



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

Dissertação de Mestrado

**PREPARAÇÃO DE ÉSTERES CATALISADA PELA LIPASE DE
Burkholderia cepacia IMOBILIZADA EM MICROESFERAS DE
QUITOSANA**

Douglas Weber

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria da Graça Nascimento

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Luis Parize

Florianópolis, fevereiro de 2018.

Douglas Weber

**PREPARAÇÃO DE ÉSTERES CATALISADA PELA LIPASE DE
Burkholderia cepacia IMOBILIZADA EM MICROESFERAS DE
QUITOSANA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria da Graça Nascimento

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Luis Parize

Florianópolis
Fevereiro de 2018

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

Weber, Douglas

Preparação de ésteres catalisada pela lipase de Burkholderia cepacia immobilizada em microesferas de quitosana / Douglas Weber ; orientadora, Maria da Graça Nascimento, coorientador, Alexandre Luis Parize, 2018.

147 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Química. 2. Biocatálise. 3. Lipase. 4. Biopolímeros. 5. Imobilização de enzimas. I. Nascimento, Maria da Graça. II. Parize, Alexandre Luis. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Douglas Weber

**PREPARAÇÃO DE ÉSTERES CATALISADA PELA LIPASE DE
Burkholderia cepacia IMOBILIZADA EM MICROESFERAS DE
QUITOSANA**

Esta dissertação de Mestrado foi julgada e aprovada para a obtenção do título de Mestre em Química no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 16 de fevereiro de 2018.

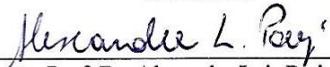


Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Química

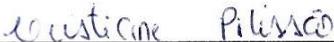
BANCA EXAMINADORA:



Prof.^a. Dr.^a. Maria da Graça Nascimento
Orientadora



Prof. Dr. Alexandre Luis Parize
Coorientador



Prof.^a. Dr.^a. Cristiane Pilissão
(DQ/UTFPR)



Prof.^a. Dr.^a. Daniela Zambelli Mezalira
(DQ/UFSC)

*"A ciência será sempre uma busca e
jamaiz uma descoberta. É uma
viagem, nunca uma chegada".*

Karl Popper

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as coisas boas que Ele tem proporcionado na minha vida.

De mod especial, gostaria de agradecer a minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Maria da Graça Nascimento, por toda ajuda e presença constante na concretização deste trabalho. Obrigado por todo o ensinamento, acolhida e amizade, pelos momentos bons e ruins, pelas conversas e “puxões de orelha”. Obrigado por ter sido como uma mãe, amiga e conselheira em vários momentos. Minha gratidão a você será eterna.

Agradeço também ao meu coorientador, Prof. Dr. Alexandre Luis Parize, por toda a ajuda e atenção que teve comigo. Obrigado por todos os ensinamentos e conselhos dados durante a execução deste trabalho, além da sua amizade e incentivos dados a mim ao longo destes anos.

Aos meus pais, Vilson e Neide, a minha eterna e singela gratidão. Agradeço por sempre me incentivarem a estudar e a crescer intelectualmente. Obrigado por sempre estarem ao meu lado, me apoiando nas minhas decisões. Obrigado pela educação dada a mim e pelo amor incondicional. Vocês são especiais e, por isso, agradeço por tudo que vocês abdicaram para o meu bem.

Agradeço a minha irmã, Samara, por ser a menina mais doce e meiga que existe. Obrigado por ser presença constante na minha vida e, acima de tudo, por ser minha amiga mais leal, por quem tenho um amor imenso.

Aos professores do Departamento de Química, por contribuírem para a minha formação.

Aos professores do Departamento de Química, por contribuírem para a minha formação.

À UFSC, pelo suporte institucional e espaço físico fornecido.

À Central de Análises, pelas várias análises realizadas.

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

A Amano e Novozymes, pela doação das enzimas.

Ao Allan, por todos esses anos de companheirismo, amor e cumplicidade. Acima de tudo, agradeço por ser tão paciente e por todo o carinho dado a mim.

Aos colegas do laboratório 301/306, Juana, Leandro, Pamela, Gabriela, Jaqueline, Paulo, pela amizade, conversas e ajuda nas atividades do laboratório.

Aos colegas do laboratório Polimat (202/204), pela amizade e ajuda prestada a mim ao longo das minhas passagens no lab.

A Katiuscia Vieira Jardim e Priscila Lemes, por terem realizado as análises de MEV.

A Cristiana Costa Bretanha, por ter gentilmente doado o reagente de Bradford para realização dos estudos de quantificação de proteínas.

Aos amigos que me acompanham desde o início da graduação, de modo especial à Stephani, pela amizade e cumplicidade de todos esses anos. Agradeço também a Salete, Janine e Handriela pelos bons momentos que compartilhamos.

A Fernanda, Katerine e aos demais amigos que conheci durante o intercâmbio, obrigado pela amizade e companheirismo de vocês.

Ao Marcelo, pela amizade, parceria no jump e pelas conversas sempre acompanhadas de muito café.

RESUMO

Neste trabalho foram preparados quatro suportes à base de quitosana para a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* (LPS-SD, 23.000 U/g). Cada suporte foi preparado por meio da prévia formação de microesferas de quitosana, seguida de reação de reticulação empregando glutaraldeído, genipin, tripolifosfato de sódio (TPP) ou uma mistura entre estes dois últimos como agentes de reticulação. Foram avaliados o tempo de reticulação, concentração do agente reticulante e, em alguns casos, o pH da solução. As modificações morfológicas e as interações químicas entre as microesferas de quitosana com os diferentes agentes reticulantes foram investigados por espectroscopia na região do infravermelho, microscopia eletrônica de varredura e ensaio de ninidrina. De modo geral, observou-se que a concentração do agente reticulante e o pH foram fatores que tiveram pouca influência nas intensidades de interação dos reticulantes com a quitosana, resultando em microesferas de tamanho médio entre 600-1130 µm, dependendo das condições de reação empregadas. Posteriormente, a LPS-SD foi imobilizada nas microesferas de quitosana reticuladas e estes sistemas foram utilizados para catalisar reações de transesterificação do geraniol, citronelol e *n*-decanol com diferentes doadores acila (acetatos de vinila e isopropenila, além de propionato e laurato de vinila) em meio orgânico. Foram avaliados a influência da temperatura (25-45°C) e tempo de reação (48-72h), da massa de lipase utilizada na imobilização (20-100mg) e da razão molar entre o acetato de vinila e o geraniol. Após imobilização, a LPS-SD se manteve estável e ativa em condições brandas de reação (35°C em até 72h de reação). A influência de solventes orgânicos e de líquidos iônicos nas reações biocatalisadas também foi investigada, em que foi possível observar que a LPS-SD imobilizada teve suas propriedades catalíticas mais preservadas em solventes de baixa polaridade. Por outro lado, o uso de líquidos iônicos como aditivos não obteve melhora significativa nas conversões a ésteres. Além disso, foi possível reutilizá-la, com perdas graduais na atividade catalítica, por até 120 dias de estocagem. Portanto, os suportes preparados se mostraram ser de baixo custo, biodegradáveis e eficientes para a imobilização da LPS-SD, que se manteve estável, permitindo a sua reutilização em mais de um ciclo reacional sem grandes perdas em sua atividade catalítica.

Palavras-chave: quitosana, lipase, imobilização.

ABSTRACT

In this work, four chitosan-based supports were prepared for immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase (LPS-SD, 23.000 U/g). Each support was prepared by prior formation of chitosan beads followed by crosslinking reaction employing glutaraldehyde, genipin, sodium tripolyphosphate (TPP) or a mixture between the latter two as crosslinking agents. The crosslinking time, the concentration of crosslinking agents and, in some cases, the pH of the solution, were evaluated. The morphological modifications and chemical interactions between chitosan beads with the varying crosslinking agents were investigated by infrared spectroscopy, scanning electron microscopy, and ninhydrin assay. In general, it was observed that the concentration of the crosslinking agent and the pH were factors that showed minor influence on the intensities of interaction of the crosslinker with chitosan, resulting in medium-sized beads ranging from 600- 1130 μ m, depending on the employed reaction conditions. Later, LPS-SD was immobilized on the crosslinked chitosan beads and these systems were used to catalyze transesterification reactions of geraniol, citronellol and *n*-decanol with several acylating agents (vinyl and isopropenyl acetate, besides vinyl propionate and laurate) in organic medium. The influence of temperature (25-45 $^{\circ}$ C) and reaction time (24-72h), the mass of the lipase used for immobilization (20-100mg), and the molar ratio between the vinyl acetate and geraniol were evaluated. After immobilization, LPS-SD remained stable and active under mild reaction conditions (35 $^{\circ}$ C for up to 72 h of reaction). The influence of organic solvents and ionic liquids on the biocatalysed reactions was also investigated, in which was possible to observe that the immobilized LPS-SD showed greater catalytic activity employing non-polar solvents. On the other hand, the use of ionic liquids as additives did not show significant improvement in the conversions to the esters. In addition, the immobilized lipase was reused, with gradual losses in the catalytic activity, for up to 120 days of storage. Therefore, the prepared supports proved to be of low-cost, biodegradable, and efficient for the immobilization of LPS-SD, which remained stable, allowing its reuse in more than one reaction cycle without great losses in its catalytic activity.

Keywords: chitosan, lipase, immobilization.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama da coordenada da reação comparando uma reação catalisada por enzima com uma não catalisada	3
Figura 2. Representação esquemática da estrutura em 3D de lipases	8
Figura 3. Exemplos de ésteres de aroma	11
Figura 4. Métodos de imobilização de enzimas	14
Figura 5. Principais fontes de quitina	16
Figura 6. Principais grupos reativos presentes no anel glucosâmido da quitosana	19
Figura 7. Principais agentes reticulantes empregados na reticulação da quitosana	20
Figura 8. Representação esquemática da quitosana reticulada com glutaraldeído	21
Figura 9. Representação esquemática da imobilização de lipases em suportes ativados com glutaraldeído	23
Figura 10. Fontes de obtenção de genipin	23
Figura 11. Exemplos de cátions e ânions formadores de líquidos iônicos	32
Figura 12. Estruturas dos álcoois terpênicos 1 e 2e do <i>n</i> -decanol (3)	34
Figura 13. Sistema utilizado para a preparação das microesferas de quitosana	40
Figura 14. Espectro de FTIR das microesferas de quitosana não reticuladas	54
Figura 15. Espectro de FTIR das microesferas de quitosana não reticuladas e reticuladas com glutaraldeído	57
Figura 16. Espectros de FTIR das microesferas de quitosana não reticuladas e reticuladas com genipin	60
Figura 17. Estrutura do genipin	61
Figura 18. Espectros de FTIR das microesferas de quitosana não reticuladas, reticuladas com TPP e reticuladas com qts/gen/TPP	62
Figura 19. Imagens de SEM das microesferas de quitosana não reticuladas e reticuladas com diferentes concentrações de glutaraldeído e tempos de reticulação	65
Figura 20. Imagens de SEM das microesferas de quitosana reticuladas com diferentes concentrações de genipin e tempos de reação	66
Figura 21. Imagens de SEM das microesferas de quitosana reticuladas com uma combinação dos agentes reticulantes genipin (10 mM) e TPP (0,1M) em diferentes pH por 4h de reação	67
Figura 22. Espectros de EDS para as microesferas de quitosana reticuladas com TPP e uma combinação entre genipin e TPP em pH 10	69
Figura 23. Determinação do teor de grupos amino livres no suporte qts/glu em função da concentração de glutaraldeído e tempo de reticulação	71

Figura 24. Determinação do teor de grupos amino livres no suporte qts/gen em função (A) da concentração de genipin e (B) do tempo de reticulação	72
Figura 25. (A) Determinação do teor de grupos amino livres no suporte qts/gen/TPP e (B) contribuição do genipin na reticulação das microesferas de quitosana no suporte qts/gen/TPP em função do pH da solução	73
Figura 26. Variação da atividade enzimática total (A_i), em U/mL, do sobrenadante durante 48h de imobilização da LPS-SD em qts/glu	76
Figura 27. Estabilidade da lipase LPS-SD livre e imobilizada no suporte qts/glu 1,25% (v/v)/6h em diferentes valores de pH durante 24h de incubação	79
Figura 28. Estabilidade térmica da lipase LPS-SD livre e imobilizada no suporte qts/glu 1,25% (v/v)/6h durante 1h de incubação	79
Figura 29. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ do acetato de geranoíla (5) destacando os picos considerados no cálculo de conversão	83
Figura 30. Variação da conversão em função da quantidade de LPS-SD nas formas livre e imobilizada no suporte qts/glu 1,25% (v/v)/6h na preparação do acetato de geranoíla	85
Figura 31. Influência da quantidade de LPS-SD imobilizada no suporte qts/gen e da concentração de genipin utilizada durante a reticulação (4h) da quitosana na preparação do acetato de geranoíla	87
Figura 32. Variação da conversão em função da temperatura e do tempo de reação utilizando a LPS-SD imobilizada no suporte qts/glu 1,25% (v/v)/6h na preparação do éster 5	88
Figura 33. Variação da conversão em função da temperatura e do tempo de reação utilizando a LPS-SD imobilizada no suporte qts/gen 2,0mM/4h na preparação (A) do éster 5 e (B) do éster 8	90
Figura 34. Variação da conversão em função da razão molar entre o geraniol e o acetato de vinila ao longo do tempo na preparação do éster 5 empregando a LPS-SD imobilizada no suporte qts/gen/TPP	92
Figura 35. Estrutura química do acetato de <i>n</i> -decila	101
Figura 36. Reuso da LPS-SD imobilizada no suporte qts/gen 2,0mM/4h em ciclos reacionais sucessivos para a preparação do éster 16	101
Figura 37. Estudos do reuso e influência do tempo de estocagem da LPS-SD imobilizada no suporte qts/glu 1.25% (v/v)/6h para a preparação do éster 5	102
Figura 38. Estudo do reuso e influência do tempo de estocagem da LPS-SD imobilizada nos suportes qts/TPP e qts/gen/TPP na preparação (A) do éster 5 e (B) do éster 8	103

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Vantagens e desvantagens da biocatálise em comparação a processos catalisados convencionalmente	1
Tabela 2: Aplicações sintéticas das enzimas	5
Tabela 3: Principais bandas de absorção no FTIR da quitosana	55
Tabela 4: Tamanho médio das microesferas de quitosana puras e reticuladas	68
Tabela 5: Determinação do teor de proteína nos diferentes suportes preparados após a imobilização da LPS-SD	77
Tabela 6: Influência de solventes orgânicos na preparação do éster 5	94
Tabela 7: Influência de solventes orgânicos na preparação do éster 8	96
Tabela 8: Influência de LIs na preparação do acetato de geranoíla	98
Tabela 9: Influência de diferentes doadores acila na preparação de ésteres derivados de (1)	100

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Hidrólise de um triacilglicerol catalisada por lipase	7
Esquema 2. Mecanismo geral para a hidrólise de um éster catalisada por lipase	9
Esquema 3. Exemplos de reações catalisadas por lipases para a produção de ésteres	10
Esquema 4. Obtenção da quitosana a partir de processo de desacetilação da quitina	17
Esquema 5. Representação das diversas formas em equilíbrio do glutaraldeído em solução aquosa	22
Esquema 6. Mecanismo da reação de reticulação da quitosana com genipin em meio neutro ou ácido	25
Esquema 7. Mecanismo da reação de reticulação da quitosana com genipin em meio básico	26
Esquema 8. Representação esquemática da reticulação iônica da quitosana com TPP	28
Esquema 9. Equações de dissociação do TPP e seus respectivos valores de pK_a	29
Esquema 10. Reações de transesterificação catalisada por lipases empregando líquidos iônicos	33
Esquema 11. Fluxograma representativo das reações de reticulação realizadas para a preparação dos suportes de quitosana	41
Esquema 12. Representação da reação de hidrólise do <i>p</i> -NPP catalisada por lipase	44
Esquema 13. Representação da reação de ninidrina com quitosana	48
Esquema 14. Preparação do acetato de geranoíla (5)	49

Esquema 15. Preparação do acetato de citroneíla (8)	49
Esquema 16. Preparação do propionato de geranoíla (10)	50
Esquema 17. Preparação de 5 a partir do acetato de isopropenila (11)	50
Esquema 18. Preparação do laurato de geranoíla (15)	50
Esquema 19. Preparação do acetato de <i>n</i> -decila (16)	51

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo I. Curva de calibração do <i>p</i> -nitrofenol	122
Anexo II. Curva de calibração da albumina bovina (BSA)	122
Anexo III. Espectro de FTIR do geraniol	123
Anexo IV. Espectro de FTIR do acetato de geranoíla.....	123
Anexo V. Espectro de FTIR do citrionelol	124
Anexo VI. Espectro de FTIR do acetato de citroneíla	124
Anexo VII. Espectro de FTIR do <i>n</i> -decanol e acetato de <i>n</i> -decila	125
Anexo VIII. Espectro de FTIR do [BMIM][PF ₆] antes e após ser usado na preparaça do éster 5	125
Anexo IX. Espectro de ¹ H-NMR do geraniol	126
Anexo X. Espectro de ¹ H-NMR do acetato de geranoíla.....	126
Anexo XI. Espectro de ¹³ C-NMR do acetato de geranoíla	127
Anexo XII. Espectro de ¹ H-NMR do citrionelol	127
Anexo XIII. Espectro de ¹ H-NMR do acetato de citroneíla	128
Anexo XIV. Espectro de ¹³ C-NMR do acetato de citroneíla	128
Anexo XV. Espectro de ¹ H-NMR do acetato de <i>n</i> -decila	129

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[BF₄⁻] = tetrafluoroborato

[BMIM⁺] = 1-butil-3-metilimidazólio

[PF₆⁻] = hexafluorofosfato

CCD = cromatografia em camada delgada

CDCl₃ = clorofórmio deuterado

EC = Enzyme Commission Numbers

EDS = energia dispersiva de raios X

EPI = equipamento de proteção individual

FTIR = espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

GD = grau de desacetilação

gen = genipin

glu = glutaraldeído

LI = líquido iônico

LPS-SD = lipase de *Burkholderia cepacia*

MTBE = éter de *t*-butil metílico

NMR = ressonância magnética nuclear

PA = padrão analítico

qts = quitosana

SEM = microscopia eletrônica de varredura

TPP = tripolifosfato de sódio

VOCs = Volatile Organic Compounds

R_f = fator de retenção

rpm = rotações por minuto

t.a. = temperatura ambiente

THF = tetrahidrofurano

TMS = tetrametilsilano

UV-VIS = ultravioleta visível

ÍNDICE GERAL

1. REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1. Biotocatálise e biotransformações.....	1
1.2. Enzimas.....	2
1.3. Lipases.....	6
1.4. Imobilização de enzimas	12
1.5. Biopolímeros	15
1.5.1. Quitina e quitosana	16
1.6. Quitosana: reatividade e reações de reticulação	18
1.6.1. Reticulação da quitosana com glutaraldeído	20
1.6.2. Reticulação da quitosana com genipin	23
1.6.3. Reticulação da quitosana com TPP	27
1.7. Uso de solventes orgânicos e líquidos iônicos em biocatálise	30
2. OBJETIVOS	35
2.1. Objetivo Geral	35
2.2. Objetivos específicos	35
3. METODOLOGIA	37
3.1. Reagentes, solventes e lipase	37
3.2. Equipamentos	38
3.2.1. Laboratório de Biotocatálise (301/306)	38
3.2.2. Grupo de Estudos em Materiais Poliméricos – POLIMAT (202/204)	38
3.2.3. Central de Análises no Departamento de Química – UFSC	38
3.2.4. Outros Laboratórios	39
3.3. Procedimentos experimentais	39
3.3.1. Determinação do grau de desacetilação da quitosana	39
3.3.2. Preparação das microesferas de quitosana	40
3.3.3. Reticulação das microesferas de quitosana	40
3.3.3.1. Reticulação da quitosana com glutaraldeído	42

3.3.3.2. Reticulação da quitosana com TPP	42
3.3.3.3. Reticulação da quitosana com genipin	42
3.3.3.4. Reticulação da quitosana com genipin e TPP	43
3.3.4. Imobilização das lipases nos suportes poliméricos	43
3.3.5. Caracterização dos suportes poliméricos	46
3.3.5.1. Microscopia eletrônica de varredura (SEM)	46
3.3.5.2. Espectroscopia de infravermelho (FTIR)	46
3.3.5.3. Determinação de grupamentos amino livres na quitosana reticulada	46
3.3.6. Aplicação da LPS-SD imobilizada em reações de transesterificação	48
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
CAPÍTULO I: Preparação e caracterização dos suportes à base de quitosana	54
4.1. Determinação do grau de desacetilação da quitosana	54
4.2. Espectroscopia de FTIR dos suportes à base de quitosana	55
4.2.1. FTIR do suporte qts/glu	56
4.2.2. FTIR do suporte qts/gen	59
4.2.3. FTIR dos suportes qts/TPP e qts/gen/TPP	62
4.3. Morfologia dos suportes à base de quitosana	64
4.4. Determinação do teor de grupamentos amino livres nos suportes	69
CAPÍTULO II: Imobilização da LPS-SD nos suportes preparados	75
4.5. Cinética de imobilização da LPS-SD	75
4.6. Determinação do teor de LPS-SD imobilizada	77
4.7. Estabilidade da LPS-SD às variações de pH e temperatura	78
CAPÍTULO III: Aplicações da LPS-SD livre ou imobilizada em reações de transesterificação	81
4.8. Caracterização dos produtos	81

4.9. Preparação dos acetatos de geranoíla, citroneíla e <i>n</i> -decila	84
4.9.1. Influência da massa de lipase na preparação do acetato de geranoíla	84
4.9.2. Influência do tempo e temperatura de reação	88
4.9.3. Influência da razão molar	91
4.9.4. Influência do meio orgânico na preparação de 5 e 8	93
4.9.5. Influência do agente acilante na preparação de ésteres derivado de 1	100
4.9.6. Reuso da LPS-SD imobilizada nos diferentes suportes	101
5. CONCLUSÕES	105
6. PERSPECTIVAS	106
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
8. ANEXOS	122

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Biocatálise e biotransformações

A biocatálise pode ser amplamente definida por processos sintéticos que empregam enzimas ou micro-organismos (células íntegras) como catalisadores. Estes biocatalisadores têm sido empregados por centenas de anos na produção de álcool por meio da fermentação e na produção de queijo através da quebra de proteínas do leite promovida por enzimas. Nas últimas décadas, houve um grande avanço no entendimento da relação entre estrutura e função das proteínas, o que se reflete na vasta gama de aplicações da biocatálise nos mais variados setores da indústria.^{1,2}

As áreas industrial e acadêmica têm, há muito tempo, interesse em reações catalisadas por enzimas.³ Os processos biocatalisados são similares aos processos convencionais em vários aspectos. No entanto, os processos biocatalisados requerem maior atenção no que se refere a fatores relacionados tanto à cinética enzimática quanto à estabilidade da enzima em reações com uma única etapa ou processos metabólicos com várias etapas.² A **Tabela 1** lista as principais vantagens e as desvantagens de processos biocatalisados em comparação aos que empregam catalisadores convencionais.

Tabela 1: Vantagens e desvantagens da biocatálise em comparação a processos catalisados convencionalmente.^{1,4,5}

Vantagens	Desvantagens
Tendem a ser mais eficientes (requerem menor concentração de enzimas).	Possibilidade de inibição do substrato ou do produto.
Podem ser modificados para aumentar a seletividade, estabilidade e atividade das enzimas.	Enzimas são solúveis em água (altos pontos de ebulição e calor de vaporização).
Maior seletividade (químico, regio, diastereo e enantiosseletividade).	Enzimas são encontradas na natureza em apenas uma forma enantiomérica.
Requerem condições brandas de reação (tipicamente, uma faixa de pH de 5-8 e temperaturas entre 20-40°C).	Apresentam limites de operação (enzimas sofrem desnaturação em altas temperaturas e em determinadas faixas de pH).
Ambientalmente mais favoráveis, podendo se enquadrar em 10 dos Princípios da Química Verde.	Enzimas podem causar reações alérgicas.

Na busca por novas técnicas para uma economia sustentável e baseada na bioeconomia, a biocatálise tem importantes contribuições em várias áreas, desde a produção de produtos químicos a granel a partir de recursos renováveis até sínteses altamente seletivas de produtos químicos finos ou farmacêuticos.⁶

Os avanços recentes na biocatálise contribuíram para que este campo de pesquisa passasse a ter um forte reconhecimento no que diz respeito à sua inserção em rotas sintéticas tradicionais. As aplicações de enzimas e de células íntegras para produzir diversos tipos de substâncias químicas e biológicas tornaram-se uma tecnologia comprovada em indústrias químicas e farmacêuticas, pois os processos baseados em catálise enzimática geralmente levam a uma redução do tempo de processo, no número de etapas de reação e a na quantidade de resíduos gerados.^{4,6,7}

Portanto, a biocatálise é uma tecnologia altamente verde e sustentável, com elevado potencial para a produção de compostos com alta eficiência sintética e custo-benefício. Ela apresenta não apenas benefícios ambientais, mas também vários avanços para impulsionar a biotecnologia. A chave para isso é a integração entre a química sintética, as transformações biológicas e o desenvolvimento de processos sob os princípios da química sustentável.⁷

1.2. Enzimas

Os sistemas em biocatálise podem utilizar células íntegras ou enzimas. As células íntegras têm como vantagens o baixo custo e o fato de conter tanto as enzimas quanto as coenzimas necessárias ao processo. Porém, por ser um sistema multienzimático, podem ocorrer reações laterais, além de problemas de permeabilidade do substrato pela membrana. Por outro lado, as enzimas isoladas oferecem maior controle do processo, apesar do custo mais alto pela tecnologia aplicada na purificação desta, com a menor perda de atividade possível.^{1,8}

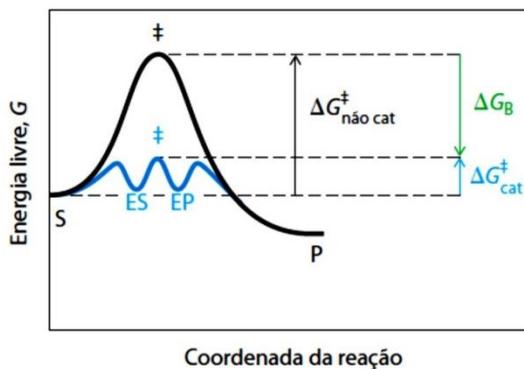
Enzimas são catalisadores biológicos, em sua maioria de origem proteica, que catalisam a maioria das reações em organismos vivos. As enzimas são os catalisadores sintetizados pela natureza para alcançar a velocidade e a coordenação de uma multiplicidade de reações necessárias para desenvolver e manter a vida. Como catalisadores, as enzimas ligam-se

a seus substratos por múltiplas interações (predominantemente não covalentes ou covalentes) no sítio ativo, reduzindo a energia de ativação da reação.^{9,10}

As enzimas são altamente eficazes, geralmente aumentando as velocidades de reação por um fator de 10^5 a 10^{23} . As reações catalisadas por enzimas são caracterizadas pela formação de um complexo entre o substrato e a enzima (complexo “ES”). Em geral, a função das enzimas e dos outros catalisadores é diminuir a energia de ativação, ΔG^\ddagger , da reação, aumentando, assim, a velocidade das reações.^{9,11}

O equilíbrio da reação não é afetado pela enzima. Na reação $S \rightarrow P$ (**Figura 1**), os intermediários ES e EP ocupam o nível mínimo na curva da progressão da energia de uma reação catalisada por uma enzima. Os termos $\Delta G^\ddagger_{\text{não cat}}$ e $\Delta G^\ddagger_{\text{cat}}$ correspondem, respectivamente, à energia de ativação da reação não catalisada e à energia de ativação total da reação catalisada. Conforme pode ser visto na Figura 1, a energia de ativação é menor quando a reação é catalisada por uma enzima.¹¹

Figura 1. Diagrama da coordenada da reação comparando uma reação catalisada por enzima com uma não catalisada.¹¹



De acordo com a **Figura 1**, a soma da energia de ativação ΔG^\ddagger desfavorável (positiva) e a energia de ligação favorável ΔG_B (negativa) resulta em uma redução líquida da energia de ativação. Para diminuir a energia de ativação da reação, o sistema deve adquirir uma quantidade de energia equivalente ao valor da diminuição de ΔG^\ddagger . Boa parte dessa energia vem da energia de ligação ΔG_B proporcionada pela formação de interações

fracas não covalentes entre substrato e enzima que ocorrem no estado de transição.¹¹

Por desempenharem um papel importante como catalisadores biológicos, as enzimas apresentam inúmeras aplicações. Algumas aplicações industriais de enzimas são apresentadas na **Tabela 2**, onde se pode verificar a grande aplicabilidade das mesmas na produção de diversos bens de consumo. Em geral, as enzimas fornecem uma maneira mais eficaz de produzir compostos enantiomericamente puros, principalmente por apresentarem alta quimio, regio e estereosseletividade.^{12,13,14}

Tabela 2: Aplicações sintéticas das enzimas^{12,13,14}

Tipo de indústria	Enzima	Aplicação
Detergente	Proteases Lipases Amilases Celulases	Remover manchas orgânicas. Remover manchas de gordura. Remover resíduos de alimentos amiláceos. Restaurar uma superfície lisa para a fibra e restaurar as cores originais de vestuário.
Alimentos	Proteases Lipases Lactases	Intensificar o sabor e acelerar o processo de envelhecimento. Produzir leite sem lactose e seus derivados para uma dieta com restrição em tais tipos de alimentos.
Vinho	β -Glucanase Celulase Celulase Pectinase	Auxiliar no processo de clarificação. Promover a quebra de paredes celulares de microorganismos patogênicos. Melhorar a estabilidade quanto à clarificação e estocagem.
Sucos de frutas	Pectinases Celulase	Melhorar a extração do suco de fruta e reduzir a viscosidade do suco. Melhorar o rendimento e a coloração do suco.
Óleos e gorduras	Lipases	Promover a hidrólise industrial de óleos e gorduras ou a produção de ácidos graxos, glicerina e ácidos graxos poli-insaturados para uso na produção de produtos farmacêuticos, produtos de aroma e fragrâncias cosméticos.
Álcool	α -Amilases Amiloglucosidase	Liquefação do amido ou a fragmentação de amidogelatinoso Sacarificação ou degradação completa de amido e dextrina em glicose.
Amido e açúcar	α -Amilases	Conversão enzimática de amido em frutose: liquefação, sacarificação e isomerização. Liquefação de amido, sacarificação e isomerização deglicose.
Alimentação animal	β -Glucanases	Redução de β -glucanos.
Produção de cerveja	β -Glucanases	Redução de β -glucanos e pentosanos.
Produtos químicos finos	Lipases, Amidases Nitrases	Produção de intermediários enantioméricos para a síntese de drogas e defensivos agrícolas. Promover a hidrólise de ésteres, amidas, nitrilas e/ou reações de esterificação.
Couro	Lipases	Remover gorduras numa das etapas de produção de couro.
Têxteis	Amilases Celulases	Remover fibras de matérias-primas de baixo valor.
Papel	Xilanases	Usado como catalisador de branqueamento durante o pré-tratamento para o fabrico de celulose branqueada para papel.

Os processos enzimáticos podem oferecer menos riscos ao meio ambiente, além de serem mais econômicos e, em última análise, mais sustentáveis que as rotas químicas tradicionais. Conseqüentemente, nas duas últimas décadas, a biocatálise emergiu como uma tecnologia importante para atender à crescente demanda por manufatura de produtos químicos verdes e sustentáveis, particularmente na síntese de produtos farmacêuticos, de sabor e fragrâncias, vitaminas e outros produtos químicos finos. Além disso, os processos enzimáticos geralmente descartam a necessidade de proteção e/ou ativação de grupos funcionais, proporcionando rotas sintéticas que são mais econômicas, gerando menos resíduos e que são, portanto, mais eficientes do que as sínteses orgânicas convencionais.¹⁵

Nesse contexto, as enzimas da classe das hidrolases (lipases, esterases e proteases), as quais promovem a cisão de uma ligação covalente promovida por moléculas de água, constituem um dos grupos de enzimas mais empregados em síntese orgânica. Seu reconhecimento e uso se baseiam, principalmente, no fato de serem biocatalisadores eficientes, além de sua alta abundância, baixo custo e dispensarem o uso de cofatores, os quais são pequenas moléculas orgânicas ou inorgânicas que podem ser necessárias no funcionamento de uma enzima.^{16,17}

Dentre as hidrolases, destacam-se as lipases, as quais tem recebido grande atenção nos últimos anos, sobretudo, por terem a habilidade de aceitar uma grande variedade de substratos, além de sua alta estabilidade em solventes orgânicos.^{16,17}

1.3. Lipases

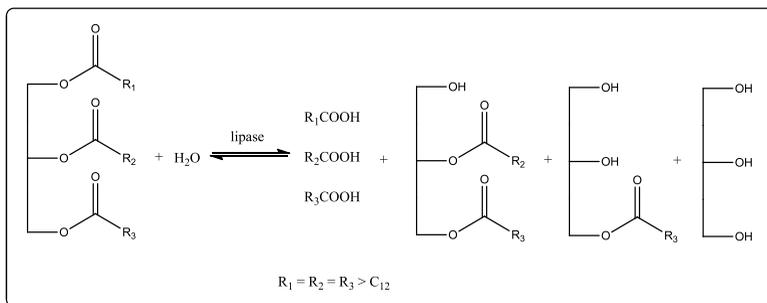
As lipases (triglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas, podendo ser de origem animal (pancreática, hepática e gástrica), microbiana (fungos e bactérias) e vegetal, com diferentes propriedades catalíticas. São, em sua maioria, extracelulares, o que favorece sua extração, isolamento e purificação.^{11,18}

As lipases catalisam reações de hidrólise de triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol. Os triacilgliceróis não ocorrem como componentes de membranas, mas se acumulam no tecido adiposo e

fornecem um meio de armazenamento de ácidos graxos, principalmente nos animais. Quando um organismo necessita de ácidos graxos, as ligações ésteres dos triacilgliceróis são hidrolisadas pelas lipases.^{9,18} O **Esquema 1** mostra a hidrólise de um triacilglicerol.^{18,19}

Esquema 1. Hidrólise de um triacilglicerol catalisada por lipase.

