (*R,S*)-2-(1-etil-amino)-3-cloro-5-(substituído)piridinas com a lipase de *Candida antarctica* e acetato de etila como agente acilante (**Esquema 5**).

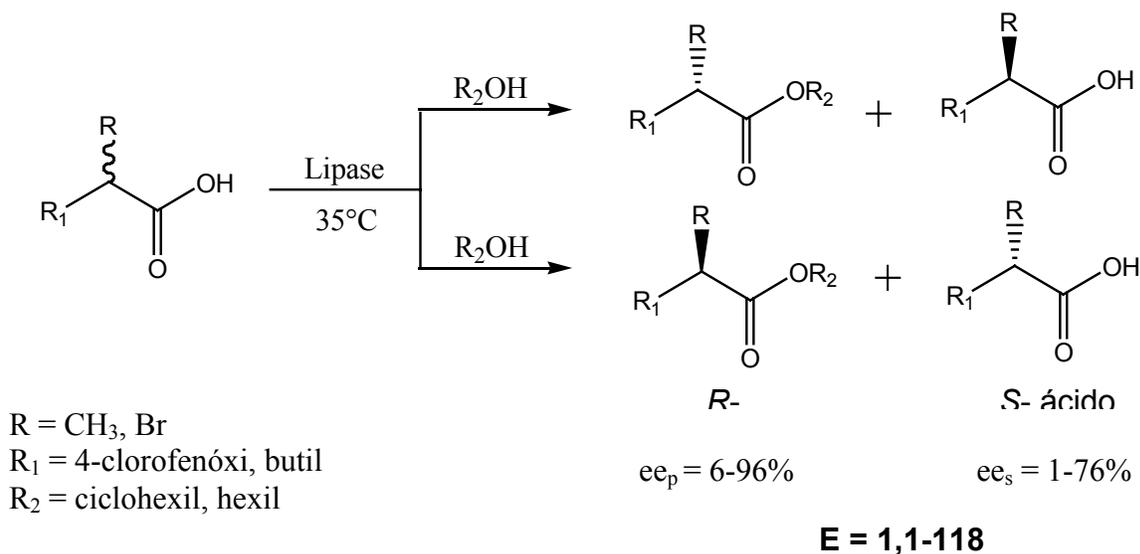


Esquema 5 – Acilação enantiosseletiva de (*R,S*)-2-(1-etil-amino)-3-cloro-5-(substituído)-piridina catalisada pela CAL-B.

O (*R*)-isômero de (*R,S*)-2-(1-etil-amino)-3-cloro-5-bromopiridina (**2a**) foi obtido com ee_s de 94%, 55% de conversão e E de 27.

A reação do (*R,S*)-2-(1-etil-amino)-3,5-dicloropiridina (**2b**) e (*R,S*)-2-(1-etil-amino)-3-cloro-5-(difluorometóxi)-piridina (**2c**) com acetato de etila catalisada pela CAL-B mostrou menor enantiosseletividade quando comparada com **2a**, sendo os valores de E de 6, 12 e 27, respectivamente.

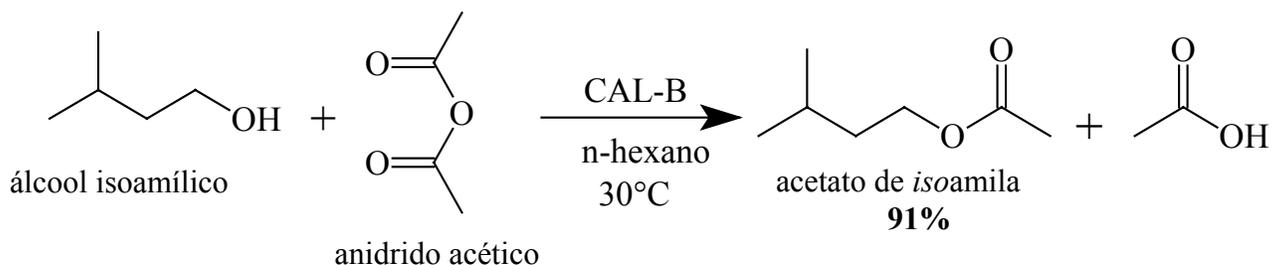
A resolução enzimática, mediada por lipases dos ácidos (*R,S*)-2-clorofenóxi propionico e (*R,S*)-2-bromo hexanóico, foi estudada por Nascimento e col.⁴⁹ Na resolução destes ácidos, os valores de ee_s obtidos foram de 1-76%, ee_p de 6-96% e E = 1,1-118. (**Esquemas 6**)



Esquema 6 – Resolução enzimática dos ácidos racêmicos catalisados pela LCR livre ou imobilizadas em PEO.

Romero e col⁵⁹ sintetizaram o acetato de *isoamila*, a partir do álcool *isoamílico* e anidrido acético catalisada pela CAL-B em *n*-hexano. Parâmetros reacionais tais como doador acila (ácido acético, acetato de amônia, acetato de etila e anidrido acético), temperatura, razão enzima/substrato e concentração do substrato foram avaliados. O melhor resultado foi obtido com o anidrido acético, formando o éster com 91% de rendimento. (**Esquema 7**)

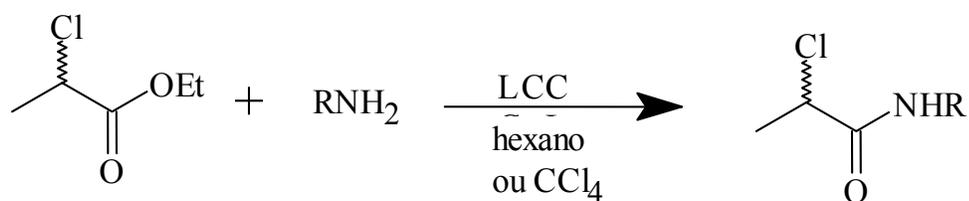
Os ésteres de cadeia curta, que são fragrâncias e flavorizantes, são também largamente usados na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. O acetato de *isoamila* é o mais empregado em alimentos (74.000 kg/ano), devido ao seu cheiro de banana.



Esquema 7 – Síntese do acetato de *isoamila* catalisada pela CAL-B.

O uso de lipases para formar ligações amídicas em solventes orgânicos foi prenunciado vários anos atrás⁶⁰ e a reação de aminólise enzimática foi aplicada na síntese preparativa de peptídeos por Klibanov⁶¹ e Wong.⁶² Alguns exemplos dos peptídeos preparados via enzimática são *N*-acetil-*L*-fenilalanil-*L*-leucinamida, *N*-acetil-*L*-fenilalanil-*L*-alanilamida e *N*-acetil-*L*-fenilalanil-*D*-leucinamida.

O uso de lipases para a preparação de amidas quirais foi também demonstrado na reação de resolução do cloropropionato de etila racêmico com várias aminas aromáticas e alifáticas.⁶³ (**Esquema 8**)



R = alquila, 2-25⁰C

R = arila, 60⁰C

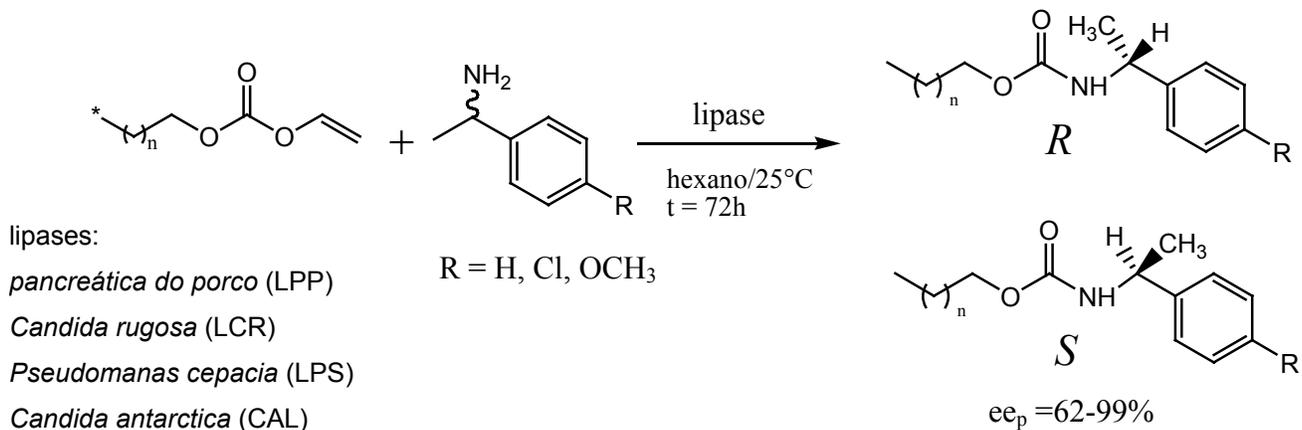
LCC = lipase de *Candida cylindracea*

(*S*)-amida ee = 40-95%

Esquema 8 – Síntese enzimática de amidas opticamente puras.

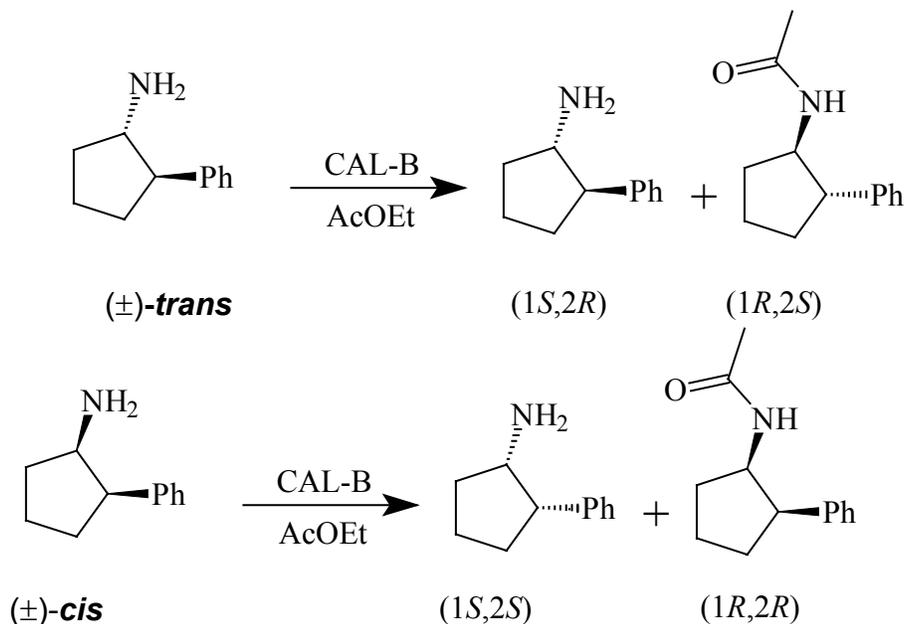
As lipases também têm sido usadas na preparação de algumas amidas quirais pela aminólise de ésteres.

Soledade e col.⁶⁴ sintetizaram derivados do carbamato usados na obtenção de compostos com propriedades inseticidas, utilizando diferentes lipases. Os produtos foram obtidos com valores de ee elevados a moderados, sendo que o carbamato foi obtido com a configuração *R*. (**Esquema 9**).



Esquema 9 – Síntese estereosseletiva de derivados do carbamato.

Rebolledo e col⁶⁵ estudaram a resolução cinética de (±)-*trans* e (±)-*cis*-2-fenilciclopentanamina catalisada pela CAL-B (**Esquemas 10**).



Esquema 10 – Acetilação de (±)-*trans* e (±)-*cis*-2-fenilciclopentanamina catalisada pela CAL-B.

Na reação entre (\pm)-*trans*-2-fenilciclopentanamina e acetato de etila a porcentagem de conversão foi de 50% e $E > 200$, e a acetilação de (\pm)-*cis*-2-fenilciclopentanamina a conversão e razão enantiomérica foram menores, sendo de 16 e 28%, respectivamente.

Uma grande diferença na velocidade e enantiosseletividade da reação foi observada para ambos diastereoisômeros, indicando a influência da configuração do carbono-2 na atividade da enzima.

1.8 Líquidos iônicos na biocatálise

Os líquidos iônicos são líquidos à temperatura ambiente, não voláteis, termicamente estáveis, moderadamente hidrofílico, apresentam alta condutividade térmica, alta viscosidade e possuem a habilidade de dissolver uma grande variedade de compostos orgânicos, inorgânicos e poliméricos. Estes sais são formados por um cátion e um ânion e representam uma nova classe de solventes polares os quais são considerados “ambientalmente verdes”.^{66,67,68} (Figura 8).

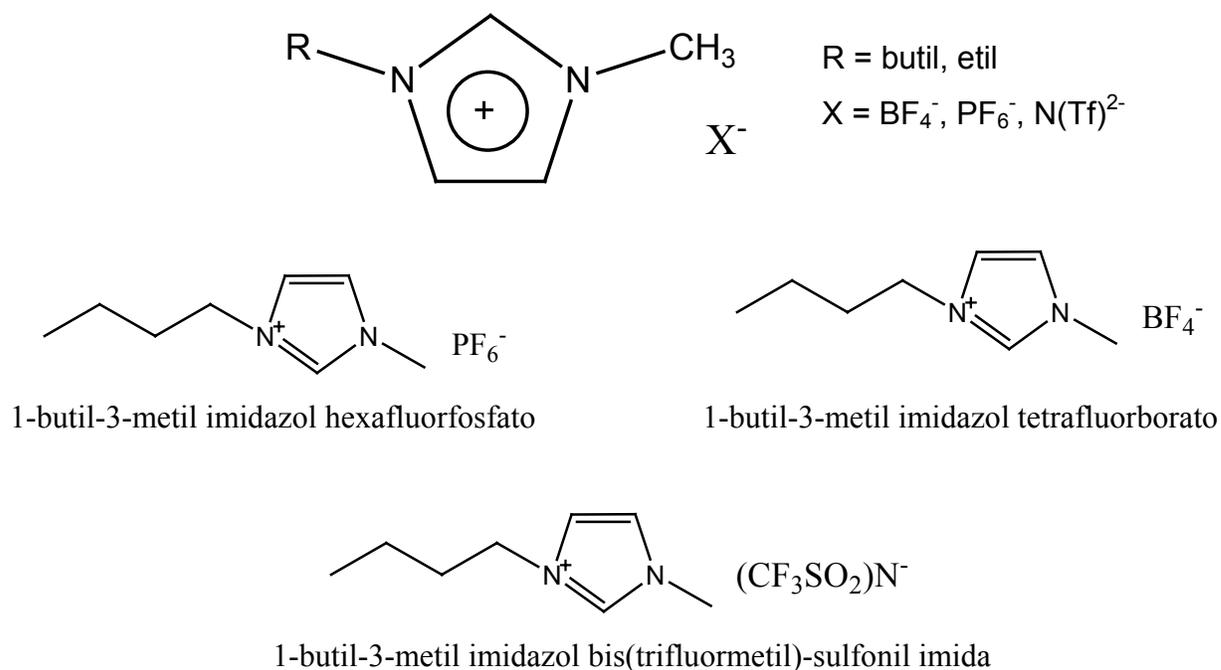


Figura 8 – Representação estrutural dos líquidos iônicos e exemplos dos mais utilizados em biocatálise.

São solventes promissores na biocatálise, e seu uso pode aumentar a atividade, seletividade, estabilidade e enantiosseletividade enzimática quando comparado aos solventes orgânicos convencionais.^{69,70} A combinação de diferentes cátions ou ânions possibilita obter uma grande variedade de líquidos iônicos, cada um com suas propriedades específicas de solvatação resultando em sistemas miscíveis ou imiscíveis.⁷¹

Como mencionado, os líquidos iônicos são altamente polares e sua polaridade é determinada através do coeficiente de partição (indica a hidrofobicidade do solvente) e também pelo método solvatocrômico⁷² (**Equações 6, 7 e 8** respectivamente)

$$\text{Log P} = [\text{solute}] \text{ fase octanol} / [\text{solute}] \text{ fase aquosa} \quad \text{Equação 6}$$

$$E_t (\text{solvente}) [\text{Kcal/mol}] = 28591/\lambda_{\text{max}}(\text{nm}) \quad \text{Equação 7}$$

$$E_t^N (\text{solvente}) = E_t (\text{solvente}) - 30,7 / 32,4 \quad \text{Equação 8}$$

Outra vantagem em utilizar líquidos iônicos como solvente, é que eles podem ser reutilizados.^{69,70}

Geralmente os líquidos iônicos podem ser usados de três modos diferentes, ou seja, como solvente puro, como co-solvente em meio aquoso ou em sistema bifásico ou trifásico.

Na **Figura 9**, tem-se um exemplo do uso do líquido iônico em sistema trifásico.⁷³

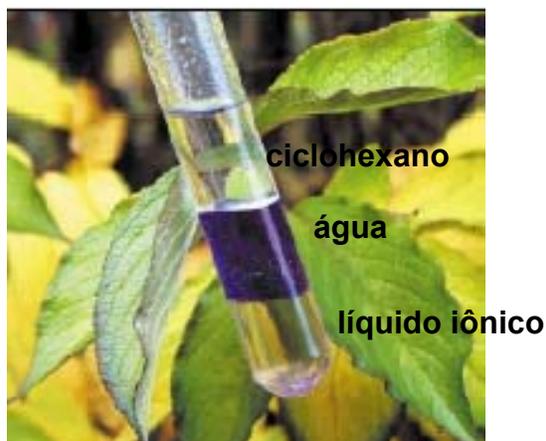
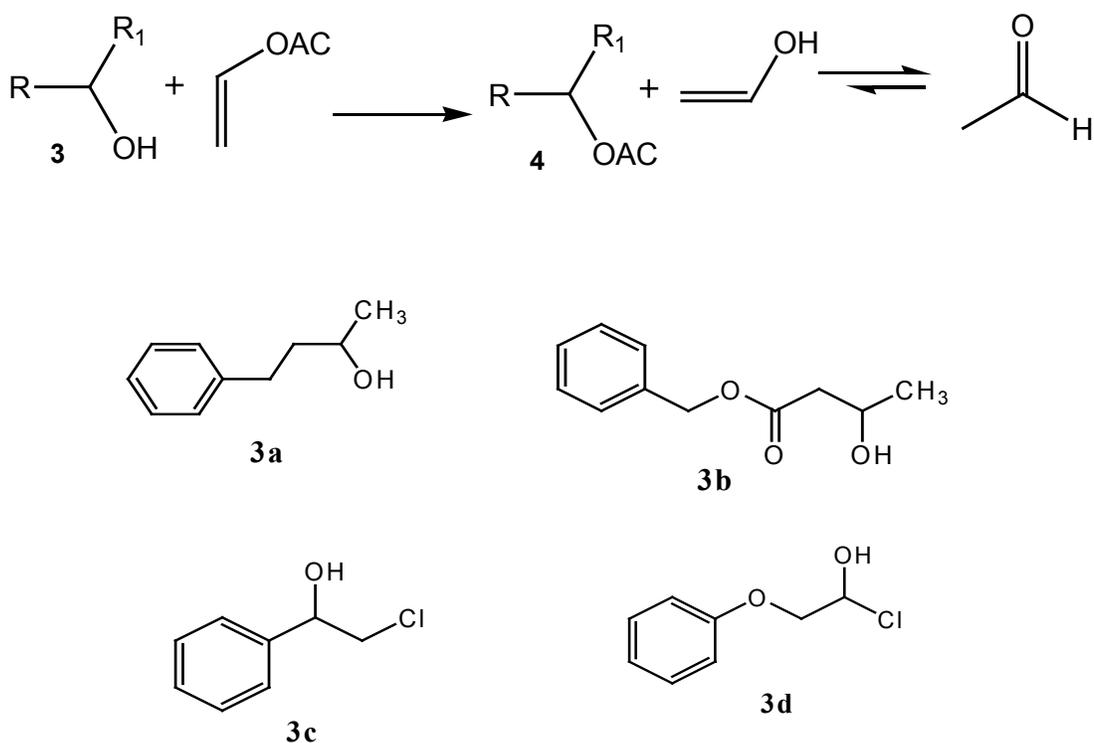


Figura 9 - Líquidos iônicos em sistema trifásico.

