

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA



Cristiane Pilissão

**Resolução de aminas alifáticas e aromática mediada por lipases:  
Influência do meio e da imobilização**

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento

Florianópolis, setembro de 2010



Cristiane Pilissão

**Resolução de aminas alifáticas e aromática mediada por lipases:  
Influência do meio e da imobilização**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química, da  
Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do título de Doutor em  
Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento

Florianópolis, setembro de 2010.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido a vida e a oportunidade de estar aqui hoje.

A UFSC e ao Departamento de Química da UFSC, pelo suporte institucional.

Ao CNPq, CAPES e INCT-catálise 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.

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

A Profa. Dra Patrícia de Oliveira Carvalho (USF-Bragança Paulista) pela doação das lipases nativas de *Aspergillus niger* e *Rhizopus oligosporus* e pela determinação das atividades lipolítica das lipases.

Ao Prof. Dr. Marcus C. Mandolesi Sá por ter cedido o seu laboratório para realizar as reações sob microondas.

A minha Família, pela força, torcida, apoio e amor em todos os momentos.

Ao meu marido Rodrigo pela cumplicidade, compreensão, carinho e amor em todos os momentos e principalmente pela sua paciência.

A Graça e ao Jadir da Secretaria de Pós-Graduação por serem sempre tão prestativos e atenciosos.

Aos colegas de laboratório Damianni, Isabel, Vanessa, Rosana e Thiago, 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 os amigos conquistados durante toda a minha carreira acadêmica.

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



## ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	v
ÍNDICE GERAL.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABELAS.....	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xviii
RESUMO.....	xxiii
ABSTRACT.....	xxv
1 Introdução.....	1
1.1 Enzimas.....	1
1.2 Classificação das enzimas.....	3
1.3 Lipases.....	5
1.4 Imobilização de enzimas.....	11
1.5 Estereosseletividade das enzimas.....	18
1.6 Resolução enzimática.....	21
1.7 Métodos analíticos para a determinação da pureza enantiomérica.....	24
1.7.1 Método polarimétrico.....	26
1.7.2 Cromatografia gasosa quiral (CGQ).....	27
1.7.3 Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE.....	29
1.8 Líquidos iônicos na biocatálise.....	30
1.9 Microondas na biocatálise.....	37
2 Justificativa.....	42
3 Objetivos.....	43
3.1 Geral.....	43
3.2 Específicos.....	43
4 Parte experimental.....	45
4.1 Materiais.....	45
4.2 Lipases e atividade.....	45
4.2.1 Determinação da atividade de hidrólise das lipases livres e imobilizadas.....	46
4.3 Equipamentos.....	47
4.4 Caracterização dos compostos.....	47
4.4.1 Espectrofotometria no infravermelho.....	47

4.4.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono.....	48
4.4.3 Polarimetria.....	48
4.4.4 Cromatografia gasosa com fase quiral.....	48
5 Preparação e caracterização dos suportes.....	49
5.1 Imobilização de lipases em filmes de amido de cará e inhame ou de gelatina.....	49
5.2 Determinação do teor de água das lipases imobilizadas em filmes de amido e de gelatina pelo método de Karl-Fischer.....	50
6 Síntese das amidas.....	51
6.1 Preparação das amidas racêmicas e quirais pelo método não enzimático.....	51
6.1.1 Preparação das amidas (RS)-, (R)- e (S)-feniletacetamida.....	51
6.1.2 Preparação das amidas (RS)- e (R)- <i>sec</i> -butilacetamida.....	53
6.1.3 Preparação das amidas (RS)-2-etilhexilacetamida (28) e (RS)-octan-2-il-acetamida (30).....	54
6.2 Sínteses das amidas pelo método enzimático.....	56
6.2.1 Resolução das aminas racêmicas usando solventes orgânicos convencionais e/ou líquidos iônicos.....	56
7 Resultados e Discussão.....	59
7.1 Resolução da (RS)-feniletilamina (4).....	60
7.1.1 Avaliação de lipases de diferentes procedências.....	64
7.1.2 Efeito da temperatura.....	68
7.1.3 Influência da razão molar do doador acila.....	69
7.1.4 Efeito do solvente orgânico.....	73
7.1.5 Efeito dos líquidos iônicos.....	80
7.1.6 Efeito da variação da massa de CAL-B.....	89
7.2 Resolução da (RS)-feniletilamina (4) catalisada pela lipase nativa de <i>Aspergillus niger</i> .....	90
7.2.1 Efeito da temperatura.....	91
7.2.2 Efeito do doador acila.....	92
7.2.3 Efeito do líquido iônico.....	94
7.3 Resolução da (RS)- <i>sec</i> -butilamina (25).....	98
7.3.1 Avaliação de lipases de diferentes procedências.....	102
7.3.2 Influência do doador acila.....	106



7.3.3 Efeito da variação da massa da lipase nativa de <i>A.niger</i> .....	109
7.3.4 Influência da irradiação por microondas.....	109
7.4 Resolução da (RS)-2-etilhexilamina (27) e (RS)-2-aminooctano (29).....	123
7.4.1 Avaliação de lipases de diferentes procedências.....	129
<b>8 Conclusões.....</b>	<b>133</b>
<b>9 Perspectivas.....</b>	<b>136</b>
<b>10 Referências Bibliográficas.....</b>	<b>137</b>
<b>11 Produções acadêmica (2006-2010).....</b>	<b>150</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Representações gráficas das estruturas tridimensionais de uma enzima. <sup>7</sup> .....	1
<b>Figura 2</b> - Representação esquemática do mecanismo de ação enzimática. <sup>8</sup> .....	2
<b>Figura 3</b> - Resolução da ( <i>RS</i> )-1-(3'-bromofenil) etilamina ( <b>3</b> ) com vários doadores acila e catalisada por lipases de diferentes procedências. <sup>24</sup> .....	7
<b>Figura 4</b> – Resolução de aminas alifáticas e aromáticas com acetato de etila catalisada pela CAL-B. <sup>36</sup> .....	7
<b>Figura 5</b> - Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de <i>Pseudomonas</i> sp.obtida por cristalografia de raios-X. <sup>17,39</sup> .....	8
<b>Figura 6</b> - Mecanismo da reação de aminólise de éster catalisada por lipases baseado na “triade catalítica” (adaptado das refs. 4 e 35) .....	9
<b>Figura 7</b> - Principais métodos de imobilização de enzimas (adaptado da ref.6). .....	13
<b>Figura 8</b> - Acilação enantiosseletiva da ( $\pm$ )- $\alpha$ -feniletilamina ( <b>4</b> ) catalisada pela lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i> imobilizada. <sup>14</sup> .....	15
<b>Figura 9</b> – Resolução da ( $\pm$ )- <i>sec</i> -butilamina com diferentes ésteres catalisada por lipases. <sup>78</sup> .....	22
<b>Figura 10</b> - Resolução da ( <i>RS</i> )-feniletilamina ( <b>4</b> ) pela técnica “easy-on, easy-off”. <sup>76</sup> .....	23
<b>Figura 11-</b> Resolução cinética dinâmica (DCR) da ( $\pm$ )-1-feniletilamina. <sup>79</sup> .....	24
<b>Figura 12</b> - Estruturas moleculares e dimensões das $\alpha$ -, $\beta$ - e $\gamma$ -CD. <sup>89</sup> ..	28
<b>Figura 13</b> - Líquidos iônicos em sistema trifásico. <sup>96</sup> .....	31
<b>Figura 14</b> - Ordem de kosmotropicidade dos íons baseado no coeficiente- $\beta$ . <sup>102</sup> .....	32
<b>Figura 15</b> - Representação estrutural dos líquidos iônicos e exemplos dos mais utilizados em biocatálise. <sup>100,106</sup> .....	33
<b>Figura 16</b> - Transesterificação do rac-CDPP ( <b>15</b> ) catalisada pela lipase de <i>P. aeruginosa</i> em <i>n</i> -hexano e/ou LIs:hexano. <sup>27</sup> .....	34
<b>Figura 17</b> - Transesterificação do 3-fenilpropanoato de etila ( <b>18a-k</b> ) catalisada pela LPS em LIs. <sup>94</sup> .....	35
<b>Figura 18</b> -Acilação enantiosseletiva da 1-feniletilamina ( <b>4</b> ) ou 2-fenil-1-propilamina ( <b>21</b> ) com o ácido 4-pentenóico em diferentes LIs catalisada pela CAL-B. <sup>106</sup> .....	36

<b>Figura 19</b> - Moléculas de água com e sem influência do campo elétrico. <sup>112</sup> .....	38
<b>Figura 20</b> - Primeiras reações orgânicas feitas em forno doméstico. <sup>116,117</sup> .....	39
<b>Figura 21</b> - Resolução do ( <i>RS</i> )-2-octanol ( <b>23</b> ) catalisada pela CAL-B. <sup>115</sup> .....	40
<b>Figura 22</b> - Comparação da reação de resolução do ( <i>RS</i> )-2-octanol catalisada pela CAL-B com aquecimento convencional (■) e irradiação por microondas (●) e sem a enzima com irradiação por microondas (▲). <sup>115</sup> .....	40
<b>Figura 23</b> - Imobilização de lipases em filmes de amido de cará e inhame ou de gelatina. ....	50
<b>Figura 24</b> - Preparação da ( <i>RS</i> )-feniletilacetamida ( <b>5</b> ).....	51
<b>Figura 25</b> - Preparação da ( <i>RS</i> )- <i>sec</i> -butilacetamida ( <b>26</b> ) .....	53
<b>Figura 26</b> - Preparação das amidas racêmicas ( <i>RS</i> )-2-etilhexilacetamida ( <b>28</b> ) e ( <i>RS</i> ) octan-2-il-acetamida ( <b>30</b> ).....	54
<b>Figura 27</b> -Resolução de aminas racêmicas catalisada por lipases livres ou imobilizadas. ....	56
<b>Figura 28</b> - Esquema reacional utilizado na resolução das aminas racêmicas.....	58
<b>Figura 29</b> - Recuperação dos líquidos iônicos .....	59
<b>Figura 30</b> - Acilação enantiosseletiva da ( <i>RS</i> )-feniletilamina ( <b>4</b> ) com diferentes doadores acila catalisada por lipases. ....	60
<b>Figura 31</b> - Espectro de IV da ( <i>RS</i> )-feniletilacetamida ( <b>5</b> ) (KBr). ....	61
<b>Figura 32</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H da ( <i>RS</i> )-feniletilacetamida ( <b>5</b> ) (400MHz, CDCl <sub>3</sub> ). ....	62
<b>Figura 33</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C da ( <i>RS</i> )-feniletilacetamida ( <b>5</b> ) (100MHz, CDCl <sub>3</sub> ). ....	63
<b>Figura 34</b> -Cromatograma dos compostos ( <i>RS</i> )- <b>5</b> , ( <i>R</i> )- <b>5a</b> e ( <i>S</i> )- <b>5b</b> , por CGQ. Condições de análises: Inj. = 230 <sup>0</sup> C, Det. = 230 <sup>0</sup> C, programação: 60 <sup>0</sup> C 3 <sup>0</sup> C/min 200 <sup>0</sup> C, split 100:1, Pressão do H <sub>2</sub> = 75Kpa. ....	64
<b>Figura 35</b> - Cromatograma de uma alíquota de reação de acilação ( <i>RS</i> )- <b>4</b> com acetato de etila catalisada pela CAL-B em 48h, por CGQ ( <b>a</b> ) padrão quiral da amida ( <i>R</i> )- <b>5a</b> ( <b>b</b> ). Condições de análises: Inj. = 230 <sup>0</sup> C, Det. = 230 <sup>0</sup> C, programação: 60 <sup>0</sup> C 3 <sup>0</sup> C/min 200 <sup>0</sup> C, split 100:1, pressão do H <sub>2</sub> = 75Kpa. ....	67
<b>Figura 36</b> – Variação da conversão e razão enantiomérica em função da temperatura na reação de acilação da ( <i>RS</i> )-feniletilamina ( <b>4</b> ) (0,26mL;	

2mmol) com acetato de etila (0,78mL; 8mmol) usando CAL-B (100mg) em <i>n</i> -hexano (25mL), 48h. [(■) c (%), (◆) E].....	68
<b>Figura 37</b> - Variação na conversão em função da razão molar do doador acila na reação de acilação da ( <i>RS</i> )-feniletilamina ( <b>4</b> ) (0,26mL; 2mmol) com diferentes doadores acila (2-20mmol) usando a CAL-B (100mg) em <i>n</i> -hexano (25mL), 48h, 35°C. [(◆) acetato de etila, (■) acetato de vinila e (▲) acetato de <i>iso</i> -propenila, 1h] .....	70
<b>Figura 38</b> - Variação na razão enantiomérica (E) em função da razão molar do doador acila na reação de acilação da ( <i>RS</i> )-feniletilamina ( <b>4</b> ) (0,26mL; 2mmol) com diferentes doadores acila (2-20mmol) usando a CAL-B (100mg) em <i>n</i> -hexano (25mL) em 48h a 35°C. [(◆) acetato de etila, (■) acetato de vinila e (▲) acetato de <i>iso</i> -propenila, 1h]. .....	71
<b>Figura 39</b> – Variação da conversão (%) em função do tempo e do solvente orgânico na reação de acilação de ( <i>RS</i> )- <b>4</b> (0,26mL; 2mmol) com acetato de etila (0,78mL; 8mmol) usando CAL-B (100mg), 35°C. [(◆) <i>n</i> -hexano; (■) <i>n</i> -heptano; (▲) <i>terc</i> -butanol; (×) clorofórmio e (●) diclorometano, 25mL de cada] .....	75
<b>Figura 40</b> – Variação da razão enantiomérica (E) em função do tempo e do solvente orgânico na reação de acilação da ( <i>RS</i> )- <b>4</b> (0,26mL; 2mmol) com acetato de etila (0,78mL; 8mmol) usando CAL-B (100mg), 35°C. [(◆) <i>n</i> -hexano; (■) <i>n</i> -heptano; (▲) <i>terc</i> -butanol; (×) clorofórmio e (●) diclorometano, 25mL de cada] .....	76
<b>Figura 41</b> - Cromatograma de uma alíquota da reação de acilação da ( <i>RS</i> )-feniletilamina ( <b>4</b> ) com acetato de etila usando diclorometano em 48h, por CGQ ( <b>a</b> ) e o padrão quiral da amida ( <i>R</i> )- <b>5a</b> ( <b>b</b> ). Condições de análises: Inj. = 230°C, Det. = 230°C, programação: 60°C 3 <sup>0</sup> C/min 200°C, split 100:1, pressão do H <sub>2</sub> = 75Kpa. ....	79
<b>Figura 42</b> - Variação na conversão (%) e razão enantiomérica (E) na presença de diferentes proporções de <i>n</i> -hexano:[BMIm][BF <sub>4</sub> ] (0-10v/v) na acilação da ( <i>RS</i> )- <b>4</b> (0,26mL; 2mmol) com acetato de etila (0,78mL; 8mmol) usando CAL-B (100mg), 35°C, 48h. [(■) conversão (%); (◆) razão enantiomérica (E)] .....	81
<b>Figura 43</b> – Variação da conversão (%), <i>ee</i> <sub>p</sub> (%) e E na acilação da ( <i>RS</i> )- <b>4</b> (0,26mL; 2mmol) com acetato de etila (0,78mL; 8mmol) na presença dos diferentes LIs usando CAL-B (100mg) em diclorometano:[BMIm][X] (9:1 v/v), 35°C, 48h. [(■) conversão (%); (■) <i>ee</i> <sub>p</sub> (%) e (■) E] .....	83

<b>Figura 44</b> -Cromatograma de uma alíquota da reação de acilação da (RS)-feniletilamina ( <b>4</b> ) com acetato de etila usando diclorometano:[BMIm][Cl] (9:1v/v) em 48h, por CGQ ( <b>a</b> ), padrão quiral da amida (R)- <b>5a</b> ( <b>b</b> ). Condições de análises: Inj. = 250 <sup>0</sup> C, Det. = 275 <sup>0</sup> C, programação: 60 <sup>0</sup> C 3 <sup>0</sup> C/min 200 <sup>0</sup> C, split 100:1, pressão do H <sub>2</sub> = 75Kpa. ....	84
<b>Figura 45</b> – Variação da conversão (%), ee <sub>p</sub> (%) e E na acilação da (RS)- <b>4</b> (0,26mL; 2mmol) com acetato de etila (0,78mL; 8mmol) na presença dos diferentes LIs usando CAL-B (100mg) em clorofórmio:[BMIm][X] (9:1v/v), 35°, 48h. [(■) conversão (%); (■) ee <sub>p</sub> (%) e (■) E]. ....	85
<b>Figura 46</b> – Variação da conversão (%) em função da massa da CAL-B e do tempo na reação de acilação da (RS)- <b>4</b> (0,26mL; 2mmol) com acetato de etila (0,78mL; 8mmol) em <i>n</i> -hexano (25mL), 35°C. [(♦)10mg, (■) 25mg, (▲) 50mg, (■) 75mg e (●)100mg] ....	89
<b>Figura 47</b> – Variação da conversão (%) em função do tempo (h) e temperatura (°C) na acilação da (RS)- <b>4</b> (0,26mL; 2mmol) com acetato de etila (0,78mL; 8mmol) usando a lipase nativa de <i>A.niger</i> (50mg) em <i>n</i> -heptano (25 mL)[(♦) 25°C; (■) 35°C e (▲) 45°C]. ....	91
<b>Figura 48</b> - Cromatograma, de uma alíquota da reação de acilação da (RS)- <b>4</b> com acetato de etila catalisada pela lipase de <i>A.niger</i> , <i>n</i> -heptano, 120h, por CGQ ( <b>a</b> ), padrão quiral da amida (R)- <b>5a</b> ( <b>b</b> ). Condições de análises: Inj. = 250 <sup>0</sup> C, Det. = 275 <sup>0</sup> C, programação: 60 <sup>0</sup> C 3 <sup>0</sup> C/min 200 <sup>0</sup> C, split 100:1, pressão do H <sub>2</sub> = 75Kpa. ....	94
<b>Figura 49</b> – Variação da conversão (%) e razão enantiomérica (E) na acilação da (RS)- <b>4</b> (0,26 mL; 2mmol) com acetato de vinila (0,74mL; 8mmol) na presença dos diferentes LIs usando a lipase de <i>A.niger</i> (50mg) em <i>n</i> -heptano:[BMIm][X] (9:1v/v), 35°C, 30min [(■) conversão (%); (■) razão enantiomérica] ....	95
<b>Figura 50</b> - Cromatograma de uma alíquota da reação de acilação da (RS)- <b>4</b> com acetato de vinila usando <i>n</i> -heptano:[BMIm][PF <sub>6</sub> ] (9:1v/v), em 30min, por CGQ ( <b>a</b> ), padrão racêmico da amida ( <b>5</b> ) ( <b>b</b> ). Condições de análises: Inj. = 250 <sup>0</sup> C, Det. = 275 <sup>0</sup> C, programação: 60 <sup>0</sup> C 3 <sup>0</sup> C/min 200 <sup>0</sup> C, split 100:1, pressão do H <sub>2</sub> = 75Kpa. ....	96
<b>Figura 51</b> - Acilação enantiosseletiva da (RS)- <i>sec</i> -butilamina ( <b>25</b> ) com diferentes doadores acila catalisada por lipases livres ou imobilizadas em aquecimento convencional ou em microondas. ....	98
<b>Figura 52</b> - Espectro de IV da (RS)- <i>sec</i> -butilacetamida ( <b>26</b> ) (filme). ..	99

<b>Figura 53</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H da (RS)-sec-butilacetamida ( <b>26</b> ) (400MHz, CDCl <sub>3</sub> ). .....	100
<b>Figura 54</b> - Cromatograma dos compostos (RS)- <b>25</b> ( <b>a</b> ), (RS)- <b>26</b> ( <b>b</b> ) e (R)- <b>26a</b> ( <b>c</b> ), por CGQ. Condições de análises: Inj. = 230 <sup>0</sup> C, Det. = 230 <sup>0</sup> C, programação: 50 <sup>0</sup> C 3 <sup>0</sup> C/min 200 <sup>0</sup> C, split 100:1, Pressão do H <sub>2</sub> = 75Kpa. ....	101
<b>Figura 55</b> - Cromatograma de uma alíquota de reação de acilação (RS)- <b>25</b> com acetato de etila catalisada pela lipase de <i>A.niger</i> em 1h, por CGQ ( <b>a</b> ), padrão quiral da amida (R)- <b>26a</b> ( <b>b</b> ). Condições de análises: Inj. = 230 <sup>0</sup> C, Det. = 230 <sup>0</sup> C, programação: 50 <sup>0</sup> C 3 <sup>0</sup> C/min 200 <sup>0</sup> C, split 100:1, pressão do H <sub>2</sub> = 75Kpa. ....	105
<b>Figura 56</b> - Variação na conversão (%) e excesso enantiomérico ( <i>ee</i> <sub>p</sub> ) na reação de acilação da (RS)-sec-butilamina ( <b>25</b> ) (0,2mL; 2mmol) com diferentes doadores acila (2mmol) com a lipase de <i>A.niger</i> (50mg) em <i>n</i> -hexano (10mL), 35°C, em 1h. [(■) <i>c</i> (%), (■) <i>ee</i> <sub>p</sub> (%)] .....	106
<b>Figura 57</b> - Variação na conversão (%) e <i>ee</i> <sub>p</sub> (%) na reação de acilação da (RS)-( <b>25</b> ) (0,2mL; 2mmol) com acetato de etila (2-10mmol) com a lipase de <i>A.niger</i> (50mg) em <i>n</i> -hexano (10mL), 1h, 35°C. [(■) conversão (%), (◆) <i>ee</i> <sub>p</sub> (%)]......	108
<b>Figura 58</b> - Variação na conversão (%) em função da temperatura (°C) na reação de acilação da (RS)-sec-butilamina ( <b>25</b> ) (0,2mL; 2mmol) com acetato de etila (0,2mL; 2mmol) usando a lipase de <i>A.niger</i> (50mg) em <i>n</i> -hexano (10mL ou 7mL), 3min. [(◆)irradiação por microondas (■) aquecimento convencional] .....	111
<b>Figura 59</b> - Cromatograma de uma alíquota de reação de acilação (RS)- <b>25</b> com acetato de etila catalisada pela lipase de <i>A.niger</i> em 1min, em MO por CGQ ( <b>a</b> ), padrão quiral da amida (R)- <b>26a</b> ( <b>b</b> ). Condições de análise: Inj. = 230 <sup>0</sup> C, Det. = 230 <sup>0</sup> C, programação: 50 <sup>0</sup> C 3 <sup>0</sup> C/min 200 <sup>0</sup> C, split 100:1, pressão do H <sub>2</sub> = 75Kpa. ....	112
<b>Figura 60</b> - Acilação enantiosseletiva da (RS)-2-etilhexilamina ( <b>27</b> ) e (RS)-2-aminooctano ( <b>29</b> ) com diferentes lipases.....	123
<b>Figura 61</b> - Espectro de IV da (RS)-2-etilhexilacetamida ( <b>28</b> ) (filme). .....	124
<b>Figura 62</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H da (RS)-2-etilhexilacetamida ( <b>28</b> ) (400MHz, CDCl <sub>3</sub> ). .....	125
<b>Figura 63</b> - Cromatograma da amida (RS)- <b>28</b> , por CGQ. Condições de análises: Inj. = 230 <sup>0</sup> C, Det. = 230 <sup>0</sup> C, programação: 90 <sup>0</sup> C 3 <sup>0</sup> C/min 150 <sup>0</sup> C 5 <sup>0</sup> C/min 200 <sup>0</sup> C, split 100:1, Pressão do H <sub>2</sub> = 75Kpa.....	126

<b>Figura 64</b> - Espectro de IV da ( <i>RS</i> )- octan-2-il-acetamida ( <b>30</b> ) (filme). .....	127
<b>Figura 65</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H da ( <i>RS</i> )- octan-2-il-acetamida ( <b>30</b> ) (400MHz, CDCl <sub>3</sub> ). .....	128
<b>Figura 66</b> - Cromatograma da amida ( <i>RS</i> )- <b>30</b> , por CGQ. Condições de análises: Inj. = 230 <sup>0</sup> C, Det. = 230 <sup>0</sup> C, programação: 90 <sup>0</sup> C 3 <sup>0</sup> C/min 150 <sup>0</sup> C 5 <sup>0</sup> C/min 200 <sup>0</sup> C, split 100:1, Pressão do H <sub>2</sub> = 75Kpa. ....	129
<b>Figura 67</b> - Cromatograma de uma alíquota de reação de acilação ( <i>RS</i> )- <b>29</b> com acetato de etila catalisada pela CAL-B, em <i>n</i> -heptano, 24h, 35 <sup>0</sup> C, por CGQ ( <b>a</b> ), padrão racêmico da amida ( <i>RS</i> )- <b>30</b> ( <b>b</b> ). Condições de análise: Inj. = 230 <sup>0</sup> C, Det. = 230 <sup>0</sup> C, programação: 90 <sup>0</sup> C 3 <sup>0</sup> C/min 150 <sup>0</sup> C 5 <sup>0</sup> C/min 200 <sup>0</sup> C, split 100:1, pressão do H <sub>2</sub> = 75Kpa. ....	131



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Classificação das enzimas segundo a UIBBM. <sup>6,7</sup> .....	4
<b>Tabela 2</b> - Acilação enantiosseletiva da ( <i>RS</i> )-feniletilamina ( <b>4</b> ) com acetato de etila usando diferentes lipases. ....	65
<b>Tabela 3</b> - Efeito dos cátions nos LIs na acilação da ( <i>RS</i> )-feniletilamina ( <b>4</b> ) com acetato de etila usando a CAL-B. ....	86
<b>Tabela 4</b> - Efeito do doador acila na acilação da ( <i>RS</i> )-feniletilamina ( <b>4</b> ) catalisada pela lipase nativa de <i>A.niger</i> . ....	92
<b>Tabela 5</b> - Acilação da ( <i>RS</i> )- <i>sec</i> -butilamina ( <b>25</b> ) com acetato de etila usando lipases de diversas procedências. ....	103
<b>Tabela 6</b> - Efeito do solvente na conversão e seletividade na reação de acilação da ( <i>RS</i> )- <i>sec</i> -butilamina ( <b>25</b> ) com aquecimento convencional e em irradiação por microondas. ....	115
<b>Tabela 7</b> - Efeito da imobilização da lipase de <i>A.niger</i> na conversão e seletividade na reação de acilação da ( <i>RS</i> )- <i>sec</i> -butilamina ( <b>25</b> ) com aquecimento convencional e em irradiação por microondas. ....	117
<b>Tabela 8</b> - Acilação da ( <i>RS</i> )- <i>sec</i> -butilamina ( <b>25</b> ) com acetato de etila usando os sistemas <i>A.niger</i> /cará e <i>A.niger</i> /inhome com aquecimento convencional e em irradiação por microondas. ....	119
<b>Tabela 9</b> - Reutilização dos sistemas <i>A.niger</i> /inhome e <i>A.niger</i> /cará na acilação da ( <i>RS</i> )- <i>sec</i> -butilamina ( <b>25</b> ) sob irradiação por microondas. ....	121
<b>Tabela 10</b> - Acilação da ( <i>RS</i> )-2-etilhexilamina ( <b>27</b> ) e da ( <i>RS</i> )-2-aminoctano ( <b>29</b> ) com acetato de etila com diferentes lipases.....	130



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha$	Alfa
RNA	ácido ribonucléico
DNA	ácido desoxirribonucléico
Glu	ácido glutâmico
$\beta$	Beta
E.C.3.1.1.3	classificação das lipases segundo UIBBM
CD	Ciclodextrina
[BMIm][Cl]	cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio
CG	cromatografia gasosa
CGQ	cromatografia gasosa com fase quiral
J	constante de acoplamento (Hz)
$\text{CDCl}_3$	clorofórmio deuterado
ES	complexo enzima-substrato
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
ccd	cromatografia de camada delgada
$\delta$	deslocamento ou delta (ppm)
Fid	detector por ionização de chama
$ee_s$	excesso enantiomérico do substrato
$ee_p$	excesso enantiomérico do produto
IV	espectrofotometria no infravermelho
Rf	fator de retenção
$\gamma$	gama

[BMIm][PF <sub>6</sub> ]	hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio
[BMPi][PF <sub>6</sub> ]	hexafluorofosfato de 1-butil-4-metilpiridínio
[BMIm][BF <sub>4</sub> ]	tetrafluorborato de 1-butil-3-metilimidazólio
[BMPi][BF <sub>4</sub> ]	tetrafluorborato de 1-butil-4-metilpiridínio
[BMIm][SCN]	tiocianato de 1-butil-3-metilimidazólio
Hz	Hertz
His	Histidina
Inj.	Injetor
LPS	lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>
PS-C	lipase de <i>Pseudomona cepacia</i> imobilizada em cerâmica
PS-D	lipase de <i>Pseudomona cepacia</i> imobilizada em terra diatomácea
<i>L.A.niger</i>	lipase nativa de <i>Aspergillus niger</i>
<i>LR. oligosporus</i>	lipase nativa de <i>Rhizopus oligosporus</i>
log <i>P</i>	logaritmo do coeficiente de partição
MHz	mega Hertz (10 <sup>6</sup> Hertz)
M	multiplete
c (%)	porcentagem de conversão
Pdb	protein data bank
Pf.	ponto de fusão (°C)
Ppm	partes por milhão
Q	Quarteto
E	razão enantiomérica
m/z	razão massa/ carga

RMN- <sup>13</sup> C	ressonância magnética nuclear de carbono
RMN- <sup>1</sup> H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
[α] <sub>D</sub> <sup>T</sup>	rotação óptica específica
Ser	Serina
s	Singleto
t <sub>R</sub>	tempo de retenção
t.a	temperatura ambiente
T <sub>f</sub>	temperatura final
T <sub>i</sub>	temperatura inicial
TMS	Tetrametilsilano
T	Triplet
UIBBM	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular



## RESUMO

As aminas e amidas são importantes em síntese orgânica, devido à presença destes grupos funcionais em vários compostos com atividade farmacológica. Neste trabalho, as lipases comerciais de *Pseudomonas cepacia* (LPS), de *Pseudomonas cepacia* (LPS-C), de *Pseudomonas cepacia* (LPS-D) e a de *Candida antarctica* (CAL-B), e as nativas de *Aspergillus niger* (*A.niger*) e de *Rhizopus oligosporus* (*R. oligosporus*) foram utilizadas como catalisadores na acilação da (RS)- phenylethylamine com diferentes doadores acila (acetatos de etila, de vinila e o de *iso*-propenila). Nesta reação, foram avaliados os efeitos da temperatura, razão molar do doador acila e o dos solventes orgânicos puros (*n*-hexano, *n*-heptano, clorofórmio, diclorometano e *tert*-butanol) e/ou em misturas com líquidos iônicos (LIs) (hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIm][PF<sub>6</sub>], tetrafluorborato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIm][BF<sub>4</sub>], cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIm][Cl], tiocianato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIm][SCN], hexafluorofosfato de 1-butil-4-metilpiridínio [BMPi][PF<sub>6</sub>] e tetrafluorborato de 1-butil-4-metilpiridínio [BMPi][BF<sub>4</sub>]. Quando as lipases de LPS, LPS-C, LPS-D e a de *R. oligosporus* foram empregadas em *n*-hexano à 35°C, foram obtidas baixas conversões a correspondente amida-*R* (0–8%) e não houve seletividade (E= 0-1,3) em 144h de reação. Porém, ao utilizar as lipases de *C. antarctica* (CAL-B) e a nativa de *A.niger* na acilação da (RS)-feniletilamina com acetato de etila, os resultados foram melhores. Ao utilizar a CAL-B, a amida-*R* foi obtida com conversões de 2-45% e com E de 1,5->200, em 96h em *n*-hexano, *n*-heptano, *tert*-butanol, clorofórmio e diclorometano. Os melhores resultados foram obtidos com os solventes com log *P* > 3,5. Com a lipase de *A.niger*, a amida-*R* foi formada com conversões de 6-30% e E >200, em 96h em *n*-heptano. Ao utilizar as misturas de diclorometano:[BMIm][X] ou clorofórmio:[BMIm][X] 10% v/v (X= PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, SCN<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>) e a CAL-B, a seletividade da reação foi maior que em solvente puro, sendo E de 6 - >200 em 48h. A seletividade da CAL-B aumentou de acordo com os ânions na seguinte ordem: Cl<sup>-</sup> > SCN<sup>-</sup> > BF<sub>4</sub><sup>-</sup> > PF<sub>6</sub><sup>-</sup> em misturas com diclorometano; e PF<sub>6</sub><sup>-</sup> > BF<sub>4</sub><sup>-</sup> > SCN<sup>-</sup> > Cl<sup>-</sup> em misturas com o clorofórmio. Com as misturas *n*-hexano: [BMPi][BF<sub>4</sub>] ou [BMPi][PF<sub>6</sub>] 10% v/v, as conversões a amida-*R* foram de 38 e 49%, e os valores de E de 24 e >200. Usando estas misturas de solventes, o efeito do LIs foi na seguinte ordem [BMPi][PF<sub>6</sub>] > [BMPi][BF<sub>4</sub>]. Quando a lipase de *A.niger* foi usada na acilação desta amina, em misturas de *n*-heptano; [BMIm][PF<sub>6</sub>], [BMIm][BF<sub>4</sub>], [BMIm][Cl] e [BMIm][SCN] 10% v/v, em geral, foram obtidos melhores resultados. Usando a mistura *n*-heptano; [BMIm][PF<sub>6</sub>] e [BMIm][BF<sub>4</sub>], os valores de E foram maiores, sendo de 8 e 7 quando comparado com o solvente puro (E=2). Usando *n*-heptano:[BMIm][SCN] e *n*-heptano:[BMIm][Cl], os

resultados foram similares aos obtidos em *n*-heptano puro, os valores de E foram de 1,5 e 1, respectivamente. A influência dos ânions seguiu a seguinte ordem  $\text{PF}_6^- > \text{BF}_4^- > \text{SCN}^- > \text{Cl}^-$ . Em outro estudo, as lipases CAL-B, LPS, LPS-C, a LPS-D e a de *A.niger* livre ou imobilizada em filmes de amido de cará, inhame ou de gelatina, foram utilizadas na acilação enzimática da (*RS*)-*sec*-butilamina com acetato de etila, de vinila, ou de *iso*-propenila em *n*-heptano, *n*-hexano, diclorometano, clorofórmio, tolueno, *tert*-butanol e em ciclohexano, em aquecimento convencional ou sob irradiação por microondas. Foram avaliados para esta reação os efeitos da razão molar do doador acila, temperatura, massa da lipase de *A.niger* e reutilização do biocatalisador. Sob aquecimento convencional, os melhores resultados foram obtidos ao utilizar o acetato de etila, a 35°. Quando as LPS, LPS-C e LPS-D livres ou imobilizadas foram utilizadas, a correspondente amida foi obtida com baixas conversões (0-5%) e valores de E (1,3-1,7) em até 6h de reação. Ao utilizar a CAL-B, a amida-*R* foi obtida com conversão de 54%, resultando em E de 30, em apenas 30min. Com a lipase de *A.niger* livre ou imobilizada, a amida-*R* foi obtida com conversões de 2-41%, resultando em valores de E de 1- >200, em *n*-hexano ou *n*-heptano, em 1h de reação. Sob irradiação de microondas, e usando a lipase de *A.niger* livre ou imobilizada, a amida-*R* foi obtida com conversões de 2-46%, resultando em valores de E de 10- >200, em 5min. Ao utilizar solventes orgânicos com  $\log P > 2,5$  a amida-*R* foi obtida com conversões de 10-21 e 30-55% sob irradiação por microondas (1min) e aquecimento convencional (30min), resultando em valores de  $ee_p$  de 74- > 99% e 78-85%, respectivamente. Com os solventes com  $\log P < 2,5$ , conversões foram maiores, sendo de 84-90% e 71-88%. No entanto, os valores de  $ee_p$  foram menores, sendo de 70-81% e 71-88%, sob aquecimento convencional ou irradiação por microondas. Em um terceiro estudo, as lipases CALB, LPS, LPS-C, LPS-D e a nativa de *A.niger* foram utilizadas na acilação enzimática da (*RS*)-2-etilhexilamina e de (*RS*)-2-aminooctano com acetato de etila em *n*-hexano ou *n*-heptano a 35°C, em 24h. Ao utilizar a (*RS*)-2-etilhexilamina, a respectiva amida foi obtida com conversões de 2-64% resultando em  $ee_p$  de 1,6-4,3. Foram obtidos melhores resultados ao utilizar o (*RS*)-2-aminooctano, e a amida foi obtida com conversões de 34-82% e E de 1,2 >200. Estes resultados mostraram a importância da estrutura dos substratos em reações biocatalisadas. Em resumo, os dados obtidos mostraram que amidas enantiomericamente puras podem ser obtidas a partir da acilação enzimática de aminas alifáticas ou aromática. Porém, é muito importante considerar a relação meio-enzima-substrato. A escolha adequada das lipases, do doador acila, dos solventes orgânicos de diferentes polaridades puros ou em misturas com LIs, e as condições nas quais a mistura reacional é aquecida, ou seja por aquecimento convencional ou em irradiação por microondas são fatores relevantes para o sucesso do processo biocatalítico.



## ABSTRACT

Amines and amides are important functional groups in terms of organic synthesis, since they are found in a wide number of compounds with pharmaceutical activity. Herein, commercial lipases from *Pseudomonas cepacia* (LPS; LPS-C; LPS-D) and *Candida antarctica* (CAL-B), and native lipases from *Aspergillus niger* and *Rhizopus oligosporus*, were used as catalysts in the acylation of (*RS*)-phenylethylamine using various acyl donors (ethyl acetate, vinyl or *iso*-propenylacetate). In this reaction, the effects of the temperature and acyl donor molar ratio were evaluated, as well as the use of organic solvents in pure form (*n*-hexane, *n*-heptane, chloroform, dichloromethane and *tert*-butanol) or in mixtures with ionic liquids, ILs (1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate [BMIm][PF<sub>6</sub>], 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate [BMIm][BF<sub>4</sub>], 1-butyl-3-methylimidazolium chloride [BMIm][Cl], 1-butyl-3-methylimidazolium thiocyanate [BMIm][SCN], 1-butyl-4-methylpyridinium hexafluorophosphate [BMPi][PF<sub>6</sub>] and 1-butyl-4-methylpyridinium tetrafluoroborate [BMPi][BF<sub>4</sub>]). When the lipases LPS, LPS-C and LPS-D, as well as that from *R. oligosporus*, were used in *n*-hexane at 35°C, the conversion degrees for the corresponding *R*-amide were low (0–8%) with no selectivity (*E*= 0-1.3) in 144 h of reaction. However, using the lipase CAL-B and that from *A. niger* in the acylation of (*RS*)-phenylethylamine with ethyl acetate, the results were better. Using CAL-B, the *R*-amide was obtained in conversion degrees of 2-45% with *E*-values of 1.5 to >200, in 96 h of reaction in *n*-hexane, *n*-heptane, chloroform, dichloromethane and *tert*-butanol. The best results were achieved using solvents with log *P* >3.5. In the case of the lipase from *A. niger*, the *R*-amide was obtained in conversion degrees of 6-30% and with *E*-values >200, in 96 h of reaction in *n*-heptane. Using the mixtures dichloromethane:[BMIm][X] or chloroform:[BMIm][X] 10% v/v (X= PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, SCN<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>) and CAL-B, the reaction selectivity was higher than that obtained in the pure organic solvents, with *E*-values in the range of 6 to >200 in 48 h of reaction. The CAL-B selectivity varied according to the anions used, increasing in the following order: Cl<sup>-</sup> > SCN<sup>-</sup> > BF<sub>4</sub><sup>-</sup> > PF<sub>6</sub><sup>-</sup> in mixtures with dichloromethane, and PF<sub>6</sub><sup>-</sup> > BF<sub>4</sub><sup>-</sup> > SCN<sup>-</sup> > Cl<sup>-</sup> in mixtures with chloroform. Using the mixtures *n*-hexane:[BMPi][BF<sub>4</sub>] or [BMPi][PF<sub>6</sub>] 10% v/v, the degrees of conversion to the *R*-amide were 38 and 49%, with *E*-values of 24 and >200, respectively. Using these solvent mixtures the effect of the ILs was [BMPi][PF<sub>6</sub>] > [BMPi][BF<sub>4</sub>]. When the lipase from *A. niger* was used in the acylation of this amine in mixtures of *n*-heptane:[BMIm][PF<sub>6</sub>], [BMIm][BF<sub>4</sub>], [BMIm][Cl] and [BMIm][SCN] 10% v/v, the *E*-values were higher (8 and 7) than those obtained with the pure organic solvents (*E*=2). Using the mixtures *n*-

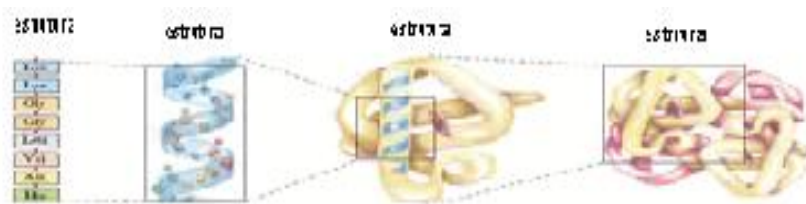
heptane:[BMIm][SCN] and *n*-heptano:[BMIm][Cl], the results were similar to those obtained in pure *n*-heptane and the E-values were 1.5 and 1.0, respectively. The selectivity varied according to the anion used, decreasing in the order  $\text{PF}_6^- > \text{BF}_4^- > \text{SCN}^- > \text{Cl}^-$ . In another study, the lipases CAL-B, LPS, LPS-C, and LPS-D, as well as that from *A. niger* free or immobilized in yam, taro starch or gelatin films, were used in the enzymatic acylation of (*RS*)-sec-butylamine with ethyl acetate, vinyl or *iso*-propenylacetate in *n*-heptane, *n*-hexane, dichloromethane, chloroform, toluene, *tert*-butanol and cyclohexane using conventional heating and microwave irradiation. In this reaction the effects of the acyl donor molar ratio, temperature, and amount of *A. niger* lipase, as well as the possibilities for the re-use of biocatalyst, were evaluated. Under conventional heating, the best results were obtained using ethyl acetate, at 35°C. When the lipases LPS, LPS-C and LPS-D, free or immobilized, were used, the corresponding amide was obtained with low conversion degrees (0-5%) and E values (1.3-1.7) in 6 h of reaction. Using CAL-B, the *R*-amide was obtained in 54% conversion resulting in an E-value of 30, in 30 min of reaction. Using the lipase from *A. niger*, free or immobilized, the *R*-amide was obtained in conversion degrees of 2-41%, resulting in E-values of 1 to >200, in *n*-hexane or *n*-heptane, in 1h of reaction. Using microwave irradiation and the lipase from *A. niger*, free or immobilized, the *R*-amide was obtained in conversion degrees of 2-46%, resulting in E-values of 10 to >200, in 5min of reaction. For organic solvents with  $\log P > 2.5$  the *R*-amide was obtained in conversion degrees of 10-21 and 30-55% using microwave irradiation (1 min) and conventional heating (30 min), resulting in  $ee_p$  values of 74 to >99% and 78-85%, respectively. Using solvents with  $\log P < 2.5$ , the conversion degrees were higher (84-90 and 71-88%), resulting in  $ee_p$  values of 74 to >99% and 78-85%, with conventional heating and microwave irradiation, respectively. In the third study, the commercial lipases CALB, LPS, LPS-C, and LPS-D, as well as the native lipase from *A. niger*, were used in the enzymatic acylation of (*RS*)-2-ethylhexylamine and (*RS*)-2-aminooctane with ethyl acetate in *n*-hexane or *n*-heptane at 35°C, in 24 h of reaction. In the case of (*RS*)-2-ethylhexylamine, the corresponding amide was obtained in conversion degrees of 2-64%, resulting in  $ee_p$  values of 1.6 to 4.3. The best results were obtained using (*RS*)-2-aminooctane, forming the amide with conversion degrees of 34-82% and E-values of 1.2 to >200. These data show the importance of the substrate structure in biocatalytic reactions. In summary, the data reported herein show that enantiomerically pure amides can be obtained from the enzymatic acylation of aliphatic or aromatic amines. However, the media-enzyme-substrate relationship is important and must be considered. The choice of lipases, acyl donors, organic solvents (with various polarities and pure or in mixtures with ILs), and type of heating used in the reactions (conventional heating or microwave irradiation) greatly affects the efficiency of a particular biocatalytic process.

# 1 Introdução

## 1.1 Enzimas

Atualmente, a biocatálise é um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para a síntese de compostos de alto valor agregado. A exploração da biodiversidade na busca de novos catalisadores por técnicas de seleção de microorganismos, de plantas ou células animais representam os métodos tradicionais de descoberta de novas enzimas para o desenvolvimento da biocatálise em escala industrial. Dentre esses, os microrganismos são de particular interesse devido ao curto período de geração, grande diversidade de processos metabólicos e enzimas envolvidas. Além disso, não há um número limitado de microrganismos na natureza que possam ser testados, os quais são bastante diferentes entre si.<sup>1-3</sup>

As enzimas são catalisadores biológicos de extraordinária eficiência, em geral, de natureza protéica com exceção de um pequeno grupo de moléculas de ácido ribonucléico com propriedades catalíticas, formadas por uma longa cadeia de aminoácidos ligados através de ligações peptídicas.<sup>4-6</sup> A seqüência exata de aminoácidos da cadeia protéica é denominada estrutura primária (cadeia polipeptídica). A conformação tridimensional dessa seqüência é chamada estrutura secundária e a disposição espacial é denominada de estrutura terciária. Algumas proteínas contêm duas ou mais unidades de cadeias polipeptídicas, ou subunidades, que podem ser idênticas ou diferentes. O arranjo destas subunidades protéicas em três complexos tridimensionais constitui a estrutura quaternária.<sup>4,7</sup>

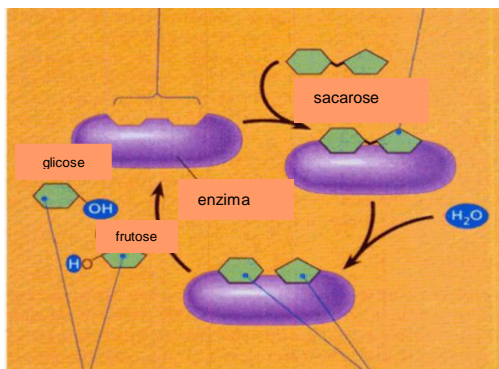


**Figura 1-** Representações gráficas das estruturas tridimensionais de uma enzima.<sup>7</sup>

As enzimas contêm um sítio ativo, o que constitui somente uma pequena proporção de seu volume total e está usualmente próximo ou na superfície, estando, portanto, 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.<sup>6</sup> As enzimas são catalisadores versáteis, existindo para cada tipo de reação orgânica um processo enzimático equivalente.<sup>7</sup>

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 favorece a formação do complexo enzima-substrato (ES), para posteriormente formar os produtos.<sup>7</sup>

Como exemplo de reação catalisada por uma enzima, pode-se citar a quebra da sacarose em seus dois monossacarídeos constituintes, uma molécula de glicose e outra de frutose. A enzima que catalisa essa reação é a sacarase (**Figura 2**).<sup>8</sup>



**Figura 2** - Representação esquemática do mecanismo de ação enzimática.<sup>8</sup>

Os biocatalisadores são utilizados em química orgânica como uma alternativa aos processos químicos clássicos por apresentarem inúmeras vantagens. Dentre estas destacam-se o elevado aumento da

velocidade de reações catalisadas por enzimas que podem ser de vinte ordens de magnitude e a utilização de condições brandas de reação (pressão atmosférica, temperaturas abaixo de 100 °C e pH neutro).

