

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Julyetty Crystyne da Silva

REAÇÕES DE ACILAÇÃO ENANTIOSSELETIVA DE AMINAS E
ÁLCOOL ALIFÁTICOS CATALISADAS POR LIPASES

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação
em Química da Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de Mestre em Química.
Orientador: Prof^ª. Dra. Maria da Graça Nascimento

Florianópolis

2015

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

Silva, Julyetty Crystyne

Reações de acilação enantiosseletiva de aminas e álcool alifáticos catalisadas por lipases / Julyetty Crystyne Silva ; orientadora, Maria da Graça Nascimento - Florianópolis, SC, 2015.

125 p.

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

Inclui referências

1. Química. 2. imobilização. 3. lipases. 4. resolução cinética enzimática. I. Nascimento, Maria da Graça. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Julyetty Crystyne da Silva

REAÇÕES DE ACILAÇÃO ENANTIOSELETIVA DE AMINAS E
ÁLCOOL ALIFÁTICOS CATALISADAS POR LIPASES

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

Florianópolis, 23 de Fevereiro de 2015.

Prof. Hugo Alejandro Gallardo Olmedo, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Prof^a. M^a da Graça Nascimento, Dra.
Orientadora
UFSC

Prof. Luiz A. S. Madureira, Dr
UFSC

Prof. Ricardo José Nunes, Dr.
UFSC

Prof^a. Patricia Bulegon Brondani, Dra.
UFSC-Blumenau

AGRADECIMENTOS

À minha mãe (Márcia), que ainda abre mão de muitos dos seus sonhos para realizar os meus;

Ao meu pai (Maurício), que até o último momento de sua vida nunca deixou de acreditar em mim;

À minha irmã (Juliana), por sempre se fazer presente, mesmo estando sempre longe;

“...Ele era para mim como uma fonte no deserto.” Aos meus amigos, Bruna, Elder, Fernando, Josilene, Juliana, Lígia e Mayara por sempre terem sido a minha fonte no deserto;

À Universidade Federal de Santa Catarina, pelo apoio institucional e pelo ensino de qualidade;

À Prof^a. Dra. Maria da Graça Nascimento, pelo empenho no ensino de química, dedicação, confiança e paciência que teve comigo, além de sempre me incentivar a aprofundar cada vez mais o meu conhecimento;

Ao CNPq, CAPES e INCT-Catálise, pelo suporte e apoio financeiro;

À Amano, Novozymes e Prof.^a Patricia Oliveira Carvalho (USF), pela doação das lipases;

Aos Profs Hernan Terenzi e Bernardo Iglesias, pelo auxílio nas análises e interpretação relacionada a EM;

À Prof^a Cristiane Pilissão, pela preparação dos suportes com nanotubos;

Aos colegas do Laboratório de Biocatálise, principalmente pela companhia de todos os dias;

Aos professores da UFSC, que de alguma forma colaboraram para esta conquista;

À Central de Análises, pelas análises realizadas.

“A imaginação é mais importante que o conhecimento. O conhecimento é limitado, enquanto a imaginação abraça o mundo inteiro...”

Albert Einstein (1929)

RESUMO

Neste trabalho, as lipases comerciais LSD, LAY, LAK, LM, LCR, e as nativas de *A. niger* bruta e LRO, foram imobilizadas em filmes de amido de milho, na presença ou ausência de dextrana. Além destas lipases, também foram utilizadas a CALB e a RM-IM, que são adquiridas imobilizadas.

Estes sistemas, foram utilizados na resolução enantiosseletiva da (\pm)-2-etilhexilamina (**58**) e do (\pm)-mentol (**64**) na presença de acetato de etila ou vinila e propionato de vinila com agentes acilantes. Também foi realizada a acilação régiosseletiva do 2-aminoetanol (**62**) com acetato de vinila.

Testes para a resolução de **58** foram realizados utilizando acetato de etila e diversas lipases em razões molares diferentes. Além disto, *n*-hexano foi combinado aos LIs [BMIm][BF₄] e [BMIm][PF₆]. Os melhores resultados obtidos foram de conversão, *ee_p* e *E* obtidos foram de 42,5 %, 28,8 % e 2,4, respectivamente, ao usar a LBC imobilizada em filme de amido de milho/dextrana, razão molar 1:2 (amina:acetato) e *n*-hexano puro como solvente.

A acilação régiosseletiva de **62** foi realizada com acetato de vinila utilizando a CALB. Os dados obtidos entre os tempos de 0-20 h, mostraram que a reação não foi seletiva, e além do método escolhido para quantificação (EM) não ser o mais adequado, não foi possível a diferenciação entre 2 dos 3 possíveis produtos formados na reação.

Na resolução enantiosseletiva do (\pm)-mentol com o acetato de vinila para a obtenção do acetato de mentila (**73**), entre as lipases testadas, a LAY foi a mais adequada. A reação foi otimizada em 35 °C, 40 mg de LAY e razão molar 1:2 (álcool:acetato de vinila). Nessas condições, obtiveram-se valores de conversão, *ee_s*, *ee_p*, e *E* de 33,6 %, 50,3 %, >99 %, e >200, respectivamente. O solvente mais adequado dentre os testados foi o tolueno e a utilização de mistura entre tolueno e LIs ([BMIm][BF₄], [BMIm][Cl], [BMIm][PF₆], [BMIm][SCN] e [BMIm][Br]) não demonstrou melhora na seletividade da reação. Dentre os amidos e suportes testados para a imobilização da LAY, o filme de amido de milho foi o mais adequado. Este foi usado por 4 vezes, com tempo de estocagem de 71 dias, sendo que **73** foi obtido com conversão, *ee_s*, *ee_p*, e *E* de 7,5 %, 8,2 %, >99 %, e >200, respectivamente.

Na resolução de **64** com propionato de vinila, a lipase mais adequada, entre as testadas foi a LCR. Porém, após imobilização ocorreu uma grande perda na enantiosseletividade da lipase, e a reação apresentou

valores de conversão, ee_s , ee_p , e E de 30,3 %, 25,9 %, 59,5 %, e 5,1, respectivamente, em 48 h. Mesmo tendo otimizado a temperatura (45 °C), massa da LCR (50 mg) e razão molar dos reagentes (1:10), esta reação apresentou $E < 15$, o que é considerado inadequado em uma resolução enzimática.

Salienta-se que o uso de enzimas, e em especial as lipases, é de interesse na obtenção de compostos enantiomericamente puros. Porém, para cada substrato, as condições reacionais devem ser cuidadosamente analisadas.

Palavras chaves: imobilização, lipases, resolução

ABSTRACT

In this work, the commercial lipases BCL, SDL AYL, AKL, ML, CRL, native from *A.niger* and ROL were immobilized in starch films in the presence or absence of dextran. In addition to these enzymes, CALB and the RM-IM, lipases acquired immobilized, were also used

These systems were used in the enantioselective resolution of (\pm)-2-ethylhexylamine (**58**) and (\pm)-menthol (**64**) with vinyl and ethyl acetate or vinyl propionate, as acylating agents. The regioselective acylation of 2-aminoethanol (**62**) with vinyl acetate, was also performed

Several tests were realized for the resolution of **58** with ethyl acetate and various lipases using different molar ratio. Besides, *n*-hexane was used in mixture with ILs [BMIm] [BF₄] or [BMIm] [PF₆]. The highest degree of conversion (42.5 %), *ee_p* (28.8 %) and *E* (2.4) were obtained using BCL immobilized in corn starch film/dextran, a molar ratio of 1:2 (amine: ethyl acetate) and pure hexane as solvent.

The regioselective acylation of **62** was performed with vinyl acetate and CALB. The obtained data (0-20 h), showed that the reaction was not selective. In addition, the method chosen for the products measurements (MS) was not the most suitable and it was not possible to differentiate between the two of the three possible products formed in the reaction.

In the enantioselective resolution of (\pm)-menthol with vinyl acetate for the preparation of menthyl acetate (**73**), AYL was the most appropriate lipase. The reaction was optimized in 35 °C, 40 mg of AYL and a molar ratio of 1:2 (alcohol:vinyl acetate). Under these conditions, the values of conversion degree, *ee_s*, *ee_p* and *E* were of 33.6 %, 50.3 %, >99 %, and >200, respectively. The results showed that the reaction was more efficient using pure toluene, and the use of toluene and ILs [BMIm][BF₄], [BMIm][Cl], [BMIm][PF₆], [BMIm][SCN] and [BMIm][Br] mixtures did not present an improvement in the reaction selectivity.

When starches from different sources or other supports were used for AYL immobilization, the best tested system was corn starch film. This system was used 4 times during 71 days of storage, and **73** was obtained with conversion degree, *ee_s*, *ee_p*, and *E* of 7.5 %, 8.2 %, >99 % and >200.

In the resolution of (\pm)-menthol with vinyl propionate, the most suitable lipase, among the tested, for the preparation of menthyl propionate (**75**) was CRL. However, after immobilization a great loss in the lipase enantioselectivity was observed and the reaction presented

conversion degree, ee_s , ee_p , and E values of 30.3 %, 25.9 %, 59.5 %, and 5.1, respectively, in 48 h. Even after the optimization of the reaction conditions, such as temperature (45 °C), mass of CRL (50 mg) and molar ratio of reagents (1:10), this reaction presented $E < 15$, which is considered inappropriate for an enzymatic resolution.

It is worth of mentioning that the use of enzymes, in particular lipases, is of interest to obtain enantiomerically pure compounds. However, for each substrate, the reaction conditions must be carefully analyzed.

Key words: immobilization, lipases, resolution

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Representação esquemática das estruturas de uma enzima..... | 2 |
| Figura 2. Modelo chave-fechadura..... | 3 |
| Figura 3. Modelo do ajuste-induzido | 3 |
| Figura 4. (a) Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase <i>Psychrobacter</i> sp.; (b) ampliação do sítio ativo da lipase (DE SANTI et al., 2010)..... | 5 |
| Figura 5. Exemplos de métodos de imobilização (adaptado) (MILNER, 2012) | 9 |
| Figura 6. Exemplos de tubérculos e grãos produtores de amido | 13 |
| Figura 7. Estruturas da amilose e amilopectina..... | 14 |
| Figura 8. Enantiômeros <i>R</i> e <i>S</i> da talidomina | 16 |
| Figura 9. Cátions e ânions mais utilizados para formar LIs (adaptado)(MOHAMMAD FAUZI; AMIN, 2012)..... | 19 |
| Figura 10. Estruturas moleculares e dimensões das α -, β -, γ - CD (adaptado)(MORRISON, 2012) | 22 |
| Figura 11. Estruturas gerais de amidas (a) e ésteres (b)..... | 23 |
| Figura 12. Exemplos de amidas com aplicações farmacológicas e na agricultura | 24 |
| Figura 13. Exemplos de ésteres de aroma | 24 |
| Figura 14. Ribavirin (a) e produto da acilação com L-alanina (b) (adaptado) (PATEL, 2012)..... | 25 |
| Figura 15. Filme de amido de milho | 30 |
| Figura 16. Cromatograma do acetato de (\pm)-mentila e (\pm)-mentol (a) e cromatograma de uma alíquota da reação de transesterificação do (\pm)-mentol (3 mmol) com acetato de vinila (6 mmol), 35 °C, 48 h, 40 mg de | |

| | |
|---|----|
| LAY immobilizada em filme de amido de milho e 15 mL de tolueno como solvente (b) | 36 |
| Figura 17. Imagens do filme de amido sem LAY; (a) ampliação 100x; (b) ampliação 250x | 40 |
| Figura 18. Imagens do filme de amido com LAY; (a) ampliação 100x; (b) ampliação 250x; (c) ampliação 500x..... | 41 |
| Figura 19. Variação do ee_p e E em função do tempo utilizando a LBC immobilizada em filme de amido de milho/dextrana como catalisador ■ - ee_p ; ▲ - E | 43 |
| Figura 20. Variação do ee_p e E em função do tempo utilizando a LBC livre como catalisador ■ - ee_p ; ▲ - E | 44 |
| Figura 21. Efeito da razão molar na obtenção de 58 ■ - ee_p ; ▲ - E | 45 |
| Figura 22. Espectro de massas ESI da reação entre o 2-aminoetanol e acetato de vinila | 52 |
| Figura 23. Espectro ESI-MS/MS do pico $m/z = 104$ da reação do 2-aminoetanol com o acetato de vinila..... | 53 |
| Figura 24. Variação da conversão e ee_s em 73 , em função do tempo utilizando a LAY immobilizada em filme de amido como catalisador ■ - conversão; ▲ - ee_s | 58 |
| Figura 25. Variação da conversão e ee_s em 73 , em função da temperatura ■ - conversão; ▲ - ee_s | 60 |
| Figura 26. Variação da conversão e ee_s em 73 , em função da razão molar utilizando a LAY immobilizada como catalisador ■ - conversão; ▲ - ee_s | 61 |
| Figura 27. Variação da conversão e ee_s em 73 , em função da massa de LAY immobilizada ■ - conversão; ▲ - ee_s | 62 |
| Figura 28. Influência do solvente orgânico..... | 64 |

| | |
|--|----|
| Figura 29. Influência de LIs na preparação de 73 | 66 |
| Figura 30. Influência do uso diferentes amidos na imobilização de LAY na resolução de 64 | 68 |
| Figura 31. Influência do uso de diferentes suportes na imobilização de LAY e resolução de 64 | 69 |
| Figura 32. Variação dos valores de ee_p e E em função da temperatura na resolução do (\pm)-mentol ■ – ee_p ; ▲ – E | 75 |
| Figura 33. Variação dos valores de ee_p e E em função da massa de LCR na resolução do (\pm)-mentol ■ – ee_p ; ▲ – E | 76 |
| Figura 34. Variação dos valores de ee_p e E em função da razão molar na resolução do (\pm)-mentol ■ – ee_p ; ▲ – E | 77 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Classificação das enzimas de acordo com a UIBBM (FABER, 2011) | 4 |
| Tabela 2. Determinação do teor de água nos filmes de amido de milho | 39 |
| Tabela 3. Influência da procedência da lipase na obtenção de 69^a | 47 |
| Tabela 4. Influência de LIs na obtenção de 69^a | 49 |
| Tabela 5. Influência da procedência da lipase na obtenção de 73^a | 56 |
| Tabela 6. Efeito da reutilização da LAY imobilizada na obtenção de 73^a | 70 |
| Tabela 7. Influência da procedência da lipase na preparação de 75^a ... | 73 |
| Tabela 8. Influência da imobilização da LCR na preparação de 75^a ... | 74 |

LISTA DE ESQUEMAS

| | |
|---|----|
| Esquema 1. Mecanismo da reação entre uma amina e um éster ativado <i>via</i> enzimática (adaptado)..... | 6 |
| Esquema 2. Preparação do serinato de miristíla catalisado pela lipase <i>de Candida antarctica</i> (adaptado)..... | 7 |
| Esquema 3. Hidrólise enantiosseletiva de ésteres racêmicos catalisada por lipases (adaptado)..... | 8 |
| Esquema 4. Fermentação da glicose para produção do ácido succínico | 10 |
| Esquema 5. Preparação dos ésteres acetato de 1-octila (5a) e octanoato de pentila (5b); mono-epóxido do β -cariofileno (5c) (adaptado) | 11 |
| Esquema 6. Hidrólise do polidatina para preparação do resveratrol (adaptado)..... | 12 |
| Esquema 7. Resolução do (<i>R,S</i>)-2-bromofenilacetato de octila | 18 |
| Esquema 8. Resolução enzimática de 29 | 18 |
| Esquema 9. Resolução do (<i>R,S</i>)-feniletanol (adaptado) | 20 |
| Esquema 10. Esterificação do ácido caféico com o 2-feniletanol | 20 |
| Esquema 11. Resolução enzimática do (<i>R,S</i>)-1-(2-furil)etanol (adaptado) | 26 |
| Esquema 12. Preparação da (\pm) 2-etilhexilacetamida | 32 |
| Esquema 13. Preparação do acetato de 2-acetamidoetila | 33 |
| Esquema 14. Preparação dos ésteres racêmicos derivados do (\pm)-mentol | 34 |
| Esquema 15. Resolução enantiosseletiva de 58 | 42 |
| Esquema 16. Acilação do 2-aminoetanol com acetato de vinila, seus possíveis produtos e suas massas molares (MM) | 51 |
| Esquema 17. Possível fragmentação do composto 72 | 54 |

| | |
|--|----|
| Esquema 18. Possível fragmentação do composto 71 | 54 |
| Esquema 19. Resolução enantiosseletiva de 64 com acetato de vinila | 55 |
| Esquema 20. Resolução enantiosseletiva de 64 com propionato de vinila | 72 |

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|--|---|
| [BMIM][BF ₄] | tetrafluoroborato de 1-butil-3-metil-imidazólio |
| [BMIm][Br] | brometo de 1-butil-3-metil-imidazólio |
| [BMIm][Cl] | cloreto de 1-butil-3-metil-imidazólio |
| [BMIM][PF ₆] | hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil-imidazólio |
| [BMIm][PF ₆] | hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil-imidazólio |
| [BMIM][SCN] | tiocianato de 1-butil-3-metil-imidazólio |
| [Bmim][Tf ₂ N] | bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-butil-3-metilimidazólio |
| [Emim][CH ₃ SO ₃] | metanosulfonato de 1-etil-3-metil-imidazólio |
| [Emim][Et ₃ SO ₄] | metilsulfonato de 1-etil-3-metil-imidazólio |
| Al ₂ O ₃ | óxido de alumínio |
| c | conversão |
| CALB | lipase de <i>Candida antarctica</i> do tipo B |
| ccd | cromatografia de camada delgada |
| CD | ciclodextrinas |
| CDCl ₃ | clorofórmio deuterado |
| CGQ | cromatografia gasosa quiral |
| CMC | carboximetilcelulose |
| d | dubleto |
| DMSO | dimetilsulfóxido |
| <i>E</i> | enantioseletividade/razão enantiomérica |
| <i>ee_p</i> | excesso enantiomérico do produto |
| <i>ee_s</i> | excesso enantiomérico do substrato |
| EM | espectrometria de massas |
| ESI | ionização por elétron spray |
| FID | detector por Ionização em Chama |
| IV | espectroscopia de infravermelho |
| J | Constante de acoplamento spin-spin |
| LAK | lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> |
| LAY | lipase de <i>Candida rugosa</i> (Amano) |
| LBC | lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> |
| LCR | lipase de <i>Candida rugosa</i> |
| LIs | líquidos iônicos |
| LM | lipase de <i>Mucor javanicus</i> |
| log <i>P</i> | coeficiente de partição octanol/ água |
| LRO | lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> |
| LSD | lipase de <i>Burkholderia cepacia SD</i> |
| <i>m/z</i> | razão massa/carga |

| | |
|-----------------------|--|
| MEV | microscopia eletrônica de varredura |
| MgSO ₄ | sulfato de magnésio |
| MM | massa molar |
| MS-MS | espectro de massa sequencial |
| MTBE | éter <i>terc</i> -butilmetílico |
| nd | não detectado |
| pH | potencial hidrogênioônico |
| PVA | poli-álcool vinílico |
| q | Quarteto |
| Rf | fator de retenção |
| RM IM | lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> |
| RMN de ¹ H | ressonância magnética nuclear de hidrogênio |
| s | Singleto |
| t | Tripleto |
| THF | tetrahidrofurano |
| TiO ₂ | dióxido de titânio |
| t _r | tempo de retenção |
| UIBBM | União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1. Considerações iniciais..... | 1 |
| 1.2. Enzimas..... | 1 |
| 1.3. Classificação das enzimas e lipases..... | 3 |
| 1.4. Lipases e a biocatálise/biotransformação | 6 |
| 1.5. Imobilização de enzimas..... | 9 |
| 1.6. Amido de milho | 12 |
| 1.7. Enantiômeros e resolução enzimática | 15 |
| 1.8. Líquidos iônicos | 18 |
| 1.9. Cromatografia gasosa quiral (CGQ)..... | 21 |
| 1.10. Amidas e ésteres..... | 23 |
| 2. OBJETIVOS..... | 27 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 28 |
| 3.1. Reagentes, solventes e enzimas | 28 |
| 3.2. Equipamentos..... | 29 |
| 3.2.1. <i>Laboratório de Biocatálise - Departamento de Química.</i> | 29 |
| 3.2.2. <i>Outros laboratórios.....</i> | 29 |
| 3.3. Preparação dos suportes para imobilização das lipases | 30 |
| 3.3.1. <i>Preparação do filme de amido de milho/dextrana/sorbitol ou amido de milho/sorbitol</i> | 30 |
| 3.3.1.1. <i>Determinação de água nos filmes de amido de milho</i> | 31 |
| 3.3.1.2. <i>Análise do suporte por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....</i> | 31 |
| 3.3.2. <i>Preparação de suportes por absorção física.....</i> | 31 |
| 3.3.3. <i>Preparação do gel de ágar.....</i> | 32 |
| 3.4. Preparação de amidas racêmicas por método químico | 32 |
| 3.5. Preparação de ésteres derivados do (±)-mentol por método químico..... | 34 |
| 3.6. Procedimento geral para a preparação de amidas e éster pelo método enzimático..... | 35 |
| 3.7. Condições experimentais nas análises de CGQ..... | 35 |
| 3.7.1. <i>Condições de análises para separação da amida derivada da (±)2-etilhexilamina.....</i> | 36 |

3.7.2. *Condições de análises para separação dos ésteres derivados do (±)-mentol*..... 37

| | |
|--|-----------|
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 38 |
| 4.1. Preparação do filme de amido de milho | 38 |
| 4.1.1. <i>Determinação do teor de água nos filmes</i> | 39 |
| 4.1.2. <i>Microscopia eletrônica de varredura dos filmes (MEV)</i> .. | 40 |
| 4.2. Resolução enzimática da (±)2-etilhexilamina | 41 |
| 4.2.1. <i>Influência da imobilização da LBC na preparação de 69</i> | 42 |
| 4.2.2. <i>Efeito da razão molar</i> | 45 |
| 4.2.3. <i>Influência do uso de lipases de diversas procedências</i> ... | 47 |
| 4.2.4. <i>Efeito do uso de misturas n-hexano/LIs como solvente da reação</i> | 49 |
| 4.3. Acilação quimiosseletiva do 2-aminoetanol | 50 |
| 4.4. Resolução do (±)-mentol – Preparação do acetato de mentila | 55 |
| 4.4.1. <i>Influência do uso de lipases de diversas procedências para obtenção de 73</i> | 55 |
| 4.4.2. <i>Influência da imobilização da lipase na obtenção de 73</i> . | 57 |
| 4.4.3. <i>Influência da temperatura na preparação de 73</i> | 59 |
| 4.4.4. <i>Efeito da razão molar</i> | 61 |
| 4.4.5. <i>Efeito da massa de LAY</i> | 62 |
| 4.4.6. <i>Efeito do solvente orgânico</i> | 64 |
| 4.4.7. <i>Efeito da utilização de LIs como co-solvente</i> | 66 |
| 4.4.8. <i>Efeito da utilização de amidos de diversas procedências para preparação do suporte</i> | 67 |
| 4.4.9. <i>Efeito do uso de diferentes suportes para imobilização da LAY</i> | 69 |
| 4.4.10. <i>Reutilização do sistema</i> | 70 |
| 4.5. Resolução do (±)-mentol – Preparação do propionato de mentila | 72 |
| 4.5.1. <i>Efeito do uso de lipases de diversas procedências</i> | 72 |
| 4.5.2. <i>Efeito de imobilização da LCR</i> | 73 |
| 4.5.3. <i>Efeito da temperatura</i> | 75 |
| 4.5.4. <i>Efeito da massa de LCR</i> | 76 |
| 4.5.5. <i>Efeito da razão molar</i> | 77 |

| | |
|------------------------------|-----------|
| 5. CONCLUSÃO | 79 |
| 6. PERSPECTIVAS | 81 |
| 7. REFERÊNCIAS | 83 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações iniciais

Os processos biológicos que envolvem catálise são conhecidos há milhares de anos, tendo seus primeiros relatos relacionados à fermentação de cereais para a produção de bebidas alcoólicas, preparo de pães, produção de queijo e afins.

Com o passar dos anos, a produção industrial de produtos químicos cresceu demasiadamente, porém agregado aos produtos desejados, formam-se diversos subprodutos indesejáveis. Além disso, muitas vezes são produzidos compostos que contaminam o meio ambiente.

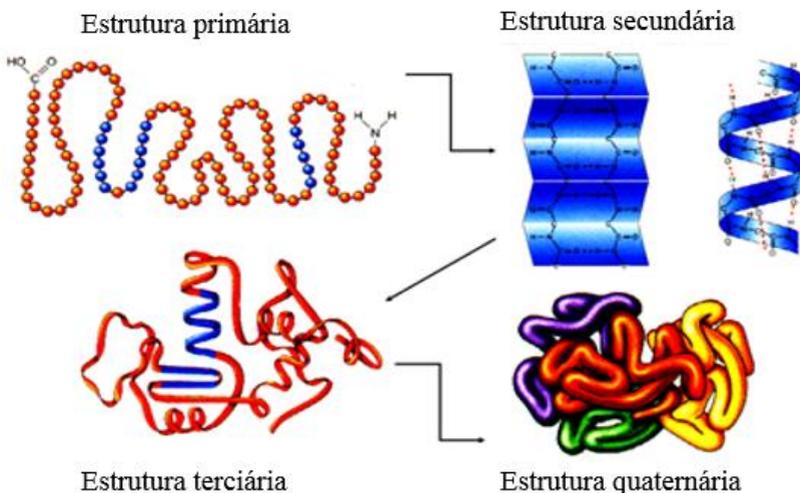
A utilização de agentes biológicos para a catálise ganhou uma atenção especial, pois estes processos apresentam ganhos consideráveis quanto à eficiência catalítica e menores impactos ao meio ambiente. O uso de enzimas apresenta uma série de vantagens, como poderem apresentar alta seletividade, o que é bastante requerido principalmente na indústria farmacêutica.

1.2. Enzimas

Proteínas são moléculas de alta massa molar essenciais para o organismo humano. Por exemplo, elas são as responsáveis pelo transporte de oxigênio no organismo, são constituintes majoritário dos músculos e estão presentes no sistema imunológico.(LEHNINGER, 2000) Entre as funções das proteínas, a catálise provavelmente é a mais importante, e as moléculas que desempenham esta função são chamadas enzimas. Estas são os catalisadores mais eficientes conhecidos, podendo aumentar a velocidade de uma reação no fator de até 10^{20} - 10^{23} vezes mais que reações não catalisadas.(CAMPBELL; FARRELL; TASKS, 2007)

As enzimas são em geral proteínas, com exceção de um pequeno grupo de moléculas de ácido ribonucleico catalítico, e são formadas por α -aminoácidos ligados entre si através de ligações peptídicas. A sequência exata de aminoácidos de uma enzima é denominada estrutura primária, o arranjo tridimensional da cadeia de aminoácidos, estrutura secundária, a estruturação espacial, estrutura terciária, e o enovelamento de mais de uma unidade de cadeia polipeptídica, é denominado estrutura quaternária. (**Figura 1**) (CAMPBELL; FARRELL; TASKS, 2007; LEHNINGER, 2000)

Figura 1. Representação esquemática das estruturas de uma enzima



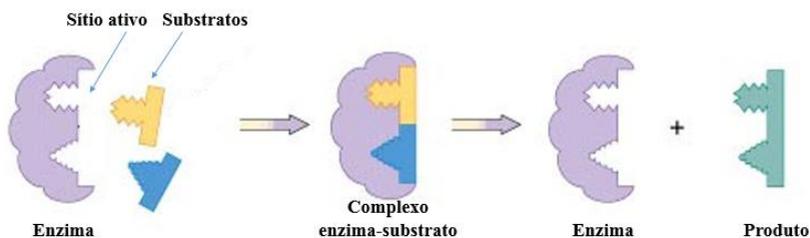
Fonte: “Protein Structures: Primary, Secondary, Tertiary, Quaternary”, 2015

A catálise enzimática ocorre em uma pequena porção da enzima chamada de sítio ativo, frequentemente localizado em uma fenda na superfície da enzima, e que possui uma sequência de aminoácidos essenciais para a catálise. A reação catalisada normalmente ocorre em várias etapas.(CAMPBELL; FARRELL; TASKS, 2007)

A função de um catalisador é acelerar a reação química, criando um caminho reacional de menor energia de ativação. A eficiência catalítica de uma enzima é atribuída principalmente a formação do complexo enzima-substrato, mais estável no estado de transição, que no estado inicial da reação.(FABER, 2011)

Historicamente o primeiro modelo que descreveu a interação entre o substrato e o sítio ativo da enzima para a catálise enzimática foi proposto por Emil Fisher em 1894. No chamado “chave-fechadura” o sítio ativo possui estrutura espacial complementar a do substrato, que se liga ao sítio formando o complexo “enzima-substrato” e posteriormente o produto, conforme apresentado na **Figura 2**. Este modelo atualmente possui apenas valor histórico, pois desconsidera aspectos importantes, como a flexibilidade conformacional das proteínas, e o fato de uma enzima poder interagir com vários substratos diferentes.(CAMPBELL; FARRELL; TASKS, 2007; FABER, 2011; LEHNINGER, 2000)

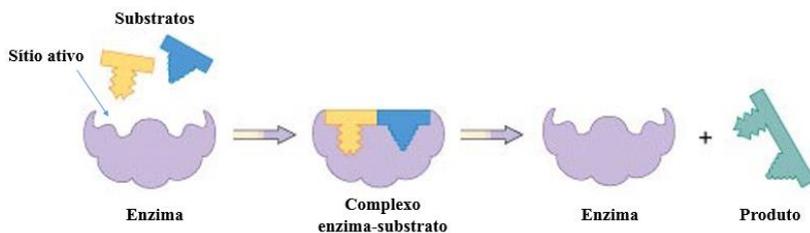
Figura 2. Modelo chave-fechadura



Fonte: desenvolvida pelo autor

O modelo do ajuste-induzido, proposto por Koshland na década de 60 é o mais aceitável para a catálise enzimática. Ele considera a flexibilidade conformacional da enzima e que a interação entre a enzima e o substrato deve ocorrer no estado de transição, admitindo uma mudança na conformação no sítio ativo, sob a influência do substrato. (CAMPBELL; FARRELL; TASKS, 2007; FABER, 2011; LEHNINGER, 2000) como apresentado na **Figura 3**.