1.8.1 Aplicações dos líquidos iônicos na biocatálise

Kim e col.⁶⁹ utilizaram as lipases de *Candida antarctica* (CAL-B) e *Pseudomonas cepacia* (LPC) na reação de transesterificação dos compostos **3a-d**. Os líquidos iônicos 1-etil-3-metil imidazol tetrafluorborato – [EMIm] [BF₄] e 1-butil-3-metil imidazol hexafluorofosfato – [BMIm] [PF₆], foram usados como meio reacional e os resultados comparados com THF e tolueno. Como agente acilante utilizou-se o acetato de vinila. A enantiosseletividade de CAL-B foi estudada para a reação de **3a** e **3b**, e a enantiosseletividade da LPC para os compostos **3c** e **3d**. (**Esquema 11**)



Esquema 11 – Transesterificação dos compostos **3a-d** catalisada por lipases.

Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 3**.

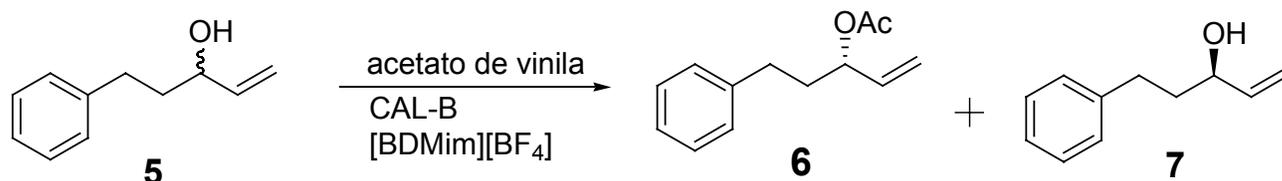
Tabela 3 – Transesterificação enantiosseletiva catalisada por lipases em solventes orgânicos e líquidos iônicos.⁶⁹

substrato	lipase	solvente	ee _s (%)	ee _p (%)	E
3a	CAL-B	THF	92	95	141
		tolueno	97	96	207
		1	91	99	648
		2	79	> 99	>967
3b	CAL-B	THF	80	82	26
		tolueno	97	95	187
		1	94	98	651
		2	67	94	155
3c	LPC	THF	18	95	56
		tolueno	42	98	158
		1	39	98	183
		2	12	>99	>450
3d	LPC	THF	42	98	150
		tolueno	41	96	85
		1	49	98	172
		2	85	>99	>1000

substrato (**3a**, **3b**, **3c** e **3d**) (0,15 mmol), lipase (20mg), acetato de vinila (1,5 - 3 equiv.) e solvente (1mL) at 25°C. 1 = [BMIm] [BF₄]; 2 = [BMIm][PF₆].

Observou-se que as lipases foram 25 vezes mais enantiosseletivas em líquidos iônicos do que em solventes orgânicos convencionais.

Itoh e col.⁷⁴ estudaram a reação de transesterificação do 5-fenil-1-penten-3-ol (\pm) (**5**) com acetato de vinila como agente acilante, e com a CAL-B como catalisador. Esta reação foi realizada em 1-butil-2,3-dimetil imidazol tetrafluorborato [BDMIm] [BF₄] e 1-butil-2,3-dimetil imidazol hexafluorofosfato [BDMIm] [PF₆] (**Esquema 12**).



Esquema 12 – Reação de transesterificação catalisada por lipase em líquidos iônicos.

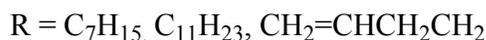
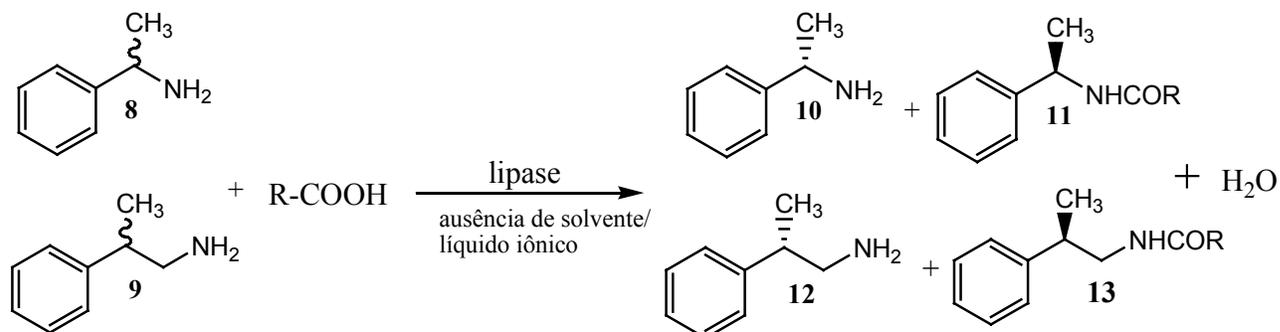
A reação usando [BDMIm] [BF₄] procedeu em condições suaves e foi possível usar a CAL-B 10 vezes repetidamente, mantendo a enantiosseletividade ($E > 200\%$ e $ee_p > 99\%$) e alta reatividade (31-36%), conforme mostrado na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Reutilização da CAL-B na resolução enantiosseletiva de **5**.

re-utilização	tempo (h)	c (%)	ee_p (%) - 5	E
1	2	33	>99	>200
2	3	34	>99	>200
3	3	34	>99	>200
4	3	31	>99	>200
5	3	30	>99	>200
6	3	30	>99	>200
7	3	34	>99	>200
8	3	36	>99	>200
9	3	36	>99	>200
10	3	36	>99	>200

CAL-B (25mg), [BDMIm] [BF₄] (1,5 mL), substrato (**5**) (0,30 mmol), acetato de vinila (0,45 mmol), 35°C.

Kato e col.⁷⁵ estudaram a acilação enantiosseletiva do 1-fenil etilamina (**8**) e 2-fenil-1-propilamina (**9**) com ácidos carboxílicos catalisada pela CAL-B, na ausência de solvente orgânico ou presença de líquidos iônicos. (**Esquema 13**).



Esquema 13 – Acilação enantiosseletiva do 1-fenil etilamina (**8**) e 2-fenil-1-propilamina (**9**) catalisada pela CAL-B.

A reação com ácido 4-pentenóico na ausência de solvente foi mais lenta para a amina **8**, formando o produto com conversão de 0,6%. Porém, procedeu mais rapidamente para a amina **9**, formando o produto com conversão de 38,2%. Isto se deve ao fato de que provavelmente a amina **9** pode acessar mais facilmente o sítio ativo da enzima devido ao centro estereogênico estar distante do grupo amino. Os valores de E variaram de 6 >500 para as aminas **8** e **9**, respectivamente.

Quando utilizaram os líquidos iônicos [BMIm][PF₆] e [EMIm][BF₄], a enantiosseletividade da amina **8** manteve-se alta em ambos solventes, sendo o valor de E >500, e obteve-se um aumento na porcentagem de conversão de 48,9 e 20,7, quando comparado com o sistema na ausência de solvente, respectivamente. Diferentes resultados foram obtidos para a reação usando a amina **9** com ácido 4-pentenóico, sendo E de 2 em ambos líquidos iônicos.

Maiores valores de conversão foram também alcançados com o uso de líquidos iônicos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Tendo em vista a relevância de compostos enantiomericamente puros e o uso de enzimas como catalisadores para obtenção destes, este trabalho tem como finalidade avaliar a eficiência de diversas lipase livres e/ ou imobilizadas na reação de aminólise do (*R,S*)-mandelato de metila com *n*-butilamina e na preparação do acetato de geranoila com alto rendimento.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar a amida racêmica (*R,S*)-*N*-butil-2-hidróxi-2-fenilacetamida e as enantiomericamente puras (*R*)-*N*-butil-2-hidróxi-2-fenilacetamida e (*S*)-*N*-butil-2-hidróxi-2-fenilacetamida via não enzimática, que serão utilizadas como padrões nas análises em cromatografia gasosa de fase estacionária quiral (CGQ).
- Caracterizar as amidas (*R,S*), (*R*) e (*S*)- *N*-butil-2-hidróxi-2-fenilacetamida por técnicas espectroscópicas de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono, e cromatografia gasosa com fase estacionária quiral (CGQ).
- Avaliar a eficiência quanto a enantiosseletividade das lipases de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM), de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM), de *Mucor miehei* (Lipozyme IM), de *Pseudomonas cepacia* (lipase PS), lipase PS imobilizada em terra diatomácea (PS-D), lipase PS imobilizada em partículas de cerâmica (PS-C), PS, PS-C e PS-D livres ou imobilizadas em PEO poli-(óxido de etileno) e da lipase de *Candida antarctica* (CAL-B) na reação de aminólise enantiosseletiva do (*R,S*)-mandelato de metila com *n*-butilamina.
- Avaliar a influência de solvente orgânico (*n*-hexano, clorofórmio e *t*-butanol) e em misturas com os líquidos iônicos 1-butil-3 metil imidazol tetrafluorborato [BMIm][BF₄] e

1-butil-3-metil imidazol hexafluorofosfato [BMIm][PF₆], na obtenção das amidas quirais citadas anteriormente utilizando lipases.

- Estudar o efeito da temperatura, e quantidade da CAL-B na reação do (*R,S*)-mandelato de metila com *n*-butilamina.
- Preparar e caracterizar o acetato de geranoíla, via enzimática utilizando as lipases de *Aspergillus niger* (LASP), *Pseudomonas cepacia* (LPS), lipase PS imobilizada em terra diatomácea (PS-D), lipase PS imobilizada em partículas de cerâmica (PS-C), e de *Candida antarctica* (CAL-B).
- Comparar os resultados obtidos neste trabalho com outros reportados na literatura.

3- Parte experimental

3.1 Materiais

Na preparação do suporte, filme de poli-(óxido de etileno), PEO, utilizou-se PEO da Aldrich. Algumas informações adicionais são fornecidas abaixo:

- PEO com massa molar de 300.000 daltons (lote 01729JZ).

Para a realização deste trabalho utilizaram as enzimas: lipases de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM) (5-6 BAUN g⁻¹), *Thermomices lanuginosus* (Lipozyme TL IM) (250 IUN g⁻¹), *Mucor miehei* (Lipozyme IM) (5-6 BAUN g⁻¹) e lipase de *Candida antarctica* (imobilizada em macroporos de resina acrílica) (Novozym 435 – CAL-B) (10,000 Plu g⁻¹) fornecidas pela Novozymes. As lipases de *Pseudomonas* sp (LPS) (30,000 U g⁻¹), *Pseudomonas* sp. (PS-D) (imobilizadas em terra diatomácea) (500 U g⁻¹), lipase *Pseudomonas* sp. (PS-C) (imobilizadas em partículas de cerâmica quimicamente modificada com grupos metacrílicos) (600 U g⁻¹) foram fornecidas pela Amano. A lipase de *Aspergillus niger* (18,2 U/mL) foi doada pela Profa. Patrícia Carvalho da Universidade de São Francisco (USF), Bragança Paulista-SP, e foi isolada de um microorganismo da região de Bueno Brandão (MG), purificada e identificada conforme descrito na literatura.¹⁰

Os solventes e reagentes foram das seguintes procedências:

- **Aldrich:** clorofórmio deuterado, 1-metilimidazol;
- **Merck:** metanol;
- **F.Maia:** tolueno, tetrahidrofurano(THF);
- **Sigma:** ácido (*R,S*)-hidróxi(fenil) acético, (*R*)-hidróxi(fenil) acético e (*S*)-hidróxi(fenil) acético.
- **Vetec:** *n*-butilamina, *t*-butanol, éter-*isopropílico*, *n*-hexano, acetona, clorofórmio, bicarbonato de sódio, sulfato de magnésio anidro, diclorometano;
- **Dinâmica:** éter etílico;
- **Nuclear:** piridina;
- **Strem Chemicals Inc:** hexafluorofosfato de potássio;
- **Across:** tetrafluorborato de sódio;

3.2 Caracterização dos compostos

Os compostos foram caracterizados por análises espectroscópicas (IV, RMN ^1H , RMN ^{13}C) e por cromatografia gasosa com fase quiral (CGQ) por comparação com padrões.

3.2.1 Espectrofotometria no infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro da Perkin Elmer FT-16-PC, em pastilha de KBr. O padrão de referência usado foi um filme de poliestireno com absorção em 1028 cm^{-1} .

3.2.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono (RMN ^{13}C) foram obtidos no espectrômetro Bruker AC 200MHz e Varian 400 MHz, utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$). O solvente utilizado foi o clorofórmio deuterado.

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

3.2.3 Cromatografia gasosa com fase quiral

Os excessos enantioméricos dos produtos e substratos das reações de biocatálise foram monitorados no cromatógrafo gasoso da marca Shimadzu-14B. A coluna capilar utilizada foi Chrompack (CP 7502), Varian (CP 7502) constituída da fase CP-chirasil Dex CB (25m X 0,25mm ID X 0,25 μm). Nesta fase a molécula de β -ciclodextrina está quimicamente ligada ao filme de dimetilpolisililoxano. Esta ligação impede a ciclodextrina de migrar para diferentes localidades na superfície do filme. Desta forma a enantiosseletividade é homogênea através da fase, resultando em um maior fator de

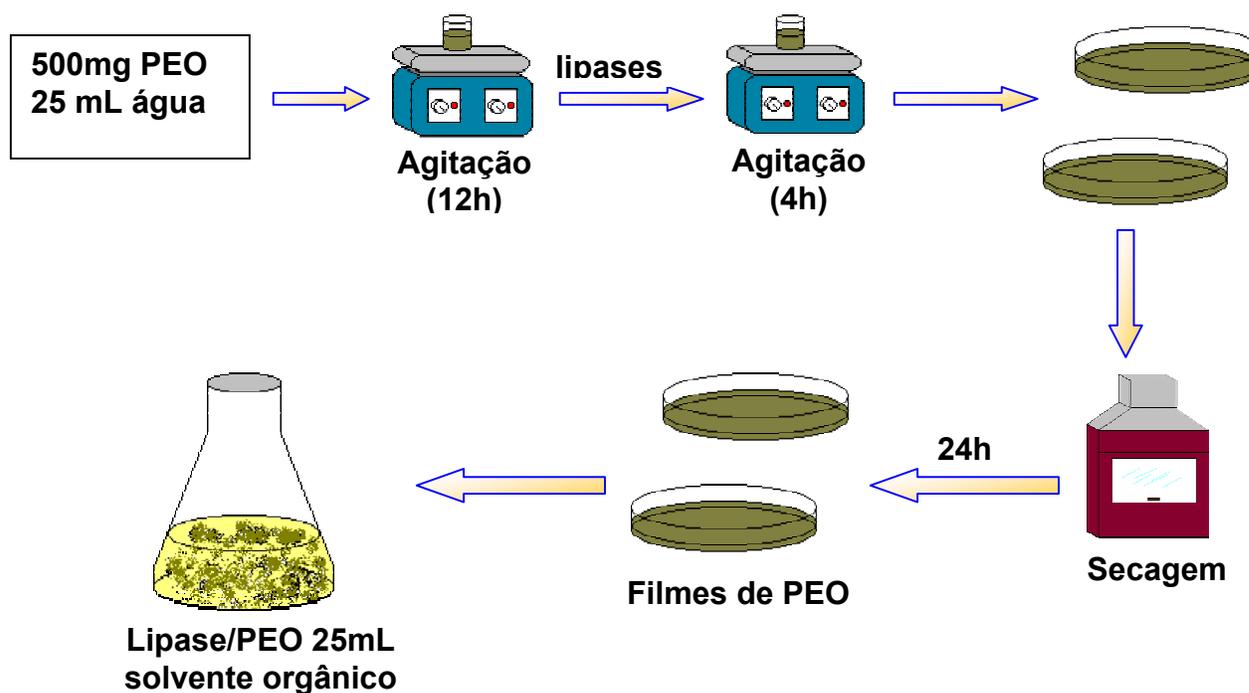
resolução entre os isômeros. (Chrompack, CP Chirasil-Dex CB. 1999, www.chrompack.com e Varian CP Chirasil-Dex CB.2005 varianbr@varianinc.com.br).

As condições de análise da CGQ (cromatografia gasosa com fase quiral) foram determinadas para cada composto. Primeiramente, os padrões racêmicos previamente sintetizados foram submetidos a CGQ para obter as melhores condições de separação dos enantiômeros. Posteriormente, os produtos de síntese foram analisados sob as mesmas condições. A programação utilizada para separar os enantiômeros dos substratos e produtos está descrita nos itens **4.2** e **4.4** em resultados e discussão.

3.3 Preparação das lipases imobilizadas

3.3.1 Imobilização de lipases em filmes de PEO

Em um béquer contendo 25 mL, de água adicionou-se 500mg de PEO e a solução foi agitada por 12 horas. Após este período, colocou-se a massa de lipase conhecida*. O sistema foi agitado por mais 4 horas para completa solubilização da enzima. A solução resultante foi depositada em um recipiente de teflon e colocada sobre um banho de areia a 40°C. Desta forma obteve-se o filme de PEO após a evaporação da água. O filme de PEO contendo a enzima foi retirado do recipiente, cortado em pequenas secções e guardado em solvente orgânico para uso posterior nas sínteses assimétricas. (**Esquema 14**)



Esquema 14 – Imobilização de lipases em filme de PEO.

* As concentrações serão especificadas no decorrer dos resultados e discussões para cada reação

3.4 Preparação de líquidos iônicos

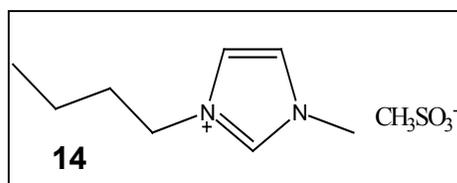
3.4.1 Preparação do butil metanosulfonato ($\text{CH}_3\text{SO}_3\text{Bu}$)

Em um balão de 2000mL adaptado com um funil de adição, adicionou-se diclorometano (1000mL), trietilamina (Et_3N ; 1,60mol, 161,6g), *n*-butanol (*n*-BuOH; 1,60mol, 118,4g) e o restante do diclorometano (400mL). A seguir adicionou-se cloreto de metano sulfonila ($\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$; 1,60mol, 183,2g) com agitação vigorosa e lentamente para evitar o aquecimento da solução. A temperatura foi mantida entre 10-20°C, controlada com banho de gelo. Após a adição, agitou-se a solução por duas horas a temperatura ambiente. Posteriormente, lavou-se a fase orgânica com água (2x 300mL), separou a fase orgânica e secou com carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3). Evaporou-se o solvente orgânico, seguido de destilação sob pressão reduzida. O butil metanosulfonato foi obtido com 93% de rendimento, como líquido incolor (pe = 80-82°C).⁷⁶

3.4.2 Preparação do 1-butil-3-metil-imidazol metanosulfonato (**14**)⁷⁶

Em um balão de 250mL, misturou-se butil metanosulfonato ($\text{CH}_3\text{SO}_3\text{Bu}$; 1,59mol, 241,9g) com 1-metilimidazol (1,59mol, 130,5g), e a mistura reacional foi mantida à temperatura ambiente (deixou-se um banho de gelo próximo, pois a solução aquece um pouco). Após 24h, adicionou-se alguns cristais de 1-butil-3-metil imidazol metanosulfonato para auxiliar a cristalização do composto, e a mistura reacional foi mantida a temperatura ambiente por 72 horas até todo o imidazol ser consumido.

A recristalização foi realizada duas vezes usando acetona à quente como solvente. O 1-butil-3-metil-imidazol metanosulfonato foi obtido com 96% de rendimento como um sólido branco (pf = $77,1^\circ\text{C}$), e como é muito hidrocópico este foi mantido sob vácuo.

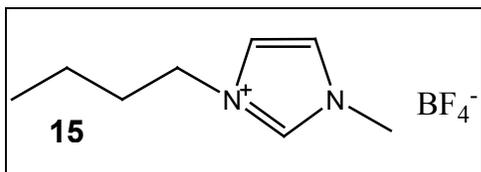


RMN ^1H (300, MHz, CDCl_3), δ 9,67 (s, 1H, C-H imidazol), 7,47 (s, 1H, J = 1,8Hz, C-H imidazol), 7,36 (s, 1 H, J = 1,8Hz, C-H imidazol), 4,1 (s, 2H, J = 7,2Hz, NCH_2), 3,89 (s, 3H, NCH_3), 2,59 (s, 3H, CH_3SO_3), 1,72 (quin, 2H, J = 7,2Hz, CH_2), 1,20 (sext, 2H, J = 7,2Hz, CH_2), 0,79 (t, 3H, J = 7,2Hz, CH_3).

RMN ^{13}C (300, MHz, CDCl_3), δ 137,4, 123,5 e 121,8 (C-H imidazol), 49,2 (NCH_2), 39,4 (CH_3SO_3), 35,9 (NCH_3), 31,7 e 19,0 (CH_2), 13,0 (CH_3).