As enzimas possuem alta especificidade pelos substratos e podem ser totalmente seletivas quanto ao tipo de reação que catalisam. Dentre estas, cita-se a quimiosseletividade, regioseletividade e em especial a enantioseletividade.<sup>6,9,10</sup>

Porém, o uso destes biocatalisadores ainda apresenta algumas desvantagens, tais como:

- São encontrados na natureza somente em uma forma enantiomérica, a forma L;
- Requerem o controle dos parâmetros reacionais, tais como temperatura e pH;
- Apresentam uma maior atividade catalítica em água;
- São propensos a sofrerem inibição por agentes químicos e físicos, tais como sabões e detergentes, metais pesados, temperaturas elevadas ou muito baixas e variações na pressão,
- Apresentam custo elevado.

Nos últimos anos tais desvantagens têm sido bastante amenizadas pelo aperfeiçoamento e desenvolvimento de diversas técnicas para reações biocatalíticas. Quando o processo não for satisfatoriamente seletivo, modificações simples nas condições experimentais podem influenciar tanto a estereoquímica quanto a enantioseletividade.<sup>11</sup>

As modificações mais comuns envolvem o uso de solventes orgânicos, adição de inibidores, técnicas de imobilização, utilização de enzimas mais resistentes (extremoenzimas), bem como o uso de líquidos iônicos e a irradiação por microondas (MO).<sup>6,12-1</sup>

## **1.2 Classificação das enzimas**

No Banco de Dados de Proteínas (PDB), encontram-se catalogados 65527 tipos de macromoléculas (entre proteínas, peptídeos, vírus, carboidratos, ácidos nucleicos e complexos proteína/ácido nucleico), sendo que destas 60654 são proteínas. Várias enzimas têm sua seqüência de aminoácidos e estruturas tridimensionais determinadas

através de cristalografia de raios-X, RMN-2D e microscopia eletrônica.<sup>7,17</sup>

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 reação que catalisa (**Tabela 1**).<sup>6,7</sup>

Para a identificação individual todas as enzimas possuem um código **EC A.B.C.D** onde **EC** é a abreviatura de “Enzyme Commission”, **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 UIBBM.<sup>6,7</sup>

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

As enzimas hidrolíticas são os biocatalisadores mais comumente usados em síntese orgânica. Nesta classe estão incluídas as amidases, proteases, nitrilases, fosfatases e epoxidases, sendo de particular e grande interesse as lipases.<sup>6,7</sup>

Uma aplicação que tem merecido destaque é a utilização na obtenção de fármacos ou insumos farmacêuticos em suas formas enantioméricas ativas com elevada pureza ótica. Estas enzimas são

capazes de reconhecer moléculas quirais e atuam preferencialmente, em um dos isômeros de uma mistura racêmica.<sup>15</sup>

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases E.C.3.1.1.3) são enzimas universais, pertencentes à família das hidrolases que, em seu meio natural hidrolisam triacilgliceróis aos correspondentes ácidos carboxílicos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e gliceróis e podem ser encontrados em animais, plantas, fungos e bactérias.<sup>6,18</sup>

### 1.3 Lipases

As lipases apresentam um papel importante na biocatálise. São biocatalisadores versáteis capazes de catalisar diferentes reações, tanto em meio aquoso como em orgânico e podem apresentar excelente atividade e estereosseletividade em relação a vários substratos. A resolução de racematos com lipases é uma das técnicas mais eficientes para obter compostos enantiomericamente puros.<sup>6,15</sup>

As lipases podem ser de origem animal (pancreática, hepática e gástrica), microbiana (bactérias e fungos) e vegetal, com variação em suas propriedades catalíticas. Suas aplicações são inúmeras, sendo que normalmente em escala industrial são empregadas as lipases de origem microbiana.<sup>1,3,19,20</sup>

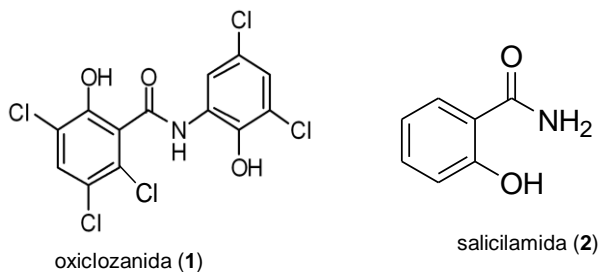
Fungos filamentosos são especialmente valorizados porque as enzimas por eles produzidas são normalmente extracelulares, o que facilita a recuperação do meio de fermentação. As espécies que mais produzem lipases pertencem ao gênero *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Aspergillus* e *Penicillium*.<sup>2,21,22</sup>

As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica devido à sua grande disponibilidade e serem de baixo custo. Além disso, não requerem cofatores, atuam em uma faixa de pH relativamente grande, são bastante estáveis, podem ser reutilizadas e conforme já citado apresentam especificidade, regiosseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade.<sup>6,23-26</sup>

Além disso, as lipases possuem a habilidade de catalisar reações de esterificação, transesterificação, (tio)-esterificação, peridrólise, epoxidação, aminólise e amidação em solventes orgânicos, sistema bifásico e em líquidos iônicos puros (LIs) ou em misturas.<sup>24-31</sup>

As aminas e amidas são uma classe de compostos orgânicos importantes com ampla aplicação na área médica e biológica.<sup>14,24,32</sup>

Alguns derivados de amidas exibem propriedades biológicas, tais como anti-helmíntico, antifúngica, antibacteriana e antihistamínica. Por exemplo, a 6-*N*-(2-hidróxi-3,5-diclorofenil)-2-hidróxi-3,5,6-triclorobenzamida (**1**) (oxiclozanida) é uma salicilanilida anti-helmíntico, utilizada no tratamento e controle da fasciolíase em ruminantes, principalmente nos animais domésticos como bovinos, ovinos e caprinos. A 2-hidroxibenzamida (**2**) (salicilamida) é um anti-inflamatório com propriedades similares a aspirina, indicada para o alívio de dores, febre e inflamação.<sup>33,34</sup>

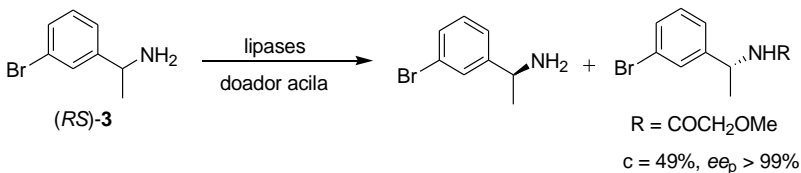


O método clássico para a síntese de amidas é a reação de ácidos carboxílicos com aminas a altas temperaturas. No entanto, devido à baixa reatividade dos ácidos carboxílicos, vários métodos para a ativação têm sido reportados. O mais comum é substituir os ácidos carboxílicos por grupos funcionais mais reativos, tais como cloretos de acila, anidridos e ésteres ativado.<sup>33,35</sup>

Entre as metodologias que têm sido desenvolvidas para a produção industrial de amidas, destaca-se a acilação enantiosseletiva catalisada por lipases.<sup>24</sup>

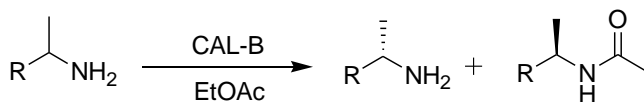
Gill e *col.* reportaram a acilação da (*RS*)-1-(3'-bromofenil)etilamina (**3**) com os acetato de etila, de vinila, de *iso*-propenila e com 2-metoxi-acetato de etila como doadores acilas catalisada por lipases de diferentes procedências. O melhor resultado foi obtido com o 2-metóxi acetato de etila catalisada pela lipase de *Candida antarctica* (CAL-B), sendo que a amida-(*R*) foi formada com 49% de conversão e excesso enantiomérico (*ee<sub>p</sub>*) >99% (**Figura 3**).<sup>24</sup>





**Figura 3** - Resolução da (*RS*)-1-(3'-bromofenil) etilamina (**3**) com vários doadores acila e catalisada por lipases de diferentes procedências.<sup>24</sup>

Davi e *col.* reportaram a resolução de várias aminas alifáticas e aromáticas com acetato de etila catalisada pela CAL-B. As (*R*)-amidas foram formadas com bons rendimentos, sendo de 50-80% e valores de *ee* de aproximadamente 98% (**Figura 4**).<sup>36</sup>



R = etil, propil, pentil, hexil, nonil, fenil

**Figura 4** – Resolução de aminas alifáticas e aromáticas com acetato de etila catalisada pela CAL-B.<sup>36</sup>

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.<sup>37</sup>

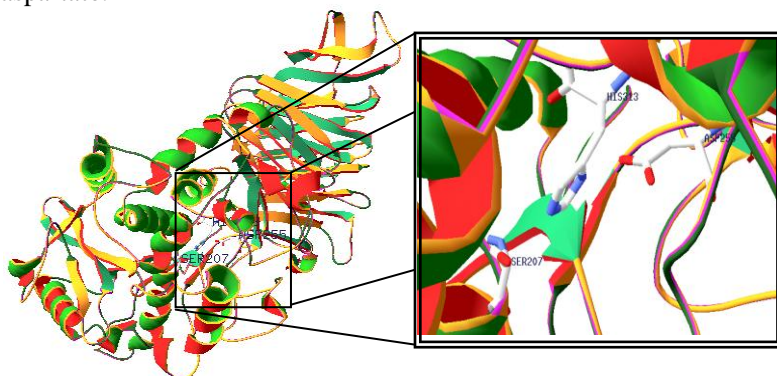
Todas as lipases cujas estruturas têm sido elucidadas são membros das famílias  $\alpha$ , $\beta$ -hidrolases pregueadas com uma arquitetura comum composta de seqüências de fitas  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -pregueada.<sup>7,18</sup>

Um mecanismo proposto para a hidrólise de ésteres e também para processos enzimáticos de transesterificação, aminólise, hidrazonólise e peridrólise de ésteres no qual o nucleófilo natural “água” é substituído por um álcool, amina, hidrazina ou hidroperóxido, respectivamente é conhecido como mecanismo da serina-hidrolase.<sup>6,7</sup>

As lipases 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)<sup>7</sup> que se repete em todas as estruturas, e

é frequentemente protegido na molécula por uma “tampa” hidrofóbica ou “lid” que ao interagir com a interface lipídeo/água sofre uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo. A presença da “tampa” na estrutura da enzima e a propriedade de ativação interfacial são fatores determinantes para a caracterização de lipases. Estudos de raios-X realizados por Uppenberg e *col.* com a lipase da *C. antarctica*, revelaram a existência de uma “tampa” recobrendo a tríade catalítica Ser-His-Asp.<sup>38</sup>

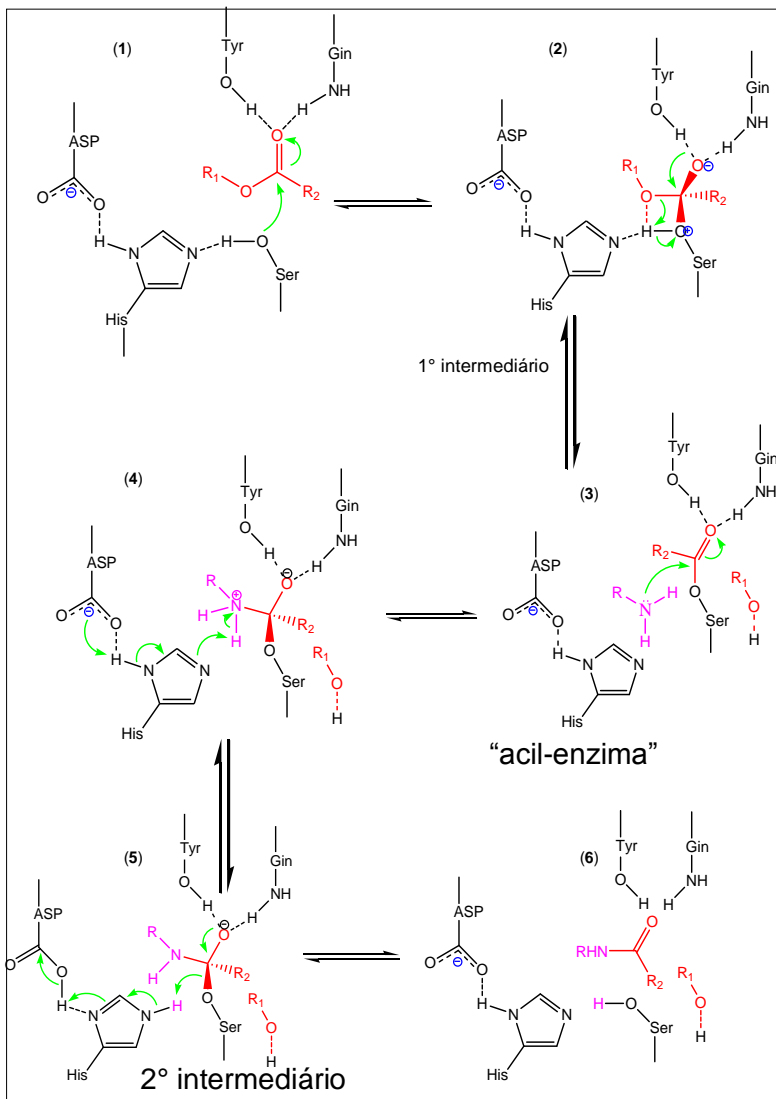
Na **Figura 5**, observa-se a representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de *Pseudomonas* sp. com a ampliação do sítio ativo formado pelas cadeias laterais da histidina, serina e aspartato.<sup>17,39</sup>



**Figura 5** - Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de *Pseudomonas* sp. obtida por cristalografia de raios-X.<sup>17,39</sup>

O mecanismo da ação catalítica de uma lipase na aminólise de um éster consiste em seis etapas, e está exemplificado na **Figura 6**.<sup>4,35</sup>

1. Ligação do 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 e saída da porção alcoólica;
4. Aminólise do intermediário acil-enzima;
5. Formação do segundo intermediário tetraédrico;
6. Formação do produto (amida) e regeneração do sítio ativo.



**Figura 6** - Mecanismo da reação de aminólise de éster catalisada por lipases baseado na “triade catalítica” (adaptado das refs. 4 e 35)

A catálise enzimática em solventes orgânicos tem aumentado significativamente. A água não é um solvente adequado para a grande maioria das aplicações em laboratório e na indústria, pois muitos compostos orgânicos de interesse comercial não são solúveis e algumas vezes são instáveis neste meio. Além disso, a remoção da água é difícil e cara devido ao alto ponto de ebulição.

Assim, as reações de hidrólise, racemização, polimerização e decomposição frequentemente acompanham estes processos. Para minimizar estes problemas os químicos desenvolveram processos enzimáticos em meio orgânico.

A aplicação de lipases em meio orgânico teve início no século 19, sendo que Zaks e Klibanov foram os primeiros pesquisadores que utilizaram enzimas nesse meio.<sup>40</sup>

As transformações biocatalíticas, neste meio, apresentam as seguintes vantagens:<sup>23,41,42</sup>

- ✓ São obtidos melhores rendimentos e maior recuperação do produto pelo uso de solventes orgânicos com ponto de ebulição menor que o da água;
- ✓ Substratos não-polares são convertidos a uma velocidade maior, devido ao aumento de solubilidade;
- ✓ Em biotransformações a contaminação microbiana é desprezível no caso de usar “células livres”;
- ✓ A desativação e/ou inibição do substrato ou produto é minimizada;
- ✓ As reações de hidrólise, não-favoráveis, são eliminadas;
- ✓ A desnaturação das enzimas é minimizada em solventes orgânicos de baixa polaridade;
- ✓ Em geral, o equilíbrio termodinâmico é alterado a favor da síntese completa.

Porém, o uso das enzimas em solventes orgânicos frequentemente apresentam algumas desvantagens:

- ✓ A atividade catalítica pode diminuir (devido ao sistema heterogêneo), o qual é geralmente de várias ordens de magnitude menor do que aqueles em solução aquosa;
- ✓ Muitas reações enzimáticas estão propensas a inibição pelo substrato ou produto, que desativa a enzima devido à maior concentração destes, causando uma diminuição na velocidade da reação e enantiosseletividade.

Além disso, as enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de protegê-las frente a esses fatores. Para minimizar esses problemas, têm sido desenvolvidas técnicas de imobilização, e conforme já citado, o uso de líquidos iônicos, da irradiação por microondas e de enzimas mais resistentes.<sup>13,14,25,27</sup>

Portanto, no próximo item serão apresentadas as principais técnicas de imobilização que vem sendo usadas para fornecer estabilidade para as enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização. A reutilização é importante, pois muitos destes biocatalisadores ainda têm alto custo.

#### **1.4 Imobilização de enzimas**

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.<sup>6,43-45</sup>

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação a sua forma livre. Idealmente, a

enzima imobilizada deverá apresentar uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. Porém, a imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, e não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização.<sup>43,45-47</sup>

Um dos fatores que sempre deve ser considerado na utilização de um determinado sistema de imobilização é o tipo de interação entre o suporte e o biocatalisador, que pode influenciar diretamente na estabilidade e nos efeitos cinéticos da catálise.<sup>46,47</sup>

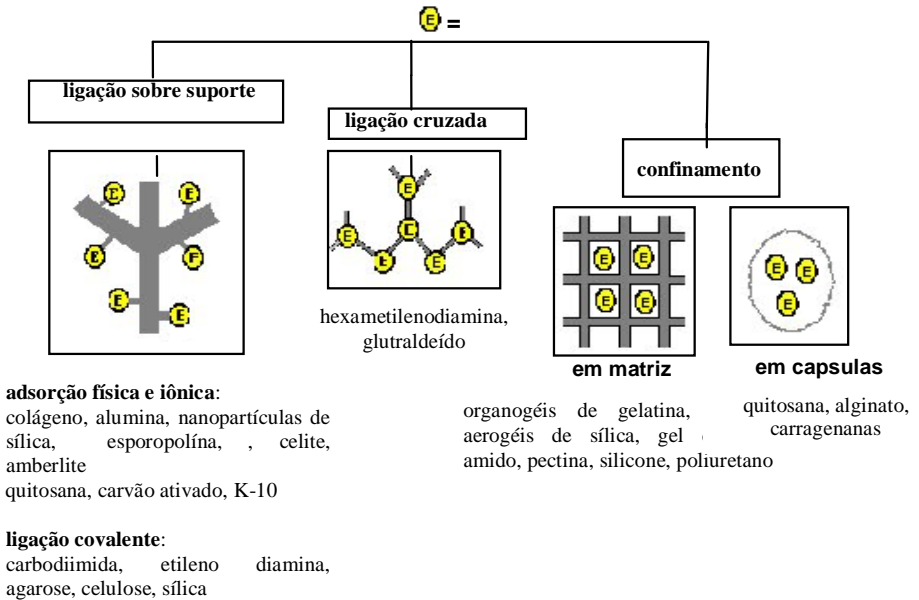
Os processos de imobilização podem ocorrer por adsorção ou ligação da enzima em material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas,<sup>43,48,49</sup> por confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos,<sup>50,51</sup> por encapsulação em membranas poliméricas<sup>52</sup> e em micelas reversas.<sup>53,54</sup>

Outra técnica utilizada, apesar de não apresentar uma barreira física entre a enzima e o meio reacional são os sistemas bi- ou trifásicos, destacando-se os líquidos iônicos, tais como o tetrafluorborato de 1-butil-3-metil-imidazólio [BMIm][BF<sub>4</sub>] e o hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil imidazólio [BMIm][PF<sub>6</sub>].<sup>27,28,55</sup>

A escolha da matriz é muito importante para uma boa atuação do sistema com a enzima imobilizada. As características mais desejáveis para um bom suporte são a área superficial grande, boa permeabilidade, características hidrofílicas, estabilidade química, mecânica e térmica, alta rigidez, forma e tamanhos adequados, resistência ao ataque de microorganismos e poder ser reutilizado.<sup>43,46,56</sup>

A **Figura 7** mostra a classificação dos principais métodos usados para imobilização de enzimas isoladas e/ou de “células integras”.

## Técnicas de imobilização de enzimas



**Figura 7** - Principais métodos de imobilização de enzimas (adaptado da ref.6).

Os métodos de imobilização estão divididos em três categorias, conforme descrito na **Figura 7**, sendo que os principais que serão descritos neste trabalho são:

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

A adsorção do biocatalisador em suporte macroscópico insolúvel em água é o método de imobilização mais usado ainda hoje. 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. Diferentes materiais orgânicos ou

inorgânicos podem ser empregados como suporte neste tipo de imobilização tais como, celite, quitosana, sílica, géis poliméricos, nanopartículas e celulose entre outros.<sup>43,57-59</sup>

Tutar e *col.* utilizaram a esporopolenina, um polímero natural obtido da *Lycopodium clavatum*, que é bastante estável e resistente ao ataque químico. A lipase de *Candida rugosa* (LCR) foi imobilizada neste polímero através do método de adsorção. A capacidade de adsorção, estabilidade térmica e atividade da LCR foram avaliadas. Este estudo mostrou que a lipase de *C. rugosa* foi imobilizada com sucesso por adsorção física, sendo que a atividade foi de 16,3 U/mg a 40°C e pH 6,0.<sup>43</sup>

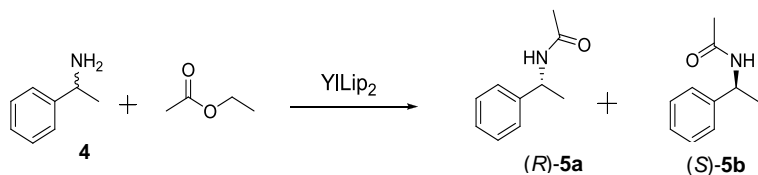
Liu e *col.*, relataram à imobilização da lipase de *Burkholderia sp C20* em celite através do método de ligação covalente. As melhores condições para a imobilização foram pH 7,0 e concentração de 70 g/L em 3h. A atividade máxima da lipase imobilizada foi de 273,5 U/g celite.<sup>58</sup>

Jiang e *col.* estudaram a imobilização da lipase de *Candida rugosa* através do método de adsorção iônica em suporte de nanopartícula-líquido iônico. Os líquidos iônicos usados foram os derivados do 1-metil-3-alkilimidazólio com diferentes cátions (C<sub>1</sub>, C<sub>4</sub> e C<sub>8</sub>) e ânions (Cl<sup>-</sup>, BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, PF<sub>6</sub><sup>-</sup>). A atividade da lipase imobilizada foi avaliada na reação de esterificação entre o ácido oléico e o butanol.<sup>57</sup>

Os resultados mostraram que a atividade da lipase foi de aproximadamente 118% quando comparada com a forma livre. Além disso, a lipase apresentou 60% da atividade inicial quando mantida a 80°C, e foi reutilizada aproximadamente 8 vezes, sendo que manteve 60% da atividade inicial. Na forma nativa, a lipase não apresentou atividade após 6 ciclos.<sup>57</sup>

Wen e *col.* estudaram a acetilação enantiosseletiva da ( $\pm$ )- $\alpha$ -feniletilamina (**4**) com acetato de etila catalisada pela lipase de *Yarrowia lipolytica* imobilizada em um suporte usado na indústria têxtil composto pela glutina, lecitina e polietileno glicol (YLip<sub>2</sub>). Foram avaliados diversos parâmetros na reação, tais como o efeito de diferentes solventes, temperatura, massa de lipase imobilizada, tempo e reutilização do biocatalisador (**Figura 8**).<sup>14</sup>





**Figura 8** - Acilação enantiosseletiva da ( $\pm$ )- $\alpha$ -feniletilamina (**4**) catalisada pela lipase de *Yarrowia lipolytica* imobilizada.<sup>14</sup>

Os resultados mostraram que quando a reação foi realizada em *n*-hexano na presença de 3% de DMSO e a lipase imobilizada a 45°C, por 6 dias, o excesso enantiomérico do produto ( $ee_p$ ) (**5a**) aumentou significativamente de 35% em *n*-hexano para 96% nesta mistura, e a razão enantiomérica de 2,5 para 190. Além disso, a lipase imobilizada foi reutilizada 5 vezes sem perda na atividade catalítica.<sup>14</sup>

Outro método de imobilização bastante utilizado é o de confinamento. Este está dividido em imobilização em matriz e em microcápsula. A imobilização da enzima consiste em “prender” a proteína em um polímero insolúvel ou em microcápsula. É um processo similar ao de inclusão, embora neste caso a enzima seja envolvida totalmente pelo sistema.<sup>6,45,47</sup>

A vantagem de utilizar esta técnica é que a enzima não interage quimicamente com o polímero, evitando assim a desnaturação. Contudo, 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 são necessárias altas concentrações de substratos.

As enzimas encapsuladas apresentam atividade mais elevada ao utilizar substratos de baixa massa molar, pois estes compostos difundem pela membrana mais facilmente e se aproximam com maior facilidade do sítio ativo do biocatalisador para que ocorra a reação.<sup>6,45</sup>

Nascimento e *col.* utilizaram o filme de caseinato de sódio (CS) com glicerol (G) como suporte para imobilização de diferentes lipases. Foram avaliados diversos parâmetros na reação de esterificação de

ácidos carboxílicos com álcoois alifáticos, tais como o efeito do solvente orgânico, massa de lipase, temperatura, influência do tamanho da cadeia alquílica do ácido e do álcool, capacidade de reutilizar o biocatalisador e o tempo de estocagem.<sup>46</sup>

Os resultados mostraram que quando a lipase de *Pseudomonas cepacia* (LPS) foi imobilizada no sistema LPS/CS/G e este usado na esterificação do ácido oléico com *n*-pentanol, obteve-se o éster com conversão de 60%. Além disso, a LPS imobilizada pode ser reutilizada 8 vezes e armazenada por 144 dias a 18°C, sem perda da atividade catalítica e das propriedades macroscópicas.<sup>46</sup>

Carvalho e *col.* estudaram a imobilização da lipase de *Aspergillus niger* por adsorção utilizando celite como suporte. A atividade de hidrólise e esterificação, estabilidade e enantiosseletividade das formas livres e imobilizadas foram comparadas. Ambas as preparações mostraram propriedades bioquímicas similares, com atividade máxima em pH 6,0 a 30-40°C. Os efeitos mais pronunciados foram com relação a estabilidade térmica e melhoria da atividade na esterificação do (*RS*)-ibuprofeno com 1-propanol em *iso*-octano após a imobilização. Além disso, a lipase imobilizada manteve 73% de sua atividade após 5 dias de armazenamento a 40°C e pode ser reutilizada por 6 vezes.<sup>2</sup>

A utilização de filmes formados a partir de proteínas ou polissacarídeos tem contribuído para que haja um aumento da biocompatibilidade entre suporte e biocatalisador, criando um microambiente favorável e mantendo, desta forma a atividade enzimática.<sup>60</sup> Dentre as vantagens de se utilizar estes biofilmes em síntese orgânica, destacam-se suas propriedades mecânicas, resistência a solvente de baixa polaridade, hidrofiliabilidade, atoxicidade e o fato de serem biodegradáveis e de baixo custo.<sup>61</sup>

Os filmes de polissacarídeos podem ser obtidos a partir de derivados hidrossolúveis de celulose, amido, pectina, alginatos, carragenana, dextrinas e outras gomas.<sup>60-62</sup>

Neste trabalho foram empregados filmes do polissacarídeo amido e de gelatina como suportes para a imobilização de lipases.

O amido é um biopolímero semicristalino, encontrado em várias plantas, tais como grãos de cereais, raízes, tubérculos, folhas, sementes, bulbos, frutas e pólen. Grânulos de amido em tecidos de armazenamento

podem variar de forma (redondas, lenticular e poligonal), tamanho (1-100 $\mu$ m de diâmetro) e composição ( $\alpha$ -glicose, lipídeo, proteína e conteúdo mineral). A forma e o tamanho dos grânulos dependem da fonte do amido. A composição química, estrutura e propriedades também são essencialmente típicas da origem biológica.<sup>63-65</sup>

Além disso, o amido é abundante, barato, biodegradável e não-tóxico, pode ser utilizado como material de implante biocompatível e transportador de fármacos e atualmente como suporte para imobilização de enzimas.<sup>62</sup>

O amido é constituído por uma mistura de dois polissacarídeos, amilose e amilopectina, em proporções variadas dependendo da procedência da espécie vegetal. Em geral muitos amidos produzem 10-20% de amilose e 80-90% de amilopectina.<sup>35</sup>

A gelatina é um polímero natural, e é uma mistura de polipeptídeos de alta massa molar, obtido pela hidrólise controlada das fibras de colágeno. O colágeno é uma proteína largamente encontrada na natureza e é o maior constituinte de peles, ossos e tecidos conectivos,<sup>66-68</sup> correspondendo a mais de 30% da base protéica do organismo humano, representando uma típica fonte de material renovável de recursos naturais de origem animal. A macromolécula consiste de resíduos de aminoácidos de proporções e distribuição variáveis ao longo da cadeia peptídica.<sup>68</sup>

Na indústria, a gelatina, é utilizada como cobertura de cápsulas farmacêuticas, cosméticos, indústria de alimentos e como suporte de enzimas.<sup>66</sup> A comercialização da gelatina é feita de acordo com sua habilidade em formar gel.<sup>69,70</sup>

O uso de biocatalisadores, imobilizados ou não, é crescente em escala industrial especialmente na indústria farmacêutica para a obtenção de compostos enantiomericamente puros. Um dos procedimentos mais úteis para separação de enantiômeros está baseado no método de resolução catalisada por enzimas, onde o biocatalisador converte seletivamente um enantiômero da mistura racêmica em outro composto, após o qual o enantiômero que não reagiu e o novo composto são separados.

Portanto, no próximo item serão apresentados e discutidos a estereosseletividade das enzimas, bem como os métodos mais usuais de resolução enzimática.

## 1.5 Estereosseletividade das enzimas

A quiralidade na química orgânica começou em 1815 quando o físico francês Jean Baptiste Biot descobriu que certas substâncias são hábeis em 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.<sup>35</sup>

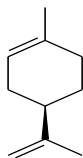
O termo quiral é usado para descrever um objeto que não é sobreponível à sua imagem especular.<sup>35,71</sup>

A mão humana é o exemplo mais conhecido para descrever a quiralidade, pois a mão esquerda é uma imagem especular não sobreponível da direita.

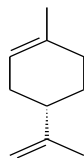
A maioria das moléculas presentes nas estruturas dos organismos vivos são quirais, tais como o ácido desoxirribonucléico (DNA), enzimas, hormônios e anticorpos. Por esta razão observa-se a relevância da quiralidade em organismos vivos. Quiralidade é a condição necessária e suficiente para a existência 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 o contrário. A mistura formada por quantidades equimolares dos enantiômeros é chamada racêmica ou racemato.<sup>35,72</sup>

Os enantiômeros podem apresentar atividade biológica completamente diferentes, pois interagem de maneira distinta com outros sistemas quirais ou aquirais. Por exemplo, o (*R*)-limoneno (**6**) possui aroma de laranja e seu enantiômero (*S*)-limoneno (**7**) de limão.

A distinção no odor ocorre porque os receptores também são constituídos de moléculas quirais e reconhecem a diferença estereoquímica nos enantiômeros.<sup>35,72</sup>



**(R)-6**  
aroma de laranja



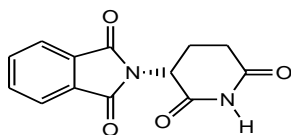
**(S)-7**  
aroma de limão

Nos fármacos quirais, em geral, somente um dos enantiômeros é o responsável pela atividade de interesse e em certos casos o outro enantiômero pode ser prejudicial ou inativo. Devido a este fato, tem sido intensificada a pesquisa em técnicas que são capazes de produzir enantiômeros puros através da síntese seletiva de apenas um dos enantiômeros ou da separação de misturas.<sup>35,72,73</sup>

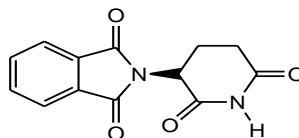
Na grande maioria dos casos, os fármacos administrados sob a forma racêmica possuem características biológicas muito inferiores aos enantiômeros puros.<sup>1,72</sup>

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)-8** foi usado contra náusea matutina de mulheres grávidas, enquanto que o **(S)-9** 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.<sup>35,72</sup>



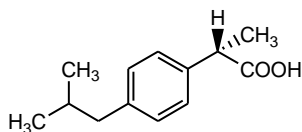
**(R)-8**  
efeito sedativo



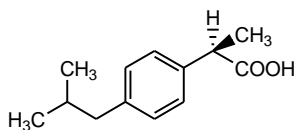
**(S)-9**  
teratogênico

Atualmente, a talidomida está aprovada sob regulamentos altamente restritos para o tratamento de complicações associadas à hanseníase. O seu potencial para uso contra outras condições incluindo AIDS, câncer de cérebro e artrites reumatóides também está sob investigação.<sup>35</sup>

São de grande interesse para a indústria farmacêutica e para a U.S. Food and Drug Administration dos EUA a produção e a venda de fármacos quirais, que contenham apenas um único enantiômero. Porém, atualmente, alguns fármacos têm sido vendidos na forma racêmica embora apenas um deles seja o agente ativo. Este é o caso do agente antiinflamatório Ibuprofeno, apenas o isômero (*S*)-**10** é efetivo, e o isômero (*R*)-**11** não tem ação anti-inflamatória.<sup>35,72,74</sup>

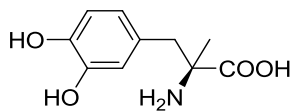


(*S*)-**10**  
anti-inflamatório

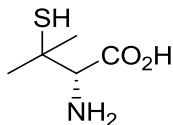


(*R*)-**11**  
inativo

A droga anti-hipertensiva metildopa (Aldomet) possui efeito exclusivamente para o isômero (*S*)-**12**. Para a penicilamina, o isômero (*S*)-**13** é um agente terapêutico altamente potente para artrite crônica primária; sendo que o isômero (*R*) não tem ação terapêutica, e é altamente tóxico.<sup>35</sup>



(*S*)-**12**  
metildopa



(*S*)-**13**  
penicilamina

Portanto, a preparação de compostos enantiomericamente puros é um fator que torna a síntese enantiosseletiva e a resolução de misturas racêmicas uma área de grande interesse.<sup>35,71</sup>

A resolução de racematos é ainda a metodologia mais importante para a síntese industrial de produtos enantiopuros.<sup>14,15,24,75</sup> Os métodos para resolução incluem a cinética química ou enzimática, clássica por cristalização preferencial ou separação de diastereoisômeros.<sup>35,72,73</sup> As lipases têm sido extensivamente usadas em resoluções racêmicas principalmente, devido sua ação estereoespecífica.<sup>1,6,24,32</sup>

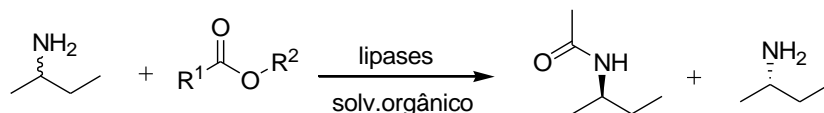
Se em uma reação um dos enantiômeros reagir preferencialmente com relação ao outro, esta é chamada enantiosseletiva. Para uma reação ser enantiosseletiva, um reagente quiral, solvente, ou catalisador deve exercer influência durante a reação. Portanto, no próximo item será abordada a resolução catalisada por enzimas, que atuam como catalisadores quirais.

## **1.6 Resolução enzimática**

Quando um substrato racêmico é submetido a uma reação enzimática, este sofre discriminação quiral entre os enantiômeros. Devido à quiralidade da enzima, o enantiômero que melhor se ajusta no sítio ativo, reage com 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, quando já não existe o enantiômero reativo. Como consequência, cada enantiômero pode ser obtido somente com 50% de conversão em uma resolução enzimática.<sup>6,72</sup>

Aminas enantiomericamente puras são amplamente usadas na indústria química como agentes de resolução, auxiliares quirais e intermediários para a síntese de compostos farmacêuticos e agroquímicos. A sua produção através da acilação enantiosseletiva catalisada por lipases tem aumentado significativamente.<sup>24,76,77</sup>

Goswami e *col.* estudaram a resolução da ( $\pm$ )-*sec*-butilamina com diferentes ésteres em diversos solventes orgânicos catalisada pelas lipases de *A. niger*, *C. antarctica*, *R. hangchow*, *A. melleus* e de *Bacillus globigii* (**Figura 9**).<sup>78</sup>

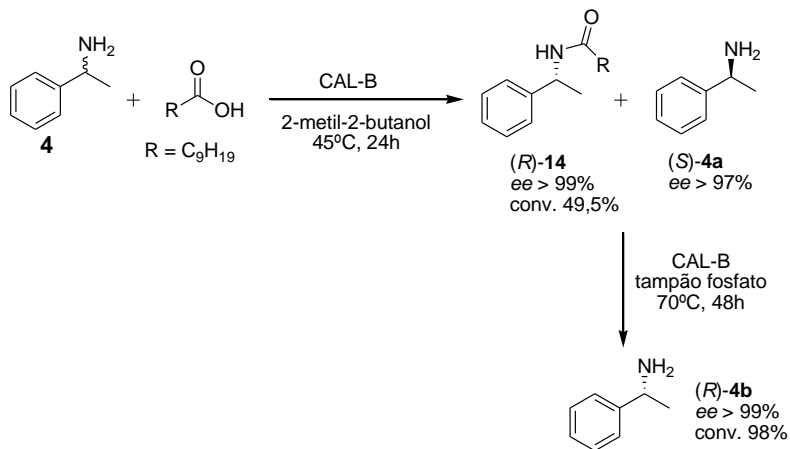


**Figura 9** – Resolução da ( $\pm$ )-*sec*-butilamina com diferentes ésteres catalisada por lipases.<sup>78</sup>

Na resolução da ( $\pm$ )-*sec*-butilamina com butirato de etila ou de vinila catalisada pela lipase de *C. antarctica* foram obtidos excessos enantioméricos baixos a moderados, sendo de 3,3-74,6%. Porém, os resultados foram melhores com os ésteres etílicos de cadeia longa, tal como o decanoato de etila em éter *t*-butil metílico (MTBE), sendo que a amina residual foi obtida com excesso enantiomérico de >98%.<sup>78</sup>

Torres-Gavilán e *col.* descreveram a resolução da (*RS*)-feniletilamina (**4**) através da técnica “easy-on, easy-off”, que envolve em uma primeira etapa a síntese da amida, seguida da hidrólise catalisada pela lipase de *C. antarctica* (**Figura 10**).<sup>76</sup>





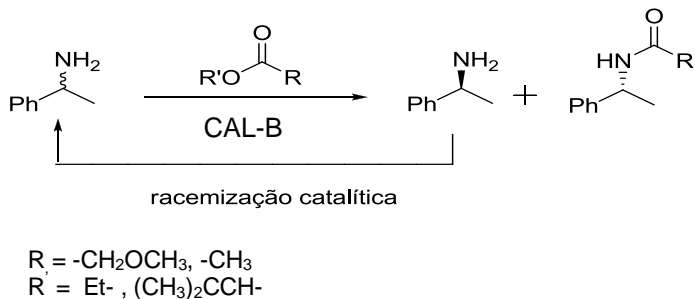
**Figura 10** - Resolução da (*RS*)-feniletilamina (**4**) pela técnica “easy-on, easy-off”.<sup>76</sup>

Os resultados mostraram que na primeira etapa a amida foi obtida com 49,5% de conversão e *ee*<sub>p</sub> >99%. Posteriormente, a amina foi hidrolisada formando a amina (*R*)-**4b** com 98% de conversão e *ee* >99%. Essa metodologia mostrou que as aminas (*S*)-**4a** e (*R*)-**4b** foram obtidas com bons rendimentos e elevados excessos enantioméricos.<sup>76</sup>

Atualmente, uma nova técnica para a síntese de compostos enantiomericamente puros vem sendo estudada para obter compostos com a mesma pureza enantiomérica, porém com rendimentos muito maiores. Esta é denominada de Resolução Cinética Dinâmica (RCD), que reuni a resolução e racemização *in situ* do substrato não reativo.<sup>79</sup>

Nesse processo o enantiômero não reativo poderá ser transformado na mistura racêmica, e ser submetido a uma nova resolução formando o enantiômero desejado com 100% de rendimento. Para que o processo RCD seja eficiente é necessário que os dois catalisadores atuem juntos, a lipase para a resolução e o catalisador convencional (“chemocalyst”) para o processo de racemização. No entanto, para a racemização de aminas são necessárias condições reacionais drásticas, fazendo com que muitas enzimas se desnaturem.<sup>32,79</sup>

Parvulescu e *col.* estudaram a resolução cinética dinâmica (RCD) da ( $\pm$ )-1-feniletilamina catalisada pela lipase de *C. antarctica* (CAL-B) e 5% Pd/BaSO<sub>4</sub> e/ou 5% Pd/CaCO<sub>3</sub> em aquecimento convencional e/ou irradiação de microondas (MO)(**Figura 11**).<sup>79</sup>



**Figura 11-** Resolução cinética dinâmica (DCR) da ( $\pm$ )-1-feniletilamina.<sup>79</sup>

A (*R*)-amida foi obtida com 88% de rendimento sob irradiação por microondas em 50min, e 60% em 75min sob aquecimento convencional. A seletividade não foi alterada em relação ao tipo de aquecimento, sendo o *ee* de 97%.<sup>79</sup>

## 1.7 Métodos analíticos para a determinação da pureza enantiomérica

Em 1982, Sih sob a base teórica de Sharpless e K.Fajans descreveu a dependência da conversão (*c*), excesso enantiomérico do substrato (*ee<sub>s</sub>*) e excesso enantiomérico do produto (*ee<sub>p</sub>*) na resolução cinética enzimática.<sup>6,80</sup>

O parâmetro que indica a discriminação de uma enzima entre dois enantiômeros foi introduzido como razão enantiomérica ou enantiosseletividade (*E*).<sup>6</sup>

A conversão, pode ser calculada de acordo com a **Equação 1** e pode ser obtida a partir de valores do *ee<sub>s</sub>* e *ee<sub>p</sub>*, com o uso das **Equações 2 e 3**, respectivamente.<sup>6,80,81</sup>

$$C = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \quad \text{Eq. 1}$$

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

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

Valores de razão enantiomérica menores que 15 são inaceitáveis para propósitos práticos. Podem ser considerados de moderados a bons entre 15-30, e acima deste valor são excelentes. Deve ser enfatizado que  $E > 200$  não pode ser determinado com precisão, devido às imprecisões emergidas dos métodos da determinação do excesso enantiomérico, tais como ressonância magnética nuclear (RMN), cromatografia gasosa quiral (CGQ) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), onde uma pequena variação do  $ee_s$  ou  $ee_p$  pode causar mudanças significativas no valor de  $E$ .<sup>6</sup>

O desenvolvimento de métodos de análise estereoquímica sensível, especialmente os cromatográficos de alta resolução para a determinação da pureza enantiomérica foi fundamental para o avanço da síntese assimétrica, pois permite a avaliação precisa do grau de seletividade obtido em uma determinada reação.<sup>82-84</sup>

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 obtida na prática.<sup>6,81</sup>

O excesso enantiomérico de 0% corresponde a uma mistura (1:1) de enantiômeros, conhecida como mistura racêmica ou racemato, denotada pelo prefixo ( $\pm$ ).<sup>6</sup>

A seguir, serão discutidos os principais métodos usados na determinação de excessos enantioméricos e porcentagens de conversão.

### 1.7.1 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**.<sup>35,85</sup>

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

onde:

$\alpha$  = rotação óptica observada

$l$  = comprimento da cela polarimétrica, em dm (1dm = 10cm)

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

$c$  = concentração da solução, em gramas por mililitro de solução (g/mL)

$t$  = temperatura (grau Celsius)

A medida da rotação ótica de uma amostra deve ser realizada sob condições definidas de temperatura, solvente, concentração e em um comprimento de onda de incidência da luz plano polarizada específico. Estes valores podem ser comparados com rotações óticas 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 com calibrações apropriadas, o valor obtido pode ser comparado com o da “pureza enantiomérica”.<sup>85</sup>

A rotação da luz plano polarizada é semelhante 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 ótica ou a porcentagem em uma mistura. A pureza enantiomérica, também chamada de excesso enantiomérico (*ee*), pode ser calculada pela **Equação 5**.<sup>35,85</sup>

$$ee = \frac{\text{Rotação específica observada}}{\text{Rotação específica do enantiômero puro}} \times 100 \quad \text{Eq.}$$

Embora este método seja geralmente usado para determinar a pureza enantiomérica, ainda apresenta algumas desvantagens. A amostra sob a análise deve ser homogênea, destituída de traços de impurezas quirais e ser isolada de uma mistura reacional.<sup>35,85</sup>

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

### 1.7.2 Cromatografia gasosa quiral (CGQ)

A cromatografia gasosa é uma das técnicas analíticas mais utilizadas. Além de possuir um alto poder de resolução, é muito atrativa devido à possibilidade de detecção em escala de nano a picogramas.<sup>84,86</sup>

Um método atrativo para a análise de misturas enantioméricas é o uso da cromatografia gasosa (CG) com fase estacionária quiral (CGQ). Este método 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.

