



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS BLUMENAU
CENTRO TECNOLÓGICO, DE CIÊNCIAS EXATAS E EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA, PROCESSOS E MATERIAIS
AVANÇADOS

Morgana Aline Voigt

Estudo da eletrorredução da acetofenona e derivados aplicando lipases

Blumenau

2022

Morgana Aline Voigt

Estudo da eletrorredução da acetofenona e derivados aplicando lipases

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência, Processos e Materiais Avançados da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Mestre em Nanociência, Processos e Materiais Avançados

Orientadora: Prof^ª. Patrícia Bulegon Brondani, Dr^ª.

Coorientadora: Prof^ª. Lidiane Meier, Dr^ª.

Blumenau

2022

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

Voigt, Morgana Aline

Estudo da eletrorredução da acetofenona e derivados aplicando lipases / Morgana Aline Voigt ; orientadora, Patrícia Bulegon Brondani, coorientadora, Lidiane Meier, 2022.

103 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Blumenau, Programa de Pós-Graduação em Nanociência, Processos e Materiais Avançados, Blumenau, 2022.

Inclui referências.

1. Nanociência, Processos e Materiais Avançados. 2. Eletrossíntese orgânica. 3. Biocatálise. 4. Redução de cetonas. I. Brondani, Patrícia Bulegon. II. Meier, Lidiane. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Nanociência, Processos e Materiais Avançados. IV. Título.

Morgana Aline Voigt

Estudo da eletrorredução da acetofenona e derivados aplicando lipases

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Eduardo Zapp, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. José Wilmo da Cruz Junior, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Joel Savi dos Reis, Dr.

Universidade Federal Fluminense

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Nanociência, Processos e Materiais Avançados.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof^a. Patrícia Bulegon Brondani, Dr^a.

Orientadora

Blumenau, 2022.

Este trabalho é dedicado os meus amados pais, Norita e Wilson.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Patrícia B. Brondani, por me acolher e me acompanhar em mais esta etapa. Por seus ensinamentos, por toda a atenção e cuidado, por confiar no meu trabalho e incentivar meu crescimento pessoal e profissional.

À minha coorientadora, Prof^a. Lidiane Meier, pela oportunidade de trabalharmos juntas novamente. Pela acessibilidade, por cada contribuição, pela confiança e pela segurança da sua presença e do seu apoio.

Aos membros da banca examinadora de qualificação e dissertação, por contribuir ao aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Prof. Eduardo Zapp, por auxiliar na execução deste estudo desde o início. Pelos esclarecimentos, disponibilidade e constância. Por, junto à Prof^a. Daniela Brondani, conceder e orientar o uso da instrumentação eletroquímica indispensável à realização desta pesquisa.

Ao Prof. Ismael C. Bellettini, por fornecer equipamentos, vidrarias e materiais de consumo. Por toda a assistência durante os ensaios e pelo suporte no laboratório.

À FURB, em especial ao Prof. Paulo C. de Jesus, pela doação de todas as lipases e pela mediação do acesso às análises; à Luana Curbani, pela prestabilidade na realização das análises de CG e ao Yan F. Schafer, pelas análises de RMN.

Ao técnico César Schaefer, pela disposição e colaboração no uso de equipamentos e pelo acesso ao almoxarifado.

À equipe de segurança da UFSC Blumenau, por permitir minha permanência no laboratório além do horário para finalização correta das reações.

Aos amigos e colegas do CReATe, em especial à Eduarda B. Pinheiro, pelos testes iniciais de otimização da eletrossíntese, pelo norte da pesquisa e pelo direcionamento no laboratório. À Gabriele S. Malvessi e à Thaynara D. Hoppe, pela paciência em compartilhar os equipamentos comigo e por todo o auxílio. À Greice M. Zickuhr, por me acompanhar desde os dias de restrição. À Pamela R. Oliveira, ao Luiz F. Keller, à Ana Carolina D. Steil e à Luiza G. Schluter pelos momentos de descontração.

Às minhas professoras Fernanda L. de Faria, Fabiana S. Corrêa, Ana Paula S. I. Boemo, Larissa N. Carli e Pricila C. Barth pelo apoio e incentivo durante este período.

À UFSC e ao PPGNPMat pela oportunidade, pela estrutura e pelo aprendizado. Ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

A eletrossíntese utiliza a transferência de elétrons, em um eletrodo, para realizar reações que podem ser aplicadas à síntese orgânica. Essa metodologia é ambientalmente adequada, branda e acessível. Sua aplicação, embora ampla, é limitada pela necessidade de otimizar diferentes parâmetros de reação e pela seletividade relativamente baixa em determinadas reações. Por exemplo, na redução eletroquímica da acetofenona, há a formação do produto 1-feniletanol juntamente com o dímero de pinacol. O álcool é, no entanto, o intermediário sintético de maior interesse, tendo em vista sua aplicabilidade nas indústrias farmacêutica, alimentícia, de química fina, agrícola e de produtos naturais. Embora existam propostas para o controle da seletividade dessa reação, poucos trabalhos apresentam alternativas realmente efetivas e/ou viáveis. Portanto, neste estudo, propõe-se utilizar a eletroquímica, aliada à biocatálise, para reduzir cetonas de maneira seletiva, visto que as enzimas podem estabilizar o intermediário reativo, evitando a dimerização e levando à formação preferencial do álcool. As enzimas escolhidas para essa função foram as lipases, disponíveis e acessíveis comercialmente, além de especialmente versáteis em síntese orgânica, pois atuam sem a necessidade de cofatores e, geralmente, de forma régio, quimio e enantiosseletiva, mantendo a estabilidade em diversos solventes, temperaturas e condições de pH, principalmente quando imobilizadas em suportes sólidos. Os ensaios foram realizados, em sua maioria, com foco na reação de eletrorredução da acetofenona e diversas combinações de eletrodos, solventes, eletrólitos de suporte e lipases foram testadas. As condições reacionais otimizadas levaram à formação de 87,8% de 1-feniletanol racêmico e são compostas por: eletrodo de trabalho combinado de estanho/chumbo (63:37) revestido com filme de Nafion modificado com lipase de *Thermomyces lanuginosus*, eletrodo auxiliar de platina, potencial aplicado de -2,0 V vs. Ag/AgCl em tampão acetato (0,1 mol L⁻¹) pH 5,0 e tempo reacional de 4 horas. O mesmo eletrodo de trabalho foi utilizado cinco vezes, ao longo de cinco dias, e a conversão ao álcool permaneceu constante. A adição da lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em argilomineral e, comercialmente, em sílica gel (Lipolase 100T) ao meio de eletrorredução resultou em rendimentos ainda maiores quanto à formação de 1-feniletanol (93,2–93,9%), entretanto, o uso do eletrodo modificado tornou a metodologia mais vantajosa quanto à estabilidade da enzima, reprodutibilidade do processo e reutilização de materiais. A eletrorredução de outros substratos, derivados da acetofenona, foi realizada a partir da metodologia descrita. Os resultados foram promissores, tendo em vista que este estudo explora uma temática inédita partindo das reações de redução: a participação ativa e conjunta da eletrossíntese e da biocatálise em transformações orgânicas.

Palavras-chave: Eletrossíntese orgânica. Biocatálise. Lipases. Redução seletiva de cetonas.

ABSTRACT

Electrosynthesis uses the transfer of electrons within an electrode to perform chemical reactions that can be applied in organic synthesis. This methodology is environmentally friendly, mild, and associated with low cost. However, its broad application is limited by the need for parameter optimizations and relatively low selectivity for some reactions. In addition, a mixture of products can be obtained in a few reactions. This is the case, for example, of the electrochemical reduction of acetophenone, in which the pinacol dimer is obtained in addition to 1-phenylethanol. Alcohol is the product of interest because it is a versatile synthetic intermediate: it has applications in the pharmaceutical, food, fine chemistry, agricultural, and natural products industries. Proposals for selectivity control in this reaction exist, but few works present effective and/or viable alternatives. In this study, it is proposed to use electrochemistry allied to biocatalysis to reduce ketones selectively, given that enzymes can stabilize the reactive intermediate, avoiding dimerization and leading to the preferential formation of the alcohol as the main product. The chosen enzymes for this function were lipases, which are commercially available under accessible prices, and especially versatile in organic synthesis as they react without the need for cofactors in regio, chemo, and enantioselective ways. They also preserve their stability under diverse solvents, temperatures, and pH conditions, especially when they are immobilized on solid supports. Most of the tests focused on the reaction of electroreduction of the acetophenone by applying diverse combinations of electrodes, solvents, supporting electrolytes and lipases. The optimized reaction conditions led to the formation of 87.8% of racemic 1-phenylethanol and are composed of: Tin/Lead (63:37) combined working electrode coated with Nafion film modified with lipase from *Thermomyces lanuginosus*, platinum auxiliary electrode, applied potential of -2.0 V vs. Ag/AgCl (KCl 3.0 mol L⁻¹) in acetate buffer (0.1 mol L⁻¹) pH 5.0 and reaction time of 4 hours. The same working electrode was used five times over five days, and the conversion to alcohol remained constant. The addition of lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized in a clay mineral and, commercially, in silica gel (Lipolase 100T) to the electroreduction medium resulted in even higher yields in terms of the formation of 1-phenylethanol (93.2–93.9%). Even though the use of the modified electrode made the methodology more advantageous regarding enzyme stability, process reproducibility, and material reusability, other substrates derived from acetophenone, were electroreduced through the described methodology. The observed results were promising, considering that this work explores a novelty in reduction reactions: the active and joint application of electrosynthesis and biocatalysis in order to perform organic transformations.

Keywords: Organic electrosynthesis. Biocatalysis. Lipases. Selective reduction of ketones.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Vias de interconversão eletroquímica de um substrato genérico (RX).....	20
Figura 2 – Mecanismo simplificado de redução do grupo carbonila de cetonas por adição nucleofílica de íon hidreto a partir de NaBH ₄	22
Figura 3 – Reações de eletrorredução da acetofenona	23
Figura 4 – Eletrorredução da acetofenona em solvente quiral	24
Figura 5 – Eletrorredução da acetofenona com sais de amônio como eletrólitos de suporte...25	
Figura 6 – Eletrorredução da acetofenona mediado por complexo quiral de ródio (III).....	26
Figura 7 – Eletrorredução da acetofenona induzida por quinidina (QD)	26
Figura 8 - Eletrorredução da acetofenona na presença de cinconidina (CD)	27
Figura 9 – Eletrorredução da acetofenona na presença de éteres de coroa substituídos	27
Figura 10 – Eletrorredução da acetofenona na presença de β-ciclodextrina	28
Figura 11 – Eletrorredução da acetofenona com eletrodo modificado com AuNPs e S-CMF	28
Figura 12 – Eletrorredução da acetofenona com álcool desidrogenase como catalisador enzimático.....	29
Figura 13 - Representação esquemática das forças de ligação em uma estrutura proteica	31
Figura 14 – Representação da estrutura e do sítio ativo da lipase de <i>Psychrobacter sp</i>	32
Figura 15 – Mecanismo catalítico proposto para lipases.....	33
Figura 16 – Reação modelo: eletrorredução da acetofenona (1) ao álcool (2) e ao dímero (3).....	37
Figura 17 – Hidrólise do butirato de 4-nitrofenila (4) mediada por lipase.....	38
Figura 18 – Reação de redução eletroquímica da acetofenona (1).....	45
Figura 19 – Voltamograma cíclico de 0,05 mol L ⁻¹ de 1 em cossolvente (CH ₃ CN/tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹) pH 7,4; 1/1), com adição de TBAPF ₆ (0,1 mol L ⁻¹), a uma taxa de varredura de 0,1 V s ⁻¹ , com W = Sn/Pb (63:37), R = Ag/AgCl e C = Pt.....	47
Figura 20 – Sistema reacional (a) no tempo zero e (b) após 4 horas de reação	47
Figura 21 – Estudo de estabilidade das lipases comercializadas em solução quando livres e após imobilização em diferentes suportes	49
Figura 22 – Estudo de estabilidade das lipases comercializadas liofilizadas quando livres e após imobilização em Celite®	51
Figura 23 – Reação de redução eletroquímica de 1 sob a condição reacional da Entrada 15 (Tabela 3), na presença de lipase.....	52
Figura 24 – Eletrorredução da acetofenona (1) e proteção do 1-feniletanol (2) mediada por lipase.....	56

Figura 25 – Possível atuação da tríade catalítica (Ser ₁₄₆ -His ₂₅₈ -Asp ₂₀₁ em azul), do bolsão do oxianion (Ser ₈₃ e Leu ₁₄₇ em verde) e da tampa (Trp ₈₉ em preto) da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> na estabilização do intermediário precursor do 1-feniletanol (em alaranjado). ...	59
Figura 26 – Voltamogramas cíclicos de 0,05 mol L ⁻¹ de 1 em cossolvente (CH ₃ CN/tampão acetato (0,1 mol L ⁻¹) pH 5,0; 1/1) e TBAPF ₆ (0,1 mol L ⁻¹); taxa de varredura de 0,1 V s ⁻¹ ; com W = Sn/Pb (63:37), Sn/Pb (63:37) + Nafion ou E-NLTL, R = Ag/AgCl e C = Pt	61
Figura 27 – Testes de reutilização do eletrodo E-NLTL para eletrorredução de 0,48 mmol de 1 , em 4,0 mL de tampão acetato (0,1 mol L ⁻¹) pH 5,0, sob potencial de -2,0 V vs. Ag/AgCl, a 25 °C, durante 4 horas	61
Figura 28 – Influência do pH sobre (A) o potencial e (B) a corrente de pico resultantes da eletrorredução de 1 , com eletrodo de trabalho E-NLTL, em soluções tampão (0,1 mol L ⁻¹) acetato (pH 4-5) e fosfato (pH 6-8) contendo 0,05 mol L ⁻¹ do substrato e 0,1 mol L ⁻¹ de TBAPF ₆ , com acetonitrila como cossolvente. Resultados obtidos por voltametria cíclica.	62
Figura 29 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz) para o composto 2 em CDCl ₃	86
Figura 30 – Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz) para o composto 2 em CDCl ₃	87
Figura 31 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz) para o composto 7 em CDCl ₃	88
Figura 32 – Espectro de ¹³ C (75 MHz) para o composto 7 em CDCl ₃	89
Figura 33 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz) para o composto 9 em CDCl ₃	90
Figura 34 – Espectro de ¹³ C (75 MHz) para o composto 9 em CDCl ₃	91
Figura 35 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz) para o composto 11 em CDCl ₃	92
Figura 36 – Espectro de ¹³ C (75 MHz) para o composto 11 em CDCl ₃	93
Figura 37 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz) para o composto 13 em CDCl ₃	94
Figura 38 – Espectro de ¹³ C (75 MHz) para o composto 13 em CDCl ₃	95
Figura 39 – Cromatograma obtido por CG da mistura reacional final de eletrorredução da acetofenona (1) com eletrodo combinado de Sn/Pb (63:37), na presença de lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada em sílica gel (Lipolase 100T), em tampão acetato (0,1 mol L ⁻¹) pH 5,0, sob potencial de -2,0 V vs. Ag/AgCl por 4 horas (Tabela 6, Entrada 11).....	96
Figura 40 – Cromatograma obtido por CG da mistura reacional final de eletrorredução da acetofenona (1) com eletrodo combinado de Sn/Pb (63:37), na presença de lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada em MMT modificada, em tampão acetato (0,1 mol L ⁻¹) pH 5,0, sob potencial de -2,0 V vs. Ag/AgCl por 4 horas (Tabela 6, Entrada 12).....	97
Figura 41 – Cromatograma obtido por CG da mistura reacional final de eletrorredução da acetofenona (1) com E-NLTL, em tampão acetato (0,1 mol L ⁻¹) pH 5,0, sob potencial de -2,0 V vs. Ag/AgCl por 4 horas (Tabela 7, Entrada 2)	98

Figura 42 – Cromatograma obtido por CG da mistura reacional final de eletrorredução da 4-metilacetofenona (6) com E-NLTL, em tampão acetato (0,1 mol L ⁻¹) pH 5,0, sob potencial de -2,0 V vs. Ag/AgCl por 4 horas (Tabela 8, Entrada 1)	99
Figura 43 – Cromatograma obtido por CG da mistura reacional final de eletrorredução 4-metoxiacetofenona (8) com E-NLTL, em tampão acetato (0,1 mol L ⁻¹) pH 5,0, sob potencial de -2,0 V vs. Ag/AgCl por 4 horas (Tabela 8, Entrada 2)	100
Figura 44 – Cromatograma obtido por CG da mistura reacional final de eletrorredução 4-fluoroacetofenona (10) com E-NLTL, em tampão acetato (0,1 mol L ⁻¹) pH 5,0, sob potencial de -2,0 V vs. Ag/AgCl por 4 horas (Tabela 8, Entrada 3)	101
Figura 45 – Cromatograma obtido por CG da mistura reacional final de eletrorredução 4-bromoacetofenona (12) com E-NLTL, em tampão acetato (0,1 mol L ⁻¹) pH 5,0, sob potencial de -2,0 V vs. Ag/AgCl por 4 horas (Tabela 8, Entrada 4)	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das enzimas conforme o tipo de reação catalisada	30
Tabela 2 – Seleção de condições experimentais testadas para eletrorredução de 1	45
Tabela 3 – Seleção de condições experimentais testadas para eletrorredução de 1 (continuação da Tabela 2)	46
Tabela 4 – Testes com adição de lipases à eletrorredução de 1	53
Tabela 5 – Testes com adição de lipases à eletrorredução de 1 (continuação da Tabela 4).....	54
Tabela 6 – Ensaio de eletrorredução de 1 em tampão acetato pH 4,0 e pH 5,0.....	57
Tabela 7 – Desempenho do E-NLTL aplicado à eletrorredução de 1	60
Tabela 8 – Ensaio de eletrorredução para diferentes cetonas nas condições otimizadas.....	63
Tabela 9 – Estudo de estabilidade da lipase de <i>Candida antarctica</i> B.....	78
Tabela 10 – Estudo de estabilidade da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>	79
Tabela 11 – Estudo de estabilidade da lipase de <i>Aspergillus oryzae</i>	80
Tabela 12 – Estudo de estabilidade da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	81
Tabela 13 – Estudo de estabilidade da lipase F-AP15 (Amano) de <i>Rhizopus oryzae</i>	82
Tabela 14 – Estudo de estabilidade da lipase M (Amano) de <i>Mucor javanicus</i>	82
Tabela 15 – Estudo de estabilidade da lipase A (Amano) de <i>Aspergillus niger</i>	82
Tabela 16 – Estudo de estabilidade da lipase de <i>Candida rugosa</i> tipo VII.....	83
Tabela 17 – Estudo de estabilidade da lipase AK (Amano) de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	83
Tabela 18 – Estudo de estabilidade da lipase de pâncreas de porco tipo II.....	83
Tabela 19 – Estudo de estabilidade da lipase PS (Amano) de <i>Burkholderia cepacia</i>	84
Tabela 20 – Testes com adição de TMSCl à (bio)eletrorredução da acetofenona (1).....	85

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÔNIMOS E SIGLAS

δ – Deslocamento químico

ADH – Álcool desidrogenase

Ag/AgCl – Eletrodo de referência de prata/cloreto de prata

APTS – 3-aminopropiltriétoxissilano

AuNPs – Nanopartículas de ouro

C – Eletrodo auxiliar ou contra-eletrodo

CAL-B – Lipase de *Candida antarctica B*

CCD – Cromatografia de camada delgada

CD – Cinconidina

CG – Cromatografia gasosa

DP – NADH-diaforase

E – Potencial elétrico

E-NLTL – Eletrodo combinado de estanho/chumbo (63:37) revestido com filme de Nafion modificado com lipase de *Thermomyces lanuginosus*