3.4.3 Preparação do 1-butil-3-metil imidazol tetrafluorborato [**BMIm**][**BF₄**] (**15**)^{76,77}

Em um béquer de 250mL, adicionou-se 1-butil-3-metil imidazol metanosulfonato (**14**) (46,2mmol, 10,83g), tetrafluorborato de sódio (48,2mmol, 5,3g), água destilada (10mL), agitou-se vigorosamente por 30 minutos. A fase aquosa foi separada e descartada, e ao restante do líquido adicionou-se tetrafluorborato de sódio (3,6mmol, 0,4g) e água destilada (1mL). Agitou-se continuamente por 15 minutos, e posteriormente adicionou-se diclorometano (30mL). A fase orgânica foi separada, seca com carbonato de sódio anidro e filtrada. Evaporou-se o solvente, e o composto foi seco sob de vácuo. O 1-butil-3-metil imidazol tetrafluorborato foi obtido com 79% de rendimento, como um líquido incolor viscoso.



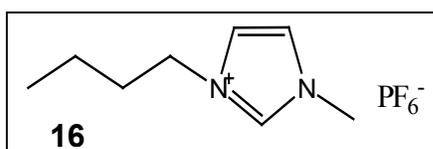
IV(KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$ 3160 e 3119 [ν (C-H) aromático], 2963, 2938 e 2876 [ν (C-H) alifático], 1573 e 1171 [ν (C=C)], 1061 [ν (BF)].

RMN ^1H (300 MHz, acetona d_6), δ 9,55 (s, 1H, C-H imidazol), 7,85 (s, 1H, C-H imidazol), 7,79 (s, 1 H, C-H imidazol), 4,40 (t, 2H, $J = 7,1\text{Hz}$, NCH_2), 4,07 (s, 3H, NCH_3), 1,93 (m, 2H, CH_2), 1,37 (m, 2H, CH_2), 0,95 (t, 3H, $J = 7,3\text{Hz}$, CH_3).

RMN ^{13}C (75 MHz, acetona d_6), δ 138,9 (C-H imidazol), 124,0 (C-H imidazol), 122,7 (C-H imidazol), 49,4 (NCH_2), 35,9 (NCH_3), 32,2 (CH_2), 19,3 (CH_2), 13,1 (CH_3).

3.4.4 Preparação do 1-butil-3-metil imidazol hexafluorofosfato [BMIm][PF₆] (16)^{76,77}

Em um béquer de 250mL, adicionou-se 1-butil-3-metil imidazol metanosulfonato (14) (55,6mmol, 13,0g), hexafluorofosfato de potássio (61,3mmol, 11,3g) e água destilada (30mL), e agitou-se vigorosamente por 30 minutos. A fase aquosa foi separada e descartada, e ao restante do líquido adicionou-se hexafluorofosfato de potássio (2,7mmol, 0,5g) e água destilada (5mL). Agitou-se continuamente por 15 minutos, e posteriormente adicionou-se diclorometano (30mL). A fase orgânica foi separada, seca com carbonato de sódio anidro e filtrada. Evaporou-se o solvente e o composto foi seco sob vácuo. O 1-butil-3-metil imidazol tetrafluorborato foi obtido com 95% de rendimento, como um líquido incolor viscoso.



IV(KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$ 3171 e 3125 [ν (C-H) aromático], 2965, 2939 e 2878 [ν (C-H) alifático], 1571 e 1167 [ν (C=C)], 836 [ν (PF)].

RMN ^1H (300 MHz, acetona d_6), δ 8,95 (s, 1H, C-H imidazol), 7,74 (s, 1H, C-H imidazol), 7,68 (s, 1 H, C-H imidazol), 4,36 (t, 2H, $J = 7,3\text{Hz}$, NCH_2), 4,05 (s, 3H, NCH_3), 1,93 (m, 2H, CH_2), 1,37 (m, 2H, CH_2), 0,96 (t, 3H, $J = 7,3\text{Hz}$, CH_3).

RMN ^{13}C (75 MHz, acetona d_6), δ 137,0 (C-H imidazol), 124,1 (C-H imidazol), 122,7 (C-H Imidazol), 49,6 (NCH_2), 36,0 (NCH_3), 32,1 (CH_2), 19,3 (CH_2), 13,0 (CH_3).

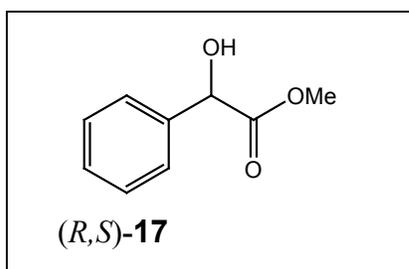
3.5 Síntese não enzimática dos reagentes racêmicos e padrões quirais

3.5.1 Preparação do (*R,S*)-mandelato de metila (**17**)

Em um balão de 250mL colocou-se 0,7g (5mmol) de (*R,S*)-ácido hidróxi (fenil) acético em 10mL de metanol e 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄). A solução foi refluxada por 5 horas, sendo acompanhada por cromatografia de camada delgada (ccd). O excesso de metanol foi evaporado e o produto dissolvido em éter etílico. Lavou-se com H₂O (3x 20mL), seguido por solução de bicarbonato de cálcio saturado (3x 20mL) até remover todo ácido sulfúrico. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro (MgSO₄) e evaporou-se o solvente. O composto (*R,S*)-mandelato de metila (**17**) foi obtido com 75% de rendimento como um sólido branco (pf = 53-54°C).

Os compostos (*R*)-**18** e (*S*)-**19**, foram preparados através da mesma metodologia.

O (*R*)-mandelato de metila (**18**), apresentou rotação óptica específica $[\alpha] = -121,6$ [0,017, CHCl₃, enquanto o (*S*)-mandelato de metila (**19**), foi de $[\alpha] = +128,6$ [0,012, CHCl₃], e o (*R,S*)-mandelato de metila, (**17**), $[\alpha] = 0$. Estes valores foram comparados com as da literatura, sendo que para o (*R*)-**18** é de $[\alpha] = -146$ [2, MeOH] e para o (*S*)-**19** é de $[\alpha] = +142$ [2, MeOH].⁷⁸



IV(KBr)v(cm⁻¹) 3070[v (C-H) aromático], 3444 [v (OH)], 1740 [v (C=O)]

RMN ¹H (200, MHz, CDCl₃), δ 7,25-7,39 (m, 5H, C-H aromático) 5,17 (s, 1H, OCH), 3,45 (s, 1H, OH), 3,75 (s, 3H, OCH₃).

RMN ¹³C(200, MHz, CDCl₃), δ 173,7 (C=O), 138, 17 (C aromático), 128,2 e 126,4 (C-H aromático), 72,7 (CH-O), 52,5 (OCH₃).

Rf = 0,38 (hexano:acetato de etila 8:2 v/v)

Os espectros de IV, RMN ¹H e RMN ¹³C são idênticos para os compostos (*R,S*)-**17** (*R*)-**18** e (*S*)-**19**, pois estes possuem comportamento espectroscópico e propriedades físicas (ponto de ebulição e fusão) semelhantes. Porém, o sentido da rotação do plano da luz polarizada é diferente para cada um dos enantiômeros.^{24,25}

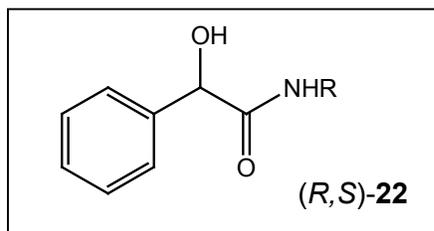
3.5.2 Preparação da (*R,S*)-*N*-butil-2-hidróxi-2-fenilacetamida (**22**)

Em um balão de 250mL colocou-se 0,17g (1mmol) de (*R,S*)- mandelato de metila (**17**) em 15mL de clorofórmio, adicionou-se *n*-butilamina 0,1mL (1mmol) e 2 gotas de piridina. A solução foi refluxada por 10 horas, sendo acompanhada por cromatografia de camada delgada (ccd). O excesso de clorofórmio foi evaporado e o produto dissolvido em éter etílico e extraído com soluções de HCl 5% (2x 10mL). A fase orgânica foi separada e seca com sulfato de magnésio anidro (MgSO₄), e em seqüência evaporou-se o solvente para obtenção da *N*-butil-2-hidróxi-2-fenilacetamida.

O composto (*R,S*)-*N*-butil-2-hidróxi-2-fenilacetamida (**22**) foi obtido como um óleo amarelado.

Os compostos (*R*)-**20** e (*S*)-**21**, foram preparados através da mesma metodologia

O composto (*R*)-*N*-butil-2-hidróxi-2-fenilacetamida (**20**) apresentou uma rotação ótica específica $[\alpha] = -48,5$ [0,002, CHCl₃], o (*S*)-*N*-butil-2-hidróxi-2-fenilacetamida (**21**) $[\alpha] = +53,4$ [0,002, CHCl₃] e o (*R,S*)-*N*-butil-2-hidróxi-2-fenilacetamida (**22**) $[\alpha] = 0$



IV(KBr) ν (cm⁻¹): 3444 [ν (OH)], 3070 [ν (C-H) aromático], 3282 [ν (NH)], 1646 [ν (C=O, banda de amida)], 1554 [ν (NH, banda de amida)].

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃), δ 7,2 (m, 5H, C-H aromáticos), 6,2 (s, 1H, NH), 4,8 (s, 1H, CH-O), 3,57 (s, 1H, OH), 3,15 (dd, 2H, NCH₂), 1,36 - 1,18 (m, 4H, 2 CH₂), 0,8 (t, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (200 MHz, CDCl₃), δ 167,6 (NC=O), 135,1 (C aromático), 124,3, 124,0 e 122,3 (C-H aromático), 69,6 (CH-O), 34,8 (NCH₂), 26,9 (CH₂), 25,2 (CH₂), 15,4 (CH₃).

RMN ¹H e RMN ¹³C são idênticos para os compostos (*R*)-**20**, (*S*)-**21** e (*R,S*)-**22**, pois estes possuem comportamento espectroscópico e propriedades físicas (ponto de

ebulição, fusão) semelhantes. Como mencionado acima, o sentido da rotação do plano da luz polarizada é diferente para cada um dos enantiômeros

3.6 Síntese via enzimática

3.6.1 Síntese de amidas derivadas do (*R,S*)-mandelato de metila (**17**) usando solventes orgânicos convencionais e líquidos iônicos

O **Esquema 19**, p.52*, mostra a reação de aminólise de (*R,S*)-mandelato de metila (**17**) com *n*-butilamina usando diferentes lipases, em diferentes solventes orgânicos e em mistura com líquidos iônicos.

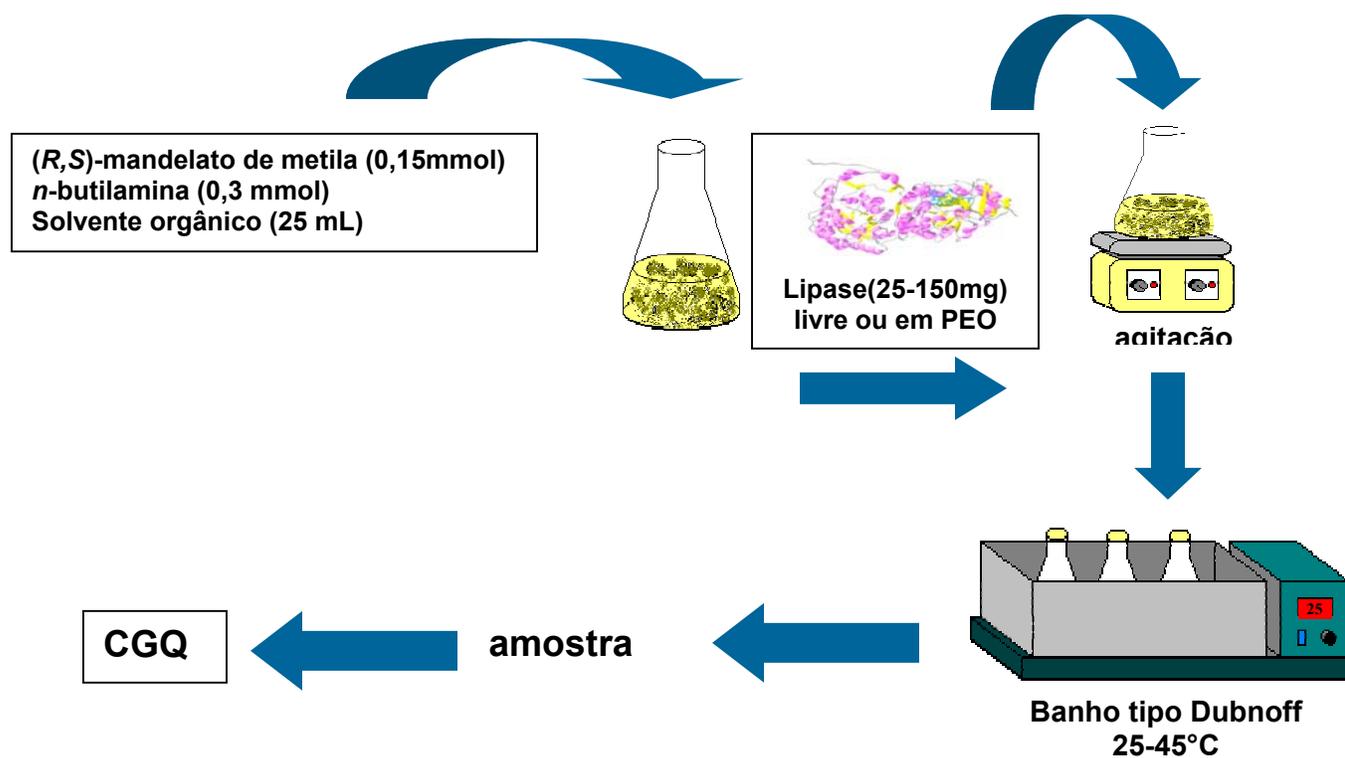
A. Solventes orgânicos convencionais

Em um erlenmeyer de 250mL, adicionou-se (*R,S*)-mandelato de metila (**17**) (0,15mmols, 25mg), solvente orgânico (25mL) e as lipases de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM), *Thermomices lanuginosus* (Lipozyme TL IM), *Mucor miehei* (Lipozyme IM), lipase de *Candida antarctica* (CAL-B), ou as de *Pseudomonas* sp, *Pseudomonas* sp (PS-D) (imobilizada em terra diatomácea), *Pseudomonas* sp (PS-C) (imobilizada em partículas de cerâmica quimicamente modificada com grupos metacrílicos) livres ou imobilizadas (25-150 mg) em filmes de PEO, e por último adicionou-se a *n*-butilamina (0,3mmols, 0,03mL). A solução resultante foi agitada em banho termostatizado nas temperaturas de 25, 35 e 45 °C. A reação foi acompanhada em tempos de até 96h por cromatografia gasosa com fase quiral, **Esquema 15**.

A porcentagem de conversão (% c) foi calculada através da **Equação 1**, p.12, e a razão enantiomérica (E) através das **Equações 2 e 3**, p.12 e do programa para o cálculo da seletividade de resolução cinética que está disponível na internet (<http://www.orgc.tugraz.at/>)

* Ver “Resultados e Discussão”

Para fins comparativos na CGQ, foram usados os padrões do reagente e produtos enantiomericamente puros, sendo que o (*R*)-**20** e (*S*)-**21** apresentaram os valores de tempos de retenção de 28,330 e 28,150 min., respectivamente.



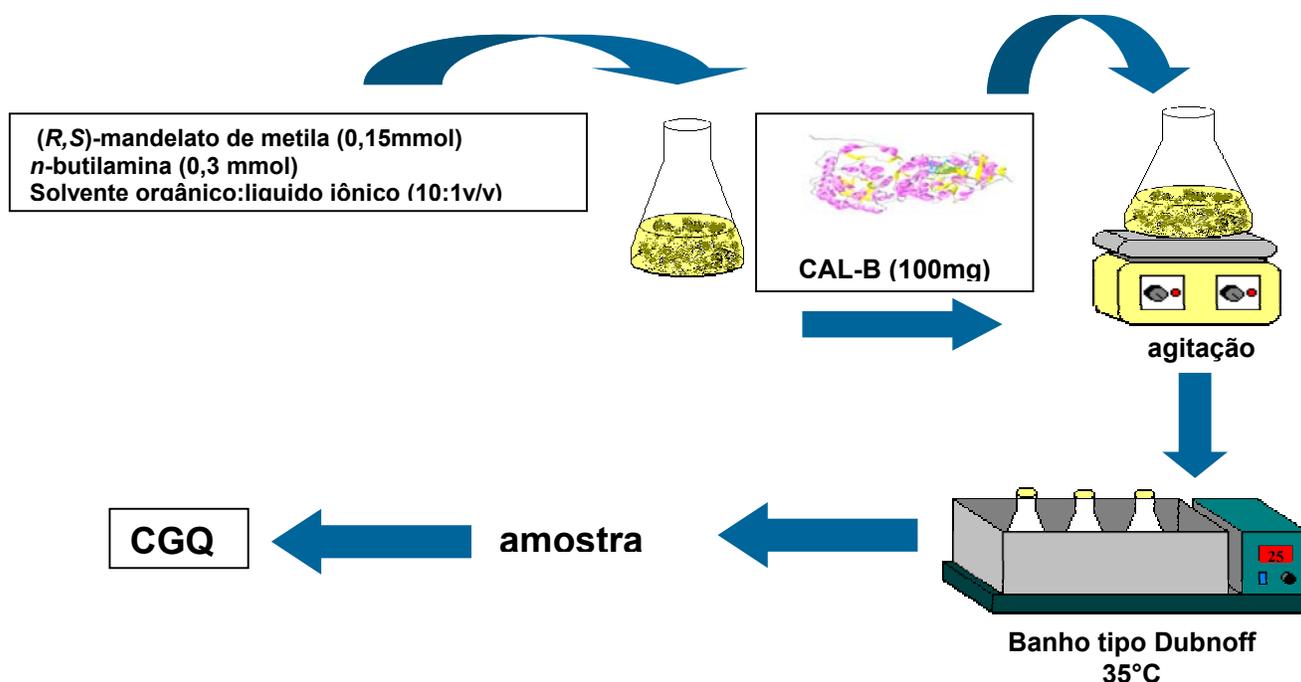
Esquema 15- Síntese de amidas derivadas do (*R,S*)-mandelato de metila (**17**) usando solventes orgânicos convencionais.