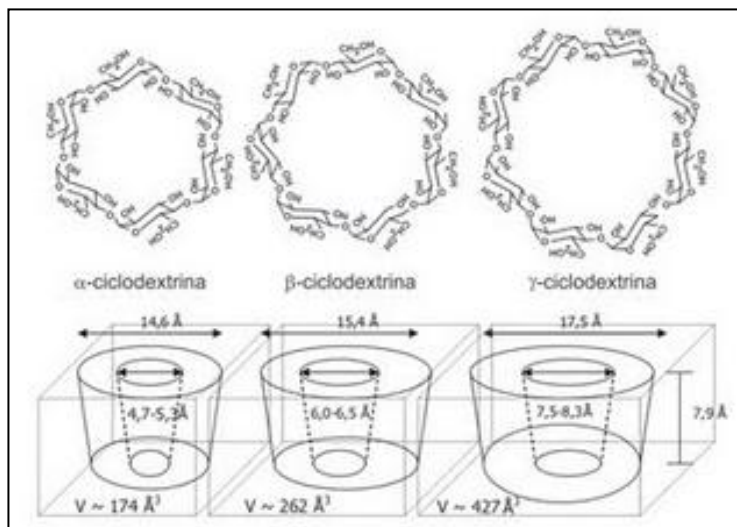
A razão dos picos fornece uma medida da composição enantiomérica da amostra precisa e quantitativa. Tais medidas podem ser realizadas com um alto grau de precisão ( $\pm 0,05\%$ ).<sup>83,84</sup>

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.<sup>84,86-88</sup>

Várias fases quirais foram desenvolvidas para a resolução de enantiômeros por cromatografia gasosa, podendo ser classificadas em fases quirais baseadas em derivados de aminoácidos e ciclodextrinas.<sup>84,89,90</sup>

Dentre as várias fases quirais disponíveis comercialmente, destacam-se aquelas baseadas em derivados de ciclodextrina. As

ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos contendo 6, 7 ou 8 unidades de glicose e denominadas, respectivamente de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ - ciclodextrinas. As unidades de glicose unidas através de ligações  $\alpha$  (1,4), estão especialmente arranjadas na forma de um cone (**Figura 12**).<sup>84,89</sup>



**Figura 12** - Estruturas moleculares e dimensões das  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -CD.<sup>89</sup>

A cavidade da ciclodextrina é relativamente apolar, enquanto sua superfície externa é polar devido aos grupos hidroxilas secundários e terciários. Esses grupos podem ser submetidos à reação química, formando vários derivados. Por exemplo, a  $\beta$ -ciclodextrina pode ser peralquilada ou derivada com grupos mais polares formando, heptakis-(2,3,6-tri-O-metil)- $\beta$ -ciclodextrina e heptakis-(2,3,6-tri-O-*n*-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina, heptakis-(2,6-tri-O-metil-3-O-trifluoroacetil)- $\beta$ -ciclodextrina ou heptakis-(2-O-(*S*)-2-hidroxiopropil-3,6-di-O-metil)- $\beta$ -ciclodextrina.<sup>84,88-90</sup>

O mecanismo de separação está baseado na formação de complexos de inclusão entre o soluto quiral e a ciclodextrina, devido à inclusão da parte hidrofóbica da molécula quiral na cavidade

hidrofóbica da ciclodextrina e interação dos grupos hidrofílicos com os grupos hidroxilas.<sup>84</sup>

A separação de enantiômeros em cromatografia gasosa está restrita a solutos relativamente voláteis devido a limitações de estabilidade térmica das fases estacionárias quirais disponíveis (200 a 270°C), bem como devido ao fato de que a enantiosseletividade das fases diminui com o aumento da temperatura.<sup>84</sup>

A razão dos picos fornece a pureza enantiomérica da amostra

#### **Equação 6.**

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

### **1.7.3 Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE**

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica de separação que em menos de trinta anos passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos. As razões para este crescimento estão relacionadas à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade, possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis. Destaca-se a aplicação na indústria farmacêutica, em determinações ambientais e em muitos outros campos da ciência, como o da medicina.<sup>84,91,92</sup>

A separação dos enantiômeros por CLAE como na CG, requer um agente quiral. O método mais direto e preferido é induzir interações diastereoméricas nos dois enantiômeros com a fase estacionária quiral. Os complexos diastereoméricos formados terão estabilidades diferentes e, portanto irão eluir em tempos diferentes. Outra alternativa é usar suporte aquiral e eluir com solvente quiral.<sup>83,84</sup>

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.<sup>84,87</sup>

Contudo, a metodologia que tem se mostrado mais atrativa é a separação direta com o uso de uma fase estacionária quiral. A resolução

direta de enantiômeros é possível desde que exista reconhecimento quiral entre a mistura racêmica e o seletor quiral.<sup>83,84,87</sup>

Na natureza, onde a maioria das reações são enantiosseletivas a influência quiral vem das enzimas, e em especial das lipases que foram apresentadas no item 1.3, pág. 5.

## 1.8 Líquidos iônicos na biocatálise

Os líquidos iônicos (LIs) são uma nova classe de solventes polares, os quais são sais formados por um cátion e um ânion. São conhecidos como uma alternativa “verde” em relação aos solventes comuns, pois não são voláteis e inflamáveis e são quimicamente e termicamente estáveis, moderadamente hidrofílicos, possuem alta condutividade térmica, alta viscosidade e também habilidade de dissolver uma grande variedade de compostos orgânicos, inorgânicos e poliméricos.<sup>27,93-95</sup>

A polaridade é determinada através do coeficiente de partição ( $\log P$  - indica a hidrofobicidade do solvente) e também pelo método solvatocrômico.<sup>16,96</sup> (**Equações 7, 8 e 9**, respectivamente).

$$\log P = [\text{soluto}]_{\text{fase octanol}} / [\text{soluto}]_{\text{fase aquosa}} \quad \text{Eq. 7}$$

$$E_t(\text{solvente}) [\text{Kcal/mol}] = 28591/\lambda_{\text{max}}(\text{nm}) \quad \text{Eq. 8}$$

$$E_t^N(\text{solvente}) = E_t(\text{solvente}) - 30,7 / 32,4 \quad \text{Eq. 9}$$

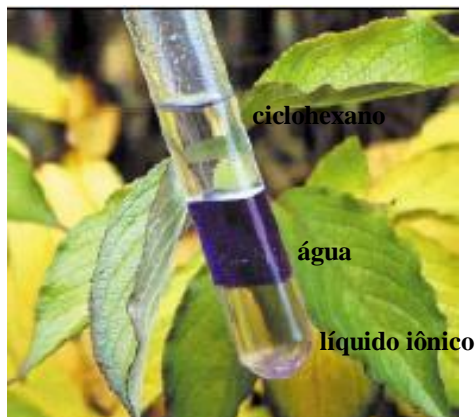
onde:  $E_t$  e  $E_t^N$  = escala de polaridade

Os líquidos iônicos, em geral, são imiscíveis com muitos solventes orgânicos especialmente, quando estes são não-polares como o *n*-hexano. Com solventes mais polares, tais como o diclorometano e tetraidrofurano os LIs podem ser miscíveis.<sup>97</sup> A imiscibilidade dos líquidos iônicos com água ou solventes orgânicos tem possibilitado o uso destes em três modos diferentes, como solvente puro, como co-solvente em meio aquoso ou em sistema bifásico ou trifásico.<sup>27,97-99</sup>



Além disso, os líquidos iônicos como solventes podem ser reutilizados.<sup>93,98,99</sup>

Na **Figura 13** é apresentado um exemplo do uso do líquido iônico em sistema trifásico.<sup>96</sup>



**Figura 13** - Líquidos iônicos em sistema trifásico.<sup>96</sup>

O uso de líquidos iônicos como meio reacional em síntese orgânica e catálise vem crescendo rapidamente. Muitos destes compostos estão disponíveis comercialmente e com alta pureza. As propriedades dos LIs que são responsáveis pela atividade e estabilidade das enzimas dependem do cátion e/ou ânion, assim como da polaridade, basicidade da ligação hidrogênio, nucleofilicidade do ânion, viscosidade e da kosmotropicidade.<sup>16,55,75,98</sup>

Como citado, o efeito do íon na atividade da enzima pode estar relacionado à série Hofmeister ou kosmotropicidade.<sup>100,101</sup> O efeito do íon na estabilidade da proteína pode ser devido à interação química por quelação entre proteínas e íons para formar complexos, e os íons podem ser usados como substrato, co-substrato ou co-fatores das enzimas. No entanto, a especificidade do íon tem sido atribuída principalmente à habilidade deste em modificar a estrutura da água (efeito físico).<sup>102</sup>

Os íons fortemente hidratados e que aumentam a estruturação da água são chamados kosmotropos (formam a estrutura), e os íons

fracamente hidratados que diminuem a estruturação da água são conhecidos como caotrops (quebram a estrutura). Os kosmotrops são usualmente pequenos e altamente carregados, ao contrário dos caotrops que são grandes e menos carregados. De fato, todos os íons multivalentes são altamente hidratados e, portanto são kosmotrópicos.<sup>102</sup>

Após alguns anos de estudos com proteínas e outras moléculas biológicas, compreendeu-se que ânions fortemente kosmotrópicos estabilizam as proteínas e os cátions fortemente kosmotrópicos as desestabilizam.<sup>103</sup> Portanto, uma estabilização ótima das macromoléculas (incluindo as enzimas) pode ser obtida através do uso de sais com ânions kosmotrópicos e cátions caotrópicos.<sup>102,103</sup>

A kosmotropicidade dos íons pode ser quantificada pela viscosidade (coeficiente  $\beta$ ) e a ordem da kosmotropicidade está representada na **Figura 14**.<sup>102</sup>

#### aumento da kosmotropicidade

←

**ânions:**  $\text{PO}_4^{2-}$  (0,495) >  $\text{CO}_3^{2-}$  (0,294) >  $\text{SO}_4^{2-}$  (0,206) >  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  (0,246) >  $\text{F}^-$  (0,107) >  $\text{Cl}^-$  (-0,005) >  $\text{N}_3^-$  (-0,018) >  $\text{CN}^-$  (-0,024) >  $\text{SCN}^-$  (-0,027) >  $\text{OCN}^-$  (-0,032) >  $\text{Br}^-$  (-0,033) >  $\text{NO}_3^-$  > (-0,043) >  $\text{I}^-$  (-0,073) >  $\text{BF}_4^-$  (-0,093) >  $\text{PF}_6^-$  (-0,21)

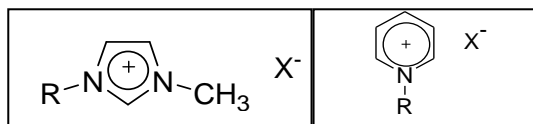
**catiões:**  $(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{N}^+$  (1,275) >  $(\text{C}_3\text{H}_7)_4\text{N}^+$  (0,916) >  $(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{N}^+$  (0,385),  $\text{Mg}^{2+}$  (0,385) >  $\text{Ca}^{2+}$  (0,284) >  $\text{Ba}^{2+}$  (0,216) >  $\text{Li}^+$  (0,146) >  $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$  (0,123) >  $\text{Na}^+$  (0,085) >  $\text{NH}_4^+$  (-0,008) >  $\text{K}^+$  (-0,009) >  $\text{Rb}^+$  (-0,033) >  $\text{Ti}^+$  (-0,036) >  $\text{Cs}^+$  (-0,047)

← **kosmotropos**

**caotrops** →

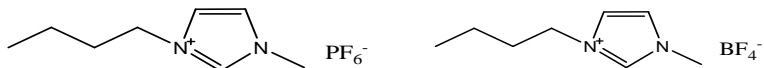
**Figura 14** - Ordem de kosmotropicidade dos íons baseado no coeficiente- $\beta$ .<sup>102</sup>

A seguir, serão representadas as estruturas de alguns dos LIs mais usados em reações biocatalisadas (**Figura 15**).<sup>98,100,104</sup>



R = metil, etil, *n*-butil.

X<sup>-</sup> = BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, SCN<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, AcO<sup>-</sup>



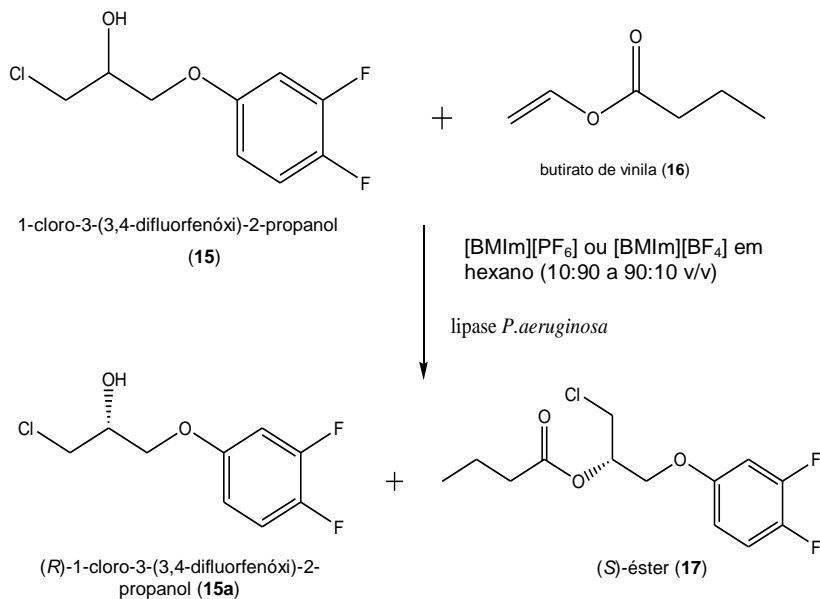
hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil imidazólio-[BMIm][PF<sub>6</sub>]    tetrafluorborato de 1-butil-3-metil imidazólio -[BMIm][BF<sub>4</sub>]

**Figura 15** - Representação estrutural dos líquidos iônicos e exemplos dos mais utilizados em biocatálise.<sup>100,106</sup>

A primeira publicação que descreveu o uso de líquidos iônicos em reações enzimáticas foi em 2000 por Erbedinger e *col.* que reportaram a síntese do (Z) aspartame com a termolisina.<sup>105</sup>

A partir desse relato diversos pesquisadores começaram a avaliar a influência de LIs em reações enzimáticas.

Singh e *col.* reportaram a transesterificação do (*RS*)-1-cloro-3-(3,4-difluorfenóxi)-2-propanol (*rac*-CDPP) (**15**) com butirato de vinila (**16**) catalisada pela lipase de *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 5113) em sistemas contendo os LIs, hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil imidazólio – [BMIm][PF<sub>6</sub>] e tetrafluorborato de 1-butil-3-metil imidazólio – [BMIm][BF<sub>4</sub>] e *n*-hexano como solvente. A reação foi otimizada em relação ao tipo de LI, razão entre *n*-hexano:[BMIm][PF<sub>6</sub>] e o tempo (**Figura 16**).<sup>27</sup>

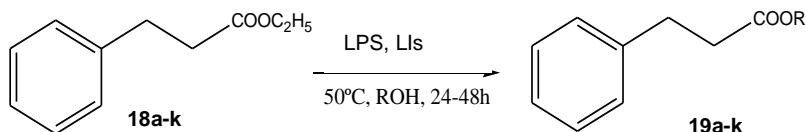


**Figura 16** - Transesterificação do rac-CDPP (15) catalisada pela lipase de *P. aeruginosa* em *n*-hexano e/ou LIs:hexano.<sup>27</sup>

Os resultados mostraram que o melhor sistema para a reação de transesterificação de (15) foi a mistura *n*-hexano:[BMIm][PF<sub>6</sub>] (1:1 v/v), a 30°C em 6h, sendo que o produto (*S*)-17 foi obtido com conversão e *ee* de >49% e 99%, respectivamente. Um resultado interessante foi observado quando a mistura de tetraidrofurano:LIs foi usado como solvente, pois observou uma inversão na configuração do produto de *S* para *R*. Além disso, a lipase de *P. aeruginosa* pode ser reutilizada 10 vezes, mantendo a enantiosseletividade e reatividade.<sup>27</sup>

Vidya e *col.* descreveram a transesterificação do 3-fenilpropanoato de etila (18) com onze alcoóis diferentes catalisada pela lipase *Pseudomonas cepacia* (LPS). Para avaliar a influência dos ânions, foram testados três líquidos iônicos diferentes tais como o hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio – [BMIm][PF<sub>6</sub>],

tetrafluorborato de 1-butil-3-metil imidazólio – [BMIm][BF<sub>4</sub>] e bis(trifluormetilsulfonyl)imida de 1-butil-3-metil imidazólio - [BMIm][Tf<sub>2</sub>N]. Além disso, a estabilidade da LPS foi avaliada, incubando-a em LIs hidrofóbicos por um período de 20-300 dias, bem como a sua reutilização (**Figura 17**).<sup>94</sup>



R = (a) -CH<sub>3</sub>, (b) CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, (c) (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH-, (d) CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-, (e) CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-, (f) CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-, (g) CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-, (h) CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-, (i) CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>-, (j) (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, (k) C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>-

**Figura 17** - Transesterificação do 3-fenilpropanoato de etila (**18a-k**) catalisada pela LPS em LIs.<sup>94</sup>

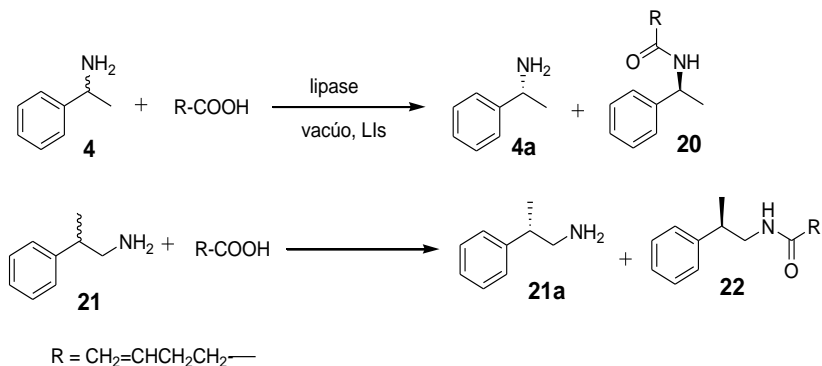
Os LIs [BMIm][PF<sub>6</sub>] e [BMIm][TF<sub>2</sub>N] foram os melhores solventes para esta reação. Com estes LIs, os ésteres **19a-k** foram obtidos com conversões de 22-95% e 55-96%, respectivamente e com o [BMIm][BF<sub>4</sub>] os ésteres **19a-k** foram obtidos com conversões de 0-19%.

A estabilidade da LPS foi também avaliada na reação de transesterificação de **18a-k** com os LIs hidrofóbicos [BMIm][PF<sub>6</sub>] e [BMIm][TF<sub>2</sub>N] por um período de 10 meses. A incubação da LPS em ambos LIs por um período de 20-300 dias, a temperatura ambiente mostrou um aumento na conversão aos ésteres **19a-k** de 45-98% ao utilizar [BMIm][PF<sub>6</sub>] e de 62-98% ao utilizar [BMIm][TF<sub>2</sub>N]. A mistura LPS:LIs foi reutilizada 5 vezes sem perda da atividade.<sup>94</sup>

Os resultados reportados acima, demonstraram que os LIs podem ser um meio reacional excelente e também um “suporte” para a LPS, na qual a enzima pode ser estocada com aumento da atividade e estabilidade.<sup>94</sup>

Irimescu e *col.* estudaram a acilação enantiosseletiva da 1-feniletilamina (**4**) e/ou 2-fenil-1-propilamina (**21**) com o ácido 4-pentenóico em diferentes LIs tais como o 1-alkil-3-metil-imidazólio e

1-alquil-2,3-dimetil-imidazólio combinados com os ânions tetrafluorborato [BF<sub>4</sub>], hexafluorofosfato [PF<sub>6</sub>] e trifluormetanosulfonato [CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>] catalisada pela lipase de *C. antarctica* (CAL-B). Foram avaliados os efeitos dos cátions e dos ânions nos LIs (**Figura 18**).<sup>106</sup>



**Figura 18** -Açilação enantiosseletiva da 1-feniletilamina (**4**) ou 2-fenil-1-propilamina (**21**) com o ácido 4-pentenóico em diferentes LIs catalisada pela CAL-B.<sup>106</sup>

Com todos os líquidos iônicos estudados a enantiosseletividade da lipase na acilação da amina **4** foi boa, sendo que o enantiômero (*R*)-**20** foi formado com conversões de 5,2 - 21,2%, *ee* >99% e valores de *E* >200. Após purificação de (*R*)-**20** o rendimento foi de 81%.

Na acilação da amina **21**, o melhor meio reacional da reação foi o [BMIm][PF<sub>6</sub>], sendo que o produto (*R*)-**22** foi obtido com conversão de 21,6%, *ee* de 52,1% e *E* de 3,6.

Os resultados apresentados por Irimescu e *col.*, mostraram que encontrar a melhor condição para uma reação enzimática não é uma tarefa fácil e não se pode presumir que o meio reacional utilizado para um substrato atuará da mesma maneira para o outro composto, mesmo que este seja estruturalmente semelhante.<sup>106</sup>

Alternativas reacionais para melhorar o processo biocatalítico vêm sendo investigadas, podendo-se destacar na última década o uso de irradiação por microondas (MO). As condições reacionais podem ser

melhoradas aumentando o rendimento, reduzindo o tempo, e tornando o processo mais limpo.

## 1.9 Microondas na biocatálise

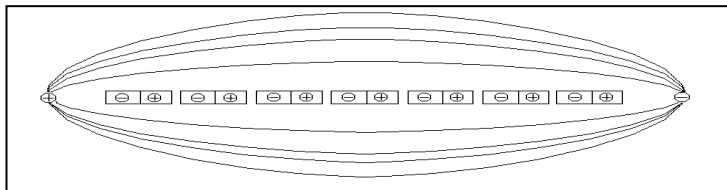
Nos últimos anos a irradiação por microondas (IMO) vem sendo utilizada para acelerar as reações biocatalisadas, especialmente as não-aquosas. Muitos estudos enfatizam o aumento da velocidade inicial da reação, a melhoria na conversão de reagente a produtos e/ou seletividade da reação e a reprodutibilidade dos resultados. No entanto, há poucos relatos de como este efeito não-térmico influencia na afinidade do substrato ou no mecanismo enzimático.<sup>107-109</sup>

As microondas (MO) são radiações eletromagnéticas não ionizantes com comprimentos de onda da ordem de 1mm a 1m, e com frequências no intervalo de 300 a 300.000 MHz. Nos fornos de microondas domésticos e nos equipamentos para abertura de amostras, é geralmente utilizada frequência de 2,45 GHz. No forno ou no reator de microondas, o aquecimento é seletivo em função de determinadas propriedades do material a ser processado tais como capacidade calorífica, polaridade, estrutura molecular, ligação química, constante dielétrica e frequência de relaxação, entre outras.<sup>110-113</sup>

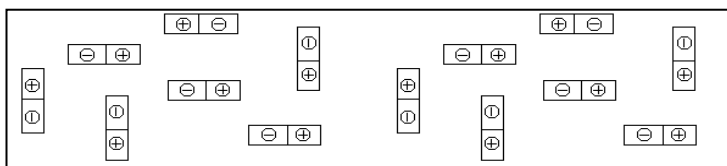
O aquecimento por microondas é completamente diferente do que ocorre em um forno de cozinha convencional (seja a gás ou elétrico), onde o processamento de cozimento de alimentos ocorre por condução, irradiação e convecção. Este aquecimento é também chamado de dielétrico, e existem dois mecanismos principais para a transformação da energia eletromagnética em calor.<sup>112-114</sup>

O primeiro deles é chamado rotação de dipolo, e relaciona-se com o alinhamento das moléculas (que tem dipolos permanentes ou induzidos) com o campo aplicado. Quando o campo é removido às moléculas voltam a um estado desordenado e a energia que foi absorvida para esta orientação nestes dipolos é dissipada na forma de calor. Como o campo elétrico na frequência de 2,45 GHz oscila (muda de sinal)  $4,9 \times 10^9$  vezes por segundo, ocorre um rápido aquecimento destas moléculas.

Uma representação esquemática é mostrada na **Figura 19**, onde a água é usada como exemplo de molécula que foi reorganizada neste sistema.<sup>112,113</sup>



1- Dipolo alinhados com o campo eletromagnético.



2- Dipolos após a retirada do campo eletromagnético.

**Figura 19** - Moléculas de água com e sem influência do campo elétrico.<sup>112</sup>

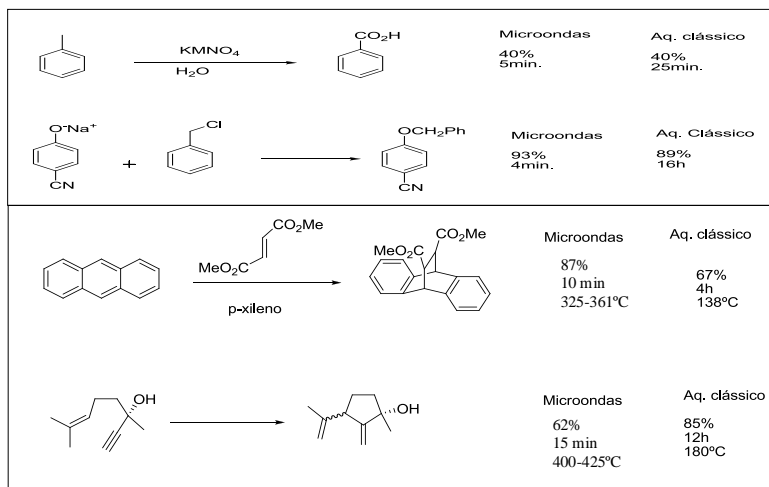
O segundo mecanismo é chamado de condução iônica, e o calor é gerado através de perdas por fricção que acontecem através da migração de íons dissolvidos sob a ação de um campo eletromagnético. Estas perdas dependem do tamanho, carga, condutividade dos íons dissolvidos e interação destes últimos com o solvente.<sup>112,113</sup>

Dentre as principais vantagens que ocorrem em relação às formas convencionais de aquecimento estão o tempo de exposição necessário relativamente mais curto e aquecimento global mais uniforme, não havendo superaquecimento da superfície. Quando a IMO é aplicada a sistemas multifásico ou constituídos por compostos polares em solventes apolares pode ocorrer a presença de pontos quentes. O aquecimento localizado pode ser vantajoso quando se objetiva acelerar reações ou buscar a seletividade para um determinado produto.<sup>110,115</sup>



Os primeiros relatos de reações orgânicas conduzidas em forno de microondas domésticos foram publicados em 1986, com os trabalhos independentes de Gedye<sup>116</sup> (**Figura 20a**) e Guigere<sup>117</sup> (**Figura 20b**).

As reações foram conduzidas em frasco selado em comparação com o aquecimento convencional. Foi observada uma redução grande no tempo de reação, embora não tenha ocorrido um controle de pressão.



**Figura 20** - Primeiras reações orgânicas feitas em forno doméstico.<sup>116,117</sup>

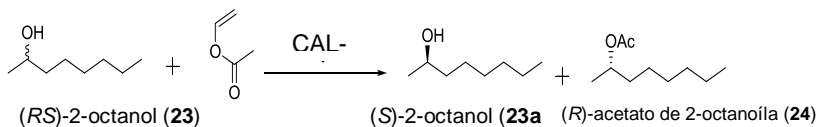
Os primeiros trabalhos também relataram casos de acidentes, pois alguns frascos deformaram ou explodiram devido às condições de irradiação.<sup>116</sup>

Apesar disso, inúmeros trabalhos seguiram, sendo citado na literatura diversas reações orgânicas conduzidas com sucesso em forno de microondas doméstico sem modificação e com segurança, tais como o rearranjo do pinacol e a alquilação aniônica conduzida em alumina.<sup>112</sup>

Posteriormente, começaram a ser usados reatores e fornos modificados.<sup>109,118,119</sup>

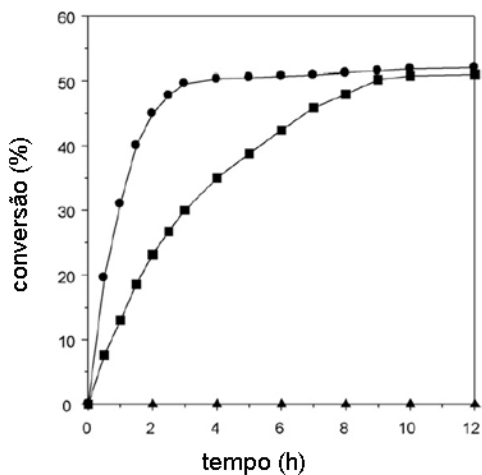
Porém ainda há pouca pesquisa sobre a aplicação do uso da irradiação de microondas em reações de resolução catalisada por lipases.<sup>115</sup>

Yu e *col.* descreveram a resolução do (*RS*)-2-octanol com acetato de vinila catalisada pela lipase de *C. antarctica* (CAL-B) por aquecimento convencional e irradiação por microondas (**Figura 21**).<sup>115</sup>



**Figura 21** - Resolução do (*RS*)-2-octanol (23) catalisada pela CAL-B.<sup>115</sup>

Foi feita uma comparação entre o aquecimento convencional e a irradiação por microondas e os resultados estão apresentados na **Figura 22**.



**Figura 22** - Comparação da reação de resolução do (*RS*)-2-octanol catalisada pela CAL-B com aquecimento convencional (■) e irradiação por microondas (●) e sem a enzima com irradiação por microondas (▲).<sup>115</sup>

Os resultados mostraram que a irradiação por microondas aumentou a conversão e a enantiosseletividade em relação à reação feita em aquecimento convencional. Como apresentado na **Figura 22**, o (*R*)-éster-**24** foi obtido com 50% de conversão em 3h com irradiação por microondas enquanto que foram necessárias 12h para obter o mesmo valor em aquecimento convencional. Em relação à enantiosseletividade (*E*), o valor de *E* aumentou significativamente de 104 com aquecimento convencional para 328 em irradiação por microondas. Além disso, a estabilidade térmica e enantiosseletividade da CAL-B aumentaram, e foi possível a reutilização após otimização das condições reacionais, tais como temperatura, solvente orgânico, atividade de água, razão do substrato e massa da enzima. Com as condições ótimas o (*S*)-2-octanol (**23a**) foi obtido com 50,5% de conversão e *ee* de 99%, em 2h sob irradiação por microondas.<sup>115</sup>

Portanto, está técnica tem a habilidade de diminuir o tempo de reação, aumentar o rendimento e seletividade, bem como tornar a reação mais limpa e reprodutível. Estes parâmetros são decisivos para a viabilidade de um determinado processo biocatalítico. Além disso, a escolha do meio reacional, do doador acila e da lipase são também relevantes para a obtenção de compostos enantiomericamente puros.

O uso de líquidos iônicos e da irradiação por microondas em biocatálise é uma área de grande interesse com potencial para novos e aprofundados estudos. Destaca-se a resolução de aminas, que será o tema abordado neste trabalho.

## 2 Justificativa

Uma aplicação das enzimas que tem merecido destaque é sua utilização na obtenção de fármacos ou insumos farmacêuticos em suas formas enantioméricas ativas com elevada pureza ótica, pois estes biocatalisadores são capazes de reconhecer moléculas quirais e atuam, preferencialmente, em um dos isômeros de uma mistura racêmica. É conhecido que alguns fármacos são produzidos e comercializados na sua forma racêmica e que a atividade biológica depende em muitos casos, de sua configuração absoluta. Normalmente, um dos isômeros (*R* ou *S*) apresenta atividade biológica enquanto o outro é menos ativo ou até mesmo tóxico. Na grande maioria dos casos, os fármacos administrados sob a forma racêmica possuem características biológicas muito inferiores aos seus enantiômeros puros.

A tecnologia quiral movimenta hoje bilhões de dólares por ano no preparo de fármacos enantiomericamente puros utilizados nas áreas farmacêutica, biológica e médica, entre outras. A indústria farmacêutica detém inúmeras patentes, e é essa demanda crescente que incentiva cada vez mais o conhecimento com relação à descoberta de novos biocatalisadores e substratos, para o desenvolvimento de compostos biologicamente ativos.

A partir destas considerações, neste trabalho, propõe-se estudar reações de resolução enzimática de aminas em meio orgânico e/ou em líquido iônico, com o uso da irradiação por microondas e/ou por aquecimento convencional. Serão utilizadas lipases de diferentes procedências na resolução de aminas alifáticas e/ou aromática. Pretende-se, obter sistemas otimizados para a produção de amidas opticamente puras, sendo que estas poderão ser utilizadas como intermediários quirais para a obtenção de outros compostos de interesse.

### 3 Objetivos

#### 3.1 Geral

Neste trabalho será avaliada a eficiência das lipases comerciais e nativas livres e/ou imobilizadas na resolução de amins alifáticas e/ou aromática com diferentes doadores acila em vários solventes orgânicos ou em misturas de solventes orgânicos: líquidos iônicos sob aquecimento convencional ou irradiação por microondas.

#### 3.2 Específicos

- Sintetizar as amidas racêmicas (*RS*)-feniletilacetamida, (*RS*)-2-etilhexilacetamida, (*RS*)-*sec*-butilacetamida, (*RS*)-octan-2-il-acetamida e as enantiomericamente puras (*R*)-feniletilacetamida, (*S*)-*N*- $\alpha$ -metilbenzilacetamida e (*R*)-*sec*-butilacetamida pelo método não enzimático. Estas serão utilizadas como padrões nas análises em cromatografia gasosa de fase estacionária quiral (CGQ).
- Caracterizar as mesmas por técnicas espectroscópicas de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e cromatografia gasosa com fase estacionária quiral (CGQ).
- Avaliar a eficiência das lipases de *C. antarctica* (CAL-B), *Pseudomonas cepacia* ou *Pseudomonas* sp (lipase PS), lipase PS imobilizada em terra diatomácea (PS-D), lipase PS imobilizada em partículas de cerâmica (PS-C), e as nativas de *Aspergillus niger* e de *Rhizopus oligosporus* livre ou imobilizadas em filmes de amido de cará, inhame ou de gelatina na reação de aminólise enantiosseletiva de amins alifáticas e/ou aromática, tais como as (*RS*)-feniletilamina, (*RS*)-2-etilhexilamina, (*RS*)-*sec*-butilamina e a (*RS*)-2-aminooctano.
- Avaliar a enantiosseletividade das lipases descritas acima na resolução das amins alifáticas e/ou aromática utilizando diferentes doadores acila, tais como os acetatos de etila, de vinila e o de *iso*-propenila.
- Avaliar a influência de solventes orgânicos puros (*n*-hexano, *n*-heptano, clorofórmio, diclorometano, *terc*-butanol, ciclohexano, tolueno) ou em

misturas com líquidos iônicos (tetrafluorborato de 1-butil-3 metilimidazólio - [BMIm][BF<sub>4</sub>], hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio - [BMIm][PF<sub>6</sub>], cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio - [BMIm][Cl], tiocianato de 1-butil-3-metilimidazólio - [BMIm][SCN], hexafluorofosfato de 1-butil-4-metil piridínio - [BMPi][PF<sub>6</sub>] e tetrafluorborato de 1-butil-4-metil piridínio - [BMPi][BF<sub>4</sub>]) para a obtenção das amidas quirais citadas anteriormente, pelo método da catálise enzimática.

- Avaliar a influência da concentração dos líquidos iônicos, bem como as dos ânions e dos cátions na obtenção da amida quiral derivada da (*RS*)-feniletilamina pelo método da catálise enzimática.
- Avaliar o efeito da temperatura, massa de lipase e concentração do doador acila na resolução das aminas (*RS*)-*N*- $\alpha$ -metilbenzilamina e (*RS*)-*sec*-butilamina.
- Avaliar o efeito da temperatura e dos solventes orgânicos na resolução da (*RS*)-*sec*-butilamina com acetato de etila sob irradiação por microondas ou aquecimento convencional.
- Avaliar a influência da imobilização da lipase nativa de *Aspergillus niger* em filmes de amido de cará, inhame e de gelatina na resolução da (*RS*)-*sec*-butilamina com acetato de etila usando o aquecimento convencional e a irradiação por microondas.
- Comparar os resultados obtidos com outros reportados na literatura recente.

## 4 Parte experimental

### 4.1 Materiais

Os solventes e reagentes utilizados foram das seguintes procedências:

- **Sigma-Aldrich:** clorofórmio deuterado, (*RS*)-feniletilamina, (*RS*)-2-etilhexilamina, (*RS*)-*sec*-butilamina e a (*RS*)-2-aminoctano, (*R*)-feniletilamina e (*S*)-feniletilamina;
- **Fluka Chemika:** tetrafluorborato de 1-butil-3 metil imidazólio - [BmIm][BF<sub>4</sub>], hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil imidazólio - [BmIm][PF<sub>6</sub>], cloreto de 1-butil-3-metil imidazólio - [BmIm][Cl], tiocianato de 1-butil-3-metil imidazólio - [BmIm][SCN], hexafluorofosfato de 1-butil-4-metil piridínio - [BmPi][PF<sub>6</sub>] e tetrafluorborato de 1-butil-4-metil piridínio - [BmPi][BF<sub>4</sub>], (*R*)-*sec*-butilamina, acetato de vinila, acetato de *iso*-propenila, anidrido acético;
- **F. Maia:** tolueno;
- **Vetec:** *tert*-butanol, *n*-hexano, clorofórmio, bicarbonato de sódio, sulfato de magnésio anidro, diclorometano; *n*-heptano, glicerol, ciclohexano; anidrido acético;
- **Grupo Química:** acetato de etila;
- **Dinâmica:** éter etílico;
- **Nuclear:** piridina;
- **Synth:** *n*-hexano.

Todos os solventes foram tratados com peneira molecular e quando necessário foram destilados.

### 4.2 Lipases e atividade

Para a realização deste trabalho utilizaram-se as seguintes lipases:

- Lipase de *Candida antarctica* (imobilizada em macroporos de resina acrílica) (Novozym 435 – CAL-B) (10.000 Plu/g), recebida pela Novozymes.

Lipases de *Pseudomonas cepacia* (LPS) (30.000 U/g), *Pseudomonas* sp. (PS-D) (imobilizada em terra diatomácea) (500 U/g), lipase *Pseudomonas* sp. (PS-C) (imobilizada em partículas de cerâmica quimicamente modificada com grupos metacrílicos) (600 U/g), recebidas como doação pela Amano. Os valores de atividade apresentados foram fornecidas pela Novozymes e Amano, sendo que 1 Plu/g – é a quantidade de enzima que libera um micromol de laurato de propila por minuto a 40°C e 1U/g – é a quantidade de enzima que libera um micromol de ácidos graxos por um minuto em pH 7,0. (<http://www.novozymes.com.br> e <http://www.amano-enzyme.co.jp>).

- Lipases de *Aspergillus niger* (18,2 U/mL) e de *Rhizopus oligosporus* (14,9 U/mL) doadas pela Profa. Patrícia O. Carvalho da Universidade de São Francisco (USF), Bragança Paulista-SP. Estas foram isoladas de um microorganismo de solo da região de Bueno Brandão (MG), e as lipases produzidas foram purificadas e identificadas conforme descrito na literatura.<sup>1a</sup>

#### **4.2.1 Determinação da atividade de hidrólise das lipases livres e imobilizadas**

A atividade das lipases comerciais de *C. antarctica*, *Pseudomonas cepacia* (LPS, LPS-C e LPS-D), bem como da lipase nativa de *A.niger* na sua forma livre ou imobilizada em filmes de amido de cará, inhame ou de gelatina foram determinadas através da hidrólise por titulometria baseado no método proposto por Thomson e col.,<sup>120</sup> que se baseia na titulação com KOH dos ácidos graxos liberados pela ação da lipase sobre triacilgliceróis presentes no óleo de oliva.<sup>1</sup>

A atividade destas lipases foi determinada pela Profa. Patrícia O. Carvalho, utilizando-se uma curva padrão do ácido oléico puro. Uma unidade de atividade lipolítica é definida como a quantidade de enzima que libera um micromol de ácidos graxos por minuto nas condições de ensaio descritas (pH 6,0, 40°C em 1h de reação). Foi usado como branco a mistura de reação no tempo zero. As análises foram realizadas em triplicadas e expressas como média das determinações. Os resultados das atividades lipolíticas serão apresentados e discutidos na seção 7, em resultados e discussão.



Para analisar a estabilidade da CAL-B em *n*-hexano, *n*-heptano, *tert*-butanol, clorofórmio e diclorometano, esta foi estocada na geladeira (temperatura de aproximadamente 10-15°C) em frascos contendo os solventes citados anteriormente por um período de 96h. Posteriormente, as amostras foram agitadas sob aquecimento (40°C) e a atividade foi determinada pelo método descrito acima, e os valores foram comparados com os obtidos antes da estocagem. Estes resultados serão apresentados e discutidos no item 7.1.1, pág. 63.

### **4.3 Equipamentos**

- Os equipamentos utilizados para a realização deste trabalho foram:
- Agitadores magnéticos - Dist;
- Chapas de aquecimento - Dist;
- Rotaevaporador - Buchi 461 water bath;
- Balanças analíticas - Sartorius basic/ Marte A500/ AND EK-200i;
- Banho termostatizado tipo Dubnoff - Marconi/TE-053/TE-093;
- Shaker – Certomat MO B. Braum Biotech International;
- Microondas: Reator Discover tipo Explorer marca CEM Corporation(Superlab);
- Ponto de fusão - Microquímica APF301.

### **4.4 Caracterização dos compostos**

Todos os compostos foram caracterizados por análises espectroscópicas de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C) e por cromatografia gasosa com fase quiral (CGQ) por comparação com padrões.

#### **4.4.1 Espectrofotometria no infravermelho**

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro da ABB Bomen FTLA 2000-100.

Os espectros de IV para os compostos sólidos foram obtidos em pastilha de KBr e para os líquidos em filme.

#### **4.4.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono**

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e de carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ) foram obtidos no espectrômetro 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 foram caracterizados como: dubleto (d), duplo dubleto (dd), multipletto (m), singleto (s), tripleto (t), quarteto (q), quinteto (qui) e sexteto (sex).

#### **4.4.3 Polarimetria**

As medidas polarimétricas foram realizadas em um Polarímetro - Schmidt + Haensch, utilizando uma quantidade conhecida de amostra (g), diluída em balão volumétrico de 10mL com clorofórmio ou etanol. A rotação óptica específica foi calculada conforme descrito do no item 1.7.1, através da **Equação 4**.

#### **4.4.4 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. As colunas capilares utilizadas foram da Restek constituída da fase RT – BetaDex – SM (30m x 0,32mm x 0,25 $\mu\text{m}$ ) e da Varian (CP 7502), constituída da fase CP-chirasil Dex CB (25m x 0,25mm ID x 0,25 $\mu\text{m}$ ).

As condições de análise de CGQ (cromatografia gasosa com fase quiral) foram determinadas para cada composto. Primeiramente, os padrões racêmicos previamente sintetizados foram submetidos à CGQ para obter as melhores condições de separação dos enantiômeros. Posteriormente, foram retiradas periodicamente alíquotas do meio reacional e estas analisadas por cromatografia gasosa sob as mesmas

condições. A programação utilizada para separar os enantiômeros dos substratos e produtos está descrita nos itens 7.1, p. 62; 7.3, p. 97 e 7.4, p. 120 e 123, em resultados e discussão.

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

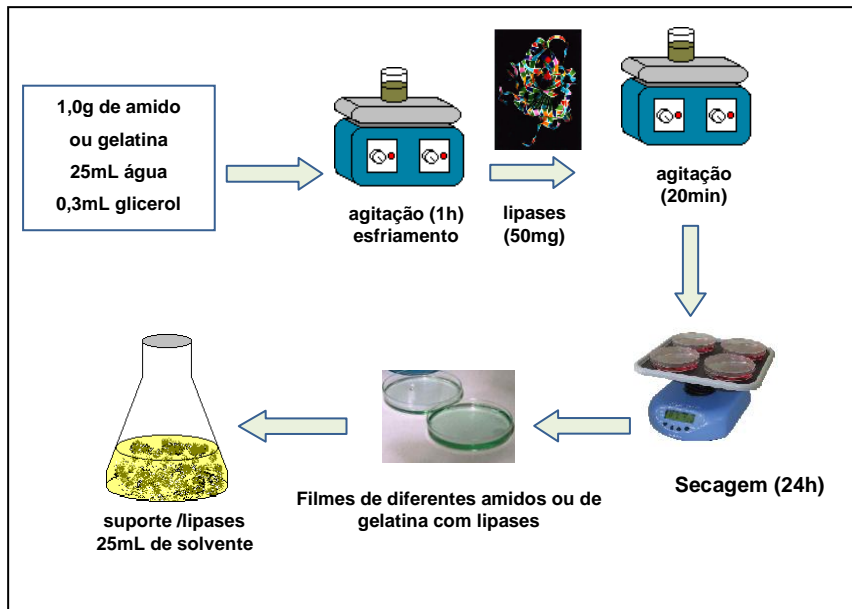
## 5 Preparação e caracterização dos suportes

Para a preparação dos suportes foram utilizados os filmes de amido de cará e inhame ou de gelatina. Os amidos foram provenientes de fontes naturais, e extraídos pela aluna Isabel Hoffmann em colaboração com a Profa. Elisa H.S. Moecke do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFSC.<sup>121</sup> A gelatina farmacêutica utilizada foi da Sigma, de granulometria 300 bloom.

### 5.1 Imobilização de lipases em filmes de amido de cará e inhame ou de gelatina

Em um béquer de 50mL contendo 25mL de água destilada e 0,3mL de glicerol, adicionou-se 1,0g de amido de cará e/ou inhame ou 1,0g de gelatina. Esta solução foi mantida sob agitação magnética e aquecimento brando a aproximadamente 60°C, por 1h ou até completa dissolução dos polímeros.

Após esse período e esfriamento a temperatura ambiente, adicionou-se 50mg das lipases LPS e/ou de *Aspergillus niger* (*A.niger*), e o sistema foi mantido sob agitação adicional por mais 20min. Posteriormente, a solução foi transferida para uma placa de Petri e aquecida sobre um banho de areia a aproximadamente 40°C para evaporação da água. Os filmes com as enzimas imobilizadas foram cortados em pedaços pequenos e transferidos para um erlenmeyer de 250mL para serem posteriormente utilizados nas reações biocatalisadas (**Figura 23**).