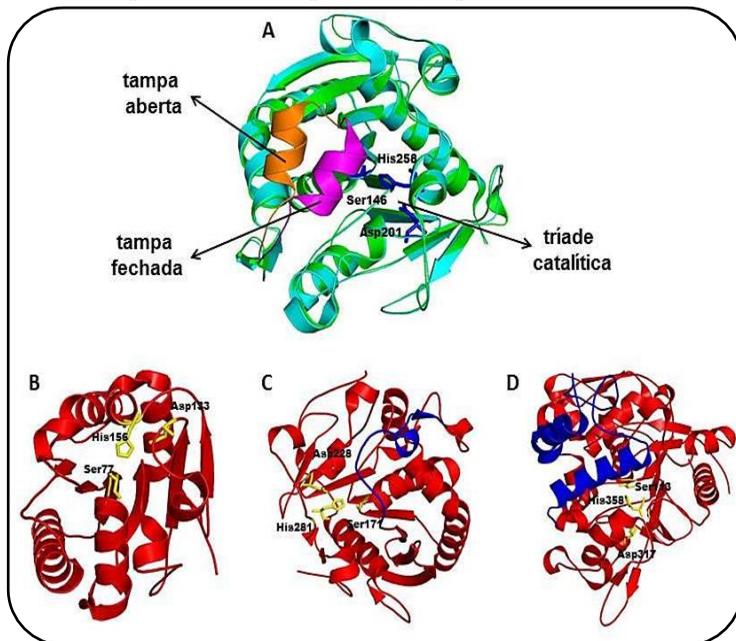
(adaptado das ref. 18 e 19)



O sítio ativo das lipases consiste, basicamente, em três sítios catalíticos, conhecidos como tríade catalítica: um resíduo nucleofílico (composto por resíduos de serina, cisteína ou aspartato), um resíduo catalítico ácido (correspondendo ao aspartato ou ao glutamato) e um resíduo de histidina, os quais sempre se apresentam nessa ordem na sequência de aminoácidos.^{20,21} O sítio catalítico formado pela tríade catalítica Ser-His- Asp/Glu se repete em todas as estruturas e é frequentemente protegido na molécula por uma "tampa" hidrofóbica ou "lid" que, ao interagir com a interface lipídio/água, sofreu na mudança conformacional, expondo o sítio ativo. Embora seja essencial, algumas lipases não apresentam esta estrutura.^{22,23}

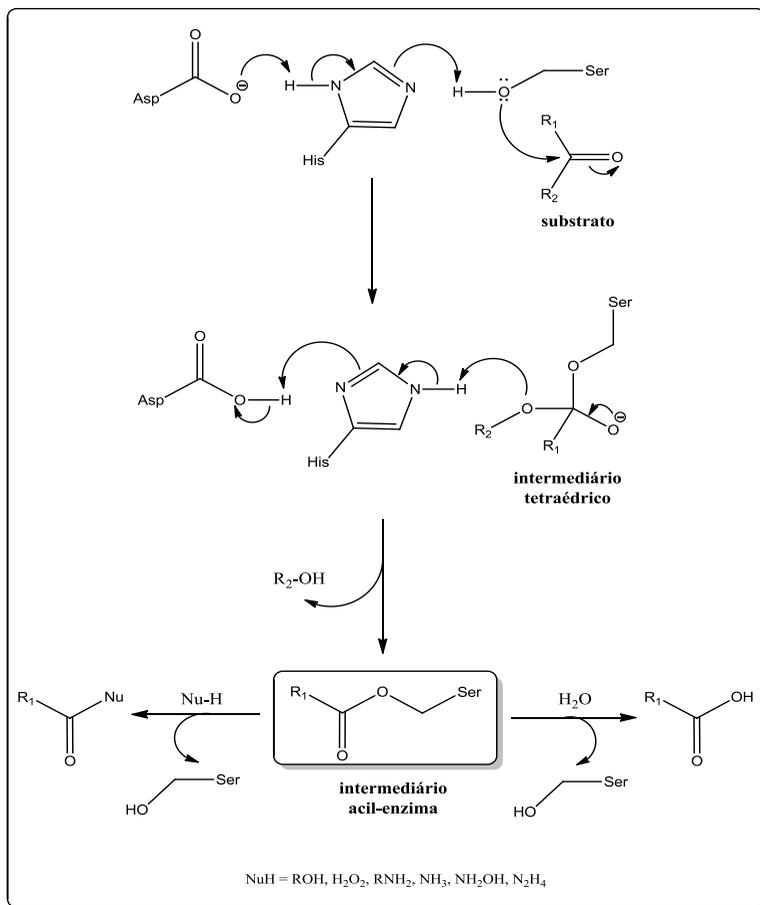
O "lid", ou tampa, das lipases é uma estrutura anfifílica. Se esta estrutura estiver fechada, o sítio ativo estará protegido e inacessível aos substratos e, portanto, a lipase estará inativa. Por outro lado, se ela estiver em uma conformação aberta, os substratos terão livre passagem até o sítio ativo, permitindo à lipase desempenhar atividade catalítica. A **Figura 2** mostra o modelo 3D de quatro lipases, onde é possível visualizar a tríade catalítica e a presença ou não do domínio da tampa.²¹

Figura 2. Representação esquemática da estrutura em 3D de lipases: (A) sobreposição das conformações fechada (em verde) e aberta (em ciano) da lipase de *Thermomyces lanuginosus*, (B) lipase de *Bacillus subtilis* sem a tampa, (C) lipase de *Malassezia globosa* com tampa em forma de “loop”, (D) lipase de *Geobacillus zalihae* com tampa em forma de dupla hélice. (adaptado da ref. 21)



O mecanismo geral de hidrólise de ésteres catalisada por lipases está representado no **Esquema 2**. A reação se inicia com um ataque nucleofílico no carbono carbonílico do éster (substrato) pelo grupo hidroxila presente no resíduo serina do sítio ativo, formando um complexo acil-enzima. Isso resulta na formação do primeiro intermediário tetraédrico, que libera uma molécula do correspondente álcool. Em sequência, o complexo acil-enzima é hidrolisado (ataque nucleofílico da molécula de água), ocorrendo a formação do segundo intermediário tetraédrico, seguida da formação do produto (ácido carboxílico) e regeneração do sítio ativo da lipase.^{9,24}

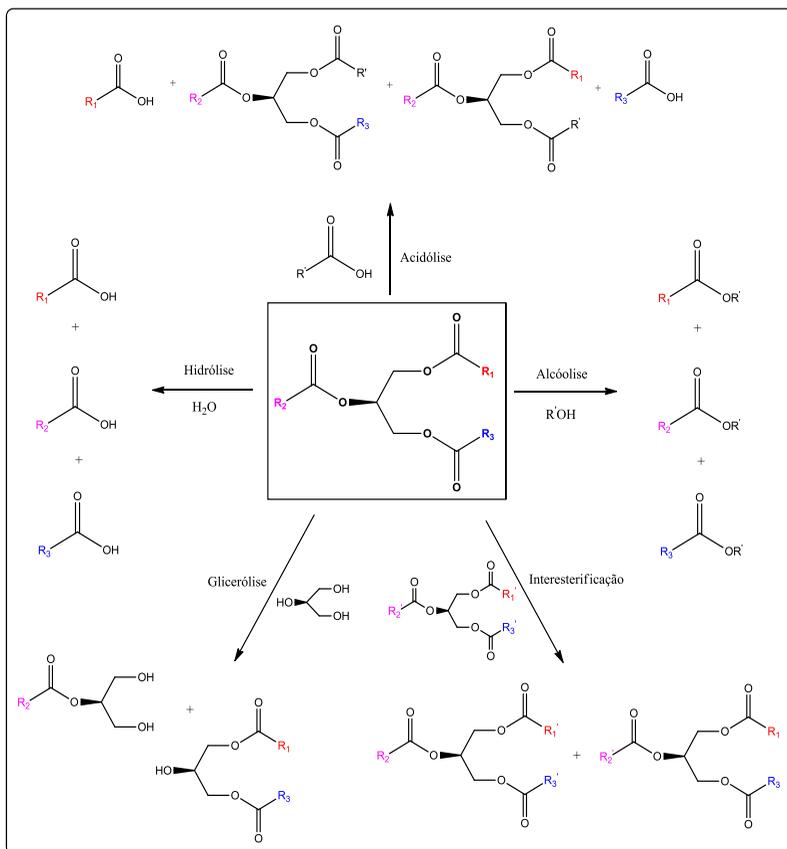
Esquema 2. Mecanismo geral para a hidrólise de um éster catalisada por lipase.
(adaptado da ref. 8)



Além da hidrólise de ésteres, as lipases atuam também como catalisadores de outras reações, como por exemplo, em reações de epoxidação, esterificação, interesterificação e transesterificação em meios não aquosos, as quais seguem um mecanismo similar ao descrito acima.^{24,25} A habilidade de catalisar diferentes tipos de reações envolvendo diferentes substratos é conhecida como promiscuidade ou versatilidade enzimática. A versatilidade das lipases tem recebido grande atenção nos últimos anos, sobretudo devido às inúmeras aplicações industriais.²⁵ O **Esquema 3** apresenta alguns exemplos de

reações catalisadas por lipases.

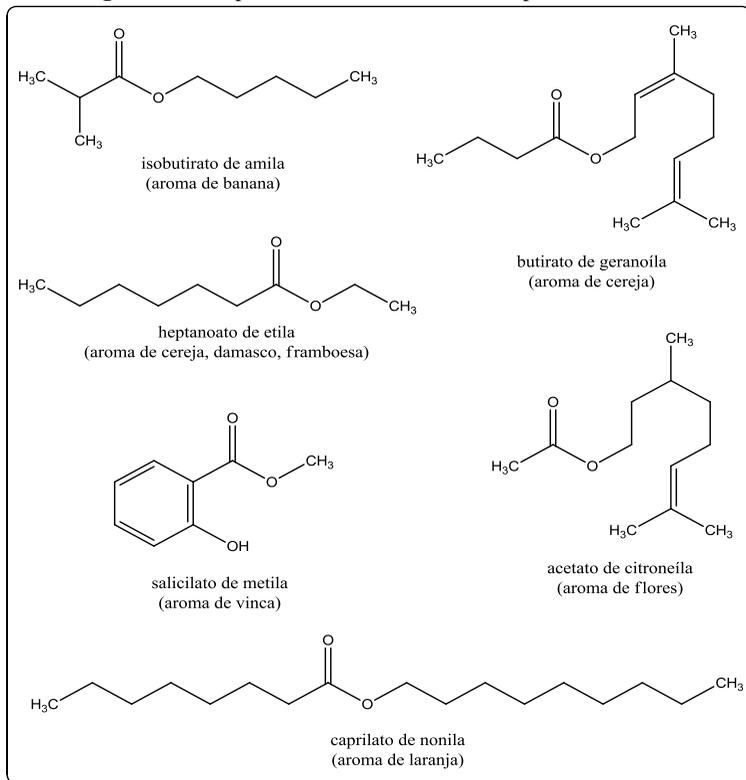
Esquema 3. Exemplos de reações catalisadas por lipases para a produção de ésteres. (adaptado da ref. 24)



Como citado anteriormente, as lipases possuem extrema importância na biotecnologia e na indústria. Nesse contexto, destacam-se a sua grande disponibilidade e baixo custo, além de atuarem em uma faixa de pH relativamente grande. Essa versatilidade faz com que as mesmas sejam uma ótima escolha na produção de alimentos, detergentes, produtos farmacêuticos, têxteis e cosméticos, entre outros. Dentre as inúmeras aplicações das lipases, destaca-se a produção de ésteres de aroma e de fragrâncias (**Figura 3**), obtidos através de

reações de esterificação ou transesterificação a partir de ácidos carboxílicos de cadeia curta, tais como o acético, propiônico e butírico, e de álcoois como, por exemplo, o geraniol, citronelol e o álcoolamílico.^{26,27,28}

Figura 3. Exemplos de ésteres de aroma. (adaptado da ref. 29)



As lipases têm sido empregadas há décadas na síntese de vários ésteres. Estes ésteres apresentam inúmeras aplicações, sobretudo na produção de perfumes e aromas, surfactantes, aditivos alimentares, produtos farmacêuticos e compostos biologicamente ativos. Além disso, características como a alta estereosseletividade e regioseletividade das lipases são bem conhecidas e relatadas na literatura científica.^{18,30-32} No entanto, a síntese de ésteres e de outros compostos catalisados por lipases ocorre, majoritariamente, em

sistemas não aquosos.^{8,27}

A lipase de *Burkholderia cepacia* (LPS-SD), por exemplo, tem sido usada em diversos processos biocatalíticos visando à obtenção de substâncias com elevada pureza óptica, além de apresentar alta regiosseletividade. Salienta-se que grande parte de sua importância reside no fato deste biocatalisador ter alta estabilidade térmica e elevada resistência à inibição e desnaturação devido às interações com solventes orgânicos, tal como o metanol.³³⁻³⁵

Sendo assim, fatores como as propriedades dos solventes orgânicos, a atividade de água, a natureza do substrato e da lipase são extremamente importantes na síntese de ésteres. Por isso, técnicas de imobilização e/ou uso de aditivos (como co-solventes) como, por exemplo, líquidos iônicos, podem auxiliar a estabilizar e preservar as propriedades catalíticas das lipases em meio orgânico.^{8,27}

No entanto, para que as lipases sejam empregadas em processos industriais de forma bem-sucedida, é necessário que as mesmas permaneçam estáveis e totalmente funcionais nas condições específicas de cada processo. As condições de reação em um ambiente industrial podem diferir consideravelmente do ambiente natural da atuação das lipases, como por exemplo, a temperatura e o pH do meio, o uso de (co)solventes orgânicos e a presença de substratos e/ou produtos não-naturais. Consequentemente, estratégias físico-químicas, como modificações químicas ou a imobilização, são de especial interesse neste contexto.^{18,26}

1.4. Imobilização de enzimas

A imobilização de enzimas é um processo que consiste no confinamento do catalisador em, ou sobre um suporte sólido.^{15,36} Geralmente, a imobilização facilita a recuperação e reutilização eficientes da enzima permitindo, assim, a utilização em modos repetitivos e/ou contínuos de reação, como por exemplo, em reatores de fluxo em pistão, ou também conhecidos como reatores em fluxo contínuo.^{37,38}

Um benefício adicional ao uso de enzimas imobilizadas é, geralmente, a maior estabilidade adquirida, tanto em condições de

armazenamento quanto em condições operacionais, como por exemplo, a possibilidade de desnaturação por aquecimento, pelo uso de solventes orgânicos ou por autólise (autodestruição), embora isso esteja relacionado ao decréscimo da atividade enzimática em comparação com a enzima solúvel. No entanto, o aumento da estabilidade da enzima e a possibilidade de reutilização em ciclos reacionais subsequentes são reflexos das maiores produtividades dos catalisadores (kg de produto por kg de enzima) que, por sua vez, determinam os custos da enzima por kg de produto.¹⁵

Portanto, muitos dos processos que empregam enzimas imobilizadas são bem estabelecidos, tais como na produção de alimentos, cosméticos, detergentes, couro e padaria, etc.^{36,39}

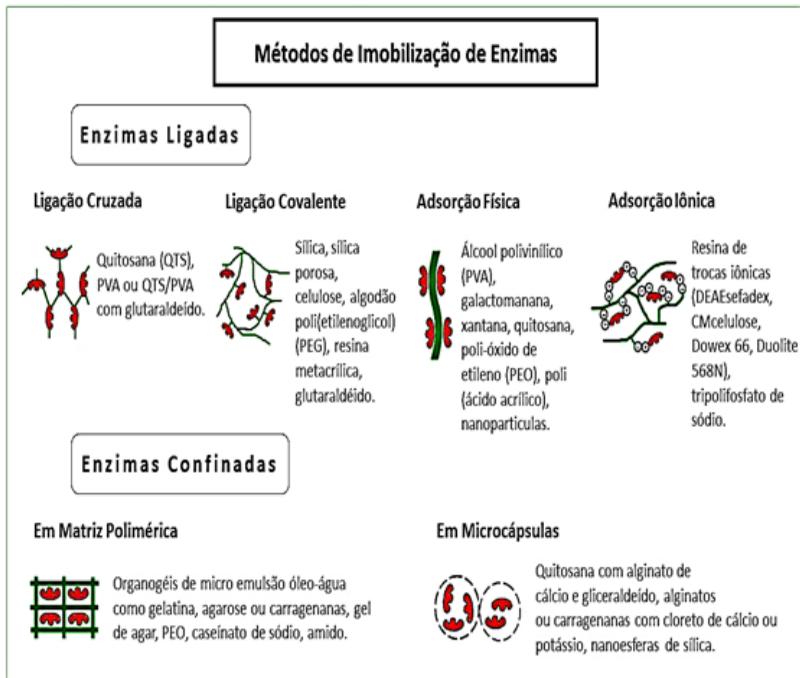
Além disso, a imobilização implica na interação de duas espécies; a enzima e o suporte. As propriedades da superfície de ambos são importantes. Um requisito essencial para qualquer suporte é apresentar uma grande área superficial. Isso pode ser alcançado com materiais de tamanho bastante reduzido (embora essa característica possa dificultar o processo de separação da enzima), ou com materiais altamente porosos cujas dimensões sejam suficientemente grandes e que não limite a difusão dos substratos. Além disso, o suporte precisa ser quimicamente e mecanicamente estável.^{15,39,40}

Os vários métodos de imobilização empregados baseiam-se nas ligações físicas e químicas entre a enzima e o suporte. Os mais utilizados são: adsorção física (interações hidrofóbicas e de van der Waals) e química (ligação covalente e iônica), imobilização por confinamento em matriz ou microcápsula e ligação cruzada.^{15,39}

De acordo com a **Figura 4**, as técnicas de imobilização de enzimas mais utilizadas podem ser agrupadas em quatro categorias, cada uma com suas vantagens e desvantagens:^{15,18,40}

1. Deposição e adsorção física (interações não covalentes);
2. Imobilização através de interações iônicas;
3. Imobilização covalente (interações por meio de ligações covalentes);
4. Aprisionamento ou encapsulação em um gel ou cápsula polimérica.

Figura 4. Métodos de imobilização de enzimas. (adaptada das ref. 18 e 40)



A combinação de tais métodos de imobilização com processos envolvendo modificações químicas, antes ou após a imobilização, pode se tornar uma fonte de novos biocatalisadores com alterações ainda mais expressivas em suas propriedades. Assim, a imobilização combinada com desenvolvimentos rápidos em áreas como manipulação genética e desenho do suporte, química de proteínas, química orgânica e reatores e design de reação devem se tornar ferramentas cada vez mais importantes e promissoras para melhorar os diferentes aspectos das enzimas como biocatalisadores industriais em um futuro próximo.⁴¹

Nesse sentido, a imobilização de enzimas continua a ser um assunto de imenso interesse, tanto na indústria quanto no contexto acadêmico.^{41,42} A viabilidade comercial das biotransformações industriais permanece, ainda, dependente do custo associado ao uso de enzimas. Portanto, a imobilização é uma tecnologia promissora que, além de fornecer um biocatalisador ativo e estável, se apresenta como

uma operação relativamente simples, não requerendo uma preparação enzimática altamente pura ou um suporte caro que pode não estar comercialmente disponível.^{15,26,42}

Uso de biopolímeros como suportes carreadores de enzimas vem recebendo a atenção de muitos pesquisadores. Como exemplos de biopolímeros com potencial aplicação em biocatálise, sobretudo devido à abundância e biocompatibilidade, pode-se citar a celulose, a quitina, a quitosana e o amido.^{43,44}

1.5. Biopolímeros

Os biopolímeros são polímeros ou copolímeros que podem ser obtidos ou produzidos por organismos vivos e isolados a partir de matérias-primas de fontes renováveis, como milho, cana-de-açúcar, celulose, quitina e outras. O crescente interesse pelos biopolímeros está relacionado a alguns fatores de ordem socioeconômica e ambiental, tais como a escassez do petróleo e aumento de seu preço, assim como os grandes impactos ambientais causados pelos processos de extração e refino utilizados para a produção dos polímeros derivados do mesmo.^{46,47}

Os biopolímeros e seus derivados constituem um grupo de compostos com características diversas, abundantes e de extrema importância para a vida. Eles apresentam propriedades fascinantes e oferecem as mais diversas aplicações. Organismos vivos são capazes de sintetizar uma grande variedade de polímeros, os quais podem ser divididos em proteínas e poli-aminoácidos; polissacarídeos como, por exemplo, celulose, amido, alginato, quitosana, xantana e carragena; e os poli-oxoésteres, como os poli-ácidos hidroxialcanóicos e poli-ácido maleico.⁴⁶ Destes, a quitina destaca-se por sua abundância e biodisponibilidade, sendo uma alternativa em potencial para a preparação de suportes biodegradáveis para a imobilização de enzimas.⁴⁷

1.5.1. Quitina e quitosana

A quitina, também denominada de 2-(acetamido)-2-desoxi-D-glicose, é o segundo biopolímero mais abundante encontrado na natureza. Ela apresenta uma estrutura semicristalina formada por uma rede de fibras altamente organizadas, sendo, portanto, responsável pela resistência e rigidez nos organismos em que está presente.⁴⁸

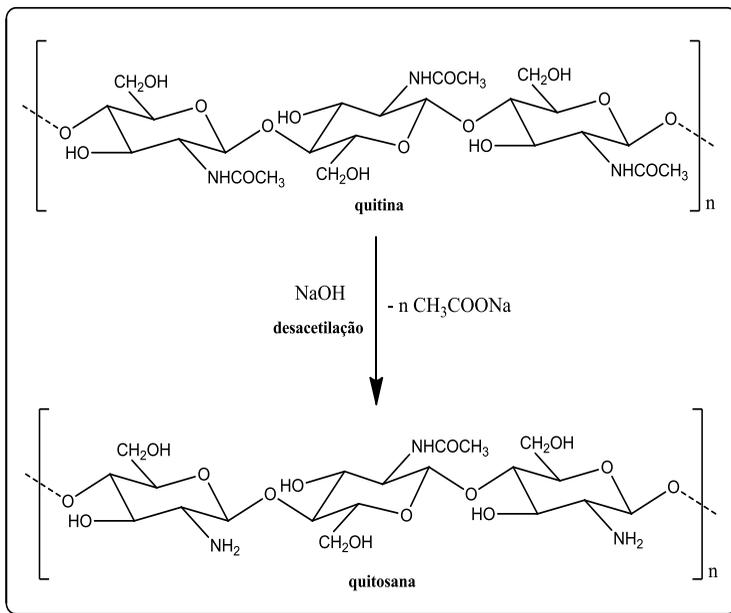
A quitina pode ser obtida a partir de diferentes fontes, sendo o exoesqueleto de artrópodes (insetos, crustáceos e aracnídeos) e moluscos a principal fonte de obtenção deste biopolímero. Além disso, diversos micro-organismos são capazes de produzir a quitina, como algumas espécies de fungos e leveduras. As conchas de crustáceos, como caranguejos e camarões (**Figura 5**), são as principais e mais importantes fontes de quitina devido à facilidade de obtenção, já que são descartadas pela indústria pesqueira e de frutos do mar.⁴⁸

Figura 5. Principais fontes de quitina.⁴⁹



A conversão dos grupos acetamido em grupos amino caracteriza o processo de desacetilação da quitina (**Esquema 4**). Quando pelo menos 50% da cadeia polimérica da quitina encontra-se desacetilada esta passa a ser denominada de quitosana.⁵⁰ A quitina, portanto, é a precursora da quitosana.

Esquema 4. Obtenção da quitosana a partir de processo de desacetilação da quitina. (adaptado das ref. 51 e 52)



A quitosana é um copolímero formado por unidades de 2-desoxi-N-acetil-D-glucosamina e 2-desoxi-D-glucosamina unidas por ligações glicosídicas β -1 \rightarrow 4.⁵³ Os principais fatores que afetam o grau de desacetilação (GD) e, conseqüentemente, as características da quitosana obtida são temperatura e tempo de reação, concentração da solução do álcali, razão quitina/álcali, tamanho das partículas da quitina e presença de agentes que evitam adespolicização.^{51,52}

A quitosana possui propriedades químicas e biológicas distintas, pois apresenta grupos amina e hidroxilas reativos capazes de serem submetidos às modificações químicas. É solúvel em meio aquoso ácido, pH inferiores à 6,2, sendo os ácidos acético, fórmico e cítrico os mais usados na solubilização do biopolímero. Quando dissolvida, possui carga positiva sobre os grupos amina (grupos $-\text{NH}_3^+$), o que facilita a sua solvatação em água.^{54,55}

Além disso, a quitosana é capaz de aderir-se às superfícies carregadas negativamente, podendo agregar-se a compostos

polianiónicos e a íons metálicos. Desta forma, tanto a solubilidade em soluções ácidas quanto a agregação com poliânions atribuem propriedades e aplicações únicas à quitosana.^{54,55}

No que se refere às suas propriedades físico-químicas, este biopolímero pode variar em distribuição de massa molar, conteúdo de impurezas e em grau de desacetilação de 50 a 95%, dependendo da fonte e do método de preparação. O GD é uma propriedade química muito importante da quitosana, sendo um parâmetro que expressa o conteúdo médio de resíduos acetilados presentes nas cadeias desse biopolímero. Esse parâmetro é capaz de influenciar as características químicas, físicas e biológicas do biopolímero. Do ponto de vista químico, o GD da quitosana exerce influência sobre algumas de suas propriedades, tais como hidrofobicidade, capacidade de reticulação na presença de determinados agentes reticulantes, solubilidade e viscosidade de suas soluções.^{55,56}

Ao longo das últimas décadas, a quitosana tem exibido potencial para diversas aplicações na medicina, cosméticos, agricultura, tratamento de água, engenharia de tecidos e sistema de liberação controlada de drogas, entre outras, sendo utilizada na forma de filmes, géis, esfera, micro/nanopartículas e membranas, pois combina propriedades como a bioatividade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade, hidrofiliabilidade, atividade antifúngica, antiúlcera, antiácida, antimicrobiana, antibacteriana e é totalmente absorvível pelo organismo.⁵⁷⁻⁶¹

Umavezqueaquitosana,apresentaalta densidade de grupos amina em sua estrutura, torna-se um sistema importante para a adsorção e imobilização de enzimas, sendo que estas podem ser imobilizadas *via* adsorção ou reticulaçãoquímica.^{60,61}

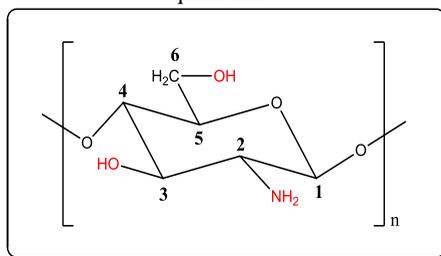
1.6. Quitosana: reatividade e reações de reticulação

A quitosana possui uma cadeia constituída por sítios reativos bastante versáteis para modificações químicas, o que a insere em um grupo de biomoléculas com diversas aplicações nos mais variados ramos da ciência, uma vez que os seus derivados apresentam aplicações biotecnológicas, biomédicas e farmacêuticas.⁶¹

A versatilidade química da quitosana resulta, principalmente, da presença dos grupos amino em sua estrutura, os quais oferecem muitas possibilidades de modificações, tais como, *N*-acetilação, *N*-alquilação, *N*-carboxilação, *N*-sulfonação e formação de bases de Schiff (iminas) com aldeídos e cetonas.⁵⁶

Apesar da maioria das modificações químicas da quitosana ocorrer em seus grupos amino, as hidroxilas em C-3 e C-6 das unidades estruturais do biopolímero também são susceptíveis a reações (**Figura 6**). As modificações químicas nos grupos hidroxilas ocorrem preferencialmente naqueles posicionados em C-6, uma vez que os localizados em C-3 são menos reativos e mais impedidos estericamente. Ao considerar apenas as unidades glucosamina da quitosana, a ordem decrescente de reatividade química é C-2>C-6>C-3 referindo-se, respectivamente, aos carbonos onde estão ligados os grupos amino, hidroxilas primário e secundário. Nesse último centro, há necessidade de um forte agente de desprotonação para torná-lo pré-disponível a reações subsequentes.⁵⁶

Figura 6. Principais grupos reativos presentes no anel glucosâmido da quitosana.⁵⁶



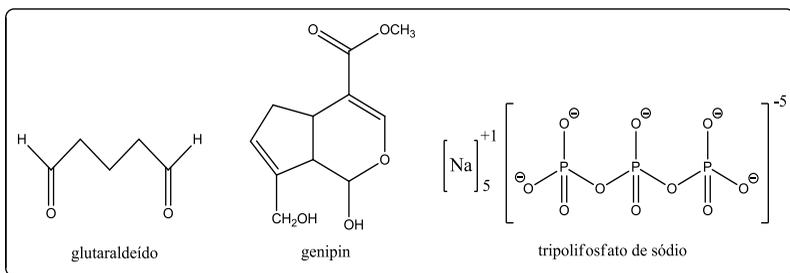
Dessa forma, a estrutura da quitosana pode ser manipulada e modificada por meio da inserção de novos grupos funcionais, conferindo aos seus derivados as características desejadas para as aplicações de interesse. O tipo de reação mais comumente empregado para promover modificações químicas na quitosana são as reações dereticulação.⁶¹

As reações de reticulação têm como objetivo a união das cadeias poliméricas da quitosana ou, ainda, a união de suas cadeias com as de

outros polímeros, resultando na formação de cadeias poliméricas híbridas. Este procedimento visa promover uma série de modificações das propriedades do biopolímero, tais como, aumento da estabilidade química e térmica, maior rigidez estrutural, permeabilidade, cor, melhor eficiência em quelação e capacidade de imobilização proteica e celular.^{62,63}

No caso da quitosana, um agente reticulante deve ser um reagente que apresente funções químicas aptas a interagir com grupamentos amino, hidroxilas ou com ambos os grupos presentes na estrutura do biopolímero. Os agentes reticulantes mais conhecidos e empregados na reticulação da quitosana são o glutaraldeído (1,5-pentanodial), o genipin, e o tripolifosfato de sódio (TPP), cujas estruturas químicas são mostradas na **Figura 7**.⁶⁴⁻⁶⁶

Figura 7. Principais agentes reticulantes empregados na reticulação da quitosana. (adaptado das ref. 64-66)



Assim, a quitosana tem atraído grande interesse por ser uma ótima opção de suporte para a imobilização de enzimas, principalmente por ser barato, biodegradável, não tóxico, fisiologicamente inerte e biocompatível, oferecendo inúmeras aplicações na biocatálise.⁴⁴

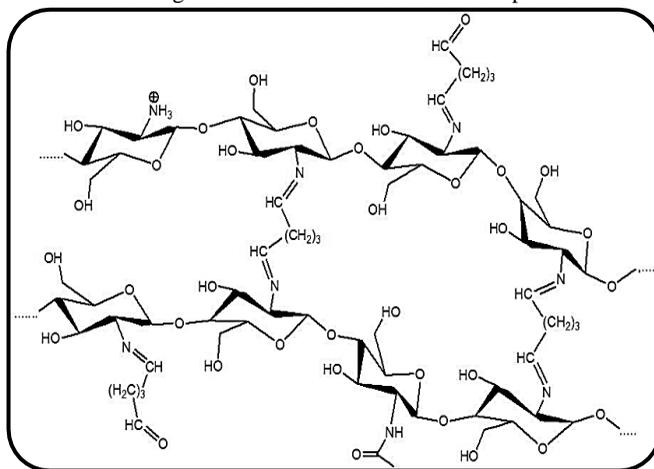
1.6.1. Reticulação da quitosana com glutaraldeído

O glutaraldeído (1,5-pentanodial) é um agente reticulante bastante empregado em reações de reticulação, especialmente para processos visando à imobilização de proteínas e enzimas. Ele é um

agente bifuncional capaz de reagir com os grupamentos amino presentes na cadeia polimérica da quitosana para a formação de ligações imina.⁶⁷ Nesse caso, a reação que ocorre entre os grupos amino e a carbonila aldeídica é uma condensação, caracterizada por uma adição nucleofílica seguida de eliminação de água. O par de elétrons não ligante no nitrogênio da amina ataca o carbono da carbonila, resultando na formação de uma ligação dupla entre o carbono do aldeído e o nitrogênio da quitosana.^{68,69}

Por ser um agente bifuncional, uma única molécula de glutaraldeído pode ligar-se a duas unidades poliméricas de quitosana ou não, resultando em estruturas análogas à mostrada na **Figura 8**.