B. Misturas solvente orgânico/ líquidos iônicos

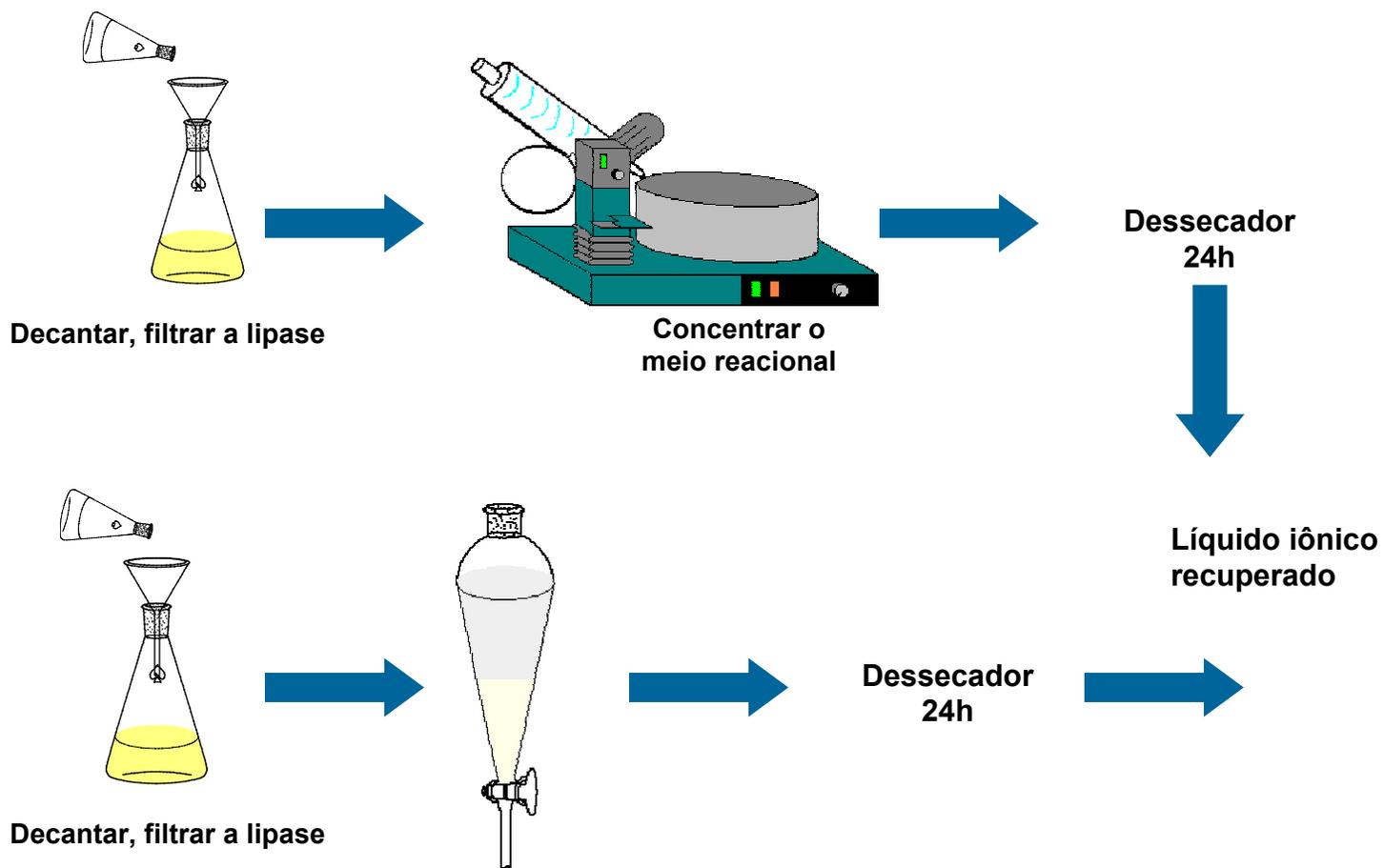
Em um erlenmeyer de 250mL, adicionou-se o (*R,S*)-mandelato de metila (**17**) (0,15mmols, 25mg), a mistura clorofórmio /líquido iônico (10:1v/v) ou *t*-butanol / líquido iônico (10:1v/v), lipase de *Candida antarctica* (CAL-B) (100 mg), e a *n*-butilamina (0,3mmols, 0,03mL). A solução resultante foi agitada em banho termostatizado na temperatura de 35 °C. A reação foi acompanhada por cromatografia gasosa com fase quiral, **Esquema 16**.

A porcentagem de conversão (% c) foi calculada através da **Equação 1**, p.12, e a razão enantiomérica (E) através das **Equações 2 e 3**, p.12 e do programa para cálculo de seletividade de resolução cinética que está disponível na internet (<http://www.orgc.tugraz.at/>)

Após o término da reação fez-se uma filtração para retirar a lipase. Posteriormente, evaporou-se o solvente orgânico mais volátil (clorofórmio ou *t*-butanol) e o líquido iônico remanescente foi seco à temperatura ambiente em dessecador a vácuo por 24h, para subsequente reutilização. (Esquema 17)



Esquema 16 - Síntese de amidas derivadas do (*R,S*)-mandelato de metila (**17**) usando mistura solventes orgânicos / líquido iônico.



Esquema 17 – Recuperação do líquido iônico.

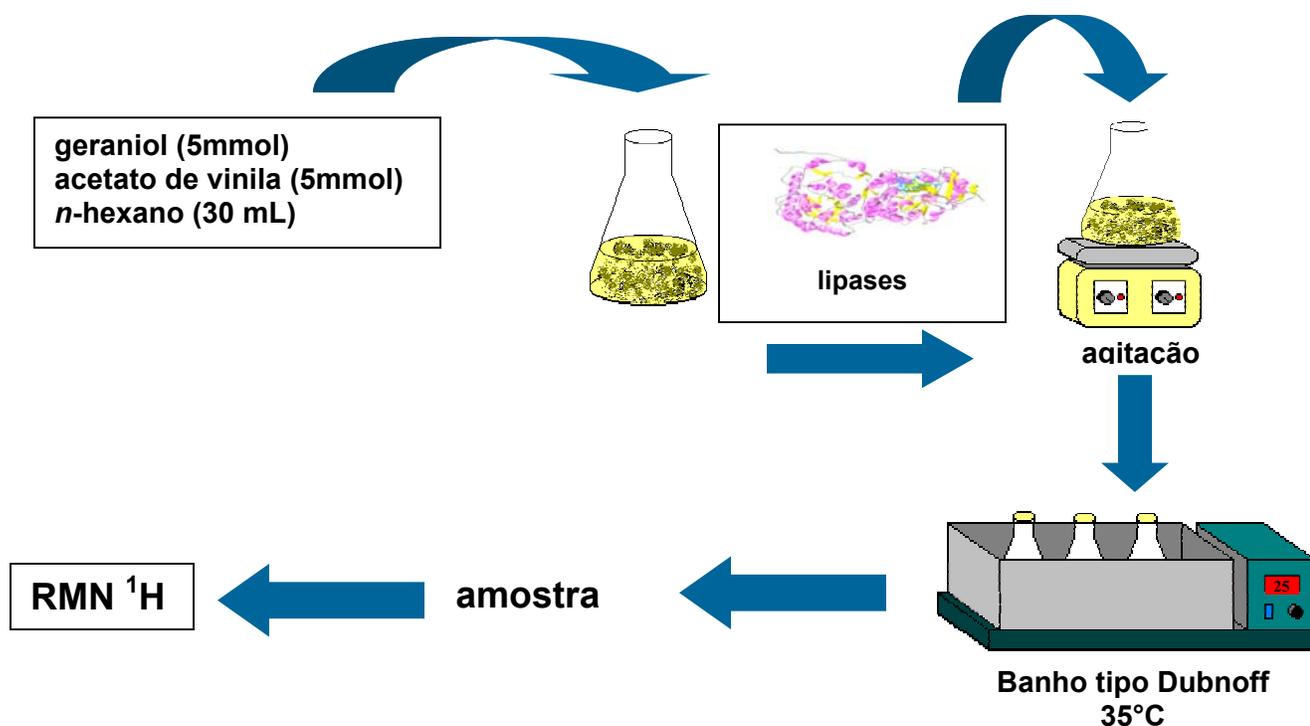
3.6.2 Síntese do acetato de geranoíla usando lipases

Em um erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se geraniol (5mmol, 0,87 mL), *n*-hexano (30 mL) e as lipases de *Candida antarctica* (CAL-B) e as de *Pseudomonas* sp, *Pseudomonas* sp (PS-D) (imobilizada em terra diatomácea), *Pseudomonas* sp (PS-C) (imobilizada em partículas de cerâmica quimicamente modificada com grupos metacrílicos) e a de *Aspergillus niger* imobilizadas em filmes de PEO. A seguir, adicionou-se o acetato de vinila (5mmol, 0,46 mL) e a solução foi agitada em banho termostatizado a 35°C. A reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (ccd), usando hexano/acetato de etila (10:3 v/v) como eluente. (**Esquema 20**).

A porcentagem de conversão (c%) foi calculada através de espectros de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H), por comparação das áreas dos hidrogênios metilênicos do álcool (**23**) (4,10 ppm) com os do éster (**24**) (4,55 ppm). (**Figura 10**)

O produto obtido foi caracterizado também pelo espectro de infra-vermelho, onde foram observadas as seguintes bandas características.

$\text{IV(KBr)}_{\text{v}}(\text{cm}^{-1})$: 2967, 2938 e 2887 [ν (C-H)], 1740 [ν (O-C=O, éster)], 1233 [ν (C=C)].



Esquema 18 – Síntese do acetato de geranoíla.

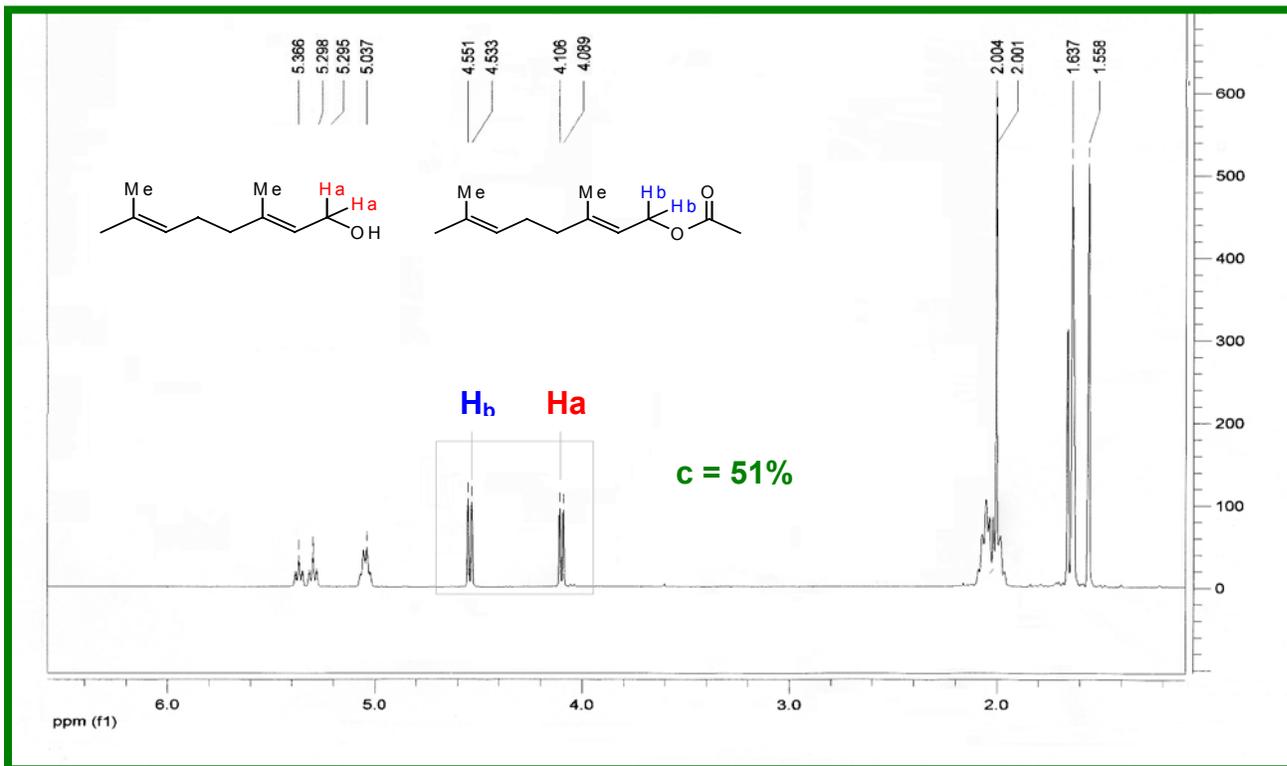
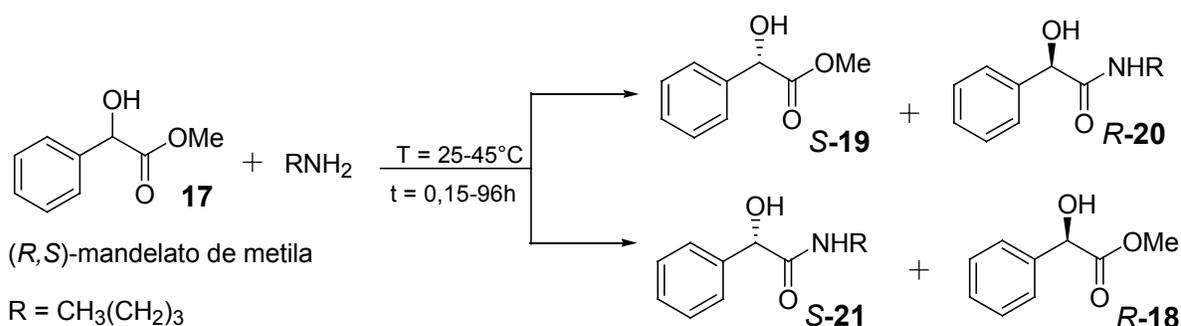


Figura 10 – Espectro de RMN ^1H comparando as áreas dos hidrogênios metilênicos do álcool com os do éster, (200 MHz, CDCl_3).

4. Resultados e Discussão

Neste trabalho, foi estudado a resolução enzimática de (*R,S*)-mandelato de metila (**17**) com *n*-butilamina em solventes orgânicos e/ou mistura solvente orgânico: líquido iônico usando diferentes lipases livres ou imobilizada em poli-(óxido de etileno), PEO, e em diferentes condições experimentais. Os resultados foram discutidos e comparados. (**Esquema 19**)



lipases = lipases de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM), *Thermomices lanuginosus* (Lipozyme TL IM), *Mucor miehei* (Lipozyme IM), de *Candida antarctica* (CAL-B), de *Pseudomonas* sp, *Pseudomonas* sp (PS-D) e de *Pseudomonas* sp (PS-C).

solventes orgânicos = *n*-hexano, clorofórmio, *t*-butanol.

líquidos iônicos = 1-butil-3-metil-imidazol tetrafluorborato [BMIm][BF₄] e 1-butil-3-metil-imidazol hexafluorofosfato [BMIm][PF₆].

Esquema 19 – Aminólise enantiosseletiva do (*R,S*)-mandelato de metila (**17**) com *n*-butilamina catalisada por lipases.

Um outro estudo realizado foi com a lipase de *Aspergillus niger* na acetilação do geraniol e comparada com outras de procedências comerciais. (**Esquema 20**, p. 76)

Para estes experimentos os reagentes e padrões foram preparados e caracterizados conforme descrito nos itens **3.5.1** e **3.5.2**.

O (*S*)-mandelato de metila (**19**) foi analisado por RMN ¹H e RMN ¹³C.

As **Figuras 11 e 12** são do reagente (*S*)-**19**, que através das áreas dos picos e regiões características dos hidrogênios e carbonos identificam o composto.

Os sinais na região de 7,25-7,39 ppm foram atribuídos aos 5 hidrogênios relativos ao anel aromático que está representado por um multipeto, H₄ a H₉. O singlete em 5,17 ppm corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono da hidroxila H₃, e o singlete em 3,75 ppm corresponde a metila do éster H₁, o singlete em 3,25 ppm corresponde ao hidrogênio da hidroxila. (**Figura 11**)

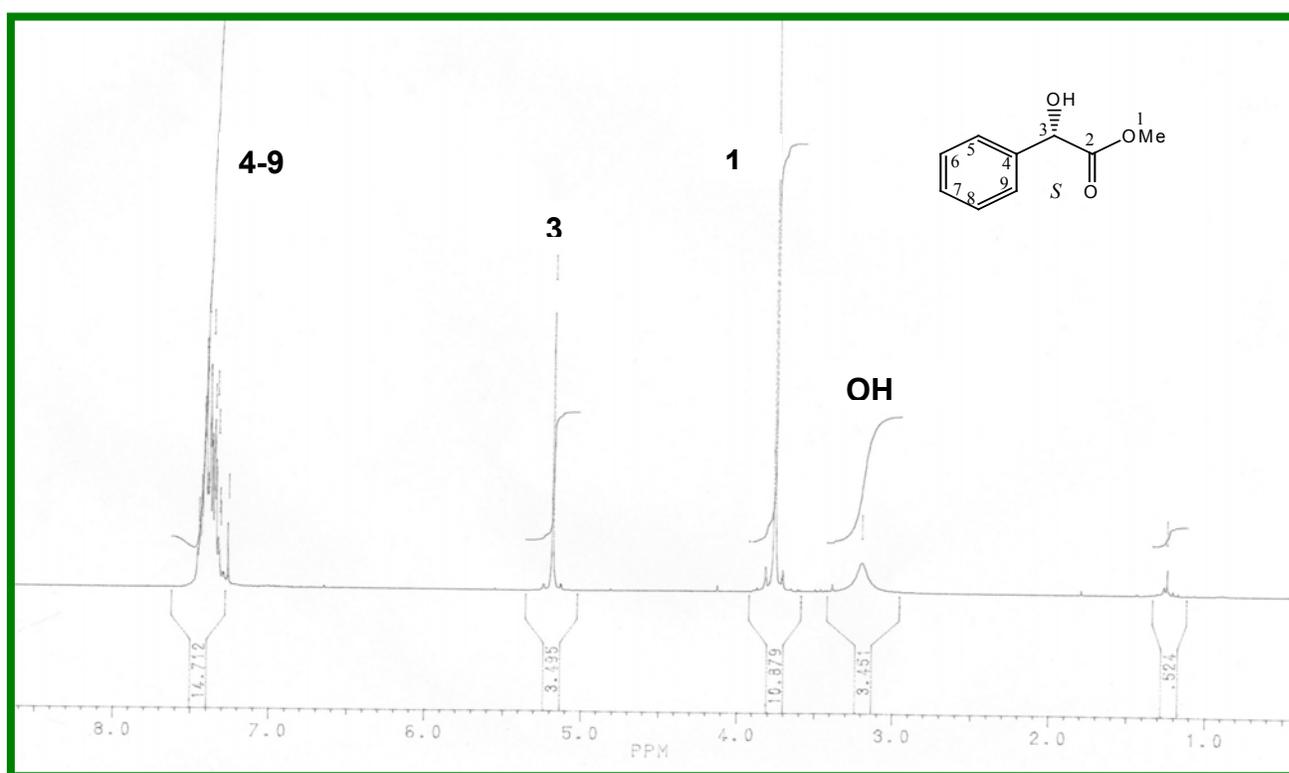


Figura 11 – Espectro de RMN ¹H do (*S*)-mandelato de metila (**19**), (200MHz, CDCl₃).

O sinal na região de 173,7 ppm é referente ao carbono da carbonila C₂, em 138,7 ppm observou-se um sinal quaternário do anel aromático C₄, na região de 128,2 e 126,4 ppm tem-se os carbonos do anel aromático que compreende as posições C₅ a C₉. O carbono ligado à hidroxila é observado em 72,7 ppm (C₃), e a metila ligada ao éster está na região de 52,2 ppm (C₁). (**Figura 12**)

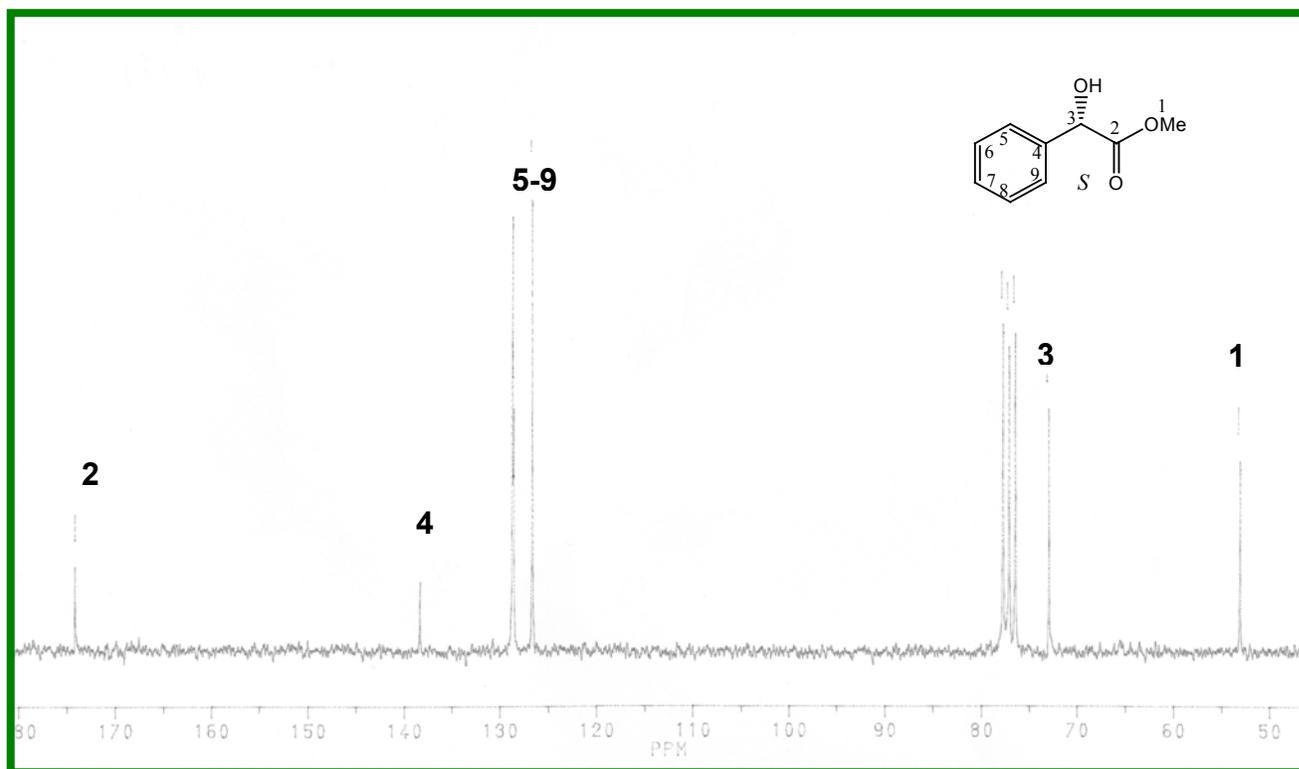


Figura 12 – Espectro de RMN ¹³C do (S)-mandelato de metila (**19**), (200MHz, CDCl₃).