Figura 3. Modelo do ajuste-induzido



Fonte: desenvolvida pelo autor

1.3. Classificação das enzimas e lipases

O número de enzimas descobertas e catalogadas cresce a cada dia. Considerando este grande crescimento, a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM) classificou-as em seis grandes classes. Estas são ainda divididas em subclasses, de acordo com a reação que catalisam (**Tabela 1**). (FABER, 2011; MILNER, 2012)

Tabela 1. Classificação das enzimas de acordo com a UIBBM

| CLASSE | TIPO DE REAÇÃO CATALISADA | SUBCLASSE |
|----------------------|--|--|
| OXIRREDUTASES | Transferência de elétrons ou remoção de hidrogênio | Hidrogenases, oxidases, peroxidases, redutases |
| TRANSFERASES | Reações de transferência de grupos | Transaldolases, transcetolase |
| HIDROLASES | Reações de hidrólise | Esterases, lipases, peptidases, fosfatases |
| LIASES | Reações de adição de grupos a dupla ligação ou formação de dupla ligação por remoção de grupos | Descarboxilases, cetoácidas, hidrolase |
| ISOMERASES | Transferência de grupos dentro da molécula para produzir isômeros | epimerases, mutases |
| LIGASES | Formação e clivagem de ligações C-C, C-S, C-O, C-N e ésteres de fosfato | Sintetases |

Fonte: FABER, 2011

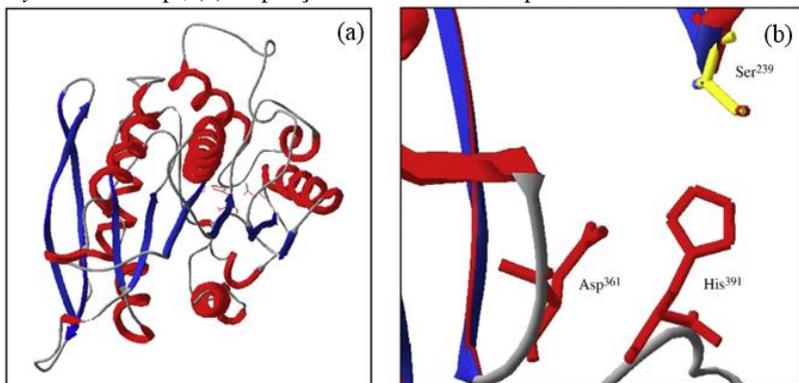
As hidrolases, mais especificamente as lipases, são as enzimas mais utilizadas nas biotransformações, e conseqüentemente as mais estudadas. Este grande interesse deve-se principalmente por estas estarem mais disponíveis comercialmente, possuírem um custo relativamente menor que outras enzimas, não requererem cofatores e poderem ser utilizadas em várias de reações.(FABER, 2011; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001)

As lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas, que possuem o papel fisiológico de hidrolisar triacilgliceróis (triglicerídeos) a ácidos graxos e di- mono- e glicerol. Elas podem ser encontradas em plantas, animais e microrganismos, e são obtidas através da extração dos dois primeiros ou pelo cultivo de microrganismos. Estas enzimas são produzidas principalmente por bactérias e fungos e excretadas extracelularmente, o que torna relativamente simples a produção em larga escala.(FABER, 2011; KAPOOR; GUPTA, 2012; STERGIOU et al., 2013) Alguns exemplos de microrganismos que produzem lipases são a *Candida rugosa*, *Candida antarctica* e *Rhizomucor miehei*, originadas de fungos,

e *Burkholderia cepacia*, originada de bactéria.(SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001)

O sítio ativo de uma lipase é formado por resíduos específicos de aminoácidos, conhecidos como tríade catalítica, sendo eles serina, histidina, e ácido aspártico ou glutâmico. Uma característica essencial das lipases é uma “alça” de superfície do aminoácido serina, atuando como uma “tampa” para o sítio ativo. Ao contato com o substrato esta “tampa” sofre mudança conformacional expondo o sítio ativo, embora algumas lipases não apresentam esta estrutura.(DE SANTI et al., 2010; STERGIOU et al., 2013) A **Figura 4** apresenta uma representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase *Psychrobacter* sp., com ampliação do sítio ativo da mesma.(DE SANTI et al., 2010)

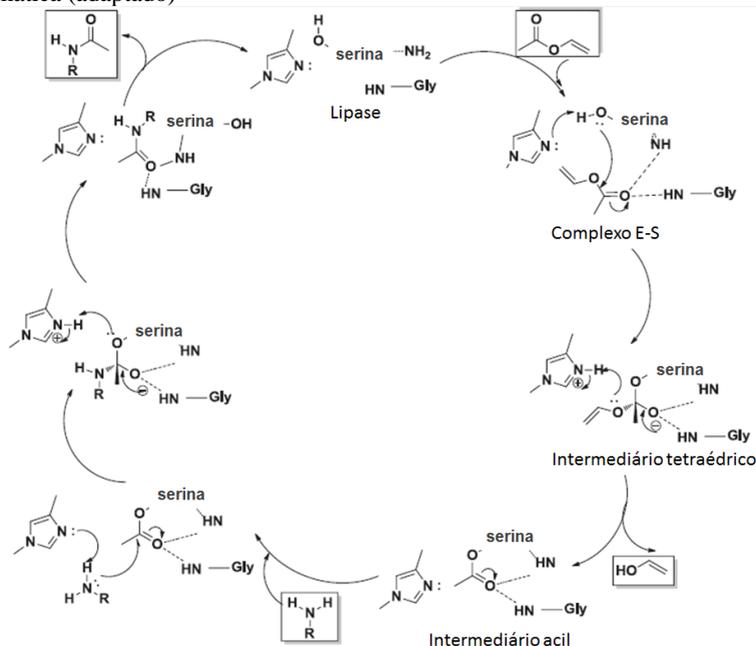
Figura 4. (a) Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase *Psychrobacter* sp.; (b) ampliação do sítio ativo da lipase



Fonte: DE SANTI et al., 2010

Diferentes mecanismos de reação são descritos na catálise enzimática, dependendo de fatores como o meio reacional. (STERGIOU et al., 2013) O **Esquema 1** representa o mecanismo de uma acilação catalisada por lipase. Este envolve primeiramente a formação de um intermediário tetraédrico, formado pelo agente acilante e a tríade catalítica da lipase, através do ataque do grupo hidroxila de serina ao agente acilante. A segunda etapa, é a saída da porção do álcool de partida presente no agente acilante, formando o intermediário acila. Na terceira etapa, ocorre a acilação do composto de interesse com o auxílio da tríade catalítica, regenerando o sítio catalítico da lipase ao final do processo.(BADGUJAR; DHAKE; BHANAGE, 2013)

Esquema 1. Mecanismo da reação entre uma amina e um éster ativado *via* enzimática (adaptado)



Fonte: BADGUJAR; DHAKE; BHANAGE, 2013

1.4. Lipases e a biocatálise/biotransformação

Os termos biotransformação ou biocatálise referem-se a processos em que enzimas presentes em células ou na forma isolada, são utilizadas como catalisadores para converter um substrato em um número limitado de etapas. (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MARSAIOLI; PORTO, 2010)

A biotransformação vem sendo utilizada pela humanidade a milhares de anos, como na transformação do etanol a ácido acético por acetobactérias, sendo este o primeiro indício da utilização da biotransformação, e empregado por antepassados na Mesopotâmia, México, Sudão e Egito. (LERESCHE; MEYER, 2006)

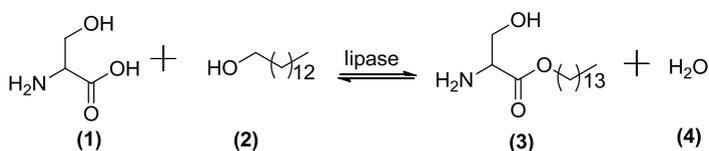
O interesse em se utilizar biocatalisadores em síntese orgânica deve-se a diversos fatores além de sua alta eficiência catalítica.

As enzimas podem atuar em condições brandas de pH, geralmente entre 6-8, e temperatura entre 20-40 °C, e isto minimiza

problemas como reações paralelas e decomposição de produtos. Porém já tem sido reportado que algumas enzimas mantêm sua atividade em condições extremas de temperatura e pH. Elas também não estão restritas a seu meio original, mesmo sendo o meio aquoso o natural das enzimas, existe algumas tolerantes a solventes orgânicos. Estes fatores podem ser demonstrados particularmente nas lipases, e a tolerância a solventes orgânicos é importante principalmente pelo fato que a maioria dos substratos utilizados em síntese orgânica são hidrofóbicos. As lipases catalisam reações com substratos diferentes dos que naturalmente catalisam. (DRAUZ et al., 2012; FABER, 2011)

Um exemplo da utilização de lipases em reações que utilizam substratos não naturais e solvente orgânico foi recentemente reportado por Cai e *col.*. Eles prepararam o serinato de miristila a partir do álcool miristílico (2) e L-serina (1) (**Esquema 2**), utilizando a lipase de *Candida antarctica* (Novozymes 435), em sistema bifásico de solventes. Foram avaliados os efeitos do sistema de reação, composição das fases, temperatura, pH e o tempo. Os resultados mostraram que o sistema bifásico formado por diclorometano e tampão fostato (80:20 v/v) foi o ideal para esta reação. As condições ótimas para obtenção do serinato de miristila foram razão molar de 1:1, massa da enzima 5 % (g/g), 20 mL de solvente, 30 °C e tempo de reação de 36 h. Nestas condições pode-se obter o éster 3 com conversão de 72,3 %. (CAI et al., 2014)

Esquema 2. Preparação do serinato de miristila catalisado pela lipase de *Candida antarctica* (adaptado)



Fonte: CAI et al., 2014

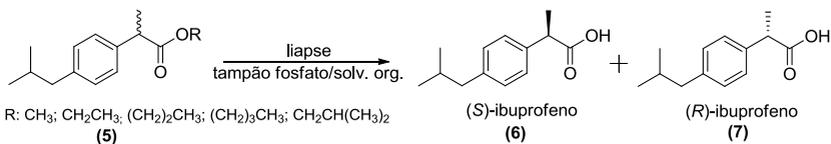
Como já citado, as lipases podem catalisar diversos tipos de reações. Esta catálise ocorre com um alto grau seletividade, podendo ser régio- quimio- ou enantiosseletivo. (DRAUZ et al., 2012; FABER, 2011)

A regiosseletividade, refere-se ao processo de catálise que permite a distinção entre grupos funcionais iguais, localizados em diferentes partes da molécula. A quimiosseletividade é atribuída ao processo que permite a diferenciação entre grupos funcionais de um

mesmo composto. A enantiosseletividade descreve a possibilidade de distinção entre enantiômeros.(DRAUZ et al., 2012; FABER, 2011)

Yousefi e *col.*, reportaram a hidrólise estereosseletiva de ésteres racêmicos derivados do ibuprofeno utilizando as lipases de *Candida rugosa* (LCR) e de *Rhizopus oryzae* (LRO) imobilizadas em octil-sefaroze (**Esquema 3**). Os parâmetros avaliados foram temperatura, razão enzima:substrato e utilização de misturas entre solventes orgânicos (*n*-hexano e isoctano) e solução tampão fosfato de sódio. A LCR foi mais eficiente na obtenção enantiosseletiva do (*S*)-ibuprofeno. Entre os ésteres estudados, a hidrólise do éster butílicico apresentou melhores resultados, tanto de excesso enantiomérico dos produtos ($ee_p > 95\%$), quanto a enantiosseletividade ($70 < E < 75$) e conversão (15 % em *n*-hexano e 10 mg de LCR e 9 % em isoctano e 5 mg de LCR) a 50 °C.(YOUSEFI; MOHAMMADI; HABIBI, 2014)

Esquema 3. Hidrólise enantiosseletiva de ésteres racêmicos catalisada por lipases (adaptado)



Fonte: YOUSEFI; MOHAMMADI; HABIBI, 2014

Somado a todas as vantagens citadas, a biocatálise pode ser considerada ecologicamente aceitável. Esta fato é interessante pois atualmente há um grande interesse em metodologias ecologicamente viáveis, que ocorrem com economia de energia e de átomos e geram o mínimo de subprodutos possíveis.(LAU; GROSSE, 2013; LENARDÃO et al., 2003; SHELDON; ARENDS; HANEFELD, 2007)

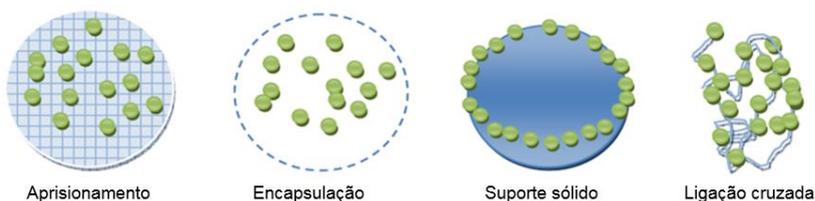
Entretanto, embora as enzimas sejam excelentes catalisadores, elas podem sofrer inativação por vários fatores. Tais como a utilização em meio orgânico, temperatura e pH diferente do usual da enzima.(FABER, 2011; MILNER, 2012) Visando aumentar a estabilidade e proporcionar a reutilização do biocatalisador, métodos de imobilização de enzimas são cada vez mais estudados. Estes métodos, ainda facilitam a separação do produto final, protegem a enzima e aumentam a sua estabilidade em solventes orgânicos.(DRAUZ et al., 2012; MATEO et al., 2007; SHELDON; VAN PELT, 2013)

1.5. Imobilização de enzimas

O principal objetivo da técnica de imobilização de enzimas, é a obtenção um biocatalisador que apresente maior estabilidade térmica, estabilidade em solventes orgânicos, maior atividade, maior seletividade, redução de inibição e que possa ser facilmente recuperado e reutilizado. Estas características levam a um processo economicamente viável, em especial para o mercado industrial.(DRAUZ et al., 2012; LIESE; HILTERHAUS, 2013; MATEO et al., 2007)

Diferentes abordagens têm sido desenvolvidas para imobilizar enzimas. Basicamente os métodos de imobilização podem ser divididos em quatro tipos, adsorção em suporte sólido, aprisionamento, encapsulamento e ligação cruzada (**Figura 5**).(LIESE; HILTERHAUS, 2013; SHELDON; VAN PELT, 2013)

Figura 5. Exemplos de métodos de imobilização (adaptado)



Fonte: MILNER, 2012

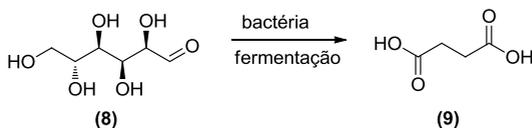
As técnicas de aprisionamento e encapsulação consistem em reter a enzima em uma matriz polimérica, geralmente constituída por polímeros orgânicos, inorgânicos ou membranas, que sejam insolúveis no meio reacional. Esta matriz deve permitir a difusão dos reagentes e produtos, evitando a migração do biocatalisador. (CANTONE et al., 2013; SHELDON; VAN PELT, 2013) Alguns exemplos de materiais utilizados para a preparação destes suportes são gelatina, quitosana, carboximetilcelulose (CMC), poli álcool vinílico (PVA) e ágar.

A adsorção em um suporte sólido pode ser física, iônica ou covalente. A adsorção física a mais utilizada, pois é a que causa menos danos a estrutura da enzima, e além disso é simples e de baixo custo. Porém, pelo fato da interação entre o suporte e a enzima ser fraca, em situações com altas concentrações de substratos, entre outras, pode ocorrer facilmente o desprendimento da enzima do suporte.(CANTONE

et al., 2013; SHELDON; VAN PELT, 2013) Alguns exemplos de suportes são sílica, alumina, carvão, xantana e amido.

Corona-González e *col.*, testaram vários suportes para a imobilização da bactéria *Actinobacillus succinogenes*, tanto por adsorção quanto por aprisionamento. Estes sistemas foram utilizados na fermentação da glicose (**8**) para a produção do ácido succínico (**9**). A maior produção de ácido succínico foi obtida quando se utilizou a bactéria aprisionada em esferas de agar, sendo obtido 43 g/L de ácido a partir de 78 g/L de glicose. Em cinco ciclos de 74 h foi possível consumir um total de 147 g/L de glicose e obter 107 g/L do ácido (**Esquema 4**). A imobilização da bactéria em ágar reduziu o tempo para atingir uma concentração máxima de ácido succínico em todas as concentrações iniciais de glicose, e permitiu a reutilização do sistema, mostrando assim que este suporte foi eficiente na imobilização desta bactéria.(CORONA-GONZÁLEZ et al., 2014)

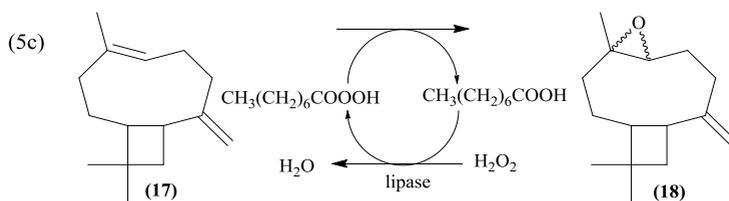
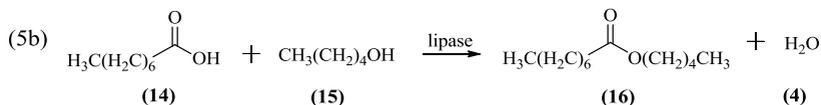
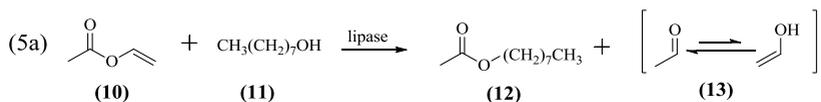
Esquema 4. Fermentação da glicose para produção do ácido succínico



Fonte: desenvolvido pelo autor

Nascimento e *col.*, imobilizaram a lipase de *Burkholderia cepacia* (30 mg) em bucha vegetal pelo método de adsorção, e utilizaram esse sistema como catalisador em várias reações. Foram avaliados o uso de diferentes solventes puros e em misturas com líquidos iônicos (LIs) (9:1 v/v), em 24 h de reação e a 25 °C. Na transesterificação entre o acetato de vinila (**10**) e o 1-octanol (**11**) (**Esquema 5a**), o éster **12** foi obtido com conversão >99 % utilizando misturas de *n*-hexano e éter etílico com [BMIM][PF₆], [BMIM][BF₄] e [BMIM][SCN]. Quando foi realizada a esterificação entre o ácido octanóico (**14**) e o 1-pentanol (**15**) (**Esquema 5b**), obteve-se o éster **16** com conversão >99 % utilizando como solventes misturas de MTBE com [BMIM][PF₆], [BMIM][BF₄] e [BMIM][SCN], ou utilizando éter etílico e [BMIM][BF₄]. Os melhores resultados obtidos ao avaliar a conversão do β-cariofileno (**17**) para seu respectivo monoepóxido (**18**) (**Esquema 5c**) foram utilizando *n*-hexano puro como solvente (~36 %).(NASCIMENTO et al., 2015)

Esquema 5. Preparação dos ésteres acetato de 1-octila (5a) e octanoato de pentila (5b); mono-epóxido do β -cariofileno (5c) (adaptado)

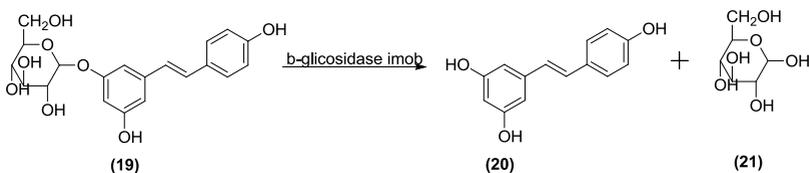


Fonte: NASCIMENTO et al., 2015

No método de ligação cruzada são utilizados reagentes multifuncionais, tais como, hexametilendiamina e glutaraldeído. Em geral utiliza-se glutaraldeído, para formar juntamente com as enzimas, partículas insolúveis, por meio de reticulação. Estas são ligadas umas às outras por ligações covalentes através destes reagentes. (CANTONE et al., 2013; SHELDON; VAN PELT, 2013)

Zhang e col., imobilizaram a β -glicosidase pelo método de ligação cruzada em microesferas de quitosana modificadas por L-lisina. Este sistema foi utilizado na obtenção do resveratrol (**19**) *via* hidrólise do polidatina (**20**) (**Esquema 6**). O produto foi obtido com 86 % de conversão quando foram utilizadas as condições reacionais de 45 °C, pH 6,0, 8 h e um reator com concentração inicial de reagente de 2 % e taxa de fluxo de 1 mL/min. (ZHANG et al., 2014)

Esquema 6. Hidrólise do polidatina para preparação do resveratrol (adaptado)



Fonte: ZHANG et al., 2014

A escolha do suporte para imobilização da enzima depende de vários fatores. Porém existem algumas características consideradas ideais para um bom suporte. Ele deve possuir uma grande área superficial, alta rigidez, não deve influenciar na estrutura principalmente do sítio ativo da enzima, deve possuir estabilidade térmica, mecânica e química, boa permeabilidade, deve ser resistente a ataques de microrganismos e permitir a reutilização do sistema. (LIESE; HILTERHAUS, 2013; MATEO et al., 2007)

Atualmente polímeros naturais, tais como amido, celulose, agarose, quitosana, gelatina, entre outros, vem sendo usados na preparação de suportes para imobilização de enzimas. Estes apresentam uma alternativa atraente, tanto do ponto de vista econômico, quanto pelo fato de poderem ser obtidos de fontes renováveis e serem biodegradáveis, tornando-os assim mais ambientalmente aceitáveis. (CANTONE et al., 2013; SHELDON; VAN PELT, 2013)

1.6. Amido de milho

Nos últimos anos ocorreu um crescente interesse pela substituição dos materiais provenientes de petróleo, por materiais de fontes renováveis. Há também interesse por materiais que causem menos danos ao meio ambiente. (FARIAS et al., 2012) O amido é uma boa matéria prima, já que é de fonte renovável, abundante, biodegradável e de baixo custo. (HALLEY; AVÉROUS, 2014) Este pode ser aplicado em vários setores, como os de alimentos, medicamentos, bebidas, fabricação de papel, embalagens e têxteis. A maior parte do amido utilizado no mundo é obtido a partir do milho. (LI et al., 2015)

O amido é a principal fonte de calorias na dieta humana e a principal reserva de polissacarídeo em plantas superiores. É encontrado em muitos grãos, raízes e tubérculos, como por exemplo, milho, batata, mandioca, inhame, cará e gengibre. Apresenta-se na forma de grânulos de tamanho e formato variados, e é insolúvel em água fria. (HALLEY;

AVÉROUS, 2014; LI et al., 2014) A **Figura 6** mostra alguns exemplos de fontes de amido.

Figura 6. Exemplos de tubérculos e grãos produtores de amido

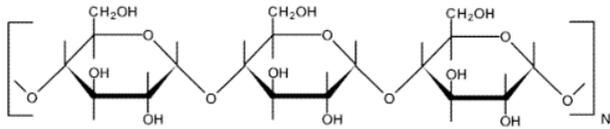


Fonte: desenvolvido pelo autor

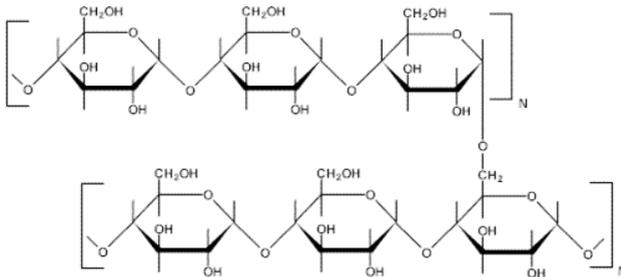
O amido é um polissacarídeo heterogêneo composto essencialmente por dois polímeros de α -D-glicose em proporções variadas, a amilose e a amilopectina, e como componentes minoritários lipídios e proteínas. A proporção entre amilose e amilopectina é dependente da espécie vegetal, e do grau de maturação das plantas provenientes de uma mesma espécie.(HALLEY; AVÉROUS, 2014; KLAOCHANPONG et al., 2015)

A amilose é um polissacarídeo linear constituído por unidades de D-glicose ligadas entre si por ligações α -1 \rightarrow 4, podendo variar em número de 200 a 3000, dependendo da fonte do amido. A amilopectina é um polissacarídeo altamente ramificado constituído de resíduos de glicose unidas por ligações α -1 \rightarrow 4 e α -1 \rightarrow 6, sendo considerada uma das maiores moléculas encontradas na natureza. Em geral, os amidos normais apresentam de 20-30% de amilose e 70- 80% de amilopectina. (KLAOCHANPONG et al., 2015; MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010) As estruturas da amilose e amilopectina estão apresentadas na **Figura 7**.

Figura 7. Estruturas da amilose e amilopectina



Amilose (22)



Amylopectina (23)

Fonte: desenvolvido pelo autor

A frio, a estrutura do amido permanece inalterada e insolúvel em água. Porém, quando aquecida em presença de água, essa mistura sofre um processo conhecido como gelatinização, esta é uma transformação irreversível do amido granular em uma pasta viscoelástica, onde ocorre a destruição da estrutura granular semicristalina do amido através do rompimento das ligações de hidrogênio que mantinham a sua integridade. Esta destruição resulta em uma matriz polimérica homogênea e essencialmente amorfa. (HALLEY; AVÉROUS, 2014; MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010)

Os filmes produzidos por amido tendem a ser pouco flexíveis e quebradiços, sendo necessário a adição de agentes plastificantes, tais como o glicerol e sorbitol, para melhorar as propriedades mecânicas. Estes filmes vem sendo aplicados na indústria em diversas áreas, como por exemplo, na produção embalagens para alimentos e sacos de lixos biodegradáveis. (HALLEY; AVÉROUS, 2014; MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010)

Zhang *et al.*, incorporaram ϵ -poli-L-lisina em filmes de amido, e analisaram suas propriedades física, mecânica e antimicrobiana. O filme formado pela mistura dos dois componentes mostrou-se mais resistente que o com apenas amido, além de apresentar alta atividade antimicrobiana

contra a *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*, e baixo efeito inibitório sobre a *Aspergillus niger*. Os resultados mostram que esses filmes podem ser de grande interesse para aplicação na indústria alimentícia. (ZHANG et al., 2015)

Lipases de diferentes fontes e dois micélios, na forma livre ou imobilizadas em filme de amido de gengibre, foram utilizados como catalisadores na reação do (*R,S*)-1-feniletanol com acetato de vinila e outros agentes acilantes. Os acetatos de vinila e o de *iso*-propenila forneceram as maiores conversões (9%) e excessos enantioméricos em (*R*)-éster (> 99%). A mistura de *n*-hexano/glicerol (9:1 v:v) foi a mais adequada para esta reação (conversão 23%, *E*>200). A blenda de amido de gengibre/PEO (7:3 m/m) foi reutilizada por seis vezes consecutivas.(HOFFMANN; SILVA; NASCIMENTO, 2011)

1.7. Enantiômeros e resolução enzimática

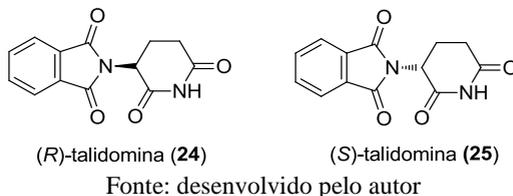
Pasteur realizou em 1848 um experimento considerado até hoje um dos mais importantes na história da química. Ele separou manualmente os isômeros ópticos do tartarato. Este experimento abriu precedente para a formulação diversos conceitos químicos, sendo o mais importante deles o de quiralidade. Uma molécula ou objeto é quiral se não for sobreponível a sua imagem especular, estas moléculas são conhecidas como enantiômeros.(MAUSKOPF, 2006)

Enantiômeros são compostos com propriedades químicas e físicas idênticas, porém são diferenciados em propriedades que são dependentes do arranjo espacial, incluindo as biológicas. No organismo dos seres vivos encontram-se inúmeros compostos quirais que podem interagir de forma diferentes com os enantiômeros, fazendo com que possuam atividades biológicas distintas, tais como na farmacologia, toxicologia, farmacocinética e metabolismo. Enquanto que um enantiômero pode ser utilizado como fármaco e produzir atividade terapêutica, o outro pode ser inativo ou apresentar efeitos indesejados, e algumas vezes tóxicos, no organismo.(BARREIRO; FERREIRA; COSTA, 1997; NGUYEN; HE; PHAM-HUY, 2006)

Talvez o caso que alcançou maior notoriedade sobre o uso de racematos em fármacos é o da talidomida (**Figura 8**), fármaco comercializado no início da década de 60 como analgésico. Enquanto o (*R*)-enantiômero (**24**) possui características analgésicas, o (*S*)-enantiômero (**25**) apresenta efeitos teratogênicos. Quando administrado em gestantes ocorreu a má formação fetal e morte de vários fetos. Após

acontecimentos como o da talidomida, a busca por métodos para separar enantiômeros e produzir compostos enantioméricamente puros foi intensificado.(BOSCH et al., 2008; FABER, 2011)

Figura 8. Enantiômeros *R* e *S* da talidomina



Como já citado, as enzimas possuem a propriedade de serem enantiosseletivas, o que as tornam um importante recurso para a obtenção de compostos enantioméricamente puros. Ao submeter um substrato racêmico a uma reação que contenha enzima é esperado que ocorra diferenciação entre os enantiômeros para a formação do produto. Isto é possível devido a quiralidade do sítio ativo da enzima, assim um enantiômero irá ter encaixe preferencial no sítio ativo, e consequentemente será convertido mais rapidamente ao produto, resultando na resolução do racemato. Em uma resolução ideal, esta taxa de conversão é tão extrema que apenas um enantiômero é convertido, e assim a reação enzimática cessaria após o consumo completo do enantiômero mais reativo. A partir dessas considerações, em uma resolução cinética enzimática só a metade do material de partida poderá ser transformado, obtendo-se assim um enantiômero puro com uma conversão máxima de 50 %.(DRAUZ et al., 2012; FABER, 2011)

Em resolução enzimática é utilizado um parâmetro que descreve a dependência entre a conversão (*c*), excesso enantiomérico do substrato (*ee_s*) e produto (*ee_p*). Este tratamento foi descrito por Sih e *col.*, utilizando como base a teoria descrita por Sharpless e Fajans. A razão enantiomérica (*E*) descreve o comportamento enantiosseletivo de um sistema biocatalisado. Este parâmetro permite fazer previsões quantitativas em relação a conversão do racemato, composição enantiomérica do substrato e produto recuperado ao término da reação.(FABER, 2011; KOSKINEN; KLIBANOV, 1996)

A **Equação 1** mostra como é calculada a conversão em uma resolução enzimática, as **Equações 2 e 3** mostram os tratamentos

matemáticos para obtenção do E para o substrato (s) e produto (p) e a **Equação 4** mostra como calcular o E da reação.(FABER, 2011)

$$c = ee_s / (ee_s + ee_p) \quad \text{Eq. 1}$$

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

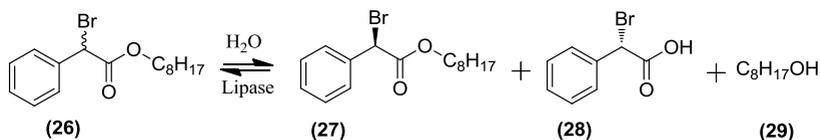
$$E_p = \frac{\ln[(1 - c)(1 + ee_p)]}{\ln[(1 - c)(1 - ee_p)]} \quad \text{Eq. 3}$$

$$E = \frac{\ln[ee_p(1 - ee_s)] / (ee_p + ee_s)}{\ln[ee_p(1 + ee_s)] / (ee_p + ee_s)} \quad \text{Eq. 4}$$

Como regra geral, E com valores abaixo de 15 são considerados inaceitáveis para fins práticos, são tidos como moderados a bons entre 15-30, e acima destes valores são excelentes. Entretanto, os valores de $E > 200$ não podem ser determinados com precisão devido às imprecisões nos métodos de determinação do excesso enantiomérico. Isto ocorre pois uma variação, mesmo diminuta, no ee_p ou ee_s , provoca uma grande alteração no E .(FABER, 2011)

Um exemplo da avaliação dos valores de E foi reportado por *Rivera e col.*. Neste trabalho foram utilizadas lipases presentes no látex de *Carica papaya* na resolução do (*R,S*)-2-bromofenilacetato de octila (**26**) (**Esquema 7**), e vários parâmetros foram estudados. A reação foi otimizada para a utilização de 50 mmol de substrato, 50 mg do preparado enzimático, uma mistura de decano e tampão (1:1 v/v) como solvente e 25 °C. Nestas condições, em pH 7 a reação apresentou $E = 30$, e ao utilizar pH 8,5 observou-se uma melhora na enantiosseletividade para $E > 200$.(RIVERA et al., 2013)

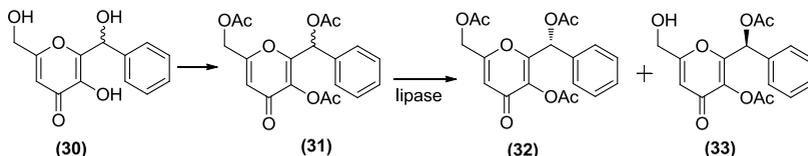
Esquema 7. Resolução do (*R,S*)-2-bromofenilacetato de octila



Fonte: RIVERA et al., 2013

Sharma e col., realizaram a resolução do éster derivado do 3-hidroxi-2-(hidroxi(fenil)metil)-6-(hidroximeil)-4H-piran-4-ona (30) utilizando várias lipases (**Esquema 8**). Os melhores resultados foram obtidos ao utilizar a lipase de *Candida antarctica* do tipo B (CALB) em tampão fosfato e tolueno (10 %) como solvente da reação, sendo obtido um $ee_p = 72\%$ em 45 min. (SHARMA; SINGH; MUKHERJEE, 2014)

Esquema 8. Resolução enzimática de 29



Fonte: desenvolvido pelo autor

Adicionalmente ao uso de enzimas, uma alternativa que vem sendo amplamente aplicada para auxiliar na resolução de enantiômeros é a utilização de LIs como solventes ou co-solventes da reação. Com a procura cada vez maior por reações químicas ecologicamente aceitáveis, os LIs vêm sendo cada vez mais aplicados e estudados, tanto como auxiliar em reações químicas, quanto na diminuição dos impactos ambientais que possam causar.