Figura 8. Representação esquemática da quitosana reticulada com glutaraldeído, destacando a possibilidade de ocorrer ou não a formação de ligação simultânea de uma única molécula do agente reticulante com duas cadeias poliméricas.⁷⁰

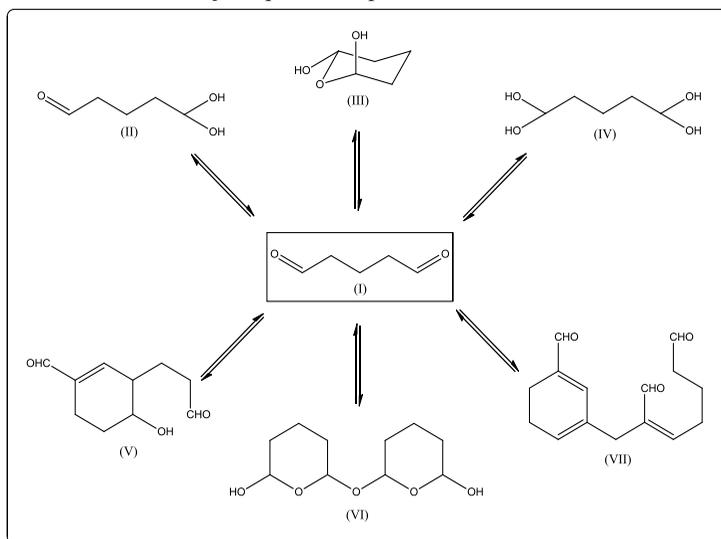


Mesmo havendo a possibilidade de ambas as carbonilas do glutaraldeído interagirem com o biopolímero, uma delas pode ficar livre e disponível para ligar-se covalentemente aos resíduos de aminoácidos das cadeias laterais de enzimas, tais como as lipases. Estudos envolvendo a imobilização de enzimas através da prévia reticulação de quitosana com glutaraldeído tem despertado o interesse de pesquisadores há décadas e, por isso, inúmeros trabalhos nas áreas farmacológica, médica e biotecnológica já foram reportados

naliteratura.^{71,72}

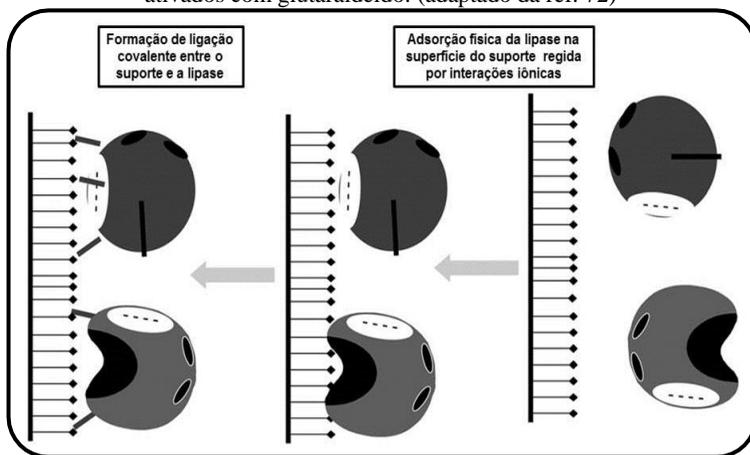
Apesar de sua grande aplicabilidade, não há um consenso com relação ao mecanismo de reação entre o glutaraldeído com proteínas, quitosana ou outros polímeros contendo grupamentos amino. Isso se deve, principalmente, pela coexistência de diversas formas em equilíbrio assumidas pelas moléculas de glutaraldeído em solução, conforme pode ser observado no **Esquema 5**.⁷¹⁻⁷³

Esquema 5. Representação das diversas formas em equilíbrio do glutaraldeído em solução aquosa. (adaptado das ref. 71-73)



Dessa forma, dependendo das condições experimentais (pH, força iônica, tipo de enzima e de suporte) a imobilização das lipases em suportes reticulados com glutaraldeído pode seguir diferentes mecanismos. De modo geral, levando-se em conta as conformações possíveis das lipases (aberta ou fechada), as mesmas podem se ligar de forma covalente aos sítios ativos no suporte ou aderir-se por meio de interações físicas e iônicas, as quais tendem a ser mais fracas (**Figura9**).⁷²

Figura 9. Representação esquemática da imobilização de lipases em suportes ativados com glutaraldeído. (adaptado da ref. 72)



Portanto, o glutaraldeído continua sendo um dos agentes reticulantes mais versáteis e empregados na ativação de suportes para a imobilização de biocatalisadores, apresentando relevância considerável na biotecnologia e engenharia enzimática.⁷²

1.6.2. Reticulação da quitosana com genipin

O genipin, ou genipina ($C_{11}H_{14}O_5$), é um agente reticulante bifuncional, sendo este isolado a partir de *Genipa americana* (planta da qual se obtém o jenipapo) e *Gardenia jasminoides Ellis* (**Figura 10**). Logo, o genipin pode ser obtido a partir de fonte renovável, sendo um composto de baixa toxicidade e alta biocompatibilidade.^{74,75}

Figura 10. Fontes de obtenção de genipin: (A) *Genipa americana* e (B) *Gardenia jasminoides Ellis*.^{76,77}



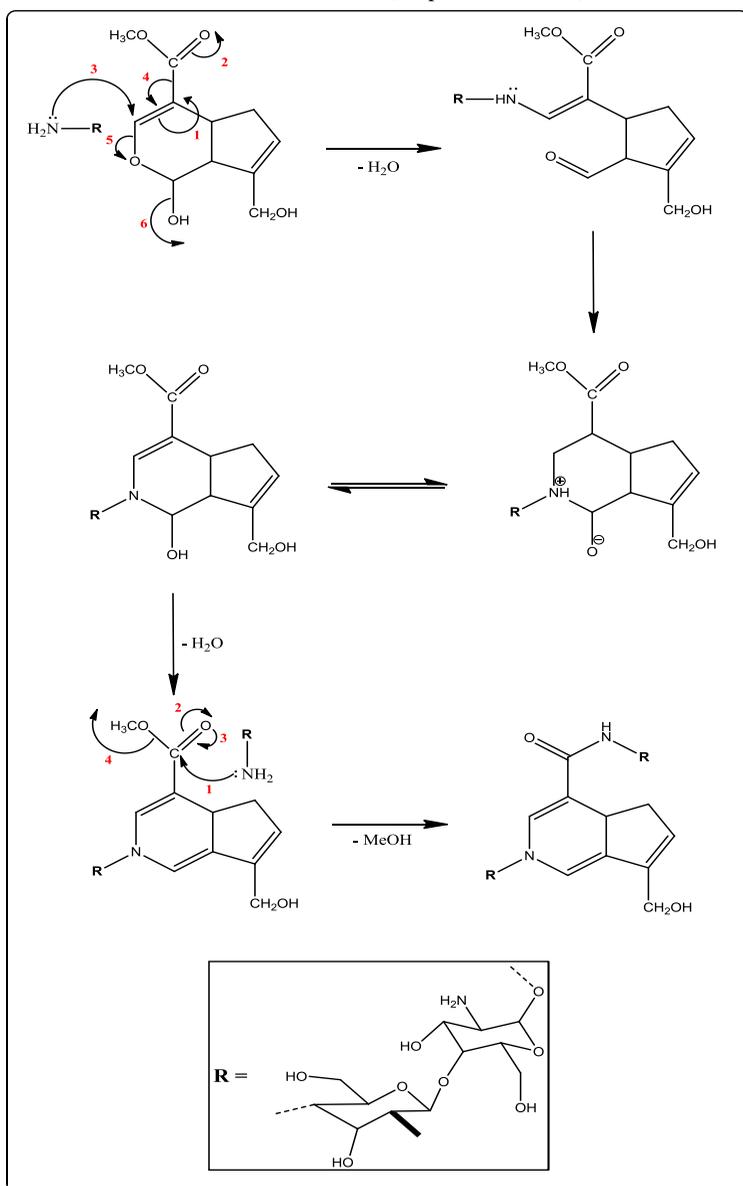
Apesar da grande aplicabilidade e versatilidade do glutaraldeído como agente reticulante, estudos já mostraram que ele pode atuar de forma negativa na imobilização de enzimas em suportes sólidos, pois podem causar a danificação dos seus sítios ativos, comprometendo a atividade catalítica das mesmas.^{74,75}

Uma forma de solucionar esse problema é a substituição de agentes reticulantes conhecidos por apresentarem toxicidade às enzimas por outros, de origem natural, que possam atuar de forma mais eficiente na imobilização sem comprometer o poder catalítico das enzimas. Nesse contexto, o genipin vem ganhando destaque no cenário científico, onde vários estudos envolvendo a imobilização de enzimas com o uso de genipin já foram relatados e confirmaram sua eficiência frente ao glutaraldeído por apresentar maior biocompatibilidade e níveis de citotoxicidade bem menores que este último (quase 10 mil vezes menos tóxico).^{74,75,78}

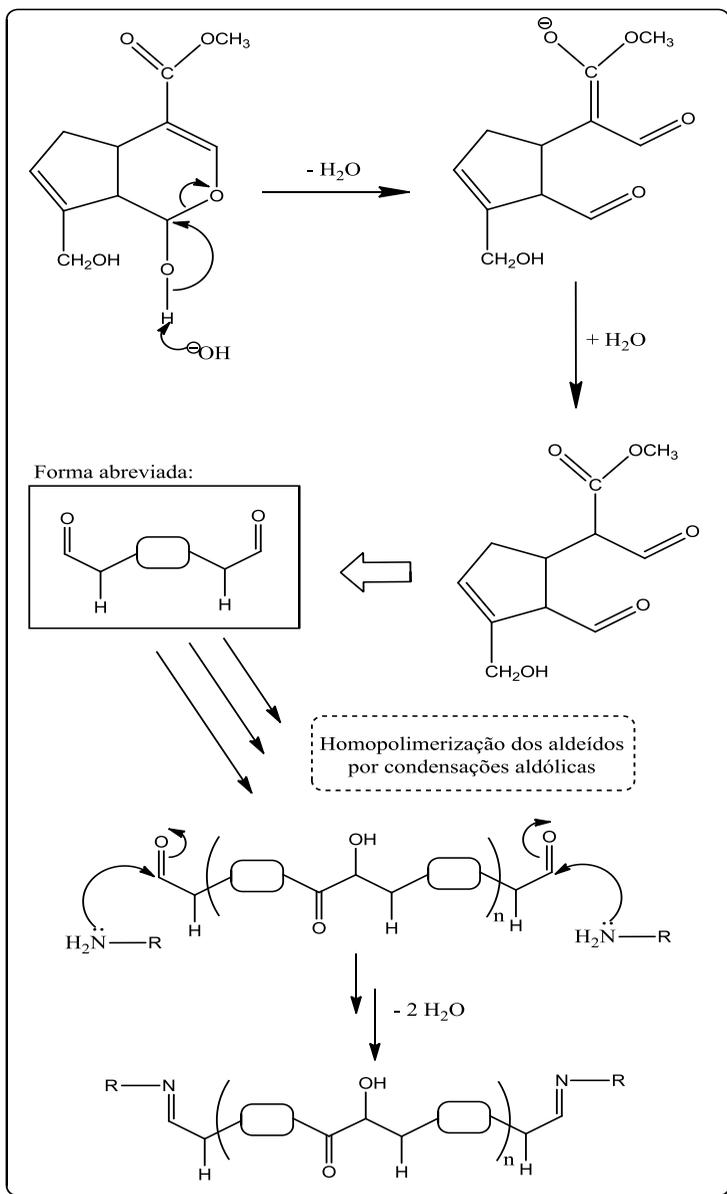
O genipin tem mostrado um grande potencial para atuar como agente reticulante de (bio)polímeros, como a quitosana, e de proteínas, como as enzimas. Além da imobilização de enzimas, o genipin também possui aplicações em outras áreas, como na produção de biomateriais e na medicina. Nesse sentido, o genipin vem sendo empregado em estudos envolvendo a liberação controlada de fármacos, regeneração de cartilagem e fixação e regeneração de tecido epitelial. Além disso, este reagente tem mostrado aplicações em outras áreas, tais como no processamento de couro, fabricação de corantes alimentícios e produção de corantes artificiais para tingimento de tecido e pele.⁷⁵

O genipin reage em condições brandas com aminas primárias, sendo esta interação visivelmente observada pela mudança de coloração bastante evidente e característica. O mecanismo de reticulação das cadeias poliméricas de quitosana pelo genipin é influenciado pelo pH do meio reacional. Assim, dois processos químicos de reticulação podem acontecer, sendo um em meio ácido ou neutro (**Esquema 6**) e outro em meio alcalino (**Esquema 7**), sendo este último caracterizado por uma abertura do anel do genipin seguida de uma homopolimerização.^{56,7}

Esquema 6. Mecanismo da reação de reticulação da quitosana com genipin em meio neutro ou ácido. (adaptado da ref. 56)



Esquema 7. Mecanismo da reação de reticulação da quitosana com genipin em meio básico, sendo o grupo **R** já definido no **Esquema 6**. (adaptado da ref. 56)



De acordo com o **Esquema 6**, a reação entre a quitosana e o genipin, em meio ácido ou neutro, inicia-se com um ataque nucleofílico de um grupo amino da quitosana ao carbono olefínico em C-3, com consequente abertura do anel diidropirânico e geração da função aldeído na molécula. Em seguida, a aldoxila reage com a amina secundária recém-formada para gerar o novo heterociclo. Na etapa final da reticulação, ocorre uma substituição nucleofílica no éster presente no genipin por uma amina primária do biopolímero, com consequente formação e liberação de metanol.⁵⁶

O mecanismo sugerido para a reação de reticulação em meio básico envolve um processo de abertura do anel diidropirânico do genipin promovido pelos íons hidroxilas, conforme mostrado no **Esquema 7**, resultando na formação de grupos aldoxila na molécula que, em seguida, reagem por condensação aldólica. Na etapa final, os grupos aldoxilas terminais do genipin polimerizado participam de uma reação de formação de base de Schiff com as aminas das cadeias da quitosana para promover, de fato, a reticulação.⁵⁶

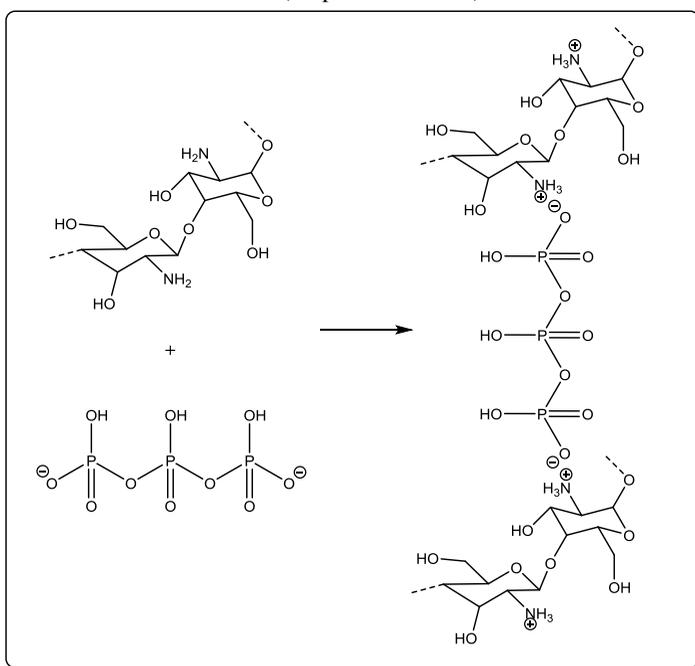
Sendo assim, o genipin apresenta grande potencial para a atuação como agente reticulante da quitosana com o intuito de promover a imobilização de lipases. A grande vantagem em se empregar o genipin reside, principalmente, no fato deste ser menos tóxico para as lipases, além de ser biodegradável e oriundo de fonte natural renovável, atendendo aos princípios da química verde.⁸⁰

1.6.3. Reticulação da quitosana com TPP

Uma característica singular da quitosana reside no fato deste apresentar, dentre todos os biopolímeros naturais, o maior caráter catiônico, uma vez que a maioria dos polissacarídeos animais ou vegetais apresenta caráter neutro (tais como a celulose, a dextrana e amido) ou aniônico (tais como o alginato, a carragenina e a xantana). Além disso, algumas funções particulares da quitosana estão diretamente relacionadas a seu caráter eletrolítico, inclusive certos procedimentos de reticulação de suas cadeias. Levando isso em consideração, a quitosana pode ser reticulada com agentes reticulantes iônicos, como por exemplo, o TPP.^{56,80}

O TPP ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) é apresentado na literatura como um agente reticulante não tóxico e alternativo para a preparação de micropartículas de quitosana. Este, por sua vez, apresenta em sua estrutura grupamentos $-\text{PO}_4^{3-}$ que são facilmente atraídos pelos grupamentos $-\text{NH}_3^+$ contidos na estrutura protonada da quitosana, ocorrendo, assim, uma aproximação dos dois compostos através de uma reticulação iônica, conforme pode ser observada no **Esquema 8**.^{81,82}

Esquema 8. Representação esquemática da reticulação iônica da quitosana com TPP. (adaptado da ref. 82)



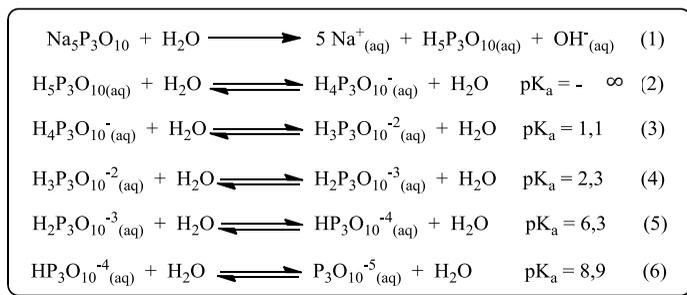
Microesferas de quitosana reticuladas com TPP já foram usadas como suportes para a imobilização de albumina bovina (BSA), lipases e citocromo C (proteína associada à membrana interna da mitocôndria). Nestes estudos, as concentrações do agente reticulante e da quitosana, além da faixa de pH escolhida, foram os fatores que tiveram considerável influência no processo de gelificação e na

eficiência de imobilização.^{83,84}

Embora com poucas exceções, grande parte dos estudos envolvendo suportes de quitosana e TPP mostram que, para sistemas com maior concentração de TPP, melhores resultados são observados quanto à eficiência de imobilização, sendo consequência da maior intensidade de interação entre o biopolímero e o agente reticulante. No entanto, não apenas a concentração do agente reticulante tem influência nestes tipos de estudos, mas também a faixa de pH escolhida para promover a reticulação desempenha influência considerável tanto na formação de micropartículas mais compactas e resistentes, quanto na eficiência na imobilização de proteínas e enzimas.^{85,86}

Dessa forma, as interações iônicas podem ser controladas pela densidade de cargas do TPP e da quitosana, a qual é dependente do pH da solução. Dessa forma, o TPP pode se dissociar em água para gerar íons OH⁻ e trifosfóricos (P₃O₁₀⁵⁻), conforme descrito nas equações de dissociação (**Esquema 9**).⁸³

Esquema 9. Equações de dissociação do TPP e seus respectivos valores de pK_a.⁸³



Portanto, a imobilização em suportes sólidos, como os descritos neste trabalho, pode aumentar a estabilidade da lipase para atuar em meio orgânico. Assim, preservar a atividade catalítica de lipases é uma tarefa muito importante, uma vez que grande parte dos processos envolvendo biocatalisadores ocorre em meio orgânico.¹⁸

Recentemente, o uso de LIs em biocatálise tem sido bastante explorado e utilizado com sucesso em diversas reações catalisadas por enzimas e micro-organismos, sendo uma alternativa promissora na substituição de solventes orgânicos tóxicos e voláteis.⁸⁷

1.7. Uso de solventes orgânicos e líquidos iônicos em biocatálise

Os sistemas aquosos são ideais para as enzimas porque a água é o solvente primordial na natureza e, como tal, deixa a enzima em sua conformação mais ativa para ser utilizada na catálise de reações químicas. No entanto, grande parte dos processos envolvendo a síntese de compostos orgânicos são aquo-restritos e, portanto, necessitam de solventes orgânicos para facilitar a solubilização dos substratos e aumentar a estabilidade térmica das enzimas.⁸⁷

Ademais, o meio orgânico também pode acarretar na diminuição da atividade catalítica da enzima devido a fatores físicos, químicos e biológicos, desestabilizando-a e comprometendo sua eficiência. Portanto, a influência de solventes orgânicos deve ser cuidadosamente analisada durante a seleção das melhores condições reacionais para um processo sintético catalisado por enzimas.⁸⁷

As lipases, de modo geral, apresentam grande estabilidade em sistemas não aquosos, correspondendo a uma das classes de enzimas mais resistentes às interferências de solventes orgânicos. Isso se justifica, em grande parte, pelo fato de que os substratos aos quais as lipases apresentam especificidade são bastante solúveis em meio orgânico. Da mesma forma, as reações catalisadas por lipases, tais como a esterificação e a transesterificação, são fortemente favorecidas em meio orgânico e, portanto, necessitam da presença de solventes orgânicos para que ocorram de forma eficiente.⁸⁸

A atuação das lipases em solventes orgânicos tem sido largamente descrita na literatura, uma vez que as aplicações de enzimas em escala industrial requerem que estes biocatalisadores atuem de forma eficiente em meio orgânico. As lipases de *Bacillus spp.*, por exemplo, são bastante estáveis em solventes orgânicos hidrofóbicos, em que um aumento na atividade catalítica foi observado na presença de 10-50% (v/v) de alcanos de cadeia curta, benzeno e tolueno.⁴³

Além disso, foi reportado também que fungos da espécie *Fusarium heterosporum* produzem uma lipase com alta estabilidade em solventes orgânicos.⁴² Algumas lipases foram reportadas como sendo altamente estáveis na presença de altas concentrações de

solventes orgânicos tóxicos, como por exemplo, a lipase purificada de *P. aeruginosa* LST-03, que se manteve com elevada atividade catalítica em *n*-decano, *n*-octano, DMSO e DMF.⁸⁹

Na última década foi reportado um grande número de lipases tolerantes a solventes orgânicos, principalmente as dos gêneros *Pseudomonas spp.* e *Bacillus spp.*, lipases de *Burkholderia cepacia* e as produzidas a partir de micro-organismos presentes em certas espécies de bactérias termófilas, fungos e fermentos.⁸⁹

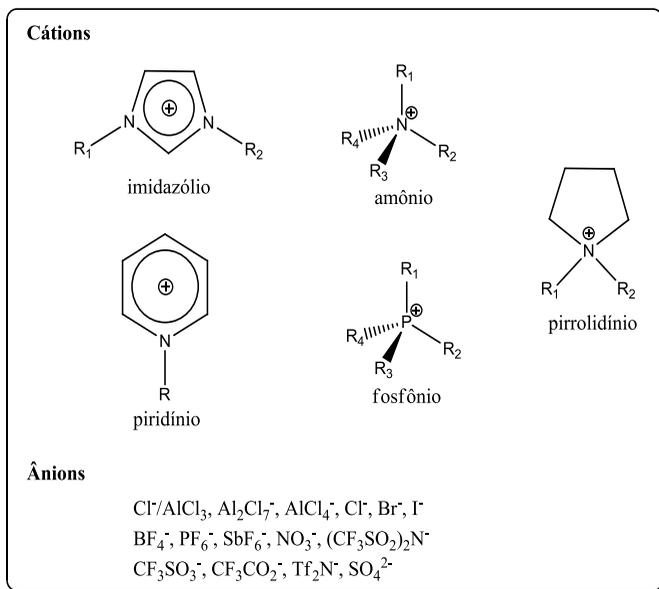
No entanto, apesar de um grande número de lipases serem ativas em solventes orgânicos, há solventes que tendem a desestabilizar e, por conseguinte, desnaturar a enzima. Tal efeito é observado, em grande parte, para solventes de média a alta polaridade, os quais são capazes de interagir com a camada de água na superfície da enzima, alterando sua conformação e inativando-a.^{10,18} Além disso, nas últimas décadas pesquisadores do mundo inteiro têm optado por rotas sintéticas que requerem cada vez menos o uso de solventes orgânicos, principalmente os que apresentam toxicidade elevada (como os VOCs, do inglês *Volatile Organic Compounds*), atendendo aos princípios da química verde no que se refere à geração de menos resíduos e à prática de rotas sintéticas mais sustentáveis.⁹⁰

Nesse contexto, os pesquisadores têm se dedicado à busca de solventes alternativos e mais verdes para substituir os convencionais, reduzindo, assim, a quantidade de resíduos e os impactos ambientais e à saúde. Os meios reacionais desenvolvidos atualmente incluem o uso de água, fluídos supercríticos (água ou CO₂), hidrocarbonetos perfluorados e líquidos iônicos. O uso de líquidos iônicos como aditivos aos solventes orgânicos ou, ainda, a completa substituição destes últimos por líquidos iônicos tem sido alvo de pesquisa de inúmeros grupos de pesquisa.⁹⁰⁻⁹²

Os líquidos iônicos (LIs) são substâncias totalmente compostas por íons e, em sua grande maioria, líquidas à temperatura ambiente. Estes compostos apresentam grande interesse por se configurarem como solventes mais verdes, além de serem menos voláteis (apresentam baixa pressão de vapor) que a maioria dos solventes orgânicos convencionais, e apresentam elevada estabilidade térmica, polaridade e viscosidade. A **Figura 11** mostra alguns exemplos de

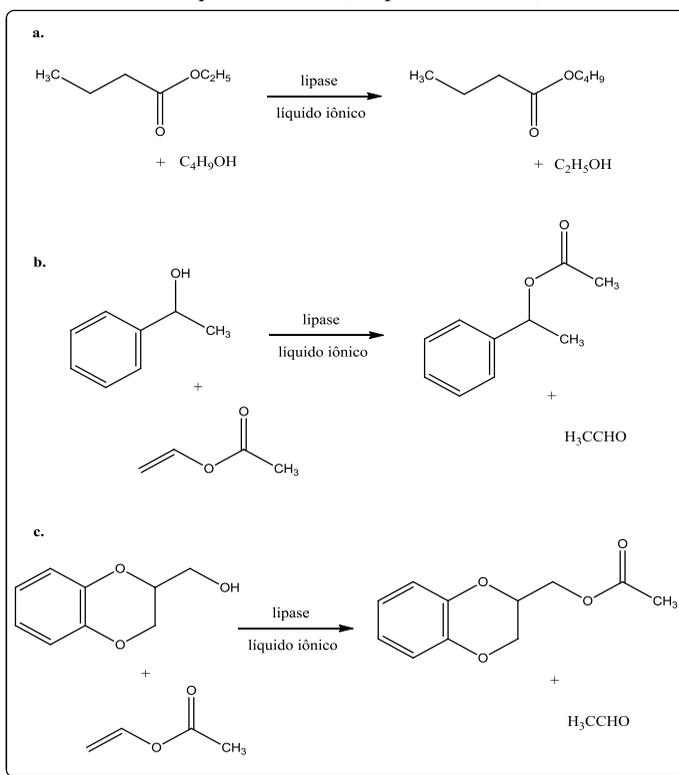
cátions e ânions mais comumente empregados na síntese de LIs. As propriedades físicas e químicas dos LIs podem variar tanto quanto as possíveis combinações entre cátions e ânions.^{7,93}

Figura 11. Exemplos de cátions e ânions formadores de líquidos iônicos.
(adaptado da ref. 7)

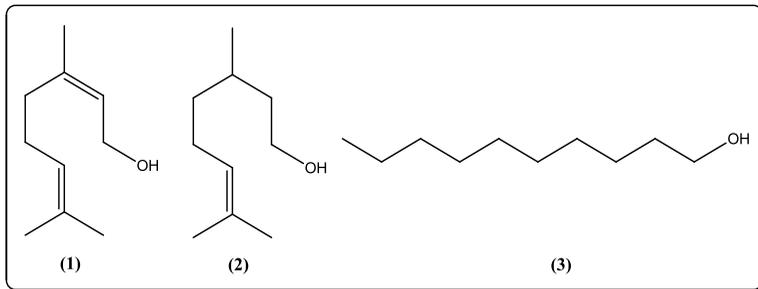


O emprego de LIs em reações biocatalisadas por lipases já é bastante relatado na literatura. Lipases de *Candida antarctica* do tipo B (CALB) e de *Pseudomonas cepacia* foram empregadas na síntese de ésteres empregando LIs derivados de 1-butil-3-metilimidazólio e 1-butilpiridínio em combinação com os ânions complexos $[\text{BF}_4^-]$, $[\text{PF}_6^-]$ e $[\text{TfO}^-]$ (**Esquema 10**). As conversões observadas nas reações empregando os LIs foram próximas ou até mesmo superiores às obtidas nas reações empregando apenas o álcool *tert*-butílico, 1,4-dioxano ou tolueno como solventes.⁹²

Esquema 10. Reações de transesterificação catalisada por lipases empregando líquidos iônicos. (adaptado da ref. 92)



Neste contexto, nesse trabalho foram preparadas microesferas de quitosana reticuladas com três agentes reticulantes diferentes (glutaraldeído, genipin, TPP, e uma combinação entre genipin e TPP) para serem empregadas como suportes para a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* (LPS-SD), a qual foi utilizada na catálise de reações de transesterificação de álcoois terpênicos, tais como o geraniol (1) e citronelol (2), e de um álcool de cadeia linear, o *n*-decanol (3) (Figura 12).

Figura 12. Estruturas dos álcoois terpênicos **1** e **2** e do *n*-decanol (**3**).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Preparar microesferas de quitosana a partir de diferentes processos de reticulação com a finalidade de imobilizar a lipase de *Burkholderia cepacia* (LPS-SD) e avaliar a sua atividade catalítica frente à preparação de ésteres terpênicos, derivados do geraniol e citronelol, e do *n*-decanol.

2.2. Objetivos específicos

- Preparar microesferas de quitosana e realizar a reticulação das mesmas com três agentes reticulantes diferentes (glutaraldeído, TPP, genipin e uma combinação entre TPP e genipin), resultando em quatro suportes poliméricos com diferentes aspectos morfológicos e estruturais.
- Caracterizar os suportes poliméricos preparados (qts/glu, qts/gen, qts/TPP e qts/gen/TPP) pelas técnicas de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (SEM) e ensaio de ninidrina.
- Imobilizar a lipase de LPS-SD nos suportes preparados.
- Avaliar o teor de lipase imobilizada por massa de suporte através de técnicas espectroscópicas na região do ultravioleta-visível, além de quantificar a atividade hidrolítica da lipase imobilizada por um método colorimétrico.
- Avaliar a influência da massa de LPS-SD imobilizada em suportes de qts/glu e qts/gen na obtenção do acetato de geranoíla (5).
- Avaliar a atividade das lipases imobilizadas como biocatalisador nas reações de transesterificação de álcoois terpênicos, como o citronelol e geraniol com acetato de vinila em meio orgânico.
- Avaliar a influência do tempo de imobilização e do tempo e temperatura de reação na preparação dos acetatos de geranoíla (5) e citroneíla (8) utilizando a LPS-SD imobilizada nos suportes de qts/glu e qts/gen.

- Avaliar a influência da razão molar entre o geraniol (**1**) e o acetato de vinila na preparação do éster **5** empregando a LPS-SD imobilizada no suporte de qts/gen/TPP.
- Avaliar a influência de solventes orgânicos empregados nas reações de preparação de **5** e **8** utilizando a LPS-SD imobilizada nos suportes de qts/glu, qts/gen e qts/gen/TPP.
- Avaliar a influência de líquidos iônicos derivados do 1-butil-3-metilimidazólio [BMIM][X] (onde X= [BF₄⁻] ou [PF₆⁻]) na preparação de **5** e **8**, utilizando a LPS-SD imobilizada nos suportes de qts/glu, qts/gen e qts/TPP.
- Avaliar a influência de outros doadores acila (acetatos de vinila e de isopropenila, propionato de vinila e laurato de vinila) na preparação dos ésteres acetato de geranoíla (**5**), propionato de geranoíla (**10**) e laurato de geranoíla (**15**) empregando a LPS-SD imobilizada no suporte qts/TPP.
- Avaliar o reuso dos suportes qts/glu contendo a LPS-SD imobilizada ao longo de 120 dias na preparação de **5**.
- Avaliar o reuso do suporte qts/gen contendo a LPS-SD imobilizada em ciclos reacionais sucessivos na preparação do acetato de *n*-decila (**16**).
- Comparar os suportes qts/TPP e qts/gen/TPP contendo a LPS-SD imobilizada, sob as mesmas condições experimentais, na preparação de **5** e **8**, assim como o reuso dos mesmos em ciclos reacionais posteriores.
- Purificar e caracterizar, por técnicas espectroscópicas de infravermelho e de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (¹H-NMR e ¹³C-NMR), os ésteres preparados.
- Comparar estes dados com os publicados na literatura.

3. METODOLOGIA

3.1. Reagentes, solventes e lipase

Os reagentes, solventes e lipase utilizados neste trabalho foram:

- **Sigma-Aldrich:** quitosana de massa molar média $122,3 \text{ kg.mol}^{-1}$ (99%), ninidrina (99%), geraniol (99%), citronelol (95%), tampão tris (99,9%), *n*-decanol (99%), propionato de vinila (98%), palmitato de *p*-nitrofenila (99,9%), laurato de vinila (99%), tetrametilsilano(TMS), tripolifosfato de sódio (99%);
- **Synth:** *n*-hexano (98,5%), diclorometano (99,5%), metanol (99,5%);
- **Fluka:** tetrafluoroborato de 1-butil-3-metil-imidazólio ([BMIM][BF₄], 97%), hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil-imidazólio ([BMIM][PF₆], 96%), acetato de isopropenila (99%);
- **Chemis:** éter etílico(98%);
- **Neon:** álcool *t*-butílico (99,8%), diclorometano (99,9%);
- **Vetec:** ácido acético (99,7%), glutaraldeído (50%), hidróxido de sódio (P.A.) acetato de vinila (99%), acetonitrila (99,5%), clorofórmio (99,8%), etanol (99,5%), *t*-butanol (99%), 1,4-dioxano (99%), álcool *n*-butílico(99%), *n*-heptano (99%), éter etílico (99,5%), éter *t*-butilmetílico (MTBE, 99,5%), éter de petróleo (PA), ciclohexano(PA), éter diisopropílico (99%), sulfato de magnésio anidro (98%), fosfato de sódio monobásico monohidratado (PA), hidróxido de sódio (PA), sílica gel 60 (0,04-0,063 mm, 230-400 mesh) para cromatografia em coluna, sílica gel 60 G para cromatografia em camada delgada (700- 800mesh);
- **Tedia:** éter *t*-butil metílico (MTBE,99,9%);
- **Reagen:** acetato de etila (PA), carbonato de sódio anidro (PA)
- **Grupo Química:** acetato de etila (99%);
- **Quimex:** acetone (99,5%);
- **Merck:** etilenoglicol (99%);
- **F. Maia:** tolueno (PA), tetrahidrofurano (99%);

- **Nuclear:** sulfato de magnésio anidro, álcool isopropílico (PA), álcool *n*-propílico (PA);
- **Cromato Produtos Químicos Ltda:** etanol absoluto (99,5%);
- **Cambridge Isotope Laboratories:** clorofórmio deuterado (CDCl₃, 99,8%);
- **Challenge Bioproducts:** Genipin (98%);
- **Amano:** lipase de *Burkholderia cepacia* (LPS-SD) com atividade de 23.000 U/g*.

* 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.⁹⁴

3.2. Equipamentos

3.2.1. Laboratório de Biocatálise (301/306)

- Agitadores magnéticos(Dist);
- Rota evaporador (Buchi461);
- Balanças analíticas (Marte A500);
- Banho tipo Dubnoff (TecnalTE0532);
- Espectrofotômetro UV-VIS (8452A Diode Array Spectrophotometer);
- Centrífuga ExcelsaBaby.

3.2.2. Grupo de Estudos em Materiais Poliméricos – POLIMAT (202/204)

- Gotejador automático (RogerR-100EC);
- Agitador mecânico QuimisQ250M2;
- Espectrômetro de infravermelho com modo FTIR/ATR (IRPrestige-21 Shimadzu);

3.2.3. Central de Análises no Departamento de Química – UFSC

- Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (400 MHz) e de carbono (100 MHz) foram obtidos no espectrômetro Varian, utilizando como referência interna o tetrametilsilano (TMS, δ=0,00). Como solvente foi utilizado o clorofórmio

deuterado (CDCl₃).

3.2.4. Outros Laboratórios

- Microscópio eletrônico de varredura com fonte de emissão de campo (MEV-FEG) marca JEOL modelo JSM-7001F, acoplado a um analisador de energia dispersiva de raios-X (EDS), localizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (UnB), coordenado pela Prof^ª. Dr^ª. Sônia Nair Bábó.
- Microscópio eletrônico de varredura de bancada, com feixe de voltagem de 15 kV, da marca HITACHI modelo TM3030, acoplado a um analisador de energia dispersiva de raios-X (EDS), localizado no Núcleo de Pesquisa em Materiais Cerâmicos e Compósitos do Departamento de Engenharia Mecânica (CERMAT) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), coordenado pelo Prof. Dr. Márcio Celso Fredel.

3.3. Procedimentos experimentais

3.3.1. Determinação do grau de desacetilação da quitosana

O grau de desacetilação da quitosana (GD) foi determinado por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) pelo método descrito por Brugnerotto et al.⁹⁵

O espectro de infravermelho das amostras sólidas de quitosana (100 mg), na faixa de 4000-400 cm⁻¹, foi realizado em pastilhas de KBr com resolução de 4 cm⁻¹, através da acumulação de 32escaneamentos.

O grau de desacetilação da quitosana foi determinado pela **Equação 1**;

$$GD(\%) = 100 - \frac{(A_{1320}/A_{1420})^{-0,3822}}{0,03133} \quad \text{Eq. 1}$$

onde GD (%) é o grau de desacetilação, expresso em porcentagem, e A_{1320} e A_{1420} são as intensidades de absorção no infravermelho em 1320 e 1420 cm^{-1} , respectivamente.