Os espectros de IV, RMN ¹H e RMN ¹³C são iguais para os compostos (R)-**18**, (S)-**19** e (R,S)-**17**, pois estes possuem comportamento espectroscópico e propriedades físicas (ponto de ebulição e fusão) semelhantes.^{24,25}

A (*S*)-*N*-butil-2-hidróxi-2-fenilacetamida (**21**) enantiomericamente pura, obtida via não enzimática foi analisada por RMN ^1H e RMN ^{13}C .

As **Figuras 13** e **14** correspondem ao composto (*S*)-**21**, através das áreas dos picos e regiões características dos hidrogênios e carbonos, respectivamente, identifica-se o composto.

Os sinais na região de 7,2 ppm foram atribuídos aos 5 hidrogênios do anel aromático representado por um multipletto (H_8 a H_{13}). O singletto em 6,2 ppm corresponde ao hidrogênio da amida que está na posição 5, o singletto em 3,57 ppm corresponde ao hidrogênio da hidroxila, o singletto em 4,8 ppm é referente ao hidrogênio ligado ao carbono na posição H_7 . Na região de 3,15 ppm tem-se um quarteto referente aos hidrogênios na posição 4. Na região compreendida entre 1,36 – 1,18 ppm tem-se um multipletto referente aos hidrogênios das posições 2 e 3. O sinal em 0,8 ppm é um triplete correspondente a metila localizada na posição 1.

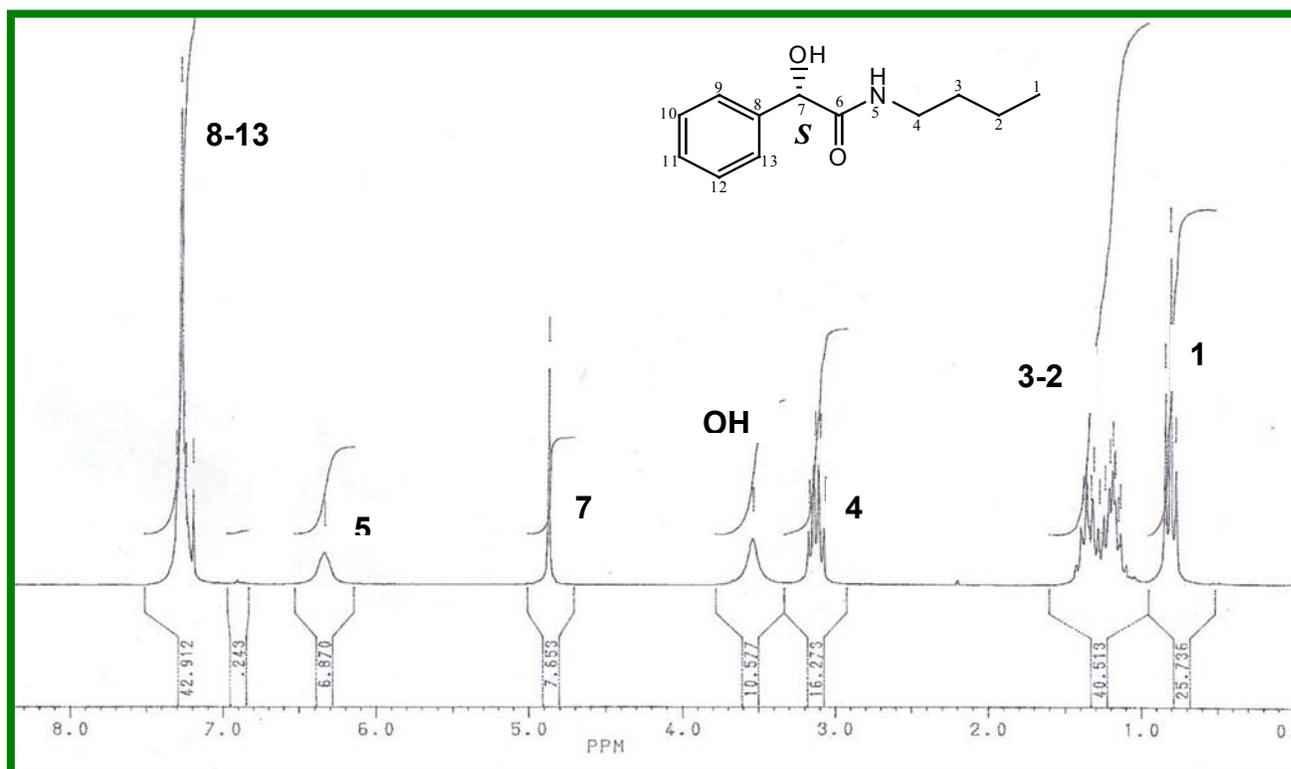


Figura 13 – Espectro de RMN ^1H do (*S*)-*N*-butil-2-hidróxi-2-fenilacetamida (**21**), (200MHz, CDCl_3).

O sinal na região de 167,6 ppm é referente ao carbono da carbonila C₆, em 135, 1 ppm observou-se o sinal quaternário do anel aromático C₈, na região de 124,3 e 122, 3 ppm tem-se os carbonos do anel aromático das posições 9-13. O carbono ligado à hidroxila (C₇) está em 69,6 ppm. Em 34,8 ppm tem-se os carbonos metilênicos, da posição 4. Na região compreendida entre 26,9 - 25,2 ppm tem se os carbonos metilênicos (C₂ e C₃), e a metila alifática está na região de 15,4 ppm (C₁). (**Figura 14**)

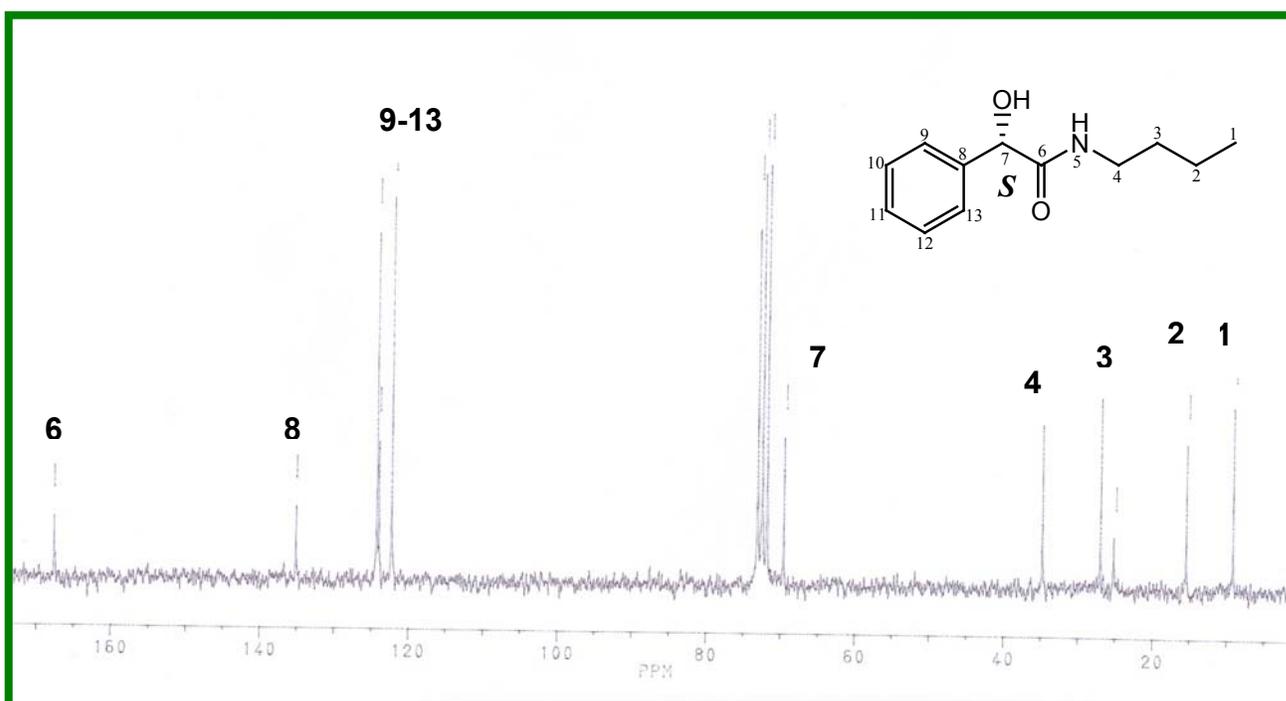


Figura 14 – Espectro de RMN ¹³C do (S)-N-butil-2-hidróxi-2-fenilacetamida (**21**) (200MHz, CDCl₃).

Os espectros de IV, RMN ¹H e RMN ¹³C são iguais para os compostos (R)-**20**, (S)-**21** e (R,S)-**22**, pois estes possuem comportamento espectroscópico e propriedades físicas (ponto de ebulição e fusão) semelhantes.

A **Figura 15** mostra o cromatograma da (*S*)-*N*-butil-2-hidróxi-2-fenilacetamida (**21**) obtido através da síntese não enzimática a partir dos reagentes quirais, conforme descrito no item **3.5.2**.

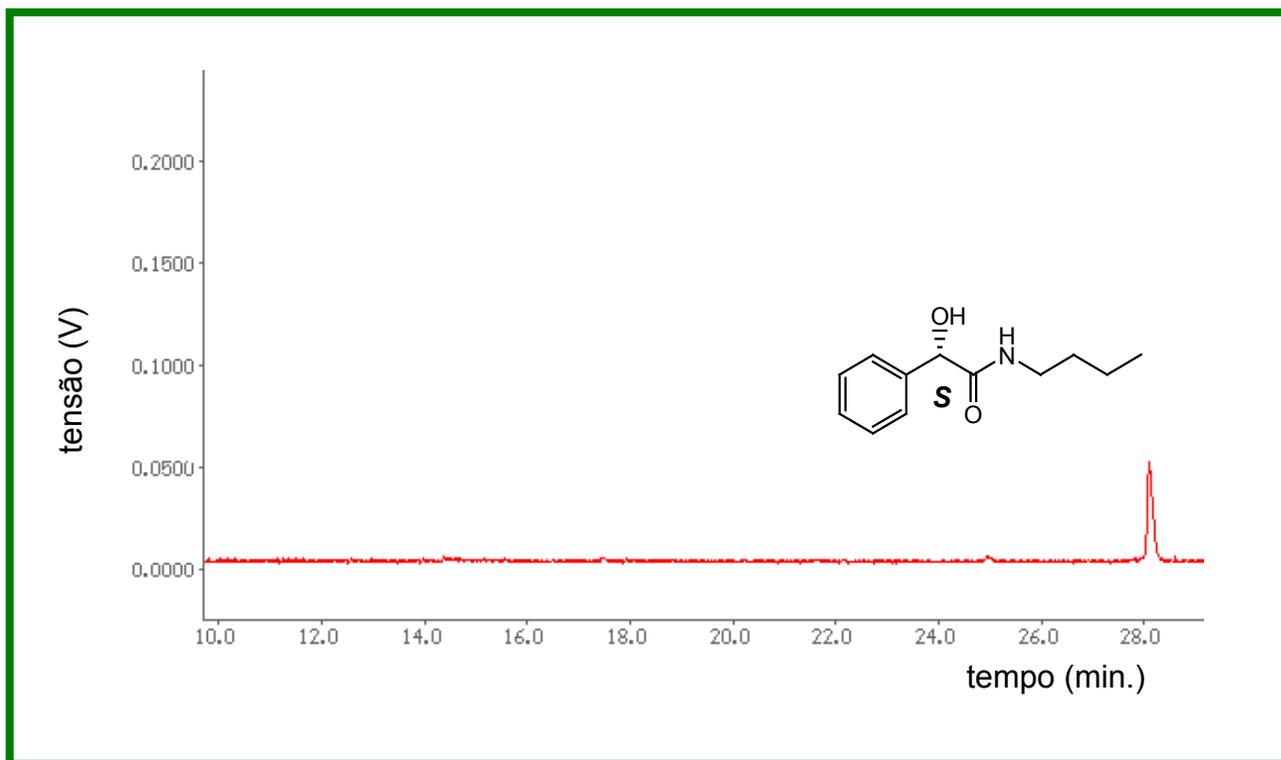


Figura15- Cromatograma da (*S*)-*N*-butil-2-hidróxi-2-fenilacetamida (**21**) enantiomericamente pura obtida através da síntese não enzimática, por CGQ. Condições experimentais: Inj. = 250°C, Det. = 275°C, programação: 80°C 5°C/min. 140°C 3°C/min. 220°C, split 100:1, Pressão do H₂ = 75Kpa.

A análise cromatográfica da **Figura 15**, mostra que o tempo de retenção do padrão (*S*)-**21** é 28,150 min.

4.1 Avaliação de lipases de diferentes fontes

Inicialmente foi avaliado o uso de lipases de diferentes fontes na aminólise de (*R,S*)-mandelato de metila (**17**) com *n*-butilamina em solventes orgânico.

As lipases de LRM, LTL, LMM, LPS, PS-D, PS-C e CAL-B foram selecionadas e usadas na forma livre ou imobilizada em filme de poli-(óxido de etileno),PEO.

Quando as lipases de LRM, LTL, LMM, LPS, PS-D, PS-C foram empregadas em sua forma nativa ou imobilizadas em PEO, nenhuma seletividade foi obtida e a amida foi formada com baixas conversões.

Usando estas lipases obtiveram-se conversões de 0 – 5%, com valores de ee_s de 1-38%, ee_p de 1-43% e E de 1,1-2,7. Como solvente orgânico foram usados *n*-hexano, clorofórmio ou *t*-butanol à 35⁰C até 96 horas de reação.

Estas lipases estão presentes em um preparado enzimático, e isto pode explicar a baixa seletividade que as mesmas apresentaram para a reação de aminólise do (*R,S*)-mandelato de metila (**17**), pois provavelmente não foram específicas para catalisar esta reação.

As lipases PS-D e PS-C imobilizadas em terra diatomêcea e em partículas de cerâmica quimicamente modificadas com grupos metacrílicos, respectivamente, também foram imobilizadas em PEO. Esta dupla imobilização não alterou o resultado anterior, e não houve formação dos produtos.

Melhores resultados foram obtidos quando a lipase de *Candida antarctica* (CAL-B) foi usada como biocatalisador, formando os produtos com conversão de 1- >99%, com valores de ee_p de 5-75% e E de 1,4-22, com os mesmos solventes citados anteriormente.

A lipase de *Candida antarctica* apresenta alta atividade catalítica, sendo de 10,000 Plu g⁻¹.^{*} Esta tem sido bastante efetiva em reações de aminólise, esterificação, transesterificação entre outras, conforme observa-se na literatura.^{79,80}

A partir destes resultados, está foi selecionada para dar continuidade aos estudos, avaliando o efeito do solvente, temperatura e massa de CAL-B empregada na reação.

* unidade laurato de propila por grama

4.2 Efeito do solvente e temperatura

O solvente e conteúdo de água influenciam na seletividade de uma enzima, pois estes parâmetros podem alterar a conformação nativa das mesmas.⁸¹

A forte influência da natureza do solvente na enantiosseletividade tem sido relatada. Ainda não há consenso sobre todos os parâmetros que influenciam na reação enzimática, mas o mais freqüentemente usado é o log P e a constante dielétrica (ϵ).^{82,83}

Laane,⁸² descreveu que a atividade catalítica é menor em solventes com log P < 2, moderada em solventes com log P entre 2 e 4, e alta em solventes apolares com log P > 4. Estes são mais hidrofóbicos e deste modo mais favoráveis para as reações enzimáticas. Foi relado que a correlação entre polaridade e atividade é de grande relevância, pois dependendo do solvente usado, este pode alterar o conteúdo de água que estabiliza o biocatalisador.

Usando *n*-hexano (log P 3,9) na aminólise de (*R,S*)-(17), a correspondente amida racêmica foi formada com conversões >99% após 210 min.

A **Figura 16** mostra a variação do grau de conversão (%c) e da razão enantiomérica (E) em função do tempo.

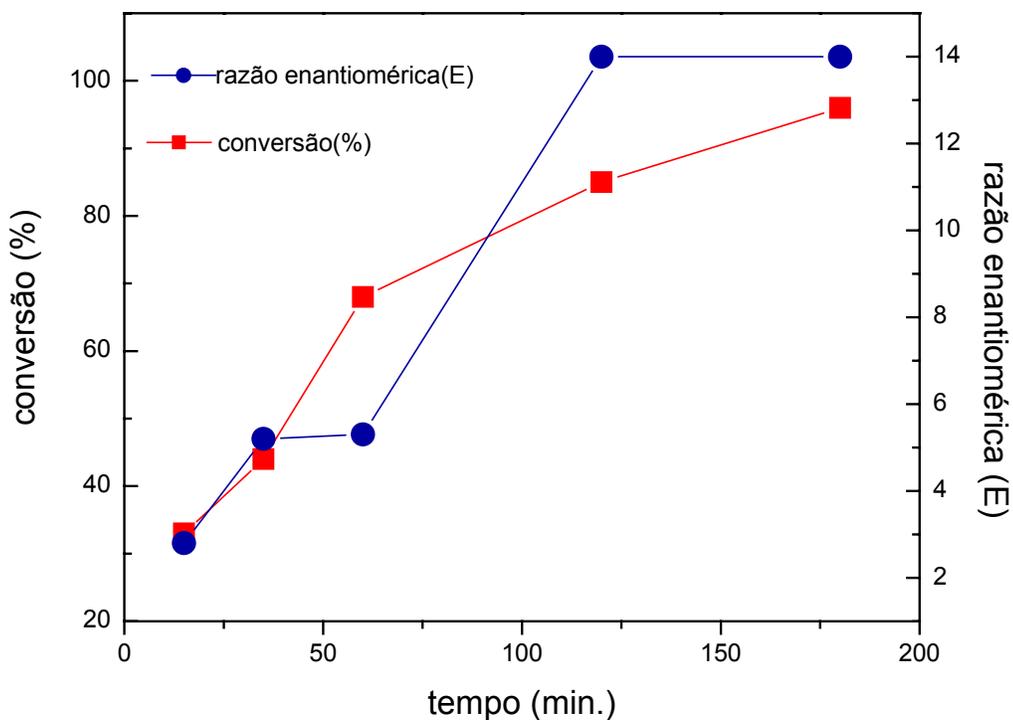


Figura 16 – Variação da conversão (%) e razão enantiomérica (E) em função do tempo na resolução enzimática de (*R,S*) mandelato de metila (**17**), [CAL-B (100 mg), *n*-hexano (25 mL), 35°C].

No intervalo de 15–180 min., a conversão de (*R,S*)-(**17**) à amida (*S*)-(**21**) foi de 33–96% com valores de E de 2,8 – 14.

A **Figura 17** mostra a variação do grau de conversão (%) e do excesso enantiomérico do produto (ee_p) em função do tempo.