FID – Detector de ionização de chama

FRN - Ferredoxina-NAD(P)⁺ redutase

FURB – Fundação Universidade Regional de Blumenau

G – Energia livre de Gibbs

h - Horas

HOMO – *Highest occupied molecular orbital*

i – Corrente elétrica

J – Constante de acoplamento

LUMO – *Lowest unoccupied molecular orbital*

MMT – Montmorilonita

MV²⁺ – Metil-viologen

NAD(P)H – Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

NC-IUBMB – *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*

pH – Potencial hidrogeniônico

ppm – Partes por milhão

QD – Quinidina

R – Eletrodo de referência

RMN – Ressonância magnética nuclear
RMN ¹³C – Ressonância magnética nuclear de carbono treze
RMN ¹H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RX – Substrato genérico
ROL – Lipase de *Rhizopus oryzae*
S-CMF – Multifareno quirál
Ser-His-Asp – Tríade catalítica serina-histidina-aspartato
Sn/Pb (63:37) – Liga metálica composta por 63% de estanho e 37% de chumbo
TBABF₄ – Tetrafluorborato de tetrabutílamônio
TBABr – Brometo de tetrabutílamônio
TBAF – Fluoreto de tetrabutílamônio
TBAP – Perclorato de tetrabutílamônio
TBAPF₆ – Hexafluorofosfato de tetrabutílamônio
TMS – Tetrametilsilano
TMSCl – Cloreto de trimetilsilano
T_R – Tempo de retenção
Trp89 – Resíduo de triptofano na posição 89
U – Unidade de atividade
UV-Vis – Ultravioleta-visível
W – Eletrodo de trabalho

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS	18
1.1.1 Objetivo Geral	18
1.1.2 Objetivos Específicos	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 ELETROSSÍNTESE ORGÂNICA	20
2.2 ELETORREDUÇÃO DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS	22
2.2.1 Eletrorredução da acetofenona	23
2.2.1.1 <i>Eletrorredução enzimática da acetofenona</i>	29
2.3 ENZIMAS	30
2.3.1 Lipases	31
2.3.1.1 <i>Imobilização de lipases</i>	33
3 PARTE EXPERIMENTAL	35
3.1 INSTRUMENTAÇÃO	35
3.2 REAGENTES E SOLUÇÕES	36
3.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS DE ELETORREDUÇÃO	37
3.4 ESTUDO DA ATIVIDADE E DA ESTABILIDADE DAS LIPASES	38
3.4.1 Imobilização das lipases livres em diferentes suportes	38
3.5 REDUÇÃO ELETROSSÍNTESE DA ACETOFENONA APLICANDO LIPASES ...	39
3.6 ESTUDOS ADICIONAIS NA PRESENÇA DE LIPASES SELECIONADAS	40
3.6.1 Eletrorredução da acetofenona e proteção <i>one-pot</i> do 1-feniletanol	40
3.6.2 Eletrorredução da acetofenona em diferentes condições de pH	41
3.6.3 Preparação e desempenho do eletrodo modificado com lipase (E-NLTL)	41
3.6.3.1 <i>Imobilização da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> sobre a superfície do eletrodo</i>	41
3.6.3.2 <i>Eletrorredução da acetofenona empregando E-NLTL como eletrodo de trabalho</i>	41
3.7 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS	42
3.7.1 Medidas voltamétricas	42
3.7.2 Medidas coulométricas	43
3.8 EXPANSÃO DA METODOLOGIA NAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE REAÇÃO	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 PRIMEIROS ENSAIOS DE ELETORREDUÇÃO: DA SELEÇÃO DOS ELETRODOS AO SISTEMA DE SOLVENTES	45

4.2 ESTUDO DA ATIVIDADE E DA ESTABILIDADE DAS LIPASES.....	48
4.3 REDUÇÃO ELETROSSÍNTETICA DA ACETOFENONA APLICANDO LIPASES ...	52
4.4 ESTUDOS ADICIONAIS NA PRESENÇA DAS LIPASES SELECIONADAS.....	55
4.4.1 Adição de TMSCl à eletrorredução da acetofenona catalisada por lipase.....	55
4.4.2 Influência do pH na eletrorredução da acetofenona aplicando lipases	56
4.4.3 Eletrorredução da acetofenona com lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada no eletrodo	59
4.4.3.1 Efeito do pH sobre a resposta voltamétrica	62
4.5 EXPANSÃO DA METODOLOGIA NAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE REAÇÃO	63
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
REFERÊNCIAS	67
APENDICE A – Tabelas Informativas.....	78
APÊNDICE B – Espectros e Cromatogramas	86

1 INTRODUÇÃO

A origem da eletroquímica remonta aos anos 1800, quando o físico Alessandro Volta inventou a primeira bateria elétrica capaz de gerar corrente contínua. Apenas em 1830, porém, Michael Faraday utilizou a eletricidade para sintetizar compostos orgânicos pela primeira vez. Durante a segunda metade do século 19, a eletroquímica orgânica floresceu e várias oxidações e substituições oxidativas, bem como reduções de compostos nitro, derivados de carbonila e reações de desalogenação foram realizadas; no entanto, na maioria dos casos, foram obtidas misturas de produtos [1]. Após 200 anos de desenvolvimento, a eletrossíntese orgânica tem atraído cada vez mais a atenção dos cientistas e, especialmente na última década, avanços consideráveis foram alcançados [2–7].

Durante uma reação eletroquímica, as moléculas do substrato são ativadas pela adição ou remoção de elétrons na superfície de um eletrodo [8]. A aplicação de uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho (W), em que ocorre a reação de interesse, e um segundo eletrodo (contra-eletrodo ou eletrodo auxiliar (C)), permite que ocorram reações de oxidação e redução, usando uma fonte de alimentação externa [9,10].

Há casos em que a transformação molecular desejada requer um potencial seletivo para um único grupo funcional, quando na presença de outros com potencial padrão ligeiramente diferente. Este objetivo pode ser alcançado pelo controle do potencial do eletrodo de trabalho em relação a um eletrodo de referência (R), com potencial constante e conhecido. Esse processo é chamado de eletrólise potenciostática e pode conduzir transformações muito seletivas [11].

Nestes moldes, a eletrossíntese orgânica é capaz de converter grupos funcionais por meio de mecanismos e intermediários reativos cinética e ambientalmente mais favoráveis que os métodos sintéticos convencionais. Nestes últimos, muitas vezes, a reação não ocorre de forma espontânea devido à alta energia de ativação, sendo necessário o emprego de catalisadores, temperaturas elevadas, variação de pressão ou equipamentos como ultrassom e micro-ondas [12,13]. A síntese eletroquímica, por sua vez, geralmente pode ser realizada à temperatura ambiente e pressão atmosférica, sem emprego de reagentes tóxicos e com instalações simples, exigindo apenas o controle adequado do potencial do eletrodo de trabalho (ou da corrente da célula) para promover a seletividade e regular a taxa de reação [13].

O grande desafio da eletrossíntese orgânica é encontrar a melhor condição reacional, tendo em vista os diferentes parâmetros a serem otimizados. As variáveis podem estar relacionadas aos tipos de eletrodos, ao eletrólito de suporte ou ao solvente utilizado, além da magnitude do potencial elétrico a ser aplicado [9]. Ao contrário da síntese orgânica tradicional,

a eletrossíntese é fortemente dependente do equipamento utilizado, pois os artefatos associados ao dispositivo podem interferir na eficiência do sistema reacional [14].

Para auxiliar no desenvolvimento da área, mais estudos metodológicos e mecanísticos de sistemas eletrossintéticos são necessários a fim de que se forneça uma visão de como as transformações existentes podem ser melhoradas e de como novos protocolos podem ser desenvolvidos [10]. Neste sentido, a eletrorredução da acetofenona é um exemplo de reação orgânica típica, conhecida na literatura pela dificuldade de obtenção do 1-feniletanol como produto principal, pois muito comumente ocorre a dimerização, levando à mistura de produtos [15–18]. O 1-feniletanol, bem como diversos álcoois principalmente em suas formas enantiopuras, é usado como bloco de construção quiral e intermediário sintético na produção de fármacos, alimentos, fragrâncias, pesticidas e produtos naturais [19].

Logo, para que ocorra a formação preferencial do álcool a partir da eletrorredução da acetofenona, o intermediário radicalar gerado na primeira etapa da reação deve ser estabilizado, evitando que o processo siga a rota competitiva de dimerização. Bons resultados quanto à seletividade da reação foram obtidos a partir da adição de sais de amônio como eletrólitos de suporte, além da utilização de catalisadores de metais de transição. Entretanto, ambos os aditivos tem um alto valor agregado e o primeiro não pode ser reciclado, permanecendo em solução após o isolamento do produto de interesse [20–27].

Alguns estudos utilizando catalisadores orgânicos, como a quinidina e a cinconidina, além de éteres de coroa substituídos ou β -ciclodextrina, foram realizados com o propósito de formação majoritária do álcool. Em todos os casos, porém, o produto principal foi derivado da dimerização [17,28–31].

Unindo as propostas anteriores, um novo eletrodo modificado com nanopartículas de ouro e um composto macrocíclico quiral também foi utilizado para reduzir a acetofenona. A reação apresentou bom rendimento e certa enantiosseletividade quanto à formação de 1-feniletanol, mas a adição de sal de amônio ao meio reacional continuou indispensável para conversão [32].

Uma alternativa a ser explorada é a utilização de enzimas na estabilização do intermediário radicalar que leva ao 1-feniletanol como produto. Visto que a eletroquímica já é aliada conhecida da biocatálise em sistemas que levam à regeneração de cofatores, que são moléculas orgânicas ou íons metálicos indispensáveis a atividade de algumas enzimas, sabe-se que o potencial pode ser aplicado no mesmo meio reacional que o biocatalisador [33–37].

Como catalisadores naturais, as enzimas possuem especificidade, reatividade e propriedades físico-químicas, catalíticas e biológicas diversificadas, podendo catalisar reações

orgânicas com boa estereo, quimio e/ou regioselectividade, em condições amenas de temperatura e pressão. Existem muitas opções de biocatalisadores disponíveis e, graças aos avanços na biotecnologia e engenharia de proteínas, é possível produzir enzimas comerciais a preços acessíveis [38–40].

As enzimas mais utilizadas em síntese orgânica atualmente são as lipases, pertencentes à classe das carboxil éster hidrolases, cujos substratos naturais são glicerídeos de cadeia longa. No entanto, moléculas como ésteres, amidas e álcoois também são substratos para estas enzimas [41], que promovem a catálise de reações de esterificação, transesterificação, interesterificação, acidólise, alcoólise, aminólise e lactonização [42,43].

De modo geral, as lipases podem ser utilizadas em condições bastante diversas, como temperaturas altas, pH variável e presença de solventes orgânicos. Nesse sentido, as espécies imobilizadas são mais estáveis que suas contrapartes livres, visto que se tornam rígidas quando confinadas em suportes sólidos [44], como os argilominerais [45], as sílicas [46–48] e uma vasta gama de polímeros naturais e sintéticos aplicados, inclusive, para modificação de eletrodos e preparação de biossensores eletroquímicos [49].

Com base no exposto, este estudo propõe a utilização da eletroquímica, aliada à biocatálise, na redução seletiva de cetonas aos seus álcoois correspondentes, evitando a dimerização. Os ensaios, em sua maioria, foram destinados à eletrorredução da acetofenona ao 1-feniletanol, reação modelo escolhida com finalidade de otimizar parâmetros e expandir o sistema a outras cetonas.

A (bio)eletrossíntese orgânica proposta é um nicho a ser explorado, com destaque à utilização de enzimas em conjunto com a eletroquímica para além da regeneração de cofatores e coenzimas em aplicações de oxirredutases. Até então, não foram identificados estudos da aplicação de hidrolases em reações eletrossintéticas. Nesta dissertação, realizou-se um estudo completo sobre a utilização de eletroquímica e biocatálise combinadas para realizar reações de redução.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver uma metodologia alternativa para a redução da acetofenona e derivados aos correspondentes álcoois, utilizando eletroquímica aliada à biocatálise.

1.1.2 Objetivos Específicos

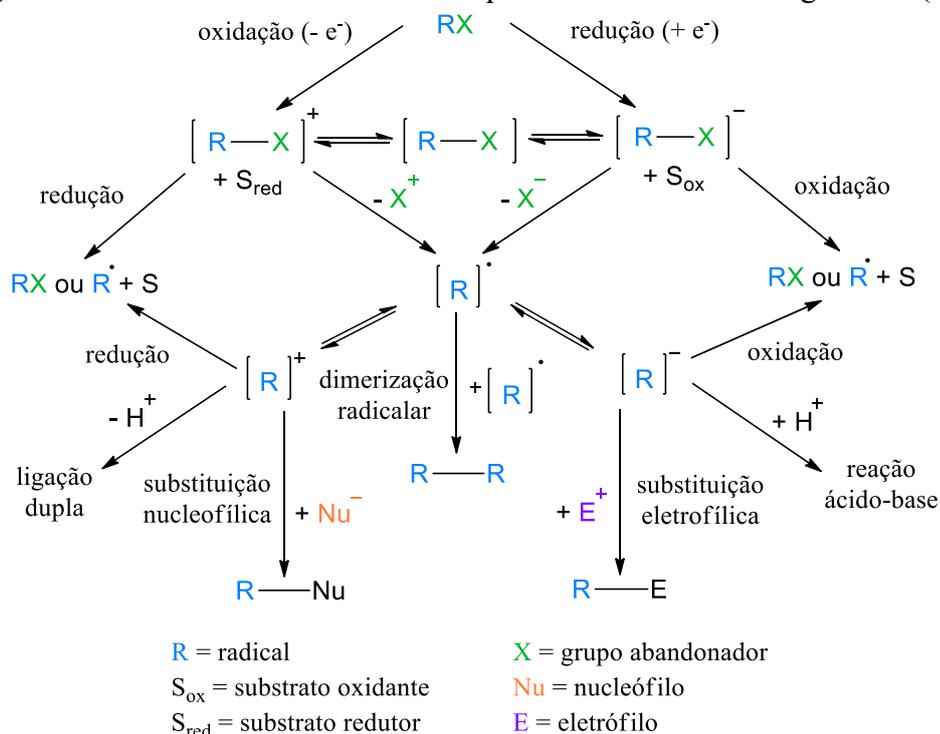
- Otimizar as condições reacionais para eletrorredução da acetofenona ao 1-feniletanol modificando o sistema de eletrodos, a natureza do solvente e dos eletrólitos de suporte, a magnitude do potencial aplicado e o tempo de reação.
- Verificar, por voltametria cíclica, o comportamento eletroquímico da acetofenona nas condições reacionais pré-otimizadas.
- Realizar um estudo comparativo sobre a estabilidade das lipases nas condições de estudo quando livres e quando imobilizadas em diferentes suportes.
- Realizar a eletrorredução da acetofenona com adição das lipases de acordo com sua estabilidade.
- Combinar a eletrorredução da acetofenona e a proteção do 1-feniletanol, na presença de lipases selecionadas, pela adição de clorossilano ao meio reacional.
- Realizar um estudo sobre a influência do solvente e da condição de pH na seletividade da eletrorredução aplicando lipases selecionadas.
- Construir um eletrodo de trabalho revestido por filme de Nafion modificado com lipase e avaliar seu desempenho frente à eletrorredução da acetofenona nas condições otimizadas.
- Expandir a metodologia (bio)eletrossintética otimizada para reduzir diferentes cetonas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ELETROSSÍNTESE ORGÂNICA

As reações eletroquímicas de compostos orgânicos ocorrem por meio de uma transferência de elétrons que converte a molécula do substrato em um intermediário reativo para, em seguida, formar o produto desejado (Figura 1) [8].

Figura 1 – Vias de interconversão eletroquímica de um substrato genérico (RX)



Fonte: Adaptado de BARD et al., 2004 [8]

Na primeira etapa da reação, um elétron é retirado da superfície do cátodo e transferido para o orbital molecular desocupado de mais baixa energia (*lowest unoccupied molecular orbital* - LUMO) da molécula do substrato, resultando em sua redução. O processo oposto ocorre no ânodo quando um elétron do orbital molecular ocupado de mais alta energia (*highest occupied molecular orbital* - HOMO) da molécula do substrato é removido, resultando em sua oxidação [1,4]. Os intermediários obtidos nessa etapa (radicais, ânions ou cátions) são tão instáveis que podem reagir facilmente entre si ou com outros compostos, dependendo das condições eletrolíticas. A segunda etapa pode, portanto, ser constituída de reações de substituição nucleofílica (no ânodo) ou eletrofílica (no cátodo), da formação de ácidos e bases, da formação de ligações C-C por acoplamento ou da dimerização ou polimerização via adição

radicalar [8,9,12]. Nos últimos anos, várias reações foram conduzidas por meio de eletrossíntese, como funcionalizações de alquino [50], funcionalizações de alqueno [51], ciclizações em cascata [52], ativações de ligação C-H [53] e halogenações [54,55].

As conversões eletroquímicas podem ser aplicadas a todos os substratos orgânicos que possuem grupos eletroativos ou que podem reagir com intermediários eletrogerados, sem que nenhum reagente adicional precise ser anexado [9,56]. Do ponto de vista de evitar o uso de quantidades estequiométricas de oxidantes ou redutores, a eletrossíntese orgânica é, sem dúvida, uma estratégia sintética muito mais ecológica do que os métodos tradicionais [57,58]. Assim, os agentes altamente reativos e/ou tóxicos podem ser totalmente evitados (eletrossíntese direta) ou gerados *in situ* na superfície do eletrodo de maneira controlada (eletrossíntese indireta) [33]. Esses reagentes, oxidantes ou redutores, são substituídos pela eletricidade e, como o elétron não está ligado a um composto químico, o processo se torna inerentemente livre de toxicidade e poluição [9,56].

Outra vantagem da eletrossíntese orgânica é que uma caracterização eletroquímica preliminar da reatividade das moléculas de interesse pode ser realizada de forma simples e rápida usando voltametria cíclica. A partir desse estudo, é possível prever quais grupos funcionais podem ser oxidados ou reduzidos [59]. O ajuste cuidadoso do potencial da célula pode, então, evitar reações colaterais indesejadas, difíceis de controlar quando quantidades estequiométricas de agentes redox são usadas [10,60].

A natureza dos eletrodos e a composição da solução podem ser usadas como parâmetros de reação para controlar a seletividade e a taxa de conversão. Os eletrodos podem ser considerados como catalisadores heterogêneos, sendo removidos fisicamente no final da reação [11]. Já os solventes/eletrolitos comumente utilizados são, na maioria dos casos, baratos, flexíveis, fáceis de reciclar e permitem o isolamento simples do produto [9].

De modo geral, a eletrossíntese orgânica é conduzida à pressão atmosférica e à temperatura ambiente, solventes e reagentes de pureza usual são suficientes e pequenas quantidades de água e oxigênio molecular podem ser toleradas. Além disso, a célula de eletrólise e o equipamento adicional podem ser usados com flexibilidade para uma variedade de reações diferentes e a escala da reação pode ser aumentada expandindo a área do eletrodo de trabalho [9,12,55].

Apesar das vantagens oferecidas pela eletrossíntese orgânica, sua aplicação na química orgânica sintética tem sido limitada pela falta de células e eletrodos padronizados, levando a uma reprodutibilidade pobre [10]. Encontrar as melhores condições reacionais envolve o estudo de diferentes parâmetros, como eletrodos, eletrólitos, solventes, potencial elétrico e corrente.

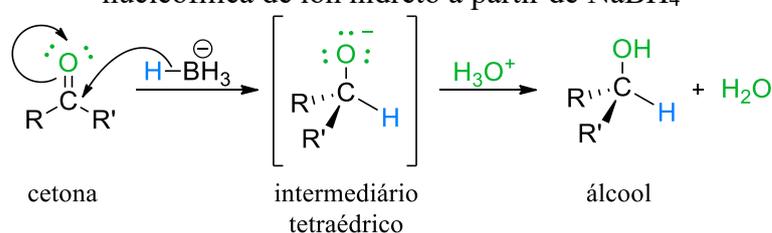
Além disso, é fundamental que a eletrólise conduza, de forma limpa, a um único intermediário que reaja por uma via dominante até formar o produto desejado [61].

2.2 ELETORREDUÇÃO DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS

Uma síntese eficiente é caracterizada por poucas etapas para atingir a molécula alvo, alta seletividade, materiais de partida prontamente disponíveis e custo baixo de reagentes e processos. A “química verde” é caracterizada por rotas sintéticas que empregam condições reacionais brandas, reagentes e solventes não tóxicos, altos padrões de segurança, que fazem uso eficiente de recursos e energia e, que geram menor quantidade de resíduos [9].