1.8. Líquidos iônicos

Líquidos Iônicos são sais, geralmente líquidos a temperatura ambiente, formados por um cátion orgânico e um íon inorgânico. Apresentam baixo ponto de fusão (<100 °C) e podem se manter líquidos dentro de uma ampla faixa de temperatura (<400 °C). Estes compostos apresentam boa estabilidade térmica e química, não são inflamáveis e

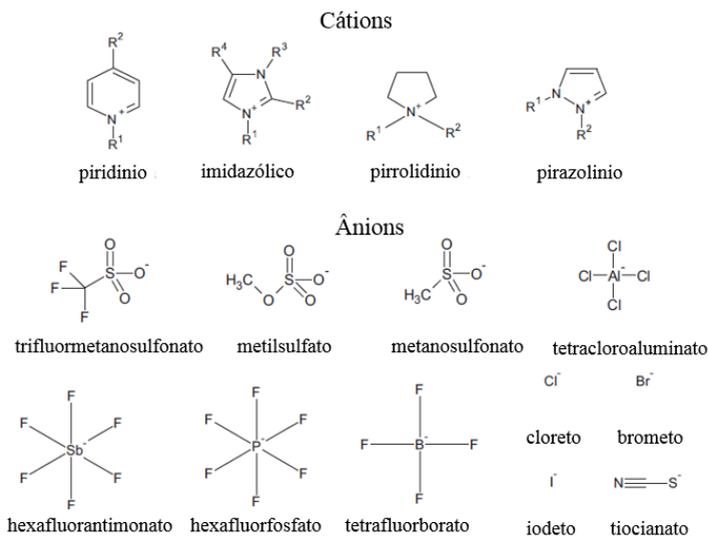
podem dissolver vários materiais hidrofóbicos, hidrofílicos e compostos poliméricos.(MAI; AHN; KOO, 2014; MONIRUZZAMAN et al., 2010)

Estes compostos são, em geral, imiscíveis em água e em muitos solventes orgânicos, como *n*-hexano, e miscíveis em solventes polares, com álcoois de cadeia pequena, cetonas e diclorometano. Devido a imiscibilidade dos LIs, muitas vezes é necessário o uso de sistemas bifásicos como solvente da reação.(MONIRUZZAMAN et al., 2010)

LIs apresentam uma grande variedade nas propriedades físico-químicas, dependendo dos cátions e ânions presentes na estrutura. Estas propriedades físico-químicas, tais como, polaridade, hidrofobicidade, densidade e viscosidade desempenham um papel importante inclusive afetando a atividade e a estabilidade da enzima. Além disto, os LIs também podem auxiliar na régio- e enantiosseletividade das reações catalisadas por enzimas.(MONIRUZZAMAN et al., 2010; NAUSHAD et al., 2012)

A **Figura 9** mostra os principais cátions e ânions que formam os LIs mais utilizados em biocatálise. Os mais comuns são os cátions imidazólicos e seus derivados, como por exemplo, o metanosulfonato de 1-etil-3-metil-imidazólio ([Emim][CH₃SO₃]), tetrafluoroborato de 1-butil-3-metil-imidazólio ([BMIm][BF₄]) e o hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil-imidazólio ([BMIm][PF₆]).

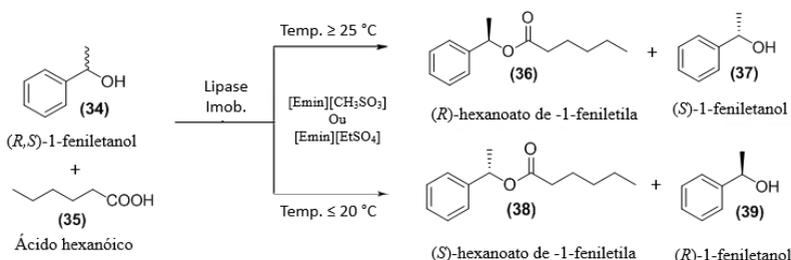
Figura 9. Cátions e ânions mais utilizados para formar LIs (adaptado)



Fonte: MOHAMMAD FAUZI; AMIN, 2012

Vários LIs foram utilizados em reações enzimáticas, como por exemplo no trabalho de Bustos-Jaimes e *col.*. Eles imobilizaram a lipase de *Bacillus pumilus* A em sílica gel, e realizaram a resolução do (*R,S*)-1-feniletanol (**34**) com o ácido hexanóico (**35**) (**Esquema 9**) em *n*-hexano, metanosulfonato de 1-etil-3-metil-imidazólio ([Emim][CH₃SO₃]) ou metilsulfonato 1-etil-3-metil-imidazólio ([Emim][Et₃SO₄]) como solventes da reação. Os resultados obtidos mostram que as reações realizadas com os LIs foram seletivas, enquanto que com *n*-hexano puro não. A formação do (*R*)- ou (*S*)-enantiômero também foi dependente da temperatura da reação. (BUSTOS-JAIMES et al., 2013)

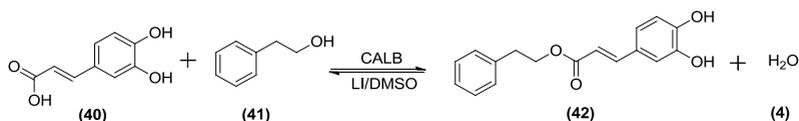
Esquema 9. Resolução do (*R,S*)-feniletanol (adaptado)



Fonte: BUSTOS-JAIMES et al., 2013

Em outro exemplo, Gu e *col.*, realizaram a esterificação entre o ácido caféico (**40**) e o 2-feniletanol (**41**) (**Esquema 10**), utilizando vários LIs e DMSO como co-solventes da reação, e CALB como catalisador. Ao realizar a reação utilizando razão molar entre os reagentes de 1:30, razão entre ácido caféico e CALB de 1:18, 80 °C, e o LI bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-butil-3-metilimidazólio [Bmim][Tf₂N] e 2 % de DMSO (v/v) como solventes, obteve-se 97 % de conversão dos reagentes ao respectivo éster (**42**). (GU et al., 2014)

Esquema 10. Esterificação do ácido caféico com o 2-feniletanol



Fonte: desenvolvido pelo autor

Pode-se notar que o uso de LIs como solventes puros ou co-solventes em reações biocatalisadas, é de grande importância. Além de ser mais ecologicamente aceitáveis, eles podem auxiliar na resolução de racematos para a obtenção de compostos enantiomericamente puros, sendo de grande interesse principalmente para a preparação de fármacos.

Com o crescente desenvolvimento na obtenção de compostos enantiomericamente puros, também foram desenvolvidos métodos para a análise destes produtos, permitindo avaliação da pureza enantiomérica deles. Entre os métodos mais utilizados está a cromatografia gasosa quiral.

1.9. Cromatografia gasosa quiral (CGQ)

Como já descrito, os enantiômeros possuem propriedades físicas e químicas idênticas. Estas características inviabilizam a separação e identificação destes compostos quirais através de métodos convencionais, exigindo uma abordagem diferente para a sua separação.(MORRISON, 2012; PORTE; PORTE; OLIVEIRA, 2014)

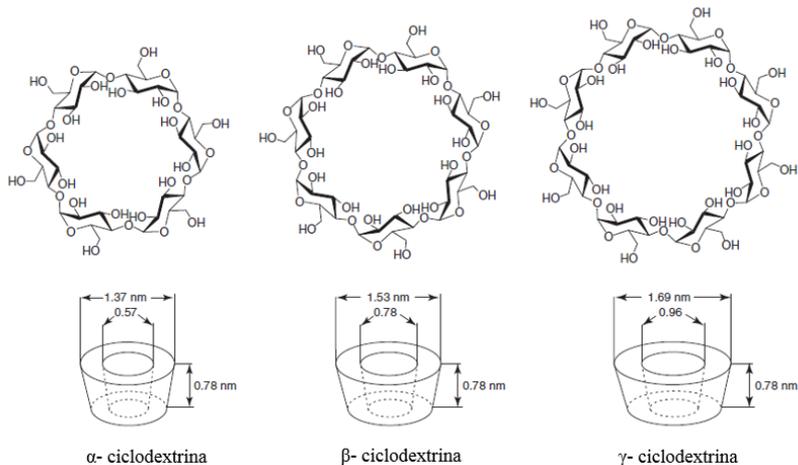
A separação de enantiômeros por cromatografia gasosa usando fases estacionárias quirais foi desenvolvida por Gil-Av e *col.*, na década de 60 em Israel.(MORRISON, 2012; PORTE; PORTE; OLIVEIRA, 2014) Devido sua alta eficiência, sensibilidade e velocidade na separação quiral, esta é uma técnica altamente aplicada para análise de enantiômeros e seus parâmetros (excesso enantiomérico, conversão e razão enantiomérica). No entanto, o método apresenta os mesmos pré-requisitos que a cromatografia gasosa simples, sendo que amostra analisada deve apresentar, principalmente, volatilidade e estabilidade térmica, o que restringe seu uso geral.(MORRISON, 2012; SCHURIG, 2005)

Em cromatografia gasosa quiral, geralmente uma substância quiral enantiomericamente pura (denominada seletor quiral) está presente na fase estacionária, e esta substância interage com os enantiômeros da amostra de forma diferenciada, produzindo a separação dos mesmos. As ciclodextrinas modificadas são os principais compostos utilizados como fase estacionária quiral.(PORTE; PORTE; OLIVEIRA, 2014)

As ciclodextrinas (CD) são formadas como produtos da degradação enzimática do amido. São oligossacarídeos cíclicos constituídos principalmente de 6 a 8 unidades de glicose unidas por ligação α (1 \rightarrow 4), denominadas α -, β - e γ - ciclodextrinas, embora ciclodextrinas com 12 ou mais resíduos de glicose sejam conhecidas. As unidades de glicose estão arranjadas espacialmente na forma de um cone cortado.(COLLINS,

2006; MORRISON, 2012; PORTE; PORTE; OLIVEIRA, 2014) As ciclodextrinas mais comuns utilizadas em cromatografia estão apresentadas na **Figura 10**.

Figura 10. Estruturas moleculares e dimensões das α -, β -, γ - CD (adaptado)



Fonte: MORRISON, 2012

Devido à ausência de grupos hidroxilas livres orientados para o interior da cavidade da CD, esta apresenta caráter hidrofóbico, enquanto o exterior apresenta caráter hidrofílico. (PORTE; PORTE; OLIVEIRA, 2014) O mecanismo de separação está baseado na formação de complexos de inclusão entre o analito quiral e a CD, devido a inclusão da parte hidrofóbica da molécula quiral na cavidade também hidrofóbica da CD.(COLLINS, 2006)

A partir das áreas obtidas nos cromatogramas das análises de CGQ, é possível calcular os excessos enantioméricos dos reagentes e produtos (**Equação 5**), e a partir destes valores, a razão enantiomérica (E) da reação.

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

Eq. 5

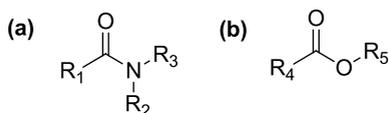
O método de cromatografia gasosa quiral vem sendo utilizado para a análise de diversos compostos de grande interesse, como por

exemplo, amidas e ésteres, que tem grande importância principalmente para indústrias farmacêuticas e alimentícias.

1.10. Amidas e ésteres

As amidas e ésteres são compostos orgânicos com fórmula geral apresentadas na **Figura 11**, podendo os grupamentos (R) serem iguais ou diferentes. (MCMURRY, 2010)

Figura 11. Estruturas gerais de amidas (a) e ésteres (b)

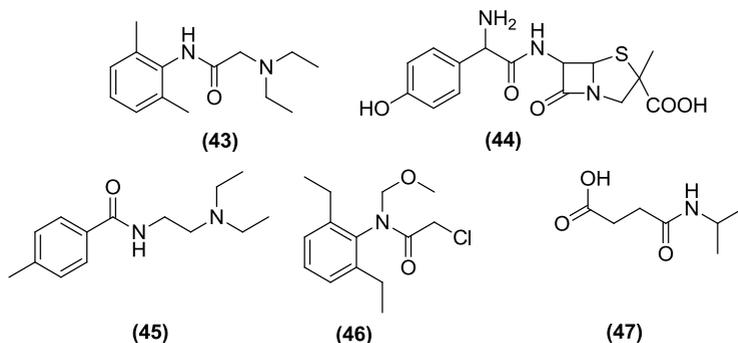


Fonte: desenvolvido pelo autor

As amidas são compostos importantes em síntese orgânica, principalmente pela sua presença em diversos compostos farmacologicamente ativos e em compostos aplicados na agricultura. (BOROS et al., 2013)

A **Figura 12** apresenta alguns exemplos de compostos de interesse que contêm a função amida. Os fármacos apresentados são a lidocaína (**43**), a amoxicilina (**44**) e a procainamida (**45**), que são usados como anestésico, antibiótico e antiarrítmico, respectivamente. Relacionado a agricultura pode-se citar o Alaclor (**46**), um herbicida e a daminozida (**47**), que é um regulador do crescimento vegetal. (WEXLER, 2014)

Figura 12. Exemplos de amidas com aplicações farmacológicas e na agricultura

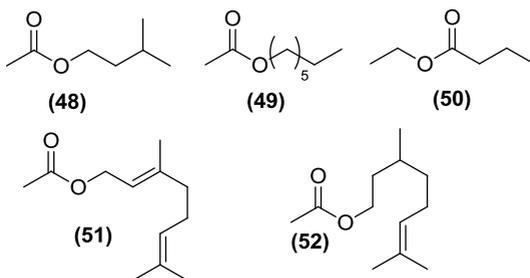


Fonte: desenvolvido pelo autor

Os ésteres estão entre os mais abundantes de todos os compostos de ocorrência natural, geralmente são responsáveis pelos odores e sabores de folhas e frutos, e estes são conhecidos como ésteres de aroma. (YADAV; DEVENDRAN, 2012)

Embora o aroma natural de plantas e frutas não seja formado apenas por um composto, os ésteres de aroma geralmente possuem um aroma característico, como por exemplo o acetato de isoamila (**48**) possui aroma de banana, o acetato de octila (**49**) de laranja, o butanoato de etila (**50**) de abacaxi, o acetato de geranila (**51**) possui nuances florais-fragrante (por exemplo, rosa) e o de citroneila (**52**) aroma cítrico. (FAHLBUSCH et al., 2003) A **Figura 13** apresenta a estrutura química destes compostos.

Figura 13. Exemplos de ésteres de aroma



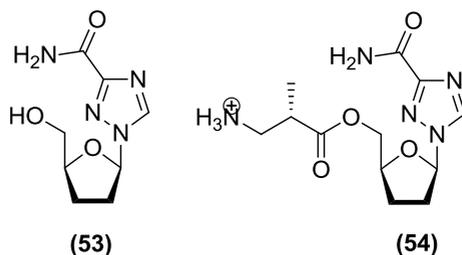
Fonte: desenvolvido pelo autor

Por suas características, estas classes de compostos são importantes ingredientes na indústria, sendo os ésteres geralmente utilizados para fornecer sabor e fragrância em diversos segmentos, e as amidas principalmente na indústria farmacêutica.

Como já mencionado a utilização de enzimas para obtenção destes compostos tem sido cada vez mais estudada. Isto deve-se principalmente pela quimio- régio- e enantiosseletividade das mesmas, o que as torna cada vez mais importante. (DEVENDRAN; YADAV, 2014; PATEL, 2012)

Alguns exemplos podem ser citados, como a acilação régiosseletiva do fármaco Ribavirin (**53**) (**Figura 14**), um anti-viral utilizado no tratamento da hepatite C. A produção deste fármaco produz vários sub-produtos, e talvez estes sejam a causa de efeitos colaterais causados pelo mesmo. A acilação deste com a L-alanina catalisada pela CALB foi realizada, e mostrou ser um método eficaz para reduzir esses efeitos colaterais e melhorar as características fármaco-cinéticas. O éster **54** foi obtido com rendimento de 85 %, após 24 h de reação à 60 °C.(PATEL, 2012; TAMAREZ et al., 2003)

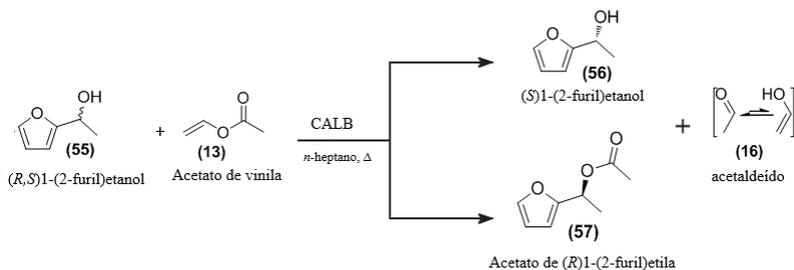
Figura 14. Ribavirin (**53**) e produto da acilação com L-alanina (**54**) (adaptado)



Fonte: PATEL, 2012

Devendran e *col.*, realizaram a resolução do (*R,S*)-1-(2-furil) etanol, sendo o (*S*)-enantiômero de grande importância como bloco de construção nas indústrias química e farmacêutica, principalmente para a obtenção de flavonóides, antibióticos e derivados de carboidratos. A resolução foi realizada com diferentes agentes acilantes e lipases como catalisadores, em *n*-heptano como solvente. Os melhores resultados foram obtidos utilizando o acetato de vinila como agente acilante e como biocatalisador a CALB (5 mg) (**Esquema 11**), sendo obtido o produto com um *ee_s* de 89 % e conversão de 47 % em 2 h, a 60 °C.(DEVENDRAN; YADAV, 2014)

Esquema 11. Resolução enzimática do (*R,S*)-1-(2-fúril)etanol (adaptado)



Fonte: DEVENDRAN; YADAV, 2014

Com base no exposto, neste trabalho foram utilizadas diversas lipases imobilizadas ou não, para a obtenção de amidas alifáticas e ésteres derivados do (\pm)-mentol em meio orgânico.

2. OBJETIVOS

Utilizar filmes de amido de milho e/ou em misturas com outros polímeros sintéticos como suportes para a imobilização de lipases de diversas procedências. Utilizar estes sistemas como catalisadores em reações de resolução da (\pm) 2-etilhexilamina e do (\pm)-mentol. E na acilação quimiosseletiva da 2-etanolamina. Para atingir esses objetivos, as seguintes metas foram cumpridas:

- Avaliar a influência de proporções variadas de amido de milho e dextrana na preparação do filme e determinar a estabilidade dos suportes em função do solvente orgânico à temperatura ambiente.
- Imobilizar lipases de diversas fontes no filme de amido de milho/dextrana e amido de milho.
- Sintetizar N-acetil amida derivadas da (\pm) 2-etilhexilamina e o produto da diacilação da 2-etanolamina, por método químico. Estas foram utilizadas como padrões na análise em cromatografia gasosa de fase estacionária quiral.
- Sintetizar ésteres etílicos e propílicos derivados do (\pm)-mentol, pelo método químico para utilização como padrões nas análises em cromatografia gasosa de fase estacionária quiral.
- Caracterizar todos os produtos por técnicas espectroscópicas de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) e cromatografia gasosa com fase estacionária quiral (CGQ).
- Avaliar a enantiosseletividade das diversas lipases na resolução dos compostos citados.
- Avaliar a influência do tempo, temperatura, massa da lipase, razão molar dos reagentes, uso de diversos suportes, diferentes agentes acilantes, solvente orgânico puro e/ou em misturas com líquidos iônicos (LIs) nas reações de resolução, utilizando lipases imobilizadas como biocatalisadores.
- Avaliar a reutilização do suporte após a armazenagem em solvente orgânico em tempos pré-determinados.
- Comparar os resultados obtidos com outros reportados na literatura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes, solventes e enzimas

Foram utilizados os seguintes reagentes:

(±) 2-etilhexilamina (Aldrich 98%); 2-aminoetanol (Vetec 99%); agar-agar PS (Isopar); amido de milho (Duryla-Maisena); acetato de vinila (Vetec 99%); ácido acético (Grupo Química 99%); ácido clorídrico (Quimex 36,5%); ácido propanóico (Vetec 99%) ácido sulfúrico (Quimex 95%); anidrido acético (Vetec 97%); bicarbonato de sódio (Dinâmica 99,5%); bucha vegetal (Santa Clara-SP); dextrana de *Leuconostocme senteroides* (Sigma 95%); (±)-mentol (SAFC 99%); gelatina –Tipo A- da pele do porco (Sigma); piridina (Nuclear 99%); propionato de vinila (Aldrich 98%); PVA (Vetec); sagu (Lisabor); sílica gel 60 (0,04-0,063 mm) (70-230 mesh) para cromatografia em coluna; sílica gel 60G para cromatografia em camada fina (700-800 mesh); sorbitol (Vetec 99%) e sulfato de magnésio seco (Vetec 99,5%);

Líquidos iônicos: tetrafluoroborato de 1-butil-3-metil-imidazólio [BMIm][BF₄] (Fluka 97%), cloreto de 1-butil-3-metil-imidazólio [BMIm][Cl] (Fluka 99%), hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil-imidazólio [BMIm][PF₆] (Fluka 96%), tiocianato de 1-butil-3-metil-imidazólio [BMIm][SCN] (Fluka 97%), brometo de 1-butil-3-metil-imidazólio [BMIm][Br] (Fluka 99%);

- Os amidos de batata, gengibre, lírio-do-brejo, mandioca e pinhão, foram extraídos de suas fontes vegetais no laboratório para trabalhos anteriores, e utilizados para os testes da influência do uso de amido de diversas procedência (ver item 4.4.8). (LEDRA, 2012)

Foram utilizados os seguintes solventes:

1,4-dioxano (Vetec 99%); acetonitrila (Vetec 99,5%); acetona (Vetec 99,7%); álcool *terc*-butílico (Vetec 99%); clorofórmio (Synth 99,8%); diclorometano (Vetec 99,5%); etanol (Synth 99,5%); éter etílico (FM 98%); éter *terc*-butilmetílico (MTBE) (Vetec 99,7%); heptano (Vetec 99%); *n*-hexano (Synth 98,5%); tolueno (Synth 99,5%) e clorofórmio deuterado (CDCl₃) (Aldrich).

Foram utilizadas as seguintes lipases:

lipase de *Aspergillus niger* - *A.niger* bruta (in natura, 17,2 u/mL)¹
lipase de *Burkholderia cepacia* - LBC (Amano, 30.000 u/g)²
lipase de *Burkholderia cepacia* SD – LSD (Amano, 30.000 u/g)
lipase de *Candida antarctica* B - CALB (Novozymes 435, 10.000 PLU/g)³
lipase de *Candida rugosa* - LCR (Sigma, 746u/mg)
lipase de *Candida rugosa*- LAY (Amano, 30.000 u/g)⁴
lipase de *Mucor javanicus* - LM (Amano, 10.000u/g)⁴
lipase de *Pseudomonas fluorescens*- LAK (Amano, 25.000 u/g)
lipase de *Rhizomucor miehei* – RM IM (Novozymes 5-6 BAUN/g)⁵
lipase de *Rizopus oligosporus*- LRO (in natura, 12,6 u/mL)

¹ Doadada pela Professora Patrícia O. Carvalho (USF-Bragança Paulista-SP)

² U/g é a quantidade necessária para liberar 1,0 µmol/min de acetato de 1-feniletila a partir da transesterificação do álcool 1-feniletílico com acetato de vinila a 25 °C.

³ PLU é uma unidade relacionada à síntese de ésteres, expressa em unidades de laurato de propila por grama, mas a reação utilizada para determinação de sua atividade é omitida na ficha técnica. (www.novozym.com)

⁴ u/g é a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µmol/min de ácidos graxos do óleo de oliva, a pH 7,0 e 30°C.

⁵ BAUN/g é atividade baseada na acidólise de óleo de girassol rico em ácido oléico, empregando ácido decanóico. A velocidade da reação é determinada pela medida da quantidade de ácido decanóico incorporada às posições 1 e 3 dos triacilgliceróis do óleo de girassol.

3.2. Equipamentos

3.2.1. Laboratório de Biocatálise - Departamento de Química

Agitadores magnéticos (Dist)

Banho Termostatizado (Marclabor)

Chapas de aquecimento com agitação magnética (Dist)

Cromatógrafo a gás (CG Agilent Tecnologia 7820 A)

Rotaevaporador (Buchi 461)

3.2.2. Outros laboratórios

Espectrômetro de RMN de H¹ (Varian AC 400F, 400 MHz) – Central de Análises - Departamento de Química

Espectrofotômetro de infravermelho (Varian 3100 FT-IR Excalibur Series) - Laboratório de Catálise e Fenômenos Interficiais - Departamento de Química

Microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6390LV) –
Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME)

Espectrômetro de massas – (Amazon X Ion Trap) Laboratório
Central de Biologia Molecular Estrutural (CEBIME)

3.3. Preparação dos suportes para imobilização das lipases

3.3.1. *Preparação do filme de amido de milho/dextrana/sorbitol ou amido de milho/sorbitol*

Os filmes foram preparados seguindo a metodologia descrita a seguir.

Em um béquer de 50 mL foram adicionados 0,8 g de amido de milho, 0,2 g de dextrana e 0,3 g de sorbitol para um tipo de filme, e 0,7 g de amido de milho e 0,3 g de sorbitol para o outro. A mistura foi então dissolvida em 15 mL de água destilada. A solução formada foi mantida sob agitação magnética e com aquecimento de ~100 °C por cerca de 35 min., e em seguida foi resfriada, e adicionado massas pré-determinadas das várias lipases (10-50 mg).

O sistema foi agitado por mais 10 min., transferido para uma placa de Petri e colocado na capela para evaporação da água (~48 h). Após a evaporação da água, os filmes com as enzimas imobilizadas foram cortados em pedaços pequenos e transferidos para um erlenmeyer de 50 mL que continha o solvente orgânico. Estes, estão prontos para serem usados nas reações biocatalisadas. (**Figura 15**)

Figura 15. Filme de amido de milho



Fonte: desenvolvido pelo autor

Foi utilizado o procedimento idêntico ao do segundo filme (0,7 g de amido e 0,3 g de sorbitol em 15 mL de água) para a preparação dos filmes com os amidos de diferentes fontes, que foram usados nas reações biocatalisadas (ver item 4.4.8).

No estudo da influência do tipo de suporte foi utilizado o mesmo procedimento da preparação do segundo filme (0,7 g de PVA ou gelatina e 0,3 g de sorbitol em 15 mL de água), e estes usados para imobilização da lipase (ver item 4.4.9).

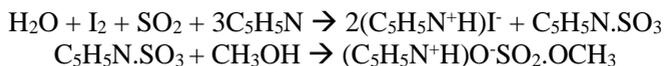
Os suportes contendo nanotudos de TiO₂ e Al₂O₃ foram preparados utilizando uma relação de 0,2 e 0,5 % (m/v) de nanotubos, 3,3 % (m/v) de PVA e 40 mg de LAY.

O filme de amido foi caracterizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a quantidade de água presente no mesmo determinada por titulação de Karl Fischer.

3.3.1.1. Determinação de água nos filmes de amido de milho

O teor de água nos filmes foi determinado pelo método de titulação de Karl-Fischer, na Central de Análises do Departamento de Química, utilizando o Titulador 633 Automático Karl Fischer, Metrohm AG CH-9100 Herisau.