3.3.2. Preparação das microesferas de quitosana

As microesferas de quitosana foram preparadas a partir da dissolução de 2 g de quitosana em 100 mL de uma solução aquosa de ácido acético 2% (v/v). A mistura foi mantida sob agitação constante até a completa homogeneização da solução (aproximadamente 24h), resultando em uma solução viscosa com aproximadamente 2% (m/v) de quitosana. Em seguida, a solução foi gotejada lentamente, por meio de um capilar, em uma solução aquosa de NaOH 2,0 mol.L^{-1} , conforme mostra a **Figura 13**.

Figura 13. Sistema utilizado para a preparação das microesferas de quitosana.
(Fonte: o autor)



Através do fenômeno de separação de fases ocorreu a precipitação das microesferas. As microesferas gelificadas foram deixadas em contato com a solução de precipitação por 30 minutos, filtradas, lavadas com água destilada até pH 7 e secas à temperatura ambiente.

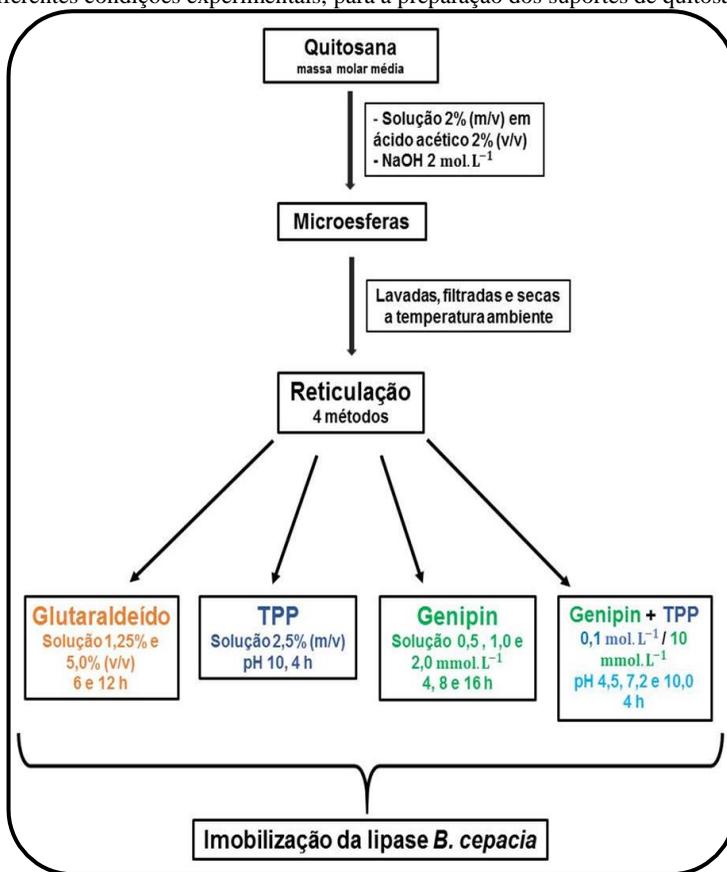
3.3.3. Reticulação das microesferas de quitosana

Neste trabalho, efetuou-se a imobilização da lipase de *B. cepacia* nos suportes poliméricos pelo método da ligação, tanto por ligação

covalente quanto por adsorção física ou iônica da mesma ao suporte.

Dessa forma, as microesferas de quitosana foram reticuladas com soluções aquosas de três diferentes agentes reticulantes (glutaraldeído, TPP, genipin e uma mistura destes dois últimos) em diferentes condições experimentais. Ao todo, foram preparados quatro tipos de suportes à base de quitosana, conforme mostrado no **Esquema 11**. Foram avaliados parâmetros como a concentração do agente reticulante, tempo de reticulação e, em alguns casos, o pH dasolução.

Esquema 11. Fluxograma representativo das reações de reticulação realizadas, sob diferentes condições experimentais, para a preparação dos suportes de quitosana.



3.3.3.1. Reticulação da quitosana com glutaraldeído

As reações de reticulação das microesferas de quitosana com glutaraldeído foram realizadas de acordo com o procedimento descrito por SILVA et al.⁹⁶, com algumas modificações.

Prepararam-se duas soluções aquosas de glutaraldeído, sendo uma de concentração 1,25% (v/v) e a outra de 5,0% (v/v). Em seguida, em um béquer, adicionou-se cerca de 100 mg de microesferas secas de quitosana a 25 mL de cada uma das soluções de glutaraldeído e deixou-se o sistema sob agitação constante, à 35°C, por 6h. O mesmo procedimento foi repetido utilizando-se um tempo de reação de 12h.

Ao final da reação, e após filtração, o excesso de glutaraldeído foi lavado com água destilada e as microesferas foram secas à temperatura ambiente.

3.3.3.2. Reticulação da quitosana com TPP

A reticulação iônica da quitosana com TPP foi realizada seguindo-se o procedimento descrito por LEE et al.⁹⁷, com algumas modificações.

Uma solução de quitosana 2% (m/v) foi preparada conforme descrito no item **3.3.2**. Posteriormente, esta solução foi gotejada lentamente (gotejador Roger R-100EC), por meio de um capilar, em uma solução aquosa 2,5% (m/v) de TPP preparada em tampão Tris 0,1 mol.L⁻¹ (pH 10,0).

Observou-se a formação de microesferas, as quais foram deixadas em contato com a solução de precipitação por 4 h e, posteriormente, foram filtradas, lavadas com água destilada e deixadas secar a temperatura ambiente.

3.3.3.3. Reticulação da quitosana com genipin

Para a reação de reticulação da quitosana com o genipin realizou-se um procedimento análogo ao da reticulação da quitosana com glutaraldeído, descrito no item **3.3.3.1**, porém, com algumas modificações, de acordo com FERNANDES et al.⁹⁸. Desse modo,

foram preparadas soluções de genipin de concentrações $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ e $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, sem controle de pH. Além disso, foram avaliados três tempos de reticulação (4, 8 e 16 h). Ao final da reação, o excesso de genipin foi lavado com água destilada e as microesferas foram secas à temperatura ambiente.

3.3.3.4. Reticulação da quitosana com genipin e TPP

Para a reação de reticulação simultânea entre a quitosana com o genipin e o TPP, procedeu-se da seguinte forma.

Uma solução de quitosana 2% (m/v) foi preparada conforme descrito no item 3.3.2. Posteriormente, esta solução foi gotejada lentamente em uma solução aquosa contendo os agentes reticulantes genipin e TPP nas concentrações 10 mmol.L^{-1} e $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, respectivamente. Neste procedimento, avaliou-se a influência do pH da solução de reticulação, empregando soluções-tampão com os pHs ajustados em 4,5, 7,2 e 10,0 (tampão acetato, fosfato e Tris, respectivamente).

Observou-se a formação de microesferas, as quais foram deixadas em contato com a solução de precipitação por 4 h e, posteriormente, foram filtradas, lavadas com água destilada e deixadas secar a temperatura ambiente.

3.3.4. Imobilização das lipases nos suportes poliméricos

Inicialmente, 40 mg da lipase LPS-SD foram dissolvidas em 10 mL de solução tampão pH 7,2 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$) e, então, deixados em contato por um período de 24-72h, sem agitação e na geladeira, com cerca de 300 mg de microesferas de quitosana reticuladas. Neste procedimento inicial, foi avaliado o tempo ótimo de imobilização por meio da determinação da atividade hidrolítica do sobrenadante da solução de lipase em contato com as microesferas de quitosana reticuladas, conforme procedimento descrito a seguir.

A determinação da atividade hidrolítica da LPS-SD livre e imobilizadas nos diferentes suportes foi realizada por meio de um método colorimétrico baseado na hidrólise do palmitato de *p*-

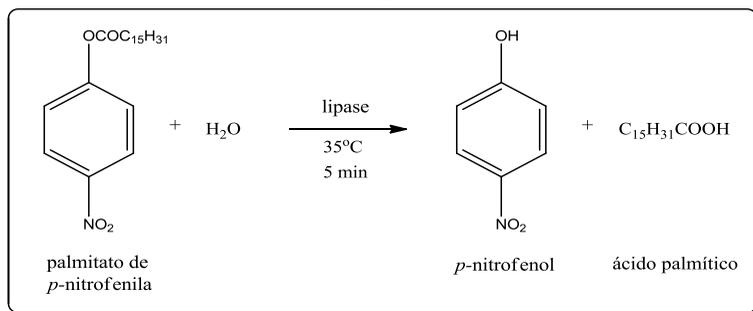
nitrofenila (*p*-NPP), cujo procedimento será descrito a seguir.⁹⁹

Primeiramente, o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) do *p*-nitrofenol foi determinado por meio de uma curva de calibração construída para diferentes soluções padrão de *p*-nitrofenol ($1,05 \cdot 10^{-4}$ - $5,43 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹). A curva obtida encontra-se no **Anexo I** (p. 122), sendo o ϵ calculado igual a $1,57 \cdot 10^4$ L.mol⁻¹.cm⁻¹.

Para os estudos de atividade enzimática, preparou-se uma solução etanólica de *p*-NPP de concentração 0,5% (m/v). Na reação de hidrólise do *p*-NPP foram colocados cerca de 30 mg do suporte contendo a lipase imobilizada (ou uma determinada massa de lipase não imobilizada, em estudos utilizando a lipase na forma livre) em um tubo de ensaio. Foram adicionados 2 mL de solução tampão pH 7,2 (NaH₂PO₄/NaOH) e 250 μ L da solução de *p*-NPP. Em seguida, a mistura reacional foi colocada em banho termostatizado (35°C) por cerca de 5 minutos. A reação foi interrompida pela adição de cerca de 6 mL de uma solução de Na₂CO₃ 0,5 mol.L⁻¹. O volume final de reação variou entre 8 e 9 mL. Amistura foi filtrada e 1,0 mL do filtrado foi diluído com água destilada num balão volumétrico de 50 mL. Esta solução foi analisada no espectrofotômetro com comprimento de onda fixado em 402 nm e os cálculos foram realizados com base na equação de reta obtida ($y = 1,57 \cdot 10^4 x + 0,02138$).

Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida pela quantidade de enzima que catalisa a produção de 1 μ mol de *p*-nitrofenol por minuto sob as condições reacionais (**Esquema 12**).

Esquema 12. Representação da reação de hidrólise do *p*-NPP catalisada por lipase. (adaptado da ref. 96)



Os estudos de estabilidade térmica da LPS-SD livre e imobilizada foram realizados por meio da incubação da mesma, por 1h, em solução tampão fosfato de sódio (pH 7,2) nas temperaturas de 25 (temperatura ambiente), 30, 40, 50, 60, 80 e 100 °C. Nos estudos de estabilidade ao pH, a LPS-SD livre e imobilizada foi mantida a temperatura ambiente em contato com soluções tampão acetato, fosfato ou Tris (pH 3-13) por um tempo de incubação de 24 h. Em seguida, a atividade hidrolítica da mesma foi determinada conforme o procedimento descrito anteriormente.

A determinação do teor de proteínas presente nos suportes poliméricos antes e após a imobilização da LPS-SD foi realizada pelo método de Bradford, cujo procedimento está bem reportado na literatura.¹⁰⁰ Este método colorimétrico baseia-se na adição de etanol, ácido fosfórico e um corante chamado Azul Brilhante de Coomassie G-250 (ou reagente de Bradford) à solução contendo proteínas, cuja coloração azul absorve fortemente em 595 nm. Neste trabalho, o reagente de Bradford utilizado foi preparado e gentilmente doado pela doutoranda Cristiana Costa Bretanha do Laboratório de Separação por Membranas (Labsem) do Departamento de Engenharia Química da UFSC.

Para o ensaio de quantificação de proteínas presente nos suportes de quitosana antes e após a imobilização, procedeu-se da seguinte maneira: 300 mg de suporte contendo ou não foram macerados e colocados em tubos de ensaio. Em seguida, adicionou-se 40 µL de solução de NaOH 1,0 mol.L⁻¹ aos tubos contendo as amostras e deixou-se homogeneizar no vórtex. Após, adicionou-se 2,5 mL do reagente de Bradford e a mistura resultante foi homogeneizada no vórtex novamente. A solução foi reservada por 5 minutos e, posteriormente, fez-se a leitura em 595 nm, zerando com um branco preparado nas mesmas condições da amostra.

O cálculo foi realizado seguindo o protocolo estabelecido, o qual emprega a seguinte equação:

$$Abs . FCM . 100 = \frac{mg}{mL} \text{ de proteína} \quad \text{Eq. 2}$$

onde *Abs* é a absorbância da amostra e *FCM* é o fator de calibração

média determinado através da curva de calibração com albumina bovina, a qual se encontra no **Anexo II** (p. 122) (FCM calculado foi 0,080289). O teste foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

3.3.5. Caracterização dos suportes poliméricos

Os suportes poliméricos preparados foram caracterizados utilizando duas técnicas, a microscopia eletrônica de varredura (SEM) e a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Além disso, os suportes reticulados ou não também foram caracterizados pelo método colorimétrico conhecido como ensaio deninidrina.

3.3.5.1. Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

A morfologia interna e externa, porosidade e tamanho médio das microesferas de quitosana pura e reticuladas foram determinados empregando-se a técnica de microscopia eletrônica de varredura (SEM). As amostras foram colocadas em estaves, recobertas com ouro e micrografadas. O diâmetro médio de cada amostra foi obtido a partir da média de uma população de microesferas (5-10), utilizando-se medidas dos diâmetros dos eixos vertical e horizontal com o software *Image J*.

3.3.5.2. Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

As amostras de microesferas de quitosana pura e reticuladas com os diferentes agentes reticulantes foram pulverizadas para a análise. O espectro de infravermelho foi obtido na região de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$, utilizando-se pastilhas de KBr, com resolução de 4 cm^{-1} e pela média de 32 escaneamentos.

3.3.5.3. Determinação de grupamentos amino livres na quitosana reticulada

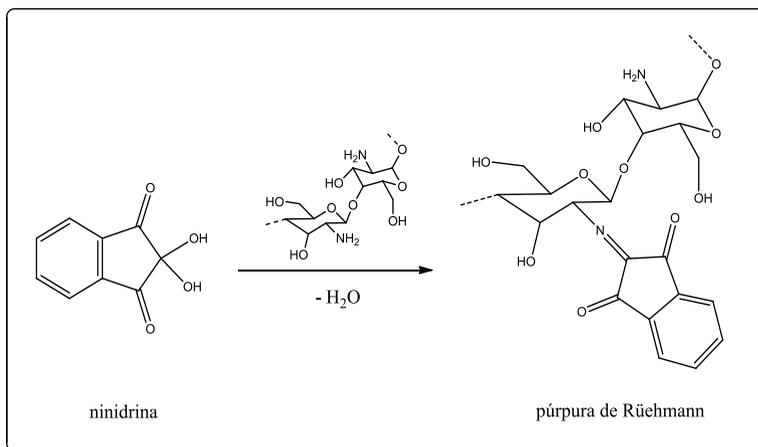
A determinação dos grupamentos amino livres na superfície das microesferas de quitosana após as reações de reticulação para a preparação dos diferentes suportes foi determinada por ensaio com ninidrina, um método colorimétrico, segundo a metodologia descrita a seguir.¹⁰¹

A solução de ninidrina foi preparada da seguinte maneira:

- Solução A: 1 mL de ácido acético, 10 mL de uma solução aquosa de NaOH $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ e 0,04 g de SnCl_2 foram misturados a 25 mL de água destilada e mantida sob agitação mecânica por 30 minutos.
- Solução B: 1 g de ninidrina ($\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4$) foi adicionado a 25 mL de etileno glicol e mantida sob agitação até sua completa solubilização (aproximadamente 30 minutos). Em seguida, as soluções A e B foram misturadas e mantidas sob agitação constante durante 45 minutos e, em seguida, a mistura resultante foi armazenada em um frasco âmbar na geladeira.

Para o ensaio, pesou-se cerca de 1,5 mg de microesferas de quitosana reticuladas e não-reticuladas previamente trituradas. Estas foram colocadas em tubos de ensaio com 8 mL da solução de ninidrina (pH 3,5), à uma temperatura de 100°C , durante um período de 20 minutos. O produto foi filtrado e resfriado até temperatura ambiente e, posteriormente, analisado por espectroscopia na região do ultravioleta-visível em 570 nm. O **Esquema 13** mostra a reação entre a ninidrina e a quitosana para a formação de um composto colorido, conhecido como púrpura de Rühmann.

Esquema 13. Representação da reação de ninidrina com quitosana.
(adaptado da ref. 101)



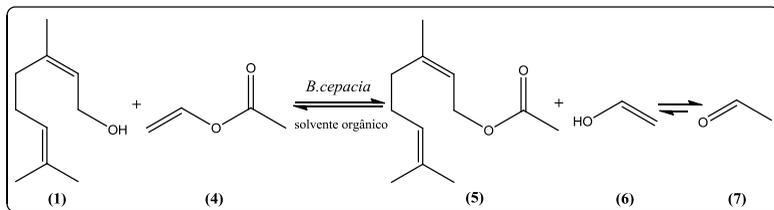
A porcentagem de grupamentos amino livres das microsferas de quitosana após a reticulação foi determinado por meio da **Equação 3**;

$$\% \text{ grupamentos amina livre} = \frac{A_{\text{reticulada}}}{A_{\text{não-reticulada}}} \cdot 100 \quad \text{Eq. 3}$$

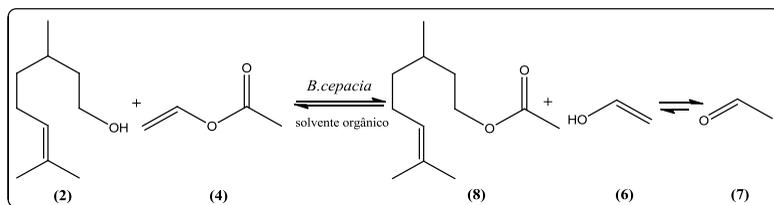
onde $A_{\text{reticulada}}$ é a absorvância de grupamentos amino livres de partículas reticuladas e $A_{\text{não-reticulada}}$ é a absorvância de grupamentos amino livres de partículas não reticuladas. A análise foi realizada em triplicata.

3.3.6. Aplicação da LPS-SD imobilizada em reações de transesterificação

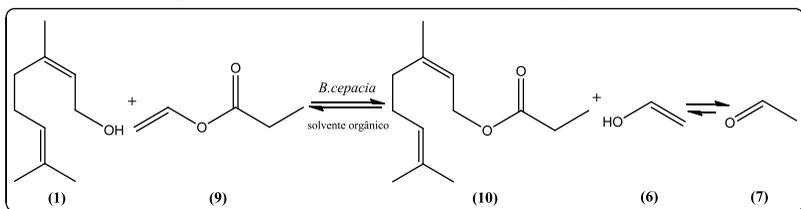
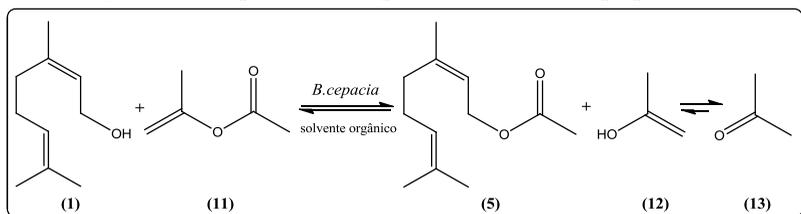
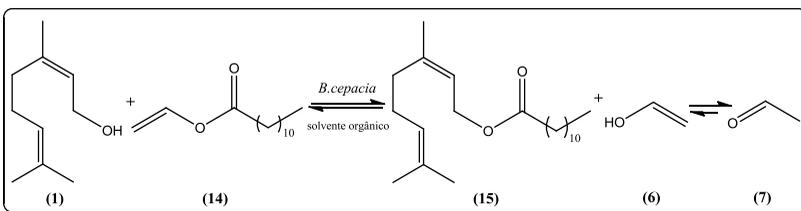
Para as reações de transesterificação de **1** foram adicionados, em um erlenmeyer de 125 mL, **1** (1,7 mL, 10 mmol), acetato de vinila (**4**) (0,90 mL, 10 mmol), solvente orgânico (25 mL) e a lipase LPS-SD imobilizada nos diferentes suportes poliméricos (300 mg). A mistura reacional foi mantida a 35 °C, de 24 a 72 h, em banho termostatizado (**Esquema14**).

Esquema 14. Preparação do acetato de geranoíla (**5**).

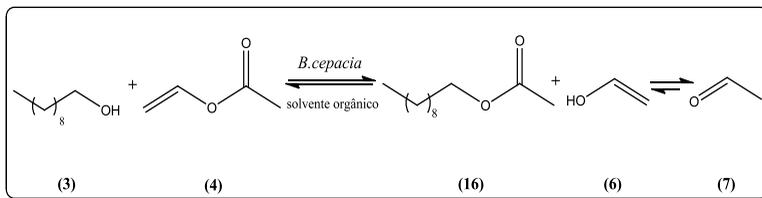
Para as reações de transesterificação de **2** foram adicionados, em um erlenmeyer de 125 mL, **2** (1,8 mL, 10 mmol), **4** (0,90 mL, 10 mmol), solvente orgânico (25 mL) e a lipase LPS-SD imobilizada nos diferentes suportes poliméricos (300 mg). A mistura reacional foi mantida a 35 °C, por 24 a 72 h, em banho termostatizado (**Esquema 15**).

Esquema 15. Preparação do acetato de citroneíla (**8**).

Nos estudos de influência de diferentes doadores acila, foram realizadas reações de transesterificação de **1** com os seguintes ésteres (além do acetato de vinila): propionato de vinila (**9**), acetato de isopropenila (**11**) e laurato de vinila (**14**). Nestes estudos, procedeu-se de forma análoga às reações de transesterificação descritas anteriormente, porém utilizando dois equivalentes molares do doador acila (éster) para cada mol de **1**. Os **Esquemas 16, 17 e 18** mostram as reações de transesterificação de **1** para a preparação dos ésteres **5, 10 e 15**.

Esquema 16. Preparação do propionato de geranóla (**10**).**Esquema 17.** Preparação de **5** a partir do acetato de isoprenila (**11**).**Esquema 18.** Preparação do laurato de geranóla (**15**).

Nos estudos referentes ao reuso da lipase LPS-SD imobilizada no suporte qts/genipin, empregou-se *n*-decanol (**3**) como álcool de partida, cuja cadeia apresenta mesmo número de átomos de carbono que **1**. As reações seguiram um procedimento análogo às reações mencionadas anteriormente, usando a razão molar de 1:2. O **Esquema 19**, mostra a reação de transesterificação de **3** com o éster **4** para a preparação de **16**.

Esquema 19. Preparação do acetato de *n*-decila (16).

As reações foram acompanhadas, periodicamente, por cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando-se como eluente *n*-hexano:acetato de etila (7:3 v/v ou 8:2 v/v, dependendo da polaridade do éster preparado). Os R_f 's para os compostos foram calculados.

Após o término das reações, a mistura reacional foi transferida para um balão de fundo redondo e o suporte lavado com solvente por diversas vezes, até que todos os reagentes e produtos fossem removidos do mesmo (acompanhado por CCD).

Cessada as lavagens, os suportes com a lipase LPS-SD foram, então, guardados em pequenos frascos fechados contendo solvente orgânico e estocados em geladeira (10-15 °C). O solvente contendo o produto foi evaporado no rotaevaporador e, em seguida, estes foram quantificados por análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio ($^1\text{H-NMR}$) por comparação da área dos hidrogênios metilênicos vizinhos do álcool com os do éster (4,1 e 4,6 ppm, respectivamente, para **1** e o éster **5** e 3,9 e 4,1 ppm, respectivamente, para **2** e o éster **8**).

Outro método empregado para verificar a formação dos ésteres foi através da análise por espectroscopia de infravermelho (FTIR). As amostras foram colocadas entre duas placas de silício e analisadas no espectrofotômetro de infravermelho na região de 4000 – 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e acúmulo de 32 escaneamentos.

Os parâmetros estudados durante as sínteses dos ésteres catalisadas pela lipase LPS-SD imobilizada nos diferentes suportes de quitosana foram: influência da temperatura e tempo de reação, além do uso de diversos solventes orgânicos e líquidos iônicos. Os solventes orgânicos empregados foram *n*-heptano, *n*-hexano, éter de petróleo,

ciclohexano, tolueno, clorofórmio, éter diisopropílico, álcool *terc*-butílico, MTBE, diclorometano, éter etílico, acetato de etila, THF, álcool propílico, álcool isopropílico, acetona, etanol, acetonitrila, metanol e 1,4-dioxano. Os líquidos iônicos empregados foram os derivados do cátion 1-butil-3-metilimidazólio com os ânions tetrafluoroborato ([BMIM][BF₄]) e hexafluorofosfato ([BMIM][PF₆]).

Além disso, avaliou-se a influência da massa de lipase imobilizada nos suportes, razão molar entre o álcool de partida e o agente acilante. O reuso e o tempo de estocagem dos suportes contendo a lipase imobilizada também foram estudados.

A purificação dos acetatos de geranoíla e citroneíla foi realizada por cromatografia em coluna empregando sílica gel (40-63 μm) como fase fixa. O empacotamento da coluna foi preparado em um bquer, suspendendo 15 g de sílica gel em uma mistura composta por *n*-hexano e acetato de etila nas proporções de 7:3 (v/v) ou 8:2 (v/v) para a purificação dos acetatos de geranoíla (R_f = 0,68) e citroneíla (R_f = 0,76), respectivamente, até a obtenção de uma pasta fluida, homogênea e sem bolhas de ar incluídas. Pequenas frações de amostras (~10 mL) foram coletadas em tubos de ensaio, e analisadas por CCD, utilizando iodo molecular como revelador químico.

4. Resultados e discussão

Neste trabalho foram preparados diferentes suportes poliméricos à base de quitosana para serem empregados na imobilização da lipase LPS-SD. Em seguida, estes sistemas foram utilizados para catalisar reações de transesterificação do geraniol, citrionelol e do *n*-decanol com diversos agentes acilantes.

Os resultados obtidos estão apresentados e discutidos separadamente em três capítulos. Dessa forma, os capítulos I, II e III tratam dos seguintes tópicos:

- **Capítulo I:** Preparação e caracterização dos suportes de quitosana preparados por meio da reticulação com os três agentes reticulantes, sendo eles o glutaraldeído, genipin, TPP e uma combinação entre estes dois últimos.
- **Capítulo II:** Imobilização da LPS-SD nos suportes de quitosana.
- **Capítulo III:** Aplicação da LPS-SD nas formas livre e imobilizada em reações de transesterificação de três álcoois, sendo dois terpênicos (geraniol e citrionelol) e o *n*-decanol, com os acetatos de vinila e de isopropenila, propionato e laurato de vinila.

Capítulo I

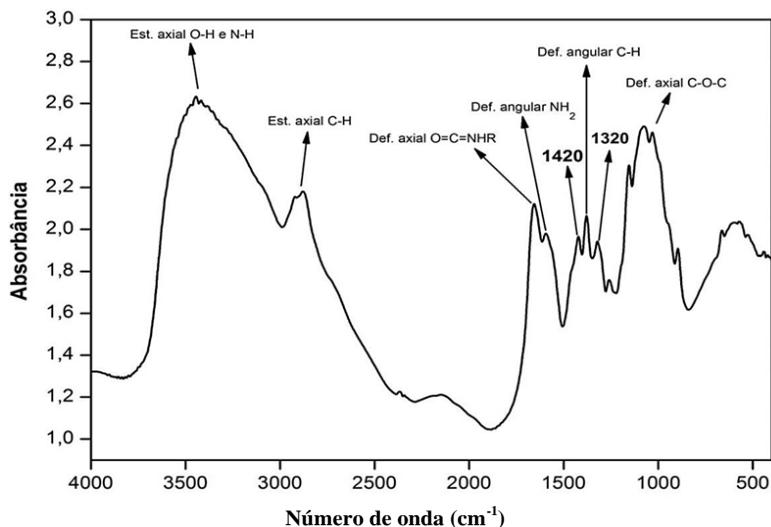
Preparação e caracterização dos suportes à base de quitosana

Neste capítulo, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos referentes à preparação e caracterização dos quatro suportes de quitosana preparados conforme o **Esquema 11**, apresentado no item **3.3.3** (p. 41). A caracterização dos diferentes suportes foi realizada por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (SEM) e ensaios de ninidrina.

4.1. Determinação do grau de desacetilação da quitosana

O grau médio de desacetilação (GD) é definido como o número de grupos amino em relação aos grupos amida da cadeia polimérica, podendo ser determinado por várias técnicas, tais como a espectroscopia na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e titulação condutimétrica.¹⁰² Neste trabalho, a determinação do GD da quitosana foi feita por FTIR segundo o método descrito por Brugnerotto et al.⁹⁵. O espectro de FTIR obtido encontra-se na **Figura 14**.

Figura 14. Espectro de FTIR das microesferas de quitosana não reticuladas.



Através da análise do espectro de FTIR das microesferas de quitosana, pode-se observar a presença de bandas características, as quais estão apresentadas na **Tabela 3**.

Tabela 3: Principais bandas de absorção no FTIR da quitosana.^{103,104}

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3330	Deformação axial de O-H e N-H de NH ₂
2921 e 2877	Deformação axial de C-H de grupos CH ₂ e CH ₃
1656	Deformação axial de grupo amida (RHN-C=O)
1589	Deformação angular de N-H do grupo amina (NH ₂)
1420	Deformação angular de C-H
1379	Deformação angular de C-H de CH ₃
1320	Deformação angular de C-N (amina primária)
1083, 1070 e 1026	Deformação axial de C-O-C de grupo éter

No espectro apresentado é possível observar bandas de absorção de grupos amida e amina. Dessa forma, a quitosana de massa molar média (122,3 kg. mol⁻¹) empregada neste trabalho, não se encontra totalmente desacetilada. Através da **Eq. 1** (p. 39), é possível calcular o GD da quitosana a qual correlaciona as absorbâncias das bandas em 1420 e 1320 cm⁻¹.

$$GD (\%) = 100 - \frac{(1,94034/1,96273) - 0,3822}{0,03133} = 80,65 \cong 81\%$$

Portanto, o grau de desacetilação da quitosana é de aproximadamente, 81%.

4.2. Espectroscopia de FTIR dos suportes à base de quitosana

No total, foram preparados quatro suportes de quitosana para a imobilização da LPS-SD. A principal distinção entre cada suporte foi o agente reticulante empregado para promover a reticulação das microesferas de quitosana. Dessa forma, os suportes preparados foram:

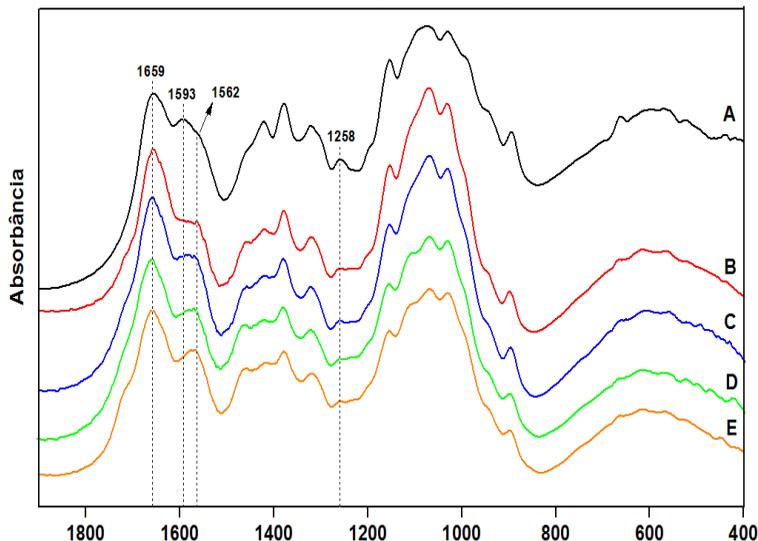
- **Suporte qts/glu:** microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído.
- **Suporte qts/gen:** microesferas de quitosana reticuladas com genipin.
- **Suporte qts/TPP:** microesferas de quitosana reticuladas com TPP.
- **Suporte qts/gen/TPP:** microesferas de quitosana reticuladas simultaneamente com genipin e TPP.

Durante o preparo de cada um destes suportes foram avaliados alguns parâmetros, tais como o tempo, concentração do agente reticulante e/ou o pH da solução, a fim de se determinar as melhores condições experimentais para se obter suportes com características mais adequadas e favoráveis à imobilização da LPS-SD. A verificação e a intensidade das interações biopolímeros-reticulante foram avaliadas por meio da espectroscopia de FTIR.

4.2.1. FTIR do suporte qts/glu

As microesferas de quitosana pura e reticulada com diferentes concentrações de glutaraldeído (1,25 e 5,0% v/v) por 6h e 12h foram analisadas por FTIR. Os espectros de FTIR sobrepostos podem ser observados na **Figura 15**.

Figura 15. Espectros de FTIR das microesferas de quitosana: (A) não reticuladas (B) reticuladas com glutaraldeído 1,25% (v/v) por 6 h e (C) por 12 h e (D) reticuladas com glutaraldeído 5,0% (v/v) por 6 h e (E) por 12 h.



Na **Figura 15** é possível observar a mudança de intensidade de quatro bandas principais que comprovam a ocorrência de interação entre o glutaraldeído e a quitosana e, portanto, caracterizam a formação de uma nova rede polimérica.

A primeira banda observada, em 1258 cm^{-1} , está relacionada aos grupos amino protonados presentes na cadeia da quitosana. A presença desses grupos na quitosana ocorre devido à sua solubilização em soluções com pH inferior a 6,5.¹⁰⁵ O meio ácido, portanto, protona os grupamentos amino presentes na cadeia da quitosana. Conforme pode ser observado na **Figura 15**, esta banda diminuiu de intensidade nos espectros da quitosana reticulada com glutaraldeído. Esta observação é esperada uma vez que as interações com o glutaraldeído ocorrem através das ligações nos grupos amino da quitosana.

A segunda banda é observada em 1562 cm^{-1} , e está relacionada com a presença de grupos etilenos na nova rede polimérica. Esta mesma banda também foi descrita por Bin Li et al.¹⁰⁶, que observou um aumento significativo na intensidade conforme o aumento da concentração de glutaraldeído empregado na reticulação com a

quitosana.

A terceira banda é observada em 1589 cm^{-1} para as microesferas de quitosana não reticuladas e, em menores intensidades, em 1593 cm^{-1} para as microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído. Esta banda se refere à deformação angular da ligação N-H de grupos NH_2 , e espera-se a diminuição de intensidade da mesma para a quitosana reticulada, pois é uma confirmação de que cada vez mais grupos amino interagiram com o glutaraldeído.