As reações orgânicas geralmente requerem o emprego de condições especiais ou adição de catalisadores para que ocorram em tempos reacionais aceitáveis [12]. A hidrogenação clássica de ligações duplas, por exemplo, é obtida cataliticamente pela adição de hidrogênio molecular ou, no caso de ligações duplas eletrofilicas, pela adição de um íon hidreto [9]. Contempladas no último cenário, as reações de redução do grupo carbonila de aldeídos e cetonas são viabilizadas pela utilização de boroidreto de sódio (NaBH_4), geralmente com metanol ou etanol como solvente [62]. No caso da redução de ácidos carboxílicos e a maioria de seus derivados, o hidreto de lítio e alumínio (LiAlH_4) é utilizado em reações com éter etílico, por exemplo, como solvente [63]. Ambos, NaBH_4 e LiAlH_4 , agem como transferidores de íon hidreto em uma reação de adição nucleofílica (ou substituição, no caso de derivados de ácidos carboxílicos). O produto inicial é um íon alcóxido, protonado pela adição de ácido em uma segunda etapa para formar o álcool como produto final (Figura 2) [64].

Figura 2 – Mecanismo simplificado de redução do grupo carbonila de cetonas por adição nucleofílica de íon hidreto a partir de NaBH_4



Fonte: Adaptado de McMURRY, 2014 [64]

Embora as abordagens tradicionais sejam confiáveis para a produção dos compostos alvo, o emprego de métodos eletrossintéticos pode levar a regio, quimio e estereosseletividades alternativas àquelas encontradas na hidrogenação não eletroquímica [9,12,13]. Além disso, do ponto de vista operacional, a capacidade de redução do sistema eletroquímico pode ser

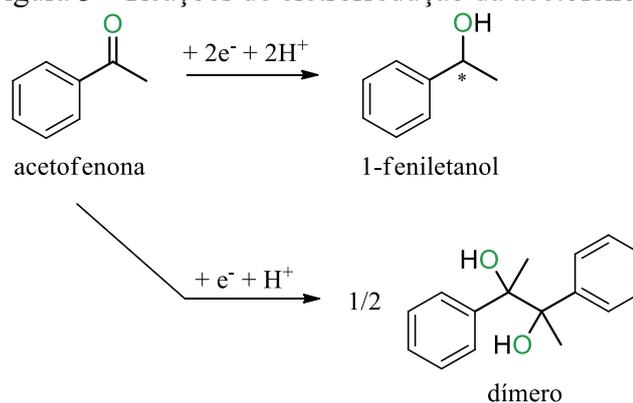
opcionalmente alterada variando a corrente ou o potencial, o que permite a expansão da metodologia a reações que não ocorrem na presença de redutores químicos exógenos [57].

Os álcoois formados nestes processos são intermediários importantes para a síntese de muitos medicamentos, pesticidas, flavorizantes, fragrâncias, cristais líquidos e auxiliares quirais [19], porém, a eletrorredução de compostos carbonílicos é conhecida na literatura pela dificuldade de obtenção destes compostos como produto principal. Devido à formação de radicais na primeira etapa da reação, a formação do álcool compete com a dimerização na segunda etapa, levando à mistura de produtos [16]. Existem relatos de tentativas de controle da seletividade da reação, embora as metodologias se mostrem pouco eficazes e/ou inviáveis quanto à formação majoritária do álcool [9,16,17].

2.2.1 Eletrorredução da acetofenona

A acetofenona, uma das cetonas pró-quirais cuja redução é amplamente estudada, tem a capacidade comprovada de receber um ou dois elétrons. Em eletrossínteses convencionais, a acetofenona pode sofrer uma reação de redução recebendo dois elétrons, levando ao 1-feniletanol como produto. Porém, devido à coexistência competitiva da rota de dimerização, a reação de redução de um elétron pode ser seguida pela formação majoritária de 2,3-difenilbutano-2,3-diol, o dímero de pinacol correspondente (Figura 3) [65].

Figura 3 – Reações de eletrorredução da acetofenona



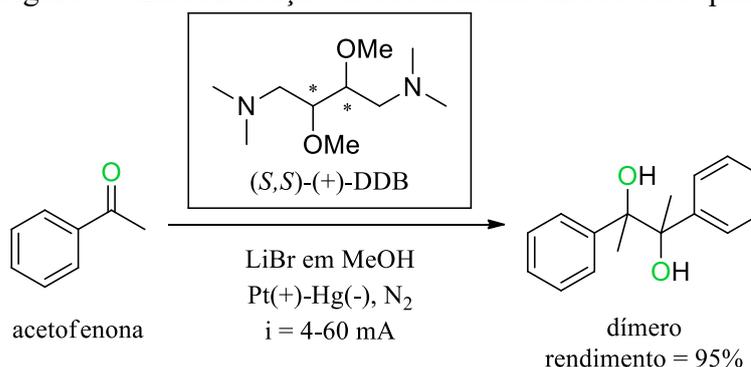
Fonte: Adaptado de CHENG, 2010 [66]

Entretanto, o 1-feniletanol é o produto de interesse da eletrorredução da acetofenona [19], usado como bloco de construção quiral e intermediário sintético nas indústrias de química fina, farmacêutica, alimentícia, agroquímica e de produtos naturais. Com destaque na indústria farmacêutica, é usado como precursor de conservantes oftálmicos e inibidores da adsorção

intestinal do colesterol [67]. Além disso, esse álcool é o principal composto endógeno volátil em flores, sendo um modelo para estudar a distribuição, transformação e metabolismo de compostos naturais em plantas [68]. Outra área de aplicação dos enantiômeros é na análise química, (*R*) e (*S*)-1-feniletanol são usados como reagentes quirais para determinação da pureza enantiomérica e para abertura assimétrica de anidridos cíclicos e epóxidos [69].

Vários estudos relatam a redução catódica da acetofenona ao 1-feniletanol, porém, sob condições eletrolíticas otimizadas, a maioria das reações já descritas leva à formação do dímero como produto majoritário [9,16,17]. É o caso do relato único de uma reação eletroquímica em solvente quiral, o amino-éter (*S,S*)-(+)-DDB, em que a acetofenona passou por uma reação de dimerização na presença de um eletrólito de suporte aquiral, formando o dímero de pinacol com 95% de rendimento (Figura 4). Postulou-se que o radical intermediário se difundiria em solução e a dimerização ocorreria em uma esfera quiral do solvente [18].

Figura 4 – Eletrorredução da acetofenona em solvente quiral

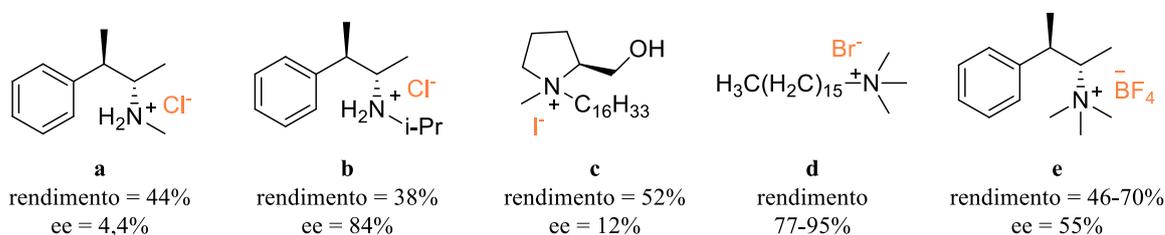
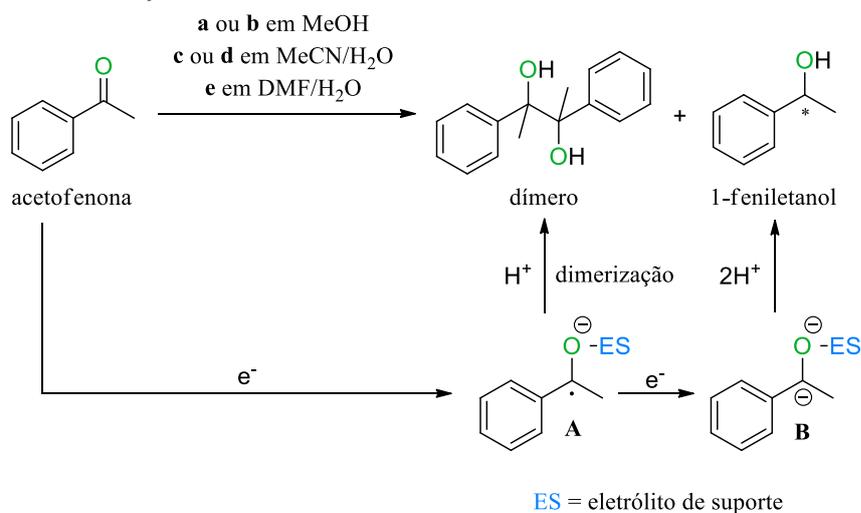


Fonte: Adaptado de SEEBACH e OEI, 1975 [18]

Por outro lado, resultados bons para a obtenção do 1-feniletanol como produto majoritário foram obtidos pela utilização de sais de amônio como eletrólitos de suporte (Figura 5) [21]. O primeiro estudo utilizou cloridrato de efedrina (**a**), que proporcionou a formação de apenas 44% de 1-feniletanol, com excesso enantiomérico de 4,4% [22]. Com a substituição do grupo metila ligado ao nitrogênio da efedrina pelo grupo isopropila (**b**), a formação de 1-feniletanol diminuiu a 38%, porém com excesso enantiomérico melhorado de 8,4% [22,23]. O mecanismo de eletrorredução assimétrica de cetonas induzida por essa classe de eletrólitos de suporte foi proposto a partir das interações entre a carga positiva das micelas de dois surfactantes catiônicos (**c** e **d**) e os intermediários aniônicos (**A** e **B**) gerados na primeira etapa da reação pela redução de um ou dois elétrons da acetofenona [20,24]. A utilização do sal de amônio **c** rendeu 52% de 1-feniletanol e 12% de excesso enantiomérico [24]. Com **d**, foi observada a formação de até 77% de álcool racêmico. Um rendimento de até 95% de 1-

feniletanol racêmico foi observado, ainda, quando **d** foi utilizado em conjunto com sulfato de sódio (Na_2SO_4) [20]. A melhor enantiosseletividade, porém, foi observada com a utilização do sal de tetralquilamônio quiral **e** e adição de tetrafluorborato de tetrabutilamônio (TBABF₄) como eletrólito de suporte extra, o que forneceu rendimentos entre 46-70% de 1-feniletanol com até 55% de excesso enantiomérico [25,26]. A obtenção do dímero como subproduto de todos os processos citados foi inevitável.

Figura 5 – Eletrorredução da acetofenona com sais de amônio como eletrólitos de suporte



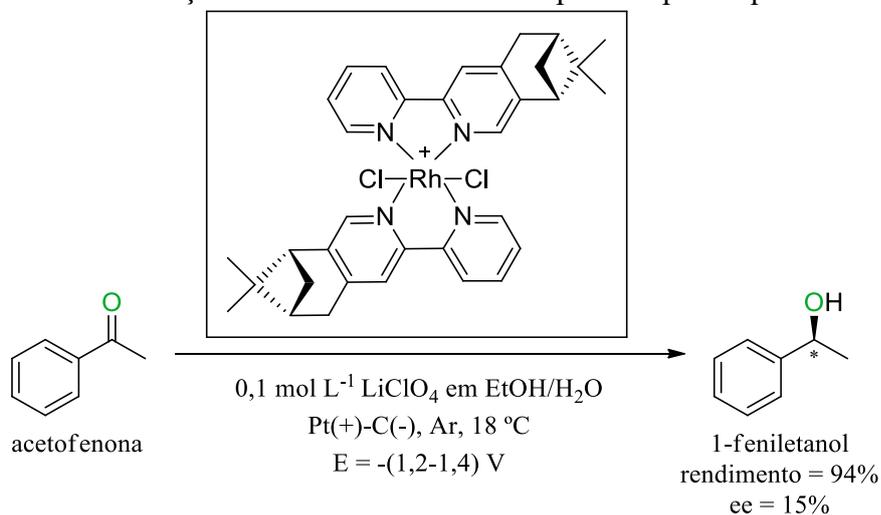
Fonte: Adaptado de LI et al., 2021 [21]

Nestes exemplos, os eletrólitos de suporte apresentam um carbono assimétrico próximo ao nitrogênio, o que construiu um ambiente de indução assimétrica nas proximidades do eletrodo por efeito eletrostático. No entanto, o alto valor agregado, a grande dosagem e a não reciclabilidade dos sais de amônio no sistema eletroquímico limitam seu desenvolvimento para síntese orgânica [21].

Complexos de metais de transição também podem ser usados como mediadores, em eletrossínteses indiretas, devido a presença de centros redox lábeis. A redução assimétrica da acetofenona já foi mediada por complexos de ródio (III) com formação preferencial de 1-feniletanol (94% de rendimento) e excesso enantiomérico de 15% (Figura 6). Entretanto, não

há discussões detalhadas sobre o mecanismo da reação e a utilização de metais nobres consiste, neste caso, em uma alternativa de custo elevado [27].

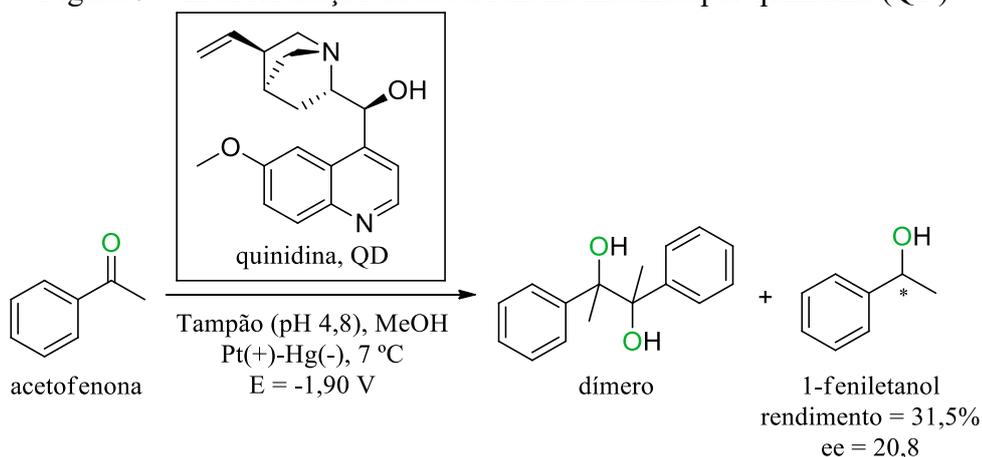
Figura 6 – Eletrorredução da acetofenona mediado por complexo quiral de ródio (III)



Fonte: Adaptado de MOUTET et al., 1999 [27]

A eletrorredução da acetofenona é frequentemente usada, ainda, como modelo para estudar a atividade de catalisadores orgânicos. Neste sentido, a utilização de quinidina (QD) rendeu 31,5% de 1-feniletanol como produto, com pureza óptica de 20,8% (Figura 7) [29].

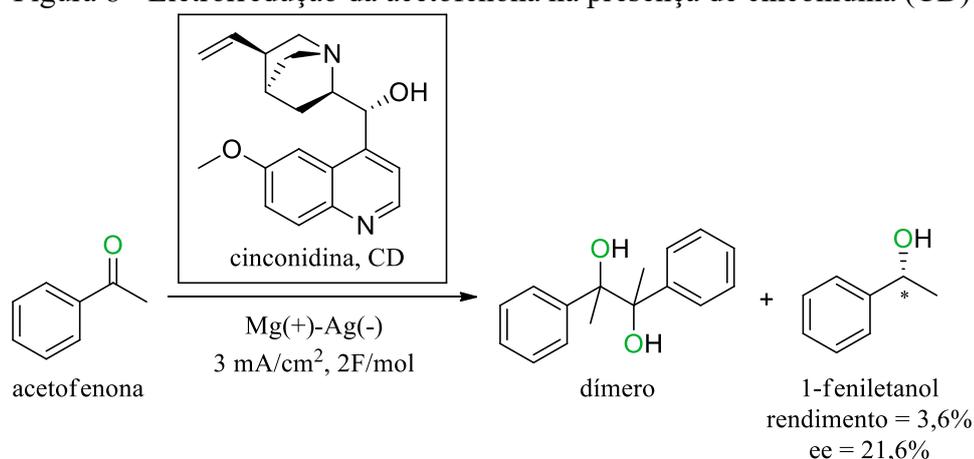
Figura 7 – Eletrorredução da acetofenona induzida por quinidina (QD)



Fonte: Adaptado de KARIV et al., 1973 [29]

Na presença de cinconidina (CD), uma ligeira melhora para 21,6% no excesso enantiomérico foi observada. Em contrapartida, o rendimento da reação diminuiu para apenas 3,6% de 1-feniletanol (Figura 8) [30].

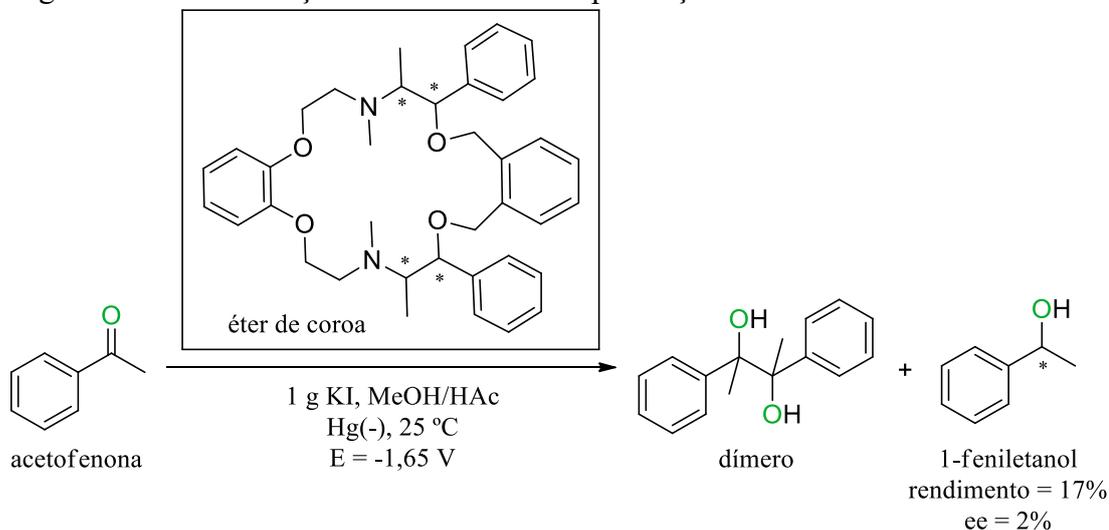
Figura 8 - Eletrorredução da acetofenona na presença de cinconidina (CD)



Fonte: Adaptado de CHEN et al., 2013 [30]

Compostos macrocíclicos com cavidades quirais, como éteres de coroa substituídos (Figura 9), β -ciclodextrina (Figura 10) e um multifareno (Figura 11), foram aplicados na eletrorredução da acetofenona. O álcool, com rendimento de 17% e excesso enantiomérico de apenas 2%, foi observado na presença dos complexos de potássio do éter de coroa quiral [31].