O método baseia-se na determinação quantitativa de água em uma solução anidra de dióxido de enxofre e iodo. (MORITA, 2007)



As quantidades de água são expressas em porcentagem (%).

3.3.1.2. Análise do suporte por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As microfotografias dos suportes foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura modelo JOEL JSM-6390LV, localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica. Os filmes de amido de milho foram colocados em suporte metálico (stub) e as amostras foram fixadas no suporte com fitas de dupla face de C, Cu e posteriormente analisados.

3.3.2. Preparação de suportes por absorção física

A imobilização da lipase em bucha vegetal e sagu seguiu uma metodologia diferenciada da usada na preparação dos filmes.

A bucha vegetal foi colocada em solução de peróxido de hidrogênio durante 24 h, para limpar totalmente o suporte antes da imobilização. Após limpa, 0,5 g da bucha vegetal foi colocada em uma placa de Petri, onde foi adicionado 40 mg da lipase de *C. rugosa* (LAY) dissolvida em 25 mL de uma solução de tampão fosfato de potássio (pH 7,2). A solução aquosa foi evaporada a temperatura ambiente. Após esse período, o suporte com a lipase imobilizada estava pronta para ser estocado em solvente orgânico e utilizado nas reações.

O sagu (1 g) foi colocado em um béquer de 10 mL, e sobre ele foi adicionado 40 mg de LAY dissolvida em 2 mL de solução de tampão fosfato de potássio (pH 7,2). A solução aquosa foi absorvida pelo sagu. A seguir, o suporte com a lipase imobilizada estava pronto para ser estocado em solvente orgânico e utilizado nas reações.

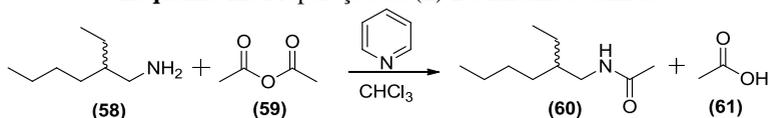
3.3.3. Preparação do gel de ágar

O gel de ágar foi preparado seguindo metodologia proposta por Silva e Nascimento. Em um béquer de 100 mL foram adicionadas 0,4 g de ágar, 1 mL de água e o sistema foi deixado no ultrassom por 3 min. Depois de 3 min completou-se com 7 mL de água fervente. Quando o sistema tornou transparente, deixou-se gelificar, até atingir uma temperatura de aproximadamente 30 °C, e em seguida adicionou-se 40 mg da LAY dissolvida em 2 mL de água. Após o resfriamento obteve-se um gel consistente e, com auxílio de uma espátula, este foi passado por uma peneira fina, obtendo-se assim pedaços pequenos de gel de ágar com enzima. Os pedaços de gel foram armazenados em solvente orgânico, para uso posterior. (SILVA; NASCIMENTO, 2014)

3.4. Preparação de amidas racêmicas por método químico

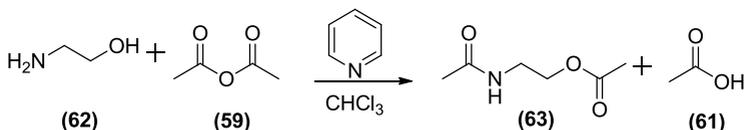
O procedimento apresentado a seguir foi utilizado para obter a N-acetil amida derivada da (±) 2-etilhexilamina (**Esquema 12**), além do produto da diacilação do 2-aminoetanol (**Esquema 13**). Estes compostos foram utilizados como padrões na CGQ.

Esquema 12. Preparação da (±) 2-etilhexilacetamida



Fonte: desenvolvido pelo autor

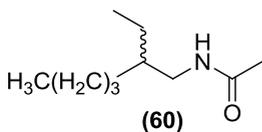
Esquema 13. Preparação do acetato de 2-acetamidoetila



Fonte: desenvolvido pelo autor

Em um balão de 250 mL adicionou-se 25 mmol da amina, 50 mmol de piridina, 50 mL de clorofórmio, Após, 50 mmol de anidrido acético foi adicionado gota-a-gota sobre a solução.

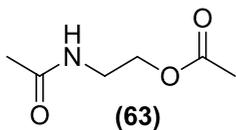
O sistema foi mantido sob agitação em banho de gelo. A reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (ccd) utilizando clorofórmio como eluente. Ao término da reação, a amida obtida foi transferida para um funil de separação, lavada com solução aquosa de ácido clorídrico 5% (3x 10 mL) e posteriormente com solução de bicarbonato de sódio 5% (3x 10 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio (MgSO_4) e evaporou-se o solvente. Os produtos foram caracterizados por RMN de H^1 e IV, e a pureza comprovada por ccd. Os espectros de RMN de H^1 e IV e os cromatogramas de todos os padrões, estão apresentados nos Anexos.



Rf= 0,53

RMN de H^1 (CDCl_3) δ 5,74 (s, 1H); δ 3,18 (m, J= 6,0 Hz, 2H); δ 1,99 (s, 3H); δ 1,28 (m, 10H); δ 0,89 (m, J= 7,4 Hz, 6H)^a

IV (KBr, cm^{-1}) 2934 [ν (C-H)] 1650 [ν (C=O)]
^a Nas integrais, foi observado a presença adicional de 1 hidrogênio



Rf= 0,66

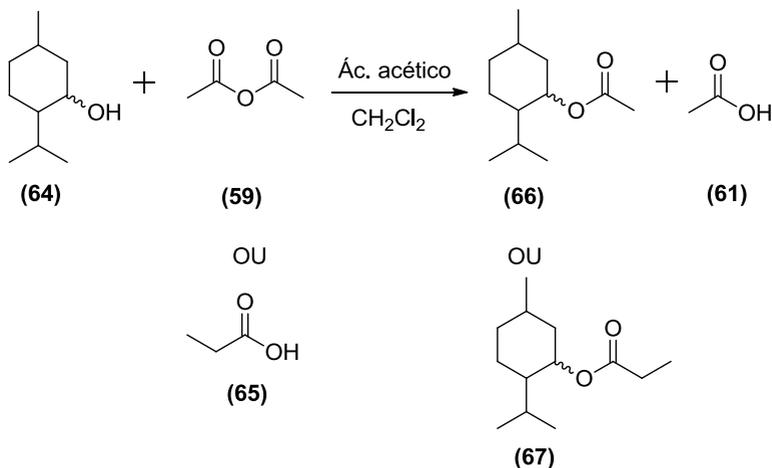
RMN de H^1 (CDCl_3) δ 6,79 (s, 1H); δ 4,17 (t, J= 5,5 Hz 2H); δ 3,50 (q, J= 5,5 Hz, 2H); 2,00 (s, 3H); 2,06 (s, 3H)

IV (KBr, cm^{-1}) 1739 [ν (C=O)]; 1645 [ν (C=O)]; 1236 [ν (C-O)]

3.5. Preparação de ésteres derivados do (\pm)-mentol por método químico

O **Esquema 14** mostra a equação química para a obtenção dos ésteres derivados do (\pm)-mentol.

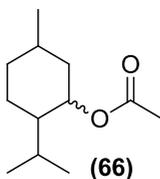
Esquema 14. Preparação dos ésteres racêmicos derivados do (\pm)-mentol



Fonte: desenvolvido pelo autor

Em um balão de 250 mL, adicionou-se 25 mmol do (\pm)-mentol, 50 mmol de anidrido acético ou ácido propanóico, 50 mL de diclorometano e quantidade catalítica (gotas) de ácido acético ou ácido clorídrico. O sistema foi mantido em refluxo por 48 h e a formação do produto foi acompanhada por ccd, utilizando como eluente *n*-hexano/acetato de etila (7:3 v/v).

Após a verificação da formação do éster, a solução foi transferida para um funil de separação e lavada com água (3x 10 mL), seguido por solução aquosa de bicarbonato de sódio (3x 10 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO_4 e concentrada. O produto foi caracterizado por RMN de H^1 e IV, e a pureza comprovada por ccd. Os espectros de RMN de H^1 e IV e os cromatogramas, de todos os padrões estão apresentados nos Anexos.

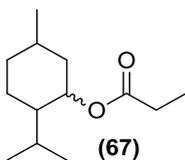


Rf= 0,69

RMN de H^1 ($CDCl_3$) δ 4,65 (t-d, J= 4,4 Hz, 1H); δ 2,79 (s, 3H); δ 1,90-1,20 (10H); δ 0,90 (d-d, J=7,1 Hz, 6H); δ 0,75 (d, J= 7,1 Hz, 3H)^a

IV (KBr, cm^{-1}) 2960 [ν (C-H)]; 1730 [ν (C=O)]; 1236 [ν (C-O)].

^a Nas integrais, foi observado a presença adicional de 1 hidrogênio



Rf= 0,73

RMN de H^1 ($CDCl_3$) δ 4,68 (t-d, J= 4,4 Hz, 1H); δ 2,3 (q, J= 7,5 Hz 2H); δ 2,0-1,30 (10H); δ 1,13 (t, J=7,6 Hz, 3H); δ 0,90 (d-d, J= 6,5 Hz, 6H); δ 0,76 (d, J= 7,0 Hz, 3H)

IV (KBr, cm^{-1}) 2953 [ν (C-H)]; 1732 [ν (C=O)]; 1200 [ν (C-O)].

3.6. Procedimento geral para a preparação de amidas e éster pelo método enzimático

Em um erlenmeyer de 50 mL, contendo a enzima imobilizada ou livre e 15 mL de solvente orgânico puro ou em misturas com LIs, adicionaram-se as aminas **58** ou **62** (5 mmol) ou (\pm)-mentol (3 mmol) e os diversos doadores acilas em diferentes proporções.

A seguir o meio reacional foi colocado sob agitação em banho termostatizado, onde periodicamente foram retiradas alíquotas para serem analisadas por cromatografia gasosa com fase estacionária quiral ou espectrometria de massas.

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

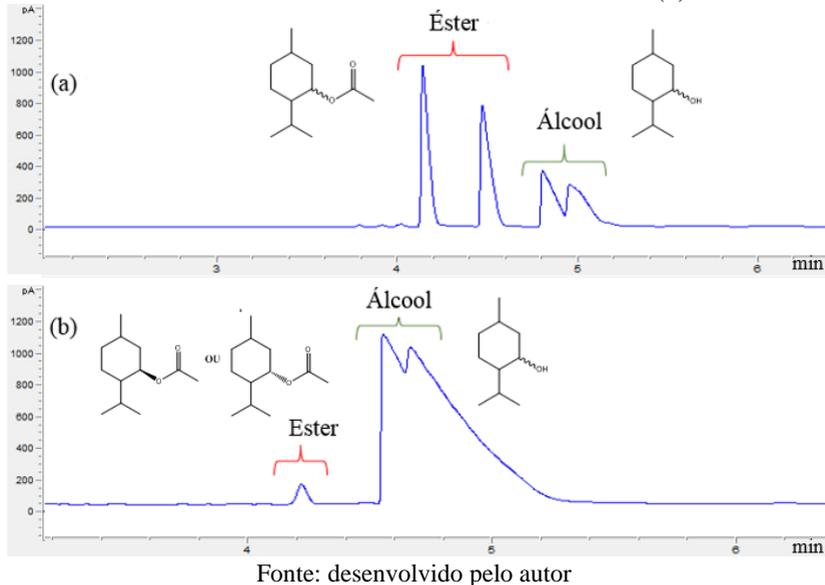
3.7. Condições experimentais nas análises de CGQ

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

As porcentagens de conversão ($c\%$) foram calculadas por comparação da área dos picos dos reagentes e produtos. Os excessos enantioméricos (ee) dos reagentes e produtos foram calculados através da **Eq. 5** (pg. 22), e a razão enantiomérica (E) pela **Eq. 4** (pg. 17)

A **Figura 16** mostra os cromatogramas do padrão químico do DL-acetato de mentila e de uma alíquota da reação de transesterificação do (\pm)-mentol com acetato de vinila.

Figura 16. Cromatograma do acetato de (\pm)-mentila e (\pm)-mentol (a) e cromatograma de uma alíquota da reação de transesterificação do (\pm)-mentol (3 mmol) com acetato de vinila (6 mmol), 35 °C, 48 h, 40 mg de LAY imobilizada em filme de amido de milho e 15 mL de tolueno como solvente (b)



3.7.1. Condições de análises para separação da amida derivada da (\pm)-2-etilhexilamina

As condições de análise utilizadas foram: pressão do gás carregador 13 psi; temperatura do injetor (Split 1:100) e detector (FID) 230 °C; volume da amostra 2 μ L. O programa de temperatura utilizado foi o seguinte:

- 90 °C por 1 min, e a seguir
- 3 °C/min até 95 °C por 2 min
- 3 °C/min até 140 °C por 2 min

5 °C/min até 230 °C

O tempo de retenção do reagente foi 2,7 e 2,8 min, e do produto de 18,9 e 19,1 min.

A coluna capilar utilizada foi da Restek - BetaDex-SM (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm)

3.7.2. Condições de análises para separação dos ésteres derivados do (±)-mentol

As condições de análise utilizadas foram: pressão do gás carregador 13 psi; temperatura do injetor (Split 1:100) e detector (FID) 230 °C; volume da amostra 2 µL

Estas análises cromatográficas foram realizadas em isoterma de 125 °C por 20 minutos.

O tempo de retenção do (±)-mentol foi 4,8 e 4,9 min, do acetato de (±)-mentila 4,2 e 4,4 min e do propionato de (±)-mentila 6,2 e 6,4 min.

A coluna capilar utilizada foi da Varian – CP-chiral Dex CB (25 m x 0,25 mm x 0,25 µm)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, lipases de diversas procedências foram imobilizadas em filmes de amido de milho e dextrana, ou apenas amido de milho. Bem como em amidos oriundos de outras fontes vegetais. Outros suportes usados foram os nanotubos de TiO_2 e Al_2O_3 , bucha vegetal, filmes de PVA e gelatina, gel de ágar e sagu. Estes sistemas foram utilizados na resolução enzimática da (\pm) 2-etilhexilamina e do (\pm)-mentol, e na acilação quimiosseletiva do 2-aminoetanol

Os padrões racêmicos (amidas e ésteres) foram sintetizados por métodos químicos e caracterizados por IV, RMN de H^1 e CGQ. Os produtos obtidos nas reações enzimáticas foram monitorados por CGQ.

As lipases LBC, LSD, LM, LAK, LAY, LCR, LRO e *A. niger* bruta, foram imobilizadas em filmes de amido de milho na presença e ausência de dextrana. Foram também utilizadas as lipases RM IM e CALB, que são imobilizadas industrialmente em resinas.

Foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura e titulação de Karl Fisher, a fim de se constatar o tipo de imobilização no filme de amido e o teor de água que os mesmos continham.

Nas reações enzimáticas foram avaliados vários parâmetros, tais como razão molar dos reagentes, temperatura, doador acila, tempo, procedência da lipase, massa da lipase, solvente, mistura solvente orgânico/líquido iônico (LI), diferentes suportes e amidos usados na preparação do suporte e reutilização do catalisador imobilizado. Os resultados estão apresentados a seguir e foram discutidos e comparados com outros reportados na literatura.

4.1. Preparação do filme de amido de milho

Em estudos anteriores, com o objetivo de definir as melhores condições para a formação de um filme de amido de milho/dextrana ou apenas amido de milho mais estável e maleável, foram feitos alguns testes.

Estes estudos mostraram primeiramente que o melhor agente plastificante para a preparação dos filmes é o sorbitol. As melhores proporções encontradas foram de 0,8 g de amido, 0,2 g de dextrana e 0,3 g de sorbitol. Outro filme maleável e estável foi obtido com 0,7 g de amido e 0,3 g de sorbitol. Estas escolhas visaram a obtenção um filme estável e economicamente viável. (SILVA, 2013)

Os dois filmes preparados foram testados quanto a sua estabilidade térmica e em diversos solventes orgânicos. Os filmes mostraram-se estáveis até a temperatura testada (45 °C) e em solventes

de diversas polaridade, sendo eles 1,4-dioxano, acetonitrila, etanol, acetona, éter etílico, diclorometano, MTBE, clorofórmio, tolueno, *n*-hexano e heptano.

Portanto, estes foram posteriormente usados para a imobilização das diversas lipases.

4.1.1. Determinação do teor de água nos filmes

Os teores de água nos filmes de amido foram determinados, utilizando o método de titulação de Karl-Fisher. Os filmes foram preparados com 30 mg de LBC, 40 mg de LAY e LCR ou na ausência das lipases. Os valores das porcentagens de água, para os sistemas preparados estão apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Determinação do teor de água nos filmes de amido de milho

| SISTEMA | TEOR DE ÁGUA (%) |
|------------------------------------|-------------------------|
| Amido de milho/dextrana | 11,4 |
| Amido de milho/dextrana/LBC | 8,5 |
| Amido de milho | 6,0 |
| Amido de milho/LAY | 3,9 |
| Amido de milho/LCR | 3,8 |

Fonte: desenvolvido pelo autor

Os resultados das análises mostram que o filme de amido de milho/dextrana e apenas de amido de milho apresentam 11,4 e 6,0 % de água, respectivamente.

Quando foi adicionado a lipase nestes filmes, pode-se observar que ocorreu um decréscimo. O filme de amido de milho/dextrana/LBC apresentou 8,5 %, e os de amido de milho/LAY e de amido de milho/LCR 3,9 e 3,8 %, respectivamente.

Está amplamente descrito na literatura que enzimas necessitam de uma quantidade mínima de água para manter sua atividade catalítica. (DRAUZ et al., 2012; FABER, 2011).

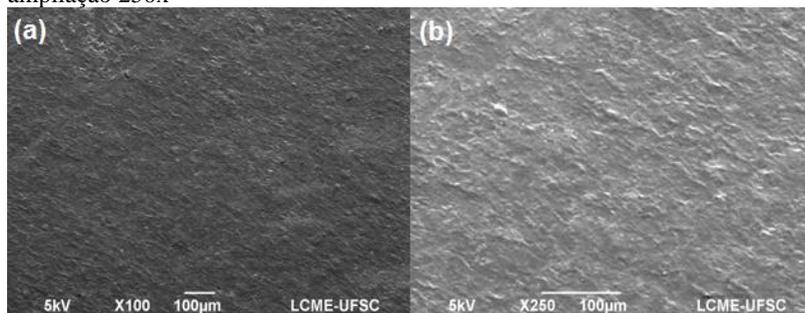
Os sistemas reacionais usados em todas as reações são não aquosos e a única água presente no meio é proveniente da preparação do suporte e imobilização da enzima. Portanto a água presente nos filmes é extremamente importante, já que auxilia na manutenção da atividade catalítica da lipase, mesmo estando presente em alguns casos em porcentagens menores que 5%.

4.1.2. Microscopia eletrônica de varredura dos filmes (MEV)

A técnica de MEV é uma análise que pode fornecer rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida. É uma das mais versáteis disponíveis para a observação e análise de características micro estruturais de objetos sólidos, sendo importante também, é a aparência tridimensional da imagem das amostras.(DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007)

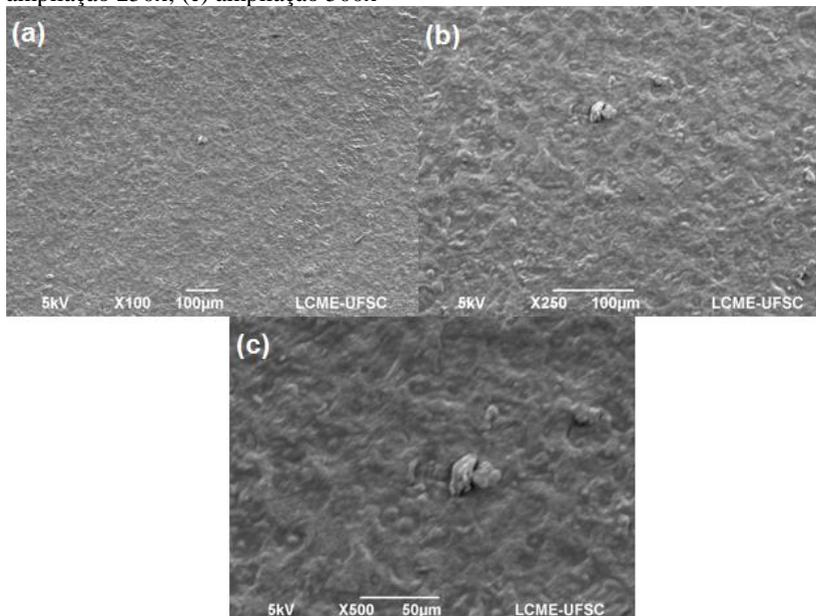
Com o intuito de constatar o tipo de imobilização obtido nos filmes de amido (adsorção física ou aprisionamento), foi realizado a microscopia eletrônica de varredura do filme preparado com 0,7 g de amido e 0,3 g de sorbitol, e do filme com mesma composição e com 40 mg de LAY. As imagens obtidas estão apresentadas nas **Figuras 17 e 18**.

Figura 17. Imagens do filme de amido sem LAY; (a) ampliação 100x; (b) ampliação 250x



Fonte: desenvolvido pelo autor

Figura 18. Imagens do filme de amido com LAY; (a) ampliação 100x; (b) ampliação 250x; (c) ampliação 500x



Fonte: desenvolvido pelo autor

A **Figura 17** mostra que o filme de amido sem lipase apresentou pequenas rugosidades, e a **Figura 18** mostra que a lipase permanece na superfície, justamente nas rugosidades do filme e também observou-se a presença de pequenos aglomerados de lipase nessas regiões. Estes resultados sugerem então, que a imobilização da enzima ocorreu pelo método de adsorção física.

Após a caracterização dos sistemas, as lipases imobilizadas foram usadas em diversas reações, sendo iniciado pela resolução enzimática da (\pm)2-etilhexilamina.

4.2. Resolução enzimática da (\pm)2-etilhexilamina

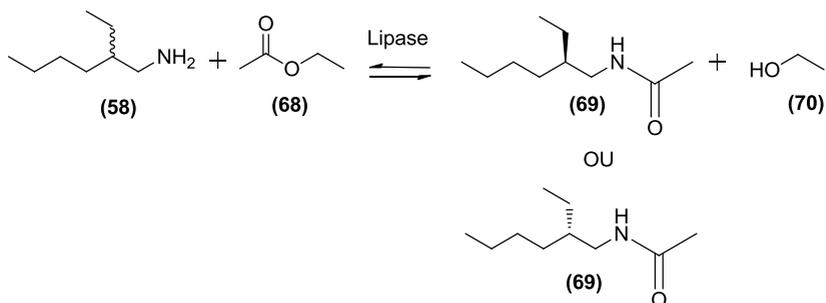
Inicialmente, realizou-se a reação de resolução da (\pm)2-etilhexilamina utilizando dois agentes acilantes, acetato de vinila e de etila. Como sistema catalisador foi utilizado a LBC livre, imobilizada em filmes de amido de milho/dextrana e apenas o filme na ausência da lipase.

As reações foram realizadas com quantidades equimolares dos reagentes (5 mmol), a 25 °C e com *n*-hexano como solvente. Este estudo

visa analisar qual agente acilante é o mais adequado para a resolução desta amina.

Pode-se observar que quando foi utilizado o acetato de vinila, a reação ocorreu na ausência da lipase ($c=93,6\%$; $ee_p=1,3\%$ e $E=1,15$) em menos de 0,5 h. Ao utilizar o acetato de etila, a reação somente ocorreu na presença da lipase. Sendo assim, foi escolhido o acetato de etila para os estudos posteriores (**Esquema 15**).

Esquema 15. Resolução enantiosseletiva de **58**



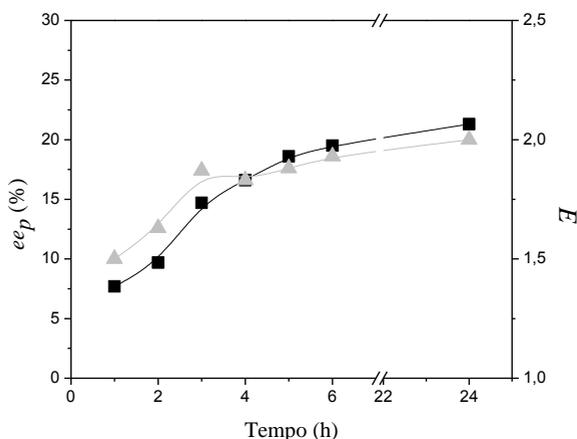
Fonte: desenvolvido pelo autor

4.2.1. Influência da imobilização da LBC na preparação de **69**

Para avaliar a influência da imobilização da LBC na conversão enantiosseletiva em **69**, a reação foi realizada com quantidades equimolares (5 mmol) de (\pm)-2-etilhexilamina e de acetato de etila, utilizando 30 mg de LBC (1,5 g/L) imobilizada em filme de amido de milho/dextrana ou na forma livre, a 25 °C e *n*-hexano. Foram retiradas alíquotas em tempos pré-determinados (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 h) e analisadas por CGQ. Com os resultados obtidos foi possível calcular os excessos enantioméricos do reagente (ee_s) e do produto (ee_p), conversão (c) e a razão enantiomérica (E).

Os valores de conversão variaram de 58,0-81,5 %. A **Figura 19** mostra os resultados obtidos dos excessos enantioméricos do produto e da razão enantiomérica em função do tempo, quando foi utilizado a lipase imobilizada.

Figura 19. Variação do ee_p e E em função do tempo utilizando a LBC imobilizada em filme de amido de milho/dextrana como catalisador ■ - ee_p ; ▲ - E [(±)2-etilhexilamina (5 mmol), acetato de etila (5 mmol), 25 °C, 30 mg de LBC e 20 mL de *n*-hexano]



Fonte: desenvolvido pelo autor

Pode-se observar um aumento nos valores de ee_p com o tempo de reação variando de 7,7 % em 1 h a 21 % em 24 h, entretanto a variação foi pouca entre 6 (19,5 %) e 24 h (21 %).

Sabe-se que nas reações de resolução, o excesso enantiomérico almejado, tanto dos reagentes como dos produtos, deve ser o mais próximo de 99 %. Porém, uma resolução não pode ser avaliada apenas a partir dos valores dos excessos enantioméricos, como descrito anteriormente, e a razão enantiomérica (E) é também um parâmetro utilizado para descrever a seletividade da resolução em relação a conversão e aos excessos enantiomérico.

Ao se analisar os valores de E desta reação, observou-se pouca alteração, sendo de 1,5 em 1 h a 2,0 em 24 h, e como já mencionado, valores de $E < 15$ são considerados inaceitáveis para fins práticos de separação. (FABER, 2011)

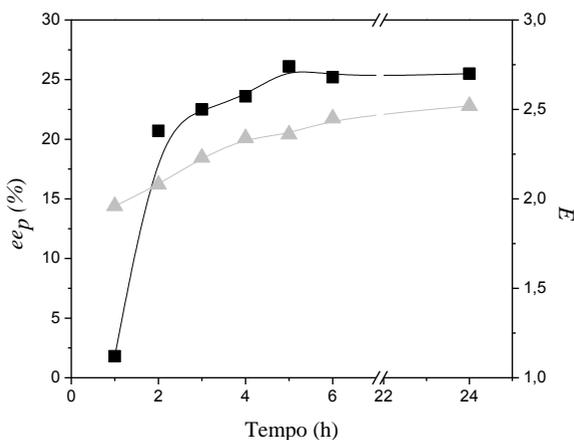
Wen e col. reportaram a acilação enantiosseletiva da (±)- α -feniletilamina com acetato de etila, catalisada pela lipase de *Yarrowia lipolytica*. Os resultados obtidos mostraram um grande aumento na

conversão entre 2 e 6 dias. Sendo assim, foi possível obter o produto, em 6 dias de reação, com conversão de 49 %, ee_p e ee_s de 96 % e E de 190.(WEN; TAN; YU, 2008)

Gupta e *col.*, imobilizaram por adsorção física a lipase de *Arthrobacter sp.* em sílica gel, celite e alumina básica e neutra. Estes sistemas foram usados na preparação do (*S*)-1,1-binaftil-2,2-diol. Os estudos constataram uma grande melhora na enantiosseletividade da reação quando foi utilizado a lipase imobilizada. (GUPTA et al., 2014)

Com a finalidade de comprovar se a imobilização da lipase influencia ou não na atividade catalítica ou na seletividade da mesma, foi realizada a reação com a LBC livre. A **Figura 20** mostra os resultados obtidos.

Figura 20. Variação do ee_p e E em função do tempo utilizando a LBC livre como catalisador ■ - ee_p ; ▲ - E [(±)2-etilhexilamina (5 mmol), acetato de etila (5 mmol), 25 °C, 30 mg de LBC e 20 mL de hexano]



Fonte: desenvolvido pelo autor

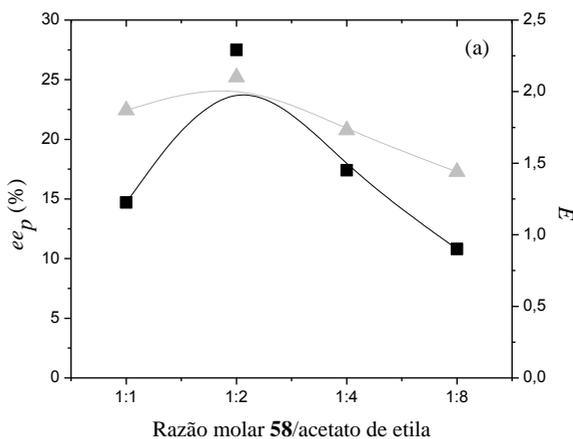
Pode-se observar um aumento nos valores de ee_p com o tempo de reação. Após 4 h, o ee_p apresentou pouca variação, sendo de 23,6 em 4 h a 25,5 % em 24 h. Quanto ao E da reação, observou-se um aumento crescente com o tempo, sendo de 1,9 em 1 h a 2,5 em 24 h. Entretanto, estes valores ainda estão muito abaixo do adequado para uma resolução enzimática seletiva.