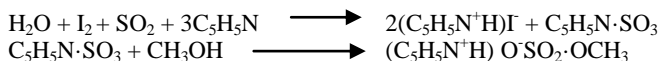


**Figura 23** - Imobilização de lipases em filmes de amido de cará e inhame ou de gelatina.

## 5.2 Determinação do teor de água das lipases imobilizadas em filmes de amido e de gelatina pelo método de Karl-Fischer

A determinação do teor de água nos filmes de amido de cará, inhame e de gelatina foi realizada na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC, utilizando-se o Titulador 633 Automático Karl Fischer, Metrohm AG CH-9100 Herisau.

Este método baseia-se na determinação quantitativa da água em uma solução anidra de dióxido de enxofre e iodo.<sup>122</sup>



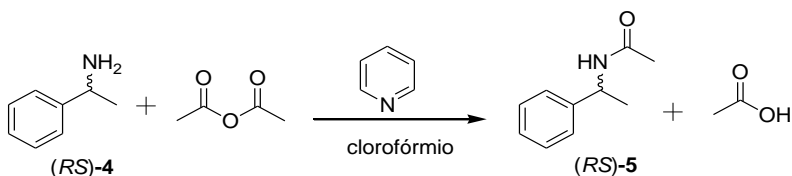
Os resultados obtidos serão apresentados e discutidos no item 7.3.4.3, pág. 113.

## 6 Síntese das amidas

### 6.1 Preparação das amidas racêmicas e quirais pelo método não enzimático

#### 6.1.1 Preparação das amidas (*RS*)-, (*R*)- e (*S*)-feniletilacetamida

A **Figura 24** mostra a equação química para a obtenção da (*RS*)-feniletilacetamida (**5**).



**Figura 24** - Preparação da (*RS*)-feniletilacetamida (**5**).

Em um béquer de 250mL adicionou-se 3,25mL (25mmol) de (*RS*)-feniletilamina (**4**) com 4mL (50mmol) de piridina em 50mL de clorofórmio. Posteriormente, o anidrido acético 5mL (50mmol) foi adicionado gota-a-gota sobre a solução.

O sistema foi mantido sob agitação mecânica e resfriado em banho de gelo, ocorrendo desprendimento de vapores brancos. A reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD). Ao término, a amida foi purificada através da extração com solução aquosa de ácido clorídrico 5% (3x 10mL) e posteriormente com solução de bicarbonato de sódio 5% (3x 10mL), utilizando éter etílico. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro (MgSO<sub>4</sub>) e evaporou-se o solvente. O composto (*RS*)-feniletilacetamida (**4**) foi obtido com 55% de rendimento como um sólido branco (pf = 75-77°C).

**IV (KBr)v (cm<sup>-1</sup>)** 3267 [ν (NH)], 3070 - 2980 [ν (C-H) alifático e aromático], 1639 [ν (C=O)], 1558 [δ (NH)].

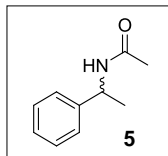
**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**, δ 7,26-7,36 (m, 5H, C-H aromático) 5,79 (s, 1H, NH); 5,1 (m, 1H, N-CH), 3,75 (s, 3H, CO-CH<sub>3</sub>), 1,49 (d, 3H, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**, δ 169,4 (C=O), 143,3 (C aromático), 128,9, 127,6, 126,4 (C-H aromático), 49,1 (CH-N), 23,7 (CO-CH<sub>3</sub>), 21,9 (CH<sub>3</sub>);

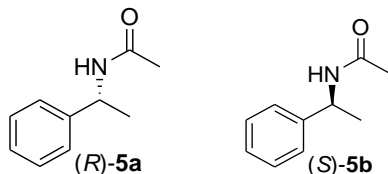
**Rf** = 0,60 (hexano:acetato de etila 5:5 v/v);

**t<sub>R</sub>** (**5b**) = 24,6min e **t<sub>R</sub>** (**5a**) = 25,5min;

[α] = 0 [10mg/mL, EtOH]



As amidas (**R**)-**5a** e (**S**)-**5b** foram preparadas através da mesma metodologia, porém utilizando as correspondentes aminas enantiomericamente puras.



Os espectros de IV, RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C são similares para os compostos (**R**)-**5a**, (**S**)-**5b** e (**RS**)-**5**, pois estes possuem comportamento espectroscópico e propriedades físicas (ponto de ebulição, fusão, solubilidade) iguais. Porém, o sentido da rotação do plano da luz polarizada é diferente para cada um dos enantiômeros.<sup>35</sup>

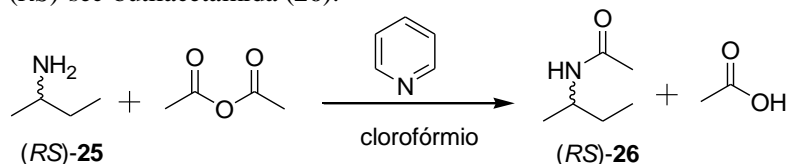
A (**R**)-feniletacetamida (**5a**) apresentou rotação óptica específica de [α] = +121,6° [29,5mg/mL, EtOH] e a (**S**)-feniletacetamida (**5b**) de [α] = -125° [29,6mg/mL, EtOH].

Os valores citados na literatura são referentes aos da amina (**S**)- e da (**R**)-feniletamina, sendo que para a (**R**)-amina é de + 30 [0,1g/mL, EtOH] e para a (**S**)-amina [α] = - 30 [0,1g/mL, EtOH].<sup>123</sup> Os sinais dos

desvios da luz plano polarizada são os mesmos em relação a amina e a correspondente amida.

### 6.1.2 Preparação das amidas (*RS*)- e (*R*)-*sec*-butilacetamida

A **Figura 25** mostra a equação química para a obtenção da (*RS*)-*sec*-butilacetamida (**26**).



**Figura 25** - Preparação da (*RS*)-*sec*-butilacetamida (**26**)

A amida (*RS*)-**26** foi preparada através da mesma metodologia utilizada para preparar o composto (*RS*)-**5**.

A (*RS*)-*sec*-butilacetamida (**26**) foi obtida com 65% de rendimento como um óleo.

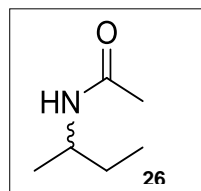
**IV (KBr)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ )** 3289 [ $\nu$  (NH)], 2973-2932 [ $\nu$  (C-H) alifático], 1647 [ $\nu$  (C=O)], 1558 [ $\delta$  (NH)].

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**, 5,76 (s, 1H, NH), 3,89 (sex, 1H, N-CH), 1,98 (s, 3H, CO- $\text{CH}_3$ ), 1,46 (qui, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1,12 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 0,9 (t, 3H,  $\text{CH}_3$ );

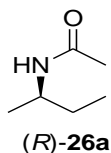
**R<sub>f</sub>** = 0,41 (hexano:acetato de etila 5:5 v/v).

**t<sub>R</sub> (26b)** = 11,3min e **t<sub>R</sub> (26a)** = 11,5min;

**[ $\alpha$ ]** = 0 [10mg/mL,  $\text{CHCl}_3$ ]



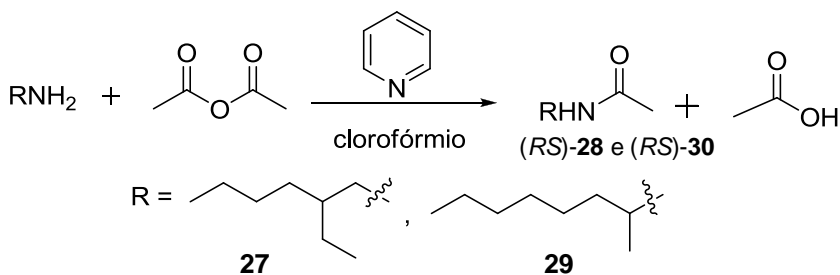
A amida (*R*)-**26a** foi preparada através da mesma metodologia, porém utilizando a correspondente amina enantiomericamente pura.



A (*R*)-*sec*-butilacetamida (**26a**) apresentou rotação ótica específica  $[\alpha] = -8,87$  [0,09g/mL,  $\text{CHCl}_3$ ]. Os valores citados na literatura são referentes ao da (*R*)-*sec*-butilamina, sendo  $[\alpha] = -7,50$ .<sup>124</sup> O sinal do desvio da luz plano polarizada foi o mesmo para a amina-(*R*) e a correspondente amida.

### 6.1.3 Preparação das amidas (*RS*)-2-etilhexilacetamida (**28**) e (*RS*)-octan-2-il-acetamida (**30**)

A **Figura 26** mostra a equação química para a obtenção das amidas racêmicas (*RS*)-2-etilhexilacetamida (**28**) e (*RS*) octan-2-il-acetamida (**30**)



**Figura 26** - Preparação das amidas racêmicas (*RS*)-2-etilhexilacetamida (**28**) e (*RS*) octan-2-il-acetamida (**30**).



As amidas racêmicas (*RS*)-**28** e (*RS*)-**30** foram preparadas através da mesma metodologia utilizada para preparar a amida racêmica (*RS*)-**5**.

As amidas (*RS*)-2-etilhexilacetamida (**28**) e (*RS*)-2-acetamida-octano (**30**) foram obtidas com 70% e 60% de rendimento, respectivamente como óleos.

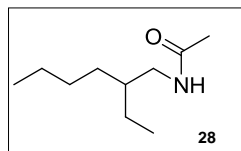
**IV (KBr)  $\nu(\text{cm}^{-1})$**  3302 [ $\nu$  (NH)], 2961-2872 [ $\nu$  (C-H) alifático], 1659 [ $\nu$  (C=O)], 1561 [ $\delta$  (NH)].

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**, 6,72 (s, 1H, NH ), 3,16 (dd, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 1,99 (s, 3H, CO-CH<sub>3</sub>), 1,45-1,27 (m, 8H, 4 CH<sub>2</sub>), 0,89 (t, 6H, 2CH<sub>3</sub>);

**Rf** = 0,50 (hexano:acetato de etila 5:5 v/v);

$t_{R1}$  = 14,3min e  $t_{R2}$  = 15,1min

$[\alpha]$  = 0 [8mg/mL,  $\text{CHCl}_3$ ]



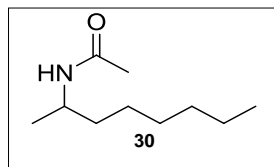
**IV (KBr)  $\nu(\text{cm}^{-1})$**  3280 [ $\nu$  (NH)], 2961-2872 [ $\nu$  (C-H) alifático], 1646 [ $\nu$  (C=O)], 1554 [ $\delta$  (NH)];

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**, 5,86 (s, 1H, NH ), 3,97 (sex, 1H, N-CH), 1,95 (s, 3H, CO-CH<sub>3</sub>), 1,28 (q, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,43-1,12 (m, 6H, 3 CH<sub>2</sub>), 1,11 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 0,86 (t, 3H, CH<sub>3</sub>);

**Rf** = 0,64 (hexano:acetato de etila 5:5 v/v);

$t_{R1}$  = 12,4min e  $t_{R2}$  = 13,0min

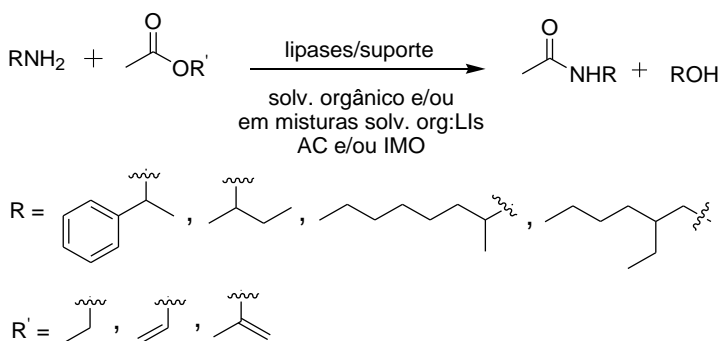
$[\alpha]$  = 0 [7mg/mL,  $\text{CHCl}_3$ ]



## 6.2 Sínteses das amidas pelo método enzimático

### 6.2.1 Resolução das aminas racêmicas usando solventes orgânicos convencionais e/ou líquidos iônicos

A resolução das aminas racêmicas foi realizada conforme apresentado na **Figura 27**, utilizando diferentes lipases livres ou imobilizadas em filmes de amido de cará, inhame ou de gelatina em diferentes solventes orgânicos e/ou em misturas de solventes orgânicos com líquidos iônicos, bem como em aquecimento convencional (AC) ou sob irradiação por microondas (MO).



**Figura 27** -Resolução de aminas racêmicas catalisada por lipases livres ou imobilizadas.

#### A. Resolução das aminas na presença de solventes orgânicos convencionais

Em um erlemmeyer de 250mL, adicionou-se (*RS*)-feniletilamina (**4**) (0,26mL; 2mmol); solvente orgânico (7-25mL) e as lipases de *C. antarctica* (CAL-B), de *P. cepacia* (LPS), *Pseudomonas* sp (PS-D), *Pseudomonas* sp (PS-C) ou as nativas de *A. niger* e de *R. oligosporus* livres ou imobilizadas (0-100mg) em filmes de amido de cará, inhame ou de gelatina.

A seguir, adicionou-se os diferentes doadores acila (2-20mmol), tais como o acetato de etila, de vinila e o de *iso*-propenila. O meio

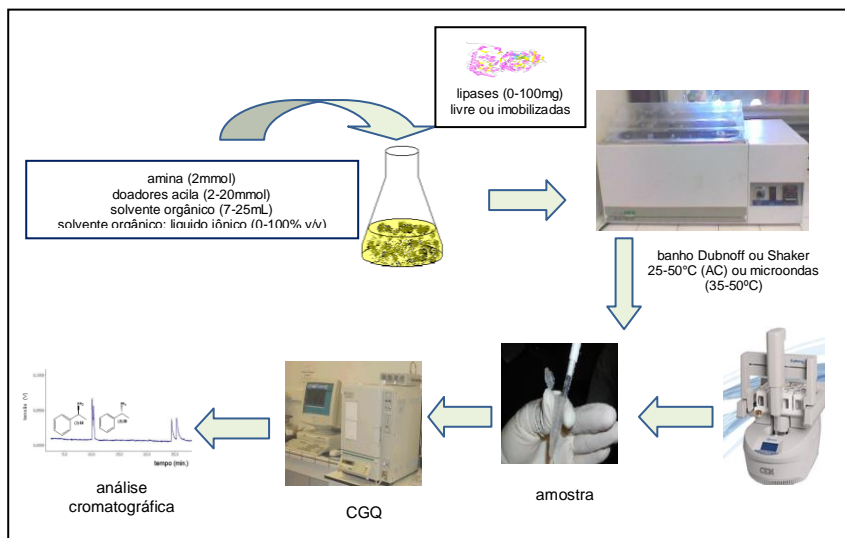
reacional resultante foi agitado em banho termostático nas temperaturas de 25-50<sup>0</sup>C por aquecimento convencional (AC) ou irradiação por microondas (IMO). O mesmo procedimento foi utilizado com as aminas (*RS*)-*sec*-butilamina (**25**) (0,2mL; 2mmol), (*RS*)-2-etilhexilamina (**27**) (0,18mL; 2mmol) ou (*RS*)-2-amino-octano (**29**) (0,18mL; 2mmol).

Em um frasco de vidro no formato de um tubo de ensaio, porém com paredes mais espessas que é adequado para o equipamento de microondas, foi colocada uma mistura de 2mmol da amina (**25**), 2mmol do acetato de etila, 7mL de solvente orgânico e a lipase de *A.niger* livre ou imobilizada. Em seguida, o frasco foi vedado com um septo e a mistura reacional colocada no reator sob sistema fechado, e submetido à potência máxima de 50W, a 50 PSI de pressão, temperatura máxima de 50°C. O tempo total de reação foi o somatório de 5 pulsos consecutivos de irradiação de 1min sem contar o tempo de rampa (1min) para cada pulso aplicado.

As variáveis como temperatura, tempo de irradiação, pressão e potência foram programadas no próprio equipamento. Além destes, foram selecionados outros parâmetros como agitação, tempo de rampa e o solvente.

Foram retiradas periodicamente alíquotas da reação e analisadas por cromatografia gasosa com fase quiral (**Figura 28**).

As porcentagens de conversão (%) foram calculadas através da **Equação 1**, pág. 24, e as razões enantioméricas (E) através da **Equações 2 e 3**, pág. 24 e do programa para o cálculo da seletividade de resolução cinética que está disponível na internet (<http://www.orgc.tugraz.at/>).



**Figura 28** - Esquema reacional utilizado na resolução das aminas racêmicas.

## B. Resolução da (*RS*)-feniletilamina (**4**) na presença de líquidos iônicos

Em um erlenmeyer de 250mL adicionou-se a (*RS*)-feniletilamina (**4**) (0,26mL; 2mmol), misturas *n*-hexano:líquido iônico (0-100% v/v), clorofórmio:líquido iônico (9:1 v/v), diclorometano:líquido iônico (9:1 v/v) ou *n*-heptano:líquido iônico (9:1 v/v) e as lipases de *C. antarctica* (CAL-B) (50 e 100mg) e a de *A. niger* (50mg). Como doadores acila foram utilizados os acetatos de etila (0,78mL; 8mmol) e o de vinila (0,74mL; 8mmol). O meio reacional resultante foi agitado em banho termostatizado a 35°C.

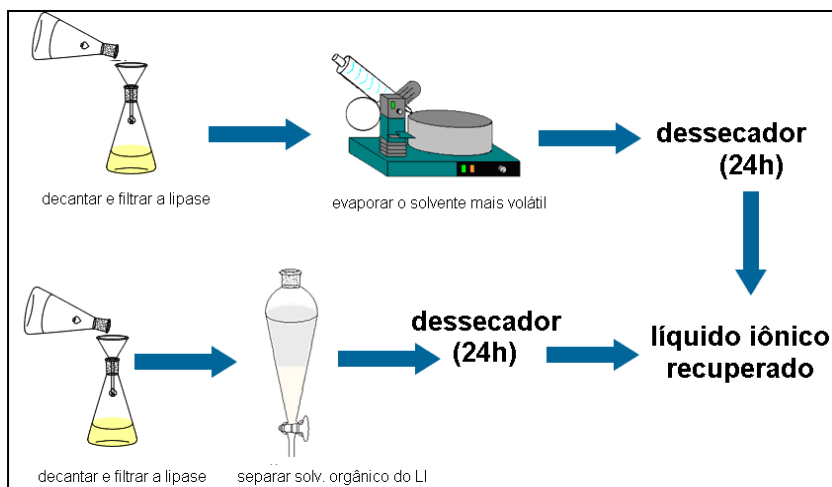
As reações foram monitoradas por cromatografia gasosa com fase quiral. As porcentagens de conversão (%) e as razões enantioméricas (E) foram calculadas, conforme descrito anteriormente.

Após o término da reação, fez-se uma filtração para retirar a lipase. Posteriormente, o solvente orgânico mais volátil foi evaporado

(*n*-hexano, *n*-heptano, clorofórmio ou diclorometano) e o líquido iônico remanescente ([BMIm][BF<sub>4</sub>], [BMIm][PF<sub>6</sub>], [BMIm][Cl], [BMIm][SCN], [BMPi][BF<sub>4</sub>] ou [BMPi][PF<sub>6</sub>]) foi seco à temperatura ambiente em dessecador a vácuo por 24h, para subsequente reutilização (**Figura 29a**).

Em outra metodologia utilizada para recuperar o líquido iônico, após a filtração da lipase, a solução foi colocada em um funil de separação. Como os LIs são imiscíveis e possuem densidades diferentes com todos os solventes orgânicos utilizados, estes formam duas fases e podem ser separados. Os LIs em geral, são mais densos que os solventes orgânicos utilizados (**Figura 29b**).

Após a recuperação dos LIs, estes podem ser utilizados em outras reações, reduzindo o custo do processo. Os LIs ainda são solventes de alto custo comercial, e portanto esta é mais uma vantagem de seu uso.

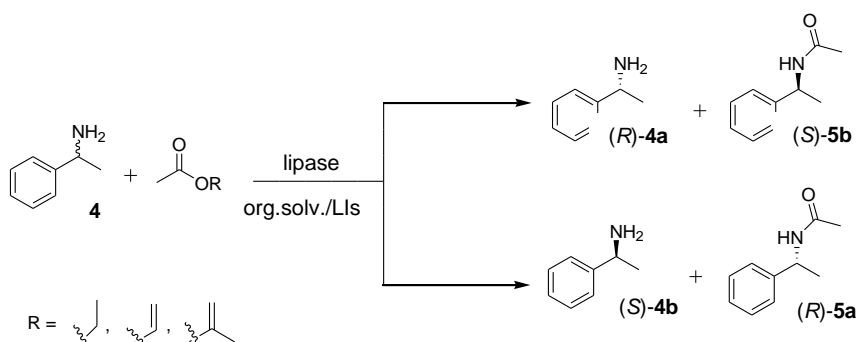


**Figura 29** - Recuperação dos líquidos iônicos

## 7 Resultados e Discussão

### 7.1 Resolução da (*RS*)-feniletilamina (4)

Inicialmente, estudou-se a acilação enzimática da (*RS*)-feniletilamina (4) com diferentes doadores acila, tais como os acetatos de etila, de vinila e o de *iso*-propenila em solventes orgânicos e/ou em misturas solvente orgânico: líquido iônico usando diferentes lipases livres ou imobilizadas, em diferentes condições experimentais. Os resultados serão discutidos e comparados (**Figura 30**).



**lipases** = lipase de *C. antarctica* (CAL-B), lipases de *Pseudomonas* sp. (PS), *Pseudomonas* sp. (PS-D) e de *Pseudomonas* sp. (PS-C) e as nativas de *A. niger* e de *R. oligosporus*.

**solventes orgânicos** = *n*-hexano, *n*-heptano, *tert*-butanol, clorofórmio e diclorometano.

**líquidos iônicos** = tetrafluorborato de 1-butil-3 metil imidazólio - [BMIm][BF<sub>4</sub>], hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil imidazólio - [BMIm][PF<sub>6</sub>], cloreto de 1-butil-3-metil imidazólio - [BMIm][Cl], tiocianato de 1-butil-3-metil imidazólio - [BMIm][SCN], hexafluorofosfato de 1-butil-4-metil piridínio - [BMPi][PF<sub>6</sub>] e tetrafluorborato de 1-butil-4-metil piridínio - [BMPi][BF<sub>4</sub>].

**Figura 30** - Acilação enantiosseletiva da (*RS*)-feniletilamina (4) com diferentes doadores acila catalisada por lipases.

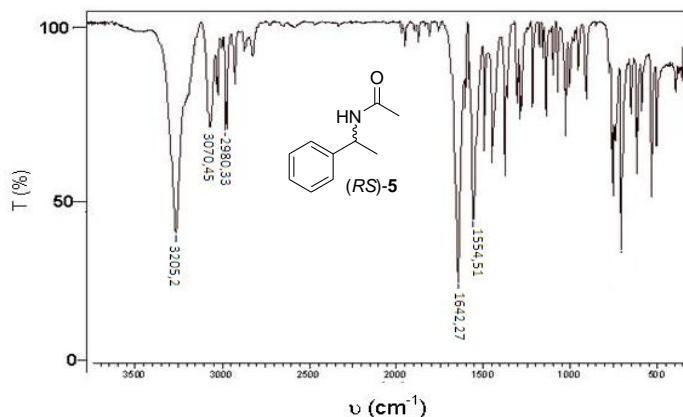
Primeiramente, foram preparados e caracterizados os padrões da amida racêmica (*RS*)-feniletilacetamida (**5**), bem como os das amidas quirais (*R*)-feniletilacetamida (**5a**) e (*S*)-feniletilacetamida (**5b**) através da metodologia não enzimática, conforme descrita no item 6.1.1, pág.50.

Os padrões racêmicos e quirais foram usados para comparar com a estereoquímica da amida obtida pelo método enzimático, através da cromatografia gasosa de fase quiral (CGQ).

A (*RS*)-fenilacetamida (**5**) preparada pelo método não enzimático foi analisada por técnicas espectroscópicas de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ ).

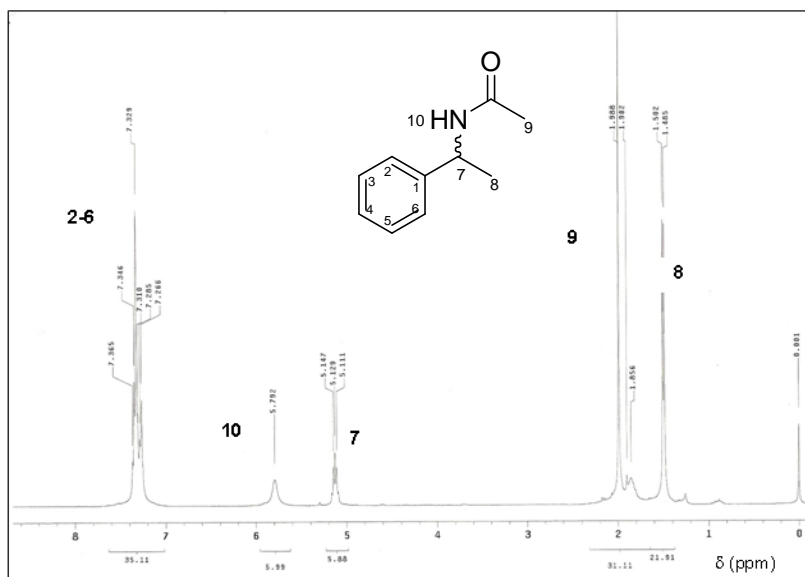
As **Figuras 31, 32 e 33** mostram os espectros de IV e RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  da amida (*RS*)-**5**. Através das bandas no espectro de infravermelho e das áreas dos picos e regiões características hidrogênios e carbonos, o composto (**5**) foi totalmente caracterizado.

Analisando a **Figura 31**, observam-se as bandas características da amida (*RS*)-**5**. Na região de  $3265\text{ cm}^{-1}$  tem-se a banda de estiramento da ligação N-H da amida, na região de  $3070\text{--}2980\text{ cm}^{-1}$  observa-se a banda de estiramento correspondente ao C-H alifático e aromático, e em  $1642\text{ cm}^{-1}$  a de estiramento correspondente a carbonila da amida (C=O). Em  $1554\text{ cm}^{-1}$  observa-se a banda de deformação da ligação do grupo N-H da amida.



**Figura 31** - Espectro de IV da (*RS*)-feniletilacetamida (**5**) (KBr).

Na **Figura 32** tem-se o espectro de RMN  $^1\text{H}$  da (*RS*)-**5**. Observam-se os sinais na região de 7,26-7,36 ppm (5H) que foram atribuídos aos hidrogênios do anel aromático que está representado por um multipletto, H<sub>2</sub> a H<sub>6</sub>. O singleto em 5,79 ppm (1H) corresponde ao hidrogênio ligado ao nitrogênio da amida H<sub>10</sub>, o multipletto em 5,1 ppm (1H) ao hidrogênio ligado ao carbono vizinho ao nitrogênio (H<sub>7</sub>), o singleto em 3,75 ppm (3H) é da metila da amida H<sub>9</sub> e o dubleto em 1,49 ppm (3H) corresponde aos hidrogênios da metila H<sub>8</sub>.

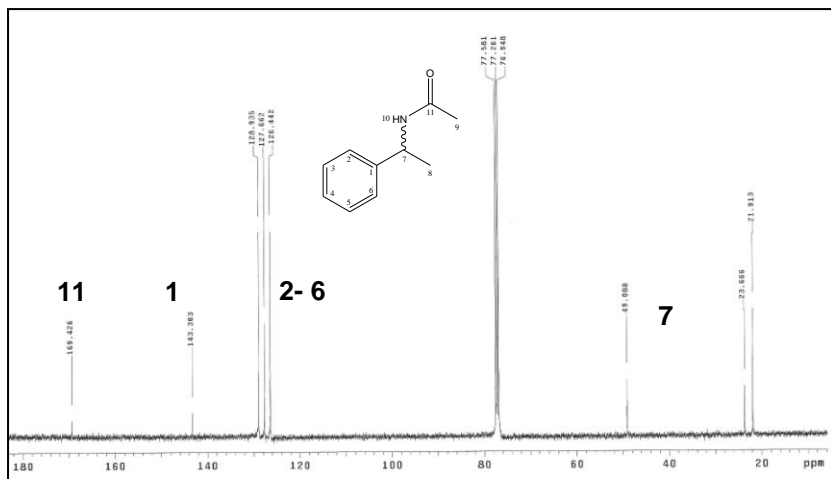


**Figura 32** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da (*RS*)-feniletacetamida (**5**) (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Na **Figura 33** é apresentado o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da (*RS*)-**5**. O pico em 169,4 ppm é referente ao carbono da carbonila C<sub>11</sub>, em 143,3 ppm observa-se um sinal quaternário do carbono do anel aromático C<sub>1</sub>, na região de 128,9, 126,4 e 127,6 ppm tem-se os picos dos carbonos do anel aromático que correspondem aos carbonos C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> e C<sub>6</sub>. O carbono ligado ao nitrogênio é observado em 49,1 ppm (C<sub>7</sub>), o pico da



metila ligada ao carbono da amida é observado em 23,7 ppm (C<sub>9</sub>) e o da metila terminal em 21,9 ppm (C<sub>8</sub>).



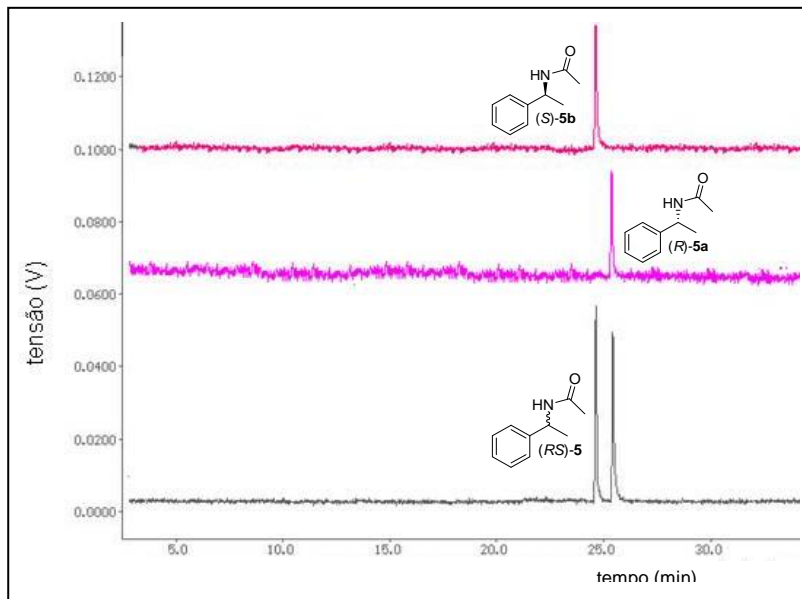
**Figura 33** - Espectro de RMN <sup>13</sup>C da (RS)-feniletilacetamida (5) (100MHz, CDCl<sub>3</sub>).

Os espectros de IV, RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C são similares para os compostos (RS)-5, (R)-5a e (S)-5b, pois os enantiômeros (RS)-5 e as correspondentes amidas quirais apresentam os mesmos grupos funcionais e, portanto o mesmo comportamento espectroscópico.<sup>35</sup>

A **Figura 34** mostra um cromatograma com a sobreposição dos compostos (RS)-5, (R)-5a e (S)-5b obtidos através do método químico a partir dos reagentes quirais, conforme descrito no item 6.1.1, pág. 50.

O cromatograma da **Figura 34** mostra que o tempo de retenção da amida (R)-5a é 25,5min e da amida (S)-5b é 24,6min.

Após a identificação das amidas racêmica e quirais, determinou-se a rotação óptica específica [α]. A amida (R)-5a apresentou rotação óptica específica de +121,6°, a (S)-5b de -125° e a (RS)-5 de 0, conforme descrito no item 6.1.1, pág. 51.



**Figura 34** -Cromatograma dos compostos *(RS)*-**5**, *(R)*-**5a** e *(S)*-**5b**, por CGQ. Condições de análises: Inj. = 230<sup>o</sup>C, Det. = 230<sup>o</sup>C, programação: 60<sup>o</sup>C 3<sup>o</sup>C/min 200<sup>o</sup>C, split 100:1, Pressão do H<sub>2</sub> = 75Kpa.

Após a preparação e caracterização da amida racêmica *(RS)*-**5** e das quirais *(R)*-**5a** e *(S)*-**5b**, iniciaram-se com os estudos da acilação da *(RS)*-feniletilamina (**4**) com várias lipases e em diferentes condições reacionais.

### 7.1.1 Avaliação de lipases de diferentes procedências

Inicialmente foi avaliado o uso de lipases de diferentes procedências na acilação enantiosseletiva da *(RS)*-feniletilamina (**4**) com acetato de etila em *n*-hexano ou em *n*-heptano.

Para este estudo, foram selecionadas as lipases comerciais de *Pseudomonas* sp. (LPS, PS-D, PS-C), a de *C. antarctica* (CAL-B) e as nativas de *A. niger* e de *R. oligosporus*.

Os resultados estão apresentados na **Tabela 2**. Ao decorrer da reação, foram retiradas alíquotas e analisadas por CGQ e comparadas com os padrões quirais. Foi observado que a conversão a amida (*R*)-**5a** foi dependente da fonte da lipase e da atividade.

**Tabela 2** - Acilação enantiosseletiva da (*RS*)-feniletilamina (**4**) com acetato de etila usando diferentes lipases.

entradas	lipases	atividade da lipases ( $\mu\text{mol}/\text{min mg.}$ ) <sup>c</sup>	tempo (h)	c (%)	E <sup>b</sup>
1	LPS	1.58 $\pm$ 0.6	120	0	0
2	LPS-D	1.69 $\pm$ 0.4	120	1	1.3
3	LPS-C	2.35 $\pm$ 0.3	120	8	1.0
4	CAL-B	3.04 $\pm$ 0.6	24	19	>200
5	<i>A. niger</i> <sup>c</sup>	0.54 $\pm$ 0.03	96	1	2.4
6	<i>A. niger</i> <sup>a</sup>	0.54 $\pm$ 0.03	96	30	>200
7	<i>R. oligosporus</i> <sup>c</sup>	14,9 U/mL	144	0	0
8	<i>R. oligosporus</i> <sup>a</sup>	14,9 U/mL	144	0	0

**Condições reacionais:** (*RS*)-feniletilamina (**4**) (0,26mL; 2mmol), acetato de etila (0,78mL; 8mmol), *n*-hexano (25mL) ou <sup>a</sup>*n*-heptano (25mL), lipase (<sup>c</sup>50 ou 100mg), 35°C.

<sup>b</sup> razão enantiomérica

<sup>c</sup> determinada conforme descrita no item 4.2.1, pág. 45.

Quando as lipases comerciais de LPS, PS-D, PS-C e a nativa de *R. oligosporus* foram empregadas, a amida foi formada com baixas conversões e a reação não foi seletiva.

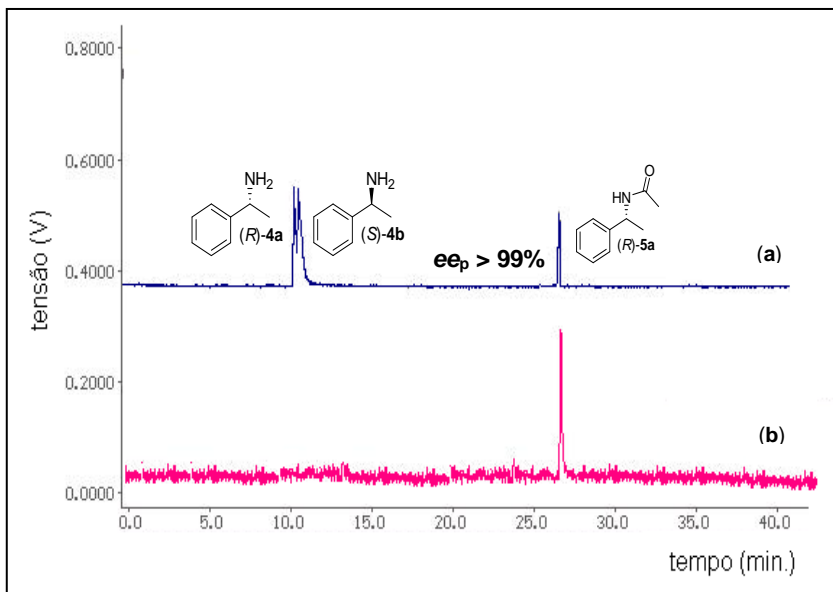
Usando estas lipases as conversões foram de 0 – 8%, com baixos valores de E sendo < 5 (entradas 1-3 e 7-8) em *n*-hexano ou *n*-heptano como solventes orgânicos, a 35°C em até 144h de reação.

Quando a lipase nativa de *A.niger* foi usada em *n*-hexano ou *n*-heptano, a amida (*R*)-**5a** foi obtida com conversões de 1 e 30%,  $ee_p$  de 27 a >99% e valores de E de 2,4 a >200, em 96h de reação, respectivamente (entradas 5 e 6). Esses resultados mostraram que esta lipase apresentou bom potencial para ser usada nesta reação. Estudos mais detalhados serão apresentados e discutidos no item 7.2, pág. 86-93.

Os melhores resultados foram obtidos quando a lipase de *C. antarctica* (CAL-B) foi usada como biocatalisador, formando a amida (*R*)-**5a** com conversão de 19%,  $ee_p$  >99% e E de >200 em *n*-hexano em 24h (entrada 4).

Na **Figura 35** observa-se a formação do produto e separação dos reagentes de uma alíquota da reação de acilação da (*RS*)-**4** com acetato de etila catalisada pela CAL-B em 48h.

Para fins comparativos, é apresentado o padrão do composto enantiomericamente puro e, pode ser observado que o produto formado foi preferencialmente a amida (*R*)-**5a**.



**Figura 35** - Cromatograma de uma alíquota de reação de acilação (*RS*)-**4** com acetato de etila catalisada pela CAL-B em 48h, por CGQ (a) padrão quiral da amida (*R*)-**5a** (b). Condições de análises: Inj. = 230<sup>o</sup>C, Det. = 230<sup>o</sup>C, programação: 60<sup>o</sup>C 3<sup>o</sup>C/min 200<sup>o</sup>C, split 100:1, pressão do H<sub>2</sub> = 75Kpa.

Em um estudo similar realizado por Gonzalez-Sabin e *col.* foi relatada a resolução da ( $\pm$ )-*trans* e ( $\pm$ )-*cis*-2-fenilciclopentanamina com acetato de etila catalisada pela CAL-B, em éter etil-metílico. Os resultados obtidos com a ( $\pm$ )-*cis*-2-fenilciclopentanamina mostraram que a amida foi obtida com conversão de 28% e valores de E de 16, e com a ( $\pm$ )-*trans*-2-fenilciclopentanamina a conversão foi de 50% e E de >200.<sup>125</sup>

A partir destes resultados, esta lipase foi selecionada para dar continuidade aos estudos avaliando o efeito do doador acila, bem como a razão molar do mesmo. Estudou-se também o efeito da temperatura, massa de CAL-B, do solvente orgânico puro e em misturas solvente orgânico: líquidos iônicos. Neste estudo foi avaliado o efeito dos ânions

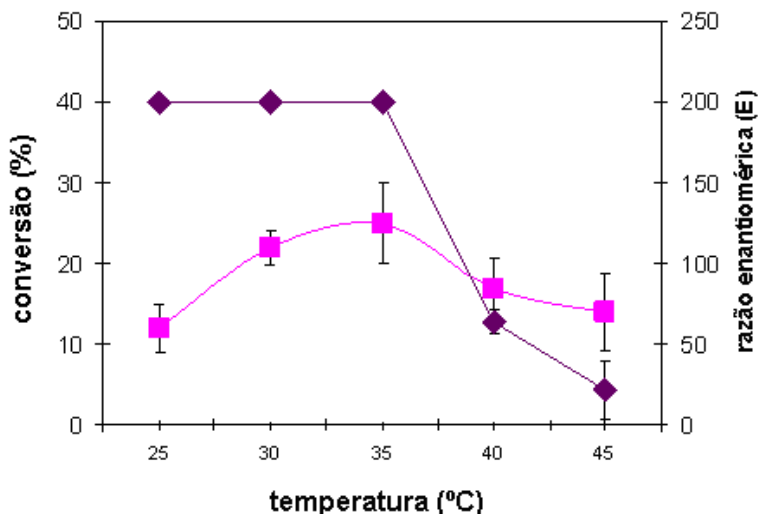
e dos cátions dos LIs derivados do imidazol e de piridina, bem como a proporção do solvente orgânico:LIs.

### 7.1.2 Efeito da temperatura

A temperatura tem grande influência em reações de resolução catalisadas por enzimas, e este parâmetro pode influenciar a atividade, seletividade e estabilidade do biocatalisador, bem como o equilíbrio da reação.<sup>14,126</sup>

Neste estudo, avaliou-se a influência de diferentes temperaturas entre 25-45°C, na acilação da (*RS*)-4 com acetato de etila em *n*-hexano em 48h de reação.

Os resultados mostraram que a conversão e a enantioseletividade foram dependentes da temperatura (**Figura 36**).



**Figura 36** – Variação da conversão e razão enantiomérica em função da temperatura na reação de acilação da (*RS*)-feniletilamina (**4**) (0,26mL; 2mmol) com acetato de etila (0,78mL; 8mmol) usando CAL-B (100mg) em *n*-hexano (25mL), 48h. [(■) c (%), (◆) E]

Os melhores resultados foram obtidos nas temperaturas de 30 e 35°C, sendo que a amida (*R*)-**5a** foi obtida com conversões de 22 e 25%,  $ee_p > 99\%$  e  $E > 200$ , respectivamente.

Nas temperaturas de 40 e 45°C, provavelmente a estabilidade da lipase foi menor, e conseqüentemente a conversão da amida (*R*)-**5a** diminuiu para 17 e 14%, com  $ee_p$  de 96 e 90% e  $E$  de 64 e 18, respectivamente.

Wen e *col.* estudaram o efeito da temperatura na resolução da ( $\pm$ )- $\alpha$ -feniletilamina com acetato de etila catalisada pela lipase de *Yarrowia lipolytic* imobilizada (YILip2) em mistura de *n*-hexano e 3% de DMSO na faixa de 25 a 55°C. Abaixo de 45°C, a amida foi formada com conversões de 20 a 50% e  $ee_p$  de 78 a 90%. Em 45°C, a amida foi obtida com conversão de 50% e  $ee_p > 99\%$ . Em temperaturas mais elevadas a estabilidade da lipase diminuiu e com isso diminuiu o  $ee_p$  para 85 e 68%, a 50 e 55°C, respectivamente.<sup>14</sup>

A redução na conversão e seletividade pode estar relacionada a desnaturação da proteína, resultante da diminuição das forças iônicas e/ou ligações hidrogênio, que estabilizam a estrutura tridimensional das enzimas necessária para a manutenção do sitio ativo das mesmas.<sup>6,115</sup>

Portanto, a partir destes resultados a temperatura de 35°C foi selecionada para dar continuidade aos estudos, incluindo a avaliação do efeito da razão molar do doador acila, massa de lipase e o efeito do solvente orgânico puro e/ou em misturas de solventes orgânicos:LIs.

### 7.1.3 Influência da razão molar do doador acila

A afinidade entre o doador acila e a enzima é de grande importância para a formação do intermediário “acil-enzima”. Devido as suas características, os ésteres enólicos (acetatos de vinila, de *iso*-propenila, os butanoatos de 2-cloroetila, de 2,2,2-tricloroetila e o de vinila) são amplamente usados como agentes acilantes em reações de esterificação, transesterificação e em alguns casos de amidação, devido a alta reatividade, irreversibilidade e seletividade.

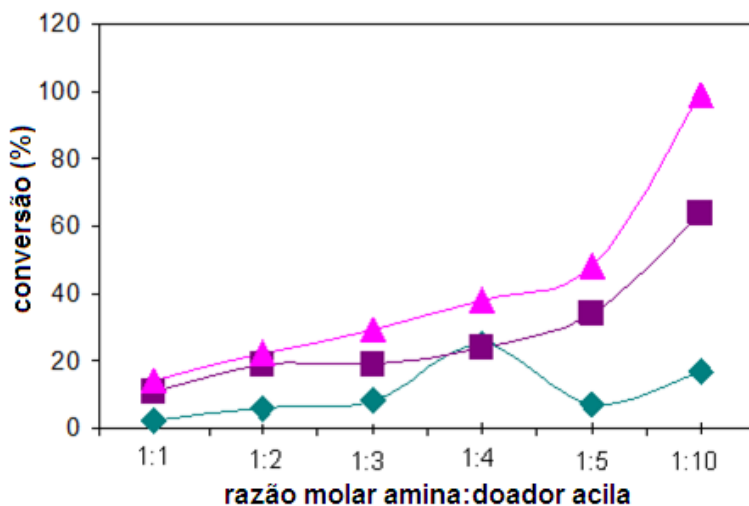
Normalmente, são empregados ésteres enólicos, pois o enol formado após a acilação do resíduo reativo da tríade catalítica é rapidamente transformado em seu tautômero, que é mais estável e volátil. Esta estratégia desloca o equilíbrio da reação na direção dos

produtos por impedir uma possível competição nucleofílica entre o álcool formado nesta etapa e o substrato.<sup>14,24,78,127-129</sup>

A razão molar entre amina e doador acila também é um parâmetro importante a ser investigado, pois espera-se que um aumento na concentração do doador acila desloque o equilíbrio para formação dos produtos.

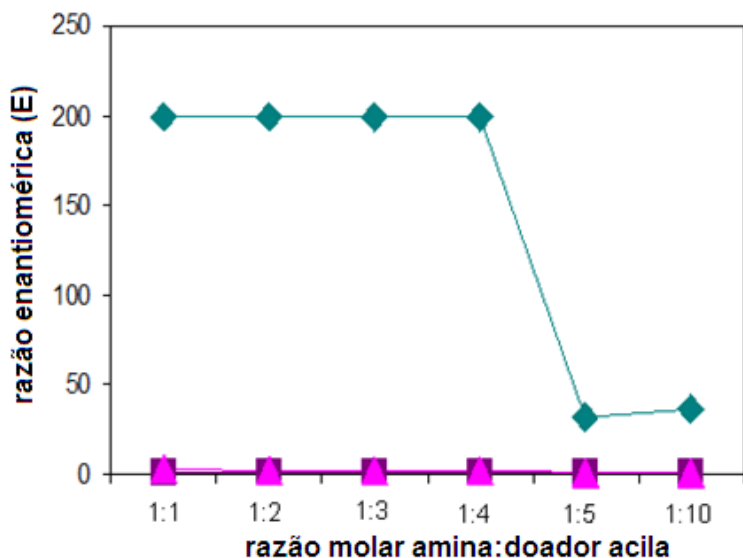
Na acilação da (*RS*)-feniletilamina (**4**) catalisada pela lipase de *C. antarctica* (CAL-B) foram utilizados três doadores acila diferentes, tais como o acetato de etila, de vinila e o de *iso*-propenila. Além disso, foi também avaliada a variação da razão molar entre (*RS*)-**4** e do doador acila nas proporções de 1:1 a 1:10.