A quarta banda, observada em 1659 cm^{-1} , também é um indicativo da formação de ligações químicas entre os grupos amino da quitosana com a(s) carbonila(s) do glutaraldeído. O aumento de intensidade observado em 1659 cm^{-1} está relacionado à formação de ligação C=N (imina) entre a quitosana e o glutaraldeído. A presença desta banda no espectro da quitosana não reticulada, ainda que em menor intensidade, está relacionada ao grupo carbonila do grupo amida, pois a quitosana utilizada apresenta GD de 81%. A carbonila de amida substituída tem absorção no infravermelho na região de 1650 cm^{-1} .¹⁰⁴

Conforme discutido na literatura, observações semelhantes foram descritas. Knaul et al.¹⁰⁶ observaram que filmes de quitosana reticulados com glutaraldeído apresentaram uma banda de forte intensidade em 1664 cm^{-1} , enquanto que Gupta e Jabrail¹⁰⁶ reportaram que microesferas de quitosana reticuladas com este agente reticulante exibiram uma banda característica em 1660 cm^{-1} . Posteriormente, Andriani et al.¹⁰⁷ prepararam nanopartículas de quitosana reticuladas com glutaraldeído que apresentaram absorção em 1627 cm^{-1} , também referente à ligação C=N. Assim, todas estas observações corroboram com a banda observada em 1659 cm^{-1} para as microesferas de quitosana reticuladas com o glutaraldeído em condições diferentes de reação.

Apesar da verificação do aumento de intensidade desta banda nos espectros da quitosana reticulada foi possível observar que, mesmo aumentando a concentração de glutaraldeído em até quatro vezes ou dobrando o tempo de reticulação, a mesma não apresentou um aumento pronunciado. Ao contrário, as **Figuras 15B-E** apresentaram intensidades de absorção semelhantes, permitindo inferir que um

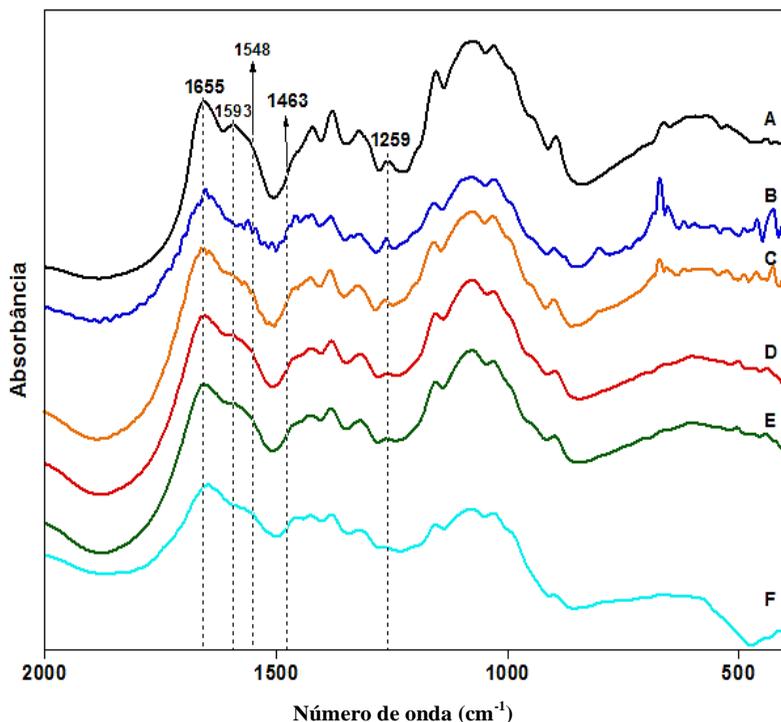
aumento na quantidade do agente reticulante ou no tempo de reticulação, não interferiu significativamente na intensidade da interação entre a quitosana e o glutaraldeído.

Portanto, duas considerações podem ser feitas a partir da análise dos espectros de FTIR para o suporte qts/glu. Primeiramente, houve interação entre a quitosana e o glutaraldeído, a qual foi verificada pela presença de bandas características, como por exemplo, a banda em 1659 cm^{-1} referente à formação de ligação imina (C=N). Segundo, a interação entre a quitosana e o glutaraldeído foi pouco dependente da concentração do agente reticulante empregado e do tempo de reticulação. Assim, para estudos posteriores envolvendo a imobilização da LPS-SD foram escolhidas a concentração de 1,25% (v/v) de glutaraldeído e o tempo de reticulação de 6 h.

4.2.2. FTIR do suporte qts/gen

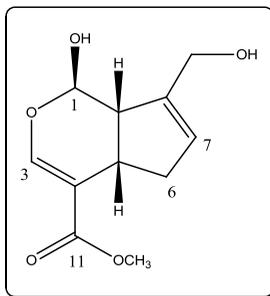
As microesferas de quitosana pura e reticulada com diferentes concentrações de genipin ($0,5$, $1,0$ e $2,0\text{ mmol.L}^{-1}$) por 4, 8 e 16 h foram analisadas por FTIR. Os espectros de FTIR sobrepostos podem ser observados na **Figura 16**.

Figura 16. Espectros de FTIR das microesferas de quitosana: (A) não reticuladas (B) reticuladas com genipin $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ por 16 h (C) 8 h e (D) 4 h e (E) reticuladas por 4h com genipin nas concentrações de $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ e (F) $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$.



A reticulação da quitosana com genipin pode se processar por uma reação rápida na qual ocorre o ataque nucleofílico do grupo amino da quitosana no carbono C-3 olefínico presente na estrutura do genipin (**Figura 17**). Como resultado tem-se a abertura do anel diidropirano do genipin e a formação de uma amina terciária, conforme apresentado no **Esquema 6**, no item 1.6.2 (p. 25).^{56,108,109}

Após esta etapa, a reação que se procede, mais lenta, envolve a formação de um grupo amida através da reação do grupo amino da quitosana com o grupo éster do genipin (carbono C-11). Ao mesmo tempo, pode ocorrer polimerização entre as moléculas de genipin não reticuladas e as já ligadas à quitosana, resultando na reticulação de grupos amino a cadeias copoliméricas de genipin.^{56,108,109}

Figura 17. Estrutura do genipin.

Assim, algumas bandas características e importantes para a confirmação da interação entre a quitosana com genipin foram observadas na **Figura 16**. De forma análoga aos espectros da quitosana reticulada com glutaraldeído, é possível observar uma diminuição nas intensidades das bandas em 1259 e 1593 cm^{-1} , relacionadas aos grupos amino protonados e à deformação angular da ligação N-H de grupos NH_2 , respectivamente. Isto se deve às interações do grupo amino com os grupos funcionais olefínicos e éster do genipin.¹⁰⁹

A presença de um “ombro” por volta de 1548 cm^{-1} , observado nas **Figuras 16B-F**, é referente a banda de amida II, característica da deformação de N-H. A sua presença, ainda que em baixa intensidade, se deve à formação de amidas secundárias como resultado da reação entre o grupo éster e hidroxila do genipin como os grupos amino da quitosana. As baixas intensidades destas bandas podem estar relacionadas às baixas concentrações de genipin empregadas neste estudo.¹⁰⁹

Além disso, a presença da banda por volta de 1463 cm^{-1} nos espectros da quitosana reticulada, de baixa intensidade, pode estar relacionada às deformações vibracionais da ligação C-N, mais numerosa após a reticulação com genipin.¹⁰⁹

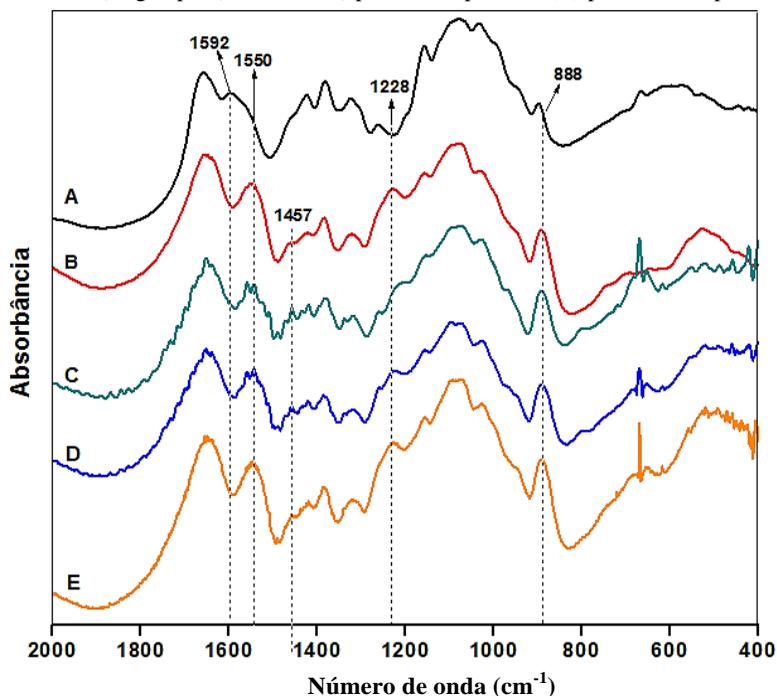
A partir da intensidade das bandas destacadas, pode-se inferir que a concentração de genipin e o tempo de reticulação também foram parâmetros que tiveram pouca influência sobre a intensidade das interações polímero- reticulante, da mesma forma como foi observado para o suporte qts/glu. Portanto, para os estudos envolvendo a imobilização da LPS-SD, optou-se por utilizar um menor tempo de

reticulação (4 h) e a concentração de $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ de genipin.

4.2.3. FTIR dos suportes qts/TPP e qts/gen/TPP

As microesferas de quitosana pura e reticuladas com TPP e com uma combinação entre genipin e TPP em diferentes pH (4,5, 7,2 e 10,0) foram analisadas por FTIR. Os espectros sobrepostos podem ser observados na **Figura 18**.

Figura 18. Espectros de FTIR das microesferas de quitosana: (A) não reticuladas (B) reticuladas com TPP 2,5% (m/v) por 4 h em pH 10 (C) reticuladas com TPP ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) e genipin (10 mmol.L^{-1}) por 4 h em pH 10,0 (D) pH 7,2 e (E) pH 4,5.



O TPP é um agente reticulante muito empregado na reticulação da quitosana. Assim, este agente reticulante foi empregado em dois dos suportes preparados neste trabalho. No suporte qts/gen/TPP, procurou-se combinar a ação de dois agentes reticulantes que agem por mecanismos distintos de reticulação, sendo um por meio de interações

covalente (genipin) e outro por interações iônicas (TPP).

A **Figura 18** mostra os espectros destes dois suportes. Observa-se no espectro das microesferas de quitosana reticuladas com TPP (**Figura 18B**) que a interação deste com os grupos amino protonados da quitosana é confirmada pelo aparecimento da banda em 1550 cm^{-1} . Estas observações também foram relatadas nos estudos de Xu e Du¹¹⁰, na preparação de nanopartículas para a liberação de soro albumina bovina. Laus et al.¹⁰⁸, também obtiveram as mesmas evidências nos seus estudos na preparação de microesferas reticuladas com TPP, para o tratamento de águas contaminadas pela mineração de carvão. A banda em 1228 cm^{-1} está relacionada às vibrações de estiramento do grupo P=O do fosfato.¹⁰⁴

A inserção de genipin para a preparação do suporte qts/gen/TPP teve como principal objetivo propiciar uma maior reticulação da quitosana, ou seja, unir e intensificar a ação reticulante do TPP e do genipin para resultar em uma rede polimérica mais reticulada e propícia para promover a imobilização da LPS-SD. No entanto, a reticulação da quitosana com ambos agentes reticulantes em um mesmo meio reacional pode ocorrer de forma competitiva dependendo do pH da solução. Nesse contexto, Mi et al.¹⁰⁸ sintetizaram microesferas de quitosana reticuladas, simultaneamente, através de interações iônicas e covalentes utilizando o TPP e genipin. Nesse estudo, os autores reportaram que dados de espectroscopia de UV e IR confirmaram a dependência do pH do meio, sendo que a reticulação covalente predominou na faixa de pH de 7,0 a 9,0, enquanto que a reticulação iônica tende a prevalecer na faixa de pH de 1,0 a 5,0.

Nas **Figuras 18C-E**, é possível observar, em grande parte, bandas relacionadas às interações iônicas entre a quitosana e o TPP, como as mencionadas anteriormente em 1550 e 1227 cm^{-1} . Além destas, está presente também a banda em 888 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação P-O-P, também observada no espectro do suporte qts/TPP.¹⁰⁹ Além disso, a banda em 1457 cm^{-1} presente nos espectros do suporte qts/gen/TPP está relacionada às deformações vibracionais de C-N, mais numerosas após a reticulação com genipin.

Nas **Figuras 16B, 16C e 17C-E**, é possível observar uma banda próxima a 700 cm^{-1} que pode estar associada ao estiramento da ligação

CH=CH (C-H fora do plano) devido à presença do genipin nestes suportes. A interação do genipin com a quitosana envolve a abertura do anel diidropirânico, como discutido anteriormente, levando à formação de intermediários e/ou estruturas em que a ligação CH=CH pode ter um estiramento fora do plano.¹⁰³

Quanto ao pH da solução, visualmente não foi possível observar diferenças quanto à intensidade de bandas características de reticulação com o genipin ou com o TPP. Para um resultado mais conclusivo acerca destes resultados, determinou-se o teor de grupamento amino livres através do ensaio com ninidrina, apresentado no **item 3.3.5.3** (p. 47-48).

No entanto, em ambos os suportes observou-se a diminuição ou a completa ausência da banda em 1592 cm^{-1} referente, à deformação da ligação N-H de grupos amino da quitosana, evidenciando a interação deste com o TPP e/ou com o genipin.

A partir das evidências obtidas pelas análises da espectroscopia de infravermelho, pode-se concluir que a reticulação da quitosana ocorreu tanto por interações iônicas quanto covalentes com os agentes reticulantes TPP e genipin.

A seguir, serão apresentados os resultados referentes a microscopia eletrônica de varredura (SEM) das microesferas, bem como a determinação dos grupos NH_2 livres pelo teste de ninidrina.

4.3. Morfologia dos suportes à base de quitosana

No próximo estudo, as microesferas de quitosana pura e reticuladas com os diferentes agentes reticulantes foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM).

Estas análises forneceram informações sobre as características morfológicas das microesferas, tais como a presença ou não de fissuras e poros tanto na superfície quanto no seu interior. Pode-se verificar também certa homogeneidade no tamanho das microesferas formadas, com pequenas variações dependendo do agente reticulante empregado durante a preparação dos suportes.

As imagens obtidas por microscopia eletrônica das microesferas de quitosana pura e reticuladas permitiram a visualização de partículas

densas com formatos esféricos, conforme pode ser visualizado nas **Figuras 19, 20 e 21**.

Figura 19. Imagens de SEM das microesferas de quitosana não reticuladas e reticuladas com diferentes concentrações de glutaraldeído e tempos de reticulação: imagens (A) externa e (B) interna de microesferas não reticuladas (C) microesferas reticuladas com glutaraldeído 1,25% e (D) 5,0% (v/v) por 6 h de reação (E) glutaraldeído 1,25% e (F) 5,0% (v/v) por 12 h de reação.

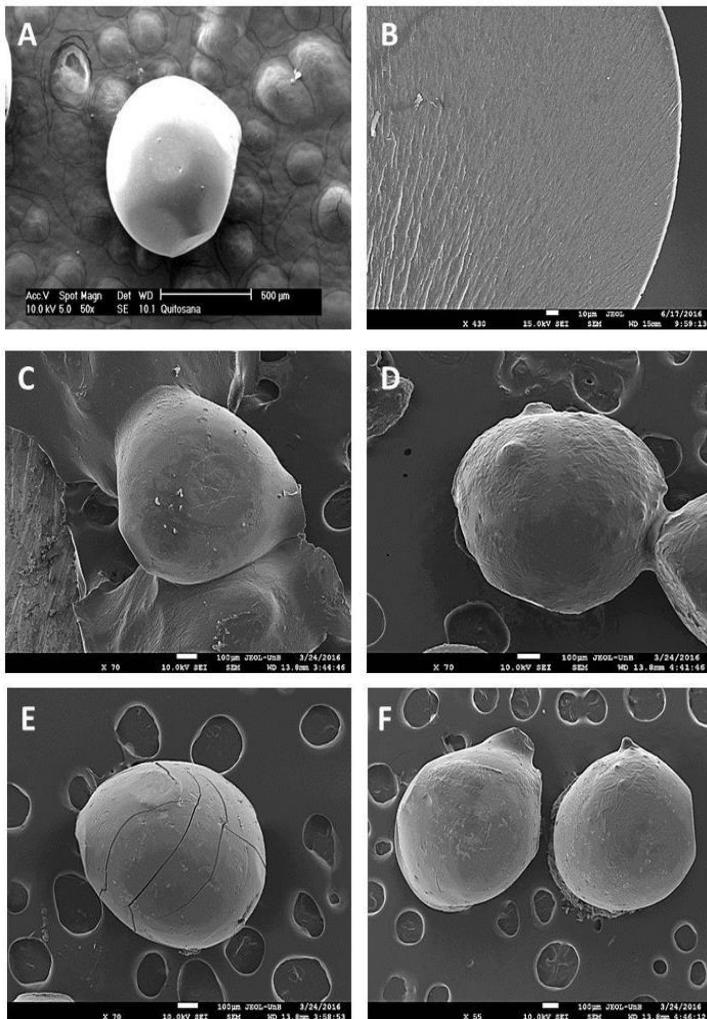


Figura 20. Imagens de SEM das microesferas de quitosana reticuladas com diferentes concentrações de genipin e tempos de reação: (A) e (B) genipin 0,5 mmol.L⁻¹/4 h de reticulação (C) e (D) genipin 1,0 mmol.L⁻¹/4 h de reticulação (E) e (F) genipin 2,0 mmol.L⁻¹/8 h de reticulação (G), (H) e (I) genipin 2,0 mmol.L⁻¹/16 h de reticulação.

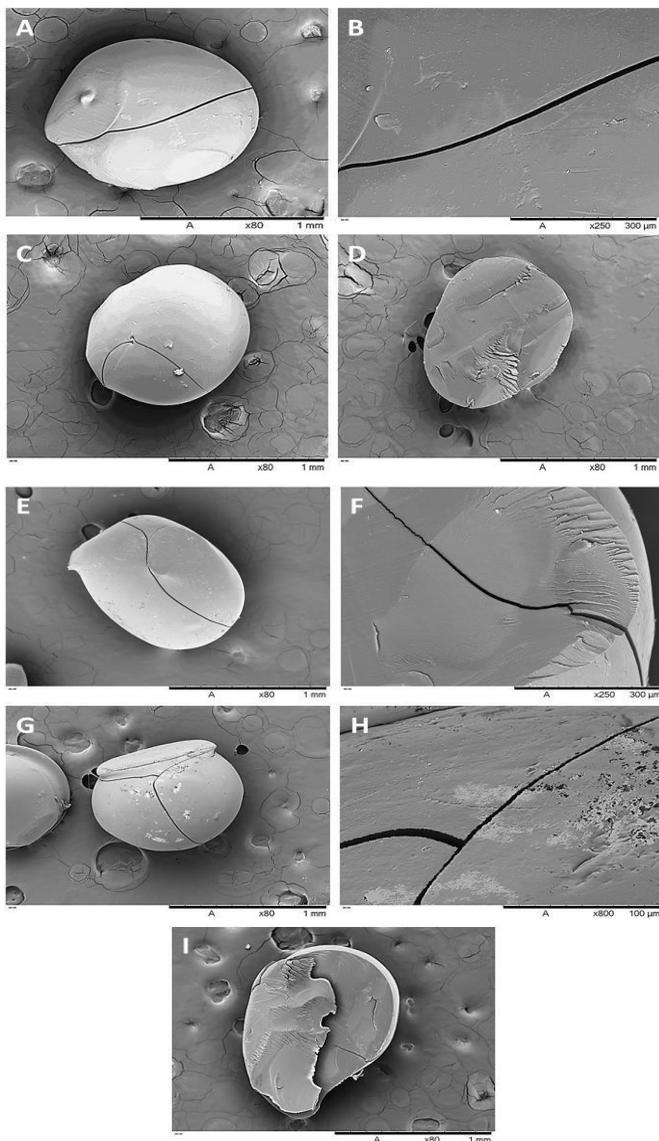
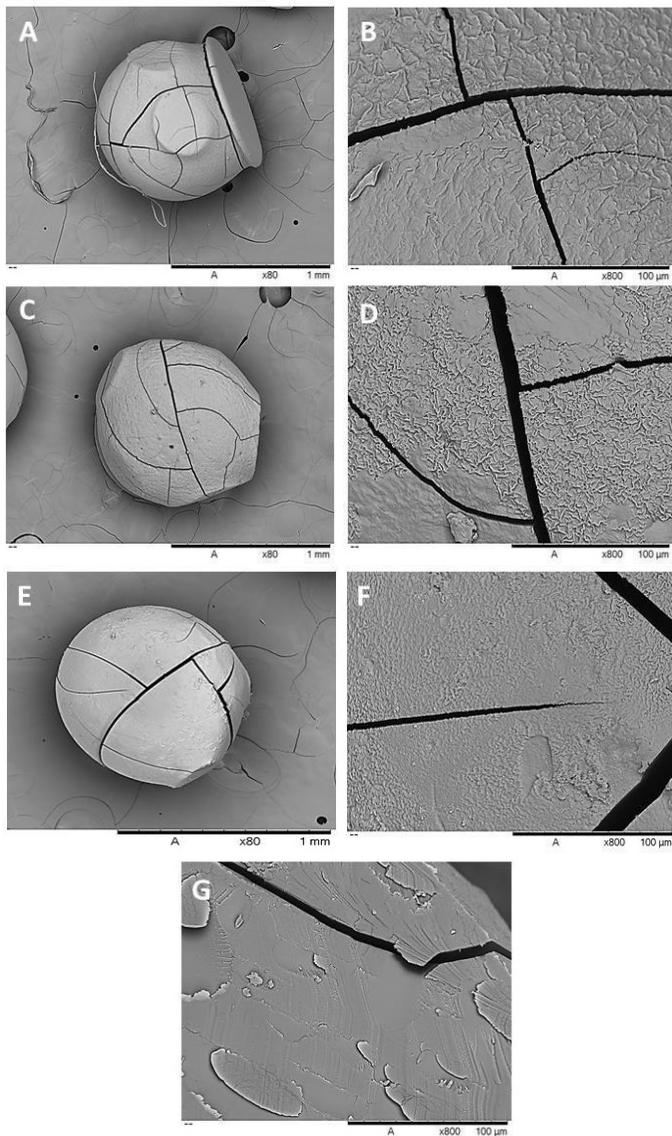


Figura 21. Imagens de SEM das microsferas de quitosana reticuladas com uma combinação dos agentes reticulantes genipin (10 mmol.L^{-1}) e TPP ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) em diferentes pH por 4 h de reação: (A) e (B) pH 4,5 (C) e (D) pH 7,2 (E), (F) e (G) pH 10,0.



O tamanho médio das micrççloesferas de quitosana em cada suporte está apresentado na **Tabela 4**, e variaram de 600 a 1030 μm . As microesferas de quitosana reticuladas com TPP não foram analisadas por SEM por serem semelhantes (tanto no tamanho quanto no formato) às microesferas de qts/gen/TPP.

Tabela 4: Tamanho médio das microesferas de quitosana puras e reticuladas.

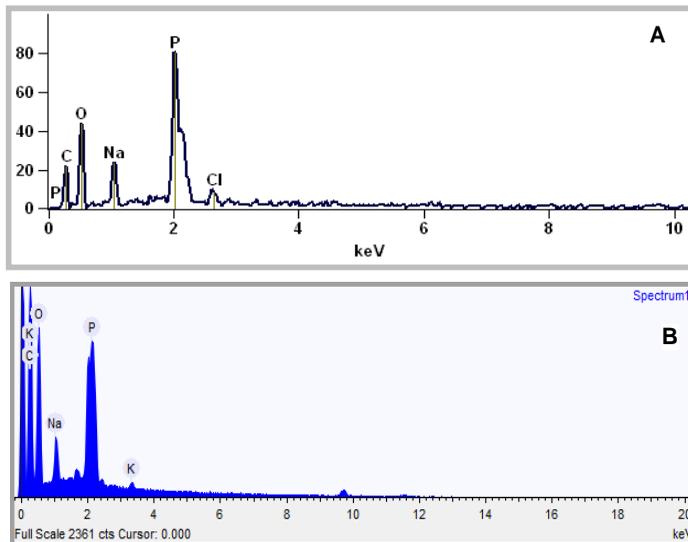
Suporte	Tamanho médio (μm)
Microesferas de quitosana não reticuladas	600 - 650
qts/glu	700 - 850
qts/gen	860 - 1030
qts/gen/TPP	900 - 1000

Observou-se que as microesferas se tornaram mais enrugadas e/ou com irregularidades na superfície após a reticulação, resultado da interação entre o biopolímero e o agente reticulante. Além disso, as microesferas reticuladas com TPP e com a combinação genipin/TPP tornaram-se mais frágeis e porosas, sendo facilmente pulverizadas.

As microesferas obtidas por reticulação com estes agentes reticulantes combinados apresentaram boa esfericidade, sendo estas altamente uniformes. Foi possível observar, também que as microesferas passaram de uma coloração branca, quando reticuladas somente com TPP, para uma mais escura. Observações similares também foram reportadas por Mi et al.⁸⁶, que sugeriu que as mudanças de coloração durante a reticulação com o TPP e com o genipin teve influência do pH do meio reacional.

A ocorrência da reticulação iônica entre o TPP e as microesferas de quitosana no suporte qts/TPP e qts/gen/TPP foi verificada através de análise de EDS (Energy Dispersive X-Ray Detector), cujos espectros obtidos estão apresentados na **Figura 22**.

Figura 22. Espectros de EDS para as microesferas de quitosana reticuladas com (A) TPP e (B) uma combinação entre genipin e TPP (10 mmol.L^{-1} e $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, respectivamente) em pH 10.



O espectro de EDS mostra que há um grande teor de átomos de fósforo e de oxigênio em ambas as amostras, o que comprova a ocorrência da reticulação, uma vez que a presença desses átomos na rede polimérica da quitosana evidencia a interação iônica entre os grupos amino protonados com os íons fosfato provenientes do TPP.

A quantificação da eficiência de reticulação da quitosana foi avaliada por meio da determinação do teor de grupamentos amino livres antes e após a reticulação com os agentes reticulantes estudados, cujos resultados obtidos estão apresentados no item a seguir.

4.4. Determinação do teor de grupamentos amino livres nos suportes

A ninidrina é um agente oxidante poderoso que reage com aminoácidos e, normalmente, é utilizada na detecção de aminoácidos por apresentar uma amina primária. Quando um aminoácido é aquecido com ninidrina forma-se um composto intensamente colorido, conhecido como Púrpura de Rühmann. Todos os aminoácidos ou

outros compostos que têm grupamentos amino livre produzem este derivado, e a intensidade da cor é proporcional à concentração de espécies presentes (aminoácidos, peptídeos, proteínas ou outros).¹¹³

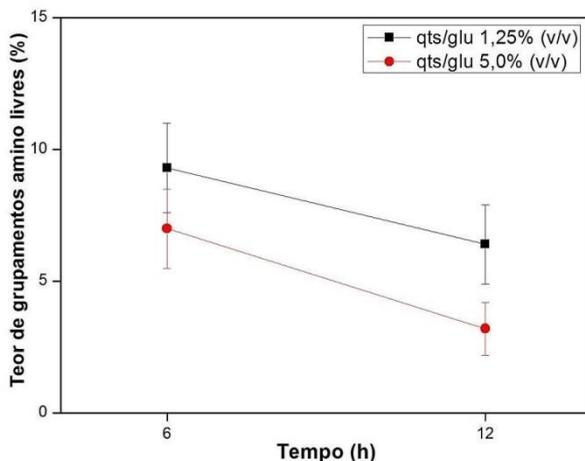
Na reação com quitosana, a solução de ninidrina é colorida, a qual é atribuída à presença da camada de valência livre ou pelo número ímpar de elétrons, apresentando uma frequência baixa, o suficiente para absorver a luz do visível. Entretanto, esta coloração diminui quando as amins primárias formam as secundárias ou terciárias, neste caso, na reação com um agente reticulante. Em consequência destas reações, intensidades diferentes de coloração são obtidas dependendo da quantidade de grupos amino livres na solução.¹¹³

A reação de ninidrina com a quitosana foi positiva e reprodutível, evidenciado pela formação de intensa coloração azul/violeta. Aplicando a **Equação 3** (p. 48) no cálculo de determinação de grupamentos amino livres nas amostras de quitosana reticuladas, obteve-se os resultados apresentados nas Figuras **23**, **24** e **25**.

A **Figura 23** mostra os resultados obtidos para o suporte qts/glu. Para a quitosana reticulada com solução aquosa de 1,25% de glutaraldeído, verificou-se uma diminuição do teor de grupos amina livre na quitosana quando o tempo de reticulação aumentou (de 9,3 para 6,4%), o que é um resultado esperado, uma vez que quanto maior o tempo de reação entre a quitosana e o agente reticulante, menor é a quantidade de grupos amino livres na cadeia polimérica. De maneira similar, a quitosana reticulada com solução aquosa de 5% de glutaraldeído também seguiu esta mesma tendência, sendo que o teor de grupos amino diminuiu de 7,0 para 3,2%.

Em termos de concentração, observou-se que as microesferas reticuladas com uma concentração maior de glutaraldeído apresentaram menor teor de grupos amino livres, o que era esperado, uma vez que a reticulação tende a ser maior quanto mais agente reticulante estiver disponível para interagir com as cadeias poliméricas da quitosana.

Figura 23. Determinação do teor de grupos amino livres no suporte qts/glu em função da concentração de glutaraldeído e tempo de reticulação.

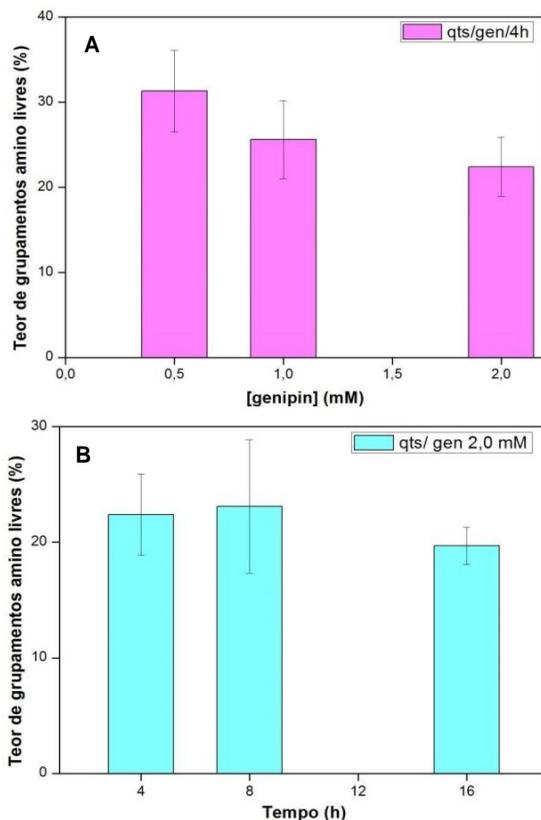


A **Figura 24** mostra os resultados obtidos para o suporte qts/genipin. De modo geral, o suporte qts/gen seguiu a mesma tendência observada pelo suporte qts/glu, onde se pode observar na **Figura 24A** que, quanto maior a concentração de genipin utilizada menor foi o teor de grupos amino livres. Por exemplo, ao usar as concentrações de genipin de 0,5, 1,0 e 2,0 mM, os teores de grupos amino livres foram de 31,3, 25,6 e 22,4%, respectivamente.

Quanto ao tempo de reticulação (**Figura 24B**), observou-se que quadriplicando o tempo (de 4 para 16 h) e mantendo-se fixa a concentração de genipin, não houve uma diminuição acentuada no teor de grupos amino livres (26-20%). Ao contrário, para 8 h de reticulação obteve-se microesferas com teor de grupos amino livres um pouco maior do que para 4 h de reticulação (23 e 22%, respectivamente).

Estes resultados, juntamente com os obtidos a partir da análise de FTIR, confirmaram a escolha das condições de 4 h de reticulação e concentração de 2,0 mmol.L⁻¹ de genipin como adequadas para a preparação do suporte qts/gen para ser usado na imobilização da LPS-SD.

Figura 24. Determinação do teor de grupos amino livres no suporte qts/gen em função (A) da concentração de genipin e (B) do tempo de reticulação.

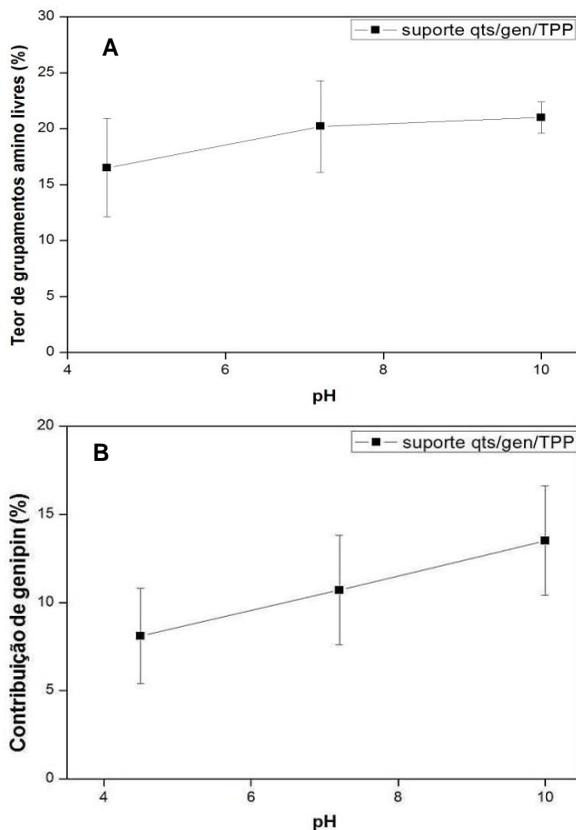


A **Figura 25** mostra os resultados obtidos para os suportes qts/TPP e qts/genipin/TPP. A **Figura 25A** mostra a quantificação do teor de grupamentos amino livres após a reticulação simultânea com genipin e TPP. Portanto, os resultados expressam o total de grupos amino livres, sem fazer distinção do quanto destes grupos estão interagindo com o genipin ou com o TPP. Assim, pode-se observar que houve maior eficiência de reticulação em pH mais ácido, diminuindo conforme o aumento do mesmo. Os valores observados foram de 16,5, 20,2 e 21,0%, respectivamente, e não superam 5% de diferença entre eles, sugerindo que os três pH avaliados (4,5, 7,2 e 10,0) podem ser utilizados para promover a reticulação da quitosana sem grandes

diferenças.

A **Figura 25B** mostra a contribuição de genipin na reticulação da quitosana durante a preparação do suporte qts/gen/TPP. Para isso, realizou-se o mesmo ensaio conforme descrito no item **3.3.5.3** (p. 47), porém utilizou-se como “branco” microesferas de quitosana reticuladas com TPP sem a presença de genipin no lugar de microesferas de quitosana não reticuladas. Os resultados obtidos mostram que a reticulação covalente tende a prevalecer conforme o aumento do pH do meio, sendo esta observação já reportada na literatura.¹⁰⁸

Figura 25. (A) Determinação do teor de grupos amino livres no suporte qts/gen/TPP e (B) contribuição do genipin na reticulação das microesferas de quitosana no suporte qts/gen/TPP em função do pH da solução.