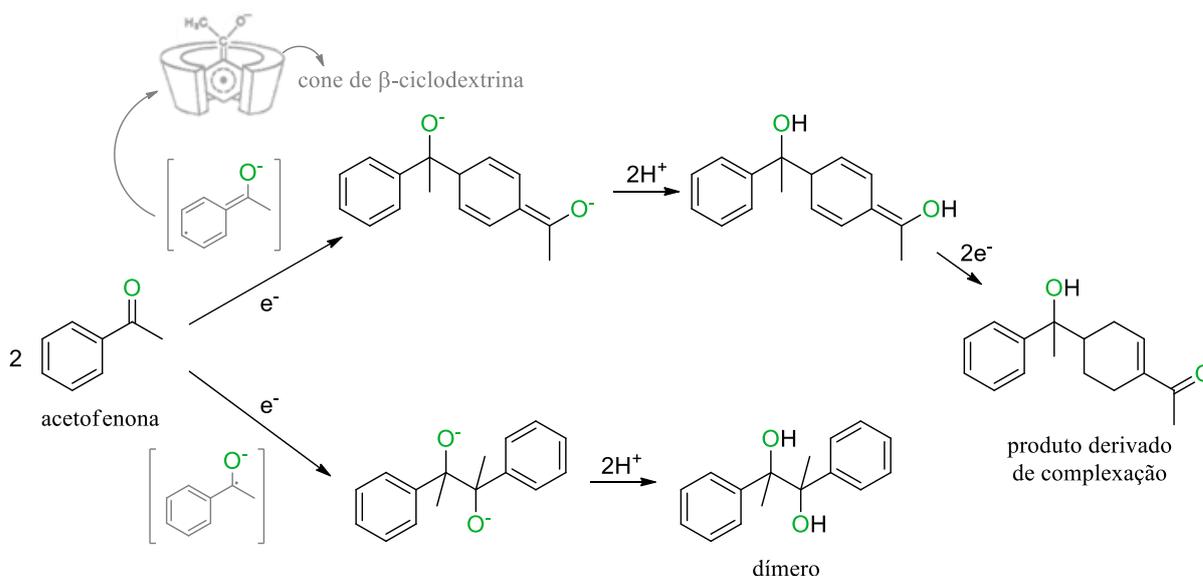
Figura 9 – Eletrorredução da acetofenona na presença de éteres de coroa substituídos



Fonte: Adaptado de HORNER e BRICH, 1978 [31]

Na presença de β -ciclodextrina, cuja molécula cônica é hidrofóbica e cujos grupos hidroxila periféricos secundários são eficientes doadores de prótons, observou-se a formação do dímero como produto majoritário (com rendimento de 68%) frente ao produto derivado de complexação (com rendimento de 32%). Não houve formação direta do 1-feniletanol, visto que, na redução catódica relatada, o anel aromático da acetofenona se posicionou dentro da cavidade apolar do cone da molécula de β -ciclodextrina, formando um complexo 1:1 [17,28].

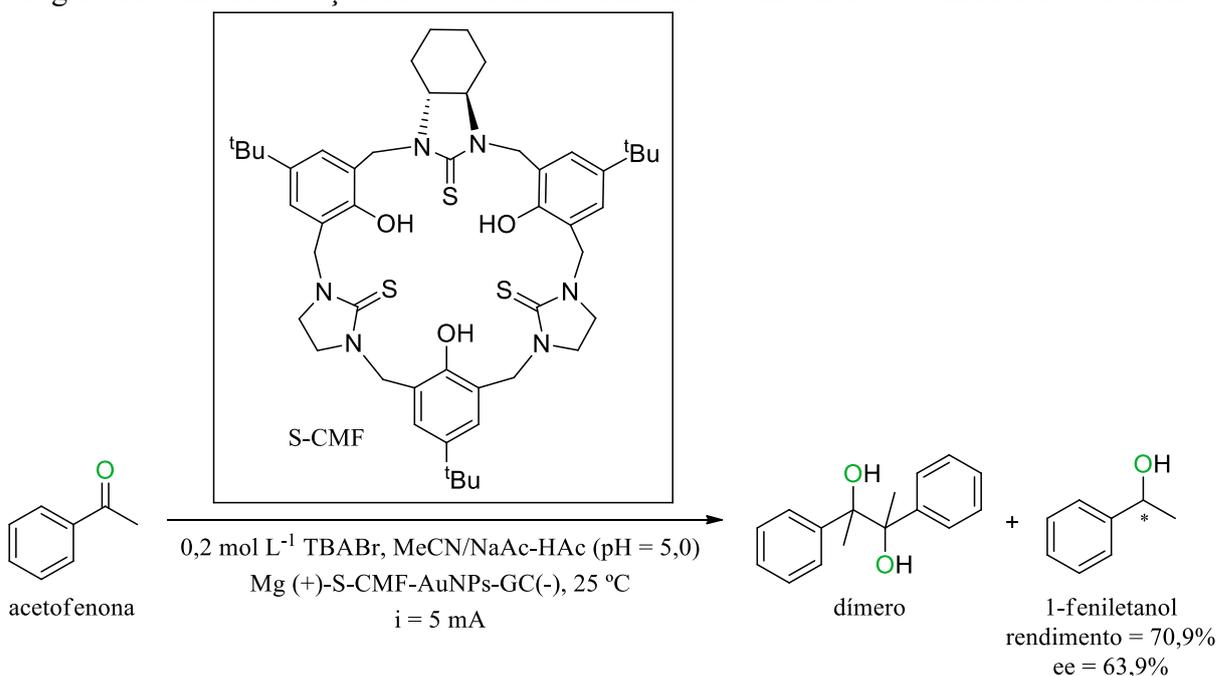
Figura 10 – Eletrorredução da acetofenona na presença de β -ciclodextrina



Fonte: Adaptado de FARNIA et al., 1990 [17]

Finalmente, em um estudo recente, um eletrodo de carbono vítreo modificado pela adição, camada por camada, de nanopartículas de ouro (AuNPs) intercaladas a um composto macrocíclico multifareno quiral (S-CMF) foi empregado para eletrorredução da acetofenona. O processo otimizado levou a 70,9% de 1-feniletanol, com excesso enantiomérico de 63,9%. A adição de brometo de tetrabutílamônio (TBABr) não reciclável como eletrólito de suporte foi, porém, necessária para possibilitar a conversão [32].

Figura 11 – Eletrorredução da acetofenona com eletrodo modificado com AuNPs e S-CMF



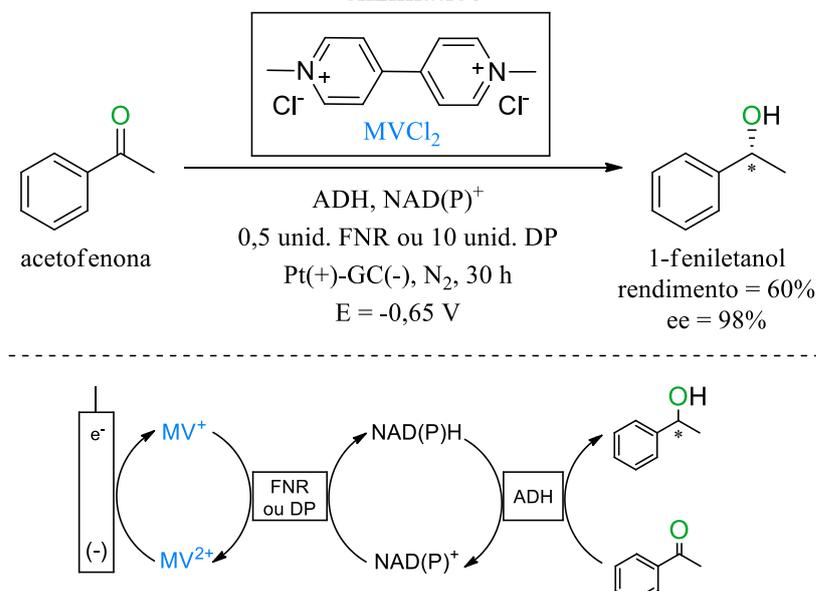
Fonte: Adaptado de XUE et al., 2021 [32]

2.2.1.1 Eletrorredução enzimática da acetofenona

A eletroquímica já é aliada conhecida da biocatálise, visto que as reações de oxirredução são onipresentes na natureza e as enzimas envolvidas normalmente dependem de cofatores redox para mediar as transformações. Tendo em vista as aplicações sintéticas das enzimas, a reciclagem desses cofatores é uma etapa limitante e o uso de processos eletroquímicos tem fornecido uma solução para esse problema [70].

O estudo pioneiro em redução eletroenzimática de cetonas utilizou uma álcool desidrogenase (ADH) como catalisador. Os substratos foram reduzidos por ação da ADH e o cofator (NAD(P)H) foi regenerado pelas enzimas ferredoxina-NAD(P)⁺ redutase (FNR) ou NADH-diaforase (DP), com auxílio de metil-viologen (MV²⁺) como mediador eletroquímico. Nestas condições, a ADH reduziu a acetofenona ao 1-feniletanol com 60% de rendimento e 98% de excesso enantiomérico (Figura 12) [37].

Figura 12 – Eletrorredução da acetofenona com álcool desidrogenase como catalisador enzimático



Fonte: Adaptado de YUAN et al., 1997 [37]

No entanto, muitos problemas surgiram em outras tentativas do uso de catalisadores enzimáticos na interface de sistemas eletroquímicos, como a inativação de enzimas na superfície do eletrodo, a baixa taxa de regeneração de cofator e a necessidade de aditivos em solução [21]. Para todos os efeitos, em todos os casos relatados, a eletroquímica foi utilizada somente como sistema de regeneração de cofator e a enzima foi a única responsável pela redução dos substratos [35–37,71].

2.3 ENZIMAS

As enzimas são, em geral, proteínas naturais que catalisam reações químicas com destacada especificidade ou seletividade frente a um determinado substrato ou classe de substratos. Essencialmente, elas oferecem um caminho reacional alternativo com menor energia de ativação [33].

Segundo o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* – NC-IUBMB), as enzimas são classificadas conforme o tipo de reações que catalisam (Tabela 1) [40,72].

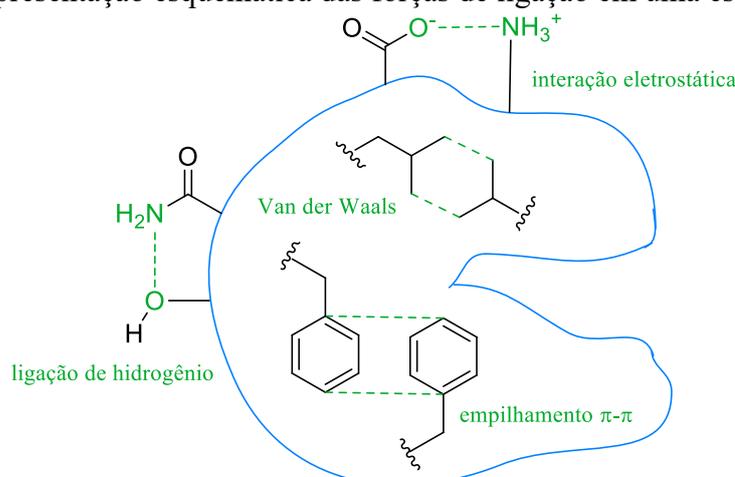
Tabela 1 – Classificação das enzimas conforme o tipo de reação catalisada

Classificação	Tipo de reação
Oxirredutases	Oxidação/redução: oxigenação de C-H, C-C ou C=C
Transferases	Transferência de grupos: aldeídico, cetônico, acila, fosforila, metila ou NH ₃
Hidrolases	Hidrólise de ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilas, anidridos, glicosídeos ou organohalogenetos
Liasas	Adição/eliminação de pequenas moléculas nas ligações C=C, C=N ou C=O
Isomerases	Isomerizações: racemização, epimerização ou rearranjo
Ligases	Formação ou rompimento de ligações C-O, C-S, C-N ou C-C com clivagem concomitante de trifosfato

Fonte: Adaptada de FABER, 2011 [40]

As cadeias de poliamida que formam uma enzima são mantidas em uma estrutura tridimensional, predominantemente determinada por sua sequência primária de ligações. Devido ao ambiente aquoso natural, os grupos polares hidrofílicos (como $-\text{COO}^-$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_3^+$, $-\text{SH}$ e $-\text{CONH}_2$) estão localizados principalmente na superfície externa da enzima, enquanto os substituintes lipofílicos (as cadeias carbônicas) encontram-se no interior. Consequentemente, toda a estrutura interna da proteína é estabilizada por um grande número de forças de ligação relativamente fracas, como interações de Van der Waals de cadeias alifáticas e empilhamentos π - π de aminoácidos aromáticos. Em contraste, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas mais fortes costumam estar próximas à superfície (Figura 13). Além da estrutura principal, as únicas ligações covalentes que compõe as enzimas são ligações dissulfeto ($-\text{S}-\text{S}-$) [40].

Figura 13 - Representação esquemática das forças de ligação em uma estrutura proteica



Fonte: Adaptado de FABER, 2011 [40]

As enzimas são, portanto, intrinsecamente instáveis em solução e podem ser desativadas por desnaturação, causada por aumento de temperatura, pH extremo ou ambiente dielétrico desfavorável, como altas concentrações de sal [40].

Uma reação catalisada por enzima é iniciada pela formação de um complexo enzima-substrato em uma cavidade chamada de sítio ativo, onde ocorre a catálise [33]. Poucos são os resíduos de aminoácidos que constituem o sítio ativo e, destes, apenas dois ou três estão envolvidos na ligação ao substrato. O restante da estrutura da enzima mantém a integridade do sítio ativo e direciona o substrato para uma catálise eficaz [33].

2.3.1 Lipases

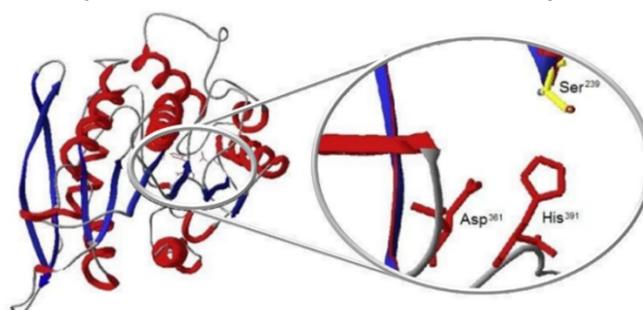
As enzimas pertencentes à classe das hidrolases são subdivididas em diversos grupos, entre eles, as carboxil éster hidrolases (EC 3.1.1.x), que catalisam a clivagem e a formação de ligações éster. Neste grupo, estão as lipases (triacilglicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3), que atuam na interface orgânico-aquosa catalisando a hidrólise de triacilgliceróis – principais componentes de óleos e gorduras – com a liberação de ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol [73–75].

No entanto, outras moléculas como ésteres, amidas, álcoois, ésteres de poliol/poliácido e de tiol também são substratos para estas enzimas [41]. Visto que as lipases apresentam níveis consideráveis de atividade e estabilidade em ambientes não-aquosos, podem promover a catálise de reações de esterificação, transesterificação, interesterificação, acidólise, alcoólise, aminólise e lactonização [42,43,76]. Essa versatilidade permite seu emprego em diversos

setores da indústria, como na formulação de detergentes, na produção de fármacos, de cosméticos, de alimentos, de aromas e fragrâncias e de biosurfactantes [77,78].

Algumas enzimas hidrolíticas, como é o caso das lipases, possuem um padrão de enovelamento denominado α/β hidrolase. O sítio ativo das α/β hidrolases é constituído por três aminoácidos. O das lipases, especificamente, é formado por uma serina (resíduo nucleofílico), um aspartato ou glutamato (resíduo catalítico ácido) e uma histidina (Figura 14). O resíduo nucleofílico de serina está localizado em uma região altamente conservada, composta pelo pentapeptídeo G-X₁-S-X₂-G, onde G = glicina; X₁ = histidina; S = Serina e X₂ = ácido glutâmico ou aspártico [79–82]. Esta região é frequentemente recoberta por uma “tampa” hidrofóbica, ou “lid”, na ausência de um substrato. Essa “tampa” pode se mover quando em contato com uma interface lipídio-água, exibindo a chamada conformação aberta da enzima, onde seu sítio ativo fica exposto e pronto para catalisar reações [83].

Figura 14 – Representação da estrutura e do sítio ativo da lipase de *Psychrobacter sp*

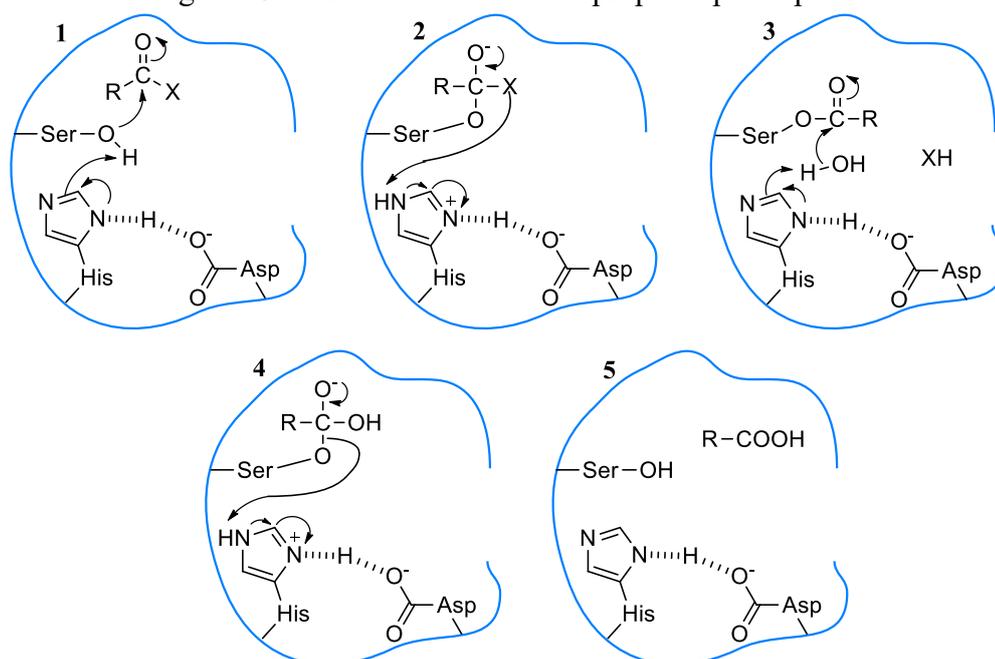


Fonte: Adaptado de DE SANTI et al., 2010 [82]

As reações catalisadas por lipases são semelhantes às catalisadas por serino-proteases devido à similaridade da tríade catalítica entre as duas enzimas. Logo, o mecanismo catalítico para as lipases segue o modelo proposto para a quimiotripsina, uma serino-protease (Figura 15).

O processo de hidrólise desencadeado pela enzima se inicia com a serina sendo desprotonada por um ataque nucleofílico do par de elétrons não ligantes da histidina. Essa desprotonação da serina permite um novo ataque nucleofílico ao carbono carbonílico da ligação éster da cadeia do substrato, formando um intermediário tetraédrico. O anel imidazólico da histidina fica protonado e carregado positivamente, sendo estabilizado pela carga negativa do resíduo ácido. O intermediário tetraédrico é estabilizado por duas ligações de hidrogênio formadas com as ligações amida dos resíduos de aminoácidos. Uma molécula de álcool é liberada, formando um complexo acil-enzima. Em um segundo ataque nucleofílico por um íon hidroxila da água, o ácido graxo é liberado e a enzima é regenerada [80].

Figura 15 – Mecanismo catalítico proposto para lipases



Fonte: Adaptado de SILVERMAN, 2002 [33]

A descoberta relativamente recente da capacidade de catálise reversa das lipases, com elevada eficiência ao realizar a reação de síntese, abriu inúmeras possibilidades no campo da química orgânica sintética. Além disso, as vantagens de utilização destas enzimas vão para além de sua elevada região, quimio e enantiosseletividade, visto que apresentam surpreendente estabilidade em diversos solventes (aquoso, orgânico ou supercrítico), atuam em condições reacionais brandas mesmo mantendo a atividade em altas temperaturas e diferentes condições de pH, não necessitam de cofatores, reconhecem uma ampla variedade de substratos não-naturais e estão disponíveis comercialmente a preços acessíveis [41,77,84–87].

2.3.1.1 Imobilização de lipases

A utilização de lipases solúveis no meio reacional tem sido limitada por fatores como baixa estabilidade sob algumas condições de operação e dificuldade de recuperação e reutilização do biocatalisador [46,88]. Uma vez imobilizada, a enzima deixa de ser solúvel e passa a apresentar as vantagens de catalisadores heterogêneos, tais como a reutilização ou uso contínuo, a facilidade na separação do meio reacional, a possibilidade de modulação de propriedades catalíticas, a prevenção de possíveis contaminações e a estabilização da estrutura tridimensional [89,90].