As **Figuras 37** e **38** mostram a variação na conversão (%) e da razão enantiomérica (*E*) em função da razão molar dos diferentes doadores acila, respectivamente.



**Figura 37** - Variação na conversão em função da razão molar do doador acila na reação de acilação da (*RS*)-feniletilamina (**4**) (0,26mL; 2mmol) com diferentes doadores acila (2-20mmol) usando a CAL-B (100mg) em *n*-hexano (25mL), 48h, 35°C. [(◆) acetato de etila, (■) acetato de vinila e (▲) acetato de *iso*-propenila, 1h]





**Figura 38** - Variação na razão enantiomérica (E) em função da razão molar do doador acila na reação de acilação da (*RS*)-feniletilamina (**4**) (0,26mL; 2mmol) com diferentes doadores acila (2-20mmol) usando a CAL-B (100mg) em *n*-hexano (25mL) em 48h a 35°C. [(◆) acetato de etila, (■) acetato de vinila e (▲) acetato de *iso*-propenila, 1h].

Os resultados apresentados nas **Figuras 37 e 38** mostram que quando acetato de vinila foi usado como doador acila na acilação da (*RS*)-**4**, a amida racêmica (**5**) foi formada com conversões de 11 a 64%,  $ee_p$  de 2-20%, resultando em valores de E de 1 a 1,5, em 48h de reação.

As maiores conversões na formação da amida racêmica (**5**) foram obtidas quando o acetato de *iso*-propenila foi usado como doador acila, sendo de 14 a >99%, com  $ee_p$  de 6 a 47% e valores de E de 1,0 a 3,2, em 1h de reação.

As conversões obtidas quando os acetato de vinila e o de *iso*-propenila foram utilizados, aumentaram com a razão molar (**Figura 37**).

Além da formação da amida racêmica (**5**) foi observada a formação de outros produtos que não foi possível identificá-los por análise de CGQ (dados não apresentados).

Os melhores resultados foram obtidos quando o acetato de etila foi usado como doador acila na acilação da (*RS*)-**4**, e a amida (*R*)-**5a** foi formada com conversões de 2-25%,  $ee_p$  de 91 a >99% resultando em E de 32 a >200 em 48h de reação.

Os resultados apresentados na **Figura 37** mostram que a conversão ao produto aumentou com a razão molar até a proporção de 1:4.

Em proporções maiores (1:5 e 1:10), a amida (*R*)-**5a** foi formada com conversões menores, sendo de 7 e 17%, respectivamente. Nestas proporções observou-se também uma diminuição dos valores de E de >200 para 32 e 37, respectivamente (**Figuras 37 e 38**).

Esta diminuição nos valores de conversão e enantiosseletividade podem estar relacionados a formação de mais etanol no meio reacional, o que torna o meio muito polar, podendo contribuir assim para a redução da atividade catalítica das lipases.

Como discutido, os acetatos de vinila e o de *iso*-propenila foram bons doadores acila na acilação da (*RS*)-**4** formando a amida racêmica (**5**) com boas conversões. No entanto, foram obtidos valores baixos de E. A menor seletividade da reação com estes doadores acila pode estar relacionada com a formação dos subprodutos acetaldeído ou cetona, que são tóxicos para as enzimas.<sup>24,128</sup> Com o acetato de etila, a amida (*R*)-**5a** foi obtida com conversões moderadas (2-25%) e com bons valores de  $ee_p$  e de E, dependendo da razão molar do doador acila.

Os resultados obtidos com relação à razão molar dos doadores acila, estão de acordo com a reatividade de alguns ésteres enólicos, descritos na literatura.<sup>24,129</sup>

Gill e *col.* reportaram a acilação da (*RS*)-1-(3-bromofenil)etilamina com os acetatos de vinila, o de *iso*-propenila e o de etila. Os resultados obtidos com o acetato de vinila mostraram que o produto foi obtido com conversões de 12 a 34%, mas a reação não foi seletiva. Além disso, foi observada a formação de produtos laterais. Quando os acetatos de *iso*-propenila e o de etila foram utilizados, não foi observado a formação de sub-produtos. Com o acetato de *iso*-propenila a maior

conversão ao produto foi de 50% e  $ee_p > 99,8\%$ , e com o acetato de etila foi de 51% e  $ee_p 97\%$ .<sup>24</sup>

Nechab e *col.* estudaram a resolução do 2-amino-4-fenil-butano com diferentes ésteres etílicos catalisada pela lipase de *C. antarctica* (CAL-B) a 80°C. Primeiramente, o acetato de etila foi usado como doador acila e o produto foi obtido com conversões de 50% em 7h, mas o  $ee_p$  não foi superior a 91%. Quando o comprimento da cadeia alquílica aumentou (de butirato para palmitato de etila), foram obtidos melhores resultados. Os valores do  $ee_p$  foram de 95,5%, 97%, 98% e 99% quando os butirato, laurato, octanoato e o palmitato de etila foram usados como doadores acila, respectivamente.<sup>129</sup> Estes resultados mostraram que à medida que aumentou o comprimento da cadeia alquílica do éster etílico, a velocidade da reação e a enantiosseletividade aumentaram.<sup>129</sup> Estes dados podem estar relacionados com a afinidade entre o doador acila e a enzima que ocorre na primeira etapa da reação formando o “complexo acil-enzima”. Cadeias alquílicas pequenas podem inibir a atividade catalítica das lipases através da reação com o resíduo da serina no sítio ativo e, portanto ocasionar danos na camada de hidratação da estrutura protéica, resultando em uma diminuição parcial ou total da atividade catalítica.<sup>129</sup>

Neste trabalho, as conversões a respectiva amida-5 foram maiores ao utilizar os acetatos de vinila e o de *iso*-propenila. No entanto, provavelmente devido a formação dos subprodutos acetaldeído ou acetona, a seletividade foi muito baixa. O melhor resultado foi obtido com o acetato de etila na proporção molar de 1:4 (amina:doador acila), e portanto esta será usada no estudo do efeito do solvente orgânico puro e em misturas com os LIs.

#### 7.1.4 Efeito do solvente orgânico

O solvente orgânico e conteúdo de água influenciam fortemente na seletividade de uma enzima, pois estes parâmetros podem alterar a conformação nativa das mesmas e, portanto a atividade catalítica do biocatalisador.<sup>14,40, 130-133</sup>

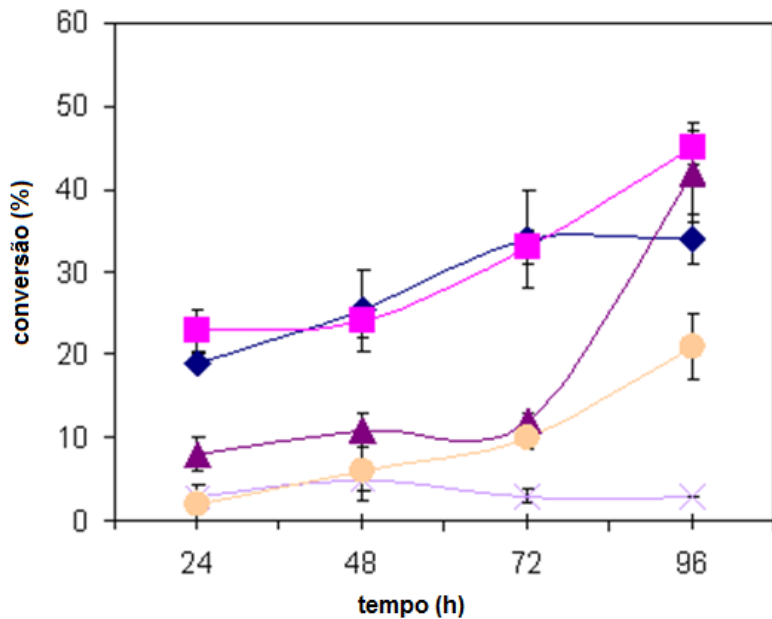
No entanto, ainda não há um consenso sobre os principais parâmetros que influenciam na reação enzimática, mas os mais freqüentemente usados são o  $\log P$  (coeficiente de partição que indica a

hidrofobicidade do solvente e é determinado pela razão entre a concentração do solvente na fase octanol sobre a concentração do solvente na fase aquosa) e a constante dielétrica ( $\epsilon$ ).<sup>14,130-131,134</sup>

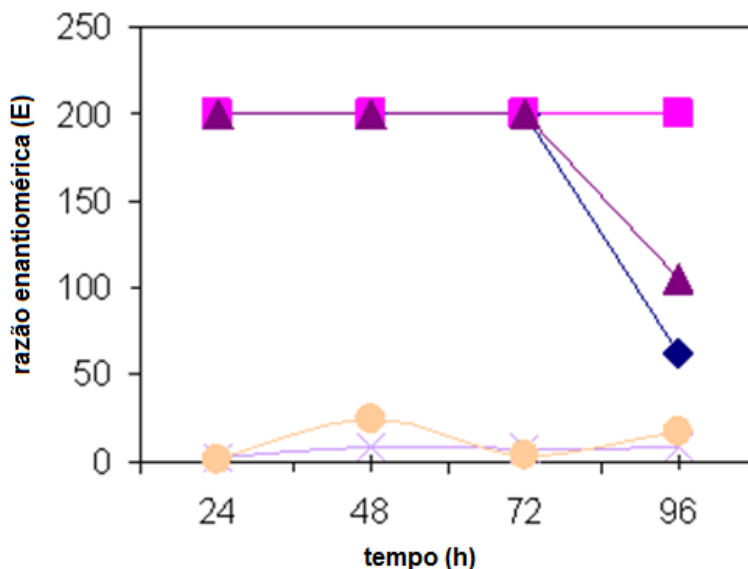
Os solventes hidrofóbicos com  $\log P \geq 4$  (*n*-heptano e octano) são considerados os mais adequados para as reações biocatalisadas. Solventes com  $\log P$  entre 2 e 4 (*n*-hexano e tolueno) são considerados moderados, e os polares com  $\log P < 2$  (clorofórmio e acetonitrila) são freqüentemente ineficientes para as reações catalisadas por enzimas. Embora os valores de  $\log P$  não correlacionem diretamente com a eficiência da síntese enzimática, esta é uma informação valiosa para a seleção de solventes.<sup>14,130-131</sup>

Para verificar estes efeitos, foi avaliado a influência do meio reacional na acilação da (*RS*)-feniletilamina (**4**) com acetato de etila usando a lipase de *C. antarctica* (CAL-B) em solventes de diferentes polaridades tais como o *n*-hexano, *n*-heptano, *terc*-butanol, clorofórmio e o diclorometano.

As **Figuras 39** e **40** mostram respectivamente a variação na conversão e razão enantiomérica em função do tempo para esta reação, na presença dos diversos solventes orgânicos.



**Figura 39** – Variação da conversão (%) em função do tempo e do solvente orgânico na reação de acilação de (*RS*)-**4** (0,26mL; 2mmol) com acetato de etila (0,78mL; 8mmol) usando CAL-B (100mg), 35°C. [(♦) *n*-hexano; (■) *n*-heptano; (▲) *terc*-butanol; (×) clorofórmio e (●) diclorometano, 25mL de cada]



**Figura 40** – Variação da razão enantiomérica (E) em função do tempo e do solvente orgânico na reação de acilação da (*RS*)-4 (0,26mL; 2mmol) com acetato de etila (0,78mL; 8mmol) usando CAL-B (100mg), 35°C. [(◆) *n*-hexano; (■) *n*-heptano; (▲) *tert*-butanol; (×) clorofórmio e (●) diclorometano, 25mL de cada]

Usando *n*-hexano ( $\log P$  3,90), a amida (*R*)-5a foi formada com conversões entre 19-34% em 24 - 96h de reação (**Figura 39**). Após 72h, o grau de conversão manteve-se constante em 34%, porém os valores de  $ee_p$  e de E diminuíram de >99% para 95% e de >200 para 62, respectivamente (**Figura 40**).

Usando *n*-heptano ( $\log P$  4,00) as conversões foram similares as obtidas com o *n*-hexano, sendo de 23-45%,  $ee_p$  de >99% e E > 200, entre 24 - 96h de reação (**Figuras 39 e 40**).

Com o solvente orgânico de polaridade moderada como o *tert*-butanol ( $\log P$  1,45), as conversões a amida (*R*)-5a foram de 8-42% em 24-96h (**Figura 39**). Os valores de  $ee_p$  e E foram de >99% e >200,

respectivamente em até 72h de reação. Após esse tempo, os valores de  $ee_p$  e de E diminuíram de >99% para 97% e de >200 para 106, respectivamente (**Figura 40**).

Os resultados obtidos usando *tert*-butanol mostraram que na presença desse solvente a solubilidade da amida (*R*)-**5a** foi melhor, favorecendo o equilíbrio no sentido da formação do produto que é polar. Resultados similares foram reportados por Li e *col.* com este solvente.<sup>135</sup>

LI e *col.* obtiveram bons resultados na metanólise para a produção de biodiesel. A reação foi catalisada pela combinação das lipases Lipozyme TL IM e Novozym 435 (CAL-B) em *tert*-butanol. A combinação dessas lipases mostrou alta atividade catalítica e estabilidade operacional. Além disso, na presença do *tert*-butanol a solubilidade da mistura reacional aumentou, e as lipases mantiveram a atividade catalítica.<sup>135</sup>

Os resultados obtidos neste estudo com *n*-hexano, *n*-heptano e *tert*-butanol estão de acordo com alguns dados da literatura e podem ser considerados adequados para propósitos práticos, pois foram obtidas boas conversões e alta enantiosseletividade.

Conforme citado, em geral, solventes orgânicos com  $\log P > 2,0$  são promissores para a biocatálise.<sup>6,131</sup> No entanto, esses dados não podem ser explicados somente com este parâmetro, sendo importante também considerar a solubilidade dos produtos em cada meio e a atividade lipolítica do biocatalisador nestes meios.

Inicialmente, determinou a atividade lipolítica da CAL-B, conforme descrita no item 4.2.1, pág. 45, sendo de 3,04  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ . Com o intuito de avaliar a estabilidade da CAL-B em solventes orgânicos, a mesma foi estocada em *n*-heptano, *n*-hexano e *tert*-butanol por 96h a temperatura de aproximadamente 10°C. Os resultados mostraram que a CAL-B manteve 97%, 92% e 78% da atividade, respectivamente em comparação a inicial. Estes dados mostraram que a CAL-B pode ser usada nestes solventes, sem perda significativa da atividade.

Wen e *col.* descreveram uma metodologia para melhorar a solubilidade da ( $\pm$ )-feniletilamina no meio reacional. Primeiramente, foi estudada a resolução desta amina com ácido acético catalisada pela lipase YILip<sub>2</sub> em hexano por 3 dias. A lipase YILip<sub>2</sub> mostrou atividade moderada e a amida foi formada com rendimentos de 20%, baixa

enantiosseletividade (E) e  $ee_p$ , sendo de 3,0 e 35%, respectivamente. Com intuito de melhorar a enantiosseletividade da reação, Wen e *col.* utilizaram uma mistura de *n*-hexano com sete solventes mais polares. Os resultados foram mais significativos com relação ao  $ee_p$ . Quando foi adicionado 2% de DMSO, o  $ee_p$  aumentou de 35% para 95% e os valores de E aumentaram 20 vezes em relação ao uso de *n*-hexano puro.<sup>14</sup>

Baseando-se nestes e em outros trabalhos da literatura, foi investigado o uso de solventes mais polares tais como o clorofórmio (log *P* 2,00) e o diclorometano (log *P* 1,18) na acilação da (RS)-4.

Quando estes solventes foram usados, as conversões e a razão enantiomérica foram menores em relação aos solventes orgânicos menos polares. Ao usar o clorofórmio as conversões a amida racêmica (5) foram de 3-5%, com  $ee_p$  e E de 14-70% e 2,5-8,2, respectivamente em 24-96h (**Figuras 39 e 40**).

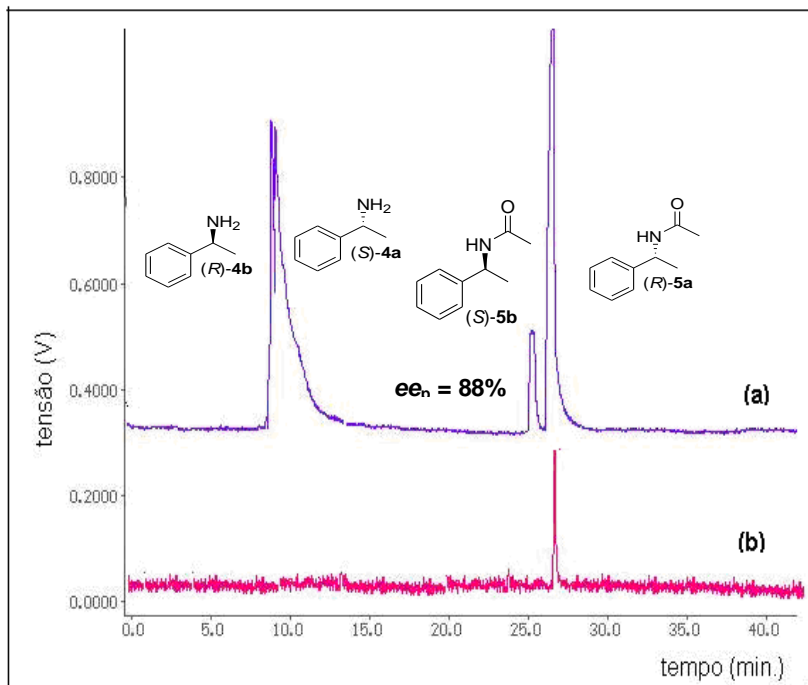
Usando o diclorometano, as conversões foram melhores em relação ao clorofórmio sendo de 2-21% com valores moderados de  $ee_p$  e de E entre 40-88% e 1,5-25, respectivamente em 24-96h de reação (**Figuras 39 e 40**).

As atividades lipolíticas da CAL-B foram também determinadas na presença destes solventes, conforme descrita no item 4.2.1, pág. 45. A atividade após estocagem em clorofórmio e diclorometano em 96h a temperatura de aproximadamente 10°C foram de 1,76 umol/min mg e 1,78 umol/min mg, respectivamente. Estes resultados mostraram que a atividade desta lipase diminuiu aproximadamente 40% após a estocagem nestes solventes em comparação a inicial (3.04umol/min mg). A menor atividade da CAL-B nestes solventes pode ser explicada devido a estes possivelmente retirarem a água essencial ao redor da enzima e assim alterar a atividade catalítica da mesma.<sup>6,133</sup>

Os dados apresentados aqui mostraram que em todos os solventes orgânicos usados, a estereopreferência foi pelo enantiômero-*R*. Esta determinação foi feita por comparação com padrões quirais. A literatura mostra que além da lipase de *C. antarctica*, a de *Pseudomonas* sp., *C. rugosa* e de *A.niger* também apresentam estereopreferência para o isômero-*R* tanto na resolução de alcoóis secundários, bem como para algumas aminas alquil-arflicas.<sup>24,36,74,136</sup>



Na **Figura 41**, observa-se o cromatograma de uma alíquota da reação de acilação da (*RS*)-**4** usando diclorometano como solvente em 48h, comparado com o padrão do composto enantiomericamente puro. O produto formado foi preferencialmente a amida (*R*)-**5a**, com  $ee_p$  de 88%.



**Figura 41** - Cromatograma de uma alíquota da reação de acilação da (*RS*)-feniletilamina (**4**) com acetato de etila usando diclorometano em 48h, por CGQ (a) e o padrão quiral da amida (*R*)-**5a** (b). Condições de análises: Inj. = 230°C, Det. = 230°C, programação: 60°C  $\frac{3^{\circ}\text{C}}{\text{min}}$  200°C, split 100:1, pressão do H<sub>2</sub> = 75Kpa.

Os resultados apresentados mostram a influência do meio orgânico em reações biocatalisadas. Porém, a conversão,  $ee_p$  e E podem ser melhorados com o uso de líquidos iônicos (LIs). Para avaliar o efeito

de LIs nestas reações foram selecionados o clorofórmio e o diclorometano que não foram muito eficientes na acilação da (*RS*)-4.

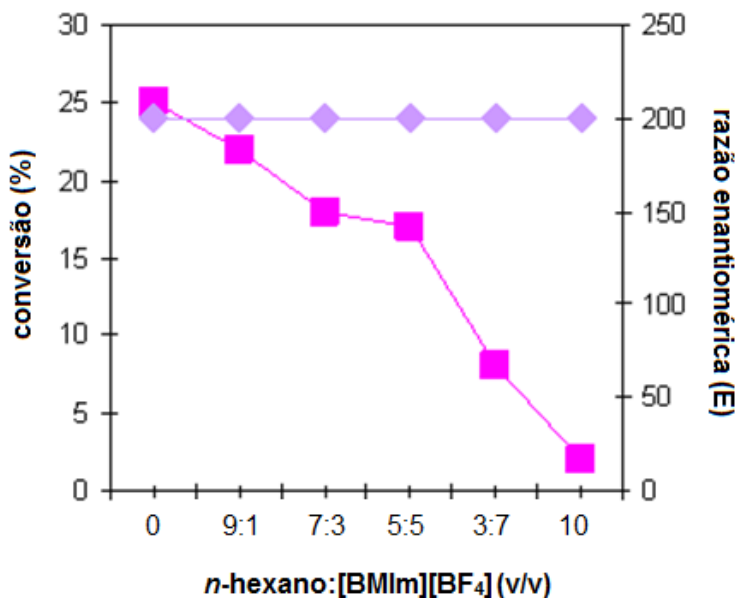
### 7.1.5 Efeito dos líquidos iônicos

As reações enzimáticas usando líquidos iônicos têm sido reportadas nos últimos anos e apresentam muitas vantagens em relação aos solventes orgânicos mais comuns. Dentre estas, destacam-se a alta atividade, boa enantioseletividade e alta velocidade reacional. Além disso, as enzimas apresentam alta estabilidade térmica e operacional.<sup>92,137,138</sup>

Está bem relatado que o efeito de vários LIs nas reações enzimáticas variam amplamente e de forma imprevisível. Muitas das propriedades dos LIs como hidrofobicidade, polaridade, viscosidade, miscibilidade com solventes orgânicos e habilidade de dissolver compostos orgânicos e inorgânicos depende da estrutura do cátion e principalmente do ânion nos líquidos iônicos.<sup>94,137-140</sup>

Para avaliar a influência de diversos LIs, foram usados o tetrafluorborato de 1-butil-3-metil imidazólio [BMIm][BF<sub>4</sub>], hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil imidazólio [BMIm][PF<sub>6</sub>], cloreto de 1-butil-3-metil imidazólio [BMIm][Cl], tiocianato de 1-butil-3-metil imidazólio [BMIm][SCN], tetrafluorborato de 1-butil-4-metil piridínio [BMPi][BF<sub>4</sub>] e o hexafluorofosfato de 1-butil-4-metil piridínio [BMPi][PF<sub>6</sub>] em misturas com *n*-hexano, diclorometano e clorofórmio na acilação da (*RS*)-4 com acetato de etila catalisada pela CAL-B. Os resultados foram comparados com os obtidos ao utilizar os solventes orgânicos na ausência de LIs.

Inicialmente, foi usado a mistura de *n*-hexano com [BMIm][BF<sub>4</sub>]. A influência desse meio foi estudada variando a quantidade do LI na proporção de 0-10 v/v em 48h de reação. Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 42**.



**Figura 42** - Variação na conversão (%) e razão enantiomérica (E) na presença de diferentes proporções de *n*-hexano:[BMIm][BF<sub>4</sub>] (0-10v/v) na acilação da (*RS*)-**4** (0,26mL; 2mmol) com acetato de etila (0,78mL; 8mmol) usando CAL-B (100mg), 35°C, 48h. [(■) conversão (%); (◆) razão enantiomérica (E)]

Como apresentado anteriormente, ao utilizar *n*-hexano puro a conversão a amida (*R*)-**5a** foi de 25%, com valores de  $ee_p$  e E de >99% e >200, respectivamente em 48h. Com a proporção do LI de 10%, a conversão foi similar ao *n*-hexano puro, sendo de 22% e manteve os valores de  $ee_p$  e de E.

Ao utilizar proporções deste LI de 30 e 50%, as conversões foram moderadas sendo de 18 e 17%, com valores de  $ee_p$  e E de >99% e >200, respectivamente.

Quando foi usada a proporção deste LI de 70% e puro, observou uma diminuição significativa na conversão, sendo de 8 e 2%,

respectivamente. No entanto os valores de  $ee_p$  e  $E$  não alteraram, sendo de  $>99\%$  e  $>200$ .

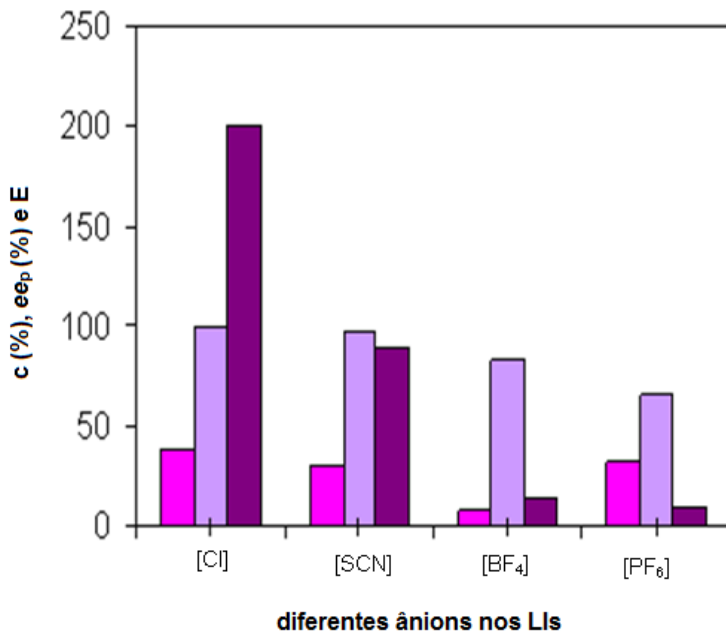
Resultados similares foram obtidos por Liu e *col.* na síntese regioseletiva de nucleosídeos catalisada pela CAL-B usando mistura de acetona:[BMIm][BF<sub>4</sub>] (9:1 v/v), sendo que o produto foi obtido com rendimento de 98,5%.<sup>140</sup>

Uma explicação possível para estes resultados é que em altas concentrações de LI a viscosidade do meio reacional é maior e com isso pode inativar a enzima, diminuindo a atividade e enantiosseletividade. A maior viscosidade do meio reacional pode limitar a difusão do substrato e/ou produtos contribuindo para a diminuição do rendimento da reação.<sup>140,141</sup>

Baseando-se nesses resultados, a mistura de solvente orgânico:LI (9:1 v/v) foi selecionada para avaliar o efeito dos ânions e cátions nos líquidos iônicos derivados do 1-butil-3-metilimidazólio e de 1-butil-4-metilpiridínio na acilação da (*RS*)-**4** com acetato de etila em diclorometano, clorofórmio ou em *n*-hexano.

Os LIs empregados nesse estudo são distintos em suas propriedades tais como hidrofobicidade, polaridade, nucleofilicidade do ânion, viscosidade e ligação de hidrogênio. Essas propriedades podem influenciar a conformação da lipase e conseqüentemente a reatividade.<sup>27,93,137</sup>

Primeiramente, avaliou-se o efeito dos ânions na conversão e enantiosseletividade usando o sistema bifásico diclorometano:[BMIm][X] na acilação da (*RS*)-**4**. Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 43**.



**Figura 43** – Variação da conversão (%),  $ee_p$  (%) e E na acilação da (*RS*)-**4** (0,26mL; 2mmol) com acetato de etila (0,78mL; 8mmol) na presença dos diferentes LIs usando CAL-B (100mg) em diclorometano:[BMIm][X] (9:1 v/v), 35°C, 48h. [(■) conversão (%); (■)  $ee_p$  (%) e (■) E]

Como observado na **Figura 43**, foram obtidos altos valores de  $ee_p$  e E com ânions fracamente caotrópicos tais como  $Cl^-$  e  $SCN^-$ , sendo >99% e 97% e E de >200 e 89, respectivamente, em 48h. A amida (*R*)-**5a** foi obtida com conversões de 38 e 30%, respectivamente.

Quando foram usados os ânions fortemente caotrópicos tais como  $BF_4^-$  e  $PF_6^-$ , as conversões a respectiva amida foram de 8 e 32%, com  $ee_p$  de 83 e 66% e valores de E de 14 e 9, em 48h, respectivamente.

Como apresentado, a enantiosseletividade na acilação da (*RS*)-**4** em misturas de diclorometano:[BMIm][Cl] e diclorometano:[BMIm][SCN] foi melhor que em diclorometano puro (**Figuras 39** e **40**). As conversões,  $ee_p$  e valores de E foram de 38 e 30%, >99 e 97% e >200 e 89, respectivamente, enquanto que com o

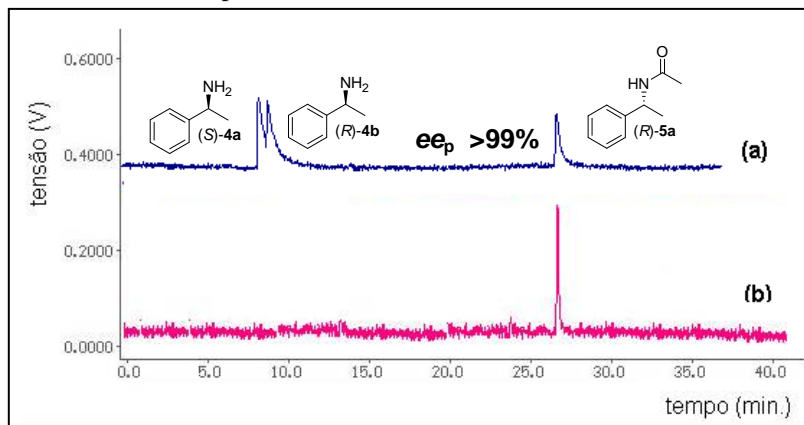
diclorometano puro a conversão foi de 6%,  $ee_p$  de 88% e E de 25, ambas em 48h.

Usando diclorometano:[BMIm][PF<sub>6</sub>] e diclorometano:[BMIm][BF<sub>4</sub>], os resultados foram similares aos obtidos em diclorometano puro. As conversões a respectiva amida (*R*)-**5a** foram de 8 e 32%, com  $ee_p$  de 83 e 66% e E de 14 e 9, respectivamente. Os dados de conversão,  $ee_p$  e E com o diclorometano puro já foram descritos anteriormente.

Usando diclorometano, a série para o efeito dos ânions diminuiu na ordem de Cl<sup>-</sup> > SCN<sup>-</sup> > BF<sub>4</sub><sup>-</sup> > PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, sendo que estes tem coeficientes-β de -0,005, -0,027, -0,093 e -0,21, respectivamente.

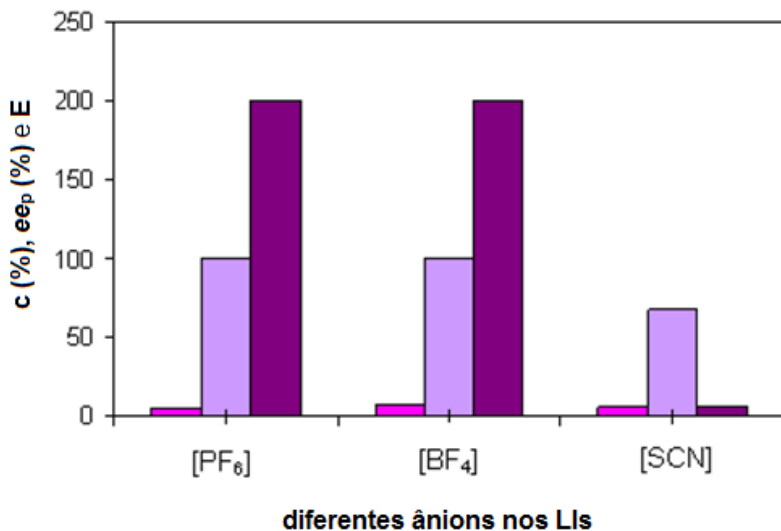
Ao utilizar a mistura diclorometano:[BMIm][X] a estereopreferência foi também para a formação da amida (*R*)-**5a** por comparação com os padrões quirais.

Na **Figura 44**, observa-se um cromatograma de uma alíquota da reação de acilação da (*RS*)-**4** com a mistura de diclorometano:[BMIm][Cl] em 48h e o do padrão do composto enantiomericamente puro.



**Figura 44** -Cromatograma de uma alíquota da reação de acilação da (*RS*)-feniletilamina (**4**) com acetato de etila usando diclorometano:[BMIm][Cl] (9:1v/v) em 48h, por CGQ (**a**), padrão quiral da amida (*R*)-**5a** (**b**). Condições de análises: Inj. = 250°C, Det. = 275°C, programação: 60°C 3°C/min 200°C, split 100:1, pressão do H<sub>2</sub> = 75Kpa.

Em outro estudo, avaliou-se o uso do sistema bifásico formado por clorofórmio:[BMIm][X] (9:1v/v) na acilação da (*RS*)-4, em 48h. Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 45**.



**Figura 45** – Variação da conversão (%),  $ee_p$  (%) e E na acilação da (*RS*)-4 (0,26mL; 2mmol) com acetato de etila (0,78mL; 8mmol) na presença dos diferentes LIs usando CAL-B (100mg) em clorofórmio:[BMIm][X] (9:1v/v), 35°, 48h. [(■) conversão (%); (■)  $ee_p$  (%) e (■) E].

Como observado na **Figura 45**, foram obtidos valores baixos de  $ee_p$  e de E com os ânions fracamente caotrópicos tais como o Cl<sup>-</sup> e o SCN<sup>-</sup>. Quando [BMIm][Cl] foi usado não foi observada a formação da amida em até 48h (dados não apresentados na **Figura 45**). Ao utilizar [BMIm][SCN], a amida foi formada com conversão de apenas 6%,  $ee_p$  68% e E de 6.

Quando foram usados os líquidos iônicos contendo os ânions fortemente caotrópicos, como BF<sub>4</sub><sup>-</sup> e PF<sub>6</sub><sup>-</sup> a conversão a respectiva amida (*R*)-5a foi de 7 e 5%,  $ee_p$  e E de >99% e >200, respectivamente.

Usando a mistura clorofórmio:[BMIm][X], observou-se um aumento na enantiosseletividade da reação quando comparado com o uso do clorofórmio puro. No entanto, as conversões foram similares as obtidas com o solvente puro. Usando esta mistura de solventes, o efeito dos ânions diminuiu na ordem de  $\text{PF}_6^- > \text{BF}_4^- > \text{SCN}^- > \text{Cl}^-$ .

Em geral, usando os sistemas bifásicos formados por diclorometano:[BMIm][X] ou clorofórmio:[BMIm][X], as conversões a respectiva amida foram similares em relação ao uso do solvente orgânico puro, mas os valores de E foram maiores.

Esses resultados mostraram que a estrutura de diferentes ânions é importante na atividade e enantiosseletividade da enzima, e conseqüentemente no processo biocatalítico.

Porém, este efeito não foi o mesmo quando foram usadas misturas de diclorometano: [BMIm][X] ou clorofórmio:[BMIm][X].

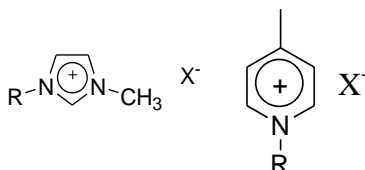
Em outro estudo, avaliou o efeito do cátion na conversão e enantiosseletividade na acilação da (*RS*)-**4** com acetato de etila usando misturas de *n*-hexano:[BMIm][BF<sub>4</sub>]; *n*-hexano:[BMIm][PF<sub>6</sub>]; *n*-hexano:[BMPi][BF<sub>4</sub>] e *n*-hexano:[BMPi][PF<sub>6</sub>]. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 3**.

**Tabela 3** - Efeito dos cátions nos LIs na acilação da (*RS*)-feniletilamina (**4**) com acetato de etila usando a CAL-B.

entradas	misturas de solventes	c (%)	<i>ee</i> <sub>p</sub> (%) <sup>a</sup>	E <sup>b</sup>
1	<i>n</i> -hexano:[BMIm][BF <sub>4</sub> ]	22	> 99	> 200
2	<i>n</i> -hexano:[BMPi][BF <sub>4</sub> ]	38	90	24
3	<i>n</i> -hexano:[BMIm][PF <sub>6</sub> ]	45	>99	>200
4	<i>n</i> -hexano:[BMPi][PF <sub>6</sub> ]	49	>99	>200

R – *n*-Butil

X – BF<sub>4</sub><sup>-</sup> e PF<sub>6</sub><sup>-</sup>



**Condições reacionais:** (*RS*)-feniletilamina (**4**) (0,26mL; 2mmol), acetato de etila (0,78mL; 8mmol), *n*-hexano:LIs (9:1v/v), CAL-B (100mg), 35°C, 48h.

<sup>a</sup> excesso enantiomérico da amida **5a**

<sup>b</sup> razão enantiomérica



Como observado na **Tabela 3**, quando foram usadas as misturas *n*-hexano:LIs contendo os cátions [BMIm] e [BMPi] ligados ao ânion [BF<sub>4</sub>] as conversões a amida (*R*)-**5a** foram de 22 e 38%, com valores de *ee*<sub>p</sub> de >99% e 90% e E de >200 e 24 em 48h, respectivamente (entradas 1 e 2).

Os melhores resultados foram obtidos utilizando as misturas *n*-hexano:[BMIm][PF<sub>6</sub>] e/ou *n*-hexano:[BMPi][PF<sub>6</sub>], sendo que a amida (*R*)-**5a** foi obtida com conversões de 45 e 49% e com *ee*<sub>p</sub> e E de >99% e >200, em 48h, respectivamente (entradas 3 e 4).

Os resultados apresentados mostraram que ao utilizar os LIs contendo o cátion piridinium, a amida foi obtida com maiores conversões em relação ao uso do LI contendo o cátion imidazolium. No entanto, foi observada uma menor seletividade ao utilizar o ânion [BF<sub>4</sub>]. Com o uso do ânion [PF<sub>6</sub>] os valores de *ee*<sub>p</sub> e E mantiveram-se constantes ao utilizar ambos os cátions.

Usando estas misturas de solventes, o efeito do cátion foi na seguinte ordem [BMPi]PF<sub>6</sub>] >[BMIm][PF<sub>6</sub>] > [BMIm] [BF<sub>4</sub>] > [BMPi][BF<sub>4</sub>].

Os resultados apresentados e discutidos mostraram que os efeitos dos ânions nos LIs é mais pronunciado que o dos cátions na acilação da (*RS*)-**4**.

Estudos mais recentes mostraram que as enzimas podem manter a atividade e estabilidade em certos líquidos iônicos. No entanto, nem todos os LIs são adequados para manter a atividade da enzima em reações biocatalíticas. Desta forma, não há uma resposta simples se uma enzima será ativa ou não em certos líquidos iônicos porque a atividade depende também da relação “enzima-meio-substrato”<sup>14,101</sup>.

Irimescu e *col.* estudaram a acilação enantiosseletiva da 1-feniletilamina e da 2-fenil-1-propilamina com o ácido 4-pentenóico usando a CAL-B em diferentes líquidos iônicos. Entre estes, foram usados os [BMIm][BF<sub>4</sub>], [BMIm][PF<sub>6</sub>] e o trifluormetanosulfonato de 1-butil-2,3-dimetilimidazólio [BDMIm][TFMS]. Os resultados mostraram que para a acilação da 2-fenil-1-propilamina os valores de E não foram superiores a 3,6 com todos os LIs testados. Na acilação da 1-feniletilamina, as conversões a respectiva amida usando [BMIm][BF<sub>4</sub>], [BMIm][PF<sub>6</sub>] e [BDMIm][TFMS] foram de 15,9 e 21% com *ee*<sub>p</sub> >99 e E >500, respectivamente em 24h.<sup>106</sup>

Habulin e *col.* reportaram a resolução do (*RS*)-1-feniletanol com acetato de vinila usando a CAL-B. A enantiosseletividade desta lipase foi estudada em vários líquidos iônicos tais como [BMIm][PF<sub>6</sub>], [BMIm][BF<sub>4</sub>] e triflimida de 1-etil-3-metilimidazólio [EMIm][NTf<sub>2</sub>]. Com os três LIs testados, foi observada uma excelente enantiosseletividade. O melhor resultado obtido na resolução do (*RS*)-1-feniletanol foi com [BMIm][PF<sub>6</sub>], sendo que o (*R*)-éster foi obtido com conversão de 50%, *ee<sub>p</sub>* >99%, em 3h de reação.<sup>142</sup>

Zhao e *col.* descreveram a hidrólise do éster metílico da fenilalanina catalisada pela protease de *Bacillus licheniformis* em vários LIs hidrofílicos. A enantiosseletividade da protease foi relacionada à kosmotropicidade de cátions e ânions individuais. A efetividade dos ânions aumentou a enantiosseletividade seguindo a série Hofmeister, sendo que os ânions kosmotrópicos e cátions caotrópicos estabilizaram a enzima. Neste estudo, a série Hofmeister dos LIs diminuiu na ordem de PO<sub>4</sub><sup>-</sup> > citrato<sup>3-</sup>, CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, EtSO<sub>4</sub><sup>-</sup> > CF<sub>3</sub>COO<sup>-</sup> > Br<sup>-</sup> > OTs<sup>-</sup>, BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, e para os cátions 1-etil-3-metilimidazólio [EMIm] > 1-butil-3-metilimidazólio [BMIm] > 1-hexil-3-metilimidazólio [HMIm]. A kosmotropicidade dos LIs foi também quantificada pelo valor  $\delta$  (coeficiente- $\beta$  de ânions e cátions). A alta enantiosseletividade da enzima foi observada em uma solução dos LIs com altos valores de  $\delta$ .<sup>101</sup>

Observa-se, portanto que os líquidos iônicos têm mostrado grande potencial como solvente na biocatálise, quando comparados com os solventes orgânicos convencionais. Em alguns casos a enzima em líquidos iônicos tem apresentado aumento na atividade, estabilidade e seletividade. A alta polaridade destes LIs permite que estes sejam usados como meio reacional na biotransformação de vários substratos, principalmente aqueles altamente polares e que apresentam dificuldade de solubilizar em solventes orgânicos tradicionais. Outro aspecto importante dos líquidos iônicos é que suas propriedades podem ser alteradas selecionando uma combinação apropriada de cátions e ânions, e assim usar o mais adequado para cada reação.<sup>100,101</sup>

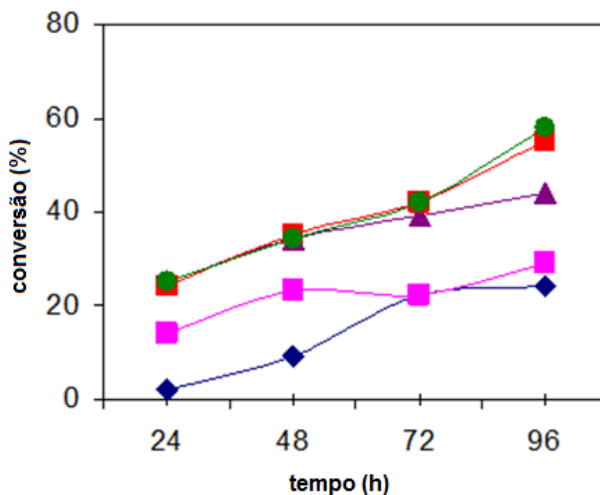
Nos últimos anos vem sendo relatado na literatura que ânions kosmotrópicos estabilizam as enzimas, e que os ânions caotrópico desestabilizam-as. No entanto para os cátions o efeito é oposto, ou seja, cátions caotrópicos (pequenos) estabilizam as enzimas, enquanto os kosmotrópicos (grandes) desestabilizam-as.<sup>143</sup>

Contudo estes resultados mostraram que os LIs testados apresentaram bom potencial para serem usados como solvente na acilação da (*RS*)-feniletilamina (**4**) com acetato de etila com a vantagem de aumentar a enantiosseletividade e em alguns casos a conversão.

Com o intuito de minimizar o custo do processo biocatalítico, em outro estudo avaliou-se a massa de CAL-B na acilação da (*RS*)-**4**.

### 7.1.6 Efeito da variação da massa de CAL-B

Devido ao alto custo dos biocatalisadores no mercado, a influência da massa de CAL-B foi avaliada na acilação da (*RS*)-**4** com acetato de etila usando *n*-hexano. As quantidades usadas foram de 10-100mg em 24-96h de reação. Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 46**.



**Figura 46** – Variação da conversão (%) em função da massa da CAL-B e do tempo na reação de acilação da (*RS*)-**4** (0,26mL; 2mmol) com acetato de etila (0,78mL; 8mmol) em *n*-hexano (25mL), 35°C. [(♦)10mg, (■) 25mg, (▲) 50mg, (■) 75mg e (●)100mg]

Ao usar 10 e 25mg da CAL-B, a amida (*R*)-**5a** foi formada com conversões de 2-24% e 14-29%,  $ee_p$  de 68 - >99% e 10 - >99% e E de 6 - >200 e 1,4 - >200, respectivamente em 24-96h. As conversões aumentaram com o tempo de reação, no entanto, em 96h a seletividade da reação diminuiu de > 200 para 6 e 1,4, respectivamente.

Foram obtidos melhores resultados ao utilizar 50, 75 e 100mg de CAL-B. A amida (*R*)-**5a** foi obtida com conversões de 25-44%, 24-55% e 25-58%, respectivamente, em 24-96h, os valores de  $ee_p$  foram >99% e E >200, até 72h, após este tempo os valores de  $ee_p$  diminuíram para 86, 80 e 94% e os de E para 29, 18 e 36, respectivamente.