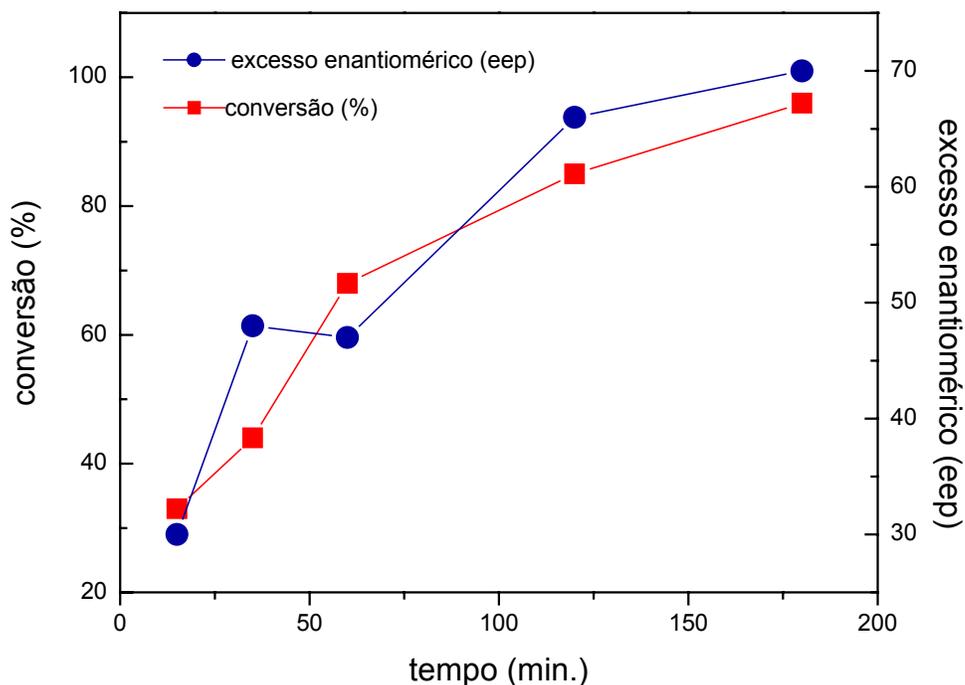


Figura 17 – Variação da conversão (%c) e do excesso enantiomérico (ee_p) em função do tempo na resolução enzimática de (*R,S*)- mandelato de metila (**17**), [CAL-B (100 mg), *n*-hexano (25 mL), 35°C].

No intervalo de 15 – 180 min., o ee_p da amida (*S*)-(**21**) foi de 30-70%.

Estas condições podem ser usadas para obter a correspondente (*R,S*)-amida (**22**) com altos rendimentos e tempo reacional relativamente pequeno. Porém como observado nas **Figuras 16 e 17**, esses resultados são considerados inaceitáveis para a proposta prática no que se refere à obtenção de compostos opticamente puros⁵.

Os resultados podem ser explicados através do coeficiente de partição ($\log P$) citado anteriormente, o *n*-hexano é um solvente apolar, hidrofóbico e tem a capacidade de manter o conteúdo de água ao redor da enzima favorecendo as reações enzimáticas. Porém, para a aminólise do (*R,S*)- (**17**) apresentou a desvantagem de não ser seletiva, formando a amida racêmica, mas com a vantagem de que a reação é rápida.

Usando solventes orgânicos mais polares tais como o clorofórmio ($\log P$ 2,00) e *t*-butanol ($\log P$ 1,45), a enantiosseletividade aumentou e o valor da conversão diminuiu. Com estes solventes, foi avaliada a influência da temperatura a 25, 35 e 45°C.

Trabalhos na literatura mostraram que a enantiosseletividade da enzima é altamente sensível a temperatura e ao meio reacional.

Sun e col.⁸⁴ estudaram a esterificação do mentol com anidrido propiônico com lipase de *Candida rugosa* (LCR) em *n*-hexano e 1-butil-3-metil imidazol hexafluorofosfato – [BMIm][PF₆] à 20, 25, 30, 35, 35 e 40^oC. A conversão do (±)-mentol (%c), o excesso enantiomérico do (-)-propionato de mentila (ee_p) e a razão enantiomérica (E) após 24 h, foram de 35 - 47,5, 74,5 – 88 e 12,6 – 31,9, respectivamente. Os resultados indicaram que a temperatura ótima da reação com [BMIm][PF₆] e hexano foi de 30^oC, sendo os valores de ee_p de 86,1 e 88 e E de 31,5 e 31,9, respectivamente.

As **Tabela 5 e 6** mostram as porcentagens de conversão (%c) a amida (**22**) em função da temperatura usando *t*-butanol e clorofórmio, respectivamente.

Tabela 5 – Efeito da temperatura na aminólise de (*R,S*)-mandelato de metila (**17**) catalisada pela CAL-B em *t*-butanol.

Nº exp.	temperatura (°C)	tempo (h)	c (%) ^a	ee _s ^b	ee _p ^b	E ^c	conf. ^d
1	25	2	22	13	1	1,1	<i>R</i>
2		12	38	68	10	2,1	<i>R</i>
3		24	65	74	23	3,1	<i>R</i>
4	35	2	21	15	13	1,5	<i>R</i>
5		8	66	66	10	2	<i>R</i>
6		24	91	93	51	9,7	<i>R</i>
	45	2	27	20	5	1,3	<i>R</i>
8		17	68	71	34	4	<i>R</i>
9		24	82	95	26	5,2	<i>R</i>

(*R,S*)-mandelato de metila (**17**) (0,15 mmol; 25mg), *n*-butilamina (0,3 mmol; 0,03 mL), CAL-B (100 mg), *t*-butanol (25mL).

a. calculado pela **Equação 1** (pág 12)

b. determinado por CGQ

c. Calculado pelas **Equações 2 e 3** (pág. 12) e através do programa que está disponível na internet (<http://www.orgc.tugraz.at/>).

d. configuração absoluta do produto foi determinada por comparação com o tempo de retenção do composto padrão enantiomericamente puro.

Usando *t*-butanol (log P 1,45) (**Tabela 5**) foi obtido maior grau de conversão em amida e menores valores de E, sendo de 21 - 91% e 1,1 – 9,7, respectivamente, quando comparado com o clorofórmio.

Na temperatura de 25°C, obteve-se a amida (*R*)-**20** com conversão de 22-65%, ee_s de 13-74%, ee_p de 1-23% e com valores de E de 1,1-3,1. Quando a temperatura aumentou para 35°C a amida **20** foi formada com conversão de 21-91%, ee_s de 15-93%, ee_p de 13-51% e valores E de 1,5-9,7.

Com o aumento da temperatura para 45°C, a porcentagem de conversão, o ee_p e o valor de E diminuí, sendo de 91% para 82%, 51 para 26% e 9,7 para 5,2, sendo que o valor de ee_s aumentou de 93% para 95%, após 24h de reação, respectivamente.

A melhor temperatura foi 35°C formando a amida (*R*)-**20** em 91% de conversão, ee_p de 51% e com um valor de E de 9,7. Nestas condições o produto formado foi preferencialmente à amida (*R*)-**20**.

Esses dados estão de acordo com a literatura, que menciona que esta enzima apresenta pronunciada preferência para enantiômeros *R*.^{79,88,89,90}

Tabela 6 – Efeito da temperatura na aminólise de (*R,S*)-mandelato de metila (**17**) catalisada pela CAL-B em clorofórmio.

N° exp.	temperatura (°C)	tempo (h)	c (%) ^a	ee _s ^b	ee _p ^b	E ^c	conf. ^d
1	25	2	2	23	10	1,5	S
2		7	3	81	28	3,9	S
3		12	6	31	69	7,3	S
4		24	14	95	55	11	S
5	35	2	3	30	5	1,4	S
6		8	15	90	56	10	S
7		24	26	92	75	22	S
8		48	48	72	70	12	S
9	45	2	4	39	21	2,1	S
10		17	18	63	52	5,9	S
11		24	30	84	57	9,3	S

(

R,S-mandelato de metila (**17**)(0,15 mmol; 25mg), *n*-butilamina (0,3 mmol; 0,03 mL), CAL-B (100 mg), clorofórmio (25mL).

a. calculado pela **Equação 1** (pág 12)

b. determinado por CGQ

c. calculado pelas **Equações 2 e 3** (pág. 12) e através do programa que está disponível na internet (<http://www.orgc.tugraz.at/>).

d. a configuração absoluta do produto foi determinada por comparação com o tempo de retenção do composto padrão enantiomericamente puro.

Usando clorofórmio (log P 2,00) (**Tabela 6**), menor grau de conversão em amida e maiores valores de E foram obtidos, sendo de 2-48% e 1,4–22, respectivamente. Foi observado um grande efeito na enantiosseletividade formando os produtos com configurações opostas quando comparado com o *t*-butanol.

Na temperatura de 25°C obteve-se a amida (*S*)-**21** com conversões de 2-14%, ee_s de 23-95%, ee_p de 10-55% e valores de E de 1,5-11. Quando a temperatura aumentou para 35°C, a amida **21** foi formada com conversões de 3-48%, ee_s de 30-92%, ee_p de 5-70% e valores de E de 1,4-22.

Com o aumento da temperatura para 45°C, a porcentagem de conversão aumentou de 26% para 30%, mas os valores de ee_s , ee_p e E diminuíram, sendo de 92% para 84%, de 75 para 57% e de 22 para 9,3, após 24h de reação, respectivamente.

A temperatura ótima foi 35°C formando a amida (S)-**21** em 26% de conversão, ee_p de 75% e com um valor de E de 22, o qual é considerado de moderado a bom para a aplicação sintética no que se refere à obtenção de compostos opticamente puros.⁵

Um solvente polar como o clorofórmio pode abstrair a camada de água essencial ao redor da enzima e deste modo alterar a conformação catalítica, induzindo a inversão na configuração do produto.⁸⁵

A inversão da enantiosseletividade induzida por solventes ao utilizar protease e algumas lipases foi relatada por Tawaki e Klibanov⁸⁶ e por Kawasaki e col. na desacetilação catalisada por lipases em solventes orgânicos.⁸⁷

Para ambos solventes (t-butanol e clorofórmio) a melhor temperatura foi de 35°C. Acima desta, ambos evaporam e podem desnaturar a enzima, e portanto, esta foi selecionada para os experimentos subseqüentes.

As **Figuras 18 e 19** apresentam os cromatogramas obtidos nesta reação usando *t*-butanol e clorofórmio, respectivamente.

Na **Figura 18** observa-se a formação e separação dos produtos de uma alíquota da aminólise de (*R,S*)-**17** após 8 h, comparado com o padrão do composto puro. O produto formado preferencialmente foi à amida (*R*)-**20**.

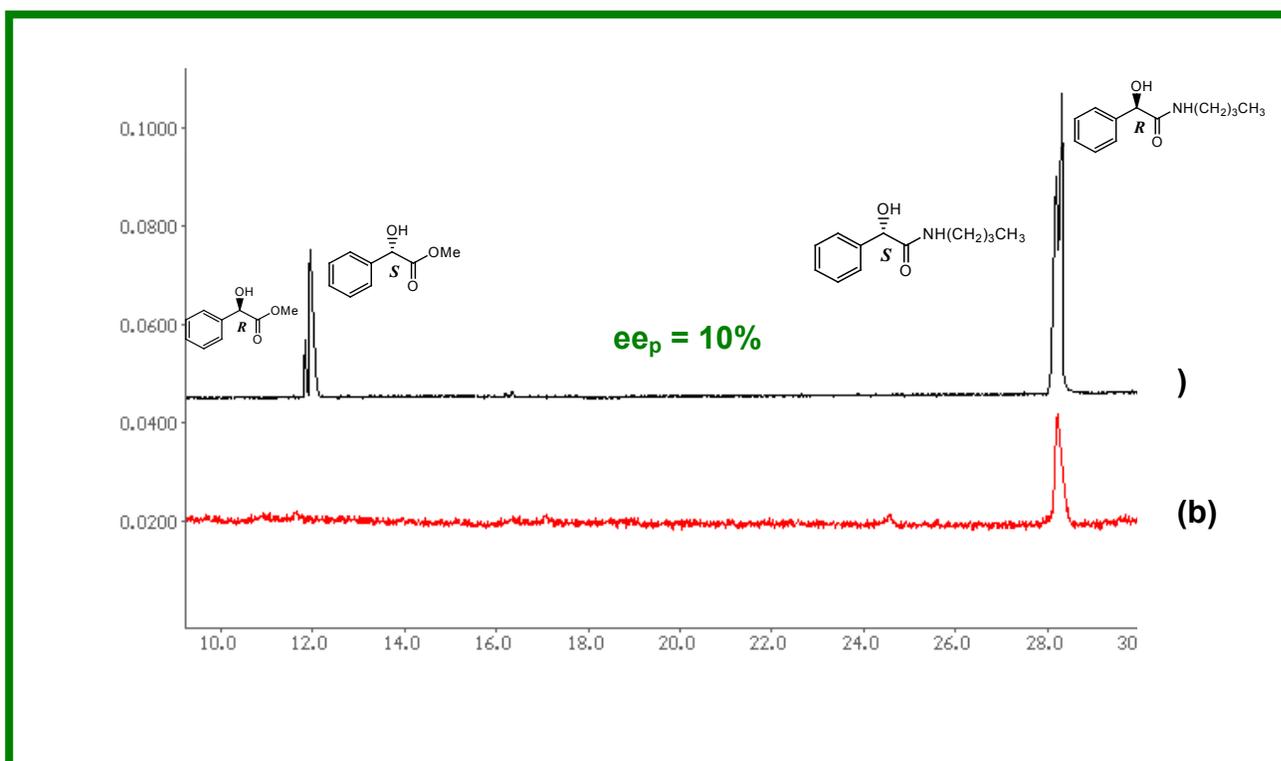


Figura 18 – Cromatogramas, de uma alíquota de reação de aminólise de (*R,S*)-mandelato de metila (**17**) com *t*-butanol, em 8h, por CGQ **(a)**, padrão quiral da amida (*R*)-**20** **(b)**. Condições experimentais: Inj. = 250°C, Det. = 275°C, programação: 80°C 5°C/min. 140°C 3°C/min. 220°C, split 100:1, pressão do H₂ = 75Kpa.

Na **Figura 19** observa-se a formação e separação dos produtos de uma alíquota da aminólise de (*R,S*)-**17** após 24 h, comparado com o padrão do composto puro. O produto formado preferencialmente foi à amida (*S*)-**21**.

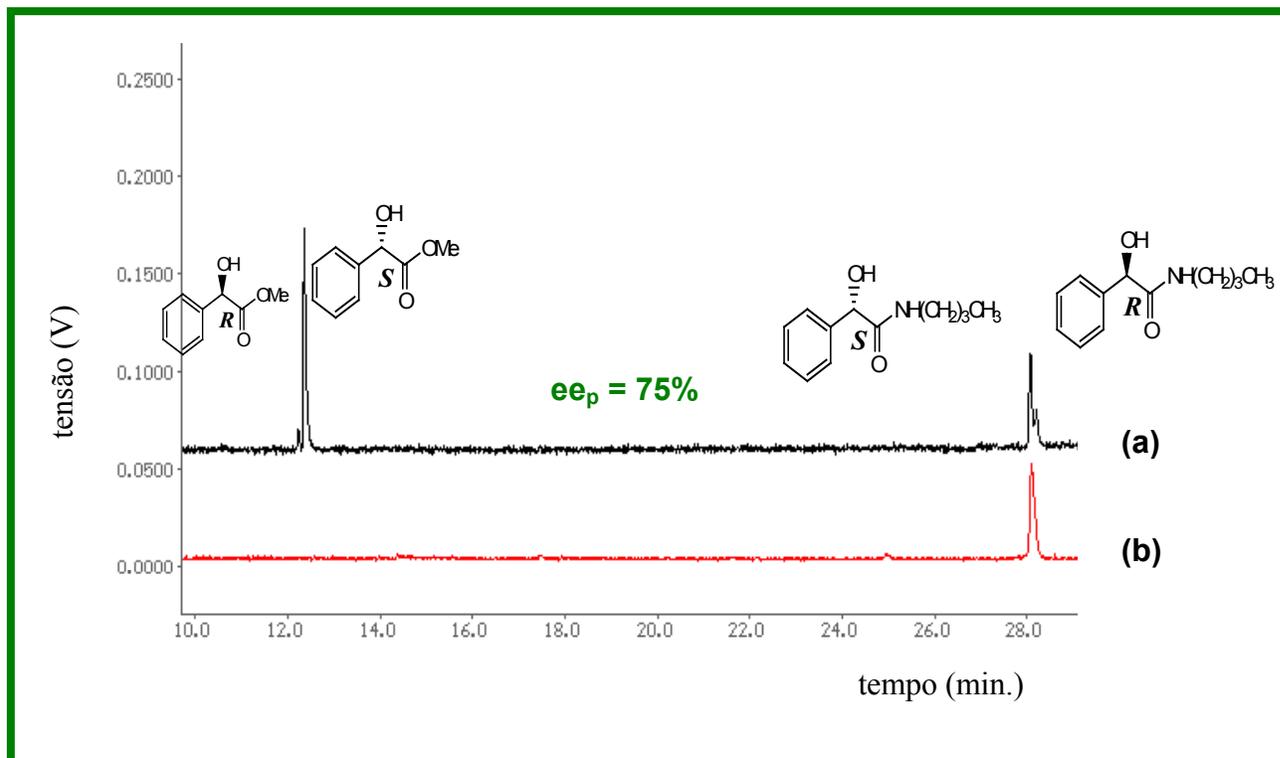


Figura 18 – Cromatogramas, de uma alíquota de reação de aminólise de (*R,S*) mandelato de metila (**17**) com clorofórmio, em 24h, por CGQ **(a)**, padrão quiral da amida (*S*)-**21** **(b)**. Condições experimentais: Inj. = 250°C, Det. = 275°C, programação: 80°C 5°C/min. 140°C 3°C/min. 220°C, split 100:1, pressão do H₂ = 75Kpa.

4.3 Efeito da variação da massa de CAL-B

A influência da massa de CAL-B também foi avaliada, usando *t*-butanol à 35°C por 24 h. As quantidades usadas foram de 25-150 mg, e os dados de conversão, excesso enantiomérico do produto e da razão enantiomérica estão mostrados nas **Figuras 20** e **21**.

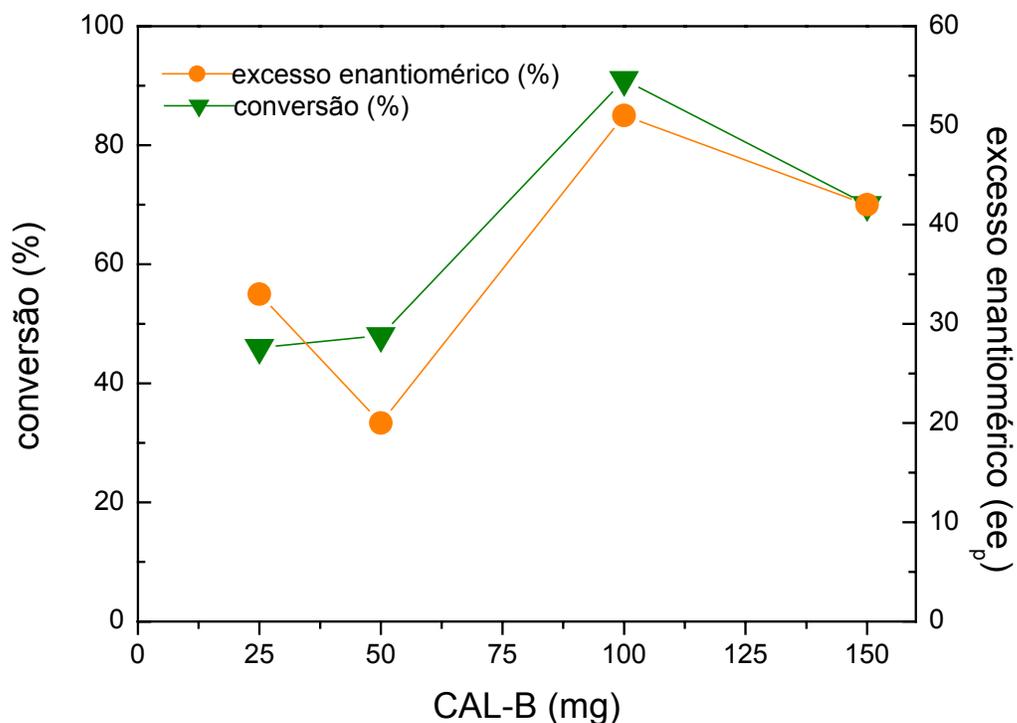


Figura 20 – Variação da conversão (%c) e do excesso enantiomérico do produto (ee_p) em função da massa de CAL-B na resolução enzimática de (*R,S*)-mandelato de metila (**17**), [*t*-butanol (25mL), 35°C, 24 h].