A imobilização enzimática é uma técnica que mantém o biocatalisador fisicamente

confinado ou localizado numa região específica do suporte, com retenção de suas atividades catalíticas e possibilidade de uso repetido e contínuo enquanto o sistema enzimático se mantiver ativo [46]. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior e não deverão ocorrer modificações no sítio ativo [41].

Dentre os vários métodos de imobilização disponíveis, a adsorção é o método mais utilizado para imobilização de lipases que, em condições adequadas, são adsorvidas em sua conformação aberta [91–94]. Considerado o método mais simples, economicamente mais barato e menos agressivo em relação à atividade enzimática, este consiste na mistura do suporte insolúvel com a solução enzimática sob condições apropriadas. A adsorção ocorre pela interação dos grupos superficiais da enzima com os grupos superficiais do suporte por meio de atrações eletrostáticas, como forças de van der Waals e interações iônicas, ou por interações hidrofóbicas. No caso de lipases, as interações hidrofóbicas são as mais comuns [92,95,96].

Uma grande variedade de materiais naturais, sintéticos, orgânicos ou inorgânicos, com diferentes características de área, forma e densidade, tem sido investigada para efetuar imobilização de lipases [97,98]. Alguns materiais citados na literatura como suportes para a imobilização de lipases são: polímeros polares como metacrilato de metila [99], polímeros sintéticos anfífilicos como polietilenoglicol [100] ou hidrofóbicos como o Accurel [101] e suportes inorgânicos, como os argilominerais [45] ou a sílica de porosidade controlada [46,47], que pode ser funcionalizada com diferentes grupos, como alquila, amino e carboxila, que possibilitam a orientação da enzima ao suporte por diferentes regiões [48].

A imobilização por adsorção nos suportes descritos também é amplamente empregada para modificação de eletrodos utilizando enzimas. No entanto, limitações como a lixiviação de biocomponentes e possíveis barreiras de difusão podem restringir sua utilização [49]. Na maioria das aplicações bioeletroquímicas, as enzimas de diferentes classes são confinadas em algum tipo de matriz polimérica para posterior imobilização na superfície do eletrodo de trabalho. O polímero fica responsável por manter a espécie estável e deve permitir, além da transferência direta de elétrons, a fácil difusão de moléculas e íons dentro e fora da matriz [102]. Geralmente, os suportes utilizados são formados por poliaminas ou poliálcoois que mimetizam o ambiente natural das enzimas que encapsulam, além de outros polímeros micelares que contêm regiões hidrofóbicas, como é o caso do Nafion modificado [102–104].

Cada método de imobilização apresenta vantagens e desvantagens. A escolha da metodologia mais apropriada depende da transformação desejada e da natureza da enzima. Além disso, reprodutibilidade, custo e dificuldade do processo de imobilização também precisam ser considerados [49].

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Para a execução das eletrossínteses, utilizou-se uma célula de vidro de 15 mL, sem compartimento divisório e com tampa de resina de acetal provida de orifícios circulares para encaixe dos eletrodos e adição das soluções. As reações foram desencadeadas em um sistema de três eletrodos. Eletrodos de trabalho de carbono vítreo, platina, níquel, alumínio, cobre e uma liga estanho/chumbo (63:37) utilizada para soldagem de componentes eletroeletrônicos (revestida e/ou não com filme de Nafion modificado com lipase de *Thermomyces lanuginosus*) foram testados juntamente a eletrodos de referência de Ag/Ag⁺ (CH₃CN/AgNO₃ 0,01 mol L⁻¹) e Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) e a eletrodos auxiliares de carbono vítreo, alumínio e platina. Os eletrodos foram conectados a um potenciostato portátil DropSens μSTAT400 ou PalmSens3, interfaceado ao *software* DropView (versão 8400) ou PStrace (versão 4.8), respectivamente.

As medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato portátil PalmSens3 e os dados foram processados no *software* PStrace (versão 4.8). As reações ocorreram em uma célula de vidro análoga à descrita anteriormente. Para execução das análises, um fio da liga que corresponde ao eletrodo de trabalho combinado de estanho/chumbo (63:37) foi polido com folha lixa de ferro/metal grão 500 (3M) e inserido em uma seringa descartável de modo a reduzir a superfície de contato do eletrodo ao diâmetro do fio (aproximadamente 1,0 mm). Esse eletrodo foi incorporado ao sistema com e sem revestimento de Nafion modificado ou não com lipase de *Thermomyces lanuginosus*. Além disso, foram utilizados um eletrodo Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) como eletrodo de referência e um filamento de platina como eletrodo auxiliar.

As medidas coulométricas foram realizadas em uma célula de vidro equivalente às anteriores, utilizando eletrodo de trabalho de estanho/chumbo (63:37) revestido com filme de Nafion modificado com lipase de *Thermomyces lanuginosus* (E-NLTL), eletrodo auxiliar de platina e eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹). Foi utilizado um potenciostato Autolab PGSTAT204, com módulo analisador de resposta de frequência (FRA32M), gerenciado pelo software NOVA 2.0.

Um espectrofotômetro Shimadzu UV-1800, gerenciado pelo software UVProbe (versão 2.42), e cubeta de quartzo com 1,00 cm de caminho óptico foram utilizados para a determinação da atividade e estabilidade das lipases no meio reacional.

As análises de cromatografia gasosa (CG) para medidas de conversão foram realizadas em um cromatógrafo a gás Agilent 7890B, equipado com detector de ionização por chama

(FID) e coluna β -DEX (30 m \times 0,25 μ m \times 0,25 mm) da Supelco, pertencente à Fundação Universidade Regional de Blumenau (FURB). A coluna foi mantida a 60 °C por 5 minutos e, em seguida, foi aquecida a uma velocidade de 10 °C/minuto até atingir a temperatura do detector (220 °C). Um volume de 1,0 μ L da amostra foi injetado a 230 °C e o tempo total da corrida foi de 31 minutos, com fluxo de gás hélio 5.0 de 1,0 mL/minuto.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C para caracterização de reagentes e produtos foram obtidos por meio de um espectrômetro Bruker Ultrashield, também pertencente à FURB, operando na frequência de 300 MHz (RMN ^1H) e 75 MHz (RMN ^{13}C) e utilizando CDCl_3 como solvente e TMS como padrão interno.

3.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os solventes (acetonitrila e etanol), bem como o H_2SO_4 concentrado, foram obtidos da Neon. Os eletrólitos de suporte (Na_2SO_4 , KCl e $\text{MgCl}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$) utilizados nos estudos de otimização de condições reacionais foram obtidos da Alphatec, da Vetec e da Dinâmica, respectivamente. Os substratos carbonílicos, o fluoreto de tetrabutilamônio (TBAF) e o hexafluorofosfato de tetrabutilamônio (TBAPF_6) foram obtidos da Sigma Aldrich.

As soluções tampão fosfato (0,1 mol L^{-1}) pH 6,2; 7,4 e 8,0 foram preparadas a partir de Na_2HPO_4 (Êxodo Científica) e NaH_2PO_4 (Synth). As soluções tampão acetato (0,1 mol L^{-1}) pH 4,0 e 5,0 foram preparadas a partir de CH_3COONa (Nuclean) e CH_3COOH (Vetec). Essas soluções tampão foram utilizadas como eletrólito de suporte nos estudos de otimização.

As enzimas comerciais lipase A (Amano) de *Aspergillus niger* (liofilizada), lipase AK (Amano) de *Pseudomonas fluorescens* (liofilizada e imobilizada em sol-gel), lipase M (Amano) de *Mucor javanicus* (liofilizada), lipase F-AP15 (Amano) de *Rhizopus oryzae* (liofilizada), lipase PS (Amano) de *Burkholderia cepacia* (liofilizada (PS-SD), imobilizada em cerâmica (PS-C) e em diatomita (PS-D)), lipase de *Candida antarctica* B (em solução (Lipozyme CAL-B L), imobilizada em resina de troca iônica (Lipozyme 435) e em resina acrílica (Novozym 435)), lipase de *Candida rugosa* tipo VII (liofilizada), lipase de pâncreas de porco tipo II (liofilizada), lipase de *Rhizomucor miehei* (em solução (Novozym 338) e imobilizada em resina de troca iônica tipo Duolite (Lipozyme RM-IM)), lipase de *Thermomyces lanuginosus* (em solução e imobilizada em sílica (Lipolase 100T)) e lipase de *Aspergillus oryzae* (em solução (Lipolase 100L)) foram doadas pela FURB. Quando em solução, as enzimas foram imobilizadas em sílica gel (0,063-0,200 mm) (Macherey-Nagel), alumina (Êxodo Científica), Celite® (Synth), haloisita (Sigma-Aldrich) e/ou montmorilonita modificada com 5-35% de

octadecilamina e 0,5-5% de APTS (MMT modificada). Para imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* no eletrodo combinado de estanho/chumbo (63:37), uma solução diluída da enzima foi adicionada a uma solução de Nafion 5% obtida da Sigma-Aldrich. Na determinação da atividade enzimática das lipases, foi empregado butirato de 4-nitrofenila, também da Sigma-Aldrich.

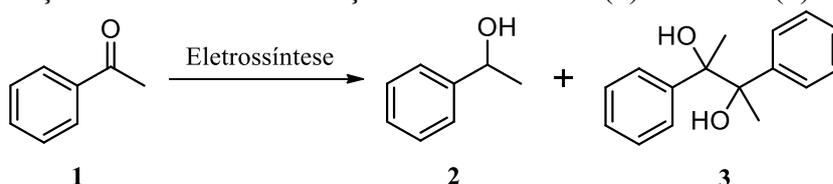
As reações de eletrorredução foram acompanhadas por cromatografia de camada delgada (CCD), realizada pelo emprego de cromatofolhas de sílica gel obtidas da Macherey-Nagel e reveladas sob luz ultravioleta ($\lambda=254$ nm). Para a purificação dos produtos por cromatografia em coluna de sílica gel (Macherey-Nagel), foi utilizada uma mistura dos solventes acetato de etila e hexano, da Neon. O $MgSO_4$ utilizado para tratar a fase orgânica foi obtido da Grupo Química.

Os reagentes e solventes comerciais foram utilizados sem purificação prévia e as enzimas foram mantidas a -20 °C. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada.

3.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS DE ELETORREDUÇÃO

Para a otimização da metodologia proposta, a redução eletrossintética da acetofenona (**1**), que leva à formação de 1-feniletanol (**2**) e de 2,3-difenilbutano-2,3-diol (**3**), foi escolhida como reação modelo de estudo (Figura 16).

Figura 16 – Reação modelo: eletrorredução da acetofenona (**1**) ao álcool (**2**) e ao dímero (**3**)



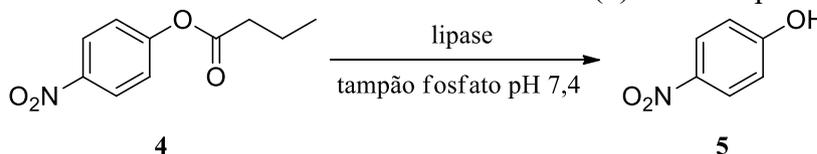
As variáveis investigadas nesta etapa foram: composição dos eletrodos, natureza do solvente, adição de eletrólitos de suporte, magnitude do potencial elétrico aplicado e tempo reacional. Eletrodos de trabalho de carbono vítreo, cobre, níquel, alumínio, platina e combinado de estanho/chumbo (63:37) foram testados junto a eletrodos auxiliares de platina, carbono vítreo e alumínio. Eletrodos de Ag/Ag^+ ($CH_3CN/AgNO_3$ $0,01$ mol L^{-1}) e $Ag/AgCl$ (KCl $3,0$ mol L^{-1}) foram utilizados como eletrodo de referência. Acetonitrila, etanol e água foram os solventes testados em sistemas contendo Na_2SO_4 , H_2SO_4 , $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, KCl , TBAF e $TBAPF_6$ como eletrólitos de suporte, além dos tampões fosfato ($0,1$ mol L^{-1}) pH 7,4 e acetato ($0,1$ mol L^{-1}) pH

4,0. Foram aplicados potenciais de -1,5 e -2,0 V *vs.* Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) em tempos reacionais de 1-6 horas. Para a realização dos testes, reações contendo 0,48 mmol de **1** para 4,0 mL de solvente de estudo foram realizadas à temperatura ambiente (25 °C) e acompanhadas por CCD e espectroscopia UV-Vis.

3.4 ESTUDO DA ATIVIDADE E DA ESTABILIDADE DAS LIPASES

A atividade das lipases foi determinada pela medida da variação de absorbância em 315 nm durante a reação enzimática de hidrólise do butirato de 4-nitrofenila (**4**) com formação do 4-nitrofenol (**5**) (Figura 17) [93]. Cada análise foi realizada após adição de 3,0 mL de solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹) pH 7,4, 10 μL (ou mg) da enzima e 1,5 μL de **4** em uma cubeta de quartzo. Após agitação das soluções (ou suspensões) de lipase, o aumento da absorbância foi acompanhado durante 5 minutos à temperatura ambiente. A atividade enzimática, em unidade por grama de enzima (U g⁻¹), é definida como a velocidade inicial de hidrólise de 1 μmol de **4** por minuto e foi calculada a partir de uma curva de calibração (absorbância × concentração - mmol L⁻¹) construída para **5**, considerando as condições de ensaio.

Figura 17 – Hidrólise do butirato de 4-nitrofenila (**4**) mediada por lipase



De forma análoga, a atividade das lipases foi determinada novamente após 15, 30, 60 e 120 minutos sob aplicação de potencial de magnitudes -1,5 V e -2,0 V *vs.* Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹), em uso dos parâmetros de reação otimizados, a fim de investigar sua estabilidade.

3.4.1 Imobilização das lipases livres em diferentes suportes

Os testes de estabilidade para as lipases comercializadas em solução foram repetidos após imobilização em sílica gel, alumina, Celite®, haloisita e MMT modificada.

A imobilização foi realizada por adsorção a partir da mistura física do suporte selecionado com a lipase em solução. Sílica gel, Celite® e MMT modificada foram utilizadas na proporção de 1,0 mg do suporte para 1,0 μL da enzima. Alumina e haloisita, por sua vez,

foram utilizadas na proporção de 2,0 mg para 1,0 μL . A mistura foi agitada com uma espátula por, aproximadamente, 2 minutos, até formar uma pasta uniforme [47].

As lipases liofilizadas foram previamente diluídas em tampão fosfato (0,1 mol L^{-1}) pH 7,4, originando soluções enzimáticas de concentração 35,0 g L^{-1} . Subsequentemente, estas lipases foram imobilizadas em Celite® de forma análoga à descrita anteriormente, a partir da mistura física do suporte com a solução enzimática na proporção de 1,0 mg para 1,0 μL . Os testes de estabilidade dessas lipases também foram repetidos na nova condição.

3.5 REDUÇÃO ELETROSSÍNTETICA DA ACETOFENONA APLICANDO LIPASES

Sob potencial de -2,0 V vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L^{-1}) e utilizando eletrodo de trabalho combinado de estanho/chumbo (63:37) e eletrodo auxiliar de platina; foram desencadeadas reações contendo 0,48 mmol de **1** para 4,0 mL de tampão fosfato (0,1 mol L^{-1}) pH 7,4 com adição de diversas lipases comerciais em diferentes condições. São elas: lipase A (Amano) de *Aspergillus niger* (liofilizada), lipase AK (Amano) de *Pseudomonas fluorescens* (liofilizada e imobilizada em sol-gel), lipase M (Amano) de *Mucor javanicus* (liofilizada), lipase F-AP15 (Amano) de *Rhizopus oryzae* (liofilizada), lipase PS (Amano) de *Burkholderia cepacia* (liofilizada (PS-SD), imobilizada em cerâmica (PS-C) e em diatomita (PS-D)), lipase de *Candida antarctica* B (em solução (Lipozyme CAL-B L), imobilizada em resina de troca iônica (Lipozyme 435) e em resina acrílica (Novozym 435)), lipase de *Candida rugosa* tipo VII (liofilizada), lipase de pâncreas de porco tipo II (liofilizada), lipase de *Rhizomucor miehei* (em solução (Novozym 338) e imobilizada em resina de troca iônica tipo Duolite (Lipozyme RM-IM)), lipase de *Thermomyces lanuginosus* (em solução e imobilizada em sílica gel (Lipolase 100T)), e lipase de *Aspergillus oryzae* (em solução (Lipolase 100L)).

As enzimas livres foram adicionadas ao meio reacional após imobilização em diferentes suportes. A lipase de *Candida antarctica* B (Lipozyme CAL-B L) e a lipase de *Aspergillus oryzae* (Lipolase 100L) foram utilizadas após imobilização em Celite®. A lipase de *Thermomyces lanuginosus* foi utilizada imobilizada em MMT modificada e a lipase de *Rhizomucor miehei* (Novozym 338), em alumina. As lipases liofilizadas foram diluídas em tampão fosfato (0,1 mol L^{-1}) pH 7,4 e utilizadas após imobilização em Celite®. Apenas as lipases liofilizadas de *Candida rugosa* tipo VII e AK (Amano) de *Pseudomonas fluorescens* foram utilizadas livres. Todas as espécies disponíveis na condição de imobilização comercial também foram testadas.

A adição de 20 mg das enzimas foi realizada de modo fracionado (ao decorrer do tempo reacional). Lipases que mostraram diminuição significativa da atividade sob aplicação do potencial elétrico de estudo foram adicionadas ao meio reacional em frações de 2,5 mg a cada 30 minutos. As demais lipases foram adicionadas em frações de 10,0 mg a cada 2 horas. As reações foram finalizadas após 4 horas. Todos os testes foram feitos em duplicata para garantir a reprodutibilidade da metodologia.

Alíquotas de 500 μL da fase aquosa foram extraídas com acetato de etila ($3 \times 300 \mu\text{L}$) e a fase orgânica foi analisada por CG. Como base para os cálculos de conversão, duas curvas de calibração foram construídas: uma para a acetofenona (**1**) e outra para o 1-feniletanol (**2**).

3.6 ESTUDOS ADICIONAIS NA PRESENÇA DE LIPASES SELECIONADAS

Ensaio de eletrorredução de **1** com adição de grupo protetor de silício ou em diferentes condições de pH foram realizados na presença de 5 lipases, selecionadas dentre as já descritas no tópico anterior, a saber: lipase PS (Amano) de *Burkholderia cepacia* (imobilizada comercialmente em diatomita (PS-D)), lipase de *Candida antarctica* B (imobilizada comercialmente em resina acrílica (Novozym 435)), lipase de *Rhizomucor miehei* (imobilizada comercialmente em resina de troca iônica tipo Duolite (Lipozyme RM-IM)) e lipase de *Thermomyces lanuginosus* (imobilizada em MMT modificada e, comercialmente, em sílica gel (Lipolase 100T)). A lipase de *Thermomyces lanuginosus* em solução foi, também, utilizada após imobilização no eletrodo de trabalho combinado de estanho/chumbo (63:37).

3.6.1 Eletrorredução da acetofenona e proteção *one-pot* do 1-feniletanol

A combinação *one-pot* da eletrorredução de **1** e da proteção de **2** com TMSCl foi investigada na presença das lipases selecionadas. As reações ocorreram utilizando eletrodo de trabalho combinado de estanho/chumbo (63:37) e eletrodo auxiliar de platina, em 4,0 mL de solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pH 7,4 e sob aplicação de potencial de $-2,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$) por 4 horas. Ao meio, foram adicionadas frações de 2,5 mg das lipases já imobilizadas a cada 30 minutos de reação, totalizando 20 mg. O TMSCl, por sua vez, foi adicionado em excesso (0,67 mmol) e de modo integral (no início da reação).

Alíquotas de 500 μL da fase aquosa foram extraídas com acetato de etila ($3 \times 300 \mu\text{L}$) e a fase orgânica foi analisada por CG. As curvas de calibração construídas previamente, uma para **1** e outra para **2**, foram suficientes para fundamentar os cálculos de conversão.

3.6.2 Eletrorredução da acetofenona em diferentes condições de pH

A adição das lipases selecionadas foi testada para eletrorredução de 0,48 mmol de **1** em 4,0 mL de tampão acetato (0,1 mol L⁻¹) pH 4,0 e pH 5,0. Foram adicionados 20 mg de enzima ao meio reacional em frações de 2,5 mg a cada 30 minutos, respeitando a estabilidade das espécies.