Estes resultados indicam que a massa de CAL-B de 50mg é suficiente para ser utilizada na acilação da (*RS*)-**4**. Portanto, essa quantidade será usada nos próximos estudos.

Os resultados apresentados e discutidos nos itens 7.1.1-7.1.5 mostraram a influência da procedência das lipases, temperatura, razão molar amina:agente acilante e do meio reacional na acilação da (*RS*)-**4**.

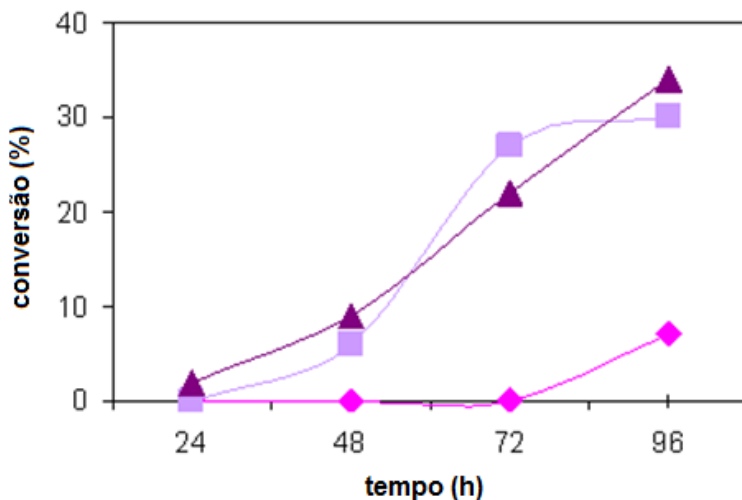
A exploração da biodiversidade na busca de novos catalisadores por técnicas de seleção de microrganismos, de plantas ou células animais representam os métodos tradicionais de descoberta de novas enzimas para o desenvolvimento da biocatálise. Microrganismos isolados de território brasileiro têm demonstrado excelente potencial como biocatalisadores frente a diferentes substratos orgânicos de interesse.<sup>1</sup> Portanto, nos próximos estudos serão avaliadas as propriedades enantiosseletivas de uma lipase microbiana, produzida por um fungo isolado e purificado de solo brasileiro.

## **7.2 Resolução da (*RS*)-feniletilamina (4) catalisada pela lipase nativa de *Aspergillus niger***

Como apresentado no item 7.1.1, p. 62-65 a lipase de *A.niger*, extraída de um microorganismo de solo da região de Monte Sião - MG<sup>1</sup> apresentou bom potencial para ser utilizada na acilação da (*RS*)-**4**. Portanto nesta reação foram avaliados o efeito dos doadores acila, temperatura e misturas de solvente orgânico:LLs.

### 7.2.1 Efeito da temperatura

Inicialmente, avaliou-se a influência de diferentes temperaturas entre 25-45°C na acilação da (*RS*)-**4** com acetato de etila em *n*-heptano. Os resultados obtidos mostraram que a conversão foi dependente do tempo e temperatura (**Figura 47**).



**Figura 47** – Variação da conversão (%) em função do tempo (h) e temperatura (°C) na acilação da (*RS*)-**4** (0,26mL; 2mmol) com acetato de etila (0,78mL; 8mmol) usando a lipase nativa de *A.niger* (50mg) em *n*-heptano (25 mL)[(♦) 25°C; (■) 35°C e (▲) 45°C].

Na temperatura de 25°C, a amida (*R*)-**5a** foi obtida com conversão de 7%,  $ee_p$  e E de > 99% e >200, respectivamente em 96h.

Os melhores resultados foram obtidos nas temperaturas de 35 e 45°C, sendo que a amida (*R*)-**5a** foi obtida com conversões de 30 e 34%,  $ee_p$  > 99% e valores de E > 200, respectivamente em 96h.

Esses resultados estão de acordo com os dados reportados na literatura por Carvalho e *col.* Recentemente, foi reportado que as lipases

produzidas foram isoladas dos solos brasileiros como as de *A.niger*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium solitum* são estáveis e mantiveram 100% de sua atividade nas temperaturas de 35-45°C na resolução do (RS)-Ibuprofeno com 1-propanol.<sup>1,2</sup>

Considerando os resultados obtidos, a temperatura de 35°C foi selecionada para dar continuidade aos estudos, onde foi avaliado o efeito do doador acila e do líquido iônico na acilação da (RS)-4.

### 7.2.2 Efeito do doador acila

Na acilação da (RS)-feniletilamina (4) catalisada pela lipase de *A.niger* em *n*-heptano foram utilizados três diferentes doadores acila, tais como os acetatos de etila, de vinila e o de *iso*-propenila. Os resultados estão apresentados na **Tabela 4**.

**Tabela 4** - Efeito do doador acila na acilação da (RS)-feniletilamina (4) catalisada pela lipase nativa de *A.niger*.

entradas	doador acila	tempo (h)	c (%)	ee <sub>p</sub> <sup>a</sup> (%)	E <sup>b</sup>
1	acetato de <i>iso</i> -propenila	0.30	74	6	1.2
2	acetato de vinila	0.30	58	22	2
3	acetato de etila	48	6	>99	>200
4	acetato de etila	72	27	>99	>200
5	acetato de etila	96	30	>99	>200

**Condições reacionais:** (RS)-feniletilamina (4) (0,26mL; 2mmol); doador acila (8mmol); lipase de *A.niger* (50mg); *n*-heptano (25mL), 35°C.

<sup>a</sup> excesso enantiomérico da amida 5a

<sup>b</sup> razão enantiomérica

Os resultados apresentados na **Tabela 4** mostraram que quando os acetatos de *iso*-propenila e o de vinila foram usados na acilação da (*RS*)-**4**, a amida racêmica (**5**) foi obtida com conversões de 74% e 58%,  $ee_p$  de 6 e 22%, resultando em valores de E de 1,2 e 2, respectivamente em 30min de reação (entradas 1 e 2).

Quando o acetato de etila foi usado como doador acila, foram obtidos melhores resultados e a amida (*R*)-**5a** foi formada com conversões entre 6-30%,  $ee_p$  e E de >99% e >200, respectivamente, em 48-96h (entradas 3-5).

Conforme foi observado, os acetatos de vinila e o de *iso*-propenila foram bons doadores acila na acilação da (*RS*)-**4**, formando a amida racêmica **5** com altas conversões. No entanto, a seletividade não foi boa e foram obtidos baixos valores de E. Com o acetato de etila a amida (*R*)-**5a** foi obtida com conversões moderadas (6-30%) e bons valores de  $ee_p$  e E, sendo de >99% e >200, respectivamente.

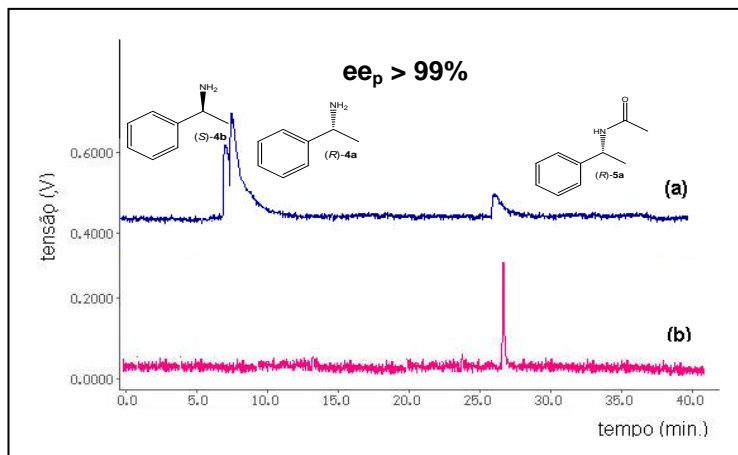
Resultados similares foram obtidos quando a CAL-B foi usada na acilação da (*RS*)-**4**, quando o acetato de etila foi usado como doador acila, conforme descrito no item 7.1.3, pág. 66-70.

A lipase de *A.niger* foi mais ativa na acilação da (*RS*)-**4** em comparação ao uso desta na resolução do (*RS*)-Ibuprofeno. Contesini e *col.* estudaram a resolução do (*RS*)-ibuprofeno com 1-propanol usando a lipase de *A.niger* em *iso*-octano. O produto foi formado com conversão de 8% e E de 2,1 em 48h de reação.<sup>74</sup>

Os resultados apresentados e discutidos neste estudo mostraram que a estrutura do doador acila e a do substrato podem influenciar tanto na conversão bem como na seletividade de um processo biocatalítico.

Com a lipase de *A.niger* a estereopreferência foi também pelo enantiômero-*R*, e foi determinada por comparação com o padrão quiral.

Na **Figura 48**, observa-se a formação do produto e separação dos reagentes de uma alíquota da reação de acilação da (*RS*)-**4** com acetato de etila usando a lipase de *A.niger* em 120h, comparado com o padrão do composto enantiomericamente puro, comprovando que o produto formado foi preferencialmente a amida (*R*)-**5a**.



**Figura 48** - Cromatograma, de uma alíquota da reação de acilação da (*RS*)-**4** com acetato de etila catalisada pela lipase de *A.niger*, *n*-heptano, 120h, por CGQ (a), padrão quiral da amida (*R*)-**5a** (b). Condições de análises: Inj. = 250°C, Det. = 275°C, programação: 60°C 3°C/min 200°C, split 100:1, pressão do H<sub>2</sub> = 75Kpa.

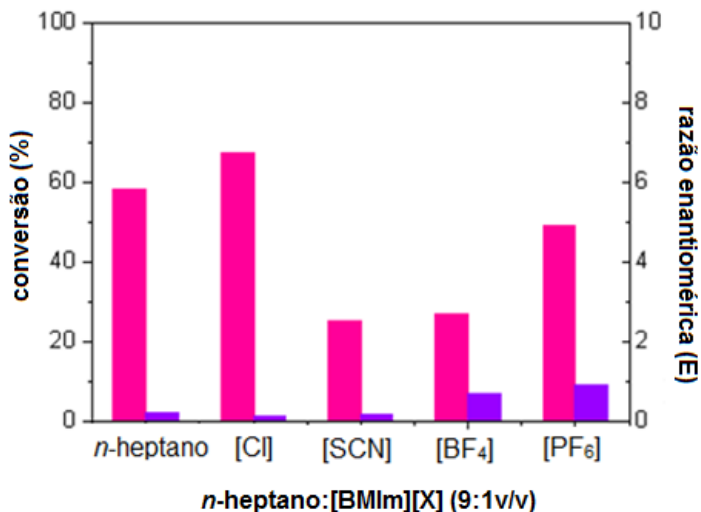
Para melhorar a seletividade na acilação da (*RS*)-**4** com o acetato de vinila, foram utilizadas misturas de *n*-heptano:[BMIm][X] como meio reacional.

### 7.2.3 Efeito dos líquidos iônicos

Como apresentado e discutido no item 7.1.5, os líquidos iônicos são amplamente usados em química orgânica e oferecem grandes vantagens em relação aos solventes orgânicos clássicos. Os quatro líquidos iônicos usados apresentam propriedades distintas como hidrofobicidade, polaridade e nucleofilidade dos ânions, e estas influenciam na conformação das lipases e na reatividade.<sup>102,137,138</sup>

Para avaliar a influência de diversos LIs, foram usados o [BMIm][BF<sub>4</sub>], [BMIm][PF<sub>6</sub>], [BMIm][SCN] e [BMIm][Cl] em misturas com *n*-heptano na acilação da (*RS*)-**4** com acetato de vinila. Os resultados foram comparados com os obtidos na ausência dos LIs, e estão mostrados na **Figura 49**.





**Figura 49** – Variação da conversão (%) e razão enantiomérica (E) na acilação da (*RS*)-**4** (0,26 mL; 2mmol) com acetato de vinila (0,74mL; 8mmol) na presença dos diferentes LIs usando a lipase de *A.niger* (50mg) em *n*-heptano:[BMIm][X] (9:1v/v), 35°C, 30min [(■) conversão (%); (■) razão enantiomérica]

Os resultados apresentados na **Figura 49** mostraram que com os ânions fracamente caotrópicos tais como, Cl<sup>-</sup> e SCN<sup>-</sup>, a amida racêmica (**5**) foi formada com conversões de 67 e 25%,  $ee_p$  de 3 e 13%, resultando em valores de E de 1 e 1,5, respectivamente em 30min de reação.

Quando os ânions fortemente caotrópicos foram usados tais como os BF<sub>4</sub><sup>-</sup> e PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, as conversões a respectiva amida foram de 27 e 49%, com  $ee_p$  de 62 e 73% e E de 7 e 9, respectivamente em 30min.

Nesse estudo, a enantiosseletividade na acilação da (*RS*)-**4** em misturas de *n*-heptano:[BMIm][BF<sub>4</sub>] e *n*-heptano:[BMIm][PF<sub>6</sub>] foi melhor que em *n*-heptano puro. As conversões,  $ee_p$  e E foram de 27 e 49%, 62 e 73% e 7 e 9, respectivamente. Com o *n*-heptano puro a conversão foi de 58%,  $ee_p$  de 22% e E de 2, ambas, em 30min (**Figura 49**).

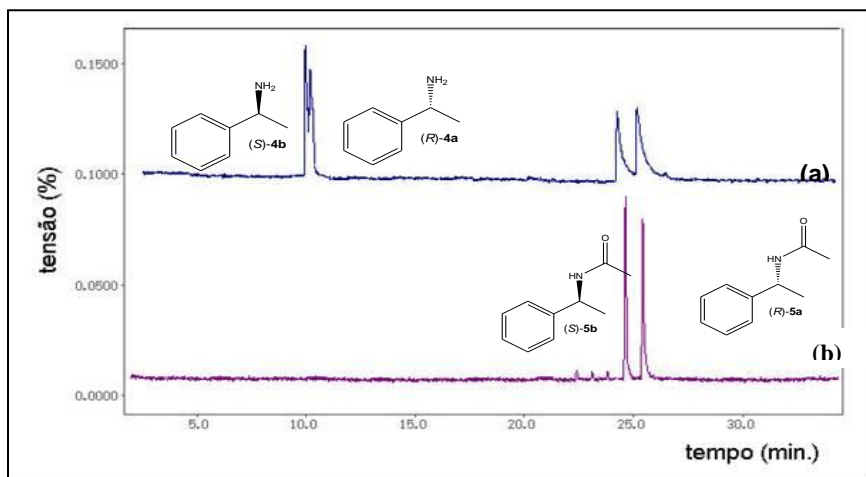
Usando *n*-heptano:[BMIm][SCN] e *n*-heptano:[BMIm][Cl] os resultados foram similares aos obtidos em *n*-heptano puro. As

conversões a amida (**5**) foram de 25 e 67%,  $ee_p$  de 13 e 3% e E de 1,5 e 1, respectivamente. Os dados de conversão,  $ee_p$  e E com o *n*-heptano puro já foram apresentados anteriormente.

Usando *n*-heptano como solvente orgânico, a série para o efeito dos ânions diminuiu na ordem de  $PF_6^- > BF_4^- > SCN^- > Cl^-$ , sendo que estes tem coeficientes- $\beta$  de -0,21, -0,093, -0,027 e -0,005, respectivamente. O efeito do ânion nesta reação foi contrária a serie Hofmeister, já que se esperava que o ânion  $[Cl^-]$  apresentasse um melhor resultado, tanto na conversão quanto na seletividade.

Estes resultados foram similares aos obtidos com a CAL-B na acilação da (*RS*)-**4** com acetato de etila em misturas de clorofórmio:[BMIm][X], que foram apresentados e discutidos, no item 7.1.5.

Na **Figura 50**, observa-se um cromatograma de uma alíquota da reação de acilação da (*RS*)-**4** usando mistura de *n*-heptano:[BMIm][PF<sub>6</sub>] em 30min, e do padrão racêmico do composto (**5**).



**Figura 50** - Cromatograma de uma alíquota da reação de acilação da (*RS*)-**4** com acetato de vinila usando *n*-heptano:[BMIm][PF<sub>6</sub>] (9:1 v/v), em 30min, por CGQ (a), padrão racêmico da amida (**5**) (b). Condições de análises: Inj. = 250°C, Det. = 275°C, programação: 60°C 3°C/min 200°C, split 100:1, pressão do H<sub>2</sub> = 75Kpa.

Resultados similares foram obtidos por Contesini e *col.* que estudaram a razão entre *iso*-octano:[BMIm][PF<sub>6</sub>] (0-100% v/v) na resolução do (*RS*)-Ibuprofeno catalisada por lipases nativas. Os dados mostraram que a resolução do (*RS*)-Ibuprofeno foi mais eficiente em mistura *iso*-octano:[BMIm][PF<sub>6</sub>] que em solvente orgânico puro, e foram dependes do conteúdo de LI. Ao utilizar a lipase de *A. niger*, o éster foi formado com conversão de 12% e E de 4,6, e com a lipase de *C. rugosa* obteve-se o produto com 48% de conversão e E de 8,5, ambos com a mistura *iso*-octano:[BMIm][PF<sub>6</sub>] (50:50% v/v).<sup>74</sup>

Os resultados apresentados e discutidos nestes estudos mostraram que os líquidos iônicos têm apresentado grande potencial como meio reacional na biocatálise, quando comparado com os solventes orgânicos convencionais.

Conforme discutido anteriormente, usando a CAL-B na acilação da (*RS*)-**4** com acetato de etila, em misturas diclorometano:[BMIm][X] e clorofórmio:[BMIm][X], os valores de E foram maiores que nos solventes orgânicos puros.

Da mesma forma, quando a lipase nativa de *A. niger* foi usada na acilação da (*RS*)-**4** com acetato de vinila em mistura de *n*-heptano:[BMIm][X], os valores de E também foram maiores em relação ao uso de *n*-heptano na ausência dos LIs.

Estes dados mostraram que líquidos iônicos podem ser usados como solvente na acilação da (*RS*)-feniletilamina (**4**) com os acetatos de etila ou de vinila, catalisada pela lipase comercial de *C. antarctica* ou a nativa de *A. niger* com a vantagem de aumentar a enantiosseletividade, e em alguns casos a conversão ao produto (amida).

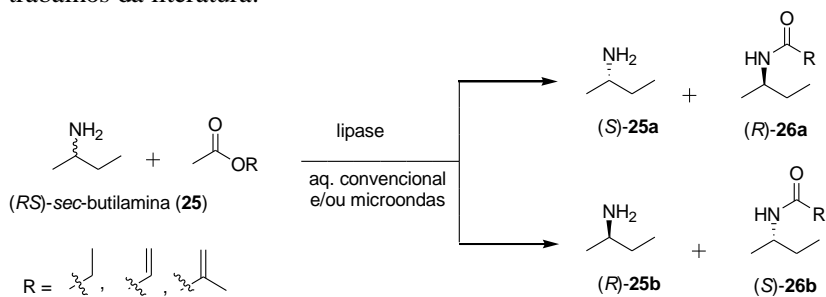
Postula-se, portanto, que o uso de líquidos iônicos está abrindo um novo campo na biocatálise assim como ocorreu com os solventes orgânicos na década de 80.

Atualmente, além do uso dos líquidos iônicos a irradiação por microondas vem sendo utilizada na busca de processos sintéticos mais limpos e eficientes. Essa metodologia pode aumentar a velocidade, rendimento, reprodutibilidade e a seletividade de uma reação comparada com a utilização por aquecimento convencional. Em virtude dessas vantagens, esse processo será explorado no próximo item na acilação da (*RS*)-*sec*-butilamina (**25**).

### 7.3 Resolução da (*RS*)-*sec*-butilamina (**25**)

A acilação enzimática da (*RS*)-*sec*-butilamina (**25**) com diferentes doadores acila, tais como os acetatos de etila, de vinila, de metila e o de *iso*-propenila foi estudada em diversos solventes orgânicos com polaridades distintas usando diferentes lipases livres ou imobilizadas em filmes de amido de cará, inhame ou de gelatina, em aquecimento convencional ou por irradiação de microondas, em várias condições experimentais (**Figura 51**).

Os resultados serão discutidos e comparados com outros trabalhos da literatura.



**lipases** = *C. antarctica* (CAL-B), *Pseudomonas* sp. (PS) livre e/ou imobilizada em filmes de amido de cará ou inhame e de gelatina, *Pseudomonas* sp. (PS-D) e *Pseudomonas* sp. (PS-C) e a nativa de *A. niger* livre e/ou imobilizada em filmes de amido de cará ou inhame e de gelatina.

**solventes orgânicos** = *n*-hexano, *n*-heptano, *terc*-butanol, clorofórmio, diclorometano, ciclohexano e tolueno.

**Figura 51** - Acilação enantiosseletiva da (*RS*)-*sec*-butilamina (**25**) com diferentes doadores acila catalisada por lipases livres ou imobilizadas em aquecimento convencional ou em microondas.

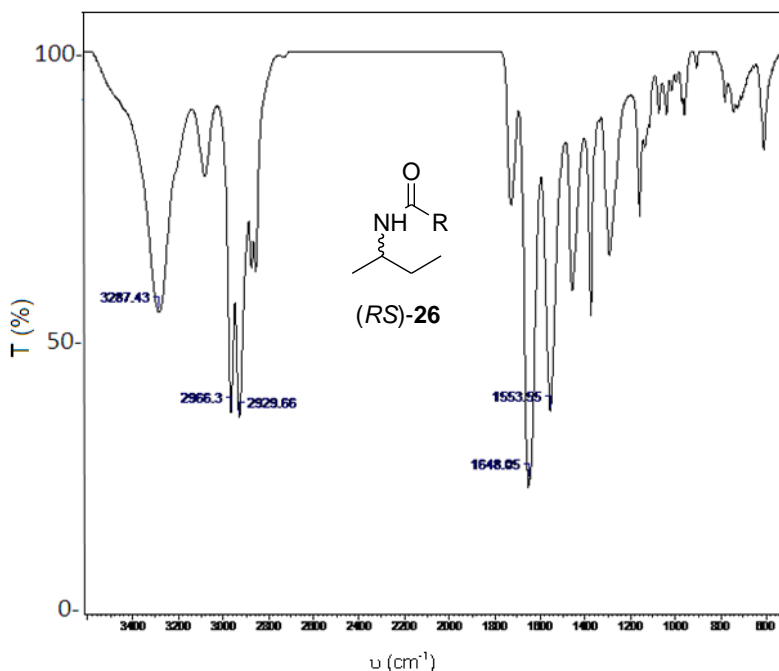
Primeiramente, os padrões da amida racêmica (*RS*)-*sec*-butilacetamida (**26**) e da amida quiral (*R*)-*sec*-butilacetamida (**26a**) foram preparadas e caracterizadas através da metodologia pelo método não enzimático descrito no item 6.1.2, pág. 52.

Os padrões da amida racêmica e da quiral foram usados para prever a estereoquímica da amida obtida pelo método enzimático, através da cromatografia gasosa de fase quiral (CGQ).

A (*RS*)-*sec*-butilacetamida (**26**) preparada pelo método químico foi analisada por técnicas de IV e RMN  $^1\text{H}$ .

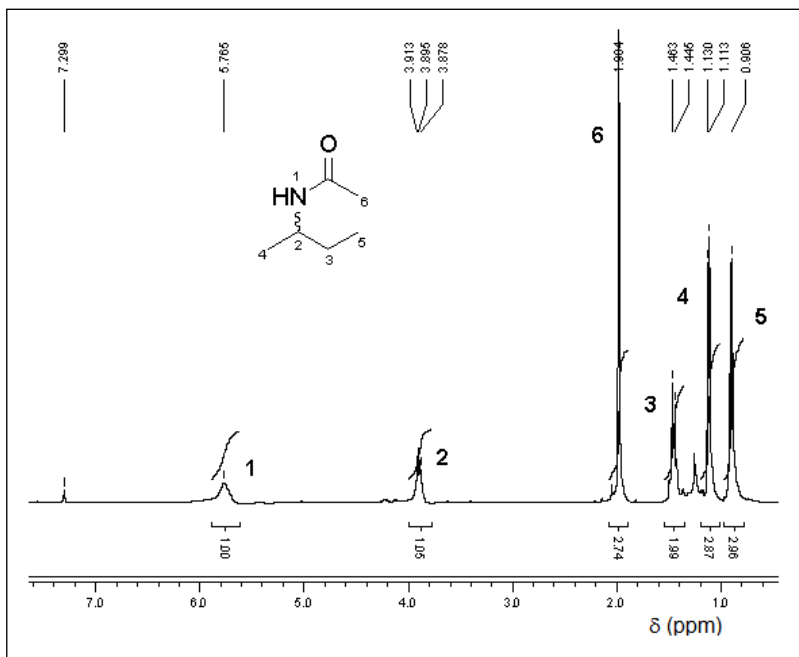
As **Figuras 52** e **53** mostram os espectros de IV e RMN -  $^1\text{H}$  da amida (*RS*)-**26**. Através das bandas na região do infravermelho, incluindo as características de estiramento e deformação das ligações C-H, entre outras, o composto (**26**) foi totalmente identificado.

Analisando a **Figura 52**, observam-se bandas características da amida (*RS*)-**26**. Na região de  $3287\text{ cm}^{-1}$  observa-se a banda de estiramento da ligação N-H da amida, em  $2929\text{--}2966\text{ cm}^{-1}$  a de estiramento da ligação C-H alifático, e em  $1648\text{ cm}^{-1}$  a de estiramento correspondente a carbonila da amida (C=O). Na região de  $1553\text{ cm}^{-1}$  observa-se a banda de deformação da ligação N-H da amida.



**Figura 52** - Espectro de IV da (*RS*)-*sec*-butilacetamida (**26**) (filme).

Na **Figura 53** é apresentado o espectro de RMN  $^1\text{H}$  da amida (*RS*)-**26**. Observa-se um singlete em 5,77 ppm (1H) correspondente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio da amida  $\text{H}_1$ , o sexteto em 3,89 ppm (1H) ao hidrogênio ligado ao carbono da amida  $\text{H}_2$ , o singlete em 1,98 ppm (3H) a metila da amida  $\text{H}_6$ , o quinteto em 1,46 (2H) aos hidrogênios metilênicos  $\text{H}_3$ , o dubleto em 1,12 ppm (3H) aos hidrogênios da metila  $\text{H}_4$  e o tripleto em 0,91 ppm (3H) corresponde aos hidrogênios da metila  $\text{H}_5$ .



**Figura 53** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da (*RS*)-*sec*-butilacetamida (**26**) (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

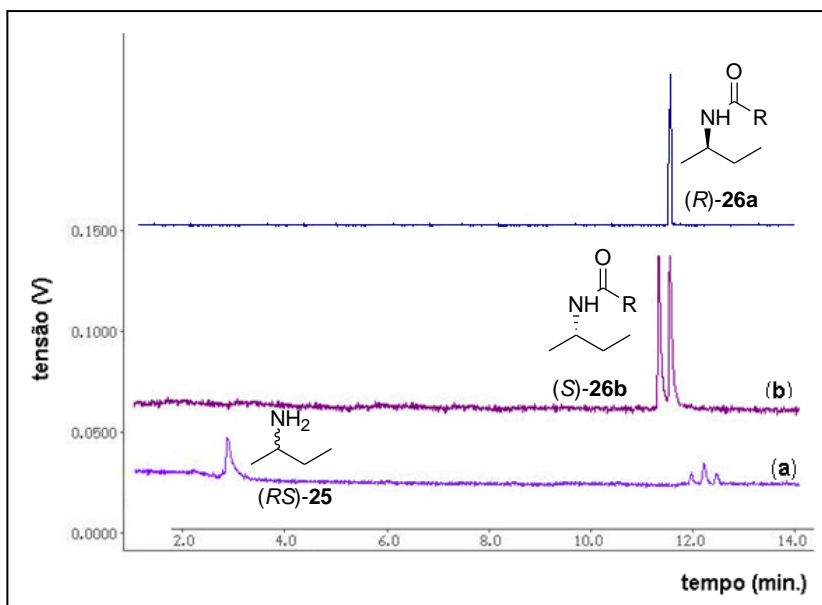
Os espectros de IV e RMN  $^1\text{H}$  são similares para os compostos (*RS*)-**26** e (*R*)-**26a**, pois os enantiômeros de (*RS*)-**26** e a amida quiral

apresentam os mesmos grupos funcionais e, portanto as mesmas atribuições espectroscópicas.<sup>35</sup>

A **Figura 54** mostra um cromatograma dos compostos (*RS*)-**25**, (*RS*)-**26** e (*R*)-**26a** obtidos através do método químico a partir dos reagentes racêmico e quiral, conforme descrito no item 6.1.2, pág. 52.

O cromatograma apresentado nesta figura mostra que o tempo de retenção da amida (*R*)-**26a** é 11,62 min. Os picos com tempo de retenção próximo a 13min observado no cromatograma da amina (*RS*)-**25**, correspondem a alguma impureza, não identificada.

Após a identificação da amida racêmica e da quiral, determinou-se a rotação óptica específica  $[\alpha]$ , sendo que a amida (*R*)-**26a** apresentou  $[\alpha]$  de  $-8,87^\circ$  e a (*RS*)-**26** de 0.



**Figura 54** - Cromatograma dos compostos (*RS*)-**25** (a), (*RS*)-**26** (b) e (*R*)-**26a** (c), por CGQ. Condições de análises: Inj. =  $230^\circ\text{C}$ , Det. =  $230^\circ\text{C}$ , programação:  $50^\circ\text{C}$   $3^\circ\text{C}/\text{min}$   $200^\circ\text{C}$ , split 100:1, Pressão do  $\text{H}_2$  = 75Kpa.

Após a caracterização da amida racêmica (*RS*)-**26** e da quiral (*R*)-**26a**, iniciou-se com os estudos da acilação da (*RS*)-*sec*-butilamina (**25**) com várias lipases e em diferentes condições reacionais.

### 7.3.1 Avaliação de lipases de diferentes procedências

Inicialmente, foi avaliado o uso de lipases de diversas procedências na acilação enantiosseletiva da (*RS*)-*sec*-butilamina (**25**) com acetato de etila em *n*-hexano.

Para este estudo, foram selecionadas as lipases comerciais de *Pseudomonas* sp.(LPS, PS-D, PS-C), de *C. antarctica* (CAL-B) e a nativa de *A. niger* livres ou imobilizadas em filmes de amido de cará ou inhame e de gelatina.

Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 5**. Ao decorrer da reação foram retiradas alíquotas em tempos pré-determinados, analisadas por CGQ e comparadas com o padrão quiral (*R*)-**26a**, preparada conforme item 6.1.2, pág.52.



**Tabela 5** - Acilação da (*RS*)-*sec*-butilamina (**25**) com acetato de etila usando lipases de diversas procedências.

entradas	lipases	atividade da lipase <sup>a</sup>	tempo (h)	c (%)	E <sup>d</sup>
1	LPS	10,72 <sup>b</sup>	6	5	1.7
2	LPS/ inhame	33,4 <sup>b</sup>	6	--	--
3	LPS/cará	17,60 <sup>b</sup>	6	5	1.3
4	LPS/gelatina	18,40 <sup>b</sup>	6	--	--
5	LPS-D	1.69 <sup>c</sup>	6	--	--
6	LPS-C	2.35 <sup>c</sup>	6	--	--
7	CAL-B	3.04 <sup>c</sup>	0.5	54	30
8	<i>A. niger</i>	2,86 <sup>b</sup>	1	41	32
9	<i>A.niger</i> /inhame	10,8 <sup>b</sup>	1	15	10
10	<i>A.niger</i> /cará	0,80 <sup>b</sup>	1	37	20
11	<i>A.niger</i> /gelatina	4,20 <sup>b</sup>	1	30	24

**Condições reacionais:** (*RS*)-*sec*-butilamina (**25**) (0,2mL; 2mmol); acetato de etila (0,2mL; 2mmol), *n*-hexano (10mL), lipases (50mg), 35°C em aquecimento convencional.

<sup>a</sup> determinada conforme item 4.4.1, pág. 45.

<sup>b</sup> U/g

<sup>c</sup> umol/min mg

<sup>d</sup> razão enantiomérica

Quando foram empregadas as lipases comerciais LPS livre ou imobilizada em filmes de amido de inhame, cará ou de gelatina e as LPS-D e LPS-C, as conversões a amida racêmica (**26**) foram baixas, bem como a seletividade.

Usando estas lipases as conversões foram de 0 – 5%, resultando em valores de E < 2 (entradas 1-6), em *n*-hexano a 35°C até 6h de reação.

Quando a lipase de *C. antarctica* (CAL-B) foi usada a amida (*R*)-**26a** foi formada com conversão de 54%, *ee*<sub>p</sub> de 84%, resultando em E de 30 em 30min de reação (entrada 7). Em 3 e 10min, a amida (*R*)-**26a**, foi formada com conversões de 17 e 33%, resultando em valores de E de 11 e 14, respectivamente. Em 1h a amida foi obtida com maior

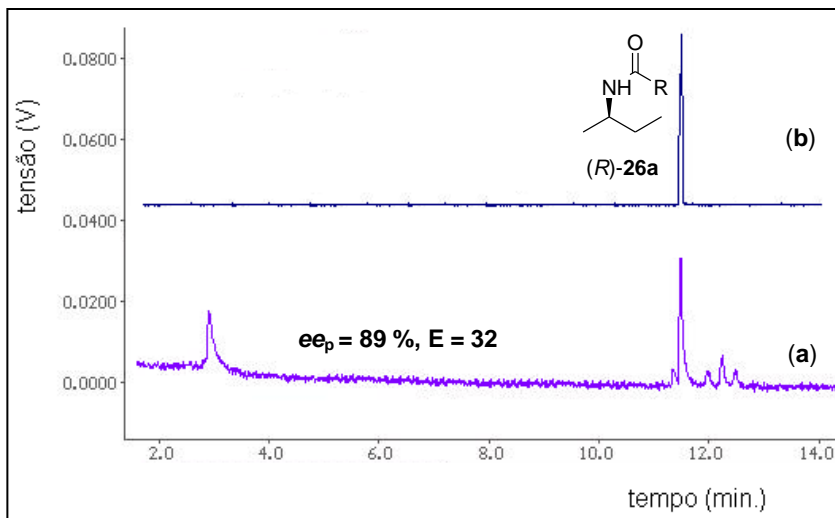
conversão, sendo de 57%, no entanto, o valor de E foi menor, sendo de 27 (dados não apresentados na **Tabela 5**).

Os resultados obtidos usando a CAL-B foram melhores em relação aos valores de E e tempo reacional quando comparado aos estudos realizados por Goswami e *col.*<sup>78</sup>

Estes autores estudaram a resolução da ( $\pm$ )-*sec*-butilamina com butirato de etila e de vinila catalisada pela CAL-B. A amida (*R*) foi obtida com conversões de 15 e 55%, resultando em valores de E de 2 a 9 em 1 a 7 dias, respectivamente. Foram obtidos melhores resultados com relação ao  $ee_p$  com os ésteres de cadeias alquílicas maiores, sendo que o melhor resultado foi obtido com o octanoato de etila, resultando em  $ee_p$  de 98,8%.<sup>78</sup>

Ao utilizar a lipase nativa de *A.niger* livre ou imobilizada em filmes de amido de inhame, cará ou de gelatina, a amida (*R*)-**26a** foi obtida com conversões de 15 a 41%,  $ee_p$  de 81 a 89%, resultando em valores de E de 10 a 32, em 1h (entradas 8-11). Em 2h de reação a amida (*R*)-**26a** foi obtida com conversões de 24-46% e valores de  $ee_p$  e E de 82-84% e 13-21, respectivamente, (dados não apresentados na **Tabela 5**). Em geral, em tempos maiores de reação, a amida foi formada com maiores conversões, mas com valores de  $ee_p$  e E menores.

Na **Figura 55**, observa-se a formação e separação dos produtos de uma alíquota da acilação da (*RS*)-**25** com acetato de etila catalisada pela lipase de *A.niger* em 1h de reação, comparado com o padrão do composto enantiomericamente puro. Como pode ser observado, o produto formado foi preferencialmente a amida (*R*)-**26a**.



**Figura 55** - Cromatograma de uma alíquota de reação de acilação (*RS*)-**25** com acetato de etila catalisada pela lipase de *A.niger* em 1h, por CGQ (a), padrão quiral da amida (*R*)-**26a** (b). Condições de análises: Inj. = 230°C, Det. = 230°C, programação: 50°C  $\frac{3^\circ\text{C}}{\text{min}}$  200°C, split 100:1, pressão do H<sub>2</sub> = 75Kpa.

Estes resultados são similares aos obtidos com a lipase comercial de *C.antarctica*, quando esta foi usada na acilação da (*RS*)-**25** com acetato de etila em *n*-hexano, a 35°C em 30min e 1h de reação (*c* = 54 e 57% e *E* = 30 e 27).

Os resultados obtidos na acilação da (*RS*)-*sec*-butilamina (**25**) com acetato de etila usando a CAL-B ou a lipase nativa de *A. niger* livre ou imobilizada mostraram que a amida-*R* foi obtida com conversões maiores e em tempos menores em comparação a acilação da (*RS*)-feniletilamina (**4**) (dados discutidos nos item 7.1 e 7.2). Esses dados podem estar relacionados ao impedimento estérico das aminas.

A partir destes resultados, a lipase nativa de *A.niger* livre ou imobilizada foi selecionada para dar continuidade aos estudos na acilação da (*RS*)-**25**. Primeiramente foi avaliado o efeito do doador acila, bem como a razão molar do mesmo e a massa do biocatalisador

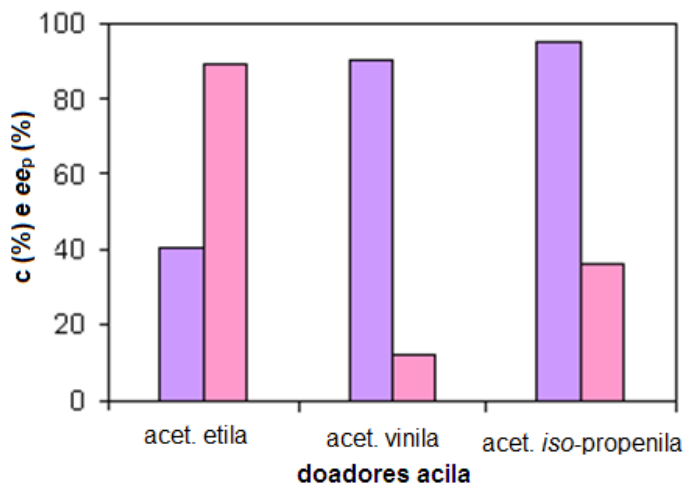
em aquecimento convencional. Posteriormente, estudou-se o efeito da temperatura, de diferentes solventes orgânicos e a influência da imobilização sob condições de aquecimento convencional ou em irradiação por microondas.

### 7.3.2 Influência do doador acila

A influência da razão molar do doador acila foi estudada e discutida no item 7.1.3 na acilação da amina (*RS*)-feniletilamina (**4**). Os resultados mostraram a dependência do doador acila e da razão molar na reatividade e seletividade desta reação. Estudos similares foram realizados com a (*RS*)-*sec*-butilamina (**25**).

Inicialmente, foram utilizados três doadores acila, sendo os acetatos de etila, de vinila e o de *iso*-propenila.

A **Figura 56** mostra a variação na conversão (%) e do excesso enantiomérico do produto (%) com os diferentes doadores acila.



**Figura 56** – Variação na conversão (%) e excesso enantiomérico ( $ee_p$ ) na reação de acilação da (*RS*)-*sec*-butilamina (**25**) (0,2mL; 2mmol) com diferentes doadores acila (2mmol) com a lipase de *A.niger* (50mg) em *n*-hexano (10mL), 35°C, em 1h. [(■) c (%), (■)  $ee_p$  (%)]

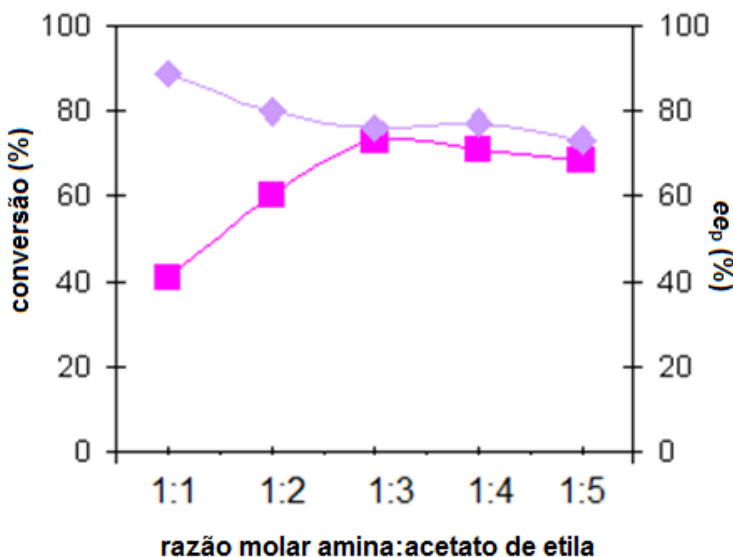
Os resultados apresentados na **Figura 56** mostram que quando foram usados os acetatos de vinila ou o de *iso*-propenila, a amida racêmica (**26**) foi formada com conversões de 90 e 95%, e com  $ee_p$  de 12 e 36% em 1h, respectivamente.

Com o acetato de etila foram obtidos melhores resultados. A amida (*R*)-**26a** foi formada com conversão de 41%,  $ee_p$  de 89% e E de 32 em 1h.

Como discutido, os acetatos de vinila e o de *iso*-propenila foram bons doadores acila na acilação da (*RS*)-**25**, formando a amida racêmica (**26**) com altas conversões. No entanto, foram obtidos valores de E baixos, sendo inaceitáveis para propósitos práticos.<sup>6</sup> Com o acetato de etila, a amida (*R*)-**26a** foi obtida com boa conversão e  $ee_p$ .

Bachu e *col.* reportaram que o uso dos acetatos de vinila e o de *iso*-propenila como doadores acila, as vezes não é vantajoso em biocatálise pois podem formar outros produtos laterais que não são os desejáveis, como por exemplo, o acetaldeído ou acetona que são tóxicos para a enzima e podem desativá-la.<sup>144</sup>

Portanto, a partir destes resultados, o acetato de etila foi selecionado como doador acila para avaliar a variação da razão molar entre (*RS*)-**25** e o acilante nas proporções de amina: acetato de etila de 1:1 a 1:5. Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 57**.



**Figura 57** - Variação na conversão (%) e  $ee_p$  (%) na reação de acilação da (*RS*)-**(25)** (0,2mL; 2mmol) com acetato de etila (2-10mmol) com a lipase de *A.niger* (50mg) em *n*-hexano (10mL), 1h, 35°C. [(■) conversão (%), (◆)  $ee_p$  (%)].

Os resultados apresentados na **Figura 57** mostram que a conversão ao produto, como esperado aumentou com a razão molar até a proporção de 1:3, sendo de 41 para 73%. No entanto foi observada uma diminuição dos valores de  $ee_p$  de 89% para 76%. Com as proporções de 1:4 e 1:5, as conversões e o  $ee_p$  mantiveram-se praticamente constante em relação a proporção de 1:3, sendo de 71 e 68% e 77 e 73%, respectivamente.

O melhor resultado, em relação a seletividade foi obtido com o acetato de etila na proporção molar de amina:acetato de etila de 1:1, e portanto, esta foi selecionada para dar continuidade aos estudos, incluindo a avaliação da massa de lipase, efeito da temperatura e do solvente orgânico em aquecimento convencional e por microondas.

### 7.3.3 Efeito da variação da massa da lipase de *A.niger*

A influência da massa da lipase de *A.niger* foi avaliada na acilação da (*RS*)-**25** com acetato de etila em *n*-hexano. As quantidades usadas foram de 0-100mg em 1h de reação.

Na ausência da lipase não foi observada a formação do produto.

Ao utilizar 25 e 50mg da lipase de *A.niger*, foram obtidos bons resultados e a amida (*R*)-**26a** foi formada com conversões de 47 e 41%,  $ee_p$  de 82 e 89% e E de 21 e 32, respectivamente. Ao utilizar 75 ou 100mg, a amida (*R*)-**26a** foi formada com conversões de 54 e 60% e  $ee_p$  de 80 e 78%, respectivamente.

Os resultados obtidos mostraram que 50mg já é suficiente para atingir a conversão ao produto próxima a ótima e com alto valor de  $ee_p$  em 1h. Com o aumento da massa da lipase de *A.niger*, foram obtidas conversões maiores a respectiva amida. No entanto, os valores de  $ee_p$  foram menores mostrando-se inaceitáveis para propósitos práticos, onde o objetivo é obter a amida enantiomericamente pura.

Portanto, a partir destes resultados, utilizou-se 50mg da lipase de *A.niger* nos estudos da avaliação do efeito da temperatura, solvente orgânico e da imobilização desta lipase em aquecimento convencional ou por irradiação de microondas.

### 7.3.4 Influência da irradiação por microondas

Nos dias atuais nos quais as demandas por processos sintéticos mais limpos e eficientes têm sido consideradas muito relevantes devido a aspectos ambientais, duas condições reacionais parecem bastante adequadas para as reações químicas em escala preparativa. Estas incluem as reações livres de solventes e as aceleradas sob irradiação de microondas (MO).

Neste sentido, devido à eficiência de aparelhos de MO em aquecer rapidamente meios reacionais, estes têm sido muito utilizados em diversas transformações orgânicas reduzindo o tempo da reação muitas vezes, de dias e horas para minutos ou segundos. Além disso, a irradiação por microondas melhora o rendimento, reprodutibilidade e a

seletividade da reação em relação ao uso do aquecimento convencional.<sup>16,108,144-146</sup>

No entanto em reações biocatalisadas, a irradiação por microondas por tempos prolongados pode danificar a estrutura da enzima e conseqüentemente diminuir a atividade catalítica da mesma. Além disso, a irradiação por microondas pode influenciar distintamente a estrutura e atividade de enzimas livres ou imobilizadas.