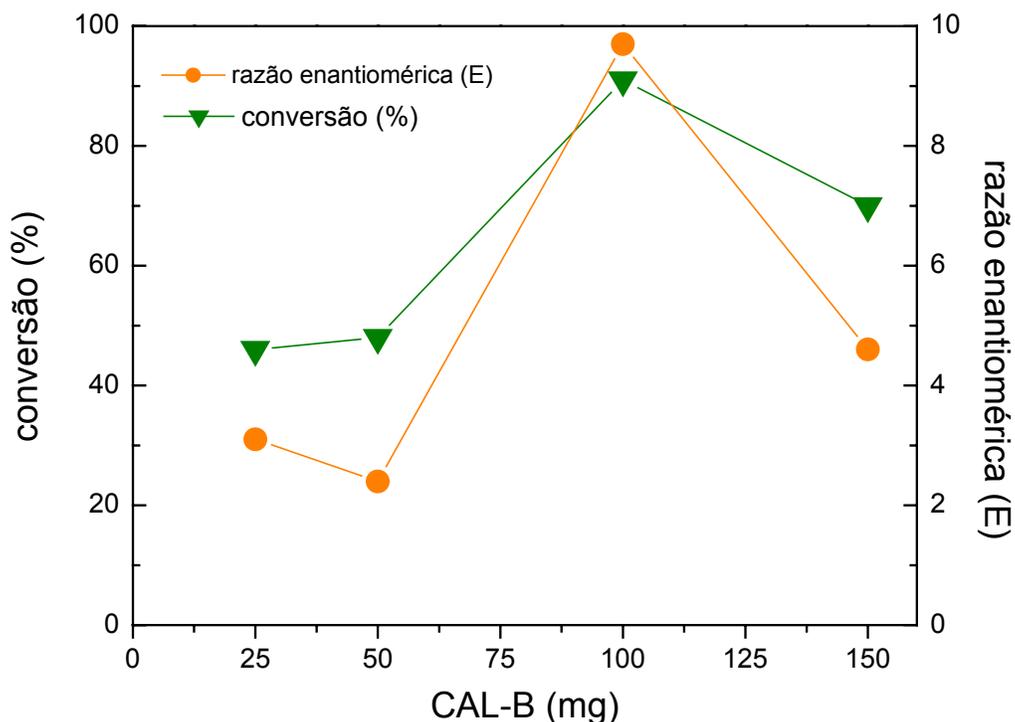


Figura 21 – Variação da conversão (%c) e da razão enantiomérica (E) em função da massa da CAL-B na resolução enzimática de (*R,S*)-mandelato de metila (**17**). [t-butanol (25mL), 35°C, 24 h].

Usando 25 e 50 mg a conversão foi 46 e 48%, ee_p 20 e 33% e E de 2,4 e 3,1, respectivamente. Quando aumentou a massa de CAL-B para 100 ou 150 mg, maiores conversões e melhor seletividade foram obtidas, sendo de 91 e 70%, com valores de ee_p de 51 e 41% e valores de E de 9,7 e 4,6.

Quando usou 100 mg de CAL-B obteve-se maior conversão e seletividade, indicando que o número de sítios disponíveis é suficiente para a quantidade de substrato utilizada, e portanto foi selecionada para experimentos posteriores. Com 150 mg de CAL-B observou uma menor seletividade.

4.4 Efeito de líquidos iônicos

Líquidos iônicos são solventes altamente polares, estando na escala dos álcoois de cadeia pequena e formamida.⁹¹ Geralmente, as enzimas são mais estáveis em solventes com $\log P (> 4)$, que em $\log P (< 2)$,⁸² mas em líquidos iônicos elas tem mostrado um aumento na atividade, estabilidade e enantiosseletividade. As propriedades dos líquidos iônicos, seus efeitos nas enzimas em relação à atividade, estabilidade e seletividade e aplicações na biocatálise tem sido recentemente discutido.^{91,92}

Neste trabalho, ambos 1-butil-3-metil imidazol tetrafluorborato [BMIm][BF₄] e 1-butil-3-metil imidazol hexafluorofosfato [BMIm][PF₆] foram usados em misturas com *n*-hexano, clorofórmio e *t*-butanol na resolução de (*R,S*)- (**17**).

Usando *n*-hexano:[BMIm][BF₄] (10:1 v/v) ou *n*-hexano:[BMIm][PF₆] (10:1v/v), nenhuma melhora na enantiosseletividade foi observada e a conversão na correspondente amida (*R,S*)-**22** foi quantitativa após 3.5 h de reação. Portanto, usando os líquidos iônicos nesta concentração, não foi observado influência no meio reacional e os resultados foram similares ao uso de *n*-hexano puro.

A seguir, verificou-se a influência da mistura líquidos iônicos:clorofórmio ou *t*-butanol.

Os resultados obtidos de conversão, ee_s , ee_p e E estão apresentados nas **Tabelas 7** e **8**, respectivamente.

Tabela 7 – Efeito do [BMIm][BF₄] ou [BMIm][PF₆]:clorofórmio na aminólise de (*R,S*)-**(17)** catalisada pela CAL-B.

Solvente	tempo (h)	c (%) ^a	ee _s (%) ^b	ee _p (%) ^b	E ^c	Conf. ^d
Clorofórmio/ [BMIm][BF ₄]	1	5	3	> 99	> 200	S
	3	7	1	> 99	> 200	S
	5	8	5	> 99	> 200	S
	22	10	6	> 99	> 200	S
	24	14	1,5	> 99	> 200	S
	48	25	22	> 99	> 200	S
	72	33	42	43	3,7	S
Clorofórmio / [BMIm][PF ₆]	1	3	12	> 99	> 200	S
	3	10	40	> 99	> 200	S
	5	10	55	> 99	> 200	S
	7	12	61	> 99	> 200	S
	24	21	95	> 99	> 200	S
	48	45	88	17	3,3	S
	72	69	17	62	5	S
	96	78	61	66	9	S

(*R,S*)-mandelato de metila (**17**) (0,15 mmol; 25mg), *n*-butilamina (0,3 mmol; 0,03 mL), CAL-B (100 mg), clorofórmio; líquido iônico (10:1v/v).

a. calculado pela **Equação 1** (pág 12)

b. determinado por CGQ.

c. calculado pelas **Equações 2 e 3** (pág. 12) e através do programa que está disponível na internet (<http://www.orgc.tugraz.at/>).

d. a configuração absoluta do produto foi determinada por comparação com o tempo de retenção do composto padrão enantiomericamente puro.

Tabela 8 – Efeito do [BMIm][BF₄] ou [BMIm][PF₆]:*t*-butanol na aminólise de (*R,S*)-**(17)** catalisada pela CAL-B.

Solvente	tempo (h)	c (%) ^a	ee _s (%) ^b	ee _p (%) ^b	E ^c	conf. ^d
<i>t</i> -butanol/[BMIm][BF ₄]	1	1,5	3	> 99	> 200	<i>R</i>
	6	4	13	> 99	> 200	<i>R</i>
	24	9,3	38	> 99	> 200	<i>R</i>
	48	10	51	> 99	> 200	<i>R</i>
	72	22	63	> 99	> 200	<i>R</i>
	96	48	86	> 99	> 200	<i>R</i>
<i>t</i> -butanol/[BMIm][PF ₆]	7	15	74	> 99	> 200	<i>R</i>
	12	59	78	28	3,8	<i>R</i>
	24	75	> 99	42	11	<i>R</i>
	48	91	> 99	42	11	<i>R</i>
	72	95	> 99	38	9,9	<i>R</i>

R,S-mandelato de metila (**17**) (0,15 mmol; 25mg), *n*-butilamina (0,3 mmol; 0,03 mL), CAL-B (100 mg), *t*-butanol: líquido iônico (10:1v/v).

a. calculado pela **Equação 1** (pág 12)

b. determinado por CGQ

c. calculado pelas **Equações 2 e 3** (pág. 12) e através do programa que está disponível na internet (<http://www.orgc.tugraz.at/>).

d. a configuração absoluta do produto foi determinada por comparação com o tempo de retenção do composto padrão enantiomericamente puro.

Como pode observar, os melhores resultados foram obtidos quando misturas de clorofórmio ou *t*-butanol:[BMIm][BF₄] ou [BMIm][PF₆] (10:1v/v) foram usadas, em comparação com o *n*-hexano e com os solventes puros.

Usando mistura de clorofórmio:[BMIm][BF₄] (10:1v/v), o grau de conversão a amida (*S*)-**21** foi de 5-33%, com ee_p de 43 - >99% e valores de E de 3,7 - >200 no intervalo de 1-72 h. Após 48 h o grau de conversão aumentou de 25 a 33% , mas a enantiosseletividade diminuiu, de >200 para 3,7.

Com clorofórmio:[BMIm][PF₆] observa-se um aumento no grau de conversão, quando comparado com a mistura clorofórmio:[BMIm][BF₄], alterando de 5-33% para 3-69% no intervalo de 1-72h. No tempo de reação de 1-24 h, obtém-se a amida (*S*)-**21** com

conversões de 3-21%, ee_p de >99% e valores de $E > 200$, sendo considerado excelente para propósitos práticos e para a obtenção de compostos opticamente puros.

Após este tempo, observou uma diminuição nos valores de ee_p e de E , sendo de 17% e 3,3, respectivamente. A amida **21** foi formada preferencialmente com configuração *S*, mantendo a configuração obtida em clorofórmio (solvente orgânico puro).

Usando a mistura *t*-butanol:[BMIm][BF₄] observou um grau de conversão de 1,5-48%, $ee_p > 99\%$ e valores de E de >200 no intervalo de 1-96h. Usando a mistura *t*-butanol:[BMIm][PF₆], observou a formação da amida (*R*)-**20** com porcentagem de conversão de 15%, $ee_p > 99\%$ e valor de $E > 200$ em 7 h. Após este tempo, observou-se um aumento na porcentagem de conversão, sendo de 59-95%, mas os valores de ee_p e E diminuíram, sendo de 28-38% e 3,8-11, respectivamente no intervalo de 12-72h. Nestas condições, houve formação preferencial da amida (*R*)-**20** mantendo a configuração obtida para os solventes orgânicos puros.

Como discutido acima, quando misturas de clorofórmio ou *t*-butanol:[BMIm][PF₆] (10:1v/v) foram usadas, foi observado dependência do tempo reacional nesta reação. Em geral, usando estas misturas de solvente na reação, obteve-se a amida pura em um tempo menor, sendo de 24 e 12h, respectivamente. Após este tempo, obteve-se a amida racêmica.

Usando clorofórmio ou *t*-butanol, puro ou em mistura com os líquidos iônicos, a configuração na correspondente amida foi à mesma. No entanto, o uso de mistura com líquidos iônicos resultou na formação dos produtos com maior grau de conversão e maiores valores de ee_p e de E .

As diferenças no grau de conversão e enantiosseletividade com esses dois líquidos iônicos podem ser explicada através de suas diferentes propriedades, tais como polaridade, hidrofobicidade, basicidade, ligação de hidrogênio, nucleofilicidade do ânion e viscosidade.⁹³ Essas propriedades podem ser muito importantes nas reações catalisadas por enzimas, afetando a conformação e conseqüentemente sua reatividade.⁶⁶

Em particular, o [BMIm][BF₄] é altamente hidrofílico na natureza, enquanto [BMIm][PF₆] é hidrofóbico devido a diferença nos ânions associados com o cátion orgânico comum. Um comportamento similar é observado com o uso de solventes orgânicos apolares puro no processo biocatalítico.⁶⁶

De acordo com Yang,⁹² a atividade da enzima pode estar mais relacionada com a viscosidade e menos com a polaridade dos líquidos iônicos. Levando-se em consideração todos estes parâmetros, é inapropriado utilizar uma única propriedade (assim como, a polaridade, hidrofobicidade ou viscosidade) para descrever os seus efeitos no desempenho da enzima.

Por outro lado, estas propriedades podem ajudar a esclarecer os resultados discutidos anteriormente. Ambos enantiômeros podem ser obtidos através da escolha de um solvente e enzimas apropriados. Além disso, os líquidos iônicos podem ser reutilizados oferecendo outra vantagem nesta metodologia, com diminuição de custos no processo.

A **Figura 22**, mostra os cromatogramas do padrão quiral (*R*)-**20** e de uma alíquota da reação obtida na aminólise do (*R,S*)- (**17**) usando mistura *t*-butanol: [BMIm][PF₆].

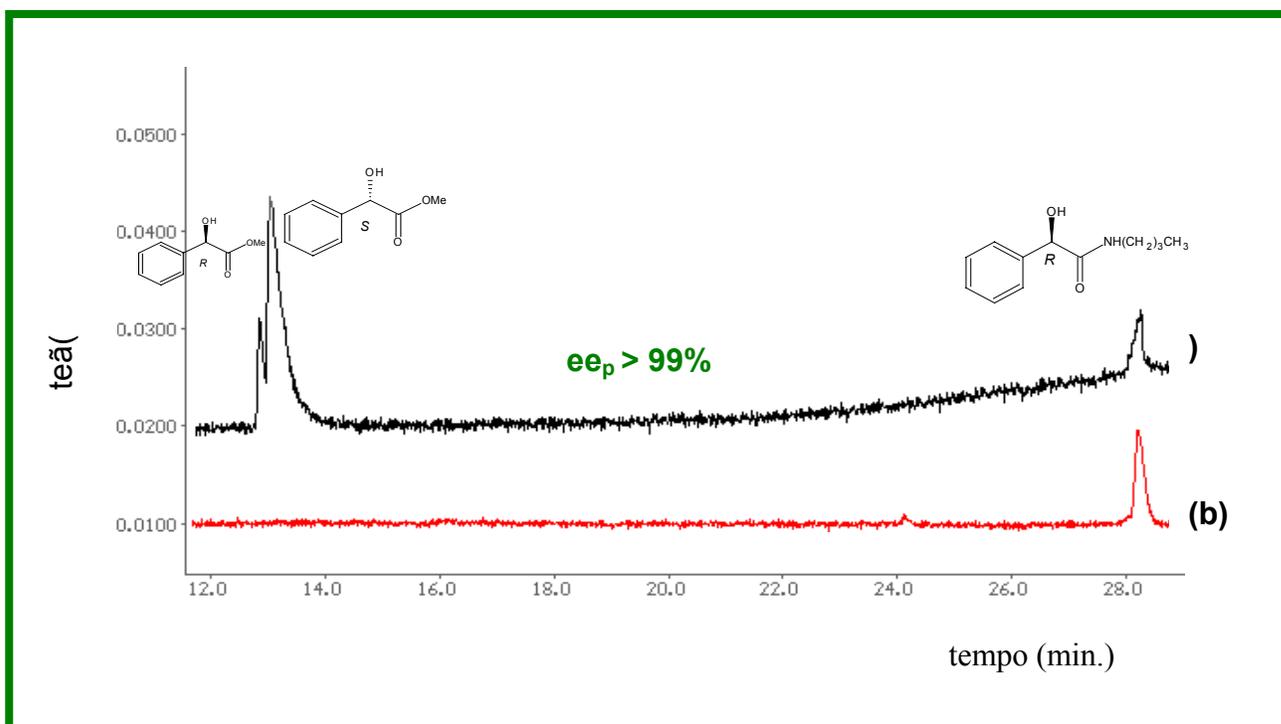


Figura 22 – Cromatogramas, de uma alíquota de reação de aminólise de (*R,S*)-mandelato de metila (**17**) com *t*-butanol:[BMIm][BF₄], em 48h, por CGQ (**a**), padrão quiral da amida (*R*)-**20** (**b**). Condições experimentais: Inj. = 250°C, Det. = 275°C, programação: 80°C 5°C/min. 140°C 3°C/min. 220°C, split 100:1, pressão do H₂ = 75Kpa.

Na **Figura 22** observa-se a formação e separação dos produtos de uma alíquota da aminólise de (*R,S*)-**17** com *t*-butanol:[BMIm][BF₄], em 48h, por CGQ. Este cromatograma mostra a formação majoritária da amida (*R*)-**20**, a qual foi comparada com o padrão do composto puro.

Os resultados discutidos até aqui, mostraram a influência da procedência das lipases e do solvente empregado na resolução de (*R,S*)-**17** com *n*-butilamina. Usando misturas solventes orgânicos:líquidos iônicos, as amidas correspondentes foram obtidas com pureza óptica elevada (>99%). O solvente também determinou a configuração do produto. Quando usou clorofórmio puro ou em mistura a amida (*S*)-**21** foi formada, e com *t*-butanol puro ou em mistura, obteve-se a amida (*R*)-**20**.

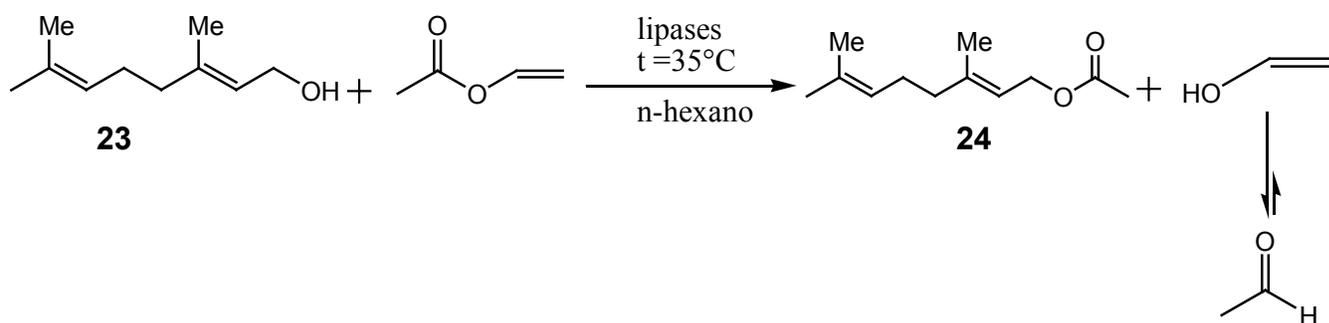
Os líquidos iônicos podem ser usados na reação de aminólise do (*R,S*)-**17** com a vantagem de aumentar a enantiosseletividade, mostrando o grande potencial como meio alternativo para a biocatálise e biotransformação.

4.5 Esterificação do geraniol utilizando lipases imobilizadas

O geraniol é um álcool monoterpênico, o qual através de doadores acila pode ser esterificado formando ésteres que são encontrados em muitos óleos essenciais e usados na produção de essências e fragrâncias, surfactantes e shampoos.⁹⁴

Neste trabalho utilizaram-se filmes de poli-(óxido de etileno) (PEO) (500mg de PEO em 25 mL de água) para imobilizar as lipases de *Burkholderia cepacia* (LPS), PSC I, PSC II, PS-D e de *Aspergillus niger*¹⁰ (LASP). Foi também usada a lipase de *Candida antarctica* (CAL-B - Novozym 435) que já está imobilizada em resina aniônica.

Estes sistemas foram usados como catalisadores na reação de esterificação do geraniol com o acetato de vinila como doador acila (**Esquema 15**).



Esquema 20 – Síntese do acetato de geranoíla catalisada por lipases.

A porcentagem de conversão (c%) foi calculada através de espectros de ressonância magnética nuclear (RMN ¹H), por comparação das áreas dos hidrogênios metilênicos do álcool (**23**) (4,10 ppm) com os do éster (**24**) (4,55 ppm). (**Figura 10**, p.51)

Primeiramente, estudou-se a esterificação do geraniol com acetato de vinila com a CAL-B em *n*-hexano. Os valores de conversão em ésteres foram de 90% em 6 horas de reação.

A seguir, realizaram-se os testes com as diferentes lipases imobilizadas em filme de PEO. (**Figura 23**).

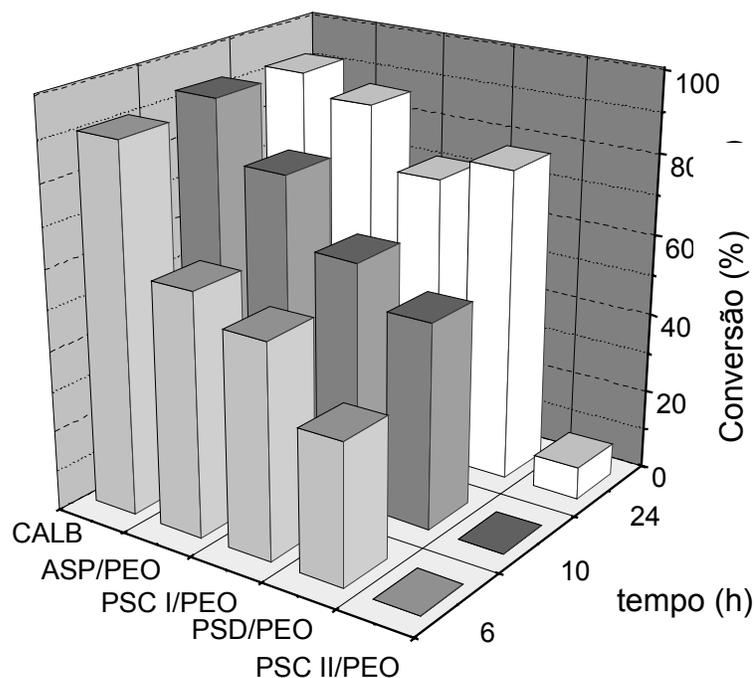


Figura 23 - Conversão (%) em acetato de geranoíla em função do tempo com as lipases imobilizadas, a 35°C.