As reações duraram 4 horas, o potencial aplicado foi de -2,0 V vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) e foram utilizados eletrodo de trabalho combinado de estanho/chumbo (63:37) e eletrodo auxiliar de platina. Todos os testes foram feitos em duplicata para garantir a reprodutibilidade da metodologia.

Alíquotas de 500 µL da fase aquosa foram extraídas com acetato de etila (3 × 300 µL) e a fase orgânica foi analisada por CG. Para cálculos de conversão, foram utilizadas as curvas de calibração construídas previamente: uma para **1** e outra para **2**.

3.6.3 Preparação e desempenho do eletrodo modificado com lipase (E-NLTL)

3.6.3.1 Imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* sobre a superfície do eletrodo

Uma solução 10% da lipase de *Thermomyces lanuginosus* foi preparada a partir da diluição da enzima comercial em tampão acetato (0,1 mol L⁻¹) pH 5,0 e adicionada a uma solução de Nafion 5% na proporção de 2:1 em volume, respectivamente. A mistura foi agitada em vórtex para originar a solução de revestimento de Nafion modificado com lipase [103,104].

Antes do procedimento de imobilização, um fio da liga que corresponde ao eletrodo de trabalho combinado de estanho/chumbo (63:37) foi polido com folha lixa ferro/metal grão 500. Sobre a superfície ativa do eletrodo limpo, foi pipetada uma alíquota (150 µL) da solução de revestimento e o eletrodo foi mantido em dessecador sob vácuo até secagem do filme formado (2-3 horas). O eletrodo modificado foi armazenado seco à temperatura de -20 °C.

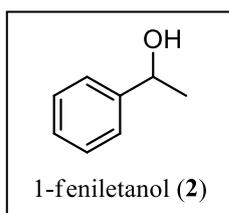
3.6.3.2 Eletrorredução da acetofenona empregando E-NLTL como eletrodo de trabalho

Reações com 4,0 mL de tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹) pH 7,4 ou acetato (0,1 mol L⁻¹) pH 4,0 ou 5,0 foram investigadas para eletrorredução de 0,48 mmol de **1** em um sistema de três eletrodos: eletrodo de trabalho E-NLTL, eletrodo auxiliar de platina e eletrodo de referência

Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹). O potencial aplicado foi de -2,0 V vs. Ag/AgCl e as reações foram finalizadas após 4 horas.

Uma alíquota de 500 µL da fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 × 300 µL). A fase orgânica foi analisada por CG. Como base para os cálculos de conversão, foram utilizadas as curvas de calibração construídas previamente: uma curva para **1** e outra para **2**.

A parte restante da fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 × 2,0 mL) e a fase orgânica seca com MgSO₄, filtrada e concentrada em rotaevaporador. O 1-feniletanol (**2**) foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel (10% acetato de etila/hexano, 50% acetato de etila/hexano) e caracterizado por RMN de ¹H e ¹³C. Os dados de experimentais de RMN de ¹H e ¹³C são relatados da seguinte forma: deslocamento químico (δ) em ppm, multiplicidade (s = singlete, d = duplete, q = quarteto e m = multipeto), constante de acoplamento (*J*) em Hertz e integral relativa dos hidrogênios. Estes dados foram comparados com os da literatura [32,105,106].



Óleo incolor; **RMN ¹H** (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) 7,41-7,27 (m, 5H); 4,89 (q, *J* = 6,46 Hz, 1H); 1,51 (d, *J* = 6,45 Hz, 3H). **RMN ¹³C** (CDCl₃, 75 MHz): δ (ppm) 145,9; 128,5; 127,4; 125,4; 70,4; 25,2.
CG: T_R (*R*) = 15,16 min; T_R (*S*) = 15,25 min.

3.7 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

3.7.1 Medidas voltamétricas

Todas as medidas de voltametria cíclica foram realizadas à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), em uma célula eletroquímica contendo 2,5 mL de acetonitrila, 2,5 mL do tampão correspondente ao pH de estudo, 0,50 mmol do eletrólito de suporte TBAPF₆ (0,1 mol L⁻¹) e 0,25 mmol de **1** (0,05 mol L⁻¹) [32]. Foram investigados os tampões acetato (0,1 mol L⁻¹) pH 4,0-5,0 e os tampões fosfato (0,1 mol L⁻¹) pH 6,2-8,0.

Para execução das análises, um fio de liga estanho/chumbo (63:37) foi inserido em uma seringa descartável. Este foi utilizado como eletrodo de trabalho com e sem o revestimento de Nafion modificado ou não com lipase de *Thermomyces lanuginosus*. Todas as medidas foram realizadas em triplicata, a uma taxa de varredura de 0,1 V s⁻¹, utilizando eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) e eletrodo auxiliar de platina.

3.7.2 Medidas coulométricas

As medidas coulométricas foram realizadas à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), em uma célula eletroquímica contendo 4,0 mL de tampão acetato (0,1 mol L⁻¹) pH 5,0 e 0,25 mmol de **1** (0,05 mol L⁻¹). Foram utilizados eletrodo de trabalho E-NLTL, eletrodo auxiliar de platina e eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹). As eletrólises ocorreram a potenciais controlados de -1,5 V e -2,0 V vs. Ag/AgCl.

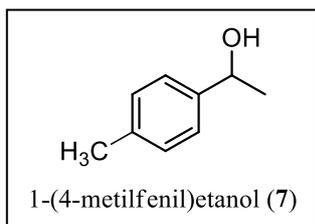
3.8 EXPANSÃO DA METODOLOGIA NAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE REAÇÃO

Utilizando a metodologia otimizada, alguns derivados de **1** foram submetidos à (bio)eletrorredução. A saber, são eles: 4-metilacetofenona (**6**), 4-metoxiacetofenona (**8**), 4-fluoroacetofenona (**10**) e 4-bromoacetofenona (**12**).

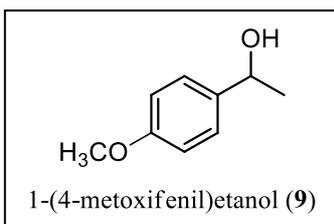
Em células eletroquímicas contendo 4,0 mL de solução tampão acetato (0,1 mol L⁻¹) pH 5,0, as eletrorreduções de 0,48 mmol das cetonas de interesse foram promovidas em um sistema de três eletrodos: eletrodo de trabalho E-NLTL, eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) e eletrodo auxiliar de platina. O potencial aplicado foi de -2,0 V vs. Ag/AgCl e as reações duraram 4 horas.

Após cada reação, uma alíquota de 500 µL da fase aquosa resultante foi extraída com acetato de etila (3 × 300 µL). A fase orgânica foi analisada por CG. Como base para os cálculos de conversão, curvas de calibração para as cetonas e álcoois correspondentes foram construídas.

A parte restante da fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 × 2,0 mL). A fase orgânica foi tratada com MgSO₄, filtrada e concentrada em rotaevaporador. Os álcoois produzidos foram purificados por cromatografia em coluna de sílica gel (10% acetato de etila/hexano, 50% acetato de etila/hexano) e caracterizado por RMN de ¹H e ¹³C. Os dados experimentais de RMN de ¹H e ¹³C são relatados de forma análoga à descrita anteriormente e comparados aos da literatura [105–109].

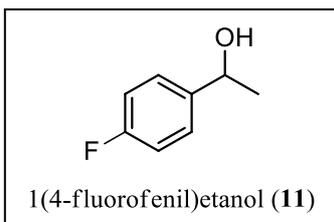


Óleo incolor; **RMN** ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) 7,29 (d, *J* = 7,80 Hz, 2H); 7,19 (d, *J* = 7,80 Hz, 2H); 4,90 (q, *J* = 6,43 Hz, 1H); 2,37 (s, 3H); 1,83 (s, 1H); 1,51 (d, *J* = 6,45 Hz, 3H). **RMN** ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): δ (ppm) 142,9; 137,2; 129,2; 125,4; 70,3; 25,1; 21,1.
CG: T_R (*R*) = 16,19 min; T_R (*S*) = 16,29 min.



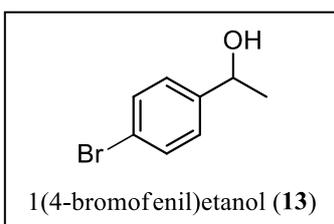
Óleo amarelado; **RMN ¹H** (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) 7,35-7,30 (m, 2H); 6,93-6,88 (m, 2H); 4,88 (q, *J* = 6,43 Hz, 1H); 3,83 (s, 3H); 1,50 (d, *J* = 6,44 Hz, 3H). **RMN ¹³C** (CDCl₃, 75 MHz): δ (ppm) 159,0; 138,0; 126,7; 113,9; 70,0; 55,3; 25,0.

CG: T_R (*R*) = 18,32 min; T_R (*S*) = 18,35 min.



Óleo acastanhado; **RMN ¹H** (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) 7,40-7,28 (m, 2H); 7,09-7,01 (m, 2H); 4,91 (q, *J* = 6,44 Hz, 1H); 1,50 (d, *J* = 6,45 Hz, 3H). **RMN ¹³C** (CDCl₃, 75 MHz): δ (ppm) 160,5; 141,5; 127,1; 115,1; 69,8; 25,3.

CG: T_R (*R*) = 15,46 min; T_R (*S*) = 15,54 min.



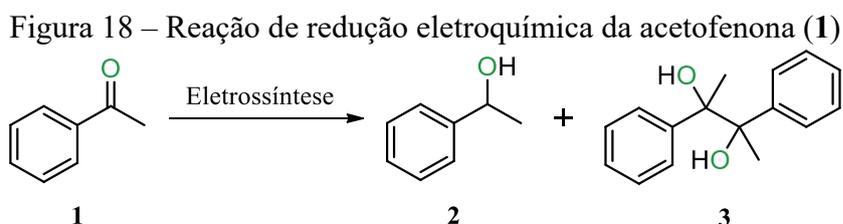
Óleo incolor; **RMN ¹H** (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) 7,52-7,46 (m, 2H); 7,30-7,25 (m, 2H); 4,89 (q, *J* = 6,46 Hz, 1H); 1,49 (d, *J* = 6,47 Hz, 3H). **RMN ¹³C** (CDCl₃, 75 MHz): δ (ppm) 144,8; 131,6; 127,2; 121,2; 69,8; 25,3.

CG: T_R (*R*) = 19,27 min; T_R (*S*) = 19,30 min.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRIMEIROS ENSAIOS DE ELETORREDUÇÃO: DA SELEÇÃO DOS ELETRODOS AO SISTEMA DE SOLVENTES

Com finalidade de otimização das condições reacionais, testes preliminares para a eletrorredução da acetofenona (**1**) visando formar 1-feniletanol (**2**) em detrimento do dímero de pinacol correspondente (**3**) (Figura 18) foram promovidos por diferentes sistemas de três eletrodos, em diversas combinações de solventes e eletrólitos de suporte (Tabelas 2 e 3). O composto **1** foi escolhido como substrato modelo pela facilidade de análise e caracterização dos produtos formados a partir de sua redução eletrossintética.



As reações que levaram à formação do álcool de interesse foram derivadas das condições observadas nas Entradas 12-15 (Tabela 3).

Tabela 2 – Seleção de condições experimentais testadas para eletrorredução de **1**

Entrada	Eletrodos	Solventes e eletrólitos ¹	Resultados ²
1	Carbono vítreo (W), Ag/Ag ⁺ (R) e platina (C)	Acetonitrila e TBAF	- ³
2	Carbono vítreo (W), Ag/Ag ⁺ (R) e platina (C)	Acetonitrila, H ₂ O e MgCl ₂ ·6H ₂ O	- ³
3	Carbono vítreo (W), Ag/AgCl (R) e platina (C)	Etanol e Na ₂ SO ₄	- ³
4	Carbono vítreo (W), Ag/AgCl (R) e platina (C)	Etanol e KCl	- ³
5	Carbono vítreo (W), Ag/AgCl (R) e platina (C)	Etanol e TBAPF ₆	Formação de 3
6	Carbono vítreo (W), Ag/AgCl (R) e platina (C)	Etanol e H ₂ SO ₄	Formação de 3

¹Foram utilizados 0,48 mmol de **1** em 4,0 mL de solvente. O potencial aplicado foi de -2,0 V vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹). Tempos reacionais de até 6 h foram observados. ²A formação de **2** foi observada por CCD e a formação de **3** por espectroscopia UV-Vis. ³Os produtos **2** e **3** não foram detectados nestas condições.

Tabela 3 – Seleção de condições experimentais testadas para eletrorredução de **1** (continuação da Tabela 2)

Entrada	Eletrodos	Solventes e eletrólitos¹	Resultados²
7	Carbono vítreo (W), Ag/AgCl (R) e alumínio (C)	Etanol e H ₂ SO ₄	Formação de 3
8	Platina (W), Ag/AgCl (R) e carbono vítreo (C)	Etanol e H ₂ SO ₄	⁻³
9	Níquel (W), Ag/AgCl (R) e platina (C)	Etanol e H ₂ SO ₄	⁻³
10	Alumínio (W), Ag/AgCl (R) e platina (C)	Etanol e H ₂ SO ₄	Formação de 3
11	Cobre (W), Ag/AgCl (R) e platina (C)	Etanol e H ₂ SO ₄	Formação de 3
12	Estanho/chumbo (W), Ag/AgCl (R) e platina (C)	Etanol e H ₂ SO ₄	Formação de 2 e 3 ⁴
13	Estanho/chumbo (W), Ag/AgCl (R) e platina (C)	Água e H ₂ SO ₄	Formação de 2 e 3 ⁴
14	Estanho/chumbo (W), Ag/AgCl (R) e platina (C)	Tampão acetato (0,1 mol L ⁻¹) pH 4,0	Formação de 2 e 3 ⁴
15	Estanho/chumbo (W), Ag/AgCl (R) e platina (C)	Tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹) pH 7,4	Formação de 2 e 3 ⁴

¹Foram utilizados 0,48 mmol de **1** em 4,0 mL de solvente. O potencial aplicado foi de -2,0 V vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹). Tempos reacionais de até 6 h foram observados. ²A formação de **2** foi observada por CCD e a formação de **3** por espectroscopia UV-Vis. ³Os produtos **2** e **3** não foram detectados nestas condições.

⁴Proporção não determinada.

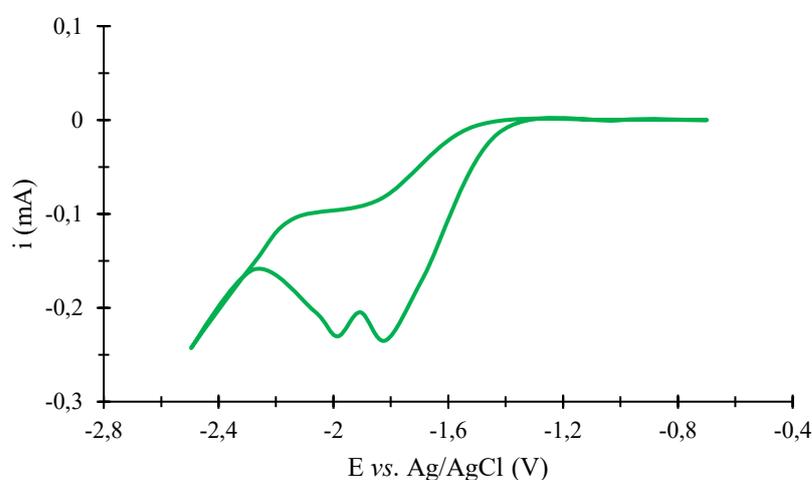
Todas as reações que conduziram à formação do composto **2** foram realizadas com fio de liga estanho/chumbo (63:37) como eletrodo de trabalho. Quanto a isso, sabe-se que a interação do grupo funcional carbonila de cetonas com superfícies metálicas formadas por átomos altamente coordenados é termodinamicamente desfavorável [110]. Entretanto, conforme foi relatado para o benzeno, espera-se que compostos contendo anel aromático interajam com essas superfícies por meio do seu sistema de elétrons π [111–113]. Desse modo, ocorre uma diminuição da distância física entre a superfície do eletrodo metálico e o grupo funcional carbonila, permitindo que este seja reduzido [114].

Os solventes e eletrólitos de suporte das reações com melhores resultados no sentido da formação de **2** foram etanol e água na presença de ácido sulfúrico, além dos tampões acetato (0,1 mol L⁻¹) pH 4,0 e fosfato (0,1 mol L⁻¹) pH 7,4. Tempos reacionais de 4 horas foram necessários para conversão e o potencial aplicado nos testes selecionados foi de -2,0 V vs. Ag/AgCl. Em potenciais de menor magnitude, não ocorreu relevante formação do álcool **2**.

Resultados similares foram observados em estudos anteriores, nos quais a formação do álcool aumentou com o aumento do potencial negativo aplicado à célula [115].

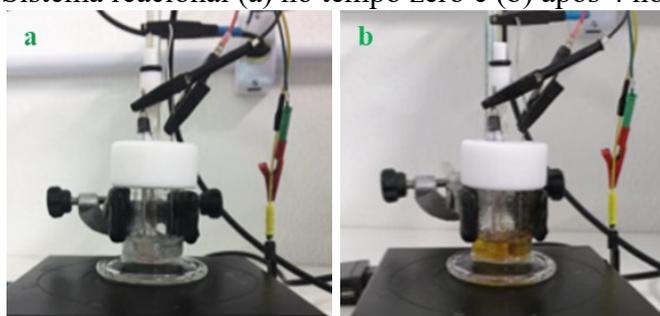
Na Figura 19, é possível observar dois picos de redução para a acetofenona (**1**), resultantes dos mecanismos de transferência de um ou dois elétrons. A transferência do um elétron (em -1,827 V) dá origem ao intermediário precursor do dímero **3** e a transferência de dois elétrons (em -1,986 V) forma o intermediário precursor do álcool **2**.

Figura 19 – Voltamograma cíclico de 0,05 mol L⁻¹ de **1** em cossolvente (CH₃CN/tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹) pH 7,4; 1/1), com adição de TBAPF₆ (0,1 mol L⁻¹), a uma taxa de varredura de 0,1 V s⁻¹, com W = Sn/Pb (63:37), R = Ag/AgCl e C = Pt



A Figura 20 mostra o sistema reacional pré-otimizado (a) em tempo zero e (b) após 4 horas de reação. Nesse caso, há formação considerável do composto **3**.

Figura 20 – Sistema reacional (a) no tempo zero e (b) após 4 horas de reação



Para estimular a formação preferencial do 1-feniletanol (**2**) a partir da redução eletroquímica da acetofenona (**1**), foi necessário estabilizar o intermediário radicalar no meio, evitando a dimerização [15,28]. Nesse sentido, as enzimas podem ser boas candidatas para proporcionar a estabilização necessária e levar à obtenção do produto de interesse.