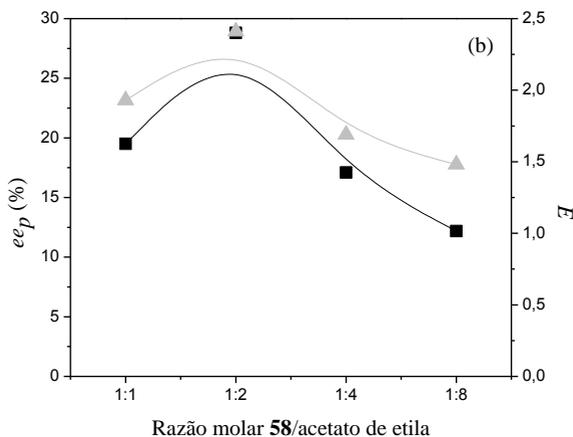
Ao comparar o uso da lipase imobilizada no filme de amido de milho/dextrana com a livre, constata-se que a reação com a lipase livre é mais eficiente com relação a seletividade, verificado nos valores de E . Todavia, como a diferença de valores de ee_p e E entre as duas reações foi pequena, optou-se por utilizar a enzima imobilizada, pois este é um método vantajoso para manter a atividade catalítica da enzima, protegê-la de solventes orgânicos e permitir a reutilização da mesma.

4.2.2. Efeito da razão molar

Com o intuito de avaliar a influência da razão molar na resolução da (\pm)-etilhexilamina, foram testadas as razões molares de 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8 (amina **58**: acetato de etila). Como biocatalisador foi utilizada a LBC imobilizada em filme de amido de milho/dextrana. A **Figura 21** mostra os resultados de ee_p e E em função da razão molar em 3 e 6 h, respectivamente.

Figura 21. Efeito da razão molar na obtenção de **58** ■ - ee_p ; ▲ - E [(\pm)-etilhexilamina (5 mmol), acetato de etila, 25 °C, 30 mg de LBC, 20 mL de *n*-hexano, 3 h (a) e 6 h (b)]





Fonte: desenvolvido pelo autor

Pode-se observar analisando as **Figuras 21a e b**, que as curvas de ee_p e E em 3 e 6 h possuem o mesmo perfil. Em 3 h, os valores de ee_p e o E aumentaram de 14,7 para 27,5 %, e de 1,9 para 2,1, respectivamente, quando a razão molar aumentou de 1:1 para 1:2. Em 6 h os valores de ee_p e o E aumentaram de 19,5 para 28,8 % e de 1,9 para 2,2, respectivamente.

Ao usar as razões molares de 1:4 e 1:8, constatou-se um decréscimo tanto nos valores de ee_p bem como nos de E . Em 3 h, o ee_p diminuiu de 27,5 para 17,4 %, e E de 2,1 para 1,7, quando a razão molar aumentou de 1:1 para 1:4. Em 6 h, o ee_p diminuiu de 28,8 para 17 %, e E de 2,4 para 1,7. Neste estudo, as conversões à amida **69**, variaram de 39,7-73,1 %.

Uma explicação plausível para a diminuição nos valores de ee_p e E ao usar razões molares maiores, pode ser pelo fato de que ao se aumentar a quantidade de acetato de etila na reação, aumenta a polaridade do meio. Está bem documentado que as lipases apresentam menor atividade catalítica em meios reacionais mais polares, e este dado pode ser explicado pelo fato que estes solventes “retiram” a água das lipases, e causam inativação na mesma. (DRAUZ et al., 2012; KOSKINEN; KLIBANOV, 1996)

Em termos reacionais, a razão molar entre os reagentes é de extrema importância. Como pode ser observado no **Esquema 15 (pg. 41)**, a reação estudada é reversível, sendo assim uma mudança na concentração dos reagentes pode deslocar o equilíbrio da reação para a

formação dos produtos.(DE MIRANDA; MIRANDA; DE SOUZA, 2013)

A partir dos resultados obtidos, a razão molar de 1:2 (amina **58**: acetato de etila) foi escolhida para os estudos sucessivos. Estes incluem o estudo da influência do uso de lipases de diversas procedências e a utilização de LIs como co-solventes na reação.

4.2.3. Influência do uso de lipases de diversas procedências

Lipases são produzidas a partir de vários microrganismos distintos, e a sua obtenção é influenciada pela fonte e concentração de carbono e nitrogênio, pH da cultura e temperatura de crescimento entre outros. Estes parâmetros podem principalmente acarretar em lipases com atividades catalíticas diferentes.(SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001)

Para a avaliação da procedência da lipase usada como catalisador da resolução entre a amina **58** com o acetato de etila, foram utilizadas 30 mg das enzimas comerciais LBC, LSD, LM, a mesma quantidade das lipases nativas *A. niger* bruta e LRO, todas em suas formas livres, e 30 mg de CALB e RM IM, que são adquiridas imobilizadas. As reações foram feitas em *n*-hexano e 25 °C. Foram analisadas alíquotas em 3 e 6 h de reação. A **Tabela 3** apresenta os resultados de conversão (*c*), *ee_p* e *E* obtidos deste estudo.

Tabela 3. Influência da procedência da lipase na obtenção de **69**^a

| LIPASE | 3 h | | | 6 h | | |
|----------------|--------------|---------------------------|----------|--------------|---------------------------|----------|
| | <i>c</i> (%) | <i>ee_p</i> (%) | <i>E</i> | <i>c</i> (%) | <i>ee_p</i> (%) | <i>E</i> |
| LBC | 41,5 | 26,8 | 2,1 | 42,5 | 28,8 | 2,2 |
| LSD | 48,8 | 21,8 | 1,8 | 55,4 | 20,3 | 1,9 |
| LM | 85,3 | 4,8 | 1,3 | 83,6 | 5,4 | 1,4 |
| LRO | 70,4 | 10,8 | 1,5 | 69,8 | 10,7 | 1,5 |
| <i>A.niger</i> | 92,2 | 2,9 | 1,3 | 75,5 | 5,6 | 1,3 |
| CALB | 75,2 | 6,6 | 1,3 | 66,5 | 10,3 | 1,5 |
| RM IM | 94,6 | 2,1 | 1,3 | 96,1 | 1,6 | 1,3 |

^a [(±)2-etilhexilamina (5 mmol), acetato de etila (10 mmol), 25 °C, 30 mg lipase e 20 mL de *n*-hexano] Fonte: desenvolvido pelo autor

Quando foram utilizadas as lipases imobilizadas, pode-se observar que as reações, tanto com a CALB quanto com a RM IM, não foram seletivas. Ao utilizar a CALB, obtiveram-se os valores de *ee_p* de

6,6, E de 1,3 e conversão de 75 %, em 3 h. Em 6 h, os valores de ee_p foram de 10,3, E de 1,5 e conversão de 66,5 %. Ao utilizar a RM IM, em 3 h de reação, os valores de ee_p foram de 2,1, E de 1,3 e conversão de 95 %. Em 6 h, os valores de ee_p foram de 1,6, E de 1,3 e conversão de 96 %.

Ao usar estas lipases, observou-se uma conversão muito alta. Porém, este resultado não está relacionado com a eficiência da reação em ser seletiva. Além de outros fatores, sabe-se que para se obter uma seletividade ideal em uma reação, a conversão ao produto deve ser próxima a 50 %. Isto significa que apenas um enantiômero do reagente foi consumido, para formar apenas um dos enantiômero do produto. Embora não tenha sido observado seletividade, estas duas lipases podem ser usadas para obter a amida racêmica, em condições brandas e tempo curto de reação.

Nas reações feitas com as lipases nativas *A. niger*, LRO e a comercial LM, as conversões foram maiores que 50 % (92, 70 e 85 % em 3 h e 75, 70 e 84 % em 6 h, respectivamente). Os valores de E foram muito abaixo do ideal, sendo de 1,3, 1,5, 1,3 em 3 h e 1,3, 1,5, e 1,4 em 6 h, respectivamente. Portanto, estas também não foram adequadas para serem usadas na resolução desta amina.

A reações realizadas com as lipases LBC e LSD foram as que apresentaram conversão mais próximas a 50 % (41,5 e 49 % em 3 h e 42,5 e 55 % em 6 h, respectivamente). Ao usar a LBC, os valores de ee_p foram 26 % e 29 % em 3 e 6 h de reação, e ao usar a LSD estes foram de 22 % e 20 %, respectivamente. Embora os valores de conversão tenham sido próximos a 50 %, a seletividade (E) foi muito abaixo do que é considerado ideal e satisfatório para uma resolução enantiosseletiva (2,1 e 1,9 em 3 h e 2,2 e 1,9 em 6 h, respectivamente).

Não é possível relacionar os valores de ee_p , conversão ou E com a atividade catalítica das lipases fornecida pelos fabricantes, já que as atividades foram determinadas em diferentes reações. (Ver item 3.1)

Pilissão e *col.*, avaliaram a utilização de diversas lipases na acilação enantiosseletiva da (*R,S*)-feniletilamina com o acetato de etila (1:2). Neste estudo, os resultados mostraram que a conversão a correspondente amida foi dependente da atividade catalítica da lipase.(PILISSÃO; CARVALHO; NASCIMENTO, 2009)

A partir destes dados, a LSD foi escolhida para o estudo da influência do uso de misturas entre *n*-hexano e LIs, e também pelo fato de estar disponível em quantidade suficiente.

4.2.4. Efeito do uso de misturas *n*-hexano/LIs como solvente da reação

Embora ainda muito discutido, uma alternativa quando se refere a reações mais ambientalmente aceitáveis, é o uso de LIs como solventes puros ou co-solventes em processos biocatalisados. Além do fator ambiental, os LIs podem apresentar algumas vantagens como auxiliares na obtenção de conversões e enantiosseletividade maiores nas reações biocatalisadas. (MONIRUZZAMAN et al., 2010; PARK; KAZLAUSKAS, 2003)

Para avaliar a influência de LIs na seletividade desta reação, foram utilizados como solvente, uma mistura de *n*-hexano e LIs (9:1 v/v). A escolha desta composição foi baseada em estudos anteriores, nos quais estes LIs foram utilizados na resolução da (*R,S*) – feniletilamina. (PILISSÃO; CARVALHO; NASCIMENTO, 2009)

Os 2 LIs testados foram o tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIm][BF₄] e hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIm][PF₆]. A reação foi realizada com 30 mg de LSD livre, a 25 °C. Os resultados obtidos deste estudo estão apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Influência de LIs na obtenção de **69**^a

| TEMPO (h) | [BMIm][PF ₆] | | | [BMIm][BF ₄] | | |
|--------------|--------------------------|------------------------|-----|--------------------------|------------------------|-----|
| | c (%) | ee _p (%) | E | c (%) | ee _p (%) | E |
| 1 | 69,6 | 17,6 | 2,0 | 41,6 | 18,7 | 1,6 |
| 2 | 60,5 | 18,5 | 1,8 | 52,2 | 23,1 | 2,0 |
| 3 | 62,7 | 23,7 | 2,3 | 58,4 | 19,4 | 1,9 |
| 4 | 52,4 | 24,2 | 2,1 | 68,9 | 20 | 2,2 |
| 5 | 68,2 | 20,0 | 2,2 | 52,8 | 24,1 | 2,2 |
| 6 | 86,2 | 4,8 | 1,3 | 93,1 | 7,3 | 3,9 |
| 24 | 83,4 | 6,4 | 1,4 | 75,1 | 13,1 | 1,8 |

^a [(±)2-etilhexilamina (5 mmol), acetato de etila (10 mmol), 25 °C, 30 mg lipase e 20 mL de *n*-hexano:Lis (9:1 v/v)] Fonte: desenvolvido pelo autor

Quando foi utilizado [BMIm][PF₆] como co-solvente, a reação apresentou as conversões acima de 50 % (52-86 %), e valores de *E* menores, sendo de 1,3 a 2,3 independente do tempo de reação. Os valores de ee_p variaram entre 4,8-24 %, sendo considerados não adequados para uma resolução enantiosseletiva. Ao utilizar [BMIm][BF₄] como co-

solvente, as conversões variaram de 42 a 93 %, os valores de E de 3,9 a 1,6 e ee_p de 7,3 a 21 %. Os dados obtidos mostraram que estes LIs usados nesta proporção, não foram eficientes em auxiliar na enantiosseletividade desta reação de acilação.

Pilissão e Nascimento estudaram o efeito de LIs na resolução do (*RS*)-mandelato de metila com a *n*-butilamina catalisada pela CALB. Foram utilizados como solventes *n*-hexano, clorofórmio e *t*-butanol, puros ou em misturas com [BMIm][BF₄] e [BMIm][PF₆]. Os resultados mostraram que uma melhora na enantiosseletividade da reação quando foram utilizadas misturas de clorofórmio e *t*-butanol com os dois LIs estudados. (PILISSÃO; NASCIMENTO, 2006)

Uma justificativa para não ter ocorrido aumento na seletividade nesta reação ao se utilizar LIs, é que a resolução enzimática não depende apenas do uso ou não de LIs mas também da interação entre substrato-enzima-meio reacional, entre outros fatores.

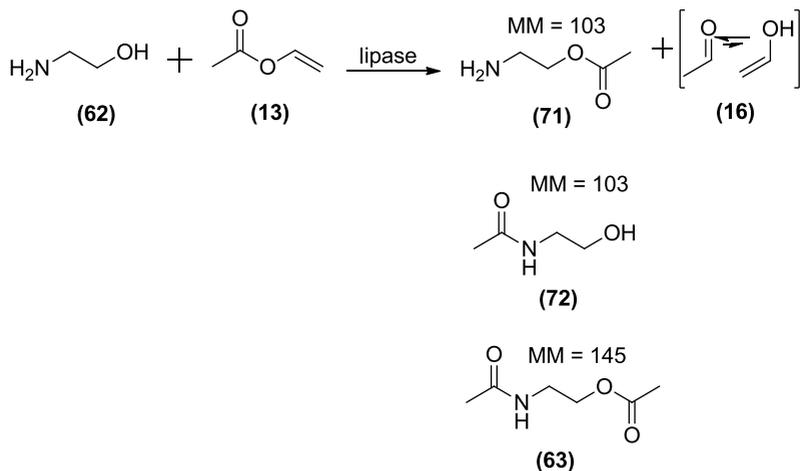
Os dados obtidos mostraram que o método utilizado para a imobilização da lipase foi eficiente e não diminuiu muito a atividade a enzima. A melhor razão molar entre os reagentes foi de 1:2 amina:agente acilante, embora as lipases testadas não tenham sido seletivas para este substrato.

Pode-se observar também que ao usar lipases de diversas procedências e atividades ou LIs ([BMIm][BF₄] e [BMIm][PF₆]) como co-solventes, não houve melhora na seletividade da reação.

4.3. Acilação quimiosseletiva do 2-aminoetanol

A fim de avaliar a quimiosseletividade de uma reação biocatalisada, foi realizada a acilação do 2-aminoetanol (5 mmol) com acetato de vinila (5 mmol). A **Esquema 16** mostra os 3 produtos possíveis de serem formados.

Esquema 16. Acilação do 2-aminoetanol com acetato de vinila, seus possíveis produtos e suas massas molares (MM)



Fonte: desenvolvido pelo autor

Foram realizados testes iniciais para avaliar o melhor solvente para a reação. Foram utilizadas 30 mg de LSD imobilizada em filme de amido de milho/dextrana como biocatalisador e a reação foi acompanhada por CCD.

Ao realizar a reação com *n*-hexano, após 30 min foi possível observar a formação de um produto por ccd e visualmente a reação começou a mudar de incolor para levemente amarelado. Ao decorrer de 24 h, a reação apresentou coloração avermelhada, mostrando que claramente ocorreu a formação do produto.

Porém, o composto formado ficou quase que totalmente retido no filme de amido, demonstrando melhor afinidade pelo filme que é um meio mais polar que o reacional. Sendo assim, testou-se como solvente o *t*-butanol, que é mais polar que *n*-hexano.

Ao utilizar *t*-butanol, pode- observar claramente uma melhora nos resultados e a reação continuou formando um produto após 30 min, e este permaneceu no meio reacional e não ficou retido no filme de amido. Sendo assim, o *t*-butanol foi usado nos próximos estudos.

Posteriormente, testou-se a CALB como catalisador, a fim de reduzir do tempo de formação do produto. Após 1 min pode-se observar

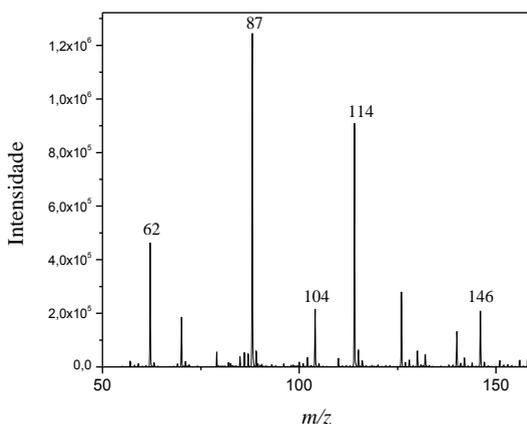
a formação do produto, tanto por ccd quanto visualmente, devido a mudança de cor. Assim, a CALB foi escolhida como biocatalisador.

Os produtos que podem ser formados nesta reação apresentam pontos de ebulição altos, sendo de 149, 291 e 301 °C para **71**, **72** e **63**, respectivamente. Portanto, não foi possível monitorar estas reações por cromatografia gasosa devido a limitações de equipamento (limite máx da coluna cromatográfica de 240 °C). Assim a espectrometria de massas (EM) foi utilizada, visando detectar a formação quimiosseletiva dos compostos.

O conceito de EM é relativamente simples. Um composto é ionizado por algum método de ionização, os íons são separados na base da razão massa/carga (m/z) e o número de íons que correspondem a cada “unidade” de massa/carga é registrado na forma de um espectro. (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006)

A reação entre o 2-aminoetanol e acetato de vinila foi realizada utilizando CALB como catalisador e *t*-butanol a 25 °C. Foram retiradas aliquotas em tempos pré-determinados para análises de espectrometria de massas. A **Figura 22** mostra o espectro de massas, em 10 min.

Figura 22. Espectro de massas ESI da reação entre o 2-aminoetanol e acetato de vinila [2-aminoetanol (5 mmol), acetato de vinila (5 mmol), 25 °C, 30 mg CALB, 10 min e 20 mL de *t*-butanol]



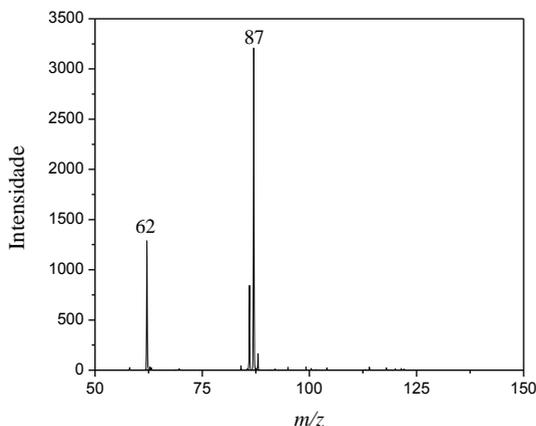
Fonte: desenvolvido pelo autor

Pode-se observar 4 picos característicos. O pico com $m/z = 62$ corresponde ao reagente **62**, o com $m/z = 87$ ao reagente **13**, o com $m/z = 146$ ao produto **63** e o com $m/z = 104$ pode corresponder tanto ao produto **71** bem como ao **72**. O pico com $m/z = 114$ pode ser referente a alguma impureza dos reagentes ou fragmentação dos produtos.

Em todas as alíquotas retiradas da reação entre 0-20 h, foi possível observar os picos com $m/z = 104$ e 146, indicando que nestas condições, a reação não foi seletiva para a formação dos produtos.

Para constatar se o pico com $m/z = 104$ correspondia ao produto **71** ou **72**, foi realizado o EM sequencial (MS-MS) apenas do pico citado. A **Figura 23** mostra os picos correspondentes aos fragmentos obtidos nesta análise.

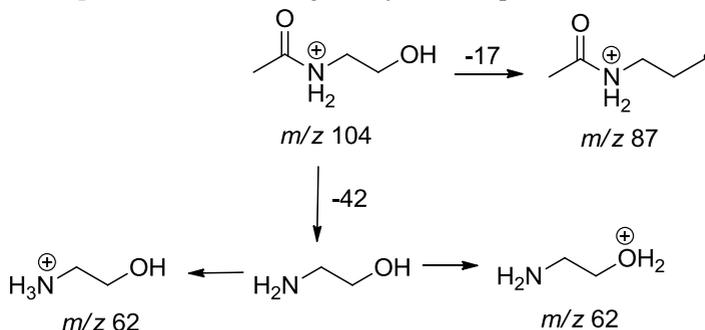
Figura 23. Espectro ESI-MS/MS do pico $m/z = 104$ da reação do 2-aminoetanol com o acetato de vinila [2-aminoetanol (5 mmol), acetato de vinila (5 mmol), 25 °C, 30 mg CALB, 5 h e 20 mL de *t*-butanol]



Fonte: desenvolvido pelo autor

Analisando este espectro, os dois picos mais significativos podem ser observados. O primeiro com $m/z = 87$ corresponde a um fragmento do composto **72** após a perda da hidroxila, embora geralmente hidroxilas em álcoois costumem ser fragmentados na forma de água. O outro pico, com $m/z = 62$ pode corresponder a um fragmento de **72**, após a perda do grupo $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$ (**Esquema 17**).

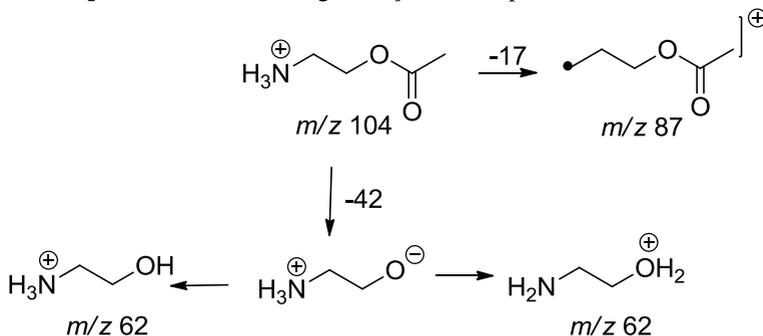
Esquema 17. Possível fragmentação do composto **72**



Fonte: desenvolvido pelo autor

Porém, como os compostos **71** e **72** são similares, e o pico $m/z = 87$ pode também corresponder a um fragmento onde ocorreu a perda de amônia em **71**, embora não usual, e o pico com $m/z = 62$ a um fragmento devido à perda do grupo $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$ (**Esquema 18**).

Esquema 18. Possível fragmentação do composto **71**



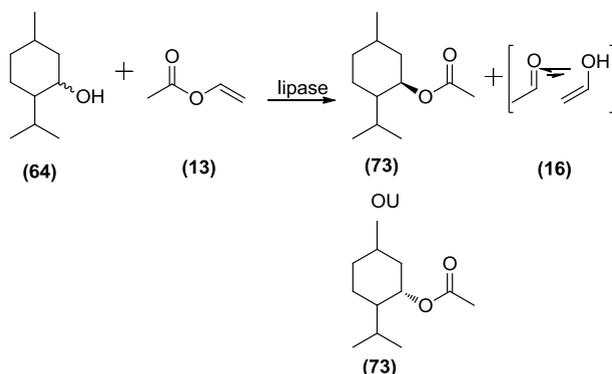
Fonte: desenvolvido pelo autor

Sendo assim, o método de análise escolhido não foi adequado para avaliar a quimiosseletividade da reação. Antes de realizar outros testes, como procedência da lipase usada como catalisador ou efeito da utilização de diferentes solventes orgânicos, é necessário encontrar um método mais adequado para a quantificação dos produtos formados nesta reação.

4.4. Resolução do (\pm)-mentol – Preparação do acetato de mentila

Na literatura são citados vários trabalhos sobre a resolução do (\pm)-mentol. Brady e *col.* sugeriram que o solvente ideal para a preparação do respectivo acetato enantioméricamente puro é o tolueno, e partindo deste estudo, este foi escolhido como solvente inicial para a reação. (BRADY et al., 2012) Como agente acilante foi escolhido o acetato de vinila na proporção inicial de 1:2 (álcool:ag.acilante) e as reações foram realizadas a 30 °C (**Esquema 19**).

Esquema 19. Resolução enantiosseletiva de **64** com acetato de vinila



Fonte: desenvolvido pelo autor

Como biocatalisadores foram, inicialmente, utilizadas lipases livres e imobilizadas nos filmes de amido de milho (0,7 g de amido e 0,3 g de sorbitol) ou apenas o filme na ausência da lipase, como reação controle.

4.4.1. Influência do uso de lipases de diversas procedências para obtenção de 73

Para avaliação da procedência da lipase usada como catalisador da resolução de **64**, foram utilizadas 40 mg (2 g/L) das lipases comerciais LSD, LAY, LAK, LM, LCR, a mesma quantidade das nativas de *A. niger* bruta, LRO, todas não imobilizadas e a CALB, que é adquirida imobilizada. As reações foram realizadas em tolueno como solvente, 30 °C e razão molar 1:2 entre o (\pm)-mentol (3 mmol) e acetato de vinila (6 mmol). Foram retiradas alíquotas em tempos pré-determinados (24, 48,

72, 96, 168 h) e analisadas por CGQ. Com os resultados obtidos foi possível calcular os excessos enantioméricos do reagente (ee_s) e do produto (ee_p), conversão (c) e a razão enantiomérica (E).

A **Tabela 5**, apresenta os resultados de conversão (c), ee_s e E obtidos em 48, 96 e 168 h.

Tabela 5. Influência da procedência da lipase na obtenção de **73**^a

| LIPASE | 48 h | | | 96 h | | | 168 h | | |
|-----------------|-------|------------|------|-------|------------|------|-------|------------|------|
| | c (%) | ee_s (%) | E | c (%) | ee_s (%) | E | c (%) | ee_s (%) | E |
| LSD | nd | 20,5 | nd | nd | 25,9 | nd | Nd | 26,4 | nd |
| LAY | 18,9 | 20,8 | >200 | 19,1 | 23,6 | >200 | 22,3 | 28,6 | >200 |
| LAK | 16,3 | 19,2 | >200 | 19,7 | 21,7 | >200 | 18,9 | 23,2 | >200 |
| LM | nd | 20,6 | nd | 19,6 | 24,4 | >200 | 22,4 | 28,8 | >200 |
| LCR | 14,2 | 16,4 | >200 | 19,3 | 23,7 | >200 | 18,8 | 23,0 | >200 |
| <i>A. niger</i> | nd | 19,3 | nd | nd | 23,9 | nd | Nd | 27,6 | nd |
| LRO | 18,2 | 22,2 | >200 | nd | nd | nd | Nd | nd | nd |
| CALB | nd | 15,0 | nd | 19,8 | 24,7 | >200 | 21,7 | 27,6 | >200 |

^a (\pm)-mentol (3 mmol), acetato de vinila (6 mmol), 30 °C, 40 mg lipase e 20 mL de tolueno; nd-não detectado; Fonte: desenvolvido pelo autor

Em todas as reações realizadas que levaram a formação do éster, os valores de ee_p foram 99 % e $E > 200$, o que é considerado ideal em uma resolução enzimática.

Quando foram utilizadas as lipases LSD e de *A. niger*, não foi possível detectar a formação do produto entre 24-168 h, o que demonstra potencialmente que estas enzimas não foram eficientes na catálise desta reação. Ao utilizar a lipase LRO, foi possível verificar a formação do produto com conversão de 18,2 % e ee_s de 22,2 %, em 48 h.

Ao utilizar as CALB e LM, a formação do produto somente foi detectada após 96 h, com valores de conversão de 19,8 e 21,7 %, e ee_s de 24,7 e 27,6 % ao usar a CALB, e com conversões de 19,6 e 22,4 % e ee_s de 24,4 e 28,8 % com a LM, em 96 e 168 h, respectivamente.

Ao usar as lipases LAY, LAK e LCR, foi possível detectar a formação dos produtos a partir de 24 h de reação. Quando foi usada a LAY, os valores de conversão foram de 17,3, 19,1, 22,3 % e ee_s de 20,8, 23,6 e 28,6 % em 48, 96 e 168 h, respectivamente. Ao usar a LAK, os valores de conversão de foram de 16,3, 17,9 e 18,9 %, e ee_s de 19,2, 21,7 e 23,2 % em 48, 96 e 168 h, respectivamente. A reação com a LCR

apresentou valores de conversão de 14,2, 19,3 e 18,8 % e ee_s de 16,4, 23,7 e 23,0 %, em 48, 96 e 168 h, respectivamente.

Brady e *col.*, testaram várias lipases na esterificação enantiosseletiva do (\pm)-mentol com acetato de vinila. Dentre as enzimas testadas, as de *R. miehei*, *C. antarctica*, *C. antarctica A*, *Chromobacterium viscosum* e *Pseudomonas cepacia* apresentaram alguma atividade catalítica quando foi utilizado o tolueno. (BRADY et al., 2012)

Neste trabalho, não foi possível observar uma relação direta entre as atividades catalíticas fornecidas pelos fabricantes e os valores de conversão e ee_s . Mesmo as reações catalisadas por lipases produzidas pelo mesmo microrganismo (LAY e LCR), resultaram em valores de conversão e ee_s distintos, pois como citado a atividade pode também estar relacionada com o meio e cultura destas.

Para o estudo a influência da imobilização da enzima nesta reação, foram selecionadas as lipases comerciais LAY e LAK e a nativa LRO.

4.4.2. Influência da imobilização da lipase na obtenção de 73

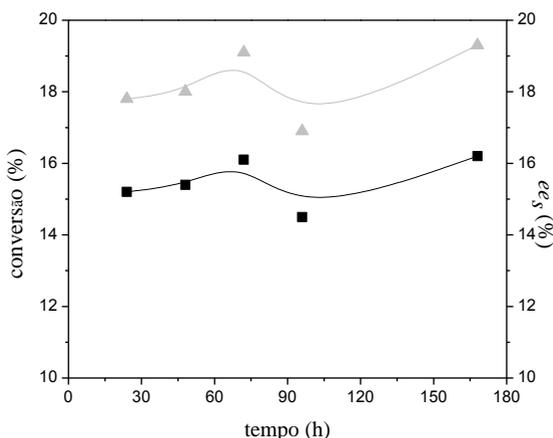
Para avaliar a influência da imobilização das lipases LAY, LAK e LRO na resolução de **64**, a reação foi realizada entre o (\pm)-mentol (3 mmol) com o acetato de vinila (6 mmol), utilizando 40 mg das enzimas imobilizadas em filme de amido de milho ou o filme na ausência de lipase, a 30 °C e em tolueno. Foram retiradas alíquotas em tempos pré-determinados (24, 48, 72, 96, 168 h), e analisadas por CGQ.

Ao realizar a reação com o filme na ausência da lipase, não foi possível observar a formação de produto. Este resultado, mostra que o suporte não influenciou nesta reação, o que é uma característica esperada para um suporte ser considerado ideal para imobilização de lipases. Além disso, não foram observadas mudanças macroscópicas no filme durante os experimentos.