Comparativamente, pode-se concluir que o suporte qts/glu apresentou maior eficiência de reticulação, pois os valores de grupamentos amino livres foram os menores, pois variaram de 3,2 a 9,3%, ou seja, menos que 10% dos grupos amino livres da quitosana (sendo o inicial igual a 81%). No entanto, todos os suportes preparados apresentaram boas eficiências de reticulação, podendo ser empregados na imobilização da LPS-SD.

Estes resultados corroboram com os obtidos por FTIR, que mostram que houve a reticulação através de ligações covalentes entre os agentes reticulantes e a quitosana.

No Capítulo II, serão apresentados e discutidos os resultados referentes à imobilização da LPS-SD nos diferentes suportes, incluindo a sua estabilidade às variações de pH e temperatura nas formas livre e imobilizada.

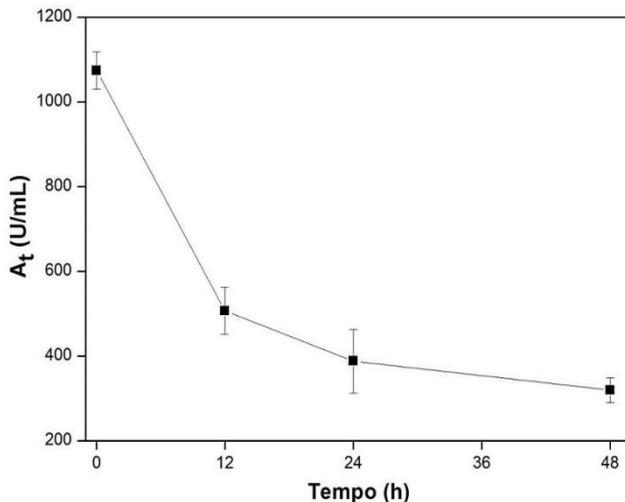
Capítulo II: **Imobilização da LPS-SD nos suportes preparados**

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados relacionados à imobilização da LPS-SD nos quatro suportes. Especificamente, serão apresentados os estudos envolvendo a cinética de imobilização, determinação do teor de proteína nos suportes contendo a LPS-SD e a estabilidade da mesma quanto à temperatura e ao pH nas formas livre e imobilizada.

4.5. Cinética de imobilização da LPS-SD

A cinética de imobilização da LPS-SD no suporte qts/glu foi avaliada através da determinação da atividade enzimática por 48 h. Uma solução 40 mg/mL de LPS-SD em tampão fosfato de sódio 0,1 mol.L⁻¹ (pH 7,2) foi preparada e deixada em contato com 300 mg de suporte qts/glu 1,25% (v/v)/6 h. De tempos em tempos, foram retiradas alíquotas do sobrenadante e a atividade foi determinada através da hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NPP), conforme o procedimento descrito no item 3.3.4 (p.43-45). Separadamente, o mesmo procedimento foi realizado, porém sem deixar a solução em contato com as microesferas de quitosana, a fim de se determinar a atividade enzimática total inicial da LPS-SD. O perfil de imobilização observado está apresentado na **Figura 26**.

Figura 26. Variação da atividade enzimática total (A_t), em U/mL, do sobrenadante durante 48 h de imobilização da LPS-SD em qts/glu. [Condições: *p*-NPP 0,5% (m/v), 35 °C, 5 min]



Os resultados mostram uma diminuição da atividade enzimática do sobrenadante conforme o aumento do tempo de contato da solução contendo a LPS-SD com as microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído. Isto é uma evidência de que cada vez menos LPS-SD encontra-se livre em solução, ou seja, a mesma deve ter se ligado ao suporte por meio de interações químicas.

Nas primeiras 12 h de imobilização, observou-se uma diminuição mais acentuada da atividade enzimática do sobrenadante, que continuou a diminuir até 48 h de contato, porém com pequenas variações. Após 48 h, observou-se que o sobrenadante ainda apresentava LPS-SD livre, pois sua atividade enzimática foi diferente de zero. No entanto, escolheu-se o tempo de 48 h para os estudos posteriores pelo fato de não ser viável estender esta etapa por mais de 48 h. Além disso, após 48 h de imobilização, a atividade enzimática do sobrenadante correspondia a menos de 30% da atividade enzimática inicial da LPS-SD, sugerindo que grande parte da mesma se encontrava imobilizada no suporte.

4.6. Determinação do teor de LPS-SD imobilizada

A determinação do teor de LPS-SD imobilizada nos diferentes suportes foi determinada através da determinação do teor de proteínas total de cada suporte contendo a lipase imobilizada pelo método de Bradford.

Estudos iniciais foram realizados por análises espectrométricas do sobrenadante durante 48 h de imobilização. Para isso, uma curva de calibração para a LPS-SD em tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 7,2) foi construída e fez-se a leitura de alíquotas do sobrenadante ao final do tempo total de contato, mas os resultados obtidos não foram reproduzíveis e precisos, inviabilizando o método escolhido.

Uma das razões para isso se deve, provavelmente, ao fato de que a carbonila, grupo presente na quitosana e em dois dos reticulantes utilizados na preparação dos suportes, apresenta uma transição $n \rightarrow \pi^*$ em aproximadamente 280 nm, que é o mesmo comprimento de onda de absorção máxima da LPS-SD.¹¹⁴ Assim, mesmo após a filtração do sobrenadante, resquícios de reticulante podem estar presentes na solução e/ou se desprendido do suporte, interferindo na absorção da lipase e na quantificação de modo eficiente, inviabilizando o método.

Os resultados obtidos para a determinação do teor de proteína nos diferentes suportes após a imobilização da LPS-SD estão apresentados na **Tabela 5**, onde a presença de qualquer proteína antes da imobilização da LPS-SD foi determinada para os suportes sem a lipase e subtraída dos resultados obtidos para os suportes após a imobilização.

Tabela 5: Determinação do teor de proteína nos diferentes suportes preparados após a imobilização da LPS-SD.

Suportes	Teor de proteínas (mg/g de suporte)
qts/glu 1,25% (v/v)/6 h	$0,91 \pm 0,13$
qts/gen $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ /4 h	$4,36 \pm 0,73$
qts/TPP 2,5% (m/v)	$1,71 \pm 0,44$
qts/gen/TPP ($10 \text{ mmol.L}^{-1}/0,1 \text{ mol.L}^{-1}$)/pH 10/4 h	$3,43 \pm 0,10$
Condições de imobilização: 40 mg de LPS/mL de tampão fosfato de sódio (pH 7,2), 4 °C, 48 h, 300mg de suporte.	

A partir dos dados obtidos, pode-se observar que os suportes reticulados com genipin (qts/gen e qts/gen/TPP) foram mais eficientes na imobilização da LPS-SD, seguido do suporte reticulado com apenas TPP e, por último, com glutaraldeído, uma vez que este último apresentou o menor teor de proteína após 48h de imobilização.

4.7. Estabilidade da LPS-SD às variações de pH e temperatura

A LPS-SD é uma lipase de grande interesse na ciência e na indústria, sendo reportada na literatura como uma enzima de alta estabilidade ao calor e às interações com solventes orgânicos. Além disso, inúmeros trabalhos já reportaram sua eficiência em reações de transesterificação e à sua ótima atividade residual quando exposta ao meio orgânico, características que podem ser consideravelmente melhoradas quando a mesma se encontra imobilizada em algum tipo de suporte.^{15,18,112}

Portanto, este estudo teve como propósito avaliar a estabilidade da LPS-SD livre e imobilizada no suporte qts/glu com relação ao pH e temperatura do meio. Como conclusão, verificou-se a vantagem de imobilizar a LPS-SD, além de inferir sobre o quão eficiente foi este processo.

As **Figuras 27 e 28** mostram os valores de atividade enzimática total (A_t) obtidos para a LPS-SD após um período de 24 e 1 h de incubação nos estudos de influência do pH e da temperatura, respectivamente.

Figura 27. Estabilidade da lipase LPS-SD livre e imobilizada no suporte qts/glu 1,25% (v/v)/6 h em diferentes valores de pH durante 24 h de incubação. [Condições: *p*-NPP 0,5% (m/v), 35 °C, 5 min]

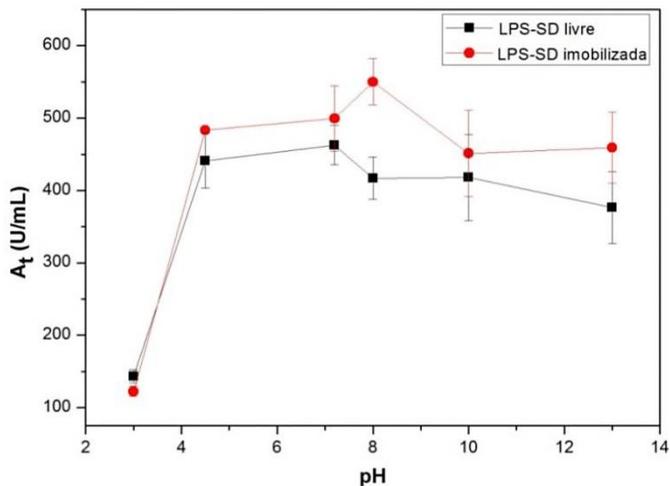
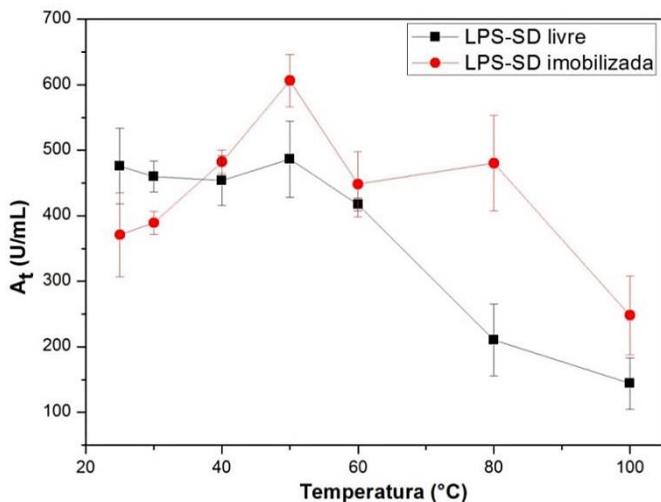


Figura 28. Estabilidade térmica da lipase LPS-SD livre e imobilizada no suporte qts/glu 1,25% (v/v) durante 1 h de incubação. [Condições: *p*-NPP 0,5% (m/v), 35 °C, 5 min]



A análise das **Figuras 27 e 28** permite concluir que o processo de imobilização da LPS-S D no suporte qts/glu foi benéfico para a mesma, uma vez que esta lipase apresentou maior estabilidade com relação às variações de pH e temperatura após imobilização. Além disso, observou-se que o pH ótimo de atuação da LPS-SD aumentou de 7,0 (forma livre) para 8,0 (imobilizada no suporte), sendo esta mudança devido ao processo de imobilização, o qual garantiu maior estabilidade para atuar em uma faixa de pH mais abrangente.

Com relação à influência da temperatura, observou-se que a LPS-SD, tanto livre quanto imobilizada, apresentou maior atividade enzimática na temperatura de 50 °C. Além disso, é possível notar que a imobilização também garantiu a esta lipase maior estabilidade térmica, pois as atividades enzimáticas observadas nas temperaturas de 80 e 100 °C, por exemplo, foram superiores às observadas, nestas mesmas condições, quando a mesma foi usada na forma livre.

Trabalhos reportados na literatura e as fichas técnicas da *Amano Co.*, reportam que a LPS-SD apresenta melhor atividade catalítica em pH 7,0 e temperatura de 50 °C.^{94,115}

Assim, pode-se concluir que a imobilização da LPS-SD no suporte qts/glu foi um processo que garantiu maior estabilidade à mesma, validando o método de imobilização empregado neste trabalho.

No Capítulo III, serão apresentados e discutidos os resultados referentes às aplicações da LPS-SD livre ou imobilizada nos suportes de quitosana na preparação de ésteres derivados do geraniol, citronelol e *n*-decanol.

Capítulo III:

Aplicações da LPS-SD livre ou imobilizada em reações de transesterificação

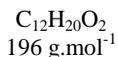
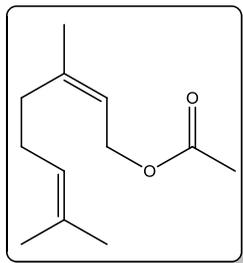
A LPS-SD imobilizada nos quatro suportes foi utilizada para catalisar a reação de transesterificação do geraniol, citronelol e *n*-decanol em meio orgânico com diversos agentes acilantes. Foram avaliados vários parâmetros experimentais, tais como a influência da massa de lipase utilizada durante a imobilização, efeito da temperatura e tempo de reação, influência da razão molar entre o álcool e o agente acilante, influência do meio orgânico, incluindo o uso de diferentes LIs derivados do 1-butil-3-metilimidazólio, a reutilização da lipase imobilizada em mais de um ciclo reacional, e o tempo de estocagem.

A caracterização dos ésteres foi realizada através de análises de FTIR, ¹H-NMR (para os ésteres **5**, **8** e **16**) e ¹³C-NMR (para os ésteres **5** e **8**), além da determinação do R_f (fator de retenção) por cromatografia em camada delgada (CCD).

4.8. Caracterização dos produtos

Os ésteres etílicos **5**, **8** e **16** derivados do geraniol, citronelol e *n*-decanol, respectivamente, foram preparados *via* catálise enzimática, purificados, isolados e caracterizados. Os dados espectrométricos também foram comparados com os da literatura.

Acetato de 3,7-dimetil-2,6-octadieno (ou acetato de geranoíla) (**5**)



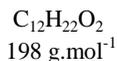
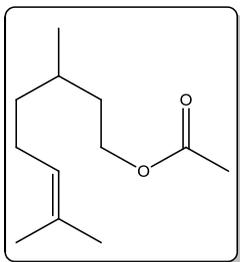
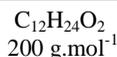
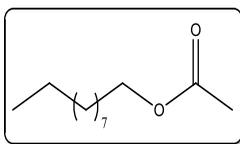
Conv. 73%

FTIR: 2965 cm⁻¹ (C-H alifático), 1733 cm⁻¹ (C=O de éster), 1236 cm⁻¹ (C-O de éster).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, TMS) δ (ppm) 5,35 (m, 1H), 5,08 (ddd, J = 6,9, 4,1, 1,3 Hz, 1H), 4,60 (d, 2H), 2,06 (s, 7H) 1,70 (s, 3H), 1,68 (s, 3H), 1,60 (s, 3H), 0,00 (TMS).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, TMS) δ (ppm) 171,0, 142,2, 131,8, 123,7, 118,2, 61,4, 39,7, 26,3, 25,7, 21,0, 17,7, 16,5.

R_f: 0,70 (*n*-hexano:acetato de etila 8:2 v/v)

Acetato de 3,7-dimetil-6-octadieno (ou acetato de citreoneila) (8)**Conv. 30%****FTIR:** 3090 cm^{-1} (C-H alifático), 1741 cm^{-1} (C=O de éster), 1242 cm^{-1} (C-O de éster). **$^1\text{H-NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS) δ (ppm) 5,08 (m, 1H), 4,11 (d, 2H), 2,04 (s, 3H) 1,98 (m, 2H), 1,68 (s, 3H), 1,60 (s, 3H), 1,28 (m, 1H), 1,24 (m, 2H), 0,88 (d, 3H), 0,00 (TMS). **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS) 171,1, 131,3, 124,5, 62,9, 36,9, 35,3, 29,4, 25,2, 22,5, 20,9, 17,5, 14,1.**Rf.:** 0,68 (*n*-hexano:acetato de etila 8:2 v/v)**Acetato de *n*-decila (16)****Conv. 53%****FTIR:** 2958 cm^{-1} (C-H alifático), 1712 cm^{-1} (C=O de éster), 1269 cm^{-1} (C-O de éster). **$^1\text{H-NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS) δ (ppm) 4,05 (t, 2H), 2,07 (s, 3H) 1,62 (m, 2H), 1,30 (m, 2H), 1,27 (m, 2H), 1,25 (m, 8H), 1,23 (m, 2H), 0,88 (t, 3H), 0,00 (TMS).**Rf.:** 0,76(*n*-hexano:acetato de etila 8:2 v/v)

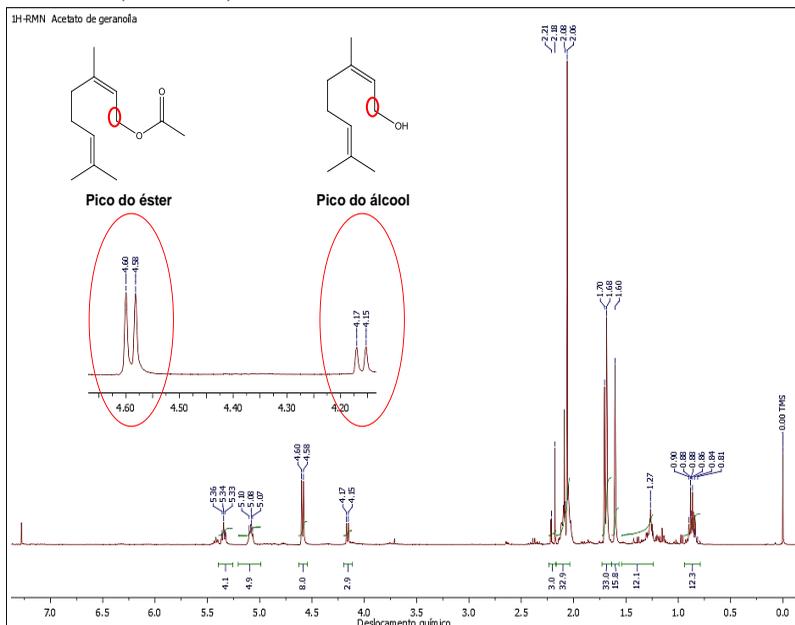
As porcentagens de conversão aos produtos foram determinadas através da razão das áreas dos picos dos reagentes e produtos obtidos por $^1\text{H-RMN}$, de acordo com a **Equação 4**;

$$\text{Conversão (\%)} = \frac{\text{Área}_{\text{produto}}}{\text{Área}_{\text{produto}} + \text{Área}_{\text{reagente}}} \cdot 100 \quad \text{Eq. 4}$$

onde $\text{Área}_{\text{produto}}$ corresponde à área do pico do produto, e $\text{Área}_{\text{reagente}}$ corresponde à área do pico do reagente.

A **Figura 29** mostra um espectro de $^1\text{H-NMR}$ do acetato de geranoila (**5**) obtido com conversão de 73% a partir da reação do geraniol com acetato de vinila, em *n*-hexano, catalisada pela LPS-SD imobilizada em qts/TPP.

Figura 29. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ de uma mistura reacional do geraniol (**1**) com acetato de vinila (**4**), e do acetato de geranoíla (**5**), destacando os picos considerados no cálculo de conversão. (Conv.73%)



Na **Figura 29**, observa-se que os picos referentes ao produto (éster) e ao reagente (álcool) estão destacados e identificados. Assim, os hidrogênios avaliados na quantificação da porcentagem de conversão ao produto são os metilênicos em posição 1 à função álcool (para o geraniol) com a do grupo acila (para o acetato de geranoíla).

No espectro de $^1\text{H-NMR}$ do geraniol (**Anexo IX**, p. 126), estes hidrogênios aparecem como um dubleto em 4,17 ppm, enquanto que, no espectro do acetato de geranoíla, este mesmo dubleto aparece em 4,60 ppm.

No espectro de $^1\text{H-NMR}$ do citronelol (**Anexo XII**, p. 127), os hidrogênios metilênicos avaliados no cálculo de conversão ao produto se apresentam como um multipletto em 3,70 ppm e, no espectro de $^1\text{H-NMR}$ do acetato de citroneíla (**Anexo XIII**, p. 128), este multipletto é deslocada para 4,10 ppm.

Por fim, nos espectros de $^1\text{H-NMR}$ do *n*-decanol e do acetato de *n*-decila (**Anexo XV**, p. 129), avaliou-se o triplete em 3,63 ppm

(álcool) e em 4,05 ppm (éster), respectivamente. Através da correlação da área destes picos utilizando a **Eq. 4**, obtiveram-se as porcentagens de conversões em cada uma das reações de transesterificação.

Os ésteres **5**, **8** e **16**, também foram caracterizados por FTIR, cujos espectros se encontram nos **Anexos IV, VI e VII** (p. 123-125), respectivamente. Destacam-se as seguintes bandas características; a banda referente ao estiramento da ligação C-H alifático é observada em 2965, 3090 e 2958 cm^{-1} , a banda correspondente ao estiramento da ligação C=O do grupo éster ocorre em 1733, 1741 e 1712 cm^{-1} e a de estiramento da ligação C-O do grupo éster em 1236, 1242 e 1269 cm^{-1} para os ésteres **5**, **8** e **16**, respectivamente. Estes valores são concordantes com os reportados na literatura.¹⁰⁴

Após a preparação catalisada pela LPS-SD na forma livre, e caracterização dos ésteres **5**, **8** e **16**, estes foram também preparados com a LPS-SD imobilizada nos suportes de quitosana, onde uma série de parâmetros foi avaliada tais como a influência da massa de lipase, tempo e temperatura de reação, razão molar dos reagentes, influência do meio orgânico e do doador acila empregado e o reuso do biocatalisador.

4.9. Preparação dos acetatos de geranoíla, citroneíla e *n*-decila

Um dos primeiros estudos realizados empregando a LPS-SD imobilizada nos suportes de quitosana reticulada foi a influência da massa de lipase na preparação do acetato de geranoíla (**5**).

4.9.1. Influência da massa de lipase na preparação do acetato de geranoíla (5)

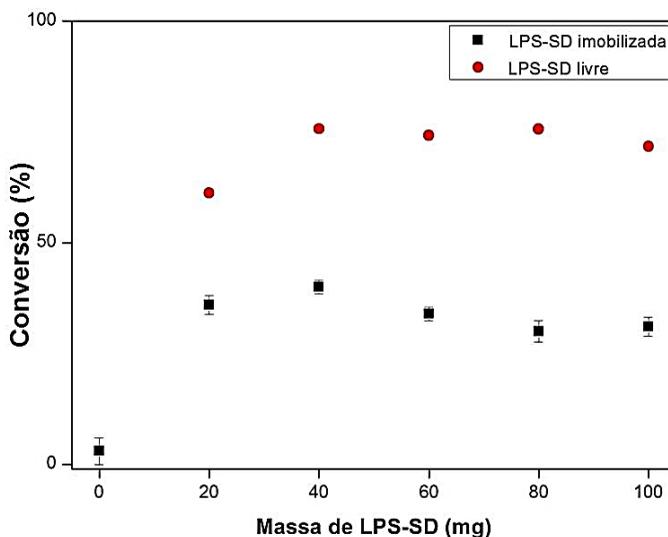
Inicialmente, o efeito da quantidade de LPS-SD imobilizada nos suportes qts/glu e qts/gen foi investigado na reação de transesterificação do geraniol com acetato de vinila para se determinar a melhor concentração da mesma a ser utilizada nos estudos posteriores.

Neste estudo, foram dissolvidas diferentes massas de LPS-SD (20-100 mg) em 1,0 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 mol.L^{-1} (pH 7,2) e deixadas em contato com 300 mg do suporte qts/glu por 48 h.

Após ser imobilizada, a LPS-SD foi empregada na preparação do éster **5**.

A **Figura 30** mostra os valores de conversão obtidos para cada este éster usando diferentes massas de LPS-SD. Para fins comparativos, utilizou-se também a LPS-SD não imobilizada (livre), nas mesmas condições experimentais.

Figura 30. Variação da conversão em função da quantidade de LPS-SD nas formas livre e imobilizada no suporte qts/glu 1,25% (v/v)/6 h na preparação do acetato de geranoíla. [Condições reacionais: geraniol (10 mmol), acetato de vinila (10 mmol), *n*-hexano (25 mL), 48 h, 35 °C, 300 mg desuporte.]



Para a reação realizada na ausência da lipase ou do suporte com a lipase imobilizada, observou-se que as conversões foram menores que 5% após 48 h de reação (resultados não apresentados na **Figura 30**).

Em geral, as conversões ao éster **5** foram menores ao usar a LPS-SD imobilizada no suporte qts/glu do que na forma livre. Ao usar a LPS-SD livre e imobilizada, as conversões variaram de 61-76% e 30-40%, respectivamente.

Isso se deve, provavelmente, ao fato de que, após a imobilização, o catalisador pode não assumir as modificações estruturais necessárias para favorecer o encaixe adequado do substrato no sítio ativo, além da

existência de limitações na difusão do substrato ao sítio ativo.^{18,19,26}

Apesar de ter sido obtido valores de conversão ao éster **5** maiores utilizando a LPS-SD livre, salienta-se que pode ocorrer a desnaturação da mesma devido a presença do meio orgânico, o que dificulta a sua reutilização.

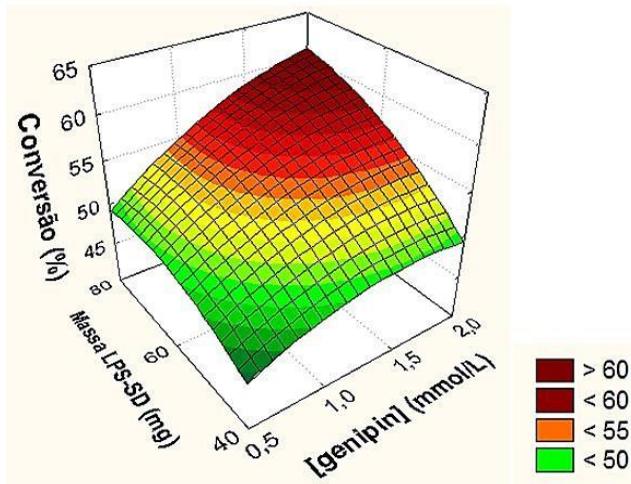
Conforme pode ser verificado na **Figura 30**, inicialmente os valores de conversão aumentaram progressivamente com o aumento de LPS-SD, variando de 36 a 40% ao se utilizar 20 e 40 mg de LPS-SD na imobilização, respectivamente. A partir de 40 mg de LPS-SD não foram verificados aumentos significativos nos valores de conversão em **5**.

No entanto, ao utilizar concentrações maiores de LPS-SD (60-100 mg.mL⁻¹), as conversões foram um pouco menores. Assim, as conversões ao éster **5** foram de 34, 31 e 30% ao utilizar 60, 80 e 100 mg de LPS-SD, respectivamente.

Estas observações se baseiam no fato de que não há regras específicas que ajudam a prever a atividade e a estabilidade de uma enzima mediante a imobilização. Em outras palavras, cada método de imobilização pode apresentar vantagens e desvantagens inerentes ao processo em si. O que se pode afirmar é que a maioria das lipases imobilizadas apresentam maior resistência às variações de temperatura e de pH, além da influência de diferentes solventes orgânicos, quando comparadas às que atuam em sua forma livre. Esta observação é atribuída ao fato de que as enzimas imobilizadas são menos sensíveis à desativação, pois sua estrutura é mais rígida.¹⁸

De forma análoga, o mesmo estudo foi realizado usando a LPS-SD imobilizada no suporte qts/gen. No entanto, além da massa de LPS-SD utilizada (40-80mg), também foi avaliada a influência da concentração de genipin empregada durante a reticulação das microesferas de quitosana na imobilização da lipase. A **Figura 31**, mostra os resultados obtidos na preparação do éster **5**.

Figura 31. Influência da quantidade de LPS-SD imobilizada no suporte qts/gen e da concentração de genipin utilizada durante a reticulação (4 h) da quitosana na preparação do acetato de geranoíla. [Condições reacionais: geraniol (10 mmol), acetato de vinila (10 mmol), LPS-SD (80 mg.mL⁻¹), *n*-hexano (25 mL), 24 h, 35 °C, 300 mg desuporte.]



A partir da **Figura 31**, pode-se observar que as conversões em **5** foram maiores quanto maior a quantidade de genipin reticulado com a quitosana e de LPS-SD utilizada durante a imobilização.

Por exemplo, para o suporte reticulado com a concentração de 0,5 mmol.L⁻¹ de genipin, as conversões em **5** foram de 46, 49 e 49% ao se utilizar 40, 60 e 80 mg de LPS-SD. Ao usar o suporte reticulado com 1,0 mmol.L⁻¹ de genipin, as conversões em **5** foram de 47, 54 e 55% ao utilizar 40, 60 e 80 mg de LPS-SD, respectivamente. E, ao utilizar o suporte reticulado com 2,0 mmol.L⁻¹ de genipin, as conversões em **5** foram de 50, 56 e 61% empregando 40, 60 e 80 mg de LPS-SD, respectivamente.

Portanto, pode-se concluir que a maior presença de agente reticulante ou de lipase imobilizada no suporte qts/gen foram fatores que levaram a um aumento nas conversões em acetato de geranoíla. Assim, para os estudos posteriores com o suporte qts/gen, optou-se por utilizar o suporte reticulado com a concentração de 2,0 mmol.L⁻¹ de genipin e a de 80 mg/mL de LPS-SD nos procedimentos de

imobilização.

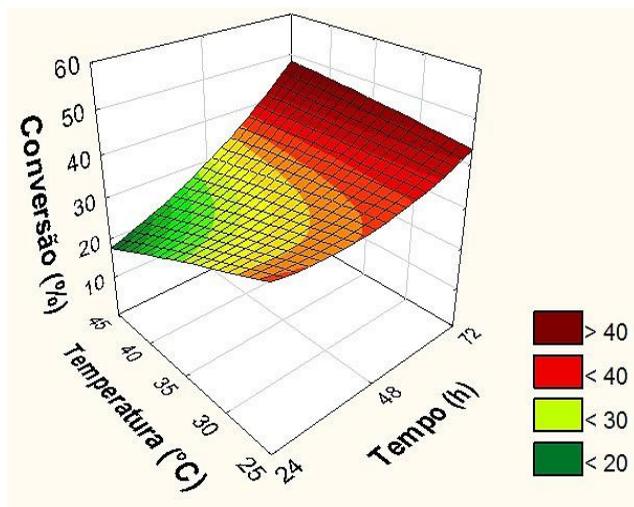
Posteriormente, a influência do tempo e da temperatura de reação foi avaliada para a preparação do acetato de geranoíla e citroneíla catalisada pela LPS-SD imobilizada nos suportes de quitosana.

4.9.2. Influência do tempo e temperatura de reação

O próximo estudo realizado foi a avaliação do tempo e da temperatura de reação na preparação de **5** e **8** usando a LPS-SD imobilizada nos suportes qts/glu.

Primeiramente, a influência do tempo e da temperatura foi avaliada na preparação de **5** empregando a LPS-SD imobilizada no suporte qts/glu. Os resultados estão apresentados na **Figura 32**.

Figura 32. Variação da conversão em função da temperatura e do tempo de reação utilizando a LPS-SD imobilizada no suporte qts/glu 1,25%(v/v)/6h na preparação do éster **5**. [Condições reacionais: geraniol (10 mmol), acetato de vinila (10 mmol), LPS-SD (40 mg.mL⁻¹), 25 mL *n*-hexano, 300mg de suporte]



De modo geral, as biotransformações dependem do tempo e, principalmente, da temperatura. A temperatura pode alterar a taxa de reação além de afetar a conformação, atividade, estabilidade e

seletividade dos biocatalisadores.²⁵ As reações estudadas mostraram resultados interessantes quanto à influência do tempo e temperatura na atividade da lipase imobilizada.

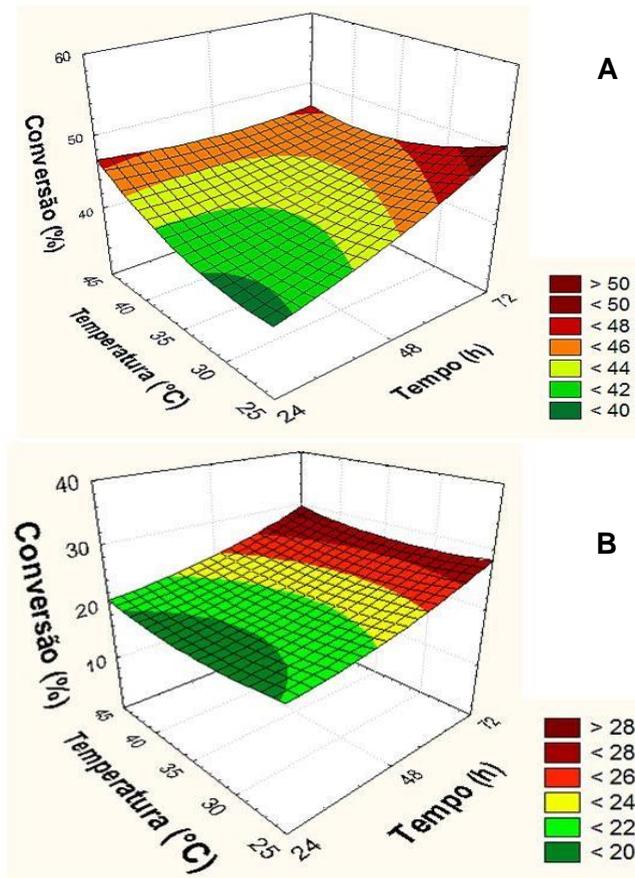
Conforme pode ser verificado na **Figura 32**, as conversões em **5** apresentaram maior dependência do tempo ao utilizar temperaturas maiores de reação. Por exemplo, as conversões ao éster **5** foram de 31, 36 e 53% para as reações realizadas a 45 °C em 24, 48 e 72 h, respectivamente. No entanto, foi observado que as conversões em **5**, foram de 19, 26 e 54% para as reações realizadas a 25 °C em 24, 48 e 72 h, respectivamente. Enquanto no primeiro caso as conversões em **5** variaram menos de 20% ao longo de 72 h de reação, no último foi verificado um aumento de quase três vezes ao triplicar o tempo de reação (de 24 a 72 h).

Neste trabalho, grande parte dos estudos empregando a LPS-SD imobilizada foi realizada na temperatura de 35 °C, a qual foi escolhida com base em trabalhos realizados anteriormente no grupo de pesquisa.¹¹³

A partir da **Figura 32**, observou-se que, para as reações realizadas nesta temperatura, as conversões em **5** tiveram aumentos pouco significativos após 48 h de reação. Por exemplo, a 35 °C, as conversões em **5** foram de 42 e 46% para as reações conduzidas em 48 e 72 h, respectivamente. Assim, optou-se por usar o tempo de 48 h para os estudos posteriores empregando a LPS-SD imobilizada no suporte qts/glu.

Em seguida, a influência do tempo e temperatura de reação foi avaliada na preparação de **5** e **8** catalisada pela LPS-SD imobilizada no suporte qts/gen. Os resultados estão apresentados na **Figura 33**.