4.2 ESTUDO DA ATIVIDADE E DA ESTABILIDADE DAS LIPASES

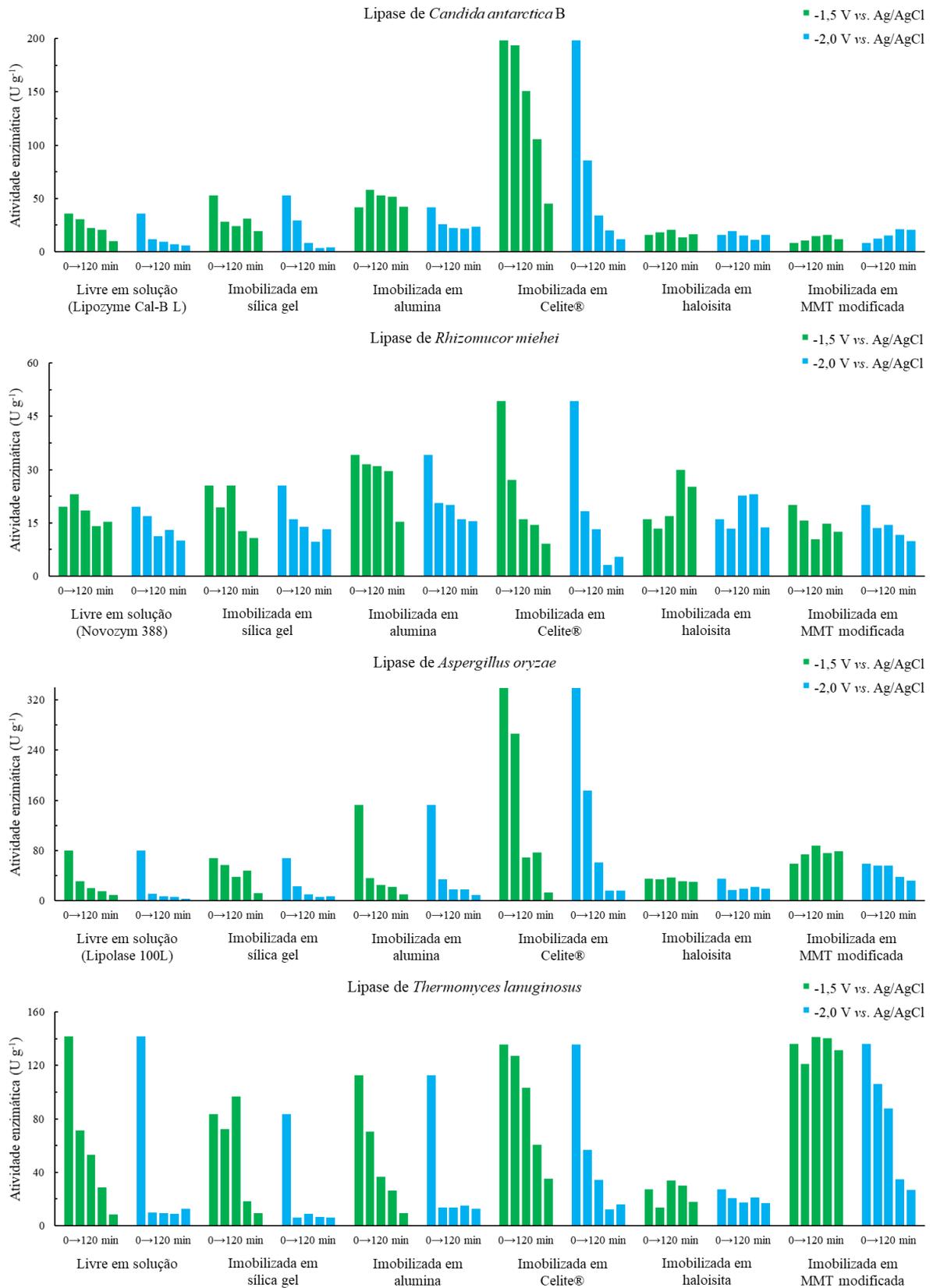
O estudo de estabilidade das lipases disponíveis foi iniciado a partir das enzimas comercializadas em solução. As atividades de 4 lipases nessa condição, a saber: lipase de *Candida antarctica* B (Lipozyme CAL-B L), lipase de *Rhizomucor miehei* (Novozym 388), lipase de *Aspergillus oryzae* (Lipolase 100L) e lipase de *Thermomyces lanuginosus*; foram determinadas antes e após exposição a potenciais de -1,5 e -2,0 V vs. Ag/AgCl por tempos de 15-120 minutos (Figura 21; Apêndice A, Tabelas 9-12).

Amostras destas espécies foram imobilizadas em sílica gel, alumina, Celite®, haloisita e MMT modificada e os testes de estabilidade foram repetidos. Estes suportes apresentam elevado potencial para imobilização por adsorção e foram escolhidos pela possibilidade de estabilizar a enzima de forma simples e imediata [47,116]. Este estudo abarcou, ainda, as mesmas lipases em suas formas de imobilização comercial (conforme disponibilidade).

Os testes foram realizados sob a condição da Entrada 15 (Tabela 3), utilizando tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pH 7,4 como solvente. Tendo em vista que álcoois de baixa massa molar podem romper a estrutura tridimensional da lipase [44,117] e que o pH ácido pode alterar cargas, interações intermoleculares e até o formato do sítio ativo da enzima, causando perda de atividade catalítica [40]; os sistemas que incluem etanol ou solução de H_2SO_4 , bem como o tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,0, foram substituídos para viabilizar a adição das lipases ao meio reacional e melhor observar seu comportamento frente à aplicação do potencial elétrico.

Ganhos e perdas na atividade catalítica inicial das lipases imobilizadas nos suportes foram observados e eram previstos, visto que são inerentes à natureza das enzimas e à condição de imobilização [98]. Dentre os materiais investigados, a imobilização em Celite® proporcionou à lipase de *Candida antarctica* B (Lipozyme CAL-B L) um aumento superior a 5 vezes em sua atividade inicial (Figura 21; Apêndice A, Tabela 9). No caso da lipase de *Rhizomucor miehei* (Novozym 388), quando imobilizada sobre o mesmo suporte, a atividade inicial se mostrou maior que o dobro da observada para a enzima livre (Figura 21; Apêndice A, Tabela 10). A Celite® foi relevante, ainda, para imobilização da lipase de *Aspergillus oryzae* (Lipolase 100L), cuja atividade inicial quadruplicou na nova condição (Figura 21; Apêndice A, Tabela 11). Ao contrário das demais enzimas em solução, a lipase de *Thermomyces lanuginosus* sofreu com a perda de atividade inicial após imobilização em qualquer dos suportes investigados, embora esta tenha sido pouco significativa para os testes com Celite® e MMT modificada (Figura 21; Apêndice A, Tabela 12).

Figura 21 – Estudo de estabilidade das lipases comercializadas em solução quando livres e após imobilização em diferentes suportes



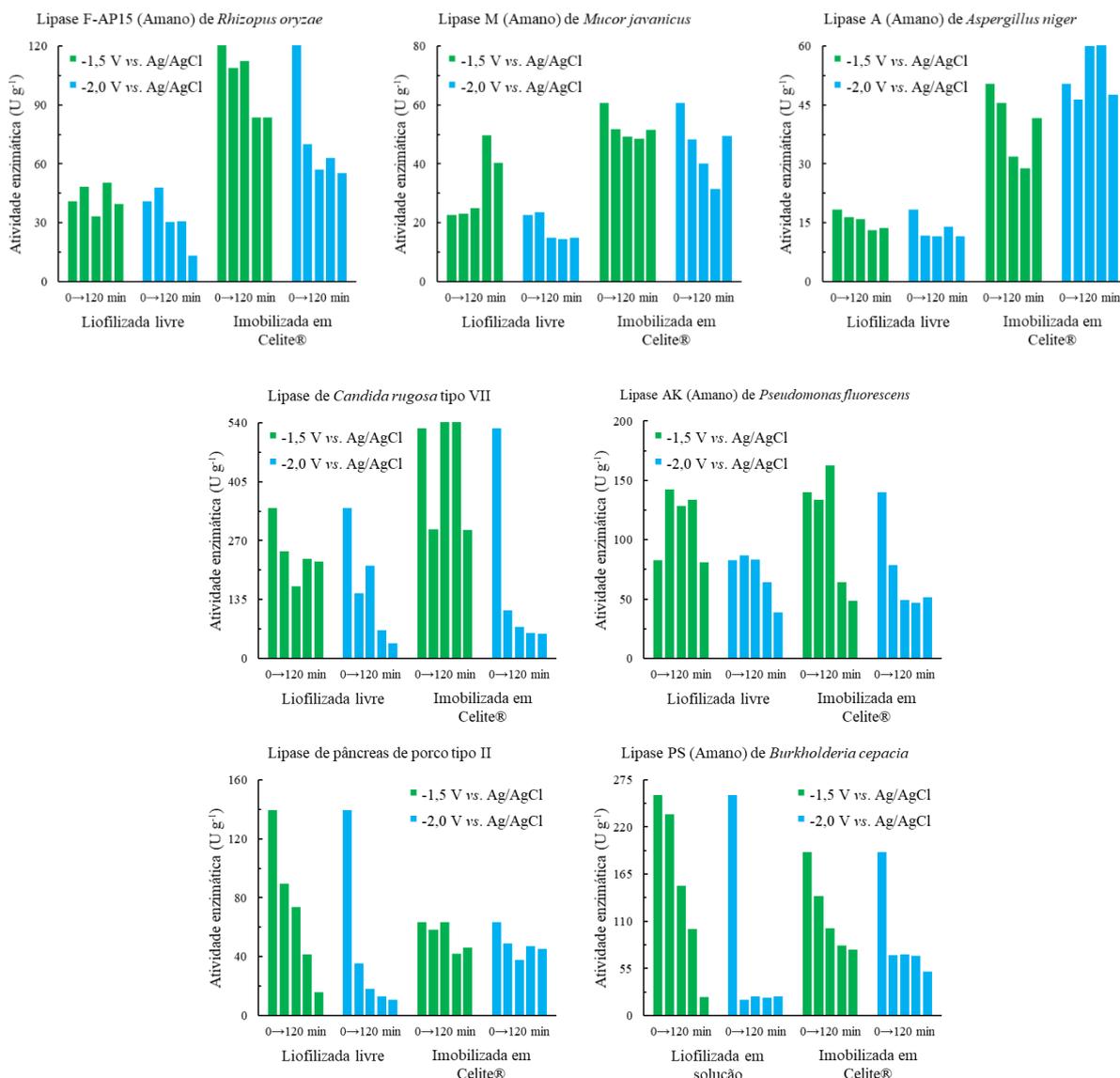
Invariavelmente, o estudo de estabilidade dessas lipases confirmou o grande impacto do potencial aplicado na atividade enzimática. Em todos os casos, quanto maiores a magnitude do potencial e o tempo de exposição, menores as atividades observadas. A par disso, a imobilização em Celite® se mostrou uma boa opção quando a lipase de *Candida antarctica* B (Lipozyme CAL-B L) foi adicionada ao meio reacional sob potencial de -1,5 V vs. Ag/AgCl, o que pode ser observado pela considerável estabilidade da espécie após 60 minutos de exposição (Figura 21; Apêndice A, Tabela 9). Para a lipase de *Rhizomucor Miehei* (Novozym 388), observou-se um comportamento similar, porém após imobilização em alumina (Figura 21; Apêndice A, Tabela 10). Em ambos os casos, a exposição das lipases imobilizadas a um potencial de maior magnitude (-2,0 V vs. Ag/AgCl) por até 30 minutos foi, ainda, viável, visto que a atividade catalítica nesse período se manteve comparável à da enzima livre em tempo zero.

O ganho na atividade catalítica da lipase de *Aspergillus oryzae* (Lipolase 100L) após imobilização em Celite® foi perdido de forma quase imediata com a aplicação de potencial elétrico. Apesar disso, a atividade da enzima imobilizada permaneceu similar à atividade inicial da enzima livre por até 60 minutos sob potencial de -1,5 V vs. Ag/AgCl e por até 30 minutos sob potencial de -2,0 V vs. Ag/AgCl. É interessante observar, ainda, que o comportamento de estabilidade se repetiu para a lipase imobilizada em MMT modificada durante os 120 minutos sob potencial de -1,5 V vs. Ag/AgCl e por até 30 minutos sob potencial de -2,0 V vs. Ag/AgCl (Figura 21; Apêndice A, Tabela 11).

Finalmente, a lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em MMT modificada permaneceu estável quando exposta a um potencial de -1,5 V vs. Ag/AgCl durante os 120 minutos de investigação. Sob aplicação do potencial de maior magnitude (-2,0 V vs. Ag/AgCl), a enzima imobilizada manteve 64% de sua atividade por até 30 minutos (Figura 21; Apêndice A, Tabela 12).

Com base nos resultados descritos para os testes iniciais com lipases comercializadas em solução, a Celite® foi o material de suporte selecionado para imobilização das 7 lipases liofilizadas disponíveis, a saber: lipase F-AP15 (Amano) de *Rhizopus oryzae*, lipase M (Amano) de *Mucor javanicus*, lipase A (Amano) de *Aspergillus niger*, lipase de *Candida rugosa* tipo VII, lipase AK (Amano) de *Pseudomonas fluorescens*, lipase de pâncreas de porco tipo II e lipase PS (Amano) de *Burkholderia cepacia*; e continuação dos estudos de estabilidade (Figura 22; Apêndice A, Tabelas 13-19). Esses estudos abarcaram, ainda, as mesmas lipases em suas formas de imobilização comercial (conforme disponibilidade).

Figura 22 – Estudo de estabilidade das lipases comercializadas liofilizadas quando livres e após imobilização em Celite®



A imobilização em Celite® proporcionou um aumento na atividade inicial das lipases F-AP15 (Amano) de *Rhizopus oryzae*, M (Amano) de *Mucor javanicus*, A (Amano) de *Aspergillus niger*, *Candida rugosa* tipo VII e AK (Amano) de *Pseudomonas fluorescens* (Figura 22; Apêndice A, Tabelas 13-17). Dentre estas, as três primeiras enzimas imobilizadas permaneceram estáveis frente a aplicação de potencial elétrico, inclusive de maior magnitude (-2,0 V vs. Ag/AgCl), durante todo o tempo de investigação (120 minutos).

Para a lipase de *Candida rugosa* tipo VII, a imobilização se mostrou viável apenas quando a enzima foi exposta a -1,5 V vs. Ag/AgCl, garantindo-lhe relevante estabilidade nessa condição por até 120 minutos (Figura 22; Apêndice A, Tabela 16). A imobilização em Celite®

não foi vantajosa para a lipase AK (Amano) de *Pseudomonas fluorescens* em termos de estabilidade (Figura 22; Apêndice A, Tabela 17).

Apesar da diminuição da atividade inicial da lipase de pâncreas de porco tipo II (Figura 22; Apêndice A, Tabela 18) e da lipase PS (Amano) de *Burkholderia cepacia* (Figura 22; Apêndice A, Tabela 19), a estabilidade dessas enzimas aumentou após imobilização em Celite®, principalmente sob $-2,0\text{ V vs. Ag/AgCl}$.

De modo geral, os exemplares comercializados em suas formas já imobilizadas, referentes tanto às enzimas em solução quanto às liofilizadas, mostraram-se estáveis frente às condições de teste a despeito de suas atividades iniciais notadamente baixas. Exceções a essa tendência de estabilidade sob potencial foram observadas para a lipases de *Thermomyces lanuginosus* (Apêndice A, Tabela 12) imobilizada em sílica gel (Lipolase 100T) e para a lipase PS-D (Amano) de *Burkholderia cepacia* (Apêndice A, Tabela 19) imobilizada em diatomita.

4.3 REDUÇÃO ELETROSSÍNTÉTICA DA ACETOFENONA APLICANDO LIPASES

Após os estudos de otimização dos parâmetros eletrossintéticos e de estabilidade das lipases, novos testes de redução da acetofenona (**1**) foram realizados combinando eletrossíntese e biocatálise. Esse novo estudo visou, portanto, o desenvolvimento de uma nova metodologia empregando para isso a (bio)eletrorredução de **1**.

Os testes iniciais foram realizados sob a condição da Entrada 15 (Tabela 3), utilizando tampão fosfato ($0,1\text{ mol L}^{-1}$) pH 7,4 como solvente, e as lipases disponíveis foram adicionadas ao meio reacional na condição mais viável, em cada caso, frente à aplicação de um potencial elétrico de $-2,0\text{ V vs. Ag/AgCl}$ (Figura 23; Tabelas 4 e 5). Além disso, todas as enzimas disponíveis na condição de imobilização comercial também foram testadas.

Figura 23 – Reação de redução eletroquímica de **1** sob a condição reacional da Entrada 15 (Tabela 3), na presença de lipase

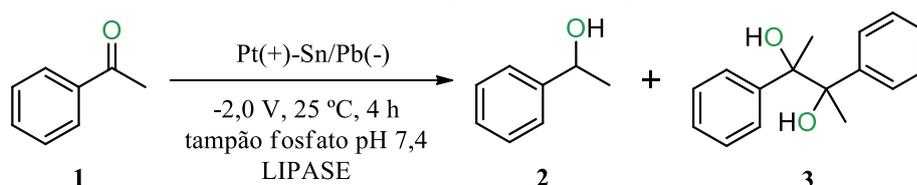


Tabela 4 – Testes com adição de lipases à eletrorredução de **1**

Entrada ¹	Enzima ²	Condição	Composição reacional final (%) ³		
			[1]	[2]	[3]
1	Sem adição	Sem adição	3,3 ± 2,2	33,6 ± 2,8	63,1 ± 0,6
2	Lipase de <i>Candida antarctica</i> B (Lipozyme CAL-B L)	Imobilizada em Celite®	-	47,6 ± 7,8	54,6 ± 7,8
3	Lipase de <i>Candida antarctica</i> B (Lipozyme 435) ⁴	Imobilizada em resina de troca iônica	-	49,0 ± 8,1	51,0 ± 8,1
4	Lipase de <i>Candida antarctica</i> B (Novozym 435) ⁴	Imobilizada em resina acrílica	-	64,1 ± 5,0	35,9 ± 5,0
5	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> (Novozym 388)	Imobilizada em alumina	4,3 ± 1,5	42,6 ± 2,0	53,1 ± 0,4
6	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> (Lipozyme RM-IM) ⁴	Imobilizada em Duolite	1,2 ± 0,1	60,1 ± 4,7	38,2 ± 4,6
7	Lipase de <i>Aspergillus oryzae</i> (Lipolase 100L)	Imobilizada em Celite®	-	41,8 ± 6,4	58,2 ± 6,4
8	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	Imobilizada em MMT modificada	-	59,7 ± 4,6	40,3 ± 4,6
9	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (Lipolase 100T) ⁴	Imobilizada em sílica gel	-	61,5 ± 4,8	38,5 ± 4,8
10	Lipase F-AP15 (Amano) de <i>Rhizopus oryzae</i>	Imobilizada em Celite®	1,1 ± 0,1	23,6 ± 4,1	75,3 ± 4,2
11	Lipase M (Amano) de <i>Mucor javanicus</i>	Imobilizada em Celite®	1,9 ± 1,7	24,0 ± 5,7	74,0 ± 7,4
12	Lipase A (Amano) de <i>Aspergillus niger</i>	Imobilizada em Celite®	1,2 ± 0,7	18,4 ± 1,9	80,3 ± 2,6

¹ Condições reacionais: eletrodo de trabalho combinado Sn/Pb (63:37), contra-eletrodo de Pt, **1** (0,48 mmol), tampão fosfato pH 7,4 (4,0 mL), -2,0 V vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹), 25 °C, 4 h. ² Adição de 20 mg da enzima. ³ Média ± desvio padrão; n = 2. Quantificação realizada por CG com base em curvas de calibração pré-definidas para **1** e **2**. ⁴ Exemplar comercialmente imobilizado.

Tabela 5 – Testes com adição de lipases à eletrorredução de **1** (continuação da Tabela 4)

Entrada ¹	Enzima ²	Condição	Composição reacional final (%) ³		
			[1]	[2]	[3]
13	Lipase de <i>Candida rugosa</i> tipo VII	Liofilizada livre	6,3 ± 1,9	15,9 ± 6,0	77,8 ± 4,1
14	Lipase AK (Amano) de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Liofilizada livre	1,8 ± 1,5	30,6 ± 0,8	67,6 ± 0,7
15	Lipase AK (Amano) de <i>Pseudomonas fluorescens</i> ⁴	Imobilizada em sol-gel	-	48,7 ± 1,4	51,3 ± 1,4
16	Lipase PS (Amano) de <i>Burkholderia cepacia</i>	Imobilizada em Celite®	-	21,2 ± 7,2	78,8 ± 7,2
17	Lipase PS-C (Amano) de <i>Burkholderia cepacia</i> ⁴	Imobilizada em cerâmica	-	41,0 ± 0,8	59,0 ± 0,8
18	Lipase PS-D (Amano) de <i>Burkholderia cepacia</i> ⁴	Imobilizada em diatomita	5,8 ± 0,4	62,2 ± 4,8	32,1 ± 5,3
19	Lipase de pâncreas de porco tipo II	Imobilizada em Celite®	5,3 ± 1,4	26,0 ± 1,9	68,7 ± 3,3

¹ Condições reacionais: eletrodo de trabalho combinado Sn/Pb (63:37), contra-eleto de Pt, **1** (0,48 mmol), tampão fosfato pH 7,4 (4,0 mL), -2,0 V vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹), 25 °C, 4 h. ² Adição de 20 mg da enzima. ³ Média ± desvio padrão; n = 2. Quantificação realizada por CG com base em curvas de calibração pré-definidas para **1** e **2**. ⁴ Exemplar comercialmente imobilizado.