Quando foram utilizadas as lipases LRO e LAK imobilizadas, não foi possível observar formação de produto em nenhuma das alíquotas analisadas (24-168h). No processo de imobilização pode ocorrer diversas interações entre as lipases e o suporte, e estas podem influenciar no sítio ativo da enzima e torná-las ineficientes para a catálise. Porém, ao usar a LAY, os resultados foram adequados para a resolução do (\pm)-mentol.

A **Figura 24**, mostra os resultados dos valores de conversão e ee_s , em função do tempo, quando foi utilizado a LAY imobilizada em filme de amido.

Figura 24. Variação da conversão e ee_s em **73**, em função do tempo utilizando a LAY imobilizada em filme de amido como catalisador ■ – conversão; ▲ – ee_s [(±)-mentol (3 mmol), acetato de vinila (6 mmol), 30 °C, 40 mg de LAY e 20 mL tolueno]



Fonte: desenvolvido pelo autor

Em todas as alíquotas analisadas, os valores de ee_p foram $>99\%$ e $E > 200$. Ao comparar o uso da LAY imobilizada com a forma livre (**Tabela 5**), pode-se observar um decréscimo nos valores de conversão e ee_s . Em 48 h, ao usar a LAY imobilizada, os valores de conversão foram de 15,4 % e ee_s de 18,0 %, e com a LAY livre estes foram de 17,3 % e 20,8 %, respectivamente, em 48h.

Mesmo que a reação com a lipase livre seja mais eficiente, esta diferença não foi muito grande, e como já citado a utilização da lipase imobilizada é mais adequada, principalmente para manter a atividade catalítica, permitir a reutilização da mesma e proteção do meio reacional.

Ao avaliar o tempo de reação quando foi utilizado a LAY imobilizada, pode-se constatar que tanto a conversão quanto o ee_s não variam muito em função do tempo. As conversões variaram de 17,8 a 19,3 %, e ee_s de 15,2 a 16,2 % em 24 e 168 h, respectivamente.

Wang e *col.*, realizaram a resolução do (\pm)-mentol utilizando diversas lipases, doadores acilas e suportes para imobilização. Os resultados obtidos mostraram que a lipase mais eficiente na catálise da reação foi a de *C. rugosa* imobilizada em DEAE-Sephadex, foi possível obter valores conversão, ee_p e E de 44%, 95% e 87, respectivamente.(WANG et al., 2002)

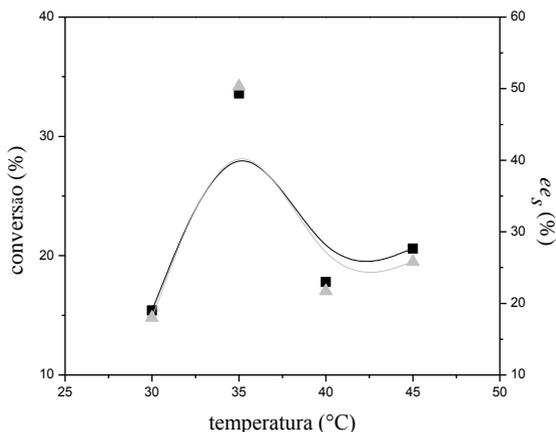
Baseado nos resultados obtidos, optou-se por utilizar a LAY imobilizada em filme de amido como biocatalisador e realizar a reação em 48 h nos próximos estudos. Estes, incluem a avaliação da temperatura, razão molar entre os reagentes, massa da enzima, reutilização do sistema catalisador, utilização de diferentes solventes orgânicos e LIs como co-solventes da reação e o uso de diversos suportes.

4.4.3. Influência da temperatura na preparação de 73

A temperatura desempenha um papel importante em reações catalíticas, o aumento pode reduzir a viscosidade da mistura, aumentar a solubilidade e melhorar o processo de difusão, entre outros fatores. Em reações biocatalisadas, a temperatura pode alterar a conformação da enzima, o que pode levar à perda de atividade e seletividade.(YADAV; DEVENDRAN, 2012)

Para avaliar a temperatura ideal deste sistema, as reações foram realizadas utilizando 40 mg da LAY imobilizada em filme de amido, tolueno a 30, 35, 40 e 45 °C. A **Figura 25** mostra os resultados obtidos dos valores de conversão e ee_s em função da temperatura.

Figura 25. Variação da conversão e ee_s em **73**, em função da temperatura ■ – conversão; ▲ – ee_s [(±)-mentol (3 mmol), acetato de vinila (6 mmol), 40 mg de LAY, 48 h imobilizada e 20 mL tolueno]



Fonte: desenvolvido pelo autor

Em todas as temperaturas testadas, foram obtidos valores de $ee_p > 99\%$ e $E > 200$. Este estudo mostrou uma variação significativa nos valores de conversão, sendo de 15,4% para 33,6% e ee_s , de 18% para 50,3%, quando a temperatura aumentou de 30 para 35 °C, respectivamente.

Ao aumentar a temperatura de 35 para 40 °C, foi observado um decréscimo nos valores de conversão e de ee_s , sendo de 17,8 e 21,7% a 40 °C, respectivamente. Em 45 °C, ocorreu um pequeno aumento nos valores de conversão (20,6%) e ee_s (25,8%). Porém, esse aumento não foi muito significativo.

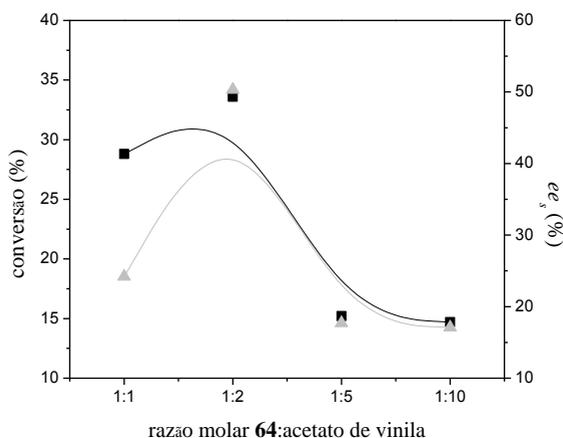
Resultados similares foram obtidos por Bai e *col.*, que utilizaram a lipase de *C. rugosa* imobilizada em nanopartículas magnéticas na resolução do (±)-mentol com anidrido propiônico. Ao avaliar a influência da temperatura, constatou-se um decréscimo nos valores de E e ee_p com o aumento da temperatura. (BAI et al., 2006)

Baseado nos resultados obtidos, foi estipulado que 35°C é a temperatura ótima para obtenção de **73**, e assim esta foi escolhida para prosseguir os estudos.

4.4.4. Efeito da razão molar

Como já citado, a razão molar entre os reagentes é de extrema importância. Com o intuito de avaliar a influência da razão molar dos reagentes na resolução de **64**, foram testadas as razões molares de 1:1, 1:2, 1:5 e 1:10 ((±)-mentol: acetato de vinila) utilizando a LAY imobilizada em filme de amido. A **Figura 26**, mostra os resultados de conversão e ee_s em função da razão molar em 48 h de reação a 35°C.

Figura 26. Variação da conversão e ee_s em **73**, em função da razão molar utilizando a LAY imobilizada como catalisador ■ – conversão; ▲ – ee_s [(±)-mentol (3 mmol), acetato de vinila, 35 °C, 40 mg de LAY, 48 h e 20 mL tolueno]



Fonte: desenvolvido pelo autor

Em todas as razões molares testadas foram obtidos valores de $ee_p > 99\%$ e $E > 200$. Os resultados mostraram que a conversão e os valores de ee_s aumentaram de 18,8 para 30,6 %, e de 23,1 para 50,3, respectivamente quando a razão molar alterou de 1:1 para 1:2. Ao usar as razões molares maiores, constatou-se uma grande diminuição tanto na conversão quanto nos valores de ee_s . As conversões foram de 15,2 e 14,7 % e os valores de ee_s de 17,7 e 17,1%, ao usar as razões molares de 1:5 e 1:10, respectivamente.

A transesterificação do (±)-mentol com o acetato de vinila forma como sub-produto o acetaldeído. Embora este seja volátil e auxilie na formação do produto em termos de equilíbrio de reação, ele também pode

ser tóxico para as lipases e a sua formação em maior quantidade pode afetar a atividade catalítica das mesmas.(FABER, 2011) Esta, pode ser uma explicação para o decréscimo obtidos nos valores de conversão e ee_s , ao usar as razões molares de 1:5 e 1:10.

Além disso o acetato de vinila é um reagente polar, e como já explicado, estes podem “retirar” a água essencial para manter a atividade catalítica da lipase. Nas razões molares maiores (1:5 e 1:10) a quantidade de acetato de vinila no meio reacional é muito maior que nas razões molares de 1:1 e 1:2.(DRAUZ et al., 2012)

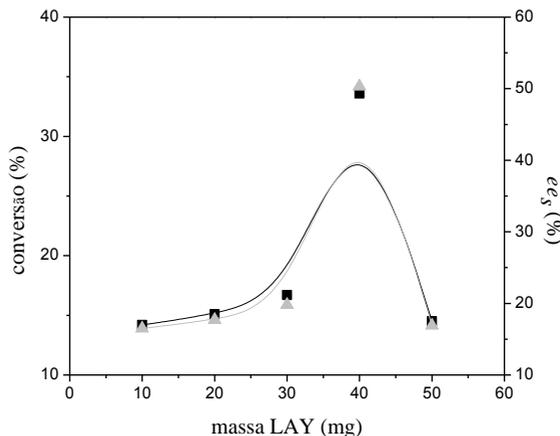
Brady e *col.*, também testaram a influência da razão molar na reação entre o (\pm)-mentol e o acetato de vinila utilizando a LAK como biocatalisador. Os resultados obtidos mostraram que pode-se aumentar a quantidade de produto final em ~25 % ao usar as razões molares de 1:2,5 e 1:3.(BRADY et al., 2012)

Nos estudos subsequentes, optou-se por usar a razão molar de 1:2 (álcool:acetato de vinila), já que nestas condições foram obtidos os maiores valores de conversão e ee_s .

4.4.5. Efeito da massa de LAY

Embora excelentes para catálise, a produção e purificação de lipases é ainda um processo de alto custo, o que é refletido no valor agregado das lipases industriais. Portanto, foi avaliado a influência da massa de LAY imobilizada no filme de amido para a obtenção de **73**. Foram usadas as massas de 10, 20, 30, 40 e 50 mg, razão molar de 1:2 (álcool:acetato de vinila), tolueno, 35 °C e 48h de reação. As conversões e ee_s em **73**, em função da massa de LAY estão apresentadas na **Figura 27**.

Figura 27. Variação da conversão e ee_s , em **73**, em função da massa de LAY imobilizada ■ – conversão; ▲ – ee_s [(±)-mentol (3 mmol), acetato de vinila (6 mmol), 35 °C, 40 mg de LAY, 48 h e 20 mL tolueno]



Fonte: desenvolvido pelo autor

Independente da massa de LAY usada, os valores de ee_p e E foram >99 % e >200, respectivamente. Pode-se observar dos dados obtidos que ocorreu uma certa constância na conversão e nos valores de ee_s entre 10-30 e 50 mg, variando entre 14,2-14,5 % e 16,5-16,9 %, respectivamente.

Ao utilizar 40 mg ocorreu uma grande alta nestes valores, sendo a conversão e o ee_s de 33,6 e 50,3 %, respectivamente. Claramente 40 mg foi a melhor massa de enzima para a catálise da reação. Entretanto, não há uma explicação lógica para a diferença tão grande entre estes valores. A partir desses resultados, a massa de 40 mg de LAY foi selecionada para ser usada nos experimentos seguintes

Brady e *col.*, também testaram a influência da concentração de LAK na reação entre o (±)-mentol com o acetato de vinila. Os resultados obtidos mostraram que entre 0-10 g/L ocorreu um aumento na conversão com a concentração, sendo de ~45 % em 10 g/L. (BRADY et al., 2012)

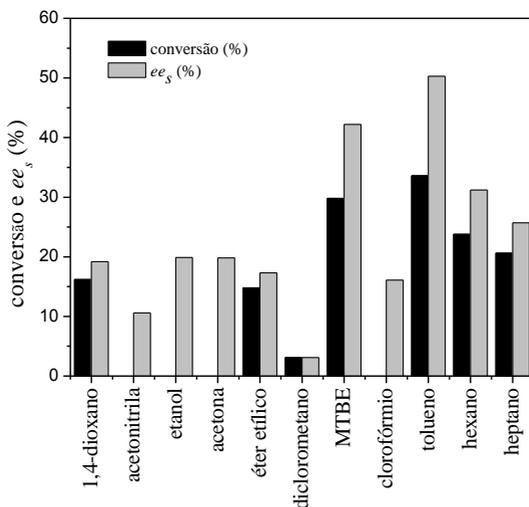
4.4.6. Efeito do solvente orgânico

A escolha do solvente é um fator importante em reações biocatalisadas, e este deve possuir principalmente a capacidade de solubilizar os reagentes e produtos sem influenciar na atividade catalítica da enzima. (KOSKINEN; KLIBANOV, 1996)

A fim de avaliar a influência de solventes orgânicos de diversas polaridades, a reação foi realizada com 40 mg de LAY imobilizada, razão molar 1:2 entre os reagentes, a 35 °C, 48 h e utilizando como solventes o 1,4-dioxano ($\log P = -1,1$), acetonitrila ($\log P = -0,33$), etanol ($\log P = -0,24$), acetona ($\log P = -0,23$), éter etílico ($\log P = 0,83$), diclorometano ($\log P = 0,93$), éter-metil-terc-butílico (MTBE ($\log P = 1,43$), clorofórmio ($\log P = 2,0$), tolueno ($\log P = 2,5$), *n*-hexano ($\log P = 3,5$) ou heptano ($\log P = 4,0$). (LAANE et al., 1987)

Os valores de conversão e de ee_s em **73**, usando os diferentes solventes estão apresentados na **Figura 28**.

Figura 28. Influência do solvente orgânico [(±)-mentol (3 mmol), acetato de vinila (6 mmol), 35 °C, 40 mg de LAY, 48 h e 20 mL solvente]



Fonte: desenvolvido pelo autor

Ao utilizar acetonitrila, etanol, acetona e clorofórmio não foi possível detectar a formação de **73**, indicando que estes solventes

influenciaram de alguma forma na estrutura da LAY e a inativaram, ou não foram eficientes em solubilizar os reagentes dificultando a reação.

Todas as reações realizadas usando os outros solventes apresentaram valores de ee_p e $E >99\%$ e >200 , respectivamente.

Quando foram utilizados 1,4-dioxano, éter-etílico e diclorometano os valores de conversão e ee_s foram de 16,2, 14,8 e 30,6 % e de 19,2, 17,3 e 3,1 %, respectivamente.

Ao realizar a reação com MTBE, tolueno, *n*-hexano e heptano os valores de conversão e ee_s foram de 29,8, 33,6, 23,8 e 20,6 % e de 42,2, 50,3, 31,2 e 25,7 %, respectivamente.

Está bem estabelecido na literatura que a atividade enzimática é fortemente influenciada pela escolha do solvente orgânico. Vários estudos têm mostrado que as reações realizadas utilizando solventes com $\log P > 4,0$, tendem a ser mais eficientes, as que usam solventes com $\log P$ entre 2,0-4,0 são moderadas e as reações com os mais polares ($\log P < 2,0$) são geralmente mais ineficazes. Uma explicação para estes resultados, é que com já citado, os solventes mais polares tendem a alterar a quantidade de água necessária para a enzima manter sua atividade catalítica. (HERBST; PEPPER; NIEMEYER, 2012; LAANE et al., 1987)

Este efeito fica claro ao analisar os dados obtidos. Quando foram utilizados solventes com $\log P \leq 0,93$, a reação não ocorreu ou apresentou valores de $ee_s < 20\%$. Ao utilizar solventes com $\log P \geq 1,43$ a reação foi mais seletiva, apresentando valores de conversão e ee_s até de 33 %. O único resultado inesperado foi obtido ao usar o clorofórmio, sendo que não foi detectada a formação do éster **73**.

Embora os resultados apresentados tenham seguido o padrão largamente descrito na literatura, não foi possível observar uma relação direta entre a polaridade do solvente e a seletividade da reação.

Resultados análogos foram obtidos por Yuan e col., que testaram diversos solventes na resolução do (\pm)-mentol com anidrido propiônico e a lipase de *C. rugosa*. Os resultados mostraram que a conversão foi maior ao usar os solventes com o $\log P$ maior. (YUAN; BAI; SUN, 2006)

A partir dos resultados obtidos, optou-se por continuar utilizando o tolueno como solvente nos próximos estudos, sendo eles o da utilização de LIs como co-solventes, influência da procedência do amido usado na preparação do suporte, uso de diferentes suportes para imobilização da LAY, bem como a reutilização do sistema.

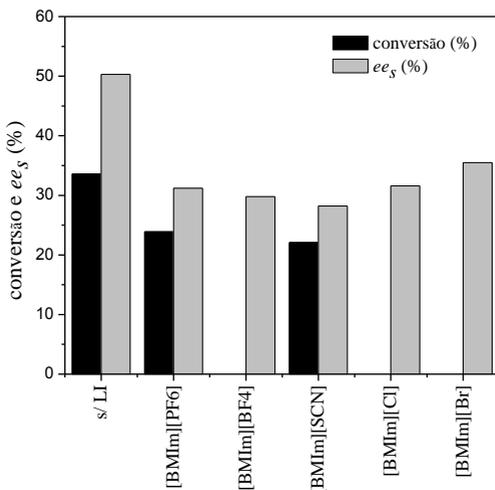
4.4.7. Efeito da utilização de LIs como co-solvente

Como já mencionado, a utilização de LIs em reações biocatalisadas está crescente. Principalmente pelo apelo destes serem mais ecologicamente viáveis e poderem auxiliar na enantiosseletividade da reação.

A fim de avaliar a influência de LIs, a reação foi realizada com 40 mg de LAY imobilizada, razão molar 1:2 entre os reagentes, a 35 °C, em 48 h. Como meio reacional, foi usada uma mistura de tolueno:LIs na proporção 9:1 (v/v). A escolha desta composição foi baseada em estudos anteriores, nos quais estes LIs foram utilizados na resolução de (*R,S*)-feniletilamina.(PILISSÃO; CARVALHO; NASCIMENTO, 2009)

Os LIs testados foram o tetrafluoroborato de 1-butil-3-metil-imidazólio [BMIm][BF₄], cloreto de 1-butil-3-metil-imidazólio [BMIm][Cl], hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil-imidazólio [BMIm][PF₆], tiocianato de 1-butil-3-metil-imidazólio [BMIm][SCN], e brometo de 1-butil-3-metil-imidazólio [BMIm][Br]. A **Figura 29** mostra os resultados de conversão e *ee_s* em 73, obtidos neste estudo e uma comparação dos dados da reação sem a utilização dos LIs.

Figura 29. Influência de LIs na preparação de **73** [(±)-mentol (3 mmol), acetato de vinila (6 mmol), 35 °C, 40 mg de LAY, 48 h e 20 mL tolueno:LIs (9:1 v/v)]



Fonte: desenvolvido pelo autor

Quando a reação foi realizada utilizando os LIs [BMIm][Cl], [BMIm][BF₄] e [BMIm][Br], não foi possível observar formação de produto. Ao utilizar os LIs [BMIm][PF₆] e [BMIm][SCN], as conversões e valores de *ee_s* foram de 31,2 e 22,1 % e 31,2 e 28,2 %, respectivamente. Com esses LIs, os valores de *ee_p* e *E* foram >99 % >200.

Ao comparar o uso de LIs como co-solventes com o uso de tolueno puro, as reações apresentaram maiores conversões e *ee_s* na presença de tolueno puro. Vários fatores podem ser apontados como justificativas para estes resultados. Os LIs podem alterar a polaridade do meio reacional, além de interagir fortemente com o suporte onde a LAY estava imobilizada, possivelmente dificultando a interação entre o meio reacional e a enzima.

Além de testar diversos solventes na resolução do (±)-mentol com anidrido propiônico e a *C. rugosa*, Yuan e *col.*, usaram os LIs [BMIm][PF₆] e [BMIm][BF₄] com solventes da reação. Os resultados mostraram que quando ao utilizar [BMIm][PF₆] a conversão e os valores de *ee_p* e *E* foram similares aos obtidos com hexano puro. Na presença de [BMIm][BF₄], ocorreu uma grande diminuição na conversão e *E*. (YUAN; BAI; SUN, 2006)

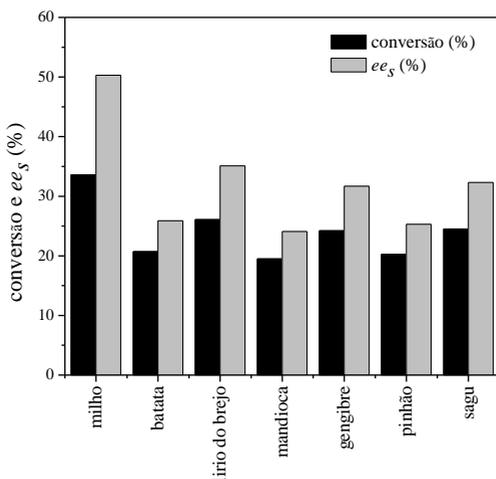
Optou-se assim por continuar usando tolueno puro como solvente da reação.

4.4.8. Efeito da utilização de amidos de diversas procedências para preparação do suporte

Como já mencionado, a composição do amido depende de vários fatores tais como a espécie vegetal que o produziu, grau de maturação da planta, entre outros. Para avaliar o efeito do uso de amidos de diferentes procedências, a LAY foi imobilizada em filmes de amidos, sendo eles de milho, batata, lírio de brejo, mandioca, gengibre e pinhão. Além destes suportes, foi também utilizado o sagu, que são pequenas esferas constituídas de amido de mandioca.

A reação foi realizada com 40 mg de LAY imobilizada, razão molar 1:2 entre os reagentes, a 35 °C, 48 h e em tolueno. Os resultados de conversão e *ee_s* em **73**, estão apresentados na **Figura 30**.

Figura 30. Influência do uso diferentes amidos na imobilização de LAY na resolução de **64** [(±)-mentol (3 mmol), acetato de vinila (6 mmol), 35 °C, 40 mg de LAY, 48 h e 20 mL tolueno]



Fonte: desenvolvido pelo autor

Todas as reações apresentaram $ee_p > 99\%$ e $E > 200$. Analisando os dados de conversão e ee_s , pode-se observar que as reações com os filmes formados por amido de milho, de lírio do brejo e gengibre foram mais eficientes, sendo os valores de conversão de 33,6, 26,1 e 24,2 % e ee_s de 50,3, 25,9 e 31,7 %, respectivamente.

Um motivo para conversão e ee_s da reação realizada com o filme de amido de milho serem um pouco maior, pode ser porque este é o único adquirido comercialmente e então o processo de extração e purificação foram mais rigorosos do que para os amidos extraídos no laboratório.

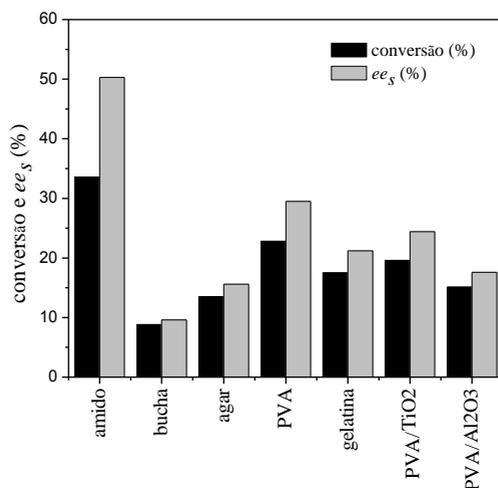
As reações realizadas com os amidos de batata, mandioca e pinhão como suportes para a LAY, apresentaram valores de conversão mais moderadas, sendo de 20,1, 19,5 e 20,3 %. Os valores de ee_s foram de 25,9, 24,1 e 25,3 %.

Ao comparar as reações realizadas com sagu ($c=24,5\%$ e $ee_s=32,5\%$) e com o filme de amido de mandioca, pode-se observar que a com o sagu foi mais eficiente. Estes resultados, podem estar relacionados com o método de preparação do suporte, já que a LAY foi imobilizada por métodos diferentes nestes suportes.

4.4.9. Efeito do uso de diferentes suportes para imobilização da LAY

É possível imobilizar enzimas em diversos suportes. Estes, podem afetar a atividade catalítica da enzima devido a interações com as mesmas. Além disso, o suporte também pode interferir na reação estudada por diversos fatores. Para avaliar o uso de suportes diferentes na imobilização da LAY, a resolução do (\pm)-mentol foi realizada com razão molar 1:2 entre os reagentes, a 35 °C, 48 h de reação e em tolueno. Foram imobilizadas 40 mg de LAY em filmes de amido de milho, poli-álcool vinílico (PVA), gelatina, PVA com nanopartículas de TiO₂, PVA com nanopartículas de Al₂O₃, gel de ágar ou em bucha vegetal. A **Figura 31** apresenta os dados de conversão e ee_s em **73**, obtidos deste estudo.

Figura 31. Influência do uso de diferentes suportes na imobilização de LAY e resolução de **64** [(\pm)-mentol (3 mmol), acetato de vinila (6 mmol), 35 °C, 40 mg de LAY, 48 h e 20 mL tolueno]



Fonte: desenvolvido pelo autor

Todas as reações apresentaram $ee_p > 99\%$ e $E > 200$. Os resultados obtidos mostram que ao usar os filmes de amido, PVA e gelatina, as conversões foram de 33,6, 22,8 e 17,5 % e os valores de ee_s de 50,3, 29,5 e 21,2 %, respectivamente. Sendo assim, dentre estes filmes, o mais eficiente como suporte para imobilização da LAY foi o de amido de milho.

Ao realizar a reação com as nanopartículas de TiO₂ e Al₂O₃ incorporadas no filme de PVA, as conversões foram de 19,6 e 15,1 % e os valores de *ee_s* de 24,4 e 17,6 %, respectivamente.

Quando foi utilizado a bucha vegetal e gel de ágar, as conversões foram de 8,8 e 13,5 %, e *ee_s* de 9,6 e 15,6 %, respectivamente.

Um motivo para a reação ter apresentado valores de conversão e *ee_s* menores quando foi utilizado a bucha vegetal com suporte, pode estar também relacionado com o método utilizado para imobilizar a enzima, que é por adsorção. Podem ter ocorrido perdas de LAY na imobilização, ou ao realizar a reação. O gel de ágar é um suporte que contém uma grande quantidade de água (81%), e este fato pode ter contribuído para a seletividade baixa da reação já este solvente pode dificultar a difusão dos reagentes. Resultados similares foram recentemente reportados na obtenção do acetato de 1-octila e octanoato de 1-pentila. (NASCIMENTO et al., 2015)

De todos os suportes testados, o mais adequado foi o filme de amido de milho, e este então foi utilizado para o estudo da reutilização do sistema catalisador.

4.4.10. Reutilização do sistema

Provavelmente, a principal vantagem de imobilizar enzimas é possibilidade de reutilização do biocatalisador. Para avaliar a eficiência da reutilização da LAY imobilizada em filme de amido, foram realizadas reações com 40 mg de LAY em um período de 71 dias.

A reação foi realizada com razão molar 1:2 entre os reagentes, a 35 °C, 48 h em tolueno. Após cada reação, os filmes foram lavados e estocados em tolueno. A **Tabela 6** apresenta os dados obtidos neste estudo.

Tabela 6. Efeito da reutilização da LAY imobilizada na obtenção de **73**^a

| REUTILIZAÇÃO | ESTOCAGEM (DIAS) | c % | <i>ee_s</i> (%) |
|--------------|------------------|------|---------------------------|
| 0 | 0 | 33,6 | 50,3 |
| 1 | 41 | 24,9 | 33,2 |
| 2 | 46 | 10,2 | 11,2 |
| 3 | 65 | 9,3 | 10,2 |
| 4 | 71 | 7,5 | 8,2 |

^a (±)-mentol (3 mmol), acetato de vinila (6 mmol), 35 °C, 40 mg de LAY, 48 h e 20 mL tolueno; Fonte: desenvolvido pelo autor

Pode-se observar que no primeiro reuso, os valores de conversão e ee_s diminuíram moderadamente, sendo de 33,2 e 24,9 %, respectivamente após 41 dias de estocagem do biocatalisador. Nos re-usos após 46, 65 e 71 dias de estocagem, os valores de conversão foram de 10,2, 9,3 e 7,5 e os ee_s de 11,2, 10,2 e 8,2 %, respectivamente.

Analisando os resultados, observou-se uma grande diminuição nos valores de conversão e ee_s após 71 dias de estocagem e 4 reutilizações do suporte. Mesmo assim, estes são satisfatórios, já que em todas as reações obteve-se valores de $ee_p > 99\%$ e $E > 200$.

Bai e *col.*, realizaram também o estudo da reutilização da lipase de *C. rugosa* imobilizada em nano partículas magnéticas na resolução do (\pm)-mentol com anidrido propiônico. Os resultados mostraram que após utilizar a lipase por 8 ciclos, a atividade relativa, diminuiu de 50 %.(BAI et al., 2006)

Os resultados deste estudo demonstraram que a imobilização da LAY no suporte de amido de milho é bastante conveniente, pois além de proteger a lipase do solvente orgânico, mantém a atividade catalítica da lipase após 71 dias de estocagem. Salienta-se que durante este período não foram observadas mudanças macroscópicas no filme, sendo, portanto mais uma vantagem do método de imobilização.

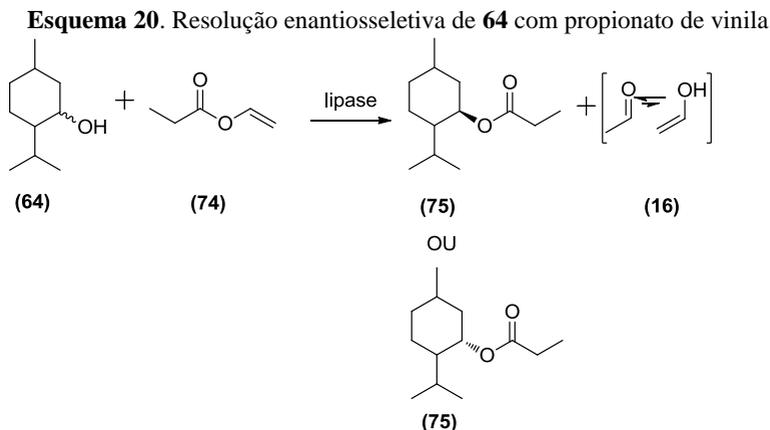
Os dados obtidos nos estudos da resolução do (\pm)-mentol com o acetato de vinila mostraram que dentre as lipases testadas, a LAY foi a mais eficiente em catalisar a reação e o método utilizado para a imobilização não diminuiu muito a atividade a enzima. A reação foi otimizada utilizando a razão molar entre os reagentes de 1:2 (álcool:agente acilante), 35 °C, 40 mg de LAY e tolueno como solvente.