Figura 33. Variação da conversão em função da temperatura e do tempo de reação utilizando a LPS-SD imobilizada no suporte qts/gen 2,0 mmol.L⁻¹/4h na preparação (A) do éster **5** e (B) do éster **8**. [Condições reacionais: geraniol (10 mmol) ou citrionelol (10 mmol), acetato de vinila (10 mmol), LPS-SD (80 mg.mL⁻¹), *n*-hexano (25 mL), 300 mg desuporte]



A **Figura 33A**, mostra que as variações nas conversões em **5** foram pequenas ao se aumentar o tempo ou a temperatura de reação. Por exemplo, a 25 °C, as conversões em **5** foram de 40, 44 e 51% nas reações conduzidas em 24, 48 e 72 h, respectivamente. Esta mesma tendência foi observada a 40 °C, onde as conversões em **5** variaram de 37-47% ao longo de 72 h de reação. Salienta-se que, a 45 °C praticamente não houve variação nas conversões em **5** ao longo do

tempo, que foi de aproximadamente 47%. Isto é facilmente comprovado a partir da análise do perfil da curva de superfície para esta temperatura, a qual se assemelha a uma linha reta.

A **Figura 33B**, apresenta resultados similares com relação à preparação do éster **8** catalisada pela LPS-SD neste mesmo suporte.

De modo geral, as conversões em **8** foram pouco dependentes do tempo de reação. Por exemplo, a 25 °C, as conversões em **8** variaram de 20-28% ao longo de 72 h de reação. Estes mesmos valores de conversão foram obtidos nas demais temperaturas (30, 35, 40 e 45 °C) durante 24-72 h. Estas observações são comprovadas analisando o perfil de curva de resposta obtida, a qual se apresenta como uma superfície plana e ligeiramente crescente, mostrando que, de fato, a preparação de **8** catalisada pela LPS-SD imobilizada em qts/gen foi pouco dependente do tempo e temperatura de reação.

De acordo com Faber¹⁸, altas temperaturas podem ter um efeito negativo na atividade enzimática ao diminuir a energia de desativação sobre a energia de ativação da reação enzimática, tornando o processo de desativação mais rápido.

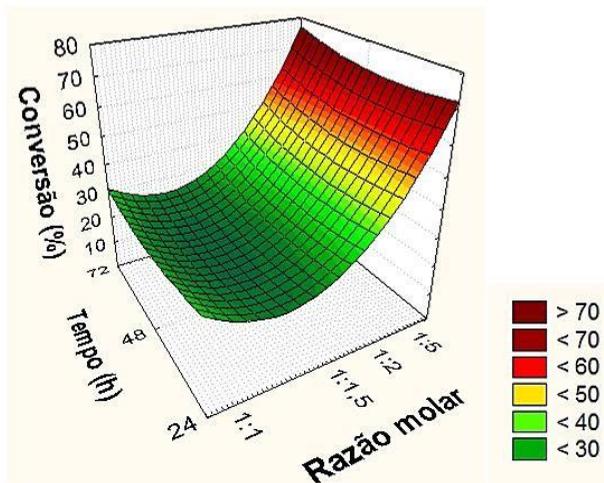
No entanto, para grande parte das reações realizadas neste estudo, as maiores conversões ao produto foram obtidas ao empregar temperaturas mais elevadas. Esta observação é uma evidência de que a imobilização permitiu que a lipase mantivesse a atividade em temperaturas mais altas. Assim, os métodos de imobilização são vantajosos e podem preservar a atividade catalítica dos biocatalisadores, além de permitir o seu reuso.

Posteriormente, foi avaliada a variação da conversão em **5** em função da razão molar entre o geraniol e o acetato de vinila, e os resultados estão descritos a seguir.

4.9.3. Influência da razão molar

Outro parâmetro analisado foi a influência da razão molar entre o geraniol e o acetato de vinila durante 72 h de reação com a LPS-SD imobilizada em qts/gen/TPP. Os resultados obtidos de conversão ao éster **5** estão apresentados na **Figura 34**.

Figura 34. Variação da conversão em função da razão molar entre o geraniol e o acetato de vinila e do tempo na preparação do éster **5** empregando a LPS-SD imobilizada no suporte qts/gen/TPP. [Condições reacionais: geraniol (10 mmol), acetato de vinila, LPS-SD (80 mg.mL⁻¹), *n*-hexano (25 mL), 35 °C, 300 mg de suporte.]



A partir da análise da **Figura 34**, observou-se um aumento na conversão em **5** de 25-75% conforme o aumento da quantidade de acetato de vinila utilizada. Assim, nas reações realizadas por 48 h, verificou-se que as conversões em **5** foram de 25, 27, 34 e 51% ao utilizar as proporções entre geraniol e acetato de vinila iguais a 1:1, 1:1,5, 1:2 e 1:5, respectivamente.

A razão molar mais efetiva foi a de 1:5 entre o geraniol e o acetato de vinila, com conversões em **5** maiores que 70% nos três tempos de reação avaliados (24, 48 e 72 h).

Além disso, também se pode observar que o aumento dos valores de conversão em **5** não teve influência significativa do tempo de reação. Por exemplo, usando a proporção de 1:1,5 entre o geraniol e o doador acila, as conversões em **5** foram de 27, 27 e 31% para as reações em 24, 48 e 72 h, respectivamente.

Portanto, pode-se concluir que 24 h de reação é suficiente para obter bons resultados (70% de conversão usando a razão molar 1:5) empregando a LPS-SD imobilizada nos suportes à base de quitosana

na preparação do éster **5**.

Em seguida, foi avaliada a influência do meio orgânico, incluindo o uso de líquidos iônicos (LIs), na preparação dos ésteres **5** e **8** usando a LPS-SD imobilizada nos suportes de quitosana.

4.9.4. Influência do meio orgânico na preparação de **5** e **8**

A atividade enzimática em meio orgânico pode variar significativamente com o solvente utilizado, o que está relacionado com vários fatores. De modo geral, os solventes menos favorecidos às enzimas são aqueles altamente polares e mais hidrofílicos, pois são capazes de remover a camada de água essencial da superfície da enzima e de competir pelas ligações de hidrogênio entre os átomos da proteína, causando desnaturação do biocatalisador e, por conseguinte, acarretando na perda das suas propriedades catalíticas.^{18,89}

Nesse contexto, os solventes apolares e os solventes hidrofóbicos tendem a causar menor desativação das enzimas justamente por preservar a camada superficial de água da mesma. Um dos indicadores mais importantes da hidrofobicidade de um solvente é o coeficiente de partição octanol/água (P). Assim, os solventes com $\log P$ maior que 3 permitem expressar melhor a atividade catalítica da maioria das enzimas, pois são mais hidrofóbicos, enquanto os solventes com $\log P$ menores que 2 tendem a ser menos eficientes em reações biocatalisadas, pois são mais polares.^{18,89,117}

A influência do meio orgânico foi investigada através da preparação dos ésteres **5** e **8** utilizando a LPS-SD imobilizada nos suportes qts/glu, qts/gen e qts/gen/TPP. Neste estudo, foram avaliados até 20 solventes orgânicos com $\log P$ diferentes sob as mesmas condições reacionais.

A **Tabela 6**, mostra os resultados obtidos ao usar a LPS-SD imobilizada em suportes de quitosana na preparação do éster **5**.

Tabela 6: Influência do uso de solventes orgânicos na preparação do éster **5**.^a

Entrada	Solvente	Log P ^b	Parâmetro de saúde ^c	Conversão (%) ^d	
				qts/glu 1,25%(v/v)/6h	qts/gen/TPP (10 mmol.L ⁻¹ /0,1 mol.L ⁻¹)/4h
1	<i>n</i> -heptano	4,00	8	36	47
2	<i>n</i> -hexano	3,50	4	40	34
3	éter de petróleo	--	5	18	-
4	cicloexano	3,20	7	23	27
5	tolueno	2,50	4	17	<5
6	clorofórmio	2,00	3	<5	10
7	éter diisopropílico	1,70	6	29	58
8	álcool <i>terc</i> -butílico	1,45	6	10	17
9	MTBE	1,43	5	15	49
10	diclorometano	0,93	4	5	<5
11	éter etílico	0,85	5	8	39
12	acetato de etila	0,68	8	5	12
13	THF	0,49	6	<5	14
14	álcool propílico	0,25	5	<5	-
15	álcool isopropílico	0,05	8	<5	9
16	acetona	-0,23	8	13	7
17	etanol	-0,24	8	<5	<5
18	acetonitrila	-0,33	6	<5	6
19	metanol	-0,76	5	<5	<5
20	1,4-dioxano	-1,10	4	12	13

(a) Condições reacionais: geraniol (10 mmol), acetato de vinila (10 mmol), solvente (20 mL), LPS-SD (40 e 80 mg.mL⁻¹, respectivamente), 35 °C, 48 h, 300 mg suporte.
(b) LAANE et al.¹¹⁷
(c) Referências 118 e 119.
(d) Determinada por¹H-RMN.

A LPS-SD imobilizada em qts/glu foi empregada na preparação de **5** utilizando 20 solventes orgânicos diferentes. A partir dos dados na **Tabela 6**, pode-se observar que as conversões em **5** usando a LPS-SD neste suporte foram maiores ao utilizar solventes mais apolares (log $P > 3$) ou de média polaridade (log $P > 2$), com algumas exceções.

Por exemplo, quando o *n*-hexano (log $P = 3,50$) foi utilizado, a conversão ao éster **5** foi de 40%. Ao usar solventes não-polares (log $P > 3$), tais como o *n*-heptano (log $P = 4,0$) e o ciclohexano (log $P = 3,20$), as conversões em **5** foram de moderadas a baixas, sendo elas 36 e 23%, respectivamente (Entradas 1 e 4). Também foram observadas boas conversões ao se utilizar solventes de menor polaridade, tais

como o éter diisopropílico ($\log P = 1,70$), tolueno ($\log P = 2,50$) e MTBE ($\log P = 1,43$), sendo elas de 29, 17 e 13%, respectivamente.

Em seguida, a LPS-SD imobilizada em qts/gen/TPP também foi empregada na preparação de **5** utilizando, desta vez, na presença de 18 solventes orgânicos diferentes. A partir dos dados na **Tabela 6**, observou-se que as conversões em **5** utilizando a LPS-SD imobilizada neste suporte seguiram uma tendência similar à descrita anteriormente, com algumas exceções.

Ao usar solventes mais apolares, tais como *n*-heptano ($\log P = 4,0$), *n*-hexano ($\log P = 3,50$) e ciclohexano ($\log P = 3,20$), as conversões em **5** foram de 47, 34 e 27%, respectivamente. No entanto, ao usar solventes de maior polaridade, tais como éter diisopropílico ($\log P = 1,70$), MTBE ($\log P = 1,43$) e éter etílico ($\log P = 0,85$), foram obtidas boas conversões em **5**, sendo ela 58, 49 e 39%, respectivamente. Estes resultados mostram que a imobilização da LPS-SD no suporte qts/gen/TPP foi importante para protegê-la das interações com solventes mais polares, garantindo a ela maior estabilidade na preparação do éster **5**.

Com o uso de solventes mais polares ($\log P < 1,43$), tais como o diclorometano ($\log P = 0,93$), THF ($\log P = 0,49$), acetonitrila ($\log P = -0,33$) e álcool isopropílico ($\log P = 0,05$), as conversões em **5** foram baixas e/ou $< 5\%$. Quando foram utilizados solventes polares e próticos, tais como metanol ($\log P = -0,76$), etanol ($\log P = -0,24$) e álcool propílico ($\log P = 0,25$), a formação do produto não foi detectada, indicando que esses solventes influenciaram de alguma forma a conformação da LPS-SD, causando a sua inativação, ou não foram efetivos na solubilização dos reagentes, dificultando o progresso da reação.

No entanto, ao usar acetona ($\log P = -0,23$) e 1,4-dioxano ($\log P = -1,10$), as conversões ao éster **5** foram de moderadas a baixas tanto ao usar a LPS-SD imobilizada em qts/glu (13 e 12%, respectivamente) quanto em qts/gen/TPP (7 e 13%, respectivamente), mostrando que alguns solventes polares apróticos não inibiram totalmente a atividade catalítica da LPS-SD após imobilização.

Posteriormente, a LPS-SD imobilizada no suporte qts/gen foi usada na preparação do éster **8** utilizando 14 solventes orgânicos

diferentes. A **Tabela 7** mostra os resultados obtidos neste estudo.

Tabela 7: Influência do uso de solventes orgânicos na preparação do éster **8**.^a

				Conversão (%) ^d
Entrada	Solvente	Log P ^b	Parâmetro de saúde ^c	qts/gen 2,0 mmol.L ⁻¹ /4h
1	<i>n</i> -heptano	4,00	8	19
2	<i>n</i> -hexano	3,50	4	26
3	ciclohexano	3,20	7	27
4	tolueno	2,50	4	14
5	clorofórmio	2,00	3	8
6	éter diisopropílico	1,70	6	19
7	MTBE	1,43	5	25
8	diclorometano	0,93	4	7
9	acetato de etila	0,68	8	15
10	THF	0,49	6	7
11	acetona	-0,23	8	12
12	etanol	-0,24	8	<5
13	acetonitrila	-0,33	6	7
14	1,4-dioxano	-1,10	4	12

(a) Condições reacionais: citronelol (10 mmol), acetato de vinila (10 mmol), solvente (20 mL), LPS-SD (80 mg.mL⁻¹) 35 °C, 48 h, 300 mg suporte.
 (b) LAANE et al.¹¹⁷
 (c) Referências 118 e 119.
 (d) Determinada por ¹H-RMN.

De modo geral, pode-se observar que o éster **8** foi obtido com conversões mais baixas (0-27%). No entanto, ao analisar os dados da **Tabela 7**, pode-se concluir que a lipase imobilizada no suporte qts/gen seguiu uma tendência similar nos solventes estudados anteriormente, onde observou-se que a mesma atuou melhor em solventes mais apolares e de baixa polaridade do que nos mais polares na preparação de **8**.

Por exemplo, ao usar *n*-heptano (log P = 4,0), *n*-hexano (log P = 3,50) e ciclohexano (log P = 3,20), as conversões em **8** foram de 19, 26 e 27%, respectivamente (Entradas 2 e 3). Ao usar solventes de maior polaridade, tais como tolueno (log P = 2,50), éter diisopropílico (log P = 1,70), MTBE (log P = 1,43) e acetato de etila (log P = 0,68), as conversões em **8** foram de 14, 19, 25 e 15%, respectivamente (Entradas 4, 6, 7 e 9). Assim, pode-se concluir que a imobilização da LPS-SD no suporte qts/gen também foi um procedimento vantajoso,

pois a deixou mais estável na preparação do éster **8**, mesmo em solventes mais polares.

A escolha do solvente orgânico também depende da análise de outros parâmetros, tal como o parâmetro de saúde. Cada solvente apresenta um valor característico relacionado a esta métrica, que indica o grau de perigo à saúde durante o seu manuseio e/ou inalação. Este parâmetro varia de 1 a 10, sendo o maior valor associado ao solvente de menor perigo (tal como a água, por exemplo) e o menor valor para o solvente que oferece mais danos à saúde.^{118,119}

As **Tabelas 6 e 7** informam o parâmetro de saúde de cada um dos solventes usados neste trabalho. É importante salientar que este parâmetro não possui uma relação direta com o $\log P$ usado para justificar a polaridade do solvente e, por conseguinte, inferir sobre as interações com a lipase. Assim, um solvente benéfico para as lipases, como o *n*-hexano, pode ser maléfico para as pessoas que o manuseiam, pois, o mesmo apresenta um parâmetro de saúde igual a 4. Portanto, medidas de prevenção durante o manuseio destes solventes devem ser consideradas através do uso apropriado de equipamentos de proteção individual (EPIs), além da necessidade de o trabalho ser realizado por pessoas treinadas e em ambiente apropriado.

Com o objetivo de aumentar as conversões em **5 e 8**, avaliou-se a influência do uso de LIs derivados do imidazol em misturas com *n*-hexano e MTBE. A escolha destes dois solventes se baseou nos resultados apresentados nas **Tabelas 6 e 7**, que mostraram que as reações empregando *n*-hexano (26-40%) e MTBE (15-49%) apresentaram conversões moderadas. Os LIs usados foram o [BMIM][BF₄] (na proporção 9:1) e o [BMIM][PF₆] em diferentes proporções.

As reações empregando LIs foram, em grande parte, conduzidas sob agitação magnética a temperatura ambiente. Ao usar banho termostatizado com agitação orbital em estudos iniciais não foi verificado a formação de **5** (conversões < 5%). Um dos motivos associados a este problema, provavelmente é a alta viscosidade dos LIs que, sob agitação orbital, não foi capaz de solubilizar e promover o contato eficiente entre os reagentes e/ou produtos e a lipase imobilizada.

Assim, os resultados apresentados na **Tabela 8** foram obtidos para as reações de preparação do éster **5** utilizando a LPS-SD imobilizada nos suportes qts/gen, qts/gen/TPP e qts/TPP realizadas com agitação magnética a temperatura ambiente (~ 25°C).

Tabela 8: Influência de LIs na preparação do acetato de geranoíla.

Conversão (%) ^a						
Solvente/aditivo	qts/gen 2,0 mmol.L ⁻¹ /4h		qts/gen/TPP (10 mmol.L ⁻¹ /0,1 mol.L ⁻¹ /4h)		qts/TPP (2,5% m/v, pH 10, 4h)	
	<i>n</i> -hexano	MTBE	<i>n</i> -hexano	MTBE	<i>n</i> -hexano	MTBE
Composição solvente:LI (v/v)						
Sem LI	61	32	79	38	57	33
[BMIM][BF ₄] (9:1)	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
[BMIM][PF ₆] (7:3)	7	-	-	-	-	-
[BMIM][PF ₆] (8:2)	12	-	-	-	-	-
[BMIM][PF ₆] (9:1)	23	< 5	38	17	32	8

(a) Condições reacionais: geraniol (5 mmol), acetato de vinila (10 mmol); solvente/LI (10 mL) LPS-SD (80 mg.mL⁻¹), t.a., 24 h, agitação magnética (150 rpm), 300 mg suporte.
(b) Determinada por ¹H-RMN.

A partir dos dados apresentados na **Tabela 8**, pode-se concluir que a adição de LIs no meio reacional nestas condições reacionais não foi eficiente, uma vez que as conversões ao éster **5** foram menores do que as realizadas sob as mesmas condições empregando os solventes orgânicos puros.

Por exemplo, usando a LPS-SD imobilizada em qts/gen, as conversões em **5** foram de 61 e 32% ao empregar *n*-hexano e MTBE como solventes, respectivamente. Contudo, ao usar a mistura *n*-hexano/[BMIM][PF₆] (9:1 v/v) e MTBE/[BMIM][PF₆] (9:1 v/v), as conversões em **5** foram de 23 e < 5%, respectivamente. Observações similares foram obtidas ao usar a LPS-SD imobilizada em qts/gen/TPP e qts/TPP.

Além disso, mesmo obtendo conversões baixas, o [BMIM][PF₆] atuou de modo mais eficiente na mistura solvente/LI do que o [BMIM][BF₄]. Isso se deve ao fato de que diferentes LIs podem apresentar diferentes polaridades, dependendo do cátion e do ânion que o compõem, o que pode afetar diretamente na estabilidade da lipase. O ânion [PF₆⁻] é mais hidrofóbico do que o [BF₄⁻] e, por isso, tende a não retirar a camada de água superficial da lipase, preservando melhor suas propriedades catalíticas. Outros parâmetros, tais como a viscosidade e

transferência de massa, também devem ser considerados e, portanto, podem aumentar ou diminuir a atividade da enzima.^{91,92}

No que se refere à composição solvente/LIs, pode-se observar que ao utilizar [BMIM][PF₆] como aditivo ao *n*-hexano, os maiores valores de conversão ao éster **5** foram obtidos para as composições mais ricas no solvente orgânico do que na presença de LI. Assim, o éster **5** foi obtido com conversões de 7, 12 e 23% empregando as composições 7:3 (v/v), 8:2 (v/v) e 9:1 (v/v), respectivamente.

Resultados similares já foram reportados na literatura por Pilissão (2009)¹²⁰ em estudos empregando LIs na resolução enzimática de (*R,S*)-feniletilamina, e por Bitencourt (2010)¹²¹ na obtenção de oxaziridinas. Nestes estudos, os autores reportaram que a mistura solvente/LI na proporção de 9:1 (v/v) foi a mais eficiente, corroborando com as observações obtidas na preparação do éster **5** usando a LPS-SD imobilizada nos suportes de quitosana.

Salienta-se que os LIs utilizados neste estudo foram separados do meio reacional, recuperados e armazenados para reuso em estudos futuros. O **Anexo VIII** (p. 125), mostra um espectro de FTIR do [BMIM][PF₆] antes e após ser usado na preparação do éster **5**. Observou-se que não houve alterações na composição química do mesmo, já que os espectros obtidos são similares, permitindo o seu reuso.

Assim, conclui-se que para a LPS-SD imobilizada nos três suportes avaliados neste estudo, a adição de LIs não foi eficiente, pois as conversões em **5** foram menores do que as obtidas com os solventes orgânicos puros, sendo um dos motivos a alta viscosidade dos LIs empregados, dificultando a agitação e o contato dos substratos com o sítio ativo da lipase.

Em seguida, a influência de diferentes doadores acila foi avaliada na preparação de ésteres derivados do geraniol usando a LPS-SD imobilizada no suporte qts/TPP.

4.9.5. Influência do doador acila na preparação de ésteres derivado de 1

A influência de diferentes doadores acila foi avaliada empregando os compostos **4**, **9**, **11** e **14** em reações de transesterificação com o geraniol (**1**) usando a LPS-SD imobilizada no suporte qts/TPP (item **3.3.6**, p. 49-51). Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 9**.

Tabela 9: Influência do uso de diferentes doadores acila na preparação de ésteres derivados de (**1**).

Entrada	Doador acila	Fórmula química	Conversão (%) ^b
1	Acetato de vinila (4)	$\text{CH}_3\text{COOCH}=\text{CH}_2$	73
2	Propionato de vinila (9)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOCH}=\text{CH}_2$	72
3	Acetato de isopropenila (11)	$\text{CH}_3\text{COOC}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$	33
4	Laurato de vinila (14)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOCH}=\text{CH}_2$	72

(a) Condições reacionais: geraniol (5 mmol), doador acila (10 mmol), LPS-SD (80 mg.mL⁻¹), *n*-hexano (20 mL), 35 °C, 48 h, 300 mg suporte.
 (b) Determinada por ¹H-RMN.

Os resultados mostram que ao usar os doadores acila contendo o grupo vinila (acetato, propionato e laurato de vinila) as conversões aos respectivos ésteres terpênicos foram maiores, sendo de 73, 72 e 72% para os ésteres derivados de **4**, **9** e **14**, respectivamente. Além disso, conclui-se que a diferença no número de carbonos da parte acila dos compostos **4**, **9** e **14** não foi um fator significativo nestes estudos, uma vez que as conversões obtidas foram similares, não sendo verificado o efeito estereo nestas reações.

O acetato de isopropenila (**11**), por sua vez, foi o doador acila menos eficiente na reação com o geraniol, sendo que o acetato de geranoila foi obtido com conversão de 33%. Assim, pode-se concluir que, nas reações estudadas, o grupo ligado ao oxigênio do éster teve maior influência, sendo que grupos menores (como o grupo vinílico) levaram à formação dos ésteres de modo mais satisfatório do que grupos mais ramificados (como o grupo isopropenil).

Em seguida, o reuso e o tempo de estocagem da LPS-SD imobilizada em diferentes suportes de quitosana foi avaliado na preparação de ésteres derivado do geraniol, citronelol e *n*-decanol.

4.9.6. Reuso da LPS-SD imobilizada nos diferentes suportes

A avaliação do reuso da LPS-SD imobilizada foi outro parâmetro investigado. O reuso do biocatalisador é de elevada importância, e constitui uma das grandes vantagens da imobilização de enzimas, pois visa diminuir os custos de todo o processo.¹⁸

A LPS-SD imobilizada no suporte qts/gen foi utilizada em dez ciclos reacionais sucessivos na preparação do acetato de *n*-decila (**16**) (**Figura 35**). Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 36**.

Figura 35. Estrutura do acetato de *n*-decila (**16**).

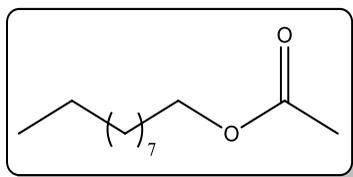
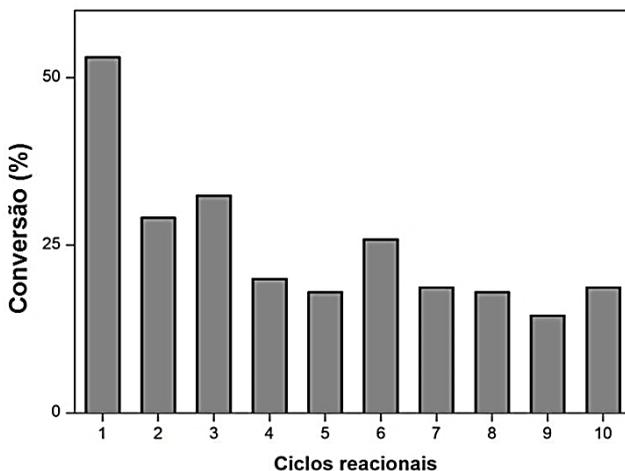


Figura 36. Reuso da LPS-SD imobilizada no suporte qts/gen 2,0 mmol.L⁻¹/4h em 10 ciclos reacionais sucessivos para a preparação do éster **16**. [Condições reacionais: *n*-decanol (10 mmol), acetato de vinila (20 mmol), LPS-SD (80 mg.mL⁻¹), *n*-hexano (25 mL), 24 h, 35°C, 300 mg de suporte.]

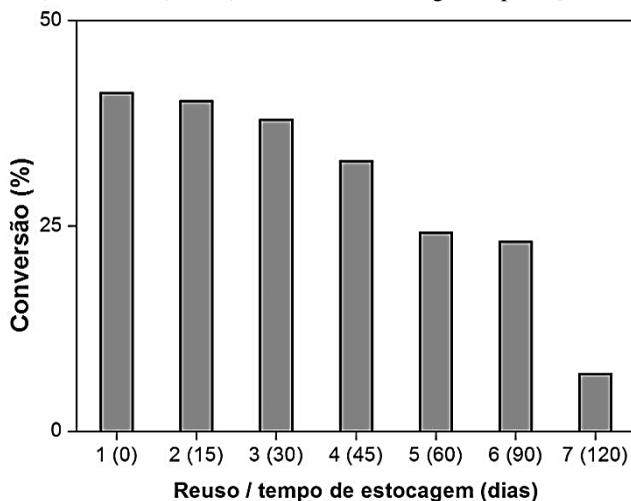


A partir da **Figura 36**, pode-se observar que as conversões ao éster **16** diminuiram ao longo de cada ciclo reacional, salvo

algumas exceções, como no reuso 3, 6 e 10, onde observou-se um pequeno aumento nas conversões em **16** quando comparados ao ciclo anterior. Isto se deve, provavelmente, à presença de reagentes e/ou produto do ciclo anterior que, eventualmente, não foi totalmente eliminado. No entanto, pode-se concluir que a LPS-SD manteve-se estável após a imobilização no suporte qts/gen, uma vez que, após dez ciclos reacionais, o éster **16** foi obtido com conversão de 19%.

A LPS-SD imobilizada no suporte qts/glu foi também reutilizada na preparação do éster **5**. Neste caso, os reusos foram realizados de tempos em tempos, onde se procurou avaliar também o tempo de estocagem do biocatalisador. A **Figura 37** mostra as conversões em **5** obtidas após a estocagem da LPS-SD por até 120 dias.

Figura 37. Estudos do reuso e influência do tempo de estocagem da LPS-SD imobilizada no suporte qts/glu 1.25% (v/v)/6h para a preparação do éster **5**. [Condições reacionais: geraniol (5 mmol), acetato de vinila (10 mmol), LPS-SD (40 mg.mL⁻¹), *n*-hexano (25 mL), 48 h, 35 °C, 300 mg de suporte.]

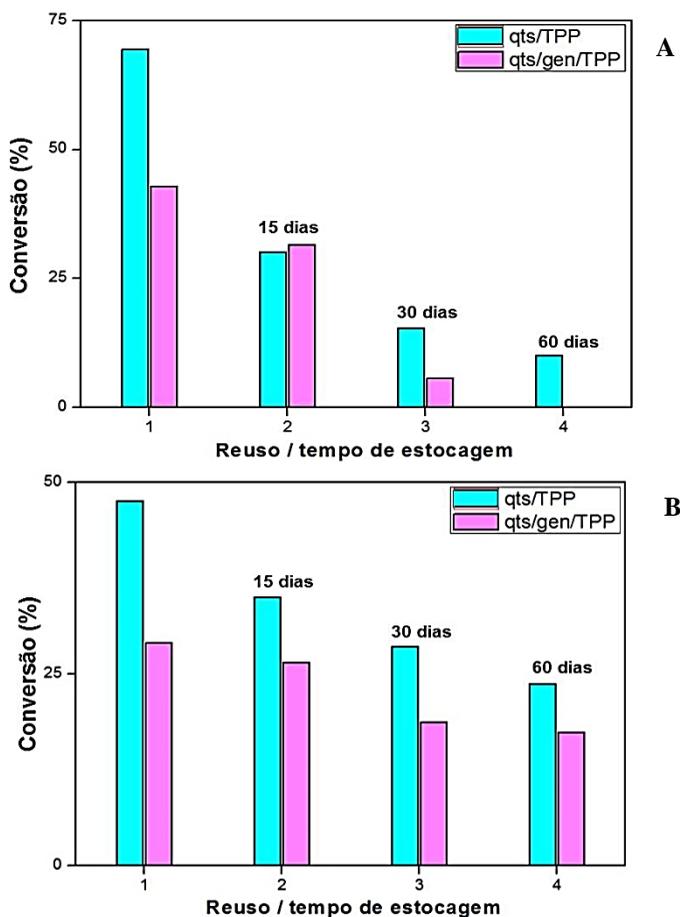


Os resultados mostraram que as conversões ao éster **5**, foram decrescendo progressivamente ao longo de cada reuso, sendo o decréscimo mais acentuado após 120 dias de estocagem, onde obteve-se o éster com conversão de 7%. Com isso, pode-se concluir que a imobilização da LPS-SD no suporte qts/glu foi satisfatória, permitindo

o reuso por até 90 dias após o primeiro ciclo reacional.

Em outro estudo, foi avaliada a reutilização ao longo do tempo da LPS- SD imobilizada nos suportes qts/TPP e qts/gen/TPP na preparação dos ésteres **5** e **8**. A **Figura 38**, a seguir mostra os resultados de conversão obtidos para cada éster.

Figura 38. Estudo do reuso e influência do tempo de estocagem da LPS-SD imobilizada nos suportes qts/TPP e qts/gen/TPP na preparação (A) do éster **5** e (B) do éster **8**. [Condições reacionais: geraniol ou citronelol (5 mmol), acetato de vinila (10 mmol), LPS-SD (80 mg.mL⁻¹), *n*-hexano (25 mL), 48 h, 35 °C, 300 mg de suporte.]



A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que a LPS-SD imobilizada nos suportes qts/TPP e qts/gen/TPP também se manteve estável, podendo ser reutilizada por até 60 dias após o primeiro ciclo reacional com perdas graduais nas suas propriedades catalíticas, com conversões que variaram de 0-69% e 17-48% na preparação dos ésteres **5** e **8**, respectivamente.

Na **Figura 38A**, referente à preparação do éster **5** utilizando a LPS-SD imobilizada nos suportes qts/TPP e qts/gen/TPP, observou-se que as conversões ao éster foram diminuindo, conforme esperado, variando de 0-69%. Além disso, foi verificado que a imobilização da LPS-SD no suporte qts/TPP foi mais eficiente. Após 60 dias de estocagem, o éster **5** foi obtido com conversão de 10%, enquanto que não foi verificado a formação do produto ao usar a LPS-SD imobilizada em qts/gen/TPP neste tempo.

De acordo com os resultados apresentados na **Figura 38B**, observou-se que as conversões ao éster **8** diminuíram continuamente ao longo de cada reuso, de forma similar ao observado na **Figura 38A**, variando de 17-48%. Assim, as conversões em **8** variaram de 24-48% e 17-29% ao usar a LPS-SD imobilizada nos suportes qts/TPP e qts/gen/TPP, respectivamente.

Portanto, pode-se concluir que, de modo geral, que os métodos de imobilização empregados neste trabalho foram eficazes, garantindo à LPS-SD maior estabilidade e reuso ao longo de diversos ciclos reacionais sucessivos e/ou programados. Assim, ressalta-se a grande vantagem de se imobilizar enzimas em processos biocatalisados, pois os mesmos tendem a preservar as suas propriedades catalíticas e permitem a reutilização ao longo do tempo.

5. Conclusões

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- As microesferas de quitosana foram preparadas e reticuladas de modo eficiente com os agentes reticulantes glutaraldeído, genipin e tripolifosfato, seguindo diferentes formulações e condições de reação, onde foram obtidas microesferas com tamanho médio que variaram de 600 a 1030 μm . As interações químicas estabelecidas entre a quitosana e os diferentes reticulantes foram devidamente verificadas por FTIR, SEM e ensaio de ninidrina, comprovando a eficiência da reticulação.
- A LPS-SD foi imobilizada nos suportes onde, de modo geral, verificou-se um aumento na estabilidade da mesma, sobretudo com relação a variações de pH e temperatura. Além disso, os suportes reticulados com genipin foram os que apresentaram melhor eficiência na imobilização da LPS-SD devido à menor toxicidade deste agente reticulante na lipase utilizada.
- A LPS-SD imobilizada nos suportes de quitosana foi devidamente empregada na reação de transesterificação do geraniol, citronelol e *n*- decanol com o acetato de vinila e/ou outros doadores acila. Verificou-se que a formação dos acetatos de geranoíla e citroneíla foi dependente do tempo e da temperatura, além do tipo de suporte utilizado para imobilizar a lipase.
- A LPS-SD manteve-se estável em meio orgânico, sendo possível o reuso do biocatalisador em mais de um ciclo reacional. Além disso, foi verificada que a LPS-SD pode ser armazenada e reutilizada por até 120 dias após o primeiro ciclo reacional, comprovando a eficiência do método de imobilização. Embora, as conversões ao usar a LPS-SD livre tenham sido maiores, a imobilização da mesma foi comprovada ser um processo vantajoso.
- Portanto, verificou-se que a imobilização da LPS-SD em suportes à base de quitosana é um processo viável e de baixo custo, considerando também que este biopolímero é de fonte renovável.

6. Perspectivas

A partir dos resultados obtidos, tem-se como perspectivas:

- Preparar filmes de quitosana reticulados com glutaraldeído ou genipin para a imobilização da LPS-SD e/ou de lipases de outras procedências e comparar a eficiência em relação às microesferas preparadas neste trabalho.
- Utilizar diferentes tipos e intensidades de agitação nas reações catalisadas de transesterificação do geraniol, citronelol e *n*-decanol usando a LPS-SD imobilizada nos suportes de quitosana.
- Utilizar a LPS-SD imobilizada nos suportes de quitosana em outras reações, tais como esterificação e epoxidação quimio-enzimática de monoterpenos (por exemplo, α - e/ou β -pineno).