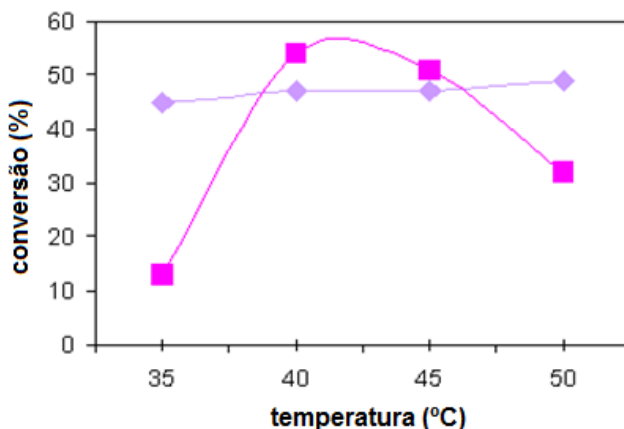
Para verificar estes efeitos, foi avaliada a influência do aquecimento convencional em comparação a irradiação por microondas na acilação da (*RS*)-*sec*-butilamina (**25**) com acetato de etila usando a lipase de *A.niger* livre ou imobilizada em diversos suportes e temperaturas.

#### **7.3.4.1 Efeito da temperatura**

A temperatura da reação é importante na biocatálise. Como discutido anteriormente este parâmetro pode influenciar na atividade, seletividade e estabilidade do biocatalisador.<sup>14,126</sup>

Neste estudo, avaliaram-se quatro diferentes temperaturas entre 35-50°C na acilação da (*RS*)-**25** com acetato de etila em *n*-hexano em 3min. A **Figura 58** mostra a variação na conversão (%) em função da temperatura ao utilizar o aquecimento convencional ou irradiação por microondas.





**Figura 58** – Variação na conversão (%) em função da temperatura (°C) na reação de acilação da (*RS*)-*sec*-butilamina (**25**) (0,2mL; 2mmol) com acetato de etila (0,2mL; 2mmol) usando a lipase de *A.niger* (50mg) em *n*-hexano (10mL ou 7mL), 3min. [(◆)irradiação por microondas (■) aquecimento convencional]

Na ausência do biocatalisador não houve formação do produto.

Quando o aquecimento convencional foi utilizado na acilação da (*RS*)-**25**, a conversão aumentou com a temperatura na faixa de 35-45°C, sendo que a amida (*R*)-**26a** foi obtida com conversões de 13-51%,  $ee_p$  81-90% e com valores de E de 21-23, respectivamente.

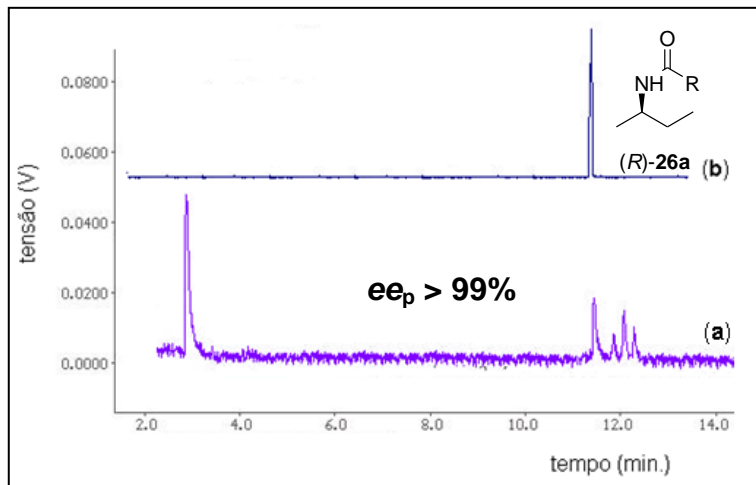
A 50°C, provavelmente a estabilidade da lipase foi menor devido a desnaturação da enzima a altas temperaturas e conseqüentemente a conversão da amida (*R*)-**26a** diminuiu para 32%, com  $ee_p$  de 81% e E de 13.

Ao utilizar a irradiação por microondas, a conversão manteve-se praticamente constante nas temperaturas de 35-50°C, e a amida (*R*)-**26a** foi formada com conversões de 45-49%. Os valores de  $ee_p$  e E também mantiveram-se praticamente constantes, sendo de 80-81% e 18-20, respectivamente.

Os resultados apresentados na **Figura 58** mostram que a conversão foi maior ao utilizar a irradiação por microondas em relação ao aquecimento convencional nas temperaturas de 35°C e 50°C. A amida

(*R*)-**26a** foi formada com conversão 3 vezes maior em irradiação por microondas em relação ao aquecimento convencional na temperatura de 35°C.

Uma alíquota da reação na temperatura de 35°C aquecida por microondas foi retirada em 1min e analisada por CGQ (**Figura 59**).



**Figura 59** - Cromatograma de uma alíquota de reação de acilação (*RS*)-**25** com acetato de etila catalisada pela lipase de *A.niger* em 1min, em MO por CGQ (**a**), padrão quiral da amida (*R*)-**26a** (**b**). Condições de análise: Inj. = 230°C, Det. = 230°C, programação: 50°C 3°C/min 200°C, split 100:1, pressão do H<sub>2</sub> = 75Kpa.

Os resultados obtidos mostraram que a amida (*R*)-**26a** foi formada com conversão de 21%,  $ee_p > 99\%$  resultando em E >200 (dado não mostrado na **Figura 58**). Estes dados mostraram que ao utilizar irradiação por microondas a conversão ao produto foi duas vezes maior em um tempo menor, bem como a seletividade da reação foi muito superior em relação a reação realizada sob aquecimento convencional. Ao usar o aquecimento convencional a amida (*R*)-**26a** foi obtida com 13% de conversão,  $ee_p$  e E de 90% e 20, respectivamente, em 3min.

A razão de obter maiores conversões ao utilizar microondas em relação ao aquecimento convencional podem ser explicada devido aos

efeitos térmico e não-térmico. Primeiramente, as moléculas polares (amina e o acetato de etila) colidem uma com a outra por causa do efeito térmico do MO. Assim, a colisão molecular em microondas possui uma força dirigida extra em relação ao aquecimento convencional, a qual resulta em uma conversão maior, enquanto a enzima não é desativada neste meio. Deve-se considerar também o efeito não-térmico, sendo que a energia de microondas pode modificar a configuração da enzima acelerando a rotação molecular e a oscilação de elétrons da parte polar do biocatalisador, favorecendo um melhor ajuste do substrato no sítio ativo.<sup>109</sup>

Yadav e *col.* estudaram o efeito da temperatura na síntese do acetato de citroneíla catalisada pela CAL-B em tolueno na faixa de 30-60°C, em aquecimento convencional e em irradiação por microondas. Os resultados mostraram que a conversão, bem como a velocidade da reação foi maior em irradiação por microondas em relação ao aquecimento convencional. A velocidade inicial e a conversão aumentaram com a temperatura. Ao utilizar aquecimento convencional a velocidade inicial aumentou de aproximadamente 0,01 para 0,025M/min, enquanto que ao utilizar MO foi de 0,015 para 0,045M/min. Além disso, foi observado uma diminuição na conversão ao aumentar a temperatura para 60°C, podendo ser atribuída a desativação da enzima. Neste estudo a temperatura de 50°C foi selecionada como ótima para esta reação.<sup>147</sup>

Portanto, a partir dos resultados apresentados e discutidos neste trabalho, a temperatura de 35°C foi usada nos estudos do efeito do solvente orgânico e da imobilização da enzima em aquecimento convencional e em microondas.

#### **7.3.4.2 Efeito do solvente orgânico**

Os solventes são especialmente de grande importância na solvatação de reagentes e das lipases, os quais podem influenciar na seletividade da reação. O efeito da irradiação por microondas precisa ser considerado de acordo com o meio reacional.<sup>106,147</sup>

Com o uso de solventes polares (alcoóis, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>), a absorção pode ocorrer entre a energia da microondas e o solvente polar. Nesse caso, a energia é transferida do solvente para a mistura reacional e

consequentemente os resultados são similares em relação ao uso do aquecimento convencional. Quando solventes mais apolares (*n*-hexano, *n*-heptano, tolueno) são utilizados provavelmente a energia é transferida dos reagentes para o solvente o que significa que quando a temperatura é aquecida por microondas, os reagentes podem possuir uma maior atividade devido aos grupos presente na reação, e consequentemente será possível obter um melhor resultado em relação ao aquecimento convencional.<sup>108,115,147</sup>

Como discutido anteriormente, o efeito do solvente na atividade da enzima é geralmente descrita pelos valores do  $\log P$ . Em geral, à medida que aumenta o  $\log P$  a atividade da lipase aumenta. No entanto, além do  $\log P$  deve-se considerar as demais propriedades dos solventes tais como solubilidade, polaridade e constante dielétrica, entre outras.<sup>147</sup>

Para verificar estes efeitos, foi avaliada a influência do meio reacional na acilação da (*RS*)-*sec*-butilamina (**25**) em solventes de diferentes polaridades tais como o *n*-hexano, *n*-heptano, ciclohexano, tolueno, *tert*-butanol, clorofórmio e diclorometano, em aquecimento convencional ou por irradiação de microondas.

Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 6**.

**Tabela 6** - Efeito do solvente na conversão e seletividade na reação de acilação da (*RS*)-*sec*-butilamina (**25**) com aquecimento convencional e em irradiação por microondas.

solventes	log <i>P</i>	aquecimento convencional		irradiação por microondas	
		<i>c</i> (%)	<i>ee<sub>p</sub></i> (%)	<i>c</i> (%)	<i>ee<sub>p</sub></i> (%)
<i>n</i> -hexano	3,90	30	85	21	>99
<i>n</i> -heptano	4,00	36	84	27	74
ciclohexano	3,20	49	78	18	80
tolueno	2,50	55	80	10	83
<i>t</i> -BuOH	1,45	71	65	90	70
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1,18	88	70	93	79
CHCl <sub>3</sub>	2,00	75	73	84	81

**Condições reacionais:**(*RS*)-*sec*-butilamina (**25**) (0,2mL; 2mmol); acetato de etila (0,2mL; 2mmol), solvente (10mL ou 7mL), lipase de *A niger* (50mg), 35°C, 30min em aquecimento convencional; 1min em microondas.

Usando os solventes mais apolares (*n*-hexano, *n*-heptano, ciclohexano e tolueno) na acilação da (*RS*)-**25** sob aquecimento convencional, a amida (*R*)-**26a** foi obtida com boas conversões e bons valores de *ee<sub>p</sub>*, sendo de 30-55% e 78-85%, respectivamente em 30min. Ao utilizar a irradiação sob microondas, a amida (*R*)-**26a** foi formada com conversões moderadas e bons valores de *ee<sub>p</sub>*, sendo de 10-27% e 74 - >99%, respectivamente em apenas 1min.

Quando os solventes hidrofílicos mais polares como o *t*-BuOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e CHCl<sub>3</sub> foram usados na acilação da (*RS*)-**25** sob aquecimento convencional, a amida (*R*)-**26a** foi formada com conversões altas e com valores de *ee<sub>p</sub>* moderados sendo de 71-88% e 65-73%, respectivamente em 30min. Na presença destes solventes foram obtidos melhores

resultados ao utilizar irradiação por microondas, e a amida (*R*)-**26a** foi formada com conversões de 84-90% e  $ee_p$  de 70-81%, em 1min.

Ao utilizar a irradiação por microondas as conversões foram similares as obtidas por aquecimento convencional, no entanto o valor de  $ee_p$  foi superior. Além disso, o tempo da reação foi bem menor em relação ao aquecimento convencional (dados na **Tabela 6**).

Yu e *col.* descreveram a transesterificação do (*RS*)-2-octanol com acetato de vinila catalisada pela CAL-B, usando solventes de diferentes polaridades (*n*-heptano, *n*-hexano, tolueno, ciclohexano, acetona, acetonitrila, DMF e 1,4-dioxano) com aquecimento convencional e em irradiação por microondas. Os resultados mostraram que a atividade da lipase e a enantiosseletividade aumentaram com a hidrofobicidade do solvente tanto em aquecimento convencional como em irradiação por microondas.<sup>115</sup>

A maior atividade da enzima e enantiosseletividade foram obtidas em *n*-heptano, ao utilizar irradiação por microondas. A atividade da enzima foi de 203  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$  com valor de E de 352. Com o uso do aquecimento convencional a atividade da enzima foi de 55  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$  e E de 99. Estes resultados mostraram que com o uso da irradiação por microondas, a atividade da enzima e o valor de E foram muito melhores em comparação ao aquecimento convencional.<sup>115</sup>

Os resultados apresentados aqui estão de acordo com dados reportados na literatura na qual mostra que os solventes orgânicos apolares não absorvem eficientemente a energia das microondas e, assim não aquecem muito o meio reacional, podendo atuar como “bloqueadores” de aquecimento, pois criam barreiras para o aquecimento produzido pela interação entre irradiação das microondas e os reagentes polares.

Neste trabalho o uso de solventes apolares foi interessante, pois devido a mistura reacional ser sensível a temperaturas mais elevadas esta reação foi beneficiada mostrando a grande importância de avaliar o meio reacional. O melhor resultado na acilação da (*RS*)-**25** foi obtido usando *n*-hexano e a amida (*R*)-**26a** foi formada com conversão de 21% e  $ee_p$  >99% ao utilizar irradiação por microondas, em 1min. Com o aquecimento convencional a amida foi obtida com conversão de 30%,  $ee_p$  de 85%, em 30min.

A partir destes resultados, o *n*-hexano foi selecionado para avaliar a influência da imobilização da lipase de *A.niger* em filmes de amido de cará, inhame ou de gelatina, bem como a sua reutilização.

### 7.3.4.3 Efeito da imobilização da lipase de *A.niger* e reutilização

A partir da década 80 tem tido um interesse crescente no desenvolvimento de técnicas de imobilização de enzimas e/ou de microrganismos, visando minimizar os efeitos causados pelo seu uso em ambientes adversos, tais como solventes orgânicos, variações no pH e/ou altas temperaturas.<sup>1,2,56</sup>

Os filmes de amido de cará, inhame ou de gelatina foram usados como suportes para a imobilização da lipase de *A.niger* na acilação da (*RS*)-*sec*-butilamina (**25**) com acetato de etila sob aquecimento convencional e em irradiação por microondas.

Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 7**.

**Tabela 7** - Efeito da imobilização da lipase de *A.niger* na conversão e seletividade na reação de acilação da (*RS*)-*sec*-butilamina (**25**) com aquecimento convencional e em irradiação por microondas.

enzima/suporte	aquecimento convencional			irradiação por microondas		
	c (%)	ee <sub>p</sub> (%)	E	c (%)	ee <sub>p</sub> (%)	E
<i>A.niger</i>	13	90	21	38	78	12
<i>A.niger</i> /inhame	--	--	--	8	>99	>200
<i>A.niger</i> /cará	8	>99	>200	15	>99	>200
<i>A.niger</i> /gelatina	21	84	14	46	77	15

**Condições reacionais:**(*RS*)-*sec*-butilamina (**25**) (0,2mL; 2mmol); acetato de etila (0,2mL; 2mmol), solvente (10mL ou 7mL), lipase de *A.niger*/suporte (50mg), 35°C, 3min em aquecimento convencional ou irradiação por microondas.

Os resultados apresentados na **Tabela 7** mostram que quando a lipase de *A. niger* foi usada na forma livre na acilação da (*RS*)-**25**, sob aquecimento convencional ou irradiação por microondas, a amida (*R*)-

**26a** foi formada com conversões de 13 e 38%,  $ee_p$  de 90 e 78%, resultando em valores de E de 21 e 12, respectivamente.

Ao utilizar esta lipase imobilizada em filme de amido de inhame com aquecimento convencional não foi observado a formação da amida em 3min de reação. Com a irradiação por microondas, a amida (R)-**26a** foi formada com conversão baixa de 8%, mas com valor elevado de  $ee_p$  e E, sendo de >99% e >200, respectivamente.

Quando o sistema *A.niger*/cará foi utilizado como suporte em aquecimento convencional ou em irradiação por microondas, a amida (R)-**26a** foi obtida com conversões de 8 e 15%,  $ee_p$  de >99%, resultando em valores de E >200. Estes dados mostram que ao usar microondas a conversão foi aproximadamente duas vezes maior.

As maiores conversões foram obtidas quando o sistema *A.niger*/gelatina foi usado com aquecimento convencional e em irradiação por microondas, sendo de 21 e 46%, entretanto os valores de  $ee_p$  e E foram moderados, sendo de 84 e 77% e de 14 e 15, respectivamente.

Os resultados apresentados mostram que as conversões,  $ee_p$  e os valores de E foram dependentes do suporte utilizado para esta lipase.

Ao utilizar os sistemas *A.niger*/cará e *A.niger*/inhame sob aquecimento convencional ou em irradiação por microondas, a amida (R)-**26a** foi obtida com conversões menores (0-15%) em relação ao uso da enzima na forma livre (13-38%). No entanto, com o uso destes suportes foi observada uma melhor seletividade e a amida (R)-**26a** foi obtida com  $ee_p$  e E de >99% e >200, respectivamente, mostrando o efeito de proteção do biocatalisador após imobilização.

A diminuição das conversões ao produto pode estar relacionada com a porosidade dos filmes de amido. Recentemente, através de estudos de microscopia eletrônica de varredura foi observado que filmes de amido de cará, inhame e de gengibre apresentam baixa porosidade. Portanto, é esperado que a difusão dos reagentes e produtos seja menor na presença destes filmes.<sup>121</sup> Baseando-se nestes dados acredita-se que o fator responsável para a amida ter sido formado com conversão menor ao utilizar a lipase *A.niger* imobilizada está relacionada com a porosidade dos filmes utilizados.

Outro fator que deve ser ressaltado é a presença de certa quantidade de água nos filmes que contribui para a manutenção da



atividade catalítica da enzima após imobilização. O teor de água nos filmes de amido de cará, inhame ou de gelatina foi determinado pelo método de titulação Karl-Fisher. Os filmes preparados apresentaram entre 10-14% de água, sendo que esta quantidade é suficiente para manter a estrutura tridimensional da enzima e conseqüentemente a sua atividade.

Com o intuito de aumentar a conversão a respectiva amida com os sistemas *A.niger*/cará e *A.niger*/inhame realizou-se a acilação da (RS)-**25** em tempos maiores com aquecimento convencional e em irradiação por microondas. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 8**.

**Tabela 8** - Acilação da (RS)-*sec*-butilamina (**25**) com acetato de etila usando os sistemas *A.niger*/cará e *A.niger*/inhame com aquecimento convencional e em irradiação por microondas.

	aquecimento convencional			irradiação por microondas		
	tempo (min)	c (%)	E	tempo (min)	c (%)	E
<i>A.niger</i> /suporte						
<i>A.niger</i> /inhame	30	2	>200	4	7	>200
	60	15	10	5	15	>200
<i>A.niger</i> /cará	10	25	14	4	15	>200
	30	30	10	5	25	>200

**Condições reacionais:** (RS)-*sec*-butilamina (**25**) (0,2mL; 2mmol); acetato de etila (0,2mL; 2mmol), solvente (10mL ou 7mL), lipase de *A.niger*/suporte (50mg), 35°C, em aquecimento convencional ou em irradiação por microondas.

Os resultados apresentados na **Tabela 8** mostram que quando a lipase de *A. niger*/inhame foi usada na acilação da (RS)-**25** em tempos maiores sob aquecimento convencional, a amida (R)-**26a** foi formada com conversões de 2-15%,  $ee_p$  e E de 81- >99% e 10 - >200, respectivamente. Após 30min os valores de E diminuíram de >200 para 10. Ao utilizar o sistema *A.niger*/cará a amida foi formada com conversões maiores, sendo de 25-30%,  $ee_p$  e E de 76-83% e 10-14, respectivamente. No entanto, os valores de E diminuíram de >200 (3min) para 14 e 10 em 10 e 30min de reação, respectivamente.

Com os sistemas *A.niger*/inhame e *A.niger*/cará sob irradiação por microondas, a amida (R)-**26a** foi obtida com conversões moderadas de 7-15% e 15-25%, em 4 e 5min, respectivamente. Ao utilizar estes suportes a seletividade com relação a (R)-**26a** manteve-se constante com valores de  $ee_p$  e E de > 99% e >200.

Estes dados mostram que a conversão a amida aumentou com o tempo, entretanto ao utilizar o aquecimento convencional a seletividade diminuiu. Com o aquecimento sob irradiação de microondas a seletividade da amida (R)-**26a** manteve-se constante ao utilizar os sistemas *A.niger*/inhame e *A.niger*/cará, mostrando a viabilidade desse processo.

Conforme discutido, os melhores resultados foram obtidos ao usar a irradiação de microondas em relação ao uso do aquecimento convencional na acilação da (RS)-**25**.

Recentemente, da Silva e *col.* reportaram a influência da imobilização da lipase de *A.niger* em celite na esterificação do (RS)-Ibuprofeno com 1-propanol em *iso*-octano, sob aquecimento convencional. Ao utilizar a lipase na forma livre o éster foi formado com conversões de 9,8-14,6%,  $ee_p$  de 4-12% e E de 2,1-6,9, em 24-72h. Quando o sistema *A.niger*/celite foi usado, o éster foi obtido com maior conversão, sendo de 26%, entretanto os valores de  $ee_p$  e E foram baixos, sendo de 6% e 1,5, respectivamente. Após a imobilização foi observado uma maior estabilidade térmica e uma melhor atividade de esterificação. Além disso, a lipase na forma imobilizada manteve pelo menos 73% da atividade de esterificação, após 5 dias de armazenamento a 40°C e pode ser reciclada e reutilizada por pelo menos 6 vezes.<sup>2</sup>

A reutilização de catalisadores imobilizados é outro parâmetro importante e em geral, determina a viabilidade econômica de um processo biocatalítico.<sup>2</sup> Para avaliar este parâmetro, os sistemas *A.niger*/cará e *A.niger*/inhame foram reutilizados na acilação enantiosseletiva da (RS)-**25** com acetato de etila, sob irradiação por microondas em 5min. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 9**.

**Tabela 9** - Reutilização dos sistemas *A.niger*/inhome e *A.niger*/cará na acilação da (RS)-*sec*-butilamina (**25**) sob irradiação por microondas.

	1º reação		1º reutilização	
	c (%)	E	c (%)	E
<i>A.niger</i> /suporte	15	>200	25	15
<i>A.niger</i> /inhome	25	>200	50	13

**Condições reacionais:**(RS)-*sec*-butilamina (**25**) (0,2mL; 2mmol); acetato de etila (0,2mL; 2mmol), solvente (7mL), lipase de *A.niger*/suporte (50mg), 35°C, em 5min sob irradiação por microondas.

Os resultados apresentados na **Tabela 9** mostram que ao utilizar o sistema *A.niger*/inhome, a amida (R)-**26a** foi obtida com conversão de 15%,  $ee_p$  e E de >99% e >200 na primeira reação, em 5min, respectivamente. Após a primeira reutilização foi observado um aumento na conversão para 25%, com diminuição dos valores de  $ee_p$  e E para 84% e 15, respectivamente.

Foram obtidos melhores resultados usando o sistema *A.niger*/cará. Na primeira reação a amida (R)-**26a** foi formada com conversão de 25%,  $ee_p$  e E de >99% e >200, respectivamente em 5min. Ao realizar a primeira reutilização, a tendência foi similar ao estudo anterior, e a amida foi formada com conversão maior. No entanto, foram obtidos menores valores de  $ee_p$  e E, sendo de 50%, 73% e 13, respectivamente.

O aumento das conversões na primeira reutilização em relação à primeira reação é um resultado inesperado, pois é previsto a manutenção ou diminuição da atividade catalítica da lipase, após cada uso. Este fato pode ser explicado através da lavagem não adequada dos filmes, podendo ter ficado produto e/ou reagentes da reação anterior.

Os resultados apresentados e discutidos até o presente momento mostraram que ao utilizar a lipase imobilizada após a primeira reação sob irradiação de microondas, a seletividade da reação foi menor. Este fato pode estar relacionado à desnaturação da proteína, resultante da diminuição das forças iônicas e/ou das ligações hidrogênio que estabilizam a estrutura tridimensional das enzimas necessária para a manutenção do sitio ativo da mesma.<sup>115</sup>

Wang e *col.* estudaram a imobilização da papaína e da penicilina acilase em “mesocellular siliceous foams” (MCFs) (espumas de sílica mesocelular) a baixas temperaturas. A massa máxima de papaína imobilizada foi de 984,1mg/g (lipase/suporte), ou seja 1,26 vezes a mais do que a obtida por aquecimento convencional. As atividades da papaína e da penicilina acilase imobilizadas em MCFs por irradiação por microondas foram de 779,6 U/mg e 141,8U/mg, respectivamente. Estes resultados foram 1,86 e 1,30 vezes maiores do que os obtidos com aquecimento convencional. Quando foi usada a irradiação por microondas a penicilina acilase, levou apenas 140s para ser imobilizada em MCFs, e 15h em aquecimento convencional. Estes resultados mostraram que a adsorção e imobilização de enzimas em MCFs melhorou sob irradiação por microondas em relação ao aquecimento convencional.<sup>146</sup>

A habilidade de diminuir o tempo da reação e a possibilidade de reutilizar o biocatalisador são parâmetros necessários e importantes para a viabilidade econômica de um processo, conforme descrito anteriormente.

Nesse estudo, foram avaliadas duas metodologias, sendo a imobilização da lipase de *A.niger* e a irradiação por microondas para aumentar a reatividade e enantiosseletividade desta lipase na acilação da (*RS*)-*sec*-butilamina (**25**). A utilização de enzimas imobilizadas tem apresentado muitas vantagens em relação a forma livre, pois além de proteger o biocatalisador diante dos solventes orgânicos, estes suportes podem ser reutilizados. O amido por ser encontrado em abundância nos vegetais, torna-se um material barato de trabalhar. Além disso, estes biopolímeros não são prejudiciais ao meio ambiente contribuindo dessa forma para uma química mais limpa.

A irradiação por microondas é uma fonte de energia limpa e rápida que ainda não foi extensivamente estudada em reações de resolução catalisada por enzimas. Portanto, esta forma de energia fornece uma ferramenta potente no campo da biocatálise com a vantagem de tornar as reações mais rápidas, limpas e com melhores conversões e seletividade.

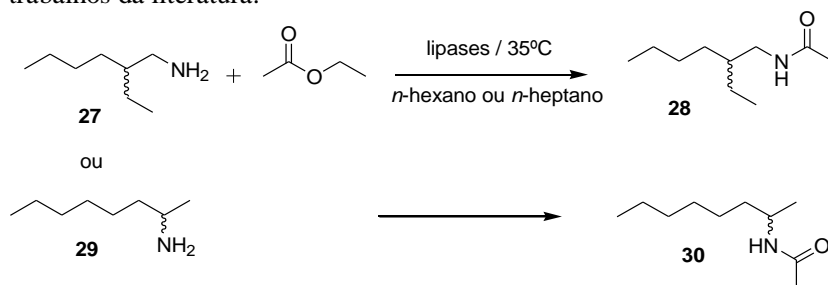
A seguir, na seção 7.4 serão apresentados e discutidos alguns resultados preliminares da acilação de aminas alifáticas com cadeias

alquílicas maiores. Foram selecionadas a (*RS*)-2-etilhexilamina (**27**) e a (*RS*)-2-aminooctano (**29**).

#### 7.4 Resolução da (*RS*)-2-etilhexilamina (**27**) e (*RS*)-2-aminooctano (**29**)

A acilação enzimática da (*RS*)-2-etilhexilamina (**27**) e da (*RS*)-2-aminooctano (**29**) com o acetato de etila foi estudada com diferentes lipases em *n*-hexano ou *n*-heptano a 35°C em 24h (**Figura 60**).

Os resultados serão discutidos e comparados com outros trabalhos da literatura.



**lipases** = lipases de *C. antarctica* (CAL-B), de *Pseudomonas* sp. (PS), *Pseudomonas* sp. (PS-D) e de *Pseudomonas* sp. (PS-C) e a lipase nativa de *A.*

**Figura 60** - Acilação enantiosseletiva da (*RS*)-2-etilhexilamina (**27**) e (*RS*)-2-aminooctano (**29**) com diferentes lipases

Primeiramente, foram preparados e caracterizados os padrões da amida racêmica (*RS*)-2-etilhexilacetamida (**28**), bem como o da amida (*RS*)-octan-2-il-acetamida (**30**) através da metodologia não enzimática, conforme descrita nos item 6.1.3, pág. 53.

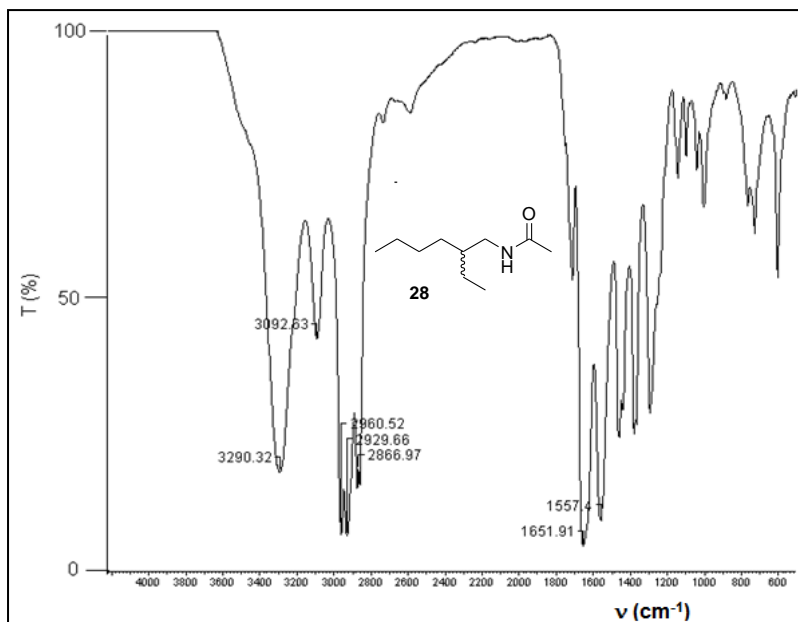
Os padrões racêmicos foram usados para comparação com a formação da amida obtida pelo método enzimático, através da cromatografia gasosa de fase quiral (CGQ).

A (*RS*)-2-etilhexilacetamida (**28**) preparada pelo método não enzimático foi analisada por técnicas espectroscópicas de infravermelho (IV) e de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ).

As **Figuras 61**, **62** e **63** mostram os espectros de IV, RMN  $^1\text{H}$  e o cromatograma da amida racêmica (*RS*)-**28** obtida através do método químico.

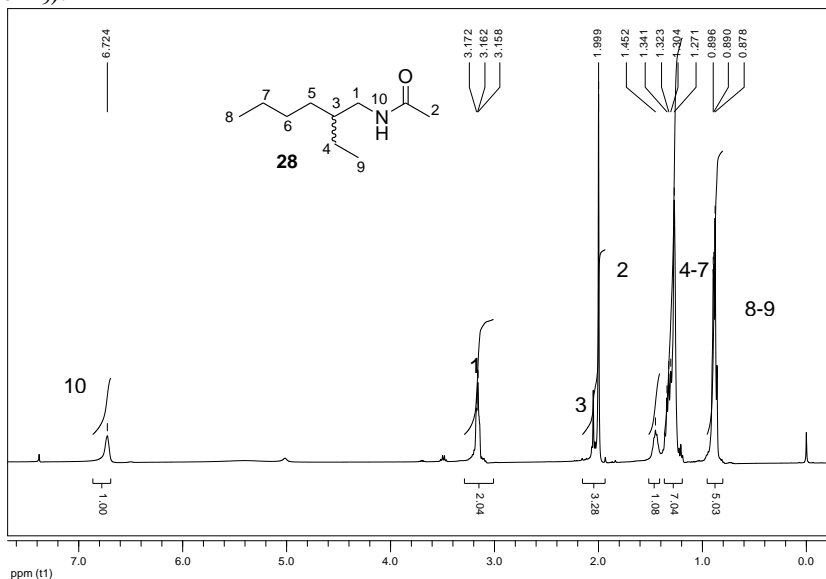
Através das bandas no espectro de infravermelho e das áreas dos picos de RMN  $^1\text{H}$  correspondendo as regiões características de hidrogênios, o composto (**28**) foi totalmente caracterizado.

Analisando a **Figura 61**, observam-se bandas características da amida (*RS*)-**28**. Na região de  $3093 - 2867\text{ cm}^{-1}$  observa-se as bandas de estiramento correspondente ao C-H alifático, na região de  $3290\text{ cm}^{-1}$  tem-se a banda de estiramento da ligação N-H da amida e em  $1651\text{ cm}^{-1}$  a de estiramento correspondente a carbonila também da amida (C=O). Em  $1557\text{ cm}^{-1}$  observa-se a banda de deformação de N-H da amida.



**Figura 61** - Espectro de IV da (*RS*)-2-etilhexilacetamida (**28**) (filme).

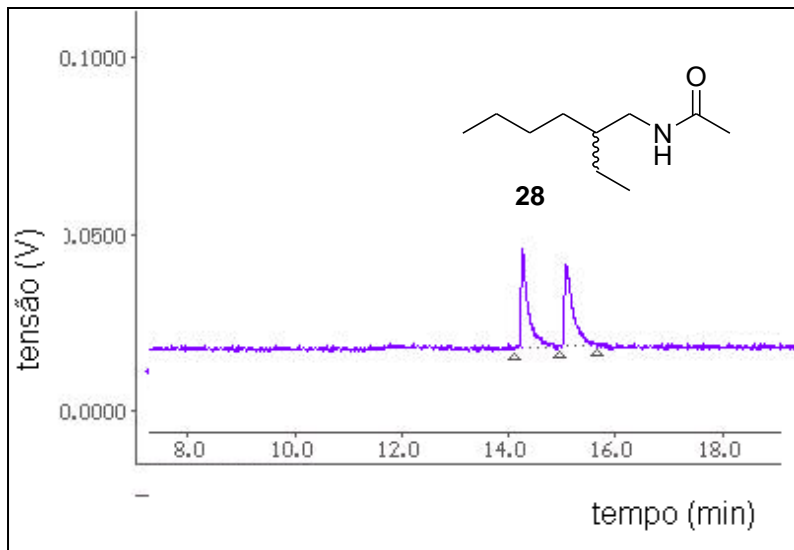
Na **Figura 62**, tem-se o espectro de RMN  $^1\text{H}$  da amida (*RS*)-**28**. O singlete em 6,72 ppm (1H) corresponde ao hidrogênio ligado ao nitrogênio da amida ( $\text{H}_{10}$ ), o duplo dubleto em 3,16 ppm (2H) corresponde aos hidrogênios ligado ao carbono ( $\text{H}_1$ ) e o quinteto em 2,05 ppm (1H) ao hidrogênio ligado ao carbono ( $\text{H}_3$ ), o singlete em 1,99 ppm (3H) é da metila da amida ( $\text{H}_2$ ). Na região de 1,27-1,45 ppm (8H) tem-se um multipletto correspondente as hidrogênios metilênicos ( $\text{H}_4 - \text{H}_7$ ) e em 0,89 ppm (6H) tem-se os hidrogênios das metilas terminais ( $\text{H}_8$  e  $\text{H}_9$ ).



**Figura 62** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da (*RS*)-2-etilhexilacetamida (**28**) (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

O cromatograma da **Figura 63** mostra que os tempos de retenção da amida racêmica (*RS*)-**28** são de 14,3min e 15,1min.

Após a identificação da amida racêmica, determinou-se a rotação óptica específica  $[\alpha]$ . A amida (*RS*)-**28** apresentou rotação óptica específica de 0.



**Figura 63** - Cromatograma da amida (*RS*)-**28**, por CGQ. Condições de análises: Inj. = 230°C, Det. = 230°C, programação: 90°C 3°C/min 150°C 5°C/min 200°C, split 100:1, Pressão do H2 = 75Kpa.

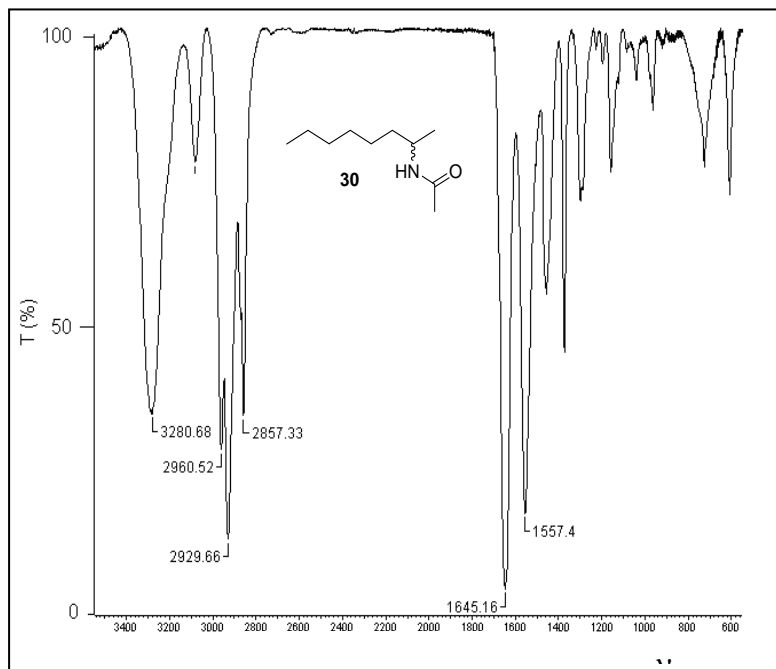
A (*RS*)-2-etilhexilacetamida (**30**) preparada pelo método não enzimático foi também analisada por técnicas espectroscópicas de infravermelhos (IV) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ).

As **Figuras 64, 65 e 66** mostram os espectros de IV e RMN  $^1\text{H}$  e o cromatograma da amida racêmica (*RS*)-**30**.

Através das bandas no espectro de infravermelho e das áreas dos picos no RMN  $^1\text{H}$  das regiões características de hidrogênios, o composto (**30**) foi totalmente caracterizado.

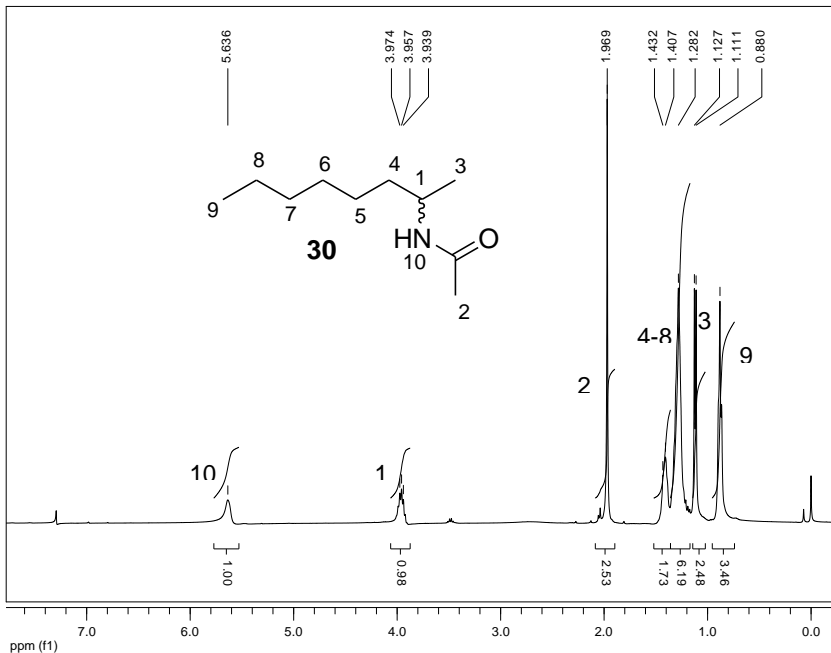
Analisando a **Figura 64**, observam-se as bandas características da (*RS*)-**30**. Na região de  $3280\text{ cm}^{-1}$  tem-se a banda de estiramento da ligação N-H da amida, na região de  $2960 - 2857\text{ cm}^{-1}$  observam-se as bandas de estiramento correspondente ao C-H alifático, e em  $1645\text{ cm}^{-1}$  a de estiramento correspondente a carbonila também da amida (C=O). Em  $1557\text{ cm}^{-1}$  observa-se a banda de deformação de N-H da amida.





**Figura 64** - Espectro de IV da (*RS*)- octan-2-il-acetamida (**30**) (filme).

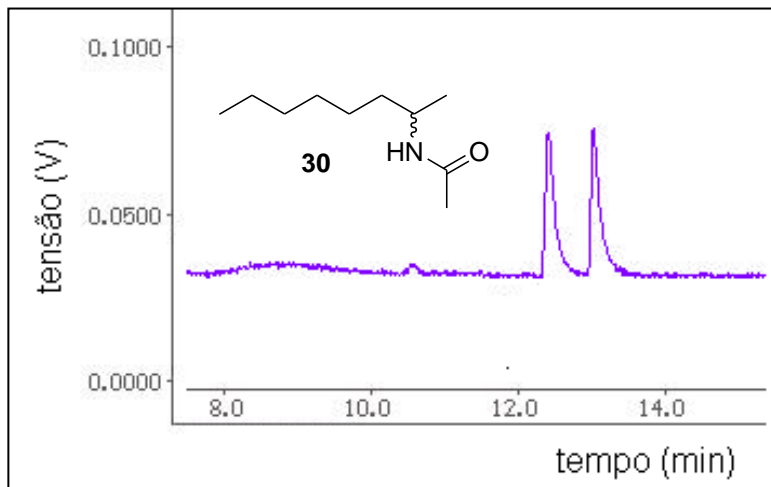
Na **Figura 65**, tem-se o espectro de RMN  $^1\text{H}$  da amida (*RS*)-**30**. O singlete em 5,6 ppm (1H) corresponde ao hidrogênio ligado ao nitrogênio da amida ( $\text{H}_{10}$ ), o quinteto em 3,95 ppm (1H) ao hidrogênio ligado ao carbono ( $\text{H}_1$ ), o singlete em 1,97 ppm (3H) é da metila da amida ( $\text{H}_2$ ), e o dubleto em 1,12 ppm (3H) corresponde aos hidrogênios da metila ligada ao carbono ( $\text{H}_3$ ). Na região de 1,28-1,43 ppm (8H) tem-se um multipletto correspondente as hidrogênios metilênicos ( $\text{H}_4 - \text{H}_8$ ) e em 0,88 ppm (3H) tem-se os hidrogênios da metila terminal ( $\text{H}_9$ ).



**Figura 65** - Espectro de RMN <sup>1</sup>H da (*RS*)- octan-2-il-acetamida (**30**) (400MHz, CDCl<sub>3</sub>).

O cromatograma da **Figura 66** mostra que os tempos de retenção da amida racêmica (*RS*)-**30** são de 12,4min e 13min.

Após a identificação da amida racêmica, determinou-se a rotação óptica específica  $[\alpha]$ . A amida (*RS*)-**30** apresentou  $[\alpha]$  de 0.



**Figura 66** - Cromatograma da amida (RS)-30, por CGQ. Condições de análises: Inj. = 230<sup>o</sup>C, Det. = 230<sup>o</sup>C, programação: 90<sup>o</sup>C 3<sup>o</sup>C/min 150<sup>o</sup>C 5<sup>o</sup>C/min 200<sup>o</sup>C, split 100:1, Pressão do H<sub>2</sub> = 75Kpa.

Após a preparação e caracterização das amidas racêmicas (RS)-28 e (RS)-30, estudou a acilação das aminas isoméricas (RS)-2-etilhexilamina (27) e (RS)-2-aminooctano (29) com diferentes lipases em *n*-hexano ou *n*-heptano.

#### 7.4.1 Avaliação de lipases de diferentes procedências

Nesse estudo, avaliou a acilação das aminas (RS)-2-etilhexilamina (27) e (RS)-2-aminooctano (29) com acetato etila usando diferentes lipases em *n*-hexano ou *n*-heptano.

Para este estudo, foram selecionadas as lipases comerciais de *Pseudomonas* sp. (LPS, PS-D, PS-C), a de *C. antarctica* (CAL-B) e a nativa de *A. niger*.

Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 10**. Ao decorrer da reação foram retiradas alíquotas e analisadas por CGQ. Os dados foram comparados com os padrões racêmicos.

**Tabela 10** - Acilação da (*RS*)-2-etilhexilamina (**27**) e da (*RS*)-2-aminooctano (**29**) com acetato de etila com diferentes lipases

lipases	<i>(RS)</i> -2-etilhexilamina			<i>(RS)</i> -2-aminooctano	
	atividade da lipase (umol/ min mg.) <sup>b</sup>	c (%)	E <sup>c</sup>	c (%)	E <sup>c</sup>
CAL-B	3.04 ± 06	64	1,6	76	117
CAL-B <sup>a</sup>	3.04 ± 06	28	1,3	35	>200
<i>A.niger</i>	0.54 ± 0.03	6	6	nd	nd
LPS	1.58 ± 0.6	2	2,7	nd	nd
LPS-C	2.35 ± 0.3	21	2,0	34	2,3
LPS-D	1.69 ± 0.4	17	4,3	82	1,2

**Condições reacionais:** (*RS*)-2-etilhexilamina (**27**) e (*RS*)-2-aminooctano (**29**) (0,18mL; 2mmol); acetato de etila (0,78mL; 8mmol), *n*-hexano (25mL) ou <sup>a</sup>*n*-heptano (25mL), lipase (50mg), 35°C, 24h.

<sup>b</sup> determinada conforme descrito no item 4.2.1, pág. 45<sup>c</sup> razão enantiomérica

Quando a (*RS*)-2-etilhexilamina (**27**) foi usada na acilação com acetato de etila com as lipases comerciais LPS, LPS-C, LPS-D, CAL-B e a nativa de *A.niger* as conversões a amida racêmica (**28**) foram moderadas, sendo de 2 – 64%, resultando em valores de E entre 1,3 - 6, em *n*-hexano ou *n*-heptano a 35°C em 24h de reação.

Ao utilizar a (*RS*)-2-aminooctano (**29**) com a lipase comercial LPS e a nativa de *A.niger* não foi observada à formação da amida (**30**). Com as lipases LPS-C e LPS-D, a amida (**30**) foi obtida com boas conversões, sendo de 34 e 82%, mas resultando em valores baixos de E, sendo de 1,2 e 2,3, respectivamente em 24h.

Os melhores resultados foram obtidos usando a CAL-B na acilação da (*RS*)-**29** em *n*-hexano ou *n*-heptano. A amida enantiomericamente pura foi obtida com boas conversões sendo de 76 e 35% e bons valores de E sendo de 117 e >200, respectivamente em 24h.