Pode-se observar também que ao utilizar diversos LIs como co-solventes, diferentes amidos para preparação do suporte ou diferentes suportes para imobilização, não houve melhora na seletividade da reação.

Salienta-se também que mesmo formando apenas um dos enantiômeros, não foi possível concluir qual foi formado, se o (-) ou (+)-acetato de mentila. Para isso, é necessário comparar com padrões ou isolar e purificar o produto em quantidade suficiente para a determinação de α , através do método de polarimetria, e comparar os valores obtidos com os da literatura, entre outras análises (RMN de H^1 na presença de reagentes de deslocamentos quirais).

4.5. Resolução do (\pm)-mentol – Preparação do propionato de mentila

A resolução do (\pm)-mentol com propionato de vinila (**Esquema 20**) foi realizada inicialmente utilizando a razão molar entre os reagentes de 1:2 (álcool:agente acilante), 30 °C, em tolueno e 40 mg de lipases não imobilizadas.



Fonte: desenvolvido pelo autor

4.5.1. Efeito do uso de lipases de diversas procedências

Para avaliação da influência do uso de diversas lipases como catalisadores da resolução do **64** com propionato de vinila, foram utilizadas 40 mg das lipases comerciais LSD, LAY, LAK, LM, LCR, a mesma quantidade das lipases nativas *A. niger* bruta e LRO, todas na sua forma livre, e a CALB, que é uma lipase adquirida imobilizada. As reações foram realizadas em tolueno, 30 °C e razão molar 1:2 entre o (\pm)-mentol (3 mmol) e propionato de vinila (6 mmol). Foram retiradas alíquotas em tempos pré-determinados (24, 48, 72, 96, 168 h) e analisadas por CGQ. Com os resultados obtidos foi possível calcular os excessos enantioméricos do reagente (ee_s) e produto (ee_p), conversão (c) e a razão enantiomérica (E). Os resultados de conversão (c), ee_p e E obtidos em 48, 96 e 168 h estão apresentados na **Tabela 7**.

Tabela 7. Influência da procedência da lipase na preparação de 75 ^a

| LIPASE | 48 h | | | 96 h | | | 168 h | | |
|-----------------|-------|---------------------|------|-------|---------------------|------|-------|---------------------|------|
| | c (%) | ee _p (%) | E | c (%) | ee _p (%) | E | c (%) | ee _p (%) | E |
| LSD | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 27,7 | 57,6 | 4,6 |
| LAY | 3,7 | 96,3 | 54,8 | 4,3 | 96,7 | 63,6 | 7,7 | 96,9 | 7,1 |
| LAK | 59,6 | 13,6 | 1,6 | 61,8 | 14,8 | 1,6 | 52,1 | 22,8 | 2,0 |
| LCR | 3,8 | >99 | >200 | 11,8 | >99 | >200 | 9,1 | >99 | >200 |
| LM | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd |
| A. niger | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd |
| LRO | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd |
| CALB | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd |

^a (±)-mentol (3 mmol), propionato de vinila (6 mmol), 30 °C, 40 mg lipase e 20 mL de tolueno; nd-não detectado; Fonte: desenvolvido pelo autor

Ao utilizar as lipases LM, *A. niger*, LRO e CALB, não foi possível observar a formação de produto, o que indica que estas lipases não são adequadas para a catálise desta reação. Quando foi usada LSD somente foi possível observar formação de produto após 168 h, sendo os valores de conversão de 27,7, ee_p de 57,6 e E 4,6.

Ao usar as LAY e LAK e LCR, foi possível detectar os produtos em todas as alíquotas analisadas. Quando foi usado a LAY, os valores de conversão foram de 3,7, 4,3 e 7,7 %, de ee_p de 96,3, 96,7 e 96,9 % e E de 4,8, 63,6 e 7,1; em 48, 96 e 168 h. Ao usar a LAK as conversões foram de 59,6, 61,8 e 52,1 %, os valores de ee_p e E foram de 13,6, 14,8 e 22,8 % e 1,6, 1,6 e 2,0, em 48, 96 e 168 h. A reação com a LCR apresentou valores de conversão de 3,8, 11,8 e 9,1 %, em 48, 96 e 168 h. Os valores de ee_p e E foram >99 % e >200, em todos os tempos testados. Porém, a conversão foi apenas moderada (~10% em 96 e 168 h).

Assim como no estudo da resolução do (±)-mentol com o acetato de vinila, não foi possível observar uma relação direta entre as atividades catalíticas fornecidas pelos fabricantes e os valores de conversão e ee_s.

A única reação que apresentou valores adequados de ee_p e E foi a realizada com a LCR como biocatalisador, sendo então esta lipase escolhida para o estudo da influência da imobilização.

4.5.2. Efeito de imobilização da LCR

Para avaliar o efeito da imobilização da LCR em filme de amido de milho, foi utilizado o (±)-mentol (3 mmol), propionato de vinila (6

mmol), 40 mg da LCR imobilizada, tolueno e a 30 °C. Foram retiradas alíquotas em tempos pré-determinados (24, 48, 72, 96, 168 h), e os resultados obtidos de conversão, ee_p e E estão apresentados na **Tabela 8**.

Tabela 8. Influência da imobilização da LCR na preparação de **75**^a

| TEMPO (h) | c (%) | ee_p (%) | E |
|-----------|-------|------------|-----|
| 24 | nd | nd | nd |
| 48 | 30,3 | 59,5 | 5,1 |
| 72 | 28,9 | 63,5 | 5,6 |
| 96 | 29,5 | 65,5 | 6,2 |
| 168 | 29,1 | 75 | 9,4 |

^a (±)-mentol (3 mmol), propionato de vinila (6 mmol), 30 °C, 40 mg lipase e 20 mL de tolueno; nd-não detectado; Fonte: desenvolvido pelo autor

Ao comparar os resultados obtidos na reação com a LCR imobilizada com os na forma livre (**Tabela 7**), pode-se observar que ocorreu uma grande perda e seletividade na reação, apresentando valores de ee_p 59,6, 65,5 e 75 % e E 5,1, 6,2 e 94, em 48, 96 e 168 h, respectivamente. Este grande decréscimo ficou claro nos valores de ee_p e E , que ao usar a LCR não imobilizada foram de >99 % e >200, respectivamente.

Ao avaliar os valores de conversão, percebeu-se um grande aumento ao usar a LCR imobilizada em comparação com a forma livre, sendo de 30,3, 29,5 e 29,1 %, em 48, 96 e 168 h, respectivamente. Com o uso da LCR livre, os valores de conversão foram <10 %.

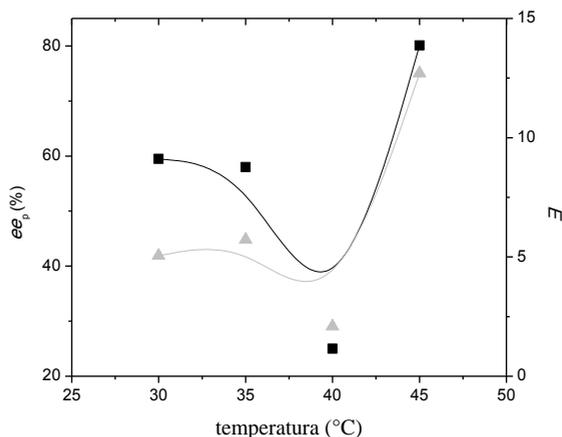
Wu e *col.*, imobilizaram a lipase de *Pseudomonas cepacia* em esferas de vidro e aplicaram esse sistema catalisador na resolução do (±)-mentol com o propionato de vinila. Os resultados obtidos mostraram que a reação utilizando a enzima imobilizada foi mais eficiente que a com a enzima livre.(WU; AKOH; PHILLIPS, 1997)

Os resultados deste estudo mostraram que a enantiosseletividade da lipase foi bastante alterada quando a mesma foi imobilizada. Mesmo a reação apresentando baixa seletividade, optou-se por utilizar a LCR imobilizada nos testes de influência da temperatura, massa da LCR e razão molar dos reagentes, visando alcançar melhores resultados, principalmente nos valores de E . Além disso, escolheu-se o tempo de reação de 48 h, já que não foram verificadas mudanças significativas em tempos maiores.

4.5.3. Efeito da temperatura

Para avaliar qual é a temperatura adequada, as reações foram realizadas utilizando 40 mg da LCR imobilizada 30, 35, 40 e 45 °C. A **Figura 32** mostra os resultados dos valores de ee_p e E em função da temperatura.

Figura 32. Variação dos valores de ee_p e E em função da temperatura na resolução do (\pm)-mentol ■ – ee_p ; ▲ – E [(\pm)-mentol (3 mmol), propionato de vinila (6 mmol), 40 mg de LCR imobilizada, 48 h e 20 mL tolueno]



Fonte: desenvolvido pelo autor

Este estudo mostrou uma variação significativa (~50 %) nos valores de ee_p , diminuindo de 59,5 para 25 %, e E de 5,1 para 2,1, quando a temperatura aumentou de 30 para 40 °C, respectivamente. Ao comparar com os valores obtidos em 30 e 35 °C, observou-se que quase não ocorreu alteração na seletividade da reação, sendo os valores de ee_p e E de 58 % e 5,7 a 35 °C. Quando a reação foi realizada a 45°C os valores de ee_p e E foram de 80,1 % e 12,7, respectivamente. Os valores de conversão variaram entre 30,8-50,7 %.

Wu e col., também estudaram o efeito da temperatura na resolução do (\pm)-mentol com propionato de vinila, utilizando a lipase de *P. cepacia* imobilizada. Os resultados mostraram que com o aumento da temperatura ambos ee_p e E diminuíram. (WU; AKOH; PHILLIPS, 1997)

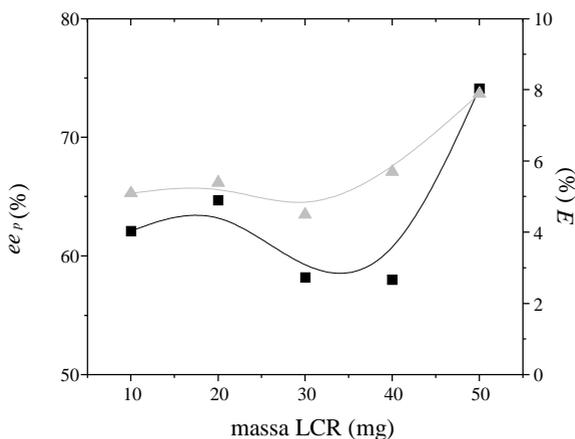
Embora os melhores resultados obtidos de ee_p tenham sido a 45 °C, optou-se por usar a temperatura de 35 °C nos estudos seguintes

visando minimizar perdas devido a evaporação dos reagentes e/ou inativação da LCR.

4.5.4. Efeito da massa de LCR

A fim de avaliar a influência da massa de LCR imobilizada no filme de amido para a obtenção de **75**, foram testadas as massas de 10, 20, 30, 40 e 50 mg, em tolueno, a 35 °C e com razão molar de 1:2 (álcool:propionato de vinila) entre os reagentes. Os valores de ee_p e E em função da massa de LCR estão apresentadas na **Figura 33**.

Figura 33. Variação dos valores de ee_p e E em função da massa de LCR na resolução do (\pm)-mentol ■ – ee_p ; ▲ – E [(\pm)-mentol (3 mmol), propionato de vinila (6 mmol), 35°C, LCR imobilizada, 48 h e 20 mL tolueno]



Fonte: desenvolvido pelo autor

Os valores de conversão para este estudo variaram entre 17,8-42,9 %.

Pode-se observar pouca variação nos valores de ee_p e E ao usar entre 10-40 mg. Os valores de ee_p foram de 62,1, 64,7, 58,2 e 58 %, e E de 5,1, 5,4, 4,5, 5,7 com o uso de 10, 20, 30 e 40 mg, respectivamente. Ao utilizar 50 mg de LCR, a reação apresentou um aumento nos valores de ee_p e E , sendo de 74,1 % e 7,9, respectivamente.

Bai e *col.*, utilizaram a lipase de *C. rugosa* imobilizada na reação entre (\pm)-mentol com o anidrido propiônico e estudaram a influência da

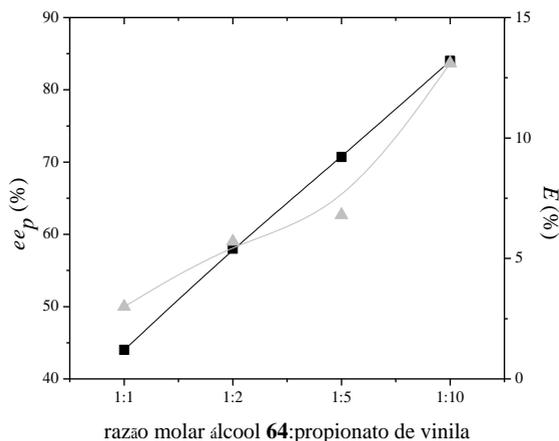
variação da concentração da lipase, sendo observado um grande aumento na conversão e nos valores de E com concentração da lipase. (BAI et al., 2006)

Como já citado, as enzimas possuem um custo agregado muito elevado. Mesmo com o uso de 50 mg de LCR a reação apresentou seletividade baixa, e portanto optou-se por usar 40 mg da lipase para o teste da influência da razão molar entre os reagentes na seletividade desta reação.

4.5.5. Efeito da razão molar

Para avaliar a influência da quantidade dos reagentes na reação entre o (\pm)-mentol e o propionato de vinila, foram testadas as razões molares de 1:1, 1:2, 1:5 e 1:10 (álcool: propionato de vinila) utilizando a LCR imobilizada em filme de amido, 35°C, 48 h e tolueno. Os valores de ee_p e E em função da razão molar, estão apresentados na **Figura 34**.

Figura 34. Variação dos valores de ee_p e E em função da razão molar na resolução do (\pm)-mentol ■ – ee_p ; ▲ – E [(\pm)-mentol (3 mmol), propionato de vinila (6 mmol), 35°C, 40 mg de LCR imobilizada, 48 h e 20 mL tolueno]



Fonte: desenvolvido pelo autor

Os resultados mostraram que quanto maior a razão molar entre os reagentes, a reação foi mais seletiva. Os valores de ee_p foram de 44, 58, 70,7 e 80 %, e E de 2,9, 5,7, 6,7 e 13,1 ao usar as razões molares de 1:1,

1:2, 1:5 e 1:10 (álcool:propionato de vinila), respectivamente. Entretanto, mesmo com o aumento na seletividade, esta ainda apresenta valores muito abaixo do adequado. Vale lembrar que valores de E abaixo de 15 são considerados inaceitáveis para fins práticos de resolução enantiosseletiva.

Os resultados obtidos nos estudos da resolução do (\pm)-mentol com o propionato de vinila mostraram que quando foi realizada a reação com a LCR, pode-se obter uma grande seletividade ($ee_p > 99\%$ e $E > 200$). Salienta-se também que o éster **75**, em geral foi obtido com conversões de 413,7-42,5%. Porém, quando a enzima foi imobilizada em filme de amido, não foi observada a mesma enantiosseletividade que na forma livre, mesmo com alterações na temperatura, massa da lipase e/ou razão molar dos reagentes. Não foi possível obter valores de ee_p e E adequados para poder classificar a resolução enzimática do (\pm)-mentol com o propionato de vinila como eficiente, nas condições testadas.

5. CONCLUSÃO

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

- Os filmes preparados com amido de milho/dextrana ou amido de milho mostraram-se maleáveis e resistentes. Além disso foram estáveis em todos os solventes e temperatura testados.

- Estes suportes foram eficientes para imobilizar as lipases. Após a imobilização, o filme de amido de milho/dextrana/LBC apresentou 8,5 % de água e o de amido de milho/LAY ou LCR ~4 %. Pode-se constatar por MEV que o método de imobilização nos filmes é por adsorção física.

- Os compostos **60**, **63**, **66** e **67** foram preparados, purificados e caracterizados pelas técnicas de IV e RMN de H^1 . Estes foram usados como padrões para análises de CGQ ou EM.

- A resolução enzimática da (\pm)2-etilhexilamina foi realizada com acetato de etila como agente acilante, e LBC como catalisador. Quando foi utilizado a LBC imobilizada os valores máximos de ee_p e E foram de 21 % e 2,0 e com a lipase livre foram de 25 % e 2,5, respectivamente.

- Ao avaliar o efeito da razão molar entre os reagentes na resolução de **58**, pode-se observar que a razão molar 1:2 (amina:acetato de etila), é a mais adequada entre as testadas. (ee_p = 28,8 % e E = 2,4)

- As lipases LBC e LSD foram as mais eficientes na obtenção de **69**.

- Ao testar as misturas de *n*-hexano com os LIs [BMIm][PF₆] ou [BMIm][BF₄] (9:1 v/v) como co-solventes, também não foi observada seletividade adequada na reação.

- As condições experimentais testadas não foram eficientes na resolução de **58**, sendo que foi obtido a correspondente amida racêmica.

- Quando a CALB foi utilizada na acilação quimiosseletiva do 2-aminoetanol com acetato de vinila, constatou-se que não ocorreu seletividade na reação.

- A resolução de **64** com acetato de vinila foi mais seletiva quando foi utilizado a LAY, apresentando valores de c , ee_s , ee_p e E de 18,9, 20,8, >99 % e >200, respectivamente, em 48 h. Quando a reação foi realizada

com a LAY imobilizada, os valores de c , ee_s , ee_p e E foram de 17,3, 20,8, >99 % e >200.

- A temperatura e massa de LAY mais adequadas para a obtenção de **73** foram de 35 °C e 40 mg.

- A melhor razão molar entre o (\pm)-mentol e o acetato de vinila na resolução foi de 1:2, sendo obtido nessas condições, valores de c , ee_s , ee_p e E de 30,5, 50,3, >99 % e >200, respectivamente.

- Dentre os solventes orgânicos testados, o mais adequado foi o tolueno. Este foi testado em mistura com os LIs [BMIm][BF₄], [BMIm][Cl], [BMIm][SCN] e [BMIm][Br] na proporção 9:1 (v/v). Porém, estas misturas não foram mais eficientes que o tolueno puro em auxiliar na seletividade da reação.

- Ao testar os amidos de milho, batata, lírio do grejo, mandioca, gengibre pinhão e sagu para a preparação do suporte, constatou-se que o amido de milho foi o mais adequado para ser usado como suporte da lipase na resolução de **64**.

- Mesmo quando foram utilizados diferentes suportes para a imobilização da LAY, o filme de amido de milho foi o mais adequado. Na resolução de **64**, os valores de c , ee_s , ee_p e E foram de 30,5, 50,3, >99 % e >200, respectivamente.

- O sistema formado pelo filme de amido/LAY foi reutilizado até 4 vezes e após um período de estocagem de 71 dias, os valores de c , ee_s , ee_p e E foram de 7,5, 8,2, >99 % e >200, respectivamente.

- Para a obtenção de **75** a LCR foi a lipase mais apropriada, e a reação apresentou valores de conversão, ee_p e E de 11,8, >99 % e >200, respectivamente. Quando foi utilizado a lipase imobilizada, observou-se um grande decréscimo nos valores de ee_p e E , sendo de 59,5 % e 5,1 respectivamente.

- As melhores temperatura, massa de LCR e razão molar entre os reagentes na reação do (\pm)-mentol com o propionato de vinila foram de 45 °C, 50 mg e 1:10 (álcool:propionato de vinila). Mesmo otimizada, a reação com a LCR imobilizada apresentou pouca seletividade, quando comparada com o uso dela livre.

Finalizando, os resultados mostraram que amidas e ésteres podem ser obtidos, *via* catálise enzimática, com altos rendimentos e em condições brandas de reação, dependendo da otimização das condições reacionais.

6. PERSPECTIVAS

- Imobilizar simultaneamente duas ou mais lipases (“coquetel enzimático”) no filme de amido, e utilizar estes suportes na resolução da (\pm)2-etilhexilamina e (\pm)-mentol.
- Avaliar a influência do uso de diferentes solventes e lipases na resolução da (\pm)2-etilhexilamina.
- Avaliar a presença de glicerol no meio reacional, para verificar se este aditivo aumenta a seletividade ou conversão nas reações citadas com as lipases.
- Avaliar o efeito do uso de diferentes solventes, LIs e suportes na resolução do (\pm)-mentol com o propionato de vinila.
- Confirmar qual enantiômero está sendo formado, isolando e purificando o produto **73** em quantidade suficiente para a determinação do α através do método de polarimetria, e comparar os valores obtidos com os da literatura.
- Continuar testando os filmes de PVA com nanotubos de TiO_2 ou Al_2O_3 , avaliando outras metodologias para a preparação dos suportes bem como outras condições reacionais.

7. REFERÊNCIAS

BADGUJAR, K. C.; DHAKE, K. P.; BHANAGE, B. M. Immobilization of *Candida cylindracea* lipase on poly lactic acid, polyvinyl alcohol and chitosan based ternary blend film: Characterization, activity, stability and its application for N-acylation reactions. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 9, p. 1335–1347, set. 2013.

BAI, S. et al. Resolution of (\pm)-menthol by immobilized lipase on superparamagnetic nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 96, n. 1, p. 1–7, maio 2006.

BARREIRO, E. J.; FERREIRA, V. F.; COSTA, P. R. R. Substâncias enantiomericamente puras (SEP): a questão dos fármacos quirais. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 647–656, dez. 1997.

BOROS, Z. et al. How the mode of *Candida antarctica* lipase B immobilization affects the continuous-flow kinetic resolution of racemic amines at various temperatures. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85-86, p. 119–125, jan. 2013.

BOSCH, M. E. et al. Recent advances in analytical determination of thalidomide and its metabolites. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, n. 1, p. 9–17, jan. 2008.

BRADY, D. et al. Biocatalytic enantiomeric resolution of l-menthol from an eight isomeric menthol mixture through transesterification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 75, p. 1–10, mar. 2012.

BUSTOS-JAIMES, I. et al. Immobilization and enantioselectivity of *Bacillus pumilus* lipase in ionic liquids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 89, p. 137–141, maio 2013.

CAI, Z. et al. Biosynthesis of myristyl serinate by immobilized *Candida antarctica* lipase in two-phase system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 108, p. 118–122, out. 2014.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O.; TASKS, A., CHAVES, MARIA MARTHA GUEDES. **Bioquímica**. São Paulo: Thomson, 2007.

CANTONE, S. et al. Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6262, 2013.

COLLINS, C. H. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora Unicamp, 2006.

CORONA-GONZÁLEZ, R. I. et al. Immobilization of *Actinobacillus succinogenes* by adhesion or entrapment for the production of succinic acid. **Bioresource Technology**, v. 164, p. 113–118, jul. 2014.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. DA G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623–630, ago. 2004.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia Eletrônica de Varredura - Aplicações e preparação de amostra**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

DE MIRANDA, A. S.; MIRANDA, L. S. M.; DE SOUZA, R. O. M. A. Ethyl acetate as an acyl donor in the continuous flow kinetic resolution of (\pm)-1-phenylethylamine catalyzed by lipases. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 11, n. 20, p. 3332, 2013.

DE SANTI, C. et al. The hormone-sensitive lipase from *Psychrobacter* sp. TA144: New insight in the structural/functional characterization. **Biochimie**, v. 92, n. 8, p. 949–957, ago. 2010.

DEVENDRAN, S.; YADAV, G. D. Lipase-catalyzed kinetic resolution of (\pm)-1-(2-Furyl) ethanol in nonaqueous media. **Chirality**, v. 26, n. 6, p. 286–292, jun. 2014.

DRAUZ, K. et al. **Enzyme catalysis in organic synthesis. Vol. 1**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2012.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 6. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011.

FAHLBUSCH, K.-G. et al. Flavors and Fragrances. In: WILEY-VCH VERLAG GMBH & CO. KGAA (Ed.). . **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003.

FARIAS, M. G. et al. Caracterização físico-química de filmes comestíveis de amido adicionado de acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 546–552, 2012.

GUPTA, P. et al. *Arthrobacter sp.* lipase catalyzed kinetic resolution of BINOL: The effect of substrate immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 35–39, mar. 2014.

GU, S. et al. Enhancement of lipase-catalyzed synthesis of caffeic acid phenethyl ester in Ionic liquid with DMSO co-solvent. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 22, n. 11-12, p. 1314–1321, nov. 2014.

HALLEY, P. J.; AVÉROUS, L. (EDS.). **Starch polymers: from genetic engineering to green applications**. First edition ed. Amsterdam: Elsevier, 2014.

HERBST, D.; PEPPER, S.; NIEMEYER, B. Enzyme catalysis in organic solvents: influence of water content, solvent composition and temperature on *Candida rugosa* lipase catalyzed transesterification. **Journal of Biotechnology**, v. 162, n. 4, p. 398–403, dez. 2012.

HOFFMANN, I.; SILVA, V. D.; NASCIMENTO, M. DA G. Enantioselective resolution of (R,S)-1-phenylethanol catalyzed by lipases immobilized in starch films. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 8, p. 1559–1567, ago. 2011.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555–569, abr. 2012.

KLAOCHANPONG, N. et al. Physicochemical and structural properties of debranched waxy rice, waxy corn and waxy potato starches. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 218–226, mar. 2015.

KOSKINEN, A.; KLIBANOV, A. M. **Enzymatic reactions in organic media**. Dordrecht: Springer, 1996.

LAANE, C. et al. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n. 1, p. 81–87, jul. 1987.

LAU, P. C. K.; GROSSE, S. The fundamentals and fun of biocatalysis. In: **Marine Enzymes for Biocatalysis**. [s.l.] Elsevier, 2013. p. 17–69.

LEDRA, C. G. **Resolução de derivados do 1-feniletanol com lipases imobilizadas em materiais poliméricos**. Dissertação de mestrado—Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

LEHNINGER, A. L. **Lehninger principles of biochemistry**. 3rd. ed. New York: Worth Publishers, 2000.

LENARDÃO, E. J. et al. “Green chemistry”: os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123–129, jan. 2003.

LERESCHE, J. E.; MEYER, H.-P. Chemocatalysis and biocatalysis (biotransformation): some thoughts of a chemist and of a biotechnologist. **Organic Process Research & Development**, v. 10, n. 3, p. 572–580, maio 2006.

LIESE, A.; HILTERHAUS, L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6236, 2013.

LI, X. et al. Evaluation of three traditional Chinese medicine (TCM) starches and potential application in health product industry. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p. 196–202, out. 2014.

LI, X. et al. Physicochemical properties of corn starch isolated by acid liquid and L-cysteine. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 353–359, fev. 2015.

MAI, N. L.; AHN, K.; KOO, Y.-M. Methods for recovery of ionic liquids—A review. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 5, p. 872–881, maio 2014.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 1, p. 137, 30 abr. 2010.

MARSAIOLI, A. J.; PORTO, A. L. M. **Biocatálise e Biotransformação - Fundamentos e Aplicações**. 1. ed. Salto, São Paulo: Schoba, 2010.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, maio 2007.

MAUSKOPF, S. A history of chirality. In: **Chiral Analysis**. [s.l.] Elsevier, 2006. p. 3–24.

MCMURRY, J. **Organic chemistry**. 7th enhanced ed ed. Belmont, CA: Cengage Brooks/Cole, 2010.

MILNER, S. E. Recent trends in whole cell and isolated enzymes in enantioselective synthesis. **Arkivoc**, v. 2012, n. 1, p. 321, 20 maio 2012.

MOHAMMAD FAUZI, A. H.; AMIN, N. A. S. An overview of ionic liquids as solvents in biodiesel synthesis. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 8, p. 5770–5786, out. 2012.

MONIRUZZAMAN, M. et al. Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 3, p. 295–314, fev. 2010.

MORITA, T. **Manual de soluções, reagentes e solventes padronização, preparação, purificação, indicadores de segurança, descarte de produtos químicos**. São Paulo: Edgard Blucher, 2007.

MORRISON, C. 8.17 Chromatographic Separations and Analysis: Chiral Gas Chromatography. In: **Comprehensive Chirality**. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 333–353.

NASCIMENTO, M. G. et al. The use of organic solvents/ionic liquids mixtures in reactions catalyzed by lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized in different supports. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 112, p. 1–8, fev. 2015.

NAUSHAD, M. et al. Effect of ionic liquid on activity, stability, and structure of enzymes: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 4, p. 555–560, nov. 2012.

NGUYEN, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Chiral drugs: an overview. **International Journal of Biomedical Science**, v. 2, n. 2, p. 85–100, jun. 2006.

PARK, S.; KAZLAUSKAS, R. J. Biocatalysis in ionic liquids – advantages beyond green technology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 432–437, ago. 2003.

PATEL, R. N. 9.12 Industrial Applications of Biocatalytic Hydrolysis (Esters, Amides, Epoxides, Nitriles) and Biocatalytic Dynamic Kinetic Resolution. In: **Comprehensive Chirality**. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 288–317.

PILISSÃO, C.; CARVALHO, P. O.; NASCIMENTO, M. G. Enantioselective acylation of (RS)-phenylethylamine catalysed by lipases. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 12, p. 1352–1357, dez. 2009.

PILISSÃO, C.; NASCIMENTO, M. G. Effects of organic solvents and ionic liquids on the aminolysis of (RS)-methyl mandelate catalyzed by lipases. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 17, n. 3, p. 428–433, fev. 2006.

PORTE, A.; PORTE, L. H. M.; OLIVEIRA, L. M. DE. chiral gas chromatography in the resolution of enantiomers involved in fruit flavours. **Química Nova**, 2014.

Protein Structures: Primary, Secondary, Tertiary, Quaternary. St. Rosemary Educational Institution, 2015. Disponível em: <<http://schoolworkhelper.net/protein-structures-primary-secondary-tertiary-quaternary/>>

RIVERA, I. et al. Lipase from *Carica papaya* latex presents high enantioselectivity toward the resolution of prodrug (R,S)-2-bromophenylacetic acid octyl ester. **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 40, p. 5523–5526, out. 2013.

SCHURIG, V. GAS CHROMATOGRAPHY | Chiral Separations. In: **Encyclopedia of Analytical Science**. [s.l.] Elsevier, 2005. p. 152–161.

SHARMA, D. K.; SINGH, B.; MUKHERJEE, D. Aldol reaction of kojic acid using alumina supported base catalyst and enzymatic resolution of the aldol adduct by CALB. **Tetrahedron Letters**, v. 55, n. 42, p. 5846–5850, out. 2014.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627–662, dez. 2001.