7. Referências bibliográficas

1. BIROLI, W. G. et al. Biocatalysis and biotransformation in Brazil: an overview. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 481-510,2015.
2. JOHANNES, T.; SIMURDIK, M. R.; ZHAO, H. Biocatalysis. **Encyclopedia of Chemical Processing**, p. 101-110,2006.
3. SILVA, F. M.; LACERDA, P. S. B.; JONES JUNIOR, J. Desenvolvimento sustentável e químicasverde. **Química Nova**, São Paulo, v.28, n.1, p.103-110, 2005.
4. MILNER, S. E.; MAGUIRE, A. R. Recent trends in whole cell and isolated enzymes in enantioselective synthesis. **Arkivoc**, p. 321-382,2012.
5. RAN, N. et al. Recent applications of biocatalysis in developing green chemistry for chemical synthesis at the industrial scale. **Green Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 361-372,2008.
6. WACHTMEISTER, J.; ROTHER, D. Recent advances in whole cell biocatalysis techniques bridging from investigative to industrial scale. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 42, p. 169-177,2016.
7. SHELDON, R. A.; WOODLEY, J. M. Role of biocatalysis in sustainable chemistry. **Chemical Reviews**,2017.
8. SHELDON, R. A.; PEREIRA, P. C. Biocatalysis engineering: the big picture. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 10, p. 2678-2691,2017.
9. CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica**. São Paulo: Cengage Learning, 2016.
10. DRAUZ, K. **Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: a**

Comprehensive Handbook. John Wiley & Sons,2012.

11. LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica.** São Paulo: Sarvier, v. 3,2014.
12. WOODLEY, J. M. New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 321-327,2008.
13. WACHTMEISTER, J. et al. Whole cell teabag catalysis for the modularisation of synthetic enzyme cascades in micro-aqueous systems. **ChemCatChem**, v. 6, n. 4, p. 1051-1058,2014.
14. CHOI, J.; HAN, S.; KIM, H. Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 7, p. 1443-1454,2015.
15. SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223-6235, 2013.
16. DE ARAÚJO, M. E. M. B. et al. Biocatalytic synthesis of flavonoid esters by lipases and their biological benefits. **Planta Medica**, v. 83, n. 01/02, p. 7-22, 2017.
17. NAGY, B. et al. Covalently immobilized lipases are efficient stereoselective catalysts for the kinetic resolution of rac-(5-phenylfuran-2-yl)- β -alanine ethyl ester hydrochlorides. **European Journal of Organic Chemistry**, v.2017, n.20, p. 2878-2882, 2017.
18. FABER, K. **Biotransformations In Organic Chemistry: a Textbook.** Springer Science & Business Media,2010.
19. CABRAL, J. S. **Engenharia Enzimática.** Lisboa: Lidel, 2003.

20. JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 315- 351,1999.
21. KHAN, F. I. et al. The lid domain in lipases: structural and functional determinant of enzymatic properties. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 5, p. 16, 2017.
22. DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 623-630,2004.
23. GUPTA, R. et al. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: their role in biotechnology and cellular physiology. **Progress in Lipid Research**, v. 57, p. 40-54,2015.
24. RIBEIRO, B. D. et al. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. **Enzyme Research**, v.2011, 2011.
25. KAPOOR, M.; GUPTA, M.N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555-569,2012.
26. LIESE, A.; HILTERHAUS, L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6236-6249, 2013.
27. KHAN, N. R.; RATHOD, V. K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: a review. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 11, p. 1793-1806,2015.
28. RAJENDRAN, A., PALANISAMY, A., THANGAVELU, V. Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Curitiba, v. 52,

- n. 1, p. 207-219,2009.
29. BEZBRADICA, D. et al. Enzymatic syntheses of esters-green chemistry for valuable food, fuel and fine chemicals. **Current Organic Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 104-138,2017.
 30. HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, n. 1-3, p. 155, 2004.
 31. MEHTA, A.; BODH, U.; GUPTA, R. Fungal lipases: a review. **Journal of Biotech Research**, v. 8, p. 58-77,2017.
 32. CHOUDHURY, P.; BHUNIA, B. Industrial application of lipase: a review. **Biopharm Journal**, v. 1, n. 2, p. 41-47,2017.
 33. CHEN, Z. G., TAN, R. X., HUANG, M. Efficient regioselective acylation of andrographolide catalyzed by immobilized *Burkholderia cepacia* lipase. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 3, p. 415-418, 2010.
 34. PAN, S. et al. Esterification activity and conformation studies of *Burkholderia cepacia* lipase in conventional organic solvents, ionic liquids and their co-solvent mixture media. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 24, p. 9822-9824, 2010.
 35. HAMA, S.; NODA, H.; KONDO, A. How lipase technology contributes to evolution of biodiesel production using multiple feedstocks. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 50, p. 57-64, 2018.
 36. 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, 2007.
 37. PLANCHESTAINER, M. et al. Continuous flow biocatalysis:

- production and in-line purification of amines by immobilised transaminase from *Halomonas elongata*. **Green Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 372-375,2017.
38. GUTMANN, B.; CANTILLO, D.; KAPPE, C. O. Continuous-flow technology—a tool for the safe manufacturing of active pharmaceutical ingredients. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 54, n. 23, p. 6688- 6728,2015.
 39. VAGHARI, H. et al. Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 2, p. 223-233,2016.
 40. HANEFELD, U.; GARDOSSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 453-468,2009.
 41. RODRIGUES, R. C. et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, v.42, n.15, p.6290-6307,2013.
 42. DWEVEDI, A. **Enzyme Immobilization: Advances in Industry, Agriculture, Medicine, and the Environment**. Springer,2016.
 43. KAPLAN, D. L. **Introduction to Biopolymers from Renewable Resources**. In: **Biopolymers from Renewable Resources**. Springer Berlin Heidelberg, 1998. p.1-29.
 44. GRABOWSKA, B. Biopolymers—structure, properties and applicability in the foundry industry. **Biodegradation**, v. 1, p. 2,2008.
 45. BRITO, G. F. et al. Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**,

v. 6, n. 2, p. 127-139, 2011.

46. UJANG, Z., SALIM, R. S., SALIM, M. R. **Microbial biopolymerization production from palm oil mill effluent (POME)**. Biopolymers Magdy Elnashar (Ed.) ISBN 978-953-30-7109-1. Published by Sciyo,2010.
47. ARANAZ, I. et al. Functional characterization of chitin and chitosan. **Current Chemical Biology**, v. 3, n. 2, p. 203-230,2009.
48. HAMED, I., ÖZOGUL, F., REGENSTEIN, J. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 40-50,2016.
49. http://www.crq4.org.br/quimica_viva_a_quimica_das_quitosanas-acesso_em03/12/2017.
50. TAN, C. S. et al. The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivate UV-spectrophotometry method of determination. **Talanta**, v. 45, p.713 – 719, 1998.
51. ACOSTA, N. et al. Extraction and characterization of chitin from crustaceans. **Biomass and Bioenergy**, v. 5, n. 2, p. 145-153,1993.
52. ZVEZDOVA, D. Synthesis and characterization of chitosan from marine sources in Black Sea. **Annual Proceedings," Angel Kanchev" University of Ruse**, v. 49, n. 9.1, p. 65-69,2010.
53. KITTUR, F. S., THARANATHAN, R. N., Chitin – the undisputed biomolecule of great potential, **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 43, p. 61- 87, 2003.
54. PAULINO, A. T. et al. Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, p. 98–103,2006.

55. NETO, C. G. T. et al. Thermal analysis of chitosan based networks. **Carbohydrates Polymers**, v. 62, p. 97-103, 2005.
56. GONSALVES, A. A. et al. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215-1223, 2011.
57. BARROS, F. C. F et al. Produção e caracterização de esferas de quitosana modificada quimicamente. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 7, p. 232–246, 2006.
58. CLEASEN, C., WHILHELMS, T., KULICKE, W. M. Formation and characterization of chitosan membranes. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 3210- 3222, 2006.
59. DASHA, M. et al. Chitosan – a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 981–1014, 2011.
60. LARANJEIRA, M. C. M; FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.
61. RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 603-632, 2006.
62. KURITA, K., YOSHIDA, Y., UMEMURA, T. Finely selective protections and deprotections of multifunctional chitin and chitosan to synthesize key intermediates for regioselective chemical modifications. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 2, p. 434-440, 2010.
63. MONTEIRO, O. A. C, AIROLDI, C. Some studies of crosslinking chitosan– glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, n. 2, p. 119-128, 1999.

64. MENDES, A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840,2011.
65. COELHO, T. C. et al. Effect of heparin coating on epichlorohydrin cross- linked chitosan microspheres on the adsorption of copper (II) ions. **Reactive and Functional Polymers**, v. 67, n. 5, p. 468-475,2007.
66. XIAO, Y.; ZHOU, X. Synthesis and properties of a novel crosslinked chitosan resin modified by L-lysine. **Reactive and Functional Polymers**, v. 68, n. 8, p. 1281-1289,2008.
67. BEPPU, M. M. et al. Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption. **Journal of Membrane Science**, v. 301, n. 1, p. 126-130,2007.
68. BRUCE, P. Y. **Organic Chemistry**. 5th Edition. Upper Saddle River: Prentice Hall,2006.
69. McMURRY, J. **Química Orgânica**. 1^a Ed. Pioneira Thomson Learning: São Paulo.2006.
70. LINS, L. C. V. **Micropartículas compostas de PHB/cetoprofeno recobertas com quitosana reticulada**. 2012. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis,2012.
71. KIL'DEEVA, N. R. et al. On the mechanism of the reaction ofglutaraldehyde with chitosan. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 35, n. 3,p. 360-369, 2009.
72. BARBOSA, O. et al. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **Research Advances**, v. 4, n. 4, p. 1583-1600,2014.

73. SWIFT, G. G.; CARRAHER JR, C. E.; BOWMAN, C. (Ed.). **Polymer Modification**. Springer Science & Business Media, p. 119-131, 2013.
74. KARNCHANAJINDANUN, J.; SRISA-ARD, M.; BAIMARK, Y. Genipin-cross-linked chitosan microspheres prepared by a water-in-oil emulsion solvent diffusion method for protein delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 3, p. 674-680, 2011.
75. CAVELLO, I. A., CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; CAVALITTO, S. F. Immobilization of a keratinolytic protease from *Purpureocillium lilacinum* on genipin activated-chitosan beads. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 8, p. 1332- 1336, 2014.
76. <http://www.naturezabela.com.br/2012/07/jenipapo-genipa-americana-1.html>- acesso em 07/12/2017.
77. https://www.alibaba.com/product-detail/Gardenia-jasminoides-EllisGardenia-fruit-extract_60163228233.html - acesso em 07/12/2017.
78. WANG, W. et al. Comparison of the properties of lipase immobilized onto mesoporous resins by different methods. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, n. 5, p. 561-572, 2011.
79. PUJANA, M. A. et al. Biodegradable chitosan nanogels crosslinked with genipin. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 2, p. 836-842, 2013.
80. CHIOU, S. et al. Immobilization of lipase to chitosan beads using a natural cross-linker. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 265-275, 2007.
81. PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation.

Progress in Polymer Science, v. 34, n. 7, p. 641-678,2009.

82. DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying. **Journal of Microencapsulation**, v. 22, n. 2, p. 179-192,2005.
83. LAUS, R. et al. Adsorption and desorption of Cu (II), Cd (II) and Pb(II) ions using chitosan crosslinked with epichlorohydrin-triphosphate as the adsorbent. **Journal of Hazardous Materials**, v. 183, n. 1, p. 233-241,2010.
84. YUAN, D.; JACQUIER, J. C.; O'RIORDAN, E. D. Entrapment of protein in chitosan-tripolyphosphate beads and its release in an in vitro digestive model. **Food Chemistry**, v. 229, p. 495-501,2017.
85. CAI, Y.; LAPITSKY, Y. Analysis of chitosan/tripolyphosphate micro-and nanogel yields is key to understanding their protein uptake performance. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 494, p. 242-254,2017.
86. MI, F. et al. Synthesis and characterization of biodegradable TPP/genipin co-crosslinked chitosan gel beads. **Polymer**, v. 44, n. 21, p. 6521-6530, 2003.
87. CASTILLO, E.; CASAS-GODOY, L.; SANDOVAL, G. Medium-engineering: a useful tool for modulating lipase activity and selectivity. **Biocatalysis**, v. 1, n. 1, p. 178-188,2016.
88. GUPTA, A.; KHARE, S. K. Enzymes from solvent-tolerant microbes: useful biocatalysts for non-aqueous enzymology. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 44-54,2009.
89. KUMAR, A. et al. Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications. **Biological Procedures Online**, v. 18, n. 1, p. 2,2016.

90. KERTON, F. M.; MARRIOTT, R. Alternative solvents for green chemistry. **Royal Society of Chemistry**, 2^a Ed., p. 1-30, 2013.
91. KAAR, J. L. Lipase activation and stabilization in room-temperature ionic liquids. **Enzyme Stabilization and Immobilization: Methods and Protocols**, p. 25-35,2017.
92. VANRANTWIJK, F.; SHELDON, R. A. Biocatalysis in ionic liquids. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 6, p. 2757-2785, 2007.
93. WASSERSCHEID, P.; KEIM, W. Ionic liquids—new “solutions” for transition metal catalysis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 39, n. 21, p. 3772-3789,2000.
94. <https://www.amano-enzyme.co.jp/> - acesso em 23 de dezembro de2017.
95. BRUGNEROTTO, J. et al. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, n. 8, p. 3569-3580,2001.
96. SILVA, J. A. et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**, v. 60, p. 16-24,2012.
97. LEE, S. et al. Equilibrium and kinetic studies of copper (II) ion uptake by chitosan-tripolyphosphate chelating resin. **Polymer**, v. 42, n. 5, p. 1879-1892, 2001.
98. FERNANDES, M. et al. Modulation of stability and mucoadhesive properties of chitosan microspheres for therapeutic gastric application. **International Journal of pharmaceuticals**, v. 454, n. 1, p. 116-124,2013.
99. GLOGAUER, A. **Isolamento de clones com atividade lipolítica**

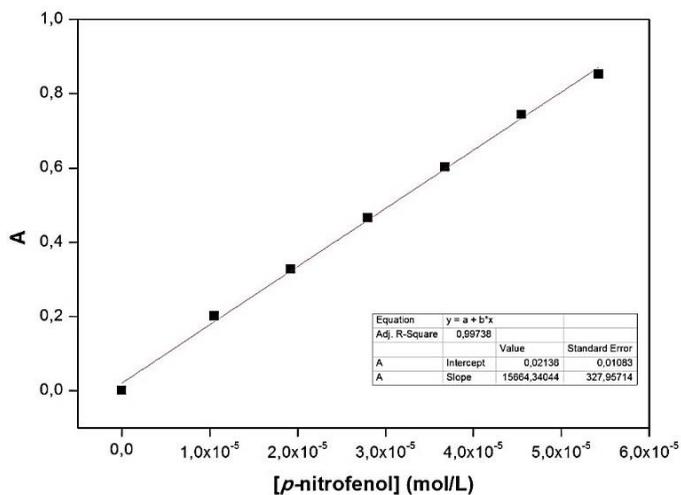
do metagenoma de solo contaminado com gordura animal e caracterização de uma nova e eficiente lipase. 2012. 99f. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

100. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254,1976.
101. YUAN, Y. *et al.* The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release. **Carbohydrate Polymers**. 561–567,2007.
102. SANTOS, J. E. et al. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: ciência e tecnologia**, v. 13, n. 4,2003.
103. WLADYMYR, J. B. S. et al. Desenvolvimento de compósitos a base de quitosana/fosfato de cálcio. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 8, n. 3,2013.
104. SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 6ª Ed. LTC Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro,2000.
105. POSPISKOVA, K.; SAFARIK, I. Low-cost, easy-to-prepare magnetic chitosan microparticles for enzymes immobilization. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, n. 2, p. 545-548,2013.
106. LI, B. et al. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of crosslinked chitosan-glutaraldehyde, **Marine Drugs**, v. 11, n. 5, p.1534-1552, 2013.
107. ANDRIANI, Y. et al. Retracted-glutaraldehyde-crosslinked chitosan-pectin nanoparticles as a potential carrier for curcumin

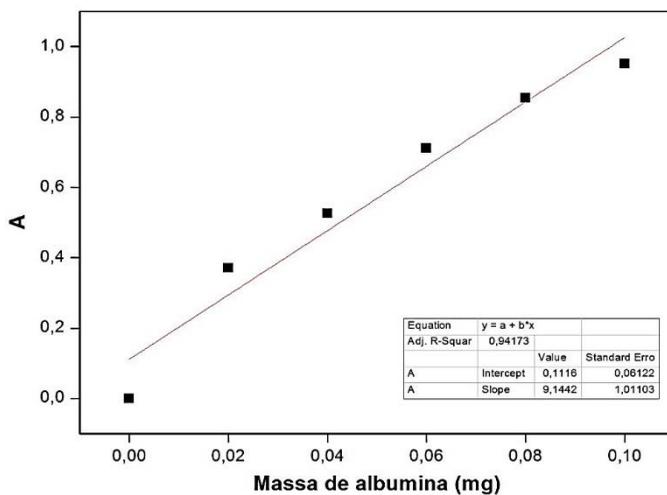
- delivery and its *in vitro* release study. *International Journal of Drug Delivery*, v. 7, n. 3 p. 167-173,2015.
108. MUZZARELLI, R. A. A. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 1, p. 1- 9,2009.
109. KLEIN, M. P. et al. Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and β -D-galactosidase immobilization. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 184-190,2016.
110. XU, Y.; DU, Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, p. 215-226,2003.
111. LAUS, R. et al. Microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para remoção da acidez, ferro (III) e manganês (II) de águas contaminadas pela mineração de carvão. **Química Nova**, v. 29, n.1, p. 34-39, 2006.
112. SALAZAR, M. C.; NEGRON, A. V. Preparación y caracterización de películas de quitosano despolimerizado y reticulado con tripolifosfato de sodo. **Revista de la Sociedad Química del Perú**, v. 79, n. 3, p. 195-208, 2013.
113. LEANE, M. M. et al. Use of the ninhydrin assay to measure the release of chitosan from oral solid dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 271, n. 1, p. 241-249,2004.
114. ATKINS, P. W.; JONES, L. **Princípios de Química:- Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente**. Bookman Editora,2009.
115. SASSO, F. et al. *Burkholderia cepacia* lipase is a promising

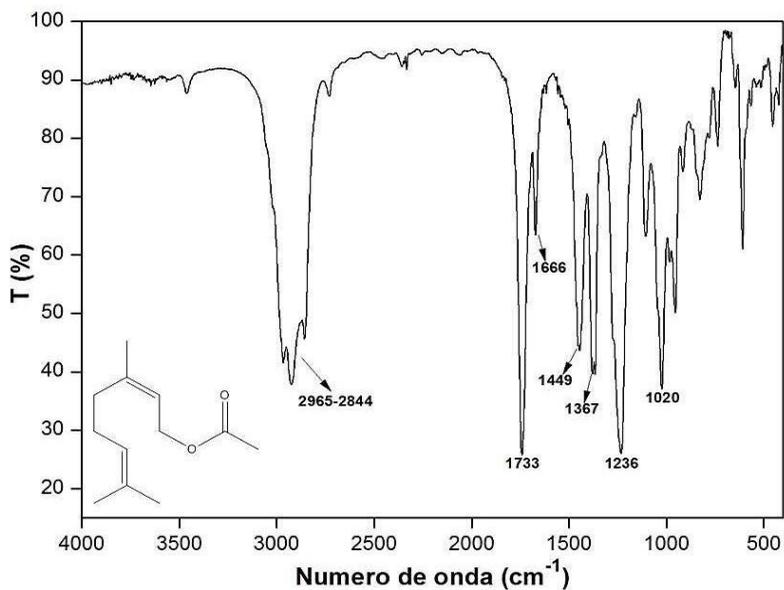
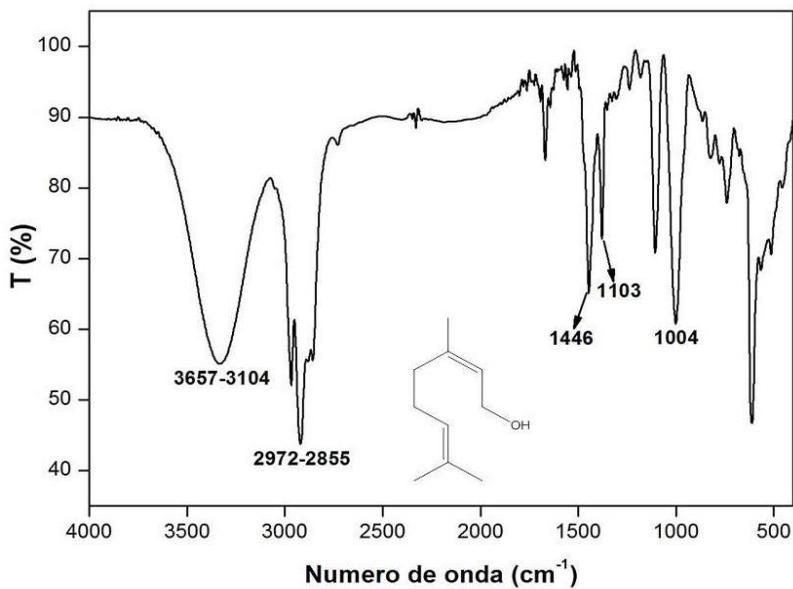
- biocatalyst for biofuel production. **Biotechnology Journal**, v. 11, n. 7, p. 954-960,2016.
116. SILVA, J. M. R.; NASCIMENTO, M. G. Chemo-enzymatic epoxidation of β -caryophyllene using lipases immobilized in agar gel. **Química Nova**, v. 37, n. 6, p. 1022-1027, 2014.
117. LAANE, C. et al. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n.1, p. 81-87, 1987.
118. CURZONS, A. D.; CONSTABLE, D. C.; CUNNINGHAM, V. L. Solvent selection guide: a guide to the integration of environmental, health and safety criteria into the selection of solvents. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 1, n. 2, p. 82-90,1999.
119. PRAT, D.; HAYLER, J.; WELLS, A. **A survey of solvent selection guides**. **Green Chemistry**, v. 16, n. 10, p. 4546-4551,2014.
120. PILISSAO, C.; CARVALHO, P. O.; NASCIMENTO, M. G. Enantioselective acylation of (*R,S*)-phenylethylamine catalyzed by lipases. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 12, p. 1352-1357,2009.
121. BITENCOURT, T. B.; NASCIMENTO, M. G. The influence of organic solvent and ionic liquids on the selective formation of 2-(2-ethylhexyl)-3-phenyl-1,2-oxaziridine mediated by lipases. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 23, n. 10, p. 995-999,2010.

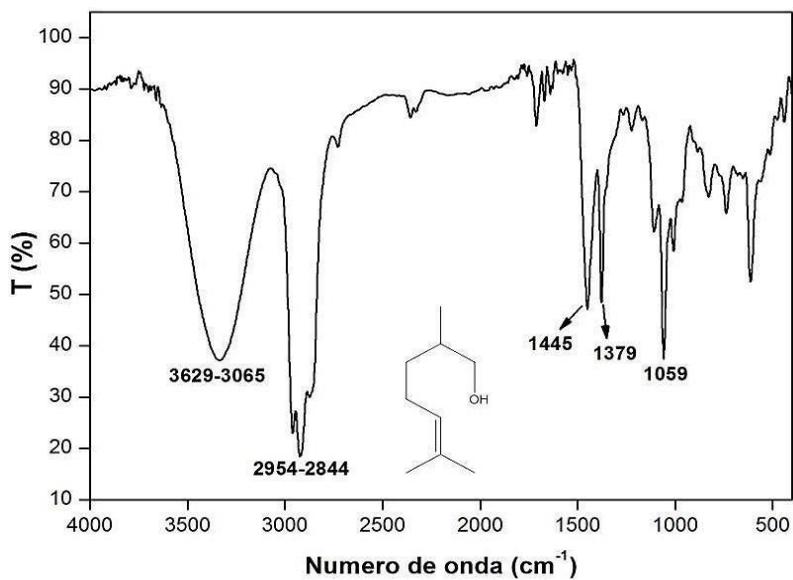
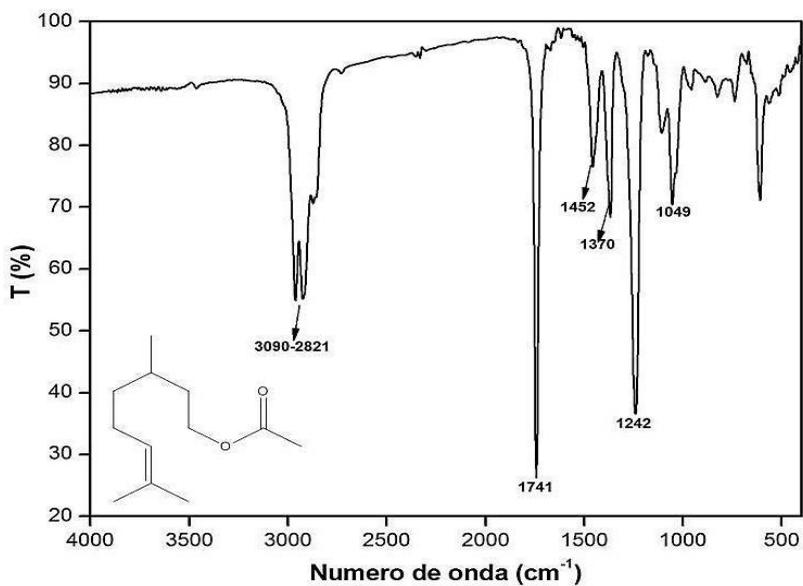
8. Anexos

Anexo I. Curva de calibração do *p*-nitrofenol

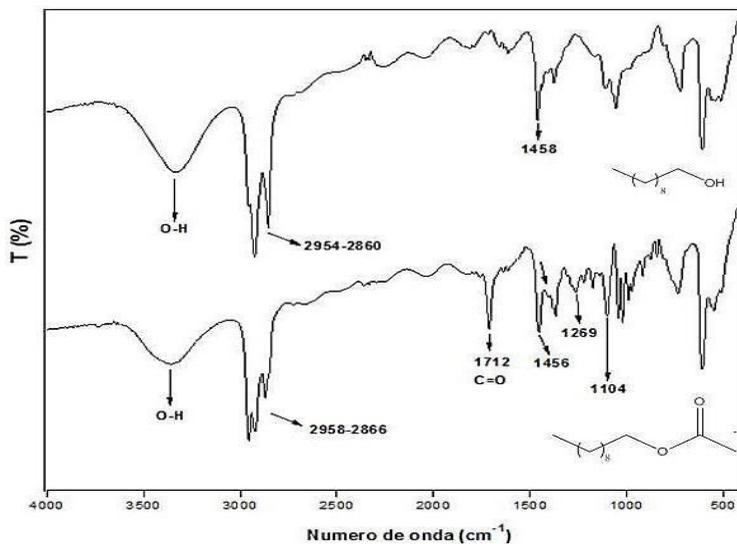
Anexo II. Curva de calibração da albumina bovina (BSA)



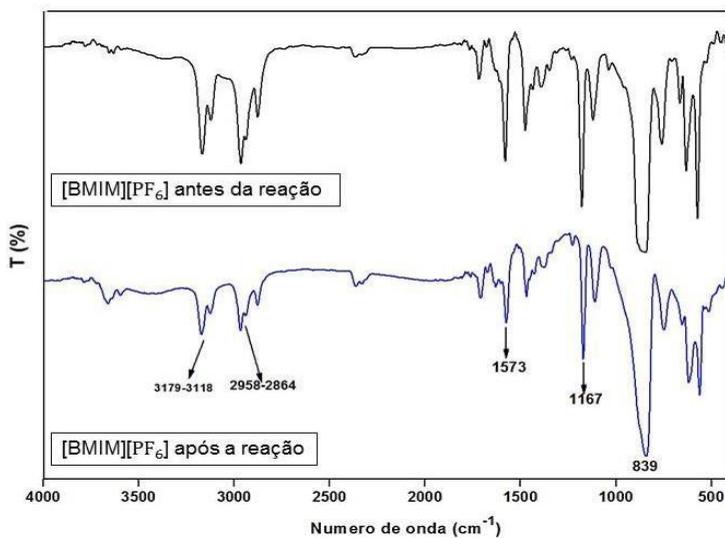
Anexo III. Espectro de FTIR do geraniol (filme)**Anexo IV.** Espectro de FTIR do acetato de geranoíla (filme)

Anexo V. Espectro de FTIR do citrônolol (filme)**Anexo VI. Espectro de FTIR do acetato de citrônella (filme)**

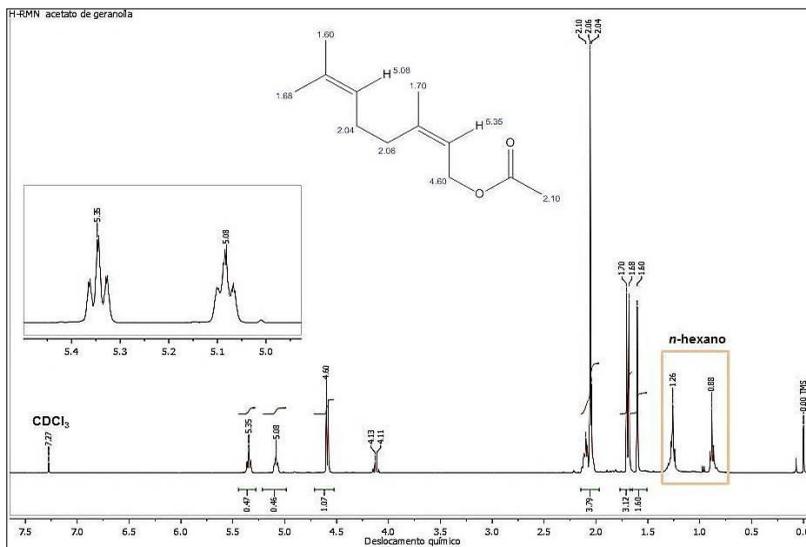
Anexo VII. Espectro de FTIR do *n*-decanol e acetato de *n*-decila (filme)



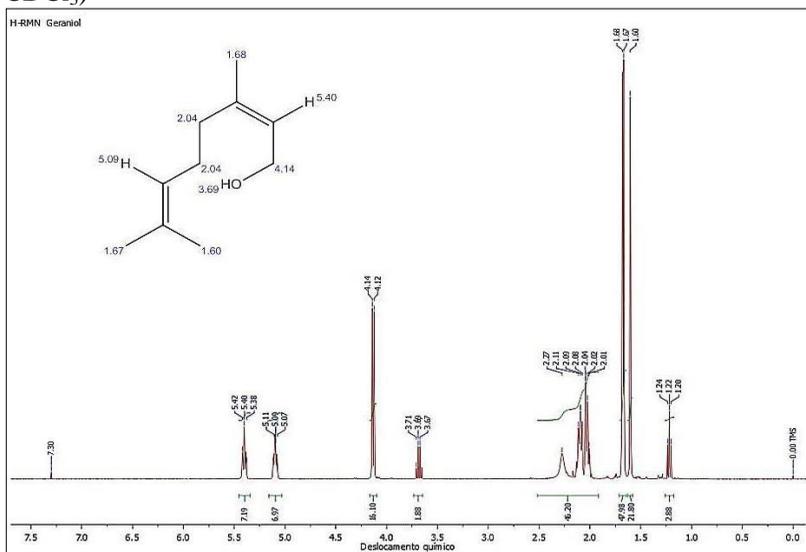
Anexo VIII. Espectro de FTIR do [BMIM][PF₆] antes e após ser usado na preparação do éster **5**.



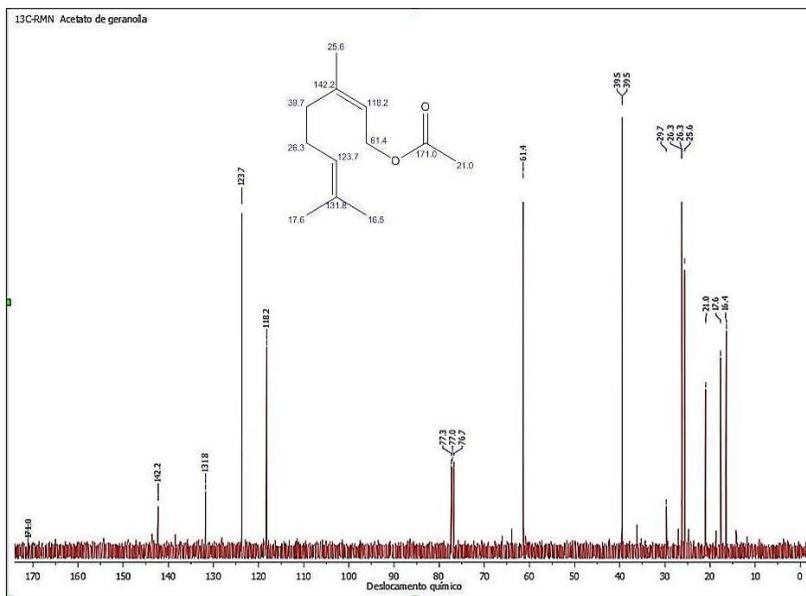
Anexo IX. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ do geraniol (400 MHz, CDCl_3)



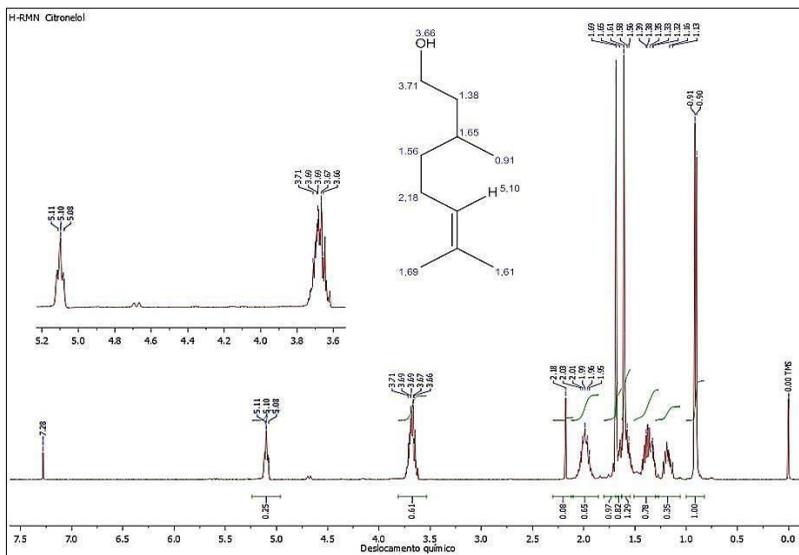
Anexo X. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ do acetato de geraniola (400 MHz, CDCl_3)



Anexo XI. Espectro de ^{13}C -NMR do acetato de geranoíla (100 MHz, CDCl_3)



Anexo XII. Espectro de ^1H -NMR do citronelol (400 MHz, CDCl_3)



Anexo XV. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ do acetato de *n*-decila impuro (400 MHz, CDCl_3)