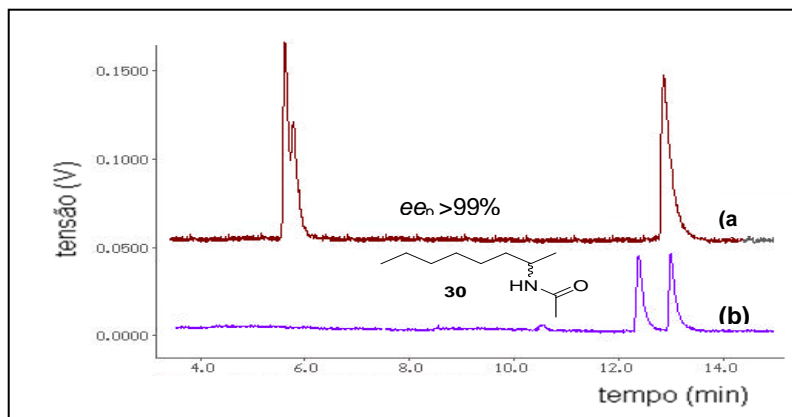
Resultados similares foram obtidos por Davis e *col.* que estudaram a resolução de uma série de aminas alifáticas (2-aminopentano, 2-aminooctano, 2-aminoheptano) e aromática (1-feniletilamina) em vários solventes (*n*-hexano, éter, THF, EtOAc). Ao utilizar a 2-aminooctano com acetato de etila como doador acila e

solvente, a amida-*R* foi obtida com 75% de rendimento e  $ee_p$  de 84,8% em 24h.<sup>36</sup>

Esses resultados mostram a influência do substrato na catálise enzimática. Estas duas aminas apresentam basicidade similar. No entanto, a amina (*RS*)-**29** é um pouco mais reativa que a (*RS*)-**27**, devido ao menor impedimento estéreo causado pelo grupo etila da amina (*RS*)-**27**. Além disso, a amina (*RS*)-**29** pode ter o seu acesso facilitado ao sítio ativo da enzima, devido ao centro quiral estar diretamente ligado ao grupo amina, enquanto que a amina (*RS*)-**27** tem o centro quiral no carbono  $\beta$  em relação ao grupo reativo.

Na **Figura 67**, observa-se a formação do produto e separação dos reagentes de uma alíquota da acilação da (*RS*)-**29** com acetato de etila catalisada pela CAL-B em *n*-heptano, em 24h de reação, comparado com o padrão do composto racêmico.

Baseado em relatos da literatura postula-se que o enantiômero formado é a amida (*R*). No entanto, não é possível afirmar com total seguridade, uma vez que produto não foi isolado e também não foi preparado o padrão quiral.



**Figura 67** - Cromatograma de uma alíquota de reação de acilação (*RS*)-**29** com acetato de etila catalisada pela CAL-B, em *n*-heptano, 24h, 35°C, por CGQ (a), padrão racêmico da amida (*RS*)-**30** (b). Condições de análise: Inj. = 230°C, Det. = 230°C, programação: 90°C 3°C/min 150°C 5°C/min 200°C, split 100:1, pressão do H<sub>2</sub> = 75Kpa.

A interpretação destes resultados, ainda requer muita atenção, pois outras condições experimentais devem ser testadas. Além disso, as amidas quirais devem ser preparadas pelo método químico e purificadas para serem utilizadas como padrões e assim determinar a rotação óptica de cada composto e o enantiômero que está sendo formado na reação biocatalisada.

Os dados obtidos neste trabalho mostraram que amidas enantiomericamente puras podem ser obtidas a partir da acilação enzimática de amins alifáticas ou aromática. No entanto, a relação meio-enzima-substrato é de grande relevância. A escolha adequada das lipases, bem como o suporte no qual esta será imobilizada, a estrutura dos substratos e dos doadores acila, o uso de solventes orgânicos de diferentes polaridades puros ou em misturas com os vários LIs, e se as reações serão realizadas sob aquecimento convencional ou em irradiação por microondas são fatores primordiais para o processo biocatalítico e determinantes da viabilidade do mesmo. Atualmente procuram-se metodologias científicas que contribuam para uma química mais limpa e que não sejam prejudiciais ao meio ambiente.

## 8 Conclusões

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

### Acilação da (RS)-feniletilamina (4):

- Na acilação da (RS)-4 com acetato de etila (1:4 amina:acetato de etila) em *n*-hexano com as lipases LPS, PS-D e PS-C e a nativa de *R. oligosporus* não houve seletividade e a *R*-amida foi obtida com conversões baixas.
- Os melhores resultados foram obtidos ao utilizar a CAL-B com *n*-hexano, *n*-heptano, *tert*-butanol, clorofórmio e diclorometano. A (*R*)-amida foi obtida com conversões de 2-45%,  $ee_p$  de 14->99%, e E de 1,5->200 em 24-96h, sendo a reação mais eficiente em *n*-heptano ( $c = 23-45\%$ ,  $ee_p > 99\%$  e  $E > 200$ ). Ao utilizar a lipase nativa de *A.niger*, a (*R*)-amida foi obtida com conversões de 1-30%,  $ee_p$  de 27->99% e E de 2,4->200, em *n*-hexano ou *n*-heptano. A temperatura mais adequada foi de 35°C.
- O uso dos sistemas bifásicos diclorometano:[BMIm][X] ou clorofórmio:[BMIm][X] ( $X=PF_6, BF_4, Cl$  e  $SCN$ ) com a CAL-B, foram os mais eficientes em comparação com o solvente puro. Com o sistema diclorometano:[BMIm][X], o efeito dos ânions diminuiu na ordem de  $Cl^- > SCN^- > BF_4^- > PF_6^-$ . Com o sistema clorofórmio:[BMIm][X], o efeito dos ânions diminuiu na ordem de  $PF_6^- > BF_4^- > SCN^- > Cl^-$ .
- Ao avaliar o efeito dos cátions nos LIs com as misturas *n*-hexano:[BMIm][X] ou *n*-hexano:[BMPi][X] ( $X = PF_6$  ou  $BF_4$ ), os melhores resultados foram obtidos com as misturas de *n*-hexano:[BMIm][ $PF_6$ ] e/ou *n*-hexano:[BMPi][ $PF_6$ ]. O efeito do cátion foi na seguinte ordem  $[BMPi]PF_6 > [BMIm][PF_6] > [BMIm] [BF_4] > [BMPi][BF_4]$ .

➤ Ao utilizar as misturas de *n*-heptano:[BMIm][BF<sub>4</sub>] e *n*-heptano:[BMIm][PF<sub>6</sub>] na acilação da (*RS*)-**4** com acetato de vinila com a lipase nativa de *A.niger*, os resultados foram melhores que ao utilizar o solvente puro. As conversões, *ee*<sub>p</sub> e E foram de 27 e 49%, 62 e 73% e 7 e 9, respectivamente. Com o *n*-heptano puro a conversão foi de 58%, *ee*<sub>p</sub> de 22% e E de 2, ambas, em 30min. Com *n*-heptano:[BMIm][SCN] e *n*-heptano:[BMIm][Cl], os resultados foram similares aos obtidos em *n*-heptano puro, e o efeito dos ânions diminuiu na ordem de PF<sub>6</sub><sup>-</sup> > BF<sub>4</sub><sup>-</sup> > SCN<sup>-</sup> > Cl.

### Acilação da (*RS*)-*sec*-butilamina (**25**)

➤ Quando as lipases comerciais LPS livre ou imobilizada em filmes de amido de inhame ou cará e de gelatina e as lipases LPS-D e LPS-C na acilação da (*RS*)-**25** com acetato de etila (1:1) foram empregadas, as conversões a amida racêmica (**26**) e a seletividade foram baixas. Os melhores resultados foram obtidos ao utilizar as lipase de *C. antarctica* (CAL-B) e a nativa de *A.niger* sendo que a (*R*)-amida foi formada com conversões de 17-57% e 15 a 46% e E de 11-30 e 10 a 32, respectivamente.

➤ Ao utilizar a lipase nativa de *A.niger* na acilação da (*RS*)- **25** em aquecimento convencional ou irradiação por microondas, a conversão foi maior ao utilizar a irradiação por microondas. A (*R*)-amida foi formada com conversão 3 vezes maior em irradiação por microondas em relação ao aquecimento convencional a 35°C.

➤ Usando solventes mais apolares (*n*-hexano, *n*-heptano, ciclohexano e tolueno) na acilação da (*RS*)-**25** com a lipase de *A.niger* sob aquecimento convencional ou irradiação por microondas, foram obtidos melhores resultados em comparação com o uso de solventes mais polares como (*t*-BuOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e CHCl<sub>3</sub>). O melhor resultado obtido foi usando *n*-hexano e a (*R*)- amida foi obtida com conversão de 21%, *ee*<sub>p</sub> >99% e E >200 em irradiação por microondas (1min).

➤ Ao utilizar os sistemas *A.niger*/cará, *A.niger*/inhame sob aquecimento convencional ou irradiação por microondas a (*R*)-amida foi obtida com conversões menores (0-30%) em relação ao uso da enzima



na forma livre (13-41%). Com o uso destes sistemas a (*R*)-amida foi obtida com maior seletividade, sendo  $ee_p$  e E de 76- >99% e 10- >200, respectivamente. Além disso, ao utilizar estes sistemas, as conversões a respectiva amida foram maiores em aquecimento sob irradiação por microondas em relação ao convencional.

#### **Acilação da (*RS*)-2-etilhexilamina (27) e (*RS*)-2-aminooctano (29):**

- Quando a (*RS*)-2-etilhexilamina (27) foi usada na acilação com acetato de etila com as lipases comerciais LPS, LPS-C, LPS-D, CAL-B e a nativa de *A.niger*, as conversões a amida racêmica (28) foram moderadas, sendo de 2 – 64%, resultando em valores de E entre 1,3 - 6, em *n*-hexano ou *n*-heptano, a 35°C em 24h.
- Na acilação da (*RS*)-2-aminooctano (29) com as lipases comerciais LPS, LPS-C e LPS-D e a nativa de *A.niger*, as conversões a amida (30) foram de 34 e 82% e E de 1,2 e 2,3, em 24h.
- Os melhores resultados foram obtidos usando a CAL-B na acilação da (*RS*)-29 em *n*-hexano ou *n*-heptano. A amida foi obtida com conversões de 76 e 35% e E de 117 e >200, respectivamente em 24h.
- Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que dependendo da escolha adequada das condições experimentais, tais como fonte de lipase, substrato e solvente as amidas podem ser obtidas com altas conversões e excessos enantioméricos.
- Os líquidos iônicos apresentaram a vantagem de aumentar a enantiosseletividade da enzima, tornando-os atrativos para o uso em reações biocatalisadas. Outro fator relevante, é que a utilização de enzimas imobilizadas apresenta muitas vantagens em relação à forma livre, e além de proteger o biocatalisador diante dos solventes orgânicos, estes suportes podem ser reutilizados. Atualmente a irradiação por microondas vem se tornando uma ferramenta potente no campo da biocatálise, com a vantagem de tornar as reações mais rápidas, limpas e com melhores conversões e seletividade. Estas condições são fatores primordiais para o sucesso de um determinado processo biocatalítico.

## 9 Perspectivas

- Utilizar a lipase nativa de *A.niger* livre ou imobilizada em filmes de amido, bem como outros suportes na resolução da (*RS*)-feniletilamina, (*RS*)-2-aminooctano e (*RS*)-2-etilhexilamina com diferentes doadores acila sob irradiação por microondas.
- Avaliar a influência da imobilização das lipases nativas ou comerciais em líquidos iônicos e sob irradiação por microondas na acilação das aminas (*RS*)-feniletilamina, (*RS*)-2-aminooctano e (*RS*)-2-etilhexilamina
- Preparar as amidas quirais derivadas das aminas (*R*)-2-aminooctano e (*R*)-2-etilhexilamina, para poder identificar corretamente qual a amida está sendo formada na catálise enzimática.
- Utilizar os fungos oriundos da região amazônica, bem como outras fontes de lipases nativa na acilação das aminas alifáticas e aromáticas.

## 10 Referências Bibliográficas

- [1] (a) Carvalho, O.P.; Calafatti, S.A.; Marassi, M.; Da Silva, D.M.; Contesini, F.J.; Bizaco, R. Potential of enantioselective biocatalysis by microbial lipases. *Quím. Nova* **2005**, 28, 4, 614-621. (b) Demirjian, D.C.; Shah, P.C.; Moris-Vas, F. From discovery to application. *Biocatalysis* **1999**, 200, 1-29
- [2] Da Silva, V.F.; Contesini, F.J.; Carvalho, P.O. Characterization and catalytic activity of free and immobilized lipase from *Aspergillus niger* a comparative study. *J. Braz. Chem. Soc.* **2008**, 19, 1468-1474.
- [3] Zanotto, S.P.; Romano, I.P.; Lisboa, L.; Duvoisin Jr.S.; Martins, M.K.; Lima, F.A.; Silva, S.F.; Albuquerque, P.M. Potential application in biocatalysis of mycelium-bound lipases from amazonian fungi. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, 20, 1046-1059.
- [4] Campbell, M.K. *Biochemistry* **1995**, Saunders College Publishing, cap. 5, 169-170.
- [5] Palmer, T. *Understanding Enzymes* **1995**, Prentice Hall-Ellis Horwood, 67-75
- [6] Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry* **1997**, 3<sup>rd</sup> Ed., Springer – Verlag, New York, cap. 1 e 2, 1-116.
- [7] Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Lehninger: Principles of Biochemistry* **2000**, 3<sup>o</sup> Ed., Worth Publishers: New York, cap. 8, 244-292.
- [8] Campbell, N.A.; Reece, J.B.; *Biology* **2002**, 6<sup>th</sup> Ed. San Francisco; Benjamin Cummings.
- [9] Paques, F.W.; Macedo, G.A. Lipases de látex vegetais: Propriedade e aplicações industriais. *Quím. Nova* **2006**, 29, 1, 93-99.
- [10] Arantes, G. Uma perspectiva computacional sobre catálise enzimática. *Quím. Nova* **2008**, 31, 2, 377-383.
- [11] Nascimento, M.G.; Zanotto, S.P.; Melegari, S.P.; Moran, P.J.S. Estudos de proteção da célula de *Saccharomyces cerevisiae* para utilização em reações de redução em meio orgânico. *Quím. Nova* **2002**, 25, 567-571.
- [12] Villeneuve, P.; Muderhwa, J.M.; Graille, J.; Hass, M.J. Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, 9, 113-148.

- [13] Haki, G.D.; Rakshit, S.K. Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. *Bioresour. Technol.* **2003**, 89, 17-34.
- [14] Wen, S.; Tan, T.; Yu, M. Immobilized lipase YILip2-catalyzed resolution of ( $\pm$ ) $\alpha$ -phenylethylamine in a medium organic cosolvent. *Process Biochem.* **2008**, 43, 1259-1264.
- [15] (a) Wang, Y.; Li, Q.; Zhang, Z.; Ma, J.; Feng, Y. Solvents effects on the enantioselectivity of the thermophilic lipase QLM in the resolution of (*R,S*)-2-octanol and (*R,S*)-2-pentanol. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, 56, 146-150.(b) Solares, L.F.; Brieva, R.; Quirós, m.; Llorente, I.; Bayod, M.; Gotor, V. Enzymatic resolution of a quaternary stereogenic centre as the key step in the synthesis of (*S*)-(+)-citalopran. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, 15, 341-345.
- [16] Zhao, H.; Baker, G.A.; Song, Z.; Olubajo, O.; Zanders, L.; Campbell, S.M. Effect of ionic liquid properties on lipase stabilization under microwave irradiation. *J. Mol. Catal B: Enzym.* **2009**, 57, 149-157.
- [17] [www.rcsb.org/pdb/](http://www.rcsb.org/pdb/). Acessada em junho de 2010.
- [18] Wooley, P.; Petersen, S.B.; Lipases their structure. Biochemistry and application **1994**, Cambridge University Press, cap. 7, 139-180.
- [19] Jaeger, K.E.; Reetz, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* **1998**, 16, 396-403.
- [20] Pandey, A.; Soccol, C.R.; Selvakumar, P.; Thomaz-Soccol, V.; Krieger, N.; Fontana, J.D. Recent developments in microbial inulinases – its production, properties and industrial applications. *App. Biochem. Biotechnol.* **1999**, 81, 35-52.
- [21] Baron, A.M.; Sarquis, M.I.M.; Baigori, M.; Mitchell, D.A.; Krieger, N. A comparative study of the synthesis of *n*-butyl-oleate using a crude lipolytic extract of *Penicillium corylophilum* in water-restricted environments. *J. Mol. Catal.B: Enzym.* **2005**, 34, 25-32.
- [22] Messias, J.M.; Da Costa, B.Z.; De Lima, V.M.G.; Dekker, R.F.H.; Rezende, M.I.; Krieger, N.; Barbosa, A.M. Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. *Enzym. Microb. Technol.* **2009**, 45, 426-431.
- [23] Ghanem, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron* **2007**, 63, 1721-1754.

- [24] Gill, I.I.; Das, J.; Patel, R.N. Enantioselective enzymatic acylation of 1-(3'- bromophenyl) ethylamine. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, 18, 1330-1337.
- [25] Yadav, G.D.; Lathi, P.S. Synergism between microwave and enzyme catalysis in intensification of reactions and selectivities: Transesterification of methyl acetoacetate with alcohols. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2004**, 223, 51-56.
- [26] Chojnacka, A.; Obara, R.; Wawrzńczyk, C. Kinetic resolution of racemic secondary aliphatic allylic alcohols in lipase-catalyzed transesterification. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, 18, 101-107.
- [27] Singh, M.; Singh, R.S.; Banerjee, U.C. Stereoselective synthesis of (*R*)-1-chloro-3(3,4-difluorophenoxy)-2-propanol using lipases from *Pseudomonas aeruginosa* in ionic liquid-containing system. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, 56, 294-299.
- [28] Wang, P.Y.; Tsai, S.W. Enzymatic hydrolytic resolution of (*R,S*)-tropic acid esters and (*R,S*)-ethyl  $\alpha$ -methoxyphenyl acetate in biphasic media. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, 57, 158-163.
- [29] McNulty, J.; Krishnamoorthy, V.; Robertson, A. Direct formation of esters and amides from carboxylic acids using diethyl chlorophosphate in pyridine. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 6344-6347.
- [30] Karnik, A.V.; Kamath, S.S. Enantioselective benzylation of racemic amines using chiral benzimidazolide as a benzoylating agent. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, 19, 45-48.
- [31] Bitencourt, T.B.; Nascimento, M.G.; Chemo-enzymatic synthesis of N-alkyloxaziridines mediated by lipases and urea-hydrogen peroxide. *Green Chem.* **2009**, 11, 209-214.
- [32] Stirling, M.; Blacker, J.; Page, M.I. Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of secondary amines. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 1247-1250.
- [33] Shaabani, A.; Soleimani, E.; Rezayan, A.H. A novel approach for the synthesis of aryl amides. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 6137-6141.
- [34] Korolkovas, A.; Burckhalter, J.H. *Química Farmacêutica* **1982** Ed. Guanabara Dois S.A, 186-187.
- [35] Solomons, T.W.G. *Química Orgânica*, **2000** 7ªEd. New York: John Wiley & Sons, Cap.5, 162-177 e Cap. 20, 232-234.

- [36] Davis, A.B.; Durden, D.A. Resolution of chiral aliphatic and arylalkyl amines using immobilized *Candida antarctica* lipase and isolation of their *R*- and *S*-enantiomers. *Synth. Comm.* **2001**, 31, 569-578.
- [37] Schmid, R.D.; Verger, R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem.* **1998**, 37, 1608-1633.
- [38] Uppenberg, J.; Ohmer, N.; Norin, M.; Hult, K.; Kleywegt, G. J. Patkar, S.; Waagen, V.; Anthomen, T.; Jones, A. T. Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochem.* **1995**, 34, 16838.
- [39] Kuwahara, K.; Angkawidjaja, C.; Matsumura, H.; Koga, Y.; Takano, K.; Kanaya, S. Importance of the Ca<sup>2+</sup>-binding sites in the N-catalytic domain of a family 1.3 lipase for activity and stability. *Protein Eng. Desegin. Selection.* **2008**, 21, 737-744.
- [40] Zaks, A.; Klivanov, A.M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 3194-3201.
- [41] Pogoreve, M.; Stecher, H.; Faber, K. A caveat for the use of log *P* values for the assessment of the biocompatibility of organic solvents. *Biotechnol. Lett.* **2002**, 24, 857-860.
- [42] Costa, V.E.U.; De Amorim, H.L.N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: Aspectos gerais sobre a influência do solvente. *Quim. Nova* **1999**, 22, 863-873.
- [43] Tutar, H.; Yilmaz, E.; Pehlivan, E.; Yilmaz, M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on sporollenin from *Lycopodium clavatum*. *Int. J. Biol.Macromol.* **2009**, 45, 315-320.
- [44] Pirozzi, D.; Fanelli, E.; Aronne, A.; Pernice, P.; Mingione, A. Lipase entrapment in a zirconia matrix: Sol-gel synthesis and catalytic properties. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, 59, 116-120.
- [45] Nascimento, M.G.; Dalla-Vechia, R.; Soldi, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Quím. Nova* **2004**, 27, 623-630.
- [46] Sebrão, D.; Silva, V.D.; Nascimento, M.G.; Moreira, M. Imobilização de lipases em filme de caseinato de sódio/glicerol: Aplicação na síntese de ésteres. *Quím. Nova*, **2007**, 30, 5, 1182-1187.

- [47] Mateo, C.; Palomo, J.M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J.M.; Fernandez-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity *via* immobilization techniques. *Enzym. Microb. Technol.* **2007**, 40, 1451-1463.
- [48] Deng, H.T.; Lin, Y.; Wang, J.J.; Liu, Z.Y.; Ma, M.; Zheng, F. Comparative study on the immobilization of lipase on chitosan gels modified by different hydrophobic groups. *Surf. Rev. Lett.* **2009**, 2, 323-327.
- [49] Rodrigues, R.C.; Godoy, C.A.; Volpato, G.; Ayub, M.A.Z.; Lafuente, R.F.; Guisan, J. M. Immobilization-stabilization of the lipase from *Thermomyces lanuginosus* critical role of chemical amination. *Process Biochem.* **2009**, 44, 963-968.
- [50] Song, X.; Qi, X.; Qu, Y. Resolution of (*R,S*)-( $\pm$ )-glycidyl butyrate with immobilized Y-11 *Trichosporon capitatum* lipase in gelatin-containing microemulsion-based organogels. *Coll. Surf. B: Biointerf.* **2008**, 67, 127-131.
- [51] Lopez, F.; Venditti, F.; Cinelli, G.; Ceglie, A. The novel hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) based organogel as reactor for ester synthesis by entrapped *Candida rugosa* lipase. *Process Biochem.* **2006**, 41, 114-119.
- [52] Jegannathan, K.R.; Chan, E.S.; Ravindra, P. Physical and stability characteristics of *Burkholderia cepacia* lipase encapsulated in K-carrageenan. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, 58, 78-83.
- [53] Baron, A.M.; Sarquis, M. I. M.; Baigori, M.; Michell, D. A.; Kriger, N. A comparative study of the synthesis of *n*-butyl-oleate using a crude lipolytic extract of *Penicillium coryophilum* in water-restricted environments. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2005**, 34, 25-32.
- [54] Fernandes, M.L.; Krieger, N.; Baron, A.M.; Zamora, P.P.; Ramos, L.P.; Michell, D. A. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, 30, 43-49.
- [55] Fehér, E.; Illeová, V.; Kelemen-Horváth, I.; Bélafi-Bakó, K.; Polakovic, M.; Gubicza, L. Enzymatic production of isoamyl acetate in an ionic liquid-alcohol biphasic system. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, 50, 28-32.
- [56] Volpato, G.; Filice, M.; Rodrigues, R.C.; Heck, J.X.; Guisan, J.M.; Mateo, C.; Ayub, M.A.Z. Modulation of a lipase from *Staphylococcus*

- warneri* EX17 using immobilization techniques. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, 60, 125-132.
- [57] Jiang, Y.; Guo, C.; Xia, H.; Mahmood, I.; Liu, C.; Liu, H. Magnetic nanoparticles supported ionic liquid for lipase immobilization: Enzyme activity in catalyzing esterification. *J. Mol.Catal. B: Enzym.* **2009**, 58, 103-109.
- [58] Liu, C.H.; Lin, Y.H.; Chen, C.Y.; Chang, J.S. Characterization of *Burkholderia* lipase immobilized on celite carriers. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2009**, 40, 359-363.
- [59] Li, Y.; Zhou, G.; Li, C.; Qin, D.; Quão, W.; Chu, B. Adsorption and catalytic activity of porcine pancreatic lipase on rod-like SBA-15 mesoporous material. *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects.* **2009**, 341, 79-85.
- [60] Barreto, P.L.M.; Pires, A.T.N.; Soldi, V. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. *Polymer Degradation and Stability* **2003**, 79, 147-152
- [61] Dave, R.; Madamwar, D. Esterification in organic solvents by lipase immobilized in polymer of PVA–alginate–boric acid. *Process Biochem.* **2006**, 41, 951-955.
- [62] Chakraborty, S.; Sahoo, B.; Teraoka, I.; Miller, L.M.; Gross, R.A. Enzyme-catalyzed regioselective modification of starch nanoparticles. *Macromol.* **2005**, 38, 61-68.
- [63] Javakody, L.; Hoover, R. Effect of annealing on the molecular structure and physicochemical properties of starches from different botanical origins – A review. *Carbohydrate Polym.* **2008**, 74, 691-703.
- [64] Tester, R.F.; Karkalas, J.; Qi, X. Starch-composition, fine structure and architecture. *J. Cereal Sci.* **2004**, 39, 151-165.
- [65] Tan, H.Z.; Li, Z.G.; Tan, B. Starch noodles: history, classification, materials, processing, structure, nutrition, quality evaluating and improving. *Food Res. Inter.* **2009**, 42, 551-576.
- [66] Dong, Z.; Wang, O.; Du, Y. Alginate/gelatin blend films and their properties for drug controlled release. *J. Memb. Sci.* **2006**; 280: 37-44.
- [67] Arvanitoyannis, I.S.; Nakayama, A.; Aiba, S. Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. *Carboh. Polym.* **1998**; 37, 371-382.



- [68] Chiellini, E.; Cinelli, P.; Fernabdes, E.G.; Kenawy, E.R.S.; Lazzeri, A. Gelatin-based blends and composites. morphological and thermal mechanical characterization. *Biomacromol.* **2001**, 2, 806-811.
- [69] Ghisleni, C.P. Influência da adição de probiótico (*Lactobacillus rhamnosus*), fibra de trigo e gelatina nas características físico-químicas e sensoriais do queijo prato durante a maturação. Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos da Uri-Campus Erechim. **2008**.
- [70] Devi, A.V.; Lahari, C.; Swarnalatha, L.; Fadnavis, N.W. Gelozymes in organic synthesis. Part IV: Resolution of glycidate esters with crude bean (*Phaseolus radiatus*) epoxide hydrolase immobilized in gelatin matrix. *Tetrahedron: Asymmetry.* **2008**, 19, 1139-1144.
- [71] Silverman, R.B. The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions. San Diego: Academic Press, **2000**. 717.
- [72] Pilli, R.A. Catálise assimétrica e o prêmio Nobel de 2001. Novos paradigmas e aplicações práticas. *Quím. Nova Esc.* **2001**, 14, 22-31.
- [73] Lorenz, H.; Perlberg, A.; Sapoundjiev, D.; Elsner, M.P.; Morgenstern, A.S. Crystallization of enantiomers. *Chem. Eng. Process.* **2006**, 45, 863-873.
- [74] Contesini, F.J.; Carvalho, P.O. Esterification of (*RS*)-Ibuprofen by native and commercial lipases in a two-phase system containing ionic liquids. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, 17, 2069-2973.
- [75] Torre, O.; Fernández-Gotor, V.; Gotor, V. Lipase-catalyzed resolution of chiral 1,3-amino alcohols: application in the asymmetric of (*S*)-dapoxetine. *Tetrahedron:Asymmetry* **2006**, 17, 860-866.
- [76] Torres-Gavilán, A.; Escalante, J.; Regla, I.; López-Munguía, A.; Castillo, E. 'Easy-on, easy-off' resolution of chiral 1-phenylethylamine catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, 18, 2621-2624.
- [77] Ismail, H.; Lau, R.M.; Van Langen, L.M.; Van Rantwijk, F.; Svedas, V.K.; Sheldon, R.A. A green fully enzymatic procedure for amine resolution, using a lipase and a *penicillin G* acylase. *Green Chem.* **2008**, 10, 415-418.
- [78] Goswami, A.; Guo, Z.; Parker, W.L.; Patel R.N. Enzymatic resolution of *sec*-butylamine. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, 16, 1715-1719.

- [79] Parvulescu, A.N.; Van Der Eycken, E.; Jacobs, P.A.; De Vos, D.E. Microwave-promoted racemization and dynamic resolution of chiral amines over Pd on alkaline earth support and lipases. *J. Catal.* **2008**, 255, 206-212.
- [80] Sih, C.J.; Wu, S.H. Resolution of enantiomers *via* biocatalysis. *Topics Stereochem.* **1989**, 19, 63-125.
- [81] Chen, C.S.; Fujimoto, Y.; Girdaukas, G.; Sih, C.J. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolution of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 7294.
- [82] Aitken, R.A., Kilényi, S.N. *Asymmetric Synthesis 1992* 1<sup>st</sup>, Ed. L.C. Hall. 233.
- [83] Snyder, L.R.; Kirkland, J.J.; Glajch, J.L. *Practical HPLC Method Development.* **1997** New York.: John Wiley & Sons. 765.
- [84] Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P.S. Fundamentos de Cromatografia **2006**, Ed. Unicamp, Campinas, SP, Cap. 5, 241-244.
- [85] Marples, B.A. *Elementary Organic Stereochemistry and Conformational Analysis*, **1981**, vol.34. London: The Royal Society of Chemistry, 82.
- [86] Degani, A.L.; Cass, Q.B.; Vieria, P.C. Cromatografia: um breve ensaio. *Quím. Nova Esc.* **1998**, 7, 21-25.
- [87] 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.
- [88] Machida, Y.; Nishi, H.; Nakamura, K.; Nakai, H.; Sato, T. Enantiomers separation of amino compounds by a novel chiral stationary phase derived from crown ether. *J. Chromatogr. A.* **1998**, 805, 85-92.
- [89] Da Silva, E.F.; Conceição, M.; Ramos, K.V.; Radler, F.; Neto, A. Utilização de derivados de ciclodextrinas como fase estacionária quiral em cromatografia gasosa de alta resolução. *Quim. Nova* **1996**, 19, 473-479.
- [90] Ethur, E.M. Síntese e Caracterização de  $\beta$ - e  $\gamma$ -Ciclodextrinas Modificadas como Fases Estacionárias Quirais em Cromatografia Gasosa Capilar Enantiosseletiva. Tese de Doutorado, **2004**, UFSM, Santa Maria-RS.

- [91] Tonhi, E.; Collins, K.E.; Jardim, I.C.S.F.; Collins, C.H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE–FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. *Quím. Nova* **2002**, 25, 4, 616-623.
- [92] De Aragão, N.M.; Veloso, M.C.C.; De Andrade, J.B. Validação de métodos cromatográficos de análise - um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. *Quím. Nova* **2009**, 32, 2476-2481.
- [93] Betti, C.; Landini, D.; Maia, A. Reactivity of anionic nucleophiles in ionic liquids and molecular solvents. *Tetrahedron* **2008**, 64, 1689-1695.
- [94] Vidya, P.; Chadha, A. The role of different anions in ionic liquids on *Pseudomonas cepacia* lipase catalyzed transesterification and hydrolysis. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, 57, 145-148.
- [95] Chen, X.; Li, X.; Hu, A.; Wang, F. Advances in chiral ionic liquids derived from natural amino acids. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, 19, 1-14.
- [96] Kaar, J.L.; Jesionowski, A.M.; Berberich, J.A.; Moulton, R.; Russell, A.J. Impact of ionic liquid physical properties on lipase activity and stability. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4125-4131.
- [97] Kim, K.; Song, B.; Choi, M.; Kim, M.J. Biocatalysis in ionic liquids: Markedly enhanced enantioselectivity of lipase. *Org. Lett.* **2001**, 3, 10, 1507-1509.
- [98] Yang, Z.; Pan, W. Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis. *Enzym. Microb. Technol.* **2005**, 37, 19-28.
- [99] Person, M.; Bomscheuer, U.T. Increased stability of an esterase from *Bacillus stearothermophilus* in ionic liquids as compared to organic solvents. *J. Mol. Catal.: B Enzym.* **2003**, 22, 21-27.
- [100] Rantwijk, F.V.; Sheldon, R.A. Biocatalysis in ionic liquid. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 2757-2785.
- [101] Zhao, H.; Campbell, S.M.; Jackson, L.; Song, Z.; Olubajo, O. Hofmeister series of ionic liquids: Kosmotropic effect of ionic liquids on the enzymatic hydrolysis of enantiomeric phenylalanine methyl ester. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, 17, 377-383.

- [102] Zhao, H. Effect of ions and other compatible solutes on enzyme activity, and its implication for biocatalysis using ionic liquids. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2005**, 37, 16-25.
- [103] Zhang, Y.; Cremer, P.S. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Curr. Opin. Chem. Biology.* **2006**, 10, 658-663.
- [104] <http://www.iupac.org/web/ins/2003-020-2-100>, Acessada em junho de 2010.
- [105] Erbedinger, M.; Mesiano, A.J.; Russel, A.J. Enzymatic catalysis of formation of *Z*-aspartame in ionic liquid - An alternative to enzymatic catalysis in organic solvents. *Biotechnol. Prog.* **2000**, 16, 1129-1131.
- [106] Irimescu, R.; Kato, K. Investigation of ionic liquids as reaction media for enzymatic enantioselective acylation of amines. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, 30, 189-194.
- [107] Fang, Y.; Huang, W.; Xia, Y.M. Consecutive microwave irradiation induced substrate inhibition on the enzymatic esterification. *Process Biochem.* **2008**, 43, 306-310.
- [108] Fang, Y.; Sun, S.Y.; Xia, Y.M. The weakened 1,3-specificity in the consecutive microwave assisted enzymatic synthesis of glycerides. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, 55, 6-11.
- [109] Huang, W.; Xia, Y.M.; Gao, H.; Fang, Y.J.; Wang, Y.; Fang, Y. Enzymatic esterification between *n*-alcohol homologs and *n*-caprylic acid in non-aqueous medium under microwave irradiation. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2005**, 35, 113-116.
- [110] <http://www.portalabpg.org.br>. Coutinho, R.C.C.; Moreira, E.M.; Pinho, A.R.; Cardoso, M.J.B.; Da Silva, C.R.R.; Da Cunha, P.S.D.; Alt, G.P. Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás – IBP. Trabalho Técnico Científico preparado para apresentação no 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, realizado no período de 2 a 5 de outubro de 2005, Salvador, BA.
- [111] R'ejasse, B.; Bessonon, T.; Legoy, M.D.; Lamare, S. Influence of microwave radiation on free *Candida antarctica* lipase B activity and stability. *Org. Biomol. Chem* **2006**, 4, 3703–3707
- [112] Sanseverino, A.M. Microondas em síntese orgânica. *Quím. Nova* **2002**, 25, 660-667.

- [113] Kappe, C.O. Microwave dielectric heating in synthetic organic chemistry *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 1127–1139.
- [114] Young, D.D.; Nichols, J.; Kelly, R.M.; Deiters, A. Microwave activation of enzymatic catalysis *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 10048–10049.
- [115] Yu, D.; Wang, Z.; Chen, P.; Jin, L.; Cheng, Y.; Zhou, J.; Cao, S. Microwave-assisted resolution of (*R,S*)-2-octanol by enzymatic transesterification. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2007**, 48, 51–57.
- [116] Gedye, R.; Smith, F.; Westaway, K.; Ali, H.; Baldisera, L.; Laberge, L.; Rousell, J. The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 279.
- [117] Giguere, R.J.; Bray, T.L.; Duncan, S.M.; Majetich, G. Application of commercial microwave ovens to organic synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 4945.
- [118] De Souza, R.O.M.A.; Antunes, O.A.C.; Kroutil, W.; Kappe, C.O. Kinetic resolution of *rac*-1-phenylethanol with immobilized lipases: a critical comparison of microwave and conventional heating protocols. *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 6157–6162.
- [119] Vacek, M.; Zarevúcka, M.; Wimmer, Z.; Stransky, K.; Demnerova, K.; Legoy, M. D. Selective enzymatic esterification of free fatty acids with *n*-butanol under microwave irradiation and under classical heating. *Biotechnol. Lett.* **2000**, 22, 1565–1570.
- [120] Thomson, C.A.; Delaquis, P.J.; Mazza, G. Detection and measurement of microbial lipase activity: A review. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* **1999**, 39, 165–187.
- [121] Hoffmann, I. Imobilização de lipases em filmes de amido: Preparação de ésteres de aroma derivados do geraniol e resolução enzimática do (*RS*)-1-feniletanol. Dissertação de Mestrado, **2010**, UFSC, Florianópolis-SC.
- [122] Morita, T.; Assumpção, R.M.V. Manual de Soluções, Reagentes e Solventes. 2º Ed.. São Paulo : Edgard Blucher LTDA, **1972**. p. 316.
- [123] Catálogo Aldrich. Desenvolvimento e ciência, 2005-2006, 1581.
- [124] Catálogo of organics and fine chemicals, 2004-2005, 79.
- [125] Gonzalez-Sabin, J.; Gotor, V.; Rebollo, F. Kinetic resolution of ( $\pm$ )-trans and ( $\pm$ )-2-phenylcyclopentanamine by CAL-B-catalyzed aminolysis of esters the key role of the leaving group. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, 15, 481–488.

- [126] Lou, W.Y.; Zong, M.H.; Zhang, Y.Y.; Wu, H. Efficient synthesis of optically active organosilyl alcohols *via* asymmetric reduction of acyl silane with immobilized yeast. *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, *35*, 190-196.
- [127] Wang, Y.; Wang, R.; Li, Q.; Zhang, Z.; Feng, Y. Kinetic resolution of rac-alkyl alcohols *via* lipase-catalyzed enantioselective acylation using succinic anhydride as acylating agent. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *56*, 142-145.
- [128] Anthonsen, T.; Hoff, B.H. Resolution of derivatives of 1,2-propanediol with lipase B from *Candida antarctica*. Effect of substrate structure, medium, water activity and acyl donor on enantiomeric ratio. *Chem. Phys. Lipids.* **1998**, *93*, 199-207.
- [129] Nechab, M.; Azzi, N.; Vanthuynne, N.; Bertrand, M.; Gastaldi, S.; Gil, G. Highly selective enzymatic kinetic resolution of primary amines at 80°C: A comparative study of carboxylic acids and their ethyl esters as acyl donors. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6918-6923.
- [130] Chua, L.S.; Sarmidi, M.R. Effect of solvent and initial water content on (*R,S*)-1-phenylethanol resolution *Enzym. Microb. Technol.* **2006**, *38*, 551-556.
- [131] Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veeger, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvent *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, *XXX*, 81-87.
- [132] Lau, R.M.; Sordedraeger, M.J.; Carrea, G.; Rantwijk, F.S.; Sheldon, R.A. Dissolution of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids: effects on structure and activity. *Green Chem.* **2004**, *6*, 483-487.
- [133] Li, Y.; Wang, F.; Tan, T. Effects of alcohols and solvent on the performance of lipase from *Candida* sp. in enantioselective esterification of racemic ibuprofen. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *56*, 126-130.
- [134] Pogorove, M.; Stecher, H.; Faber, K. A caveat for the use of log *P* values for the assessment of the biocompatibility of organic solvents. *Biotechnol. Lett.* **2002**, *2*, 857-860.
- [135] Li, L.; Du, W.; Liu, D.; Wang, L.; Li, Z. Lipase-catalyzed transesterification of rapessed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *43*, 58-62.

- [136] Cygler, M.; Schrag, J.D. Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1441, 205-214.
- [137] Moniruzzaman, M.; Nakashima, K.; Kamiya, N.; Goto, M. Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids. *Biochem. Eng. J.* **2010**, 48, 3, 295-31.
- [138] Yang, Z; Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis. *J. Biotechnol.* **2009**, 144, 12-22.
- [139] De Diego, T.; Lozano, P.; Abad, M.A.; Steffensky, K.; Vaultier, M.; Iborra, J.L. On the nature of ionic liquids and their effects on lipases that catalyze ester synthesis. *J. Biotechnol.* **2009**, 140, 234-241.
- [140] Liu, B.K.; Wang, N.; Chen, Z.C.; Wu, Q.; Lin, X.F. Markedly enhancing lipase-catalyzed synthesis of nucleoside drugs ester by using a mixture system containing organic solvents and ionic liquid. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 3769-3771.
- [141] Lou, W. Y.; Zong, M. H.; Liu, Y. Y.; Wang, J. F. Efficient enantioselective hydrolysis of d,l-phenylglycine methyl ester catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase B in ionic liquid containing systems *J. Biotechnol.* **2006**, 125, 64-74.
- [142] Halubin, M.; Knez, Z. Optimization of (R,S)-1-phenylethanol kinetic resolution over *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, 58, 24-28.
- [143] Zhao, H.; Olubajo, O.; Song, Z.; Sims, A.L.; Person, T.E.; Lawal, R.A.; Holley L.A. Effect of kosmostropicity of ionic liquids on the enzyme stability in aqueous solutions *Bioorg. Chem.* **2006**, 34, 15-25.
- [144] Bachu, P.; Gibson, J.S.; Sperry, J.; Brimble, M.A. The influence of microwave irradiation on lipase-catalyzed kinetic resolution of racemic secondary alcohols. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, 18, 1618-1624.
- [145] Da Silva, F.C.; Ferreira, V.F.; De Souza, M.B.V. Adaptação de forno de microondas doméstico para realização de reações de transesterificação sob refluxo e catálise por argilas *Quim. Nova* **2006**, 29, 376-380.
- [146] Gelens, E.; Smeets, L.; Sliedregt, L.A.J.M.; Van Steen, B.J.; Kruse, C.G.; Leurs, R.; Orru, R.V.A. An atom efficient and solvent-free synthesis of structurally diverse amides using microwaves. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 3751-3754.

[147] Yadav, G.D.; Borkar, I.V. Kinetic and mechanistic investigation of microwave-assisted lipase catalyzed synthesis of citronellyl acetate. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2009**, 48, 7915-7922.

[148] Irimescu, R.; Kato, K. Lipase-catalyzed enantioselective reaction of amines with carboxylic acids under reduced pressure in non-solvent system and in ionic liquids. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 523-525.

## **11 Produções acadêmica (2006-2010)**

### **Produção bibliográfica**

#### **Artigos completos publicados em periódicos**

1. Pilissão, C.; Carvalho, P. O.; Nascimento, M. G.  
Potencial application of native lipases in the resolution of (*RS*)-phenylethylamine. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, 21, 6, 973-977.
2. Pilissão, C.; Carvalho, P. O.; Nascimento, M. G.  
Enantioselective acylation of (*RS*)-phenylethylamine catalysed by lipases. *Process Biochem.* **2009**, 44, 1352 - 1357.
3. Pilissão, C.; Nascimento, M.G.  
Effects of organic solvents and ionic liquids on the aminolysis of (*RS*)-methyl mandelate catalyzed by lipases. *Tetrahedron. Asymmetry*, **2006**, 17, 428 - 433.



## Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. Pilissão, C.; Nascimento, M. G.; Hoffmann, I.; Henriques, R.  
Resolução da (RS)-*sec*-butilamina pela *Aspergillus niger* livre e imobilizada.  
32º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza, CE.
2. Hoffmann, I.; Nascimento, M. G.; Pilissão, C.; Moecke, E.  
Efeito do solvente na obtenção de alcanóatos de geranoíla via enzimática.  
31º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia-SP.
3. Pilissão, C.; Nascimento, M. G.; Henriques, R.  
Imobilização de lipases em filme de gelatina: Utilização em Reações de esterificação. IV Workshop de Biocatálise e Biotransformação, 2008, São Carlos-SP.
4. Hoffmann, I.; Moecke, E.; Nascimento, M. G.; Pilissão, C.  
Influência do solvente orgânico na obtenção dos alcanóatos de benzila. IV Workshop de Biocatálise e Biotransformação, 2008, São Carlos -SP.
5. Pilissão, C.; Nascimento, M. G.; Carvalho, P. O.; Silva, V.C.F.  
Resolução da (RS)-feniletilamina com a lipase de *Aspergillus niger*: IV Workshop de Biocatálise e Biotransformação, 2008, São Carlos-SP.
6. Pilissão, C.; Nascimento, M. G.  
Effect of kosmotropicity on the enzymatic resolution of (RS)-phenylethylamine 12th Brazilian Meeting on Organic Synthesis (12th Bmos), 2007, Itapema-SC.
7. Hoffmann, I.; Henriques, R.; Nascimento, M. G.; Moecke, E.; Pilissão, C.  
Preparação de ésteres derivados do geraniol com lipases imobilizadas em filmes de amido. Encontro de Química da Região Sul (XV SBQSUL), 2007, Ponta Grossa-PR

8. Pilissão, C.; Nascimento, M. G.; Hoffmann, I.; Henriques, R.; Moecke, E.

Preparação de ésteres terpênicos com a lipase de *Pseudomas.sp* imobilizada em filmes de gelatina e amido de cará e inhame. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia-SP.

9. Henriques, R.; Hoffmann, I.; Pilissão, C.; Nascimento, M. G.

Preparação de ésteres derivados do citronelol com lipases imobilizadas em filmes de gelatina. Encontro de Química da Região Sul (XV SBQSUL), 2007, Ponta Grossa-PR.

10. Pilissão, C.; Nascimento, M. G.; Carvalho, P. O.; Contensini, F. J.

Acetilação do geraniol com lipases imobilizadas. II Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones, 2006, São Paulo-SP.

### **Co-orientadora**

#### **Iniciação científica**

1. Rosana Oliveira Henriques. Imobilização de lipases em filmes de gelatina: Aplicação na síntese de ésteres, 2008. Iniciação Científica (BACHARELADO EM QUÍMICA) - Universidade Federal de Santa Catarina.

2. Isabel Hoffmann. Preparação de acetato e/ou alcanóatos de geranoíla utilizando lipases imobilizadas em filmes de amido. 2007. Iniciação Científica (BACHARELADO EM QUÍMICA) - Universidade Federal de Santa Catarina.

### **Atuação profissional**

**Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC**

#### **Vínculo institucional**

**2009 - Atual** Vínculo: Professora Substituta , Enquadramento funcional: Professor , Carga horária: 40h, Regime: Parcial

Atuação em aulas de Química Geral Teórica e Experimental e Química Orgânica A e B.