As conversões em éster variam de 35-93% após 6 horas, com exceção da PSCII/PEO que formou o produto com conversão de apenas 8% em 24 h. Conversões acima de 90% foram obtidas ao utilizar a CAL-B e LASP/PEO, após 24h.

Os estudos de reutilização com as lipases imobilizadas mostraram que, em geral, as mesmas mantiveram suas atividades catalíticas (**Tabela 9**).

Tabela 9 - Conversão em acetato de geranoíla com sucessivas reutilizações com o sistemas lipases/PEO.

lipases	1 ^o reutilização c(%)	2 ^o reutilização c(%)	3 ^o reutilização c(%)
ASP / PEO	87	93	40
PSD / PEO	78	81	89
PSC I / PEO	72	88	43
PSCII / PEO	8	12	10

geraniol (5mmol), acetato de vinila (5mmol), hexano (25 mL) ,35°C, 24h.

A síntese do acetato de geranoíla usando lipases comerciais e a de *A. niger* imobilizada, mostrou-se bastante promissora, obtendo-se o éster em 35-93% de conversão sendo similares aos resultados obtidos com a CAL-B, PSC-I/PEO, PSD/PEO, com exceção da PSC II/PEO que obteve o éster com 8% de conversão em 24h de reação. Estes dados sugerem que a lipase de *A. niger* pode também ser usada em reações enantiosseletivas.

Deve-se destacar a capacidade das mesmas de serem reutilizadas, mantendo a atividade catalítica neste suporte (PEO).

5. Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram obter as seguintes conclusões:

- A reação de aminólise de (*R,S*)-mandelato de metila (**17**) usando as lipases LRM, LTL, LMM, LPS, PS-D e PS-C livres ou imobilizadas não apresentaram seletividade e foram obtidas baixas conversões nas amidas correspondentes.
- Com o uso da lipase de *Candida antarctica* (CAL-B) na aminólise de (*R,S*)-**17**, os produtos foram formados com conversão de 1- >99%, ee_p de 5-75% e valores de E de 1,4-22 com *n*-hexano, clorofórmio e *t*-butanol.
- Usando *n*-hexano na aminólise de (*R,S*)-(**17**), a correspondente amida foi obtida com conversões >99% após 210 min. No intervalo de 15–180 min., a conversão de (*R,S*)-(**17**) à amida (*S*)-(**21**), foi de 33-96%, com valores de ee_p de 30-70% e E de 2,8 – 14.
- A temperatura ótima foi de 35°C na reação de (*R,S*)-**17**. Usando clorofórmio a amida (*S*)-**21** foi obtida com 26% de conversão, apresentando valores de ee_p de 75% e E de 22. Com o *t*-butanol formou preferencialmente a amida (*R*)-**20** em 91% de conversão, valor de ee_p de 51% e E de 9,7, em 24 h. Estes resultados mostraram a influência do solvente orgânico nesta reação.
- A massa de 100 mg de CAL-B foi selecionada para a realização das reações de aminólise.
- Usando clorofórmio ou *t*-butanol, puro ou em mistura com os líquidos iônicos [BMIm][BF₄] ou [BMIm][PF₆], a configuração nas correspondentes amidas foi a mesma. A amida (*R*)-**20** foi formada preferencialmente em *t*-butanol e a amida (*S*)-**21** em clorofórmio. No entanto, o uso de mistura com líquidos iônicos resultou na formação dos produtos com maior grau de conversão,

sendo de 3-48%, e maiores valores de ee_p e de E , sendo $>99\%$ e >200 , respectivamente.

- Os líquidos iônicos além de apresentarem a vantagem de aumentar a enantiosseletividade da enzima podem ser reutilizados sem perda de suas propriedades. Assim, apresentam um grande potencial como meio reacional para as reações biocatalisadas.
- O acetato de geranoíla foi formado com boas porcentagens de conversão, sendo de 35-93% após 6 h de reação usando diversas lipases, tais como PS-C, PS-D, CAL-B e a de *A. niger*.
- As lipases PS-C, PS-D, CAL-B e a de *A. niger* immobilizadas em filme de PEO foram reutilizadas 3 vezes, sem perda de sua atividade catalítica.
- Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que dependendo da escolha adequada das condições experimentais, tais como fonte de lipase e solvente, os produtos podem ser obtidos em altas conversões e excessos enantioméricos. Portanto, a biocatálise apresenta-se como uma ferramenta bastante útil e com grandes aplicações em síntese orgânica.

6. Perspectivas

- Utilizar a lipase de *A. niger* livre ou imobilizada em PEO na resolução de (*R,S*)-mandelato de metila e de outros substratos racêmicos, por exemplo, (\pm)-aminoheptano, (\pm)-2-etilhexilamina e (\pm)- α -metilbenzalamina.
- Estudar a aminólise enantiosseletiva do (*R,S*)-mandelato de metila com outras aminas alifáticas ou aromáticas, com *n*-octilamina, dodecilamina, hexadecilamina, fenilamina e benzilamina.
- Estudar a influência de outros líquidos iônicos na aminólise enantiosseletiva de (*R,S*)-mandelato de metila com as diferentes aminas citadas anteriormente.
- Estudar a influência dos líquidos iônicos na aminólise de (*R,S*)-mandelato de metila em diferentes concentrações.
- Estudar a esterificação do geraniol com outros doadores acila, tais como ácido butírico, hexanóico, láurico e palmítico.
- Estudar a influência da temperatura e do solvente na esterificação do geraniol.
- Publicar os resultados obtidos em revistas indexadas e arbitradas.

7. Referências Bibliográfica

1. Murray, R. K.; Granner, D. K.; Harper; *Bioquímica*, **1990**, 6^a Ed., cap. 7, Atheneus, SP.
2. Campbell, M. K. *Biochemistry*, **1995**, Saunders College Publishing, 169.
3. Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E.; *The Protein Data Bank*. *Nucleic Acids Research*, **2000**, 28, 235-242.
4. Palmer, T.; *Understanding Enzymes*, **1995**, Prentice Hall-Ellis Horwood, 67-75.
5. Faber, K.; *Biotransformations in Organic Chemistry*, **1997**, 3rd Ed., Springer – Verlag, New York, Cap. 1 e 2, 1-116.
6. Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, U.C. *Biotechnol. Adv.* **2001**, 19, 627-662.
7. Nelson, D. L.; Cox, M. M.; *Lehninger: Principles of Biochemistry*, **2000**, 3rd Ed., Worth Publishers, Cap.5, 113-152.
8. www.rcsb.org/pdb/. Acessada em janeiro de 2006.
9. Woolley, P.; Petersen, S. B. *Lipases their Structure, Biochemistry and Application*, **1994**, Cambridge University Press, 139-180.
10. Carvalho, P. O.; Calafatti, S. A.; D. M.; Contesini, F. J.; Bizaco, R. *Quim. Nova* **2005**, 28, 4, 614-621.
11. Queiroz, N.; Nascimento, M. G. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 5225-5227.
12. Nascimento, M. G.; Neto, P. R. C.; Mazzuco, L. M. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, **2001**, ano III, 19, 28-31.
13. de Castro, H. F.; Mendes. A. A.; dos Santos, J. C.; de Aguiar, C. L. *Quim. Nova* **2004**, 27 (1), 146 -156.
14. Ciuffreda, P.; Casati, S.; Santaniello, E. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 3663.
15. Ciuffreda, P.; Alessandrini, L.; Terraneo, G.; Santaniello, E. *Tetrahedron Asymmetry*, **2003**, 14, 3197.
16. Chien, T.; Chern, J. *Carbohydr. Res.* **2004**, 339, 1215.
17. Framis, V.; Camps, F.; Clapés, P. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 5031.
18. Lohith, K.; Divakar, S. *J. Biotechnol.* **2005**, 117, 49.

19. Athawale, V.; Manjrekar, N.; Athawale, M. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 4797-4800.
20. Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. *Tetrahedron* **2005**, 61, 10827-10852.
21. Moreira, M. A.; Bitencourt, T. B.; Nascimento, M. G. *Synth. Commun.* **2005**, 35, 2107-2114.
22. Schmid, R. D.; Verger, R. *Angew. Chem.* **1998**, 37, 1608-1633.
23. [http:// www.pasteur.fr](http://www.pasteur.fr), acessada em dezembro de 2005
24. Morrison, R.T.; Boyd, R. N.; *Organic Chemistry*, **1992** Prentice Hall, Inc. 135-138.
25. Pilli, R. A. *Quím. Nova na Escola* **2001**, 14, 22.
26. Muralidhar, V. R.; Chirumamilla, R. R.; Ramachandran, N. V.; Marchant, R.; Nigam, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10, 1471-1475.
27. Liebeton, K.; Zonta, A.; Schimossek, K.; Nardini, M.; Lang, D. *Chem. Biol.* **2000**, 7, 709-718.
28. Collis, A. N., Sherdrake, G. N., Crosby, J. Eds., *in Chirality in Industry II*. **1997**: chichester.
29. Breen, G. F.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, 15, 1427-1430.
30. Sih, C. J.; Wu, S.-H. *Topics Stereochem.* **1989**, 19, 63.
31. Aitken, R. A., Kilényi, S. N. *Asymmetric Synthesis* **1992** 1st, Ed. L.C. Hall. 233.
32. Snyder. L. R.; Kirkland, J.J.; Glajch, J. L. *Practical HPLC Method Development*. New York.: John Wiley & Sons., **1997**, 765.
33. Marples, B. A. *Elementary Organic Stereochemistry and Conformational Analysis* **1981**.
34. Solomons, T. W. G. *Organic Chemistry*, **1992**, 5 Ed. New York: John Wiley & Sons.
35. Botolli, C. B. G.; Jardim, I. C. S. F.; Collins, C. H. *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência*. In: Canevarolo Jr.; S. V. (Coord.) *Técnicas de Caracterização de Polímeros*. São Paulo: Artliber Editora, **2004**, 95-115.
36. Machida, Y.; Nishi, H.; Nakamura, K.; Nakai, H.; Sato, T. *J. Chromatogr. A.* **1998**, 805, 85-92.

37. Ethur, E. M. Síntese e Caracterização de β - e γ -Ciclodextrinas Modificadas como Fases Estacionárias quirais em Cromatografia Gasosa Capilar Enantiosseletiva. Tese de Doutorado, **2004**, UFSM, Santa Maria-RS.
38. Queiroz, N. Síntese Enantiosseletiva de Amidas e Ésteres Catalisada por Lipases. Tese de Doutorado, **2002**, UFSC-SC.
39. Sheldon, R. A.; Schoevaart, R.; Van Langen, L. M. *Biocatal. Biotransform.* **2005**, 23, (3-4), 141-147.
40. Dalla-Vecchia, R.; Sebrão, D.; Soldi, V.; Nascimento, M. G. *Process Biochem.* **2005**, 40, 2677.
41. Betigeri, S. S.; Neau, S. H. *Biomaterials* **2002**, 23, 3627-3636.
42. Rahman, M. B. A.; Yunus, N. M. M.; Hussein, M. Z.; Rahman, R. N. Z. R. A.; Salleh, A. B.; Basri, M. *Biocatal. Biotransform.* **2005**, 23, (3-4), 233-239.
43. Dalla-vecchia, R.; Soldi, V.; Nascimento, M. G. *Quim. Nova* **2004**, 27, 4, 623.
44. Villeneuve, P.; Muderhwa, J.M.; Graille, J. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, 9, 4, 113-148
45. Crespo, J. S. Imobilização de Lipases em Materiais Poliméricos. Florianópolis. **1999**. Dissertação de Mestrado em Química, UFSC, SC.
46. Tan, T.; Wang, F.; Zhang, H. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, 18, 325-331.
47. Kilingç, A.; Önal, S.; Telefoncu, A. *Process Biochem.* **2002**, 38, 641-647.
48. Nagayama, K.; Yamasaki, N.; Imai, M. *Biochem. Eng. J.* **2002**, 1-6, 3630-3635.
49. Crespo, J. S.; Queiroz, N.; Nascimento, M. G.; Soldi, V. *Process Biochem.* **2005**, 40, 401-409.
50. Xi, J.; Qiu, X.; Zhu, W.; Tang, X. *Microporus Mesoporus Mater.* **2006**, 88, 1-7.
51. Rodriguez-Sáiz, M.; Diez, B. Barredo, J. L. *Fungal Genet. Biol.* **2005**, 42, 5, 464-470.
52. Hasan, F.; Shah, A. D.; Hameed, A. *Enzym. Microb. Technol.* **2005** in press.
53. Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B.; *Nature* **2001**, 409, 258.
54. Zaks, A.; Klibanov, A.M. *Science* **1984**, 224, 1249.
55. Zaks, A.; Klibanov, A.M. *J. Biol. Chem.* **1988**, 17, 8017.

56. Haki, G. D.; Rakshit, S. K. *Bioresour. Technol.* **2003**, 89, 17
57. Yadav, G. D.; Sivakumar, P. *Biochem. Engineer. J.* **2004**, 19, 101-107.
58. DiCosimo, R.; Sigmund, A. E. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, 15, 2797-2799.
59. Romero, M. D.; Calvo, L.; Alba, C.; Daneshfar, A.; Ghaziaskar, H. S. *Enzym. Microb. Technol.* **2005**, 37, 42.
60. Zaks, A.; Klibanov, A.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1985**, 82,3192.
61. Margolin, A. L., Klibanov, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 3802-3804.
62. West, J. B., Wong, C. H. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 1629-1632.
63. Gotor, V., Brieva, R., Revallado, F. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 6973-6974.
64. Soledade de Castro, M.; Domingues, P.; Sinisterra, V. J.; *Tetrahedron* **2000**, 56, 1387-1391.
65. Rebolledo, F.; Gotor, V.; Gonzalez-Sabin, J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, 15, 481-488.
66. Chiappe, C.; Leandri, E.; Lucchesi, S.; Pieraccino, D.; Hammock, B. D.; Morisseau, C.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, 27, 243.
67. Lozano, P.; de Diego, T.; Vaultier, M.; Iborra, J. L. *Biocatal. Biotransform.* **2005**, 23, 169-176.
68. Park, S.; Kaslauskas, R. J. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, 14, 432-437.
69. Kim, K.; Song, B.; Choi, M.; Kim, M. J. *Organic Lett.* **2001**, 3, 10, 1507-1509.
70. Person, M.; Bomscheuer, U. T. *J. Mol. Catal.: B Enzym.* **2003**, 22, 21-27.
71. Kaar, J.L.; Jesionowski, A. M.; Berberich, J. A.; Moulton, R.; Russel, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4125-4131.
72. Anderson, J. L.; Ding, J.; Welton, T.; Armstrong, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14247-14254.
73. Kragl, U.; Eckstein, M.; Kaftzik, N. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, 13, 565-571.
74. Itoh, T.; Nishimura, Y.; Ouchi, N.; Hayase, S. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2003**, 26, 41-45.
75. Kato, K.; Irimeseu, R. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 523-525.
76. Cassol, C. C.; Ebeling, G.; Ferreira, B.; Dupont, *J. Adv. Synth. Catal.* **2006**, 348, 243-248.

77. Suarez, P. A. Z.; Dullius, J. E. L.; Einloft, S.; de Souza, R. F.; Dupont, J. *Polyhedron* **1996**, 15, 7, 1217-1219.
78. Catalog of Organics and Fine Chemicals, Acros Organics, **2004 / 2005**.
79. Lutz, S. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, 15, 2743-2748.
80. Flores-Sánchez, P.; Escalante, J.; Castillo, E. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, 16, 629-634.
81. Pearsson, M.; Costes, D.; Wehtje, E.; Adlerereutz, P. *Enzym. Microb. Technol.* **2002**, 30, 916-923.
82. Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veeger, C. *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, 30, 81-87.
83. Salunkhe, M. M.; Nair, R. V.; *Enzym. Microb. Technol.* **2001**, 28, 333-338.
84. Sun, Y.; Bai, S.; Yuan, Y. *Food Chem.* **2005**.
85. Klibanov, A. M. *J. Biol. Chem.* **2001**, 409, 11, 241-246.
86. Tawaki, S.; Klibanov, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 1882-1884.
87. Kawasaki, M.; Nakamura, K.; Kawabata, S.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1999**, 6, 4, 447-451.
88. Anderson, E. M.; Larsson, K. M.; Kirk, O. *Biocatal. Biotransform.* **1998**, 16, 181-204.
89. Palomo, J. M.; Mateo, C.; Fernández-Lorente, G.; Solares, L. F.; Diaz, M.; Sánchez, V. M.; Bayod, M.; Gotor, V.; Guisan, J. M.; Fernández-Lafuente, R. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, 14, 429-438.
90. Palomo, J. M.; Segura, R. L.; Fuentes, M.; Ortiz, C. C.; Guisan, J. M.; Fernández-Lafuente, R. *Enzym. Microb. Technol.* **2006**, 38, 429-435.
91. van Rantwijk, F.; Lau, R. M.; Sheldon, R. A. *Trends Biotechnol.* **2003**, 21, 3, 131-138.
92. Yang, Z.; Pan, W. *Enzym. Microb. Technol.* **2005**, 37, 19-28.
93. Zhao, H.; *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2005**, 37, 16-25.
94. Athawale, V.; Manjrekar, N.; Athawale, M. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 4797-4800.

8. Produção Científica 2004-2006.

Artigo publicado em periódico indexado

1.

PILISSÃO, C.; NASCIMENTO, M. G

Effects of organic solvents and ionic liquids on the aminolysis of (RS)-methyl mandelate catalyzed by lipases *Tetrahedron:Asymmetry*, 17, **2006**, 428-433.

Trabalhos resumidos publicados em anais de evento

1.

PILISSÃO,C., NASCIMENTO,M.G., CARVALHO,P.O.;CONTESINI, F. J

Acetilação do geraniol com lipases imobilizadas In: II Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones – III Workshop de Biocatálise , 2006, São Paulo.

2.

PILISSÃO, C. LISBOA, L.; ZANOTTO, S. P.; PEREIRA, J. O.; NASCIMENTO, M. G.;ALBUQUERQUE,P.M.

Triagem de Fungos Amazônicos Produtores de Lipases In: II Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones - III Workshop de Biocatálise, 2006, São Paulo-SP.

3.

PILISSÃO,C., NASCIMENTO,M. G., CARVALHO,P.O.; CONTENSINI,F.J.
Preparação do acetato de geranoíla com lipases imobilizadas In: XIII Encontro de Química da Região Sul, 2005, Florianópolis-SC.

4.

PILISSÃO, C., NASCIMENTO, M. G., ALBUQUERQUE, P.M., STAMBUK, B. U.
Solvent Effects on the enantioselectivity of aminolysis and reduction biocatalitic

reactions In: 8° Latin american Conference on Physical Organic Chemistry, 2005, Florianópolis-SC.

5.

PILISSÃO,C., NASCIMENTO,M.G.

Solvents effects on the aminolysis of (R,S)-methyl mandelate catalysed by lipases
In: 11th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 2005, Canela-RS.

6.

PILISSÃO,C.,NASCIMENTO,M.G.,QUEIROZ ,N.

Aminólise enantiosseletiva de (R,S)-hidróxi(fenil)acetato de metila com 1-butilamina catalisada pela CAL In: Biocatálisis y Biotransformaciones 1er Encuentro Regional, 2004, Montevideo.

7.

PILISSÃO,C., NASCIMENTO, M.G., QUEIROZ, N.

Aminólise enantiosseletiva de (R,S)-hidróxi(fenil)acetato de metila com 1-butilamina catalisada por lipases In: X II Encontro de química da Região Sul, 2004, Guarapuava-PR.