SHELDON, R. A.; ARENDS, I.; HANEFELD, U. **Green chemistry and catalysis**. Weinheim: Wiley-VCH, 2007.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how? **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223, 2013.

SILVA, J. M. R. DA; NASCIMENTO, M. DA G. Chemo-enzymatic epoxidation of β -Caryophyllene using lipases immobilized in agar gel. **Química Nova**, v. 37, p. 1022–1027, 2014.

SILVA, J. C. **Preparação do acetato de 1-octila catalisada por lipases imobilizadas em filmes de amido de milho/dextrana**. Trabalho de conclusão de curso—Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, fev. 2013.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2006.

STERGIOU, P.-Y. et al. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1846–1859, dez. 2013.

TAMAREZ, M. et al. Pilot-scale lipase-catalyzed regioselective acylation of ribavirin in anhydrous media in the synthesis of a novel prodrug intermediate. **Organic Process Research & Development**, v. 7, n. 6, p. 951–953, nov. 2003.

WANG, D.-L. et al. Factors Affecting the Resolution of *dl*-Menthol by Immobilized Lipase-Catalyzed Esterification in Organic Solvent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 2, p. 262–265, jan. 2002.

WEN, S.; TAN, T.; YU, M. Immobilized lipase YILip2-catalyzed resolution of (\pm)- α -phenylethyl amine in a medium with organic cosolvent. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 11, p. 1259–1264, nov. 2008.

WEXLER, P. **Encyclopedia of toxicology**. 3. ed. San Diego: Elsevier, 2014. v. 1

WU, W.-H.; AKOH, C. C.; PHILLIPS, R. S. Stereoselective acylation of *Dl*-menthol in organic solvents by an immobilized lipase from *Pseudomonas cepacia* with vinyl propionate. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 4, p. 435–439, abr. 1997.

YADAV, G. D.; DEVENDRAN, S. Lipase catalyzed synthesis of cinnamyl acetate via transesterification in non-aqueous medium. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 496–502, mar. 2012.

YOUSEFI, M.; MOHAMMADI, M.; HABIBI, Z. Enantioselective resolution of racemic ibuprofen esters using different lipases immobilized on octyl sepharose. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 104, p. 87–94, jun. 2014.

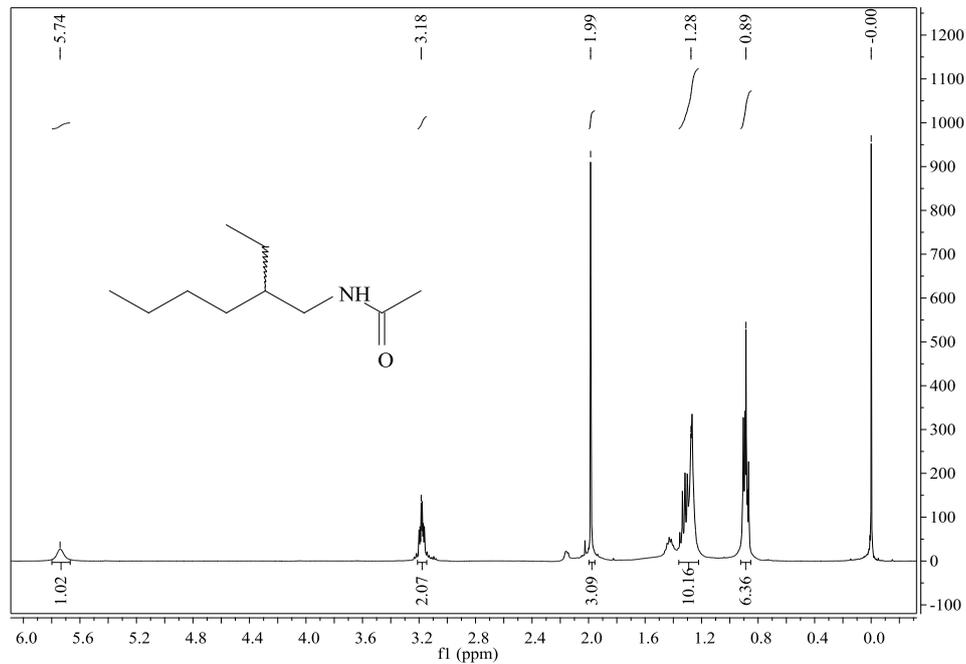
YUAN, Y.; BAI, S.; SUN, Y. Comparison of lipase-catalyzed enantioselective esterification of (\pm)-menthol in ionic liquids and organic solvents. **Food Chemistry**, v. 97, n. 2, p. 324–330, jul. 2006.

ZHANG, J. et al. Efficient resveratrol production by immobilized β -glucosidase on cross-linked chitosan microsphere modified by l-lysine. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 104, p. 29–34, jun. 2014.

ZHANG, L. et al. Physical, mechanical and antimicrobial properties of starch films incorporated with ϵ -poly-l-lysine. **Food Chemistry**, v. 166, p. 107–114, jan. 2015.

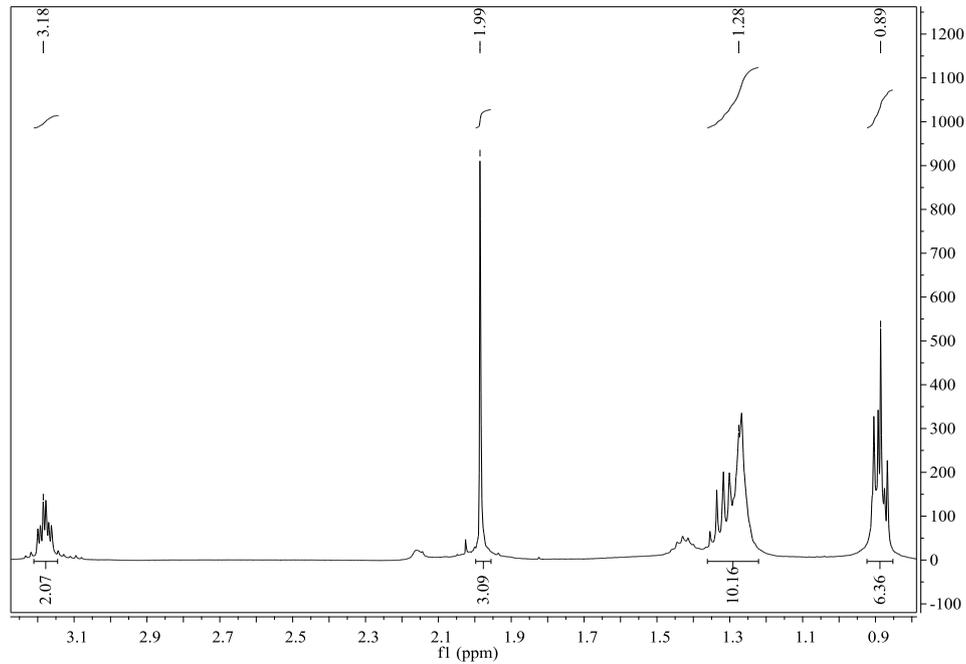
ANEXO A

Figura 1. Espectro de RMN de H¹ da (±) 2-etilhexilacetamida (400MHz, CDCl₃)



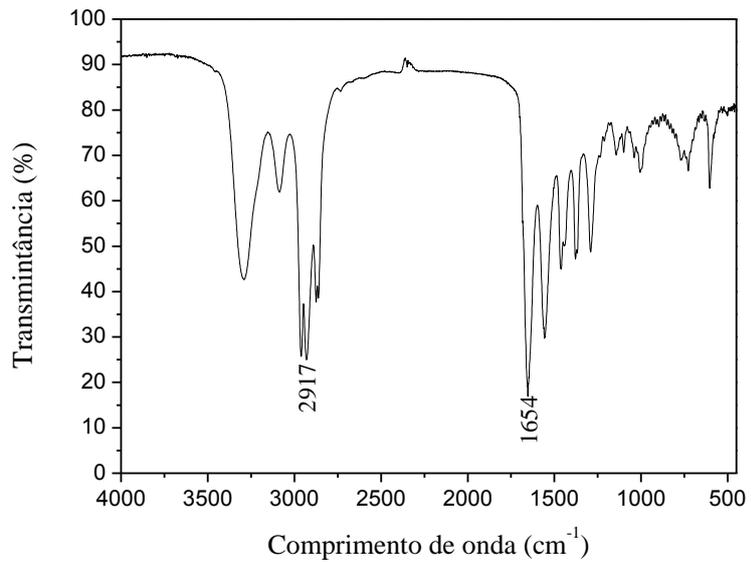
ANEXO B

Figura 2. Ampliação entre 0,8-3,2 ppm do espectro de RMN de H^1 da (\pm) 2-etilhexilacetamida (400MHz, $CDCl_3$)



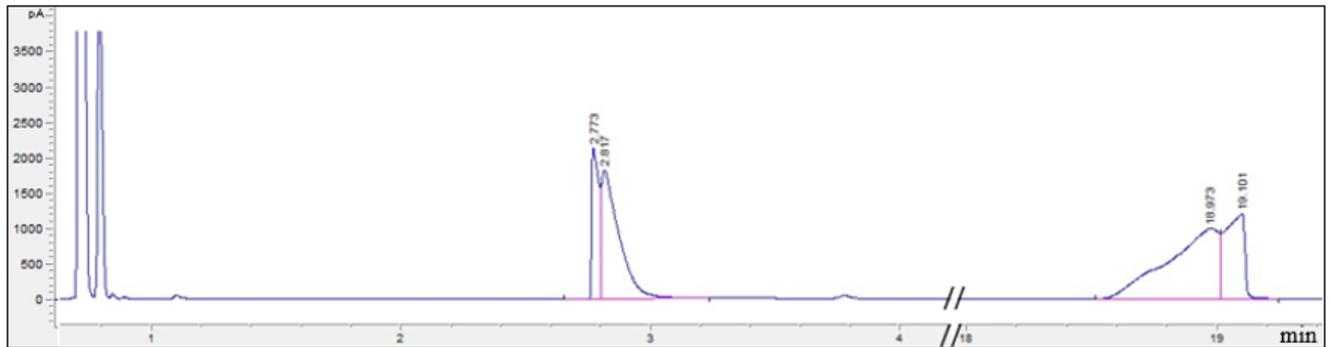
ANEXO C

Figura 3. Espectro de IV da (\pm) 2-etilhexilacetamida (filme)



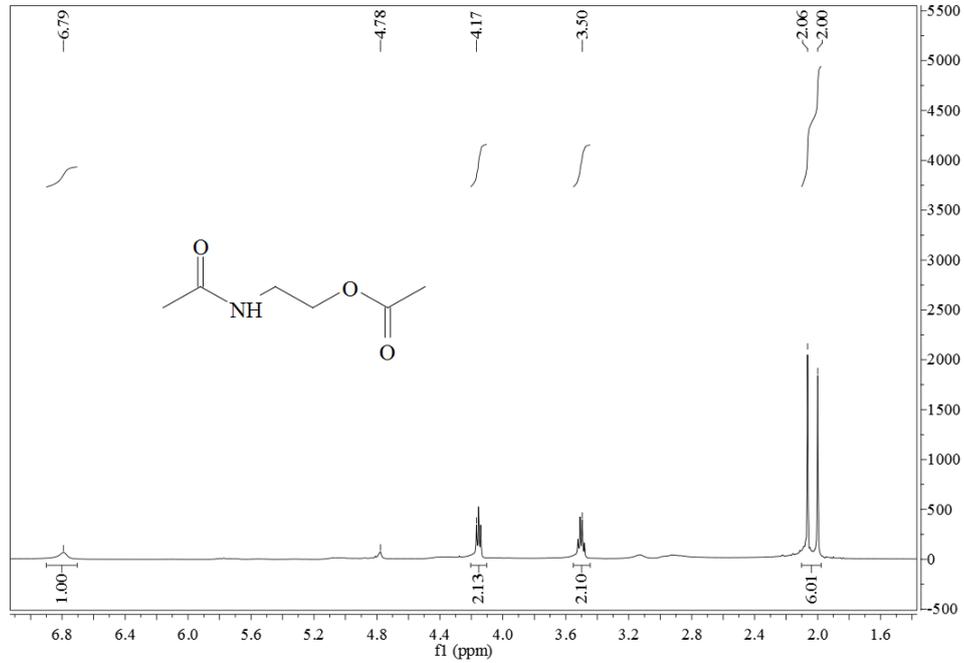
ANEXO D

Figura 4. Cromatograma da (\pm) 2-etilhexilacetamida (19 min) e da amina de partida (2,7min)



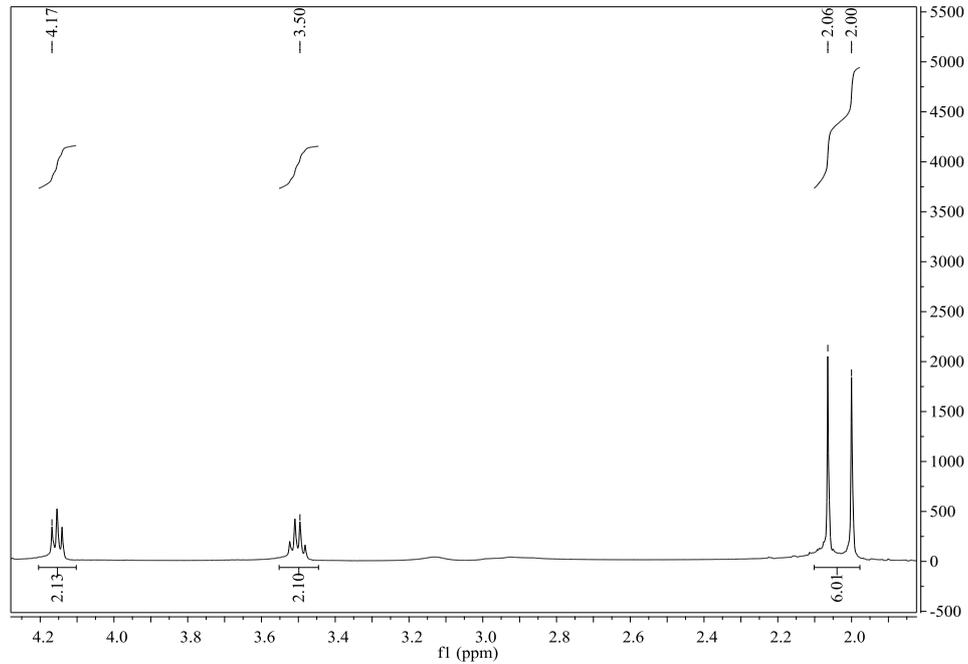
ANEXO E

Figura 5. Espectro de RMN de H¹ do acetato de 2-acetamidoetila (400MHz, CDCl₃)



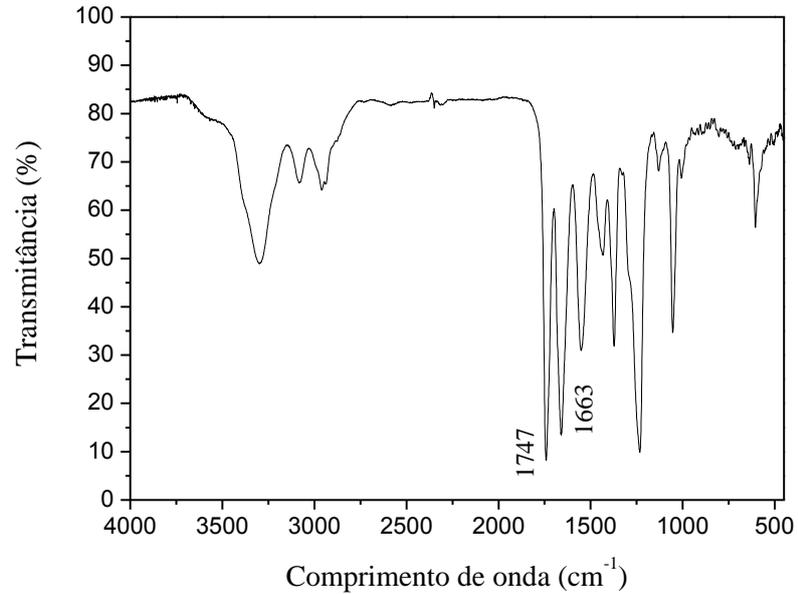
ANEXO F

Figura 6. Ampliação entre 2-4,2 ppm do espectro de RMN de H¹ do acetato de 2-acetamidoetila (400MHz, CDCl₃)



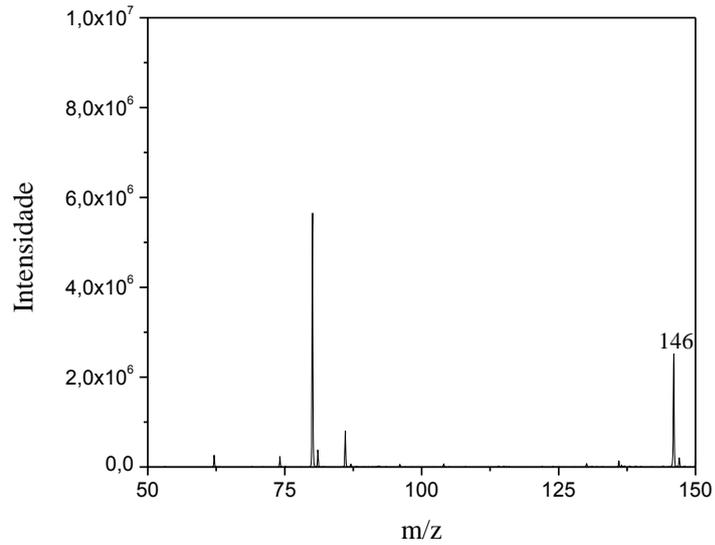
ANEXO G

Figura 7.Espectro de IV do acetato de 2-acetamidoetila (filme)



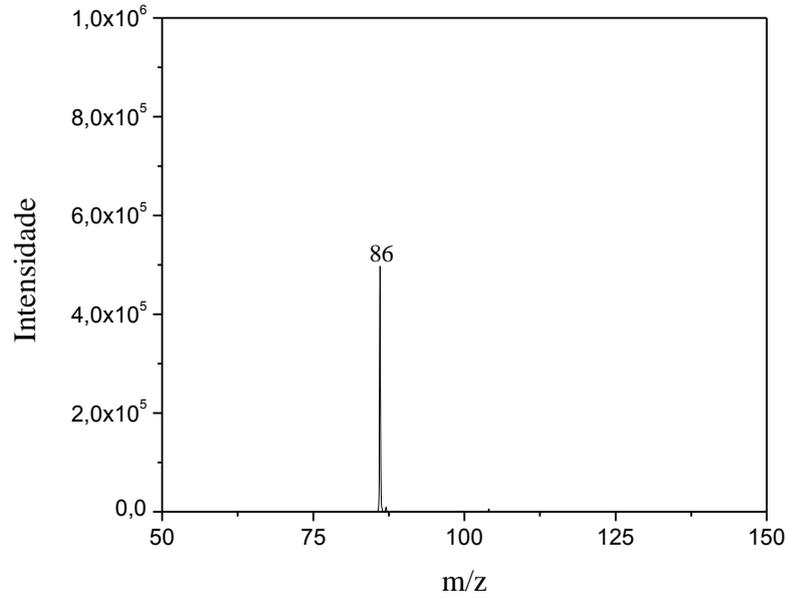
ANEXO H

Figura 8. Espectro de massas do acetato de 2-acetamidoetila (ESI)



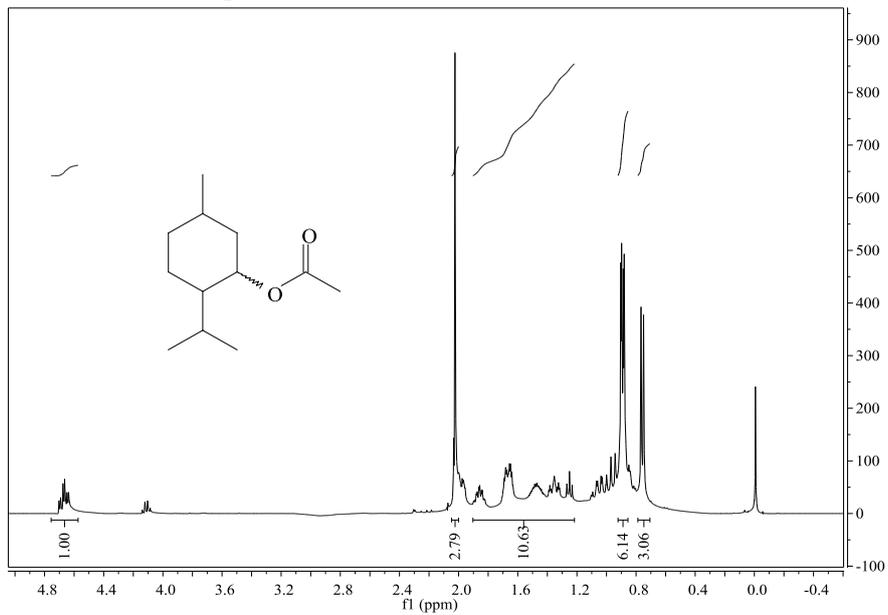
ANEXO I

Figura 9. ESI-MS/MS do pico $m/z = 146$ do espectro de massas do acetato de 2-acetamidoetila



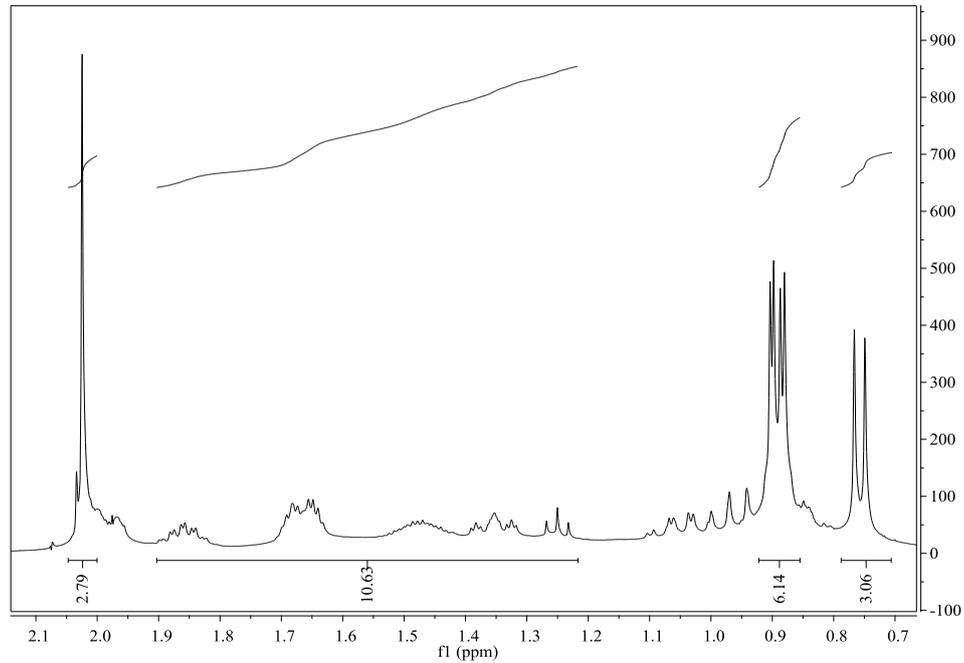
ANEXO J

Figura 10. Espectro de RMN de H¹ do acetato de (±)-mentila (400MHz, CDCl₃)



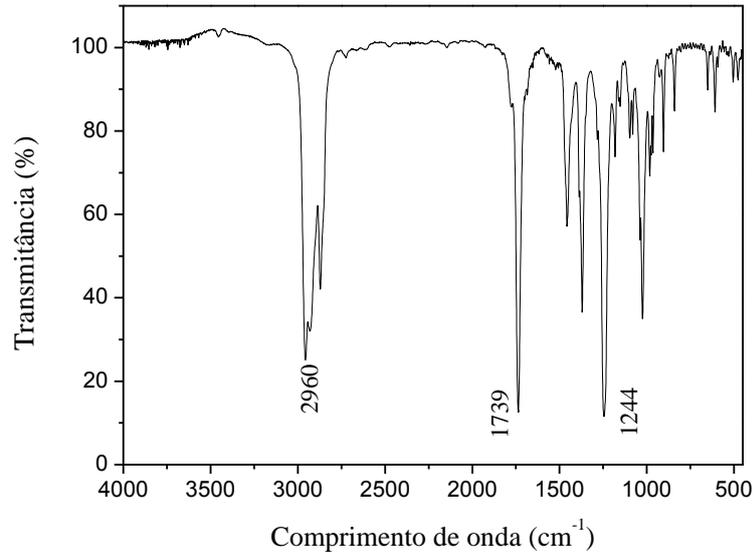
ANEXO L

Figura 11. Ampliação entre 0,7-2,1 ppm do espectro de RMN de H^1 do acetato de (\pm)-mentila (400MHz, $CDCl_3$)



ANEXO M

Figura 12. Espectro de IV do acetato de (\pm)-mentila (filme)



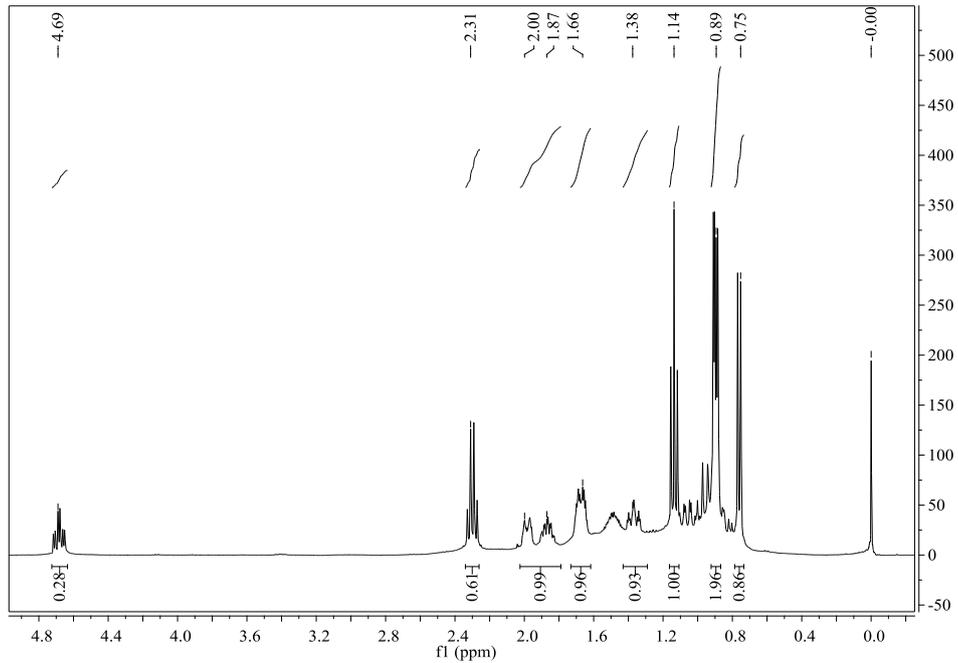
ANEXO N

Figura 13. Cromatograma do acetato de (\pm)-mentila (4,5 min) e do álcool de partida (5 min)



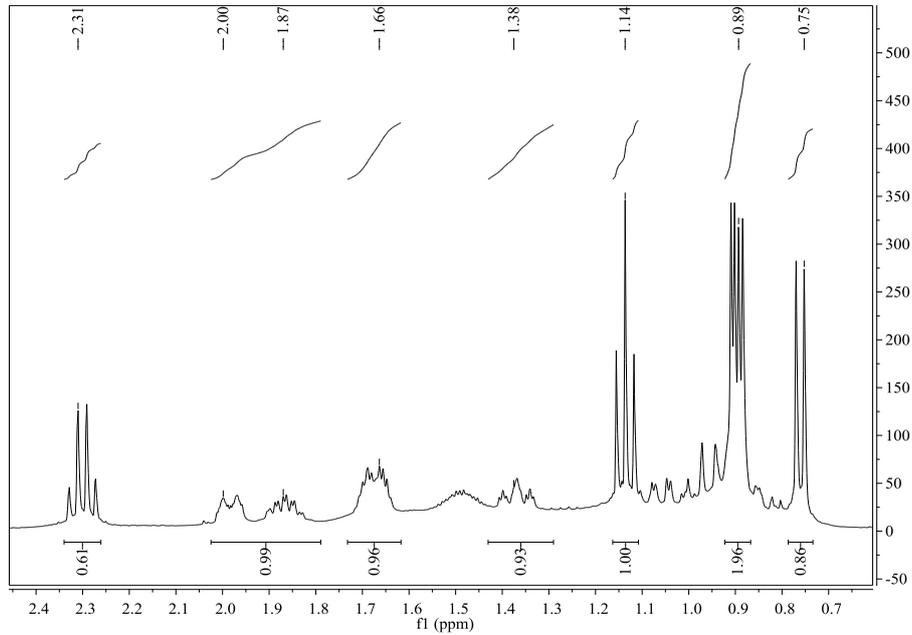
ANEXO O

Figura 14. Espectro de RMN de H^1 do propionato de (\pm)-mentila (400MHz, $CDCl_3$)



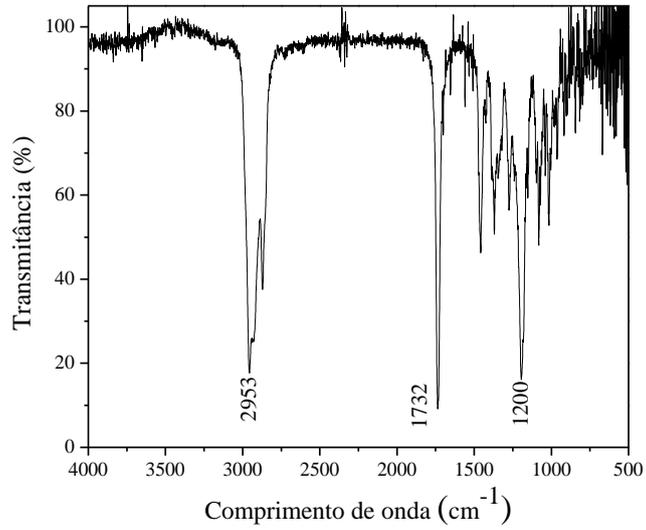
ANEXO P

Figura 15. Ampliação entre 0,7-2,4 ppm do espectro de RMN de H^1 do propionato de (\pm)- mentila (400MHz, $CDCl_3$)



ANEXO Q

Figura 16. Espectro de IV do propionato de (\pm)-mentila (filme)



ANEXO R

Figura 17. Cromatograma do propionato de (\pm)-mentila (6 min) e do álcool de partida (5 min)