Inusitadamente, não há relação direta entre a estabilidade das lipases investigadas frente à aplicação de potencial elétrico e a conversão da acetofenona (**1**) ao 1-feniletanol (**2**). Em vista disso, propõe-se que o desempenho das diferentes lipases envolvidas na eletrorredução pode estar também relacionado com o efeito do próprio substrato sobre o potencial catalítico da enzima. Existe a evidência de que a exposição da lipase de *Candida antarctica* B (Novozym 435) a uma solução de acetofenona (0,02 mol L⁻¹) diminuiu em 17% a formação do produto desejado no referido estudo, o que os autores classificaram como uma ligeira inibição da atividade enzimática [118]. Em contrapartida, testes que envolveram a sujeição de lipases pancreáticas de porco, como a do tipo II, a uma solução de acetofenona (8×10⁻³ mol L⁻¹) revelaram uma inibição de 33% da atividade enzimática, considerada relevante [119].

Sendo assim, algumas lipases são muito afetadas pela presença da acetofenona (**1**) no meio, enquanto outras menos. Esses fenômenos de inibição já observados podem estar relacionados ao fato de que a adição da lipase de *Candida antarctica* B (Novozym 435) à eletrorredução de **1** (Tabela 4, Entrada 4), por exemplo, levou à formação majoritária do álcool **2**, mesmo quando a enzima se mostrou menos ativa ou estável nos testes de hidrólise do éster **4** (Apêndice A, Tabela 9). Paralelamente, a adição da lipase de pâncreas de porco tipo II contribuiu com a conversão de **1** para formar o dímero **3**, ainda que mais ativa e estável nas mesmas condições de estudo (Apêndice A, Tabela 18).

De forma análoga à lipase de *Candida antarctica* B (Novozym 435), a formação de 1-feniletanol (**2**) foi favorecida na presença de lipase de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM-IM), lipase de *Thermomyces lanuginosus* (imobilizada em MMT modificada e, comercialmente, em sílica gel (Lipolase 100T)) e lipase de *Burkholderia cepacia* (PS-D Amano I) (Tabelas 4 e 5, Entradas 4, 6, 8, 9 e 18, respectivamente). Apesar de não constatado excesso enantiomérico, a adição dessas enzimas levou a percentuais de 64,1%, 60,1%, 59,7%, 61,5% e 62,2% de **2**, respectivamente, na composição da mistura reacional final, com desvios padrão de 4,6–5,0%. Estas conversões são significativamente superiores aos 33,6±2,8% de **2** observados na mistura reacional final quando não houve a adição de enzima (Tabela 4, Entrada 1).

Para todos os fins, as lipases que levaram à formação do álcool **2** em detrimento do dímero **3** foram selecionadas para dar continuidade aos ensaios de eletrorredução da acetofenona (**1**).

4.4 ESTUDOS ADICIONAIS NA PRESENÇA DAS LIPASES SELECIONADAS

4.4.1 Adição de TMSCl à eletrorredução da acetofenona catalisada por lipase

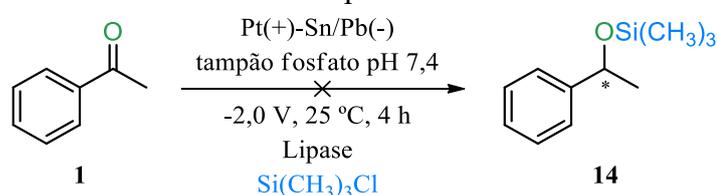
Ao meio de (bio)eletrorredução de **1**, nas condições da Entrada 15 (Tabela 3) e na presença das lipases selecionadas, foi adicionado cloreto de trimetilsilano ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$, TMSCl). Os resultados desses testes podem ser observados na Tabela 20 (Apêndice A).

Na literatura, alguns autores apresentaram protocolos promissores para formação de éteres de silício oriundos de reações de proteção de álcoois mediadas por lipases. Em um desses estudos, alcoxisilanos foram utilizados como eletrófilos em reações de transesterificação do 1-octanol e do álcool terc-butilíco catalisadas por enzimas, como a lipase de *Rhizopus oryzae* [120]. Em outros ensaios, a lipase de *Candida antarctica* B (CAL-B) foi responsável pela catálise da proteção de álcoois primários e secundários, inclusive do 1-feniletanol (**2**), com

clorossilanos como fonte de silício, sendo que a utilização de TMSCl levou aos melhores resultados quanto à conversão [121]. A construção da ligação O-Si se dá, nesses casos, por meio de um possível mecanismo que inclui a reação do resíduo de serina da tríade catalítica da lipase com o silano em questão, formando um intermediário reativo [122,123].

Com base nisso, esperava-se promover a captura do radical precursor do álcool neutro, o intermediário reativo gerado na primeira etapa da eletrorredução, para dar origem ao composto **14** em maiores proporções e/ou com excesso enantiomérico (Figura 24).

Figura 24 – Eletrorredução da acetofenona (**1**) e proteção do 1-feniletanol (**2**) mediada por lipase



No entanto, observou-se a inabilidade do sistema testado em promover a proteção do álcool. Além disso, a conversão ao 1-feniletanol (**2**) diminuiu consideravelmente na presença de TMSCl (Apêndice A, Tabela 20) se comparada às porcentagens do álcool na composição reacional final das eletrorreduções na ausência do grupo protetor (Tabelas 4 e 5).

Nas condições das Entradas 1-5 (Apêndice A, Tabela 20), o decréscimo na formação de **2** foi de 5,6%, 7,1%, 12,8%, 14,7% e 31,3%, respectivamente. Com a adição das lipases de *Burkholderia cepacia* (PS-D Amano I) e de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em MMT modificada (Apêndice A, Tabela 20, Entradas 4 e 5) junto ao TMSCl, observou-se, inclusive, a formação majoritária do composto **3**. A possível justificativa para estes resultados envolve a ação inibitória dos ânions cloreto sobre a atividade catalítica das lipases que, apesar de reversível por diluição em meio isento de sal, é relevante (pode superar 60%) e praticamente instantânea [124–126].

4.4.2 Influência do pH na eletrorredução da acetofenona aplicando lipases

Por se tratar de uma reação cujo mecanismo depende da transferência de prótons, a eletrossíntese em solução neutra foi reavaliada. Nesse sentido, um estudo recente revelou que a ocorrência da eletrorredução da acetofenona (**1**) em pH 6,0 foi, de fato, inviabilizada pela diminuta concentração de íons hidrônio no meio reacional. Ainda, segundo os autores, melhores

resultados quanto à formação de 1-feniletanol (**2**) foram alcançados em solução de ácido acético/acetato de sódio pH 5,0 como cossolvente [32].

Permeado a este enfoque nos eletrólitos e aditivos, é importante considerar que os íons fosfato tem um efeito negativo conhecido na estabilidade de diversas lipases [126–128]. Sob essa premissa e buscando um maior rendimento na conversão ao álcool em meio ácido, a eletrorredução de **1** na presença das lipases selecionadas foi testada em tampão acetato (0,1 mol L⁻¹) pH 4,0 e pH 5,0 (Tabela 6).

Tabela 6 – Ensaio de eletrorredução de **1** em tampão acetato pH 4,0 e pH 5,0

Entrada ¹	Enzima ²	pH	Composição reacional final (%) ³		
			[1]	[2]	[3]
1	Sem adição	4,0	1,2 ± 0,1	61,5 ± 4,8	37,2 ± 4,7
2	Lipase de <i>Candida antarctica</i> B (Novozym 435) ⁴	4,0	2,1 ± 0,2	67,9 ± 5,3	29,9 ± 5,5
3	Lipase PS-D (Amano) de <i>Burkholderia cepacia</i> ⁴	4,0	3,2 ± 0,2	49,7 ± 3,9	47,1 ± 3,6
4	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> (Lipozyme RM-IM) ⁴	4,0	3,2 ± 0,2	46,1 ± 3,6	50,7 ± 3,8
5	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (Lipolase 100T) ⁴	4,0	3,3 ± 0,3	57,9 ± 4,5	38,8 ± 4,8
6	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (em MMT modificada)	4,0	1,1 ± 0,1	78,7 ± 6,1	20,1 ± 6,2
7	Sem adição	5,0	-	63,8 ± 6,7	36,2 ± 6,7
8	Lipase de <i>Candida antarctica</i> B (Novozym 435) ⁴	5,0	-	65,2 ± 5,1	34,8 ± 5,1
9	Lipase PS-D (Amano) de <i>Burkholderia cepacia</i> ⁴	5,0	4,6 ± 0,3	37,2 ± 2,9	58,1 ± 2,6
10	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> (Lipozyme RM-IM) ⁴	5,0	0,6 ± 0,3	74,9 ± 1,7	24,4 ± 1,4
11	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (Lipolase 100T) ⁴	5,0	1,7 ± 0,1	93,9 ± 4,4	4,4 ± 4,3
12	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (em MMT modificada)	5,0	2,1 ± 0,1	93,2 ± 4,3	4,6 ± 4,2

¹ Condições reacionais: eletrodo de trabalho combinado Sn/Pb (63:37), contra-eletrodo de Pt, **1** (0,48 mmol), tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (4,0 mL), -2,0 V vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹), 25 °C, 4 h. ² Adição de 20 mg da enzima. ³ Média ± desvio padrão; n = 2. Quantificação realizada por CG com base em curvas de calibração pré-definidas para **1** e **2**. ⁴ Exemplar comercial imobilizado.

Efetivamente e na maioria dos ensaios, a alteração do solvente promoveu a formação do álcool **2** como produto majoritário da reação, inclusive em testes controle na ausência de biocatalisador (Tabela 6, Entradas 1 e 7).

A presença da lipase de *Candida antarctica* B (Novozym 435) não teve influência significativa no direcionamento da eletrorredução de **1** nas novas condições investigadas (Tabela 6, Entradas 2 e 8). Já a lipase de *Burkholderia cepacia* (PS-D Amano I) foi a única, dentre as selecionadas, com desempenho reduzido no sentido da formação eletrossintética do composto **2** em meio ácido, principalmente em pH 5,0, quando ocorreu formação majoritária de **3** (Tabela 6, Entrada 9).

A lipase de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM-IM) e a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase 100T) seguiram a tendência de diminuição da formação de **2** em pH 4,0 (Tabela 6, Entradas 4 e 5, respectivamente). Entretanto, observou-se um aumento expressivo das porcentagens deste álcool na mistura reacional final quando as mesmas reações foram realizadas em pH 5,0 (Tabela 6, Entradas 10 e 11, respectivamente). A adição específica da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase 100T) nesta condição levou ao marco de $93,9 \pm 4,4\%$ de conversão ao produto de interesse (**2**) (Tabela 6, Entrada 11).

Além disso, a mesma lipase de *Thermomyces lanuginosus*, agora imobilizada em MMT modificada, contribuiu com a geração do álcool **2** em ambas as condições de pH. Quando adicionada à eletrorredução de **1** em pH 5,0, a espécie conduziu a um rendimento de $93,2 \pm 4,3\%$ na formação do álcool em questão (Tabela 6, Entrada 12).

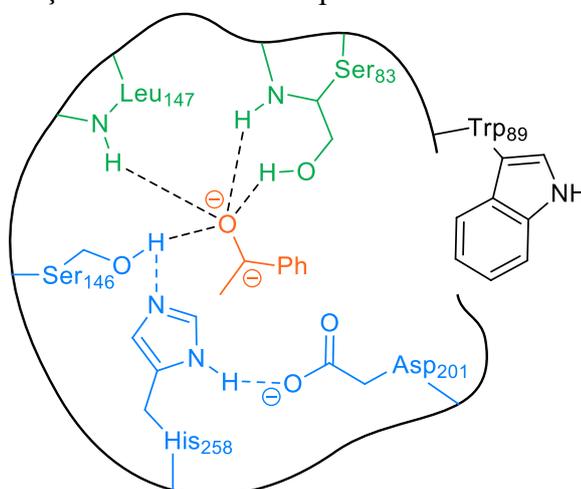
Alicerçada ao exposto está a conclusão de que a lipase de *Thermomyces lanuginosus* assume um papel fundamental na seletividade da reação de eletrorredução de **1**, principalmente quando esta ocorre em tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pH 5,0. Logo, solvente e enzima foram escolhidos para testes adicionais de (bio)eletrossíntese.

Sabe-se que a afinidade da lipase de *Thermomyces lanuginosus* pela acetofenona (**1**), bem como a eficiência da transformação catalítica observada, é determinada por fatores nos quais a natureza e a estrutura tridimensional da enzima como um todo desempenham o papel principal [119]. Ao que tudo indica, o que diferencia a lipase de *Thermomyces lanuginosus*, cujo sítio ativo inclui a típica tríade catalítica Ser₁₄₆-His₂₅₈-Asp₂₀₁, é um dos quatro resíduos de triptofano localizado no centro da tampa altamente móvel que o encobre, Trp₈₉, possível responsável pela atividade e estabilidade da espécie [129–131]. Além deste, outro dos resíduos de aminoácidos da tampa, Ser₈₃, é parte constituinte do bolsão do oxianion da lipase em questão que, junto ao resíduo de leucina (Leu₁₄₇), deve estabilizar o intermediário oxianiónico precursor do 1-feniletanol (**2**) formado na primeira etapa da reação de eletrorredução de **1**, de modo

semelhante ao que ocorre na estabilização do intermediário tetraédrico envolvido na catálise de reações de transferência de acila [132–135].

Na Figura 25 estão representados os principais resíduos de aminoácidos da tríade catalítica, do bolsão do oxiânion e da tampa do sítio ativo da lipase de *Thermomyces lanuginosus*. O intermediário reativo precursor do álcool (em alaranjado), resultante da redução de dois elétrons da acetofenona, aparece estabilizado por ligações de hidrogênio formadas, principalmente, no bolsão do oxiânion [133].

Figura 25 – Possível atuação da tríade catalítica (Ser₁₄₆-His₂₅₈-Asp₂₀₁ em azul), do bolsão do oxiânion (Ser₈₃ e Leu₁₄₇ em verde) e da tampa (Trp₈₉ em preto) da lipase de *Thermomyces lanuginosus* na estabilização do intermediário precursor do 1-feniletanol (em alaranjado).



4.4.3 Eletrorredução da acetofenona com lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada no eletrodo

Embora o desempenho da lipase de *Thermomyces lanuginosus* tenha se mostrado bastante satisfatório para redução da acetofenona (**1**) para formar 1-feniletanol (**2**) nas condições já descritas (Tabela 6, Entradas 11 e 12), qualquer melhoria adicional na estabilidade e reutilização da enzima seria interessante para viabilizar ainda mais sua aplicação em eletrossíntese orgânica.

Sob esta perspectiva, a imobilização da lipase no eletrodo de trabalho foi pautada e concebida por encapsulamento em micelas de Nafion [102–104], um ionômero perfluorado e sulfonado amplamente empregado na modificação de eletrodos. Dentre outras vantagens de imobilização, o Nafion atua como um revestimento protetor para a superfície do eletrodo, possui excelentes propriedades como condutor iônico e fornece uma interface biocompatível para transferência direta de elétrons [136–138].

Continuadamente, o eletrodo de trabalho composto pela liga estanho/chumbo (63:37) revestido por filme de Nafion modificado com lipase de *Thermomyces lanuginosus*, nomeado E-NLTL, foi incorporado ao sistema de eletrorredução de **1**. As reações foram desencadeadas não apenas em solvente otimizado – tampão acetato (0,1 mol L⁻¹) pH 5,0 –, mas também em tampão acetato (0,1 mol L⁻¹) pH 4,0 e tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹) pH 7,4 para fins de comparação (Tabela 7).

Tabela 7 – Desempenho do E-NLTL aplicado à eletrorredução de **1**

Entrada ¹	Solvente	Composição reacional final (%) ²		
		[1]	[2]	[3]
1	Tampão acetato pH 4,0	0,3 ± 0,1	58,0 ± 3,2	41,9 ± 2,8
2	Tampão acetato pH 5,0	1,5 ± 0,6	87,8 ± 0,1	10,8 ± 2,0
3	Tampão fosfato pH 7,4	-	49,5 ± 0,7	50,5 ± 0,7

¹ Condições reacionais: eletrodo de trabalho E-NLTL, contra-eletrodo de Pt, **1** (0,48 mmol), tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ ou tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (4,0 mL), -2,0 V vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹), 25 °C, 4 h. ² Média ± desvio padrão; n = 2. Quantificação realizada por CG com base em curvas de calibração pré-definidas para **1** e **2**.

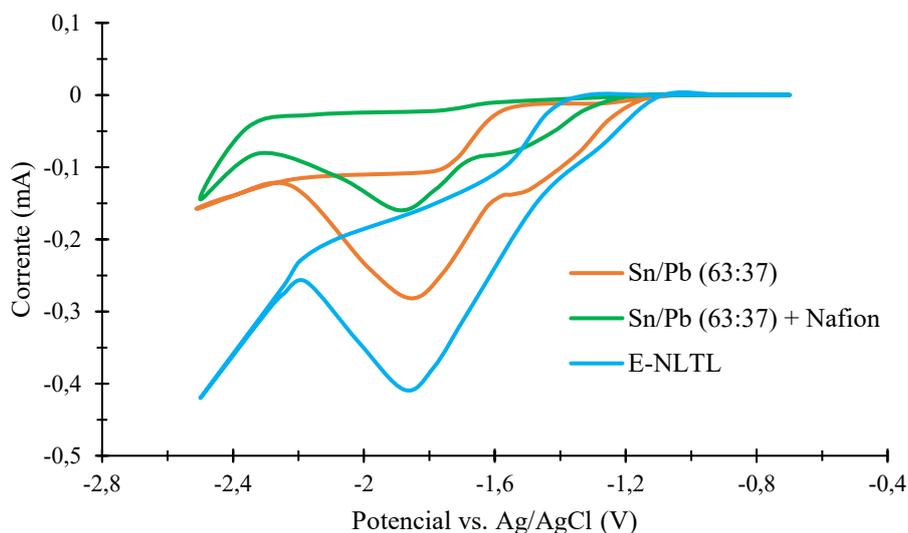
Conforme o esperado, a maior conversão ao composto **2** foi observada em tampão acetato (0,1 mol L⁻¹) pH 5,0 e o rendimento neste sentido alcançou 87,8%. A porcentagem do álcool **2** na mistura reacional após finalizada a eletrorredução de **1** foi apenas sutilmente menor utilizando E-NLTL no lugar da adição fracionada da enzima imobilizada à solução (2,5 mg a cada 30 minutos de reação). Além disto, a nova condição aumentou a reprodutibilidade da metodologia, visto que o desvio padrão da média aritmética de três repetições da reação foi de aproximadamente 0,1%.

Na Figura 26, ainda é possível observar dois picos de redução para a acetofenona (**1**) quando utilizada a liga metálica de estanho/chumbo (63:37) como eletrodo de trabalho para eletrorredução em tampão acetato (0,1 mol L⁻¹) pH 5,0, na ausência de lipase. O pico em -1,547 V corresponde ao mecanismo de redução de um elétron, que forma o intermediário precursor do dímero **3**. Já o pico em -1,856 V corresponde ao mecanismo de redução de dois elétrons, que dá origem ao intermediário precursor do álcool **2**. Um comportamento similar é observado com uso do eletrodo de trabalho metálico em questão quando este é revestido apenas com filme de Nafion, sem imobilização da lipase, salvo pela diminuição da corrente de 0,28 para 0,16 mA.

No entanto, para a reação com emprego do eletrodo revestido com Nafion modificado com lipase de *Thermomyces lanuginosus* (E-NLTL), apenas um dos picos de redução é observado com clareza na Figura 26, em -1,876 V. Essa resposta voltamétrica indica uma

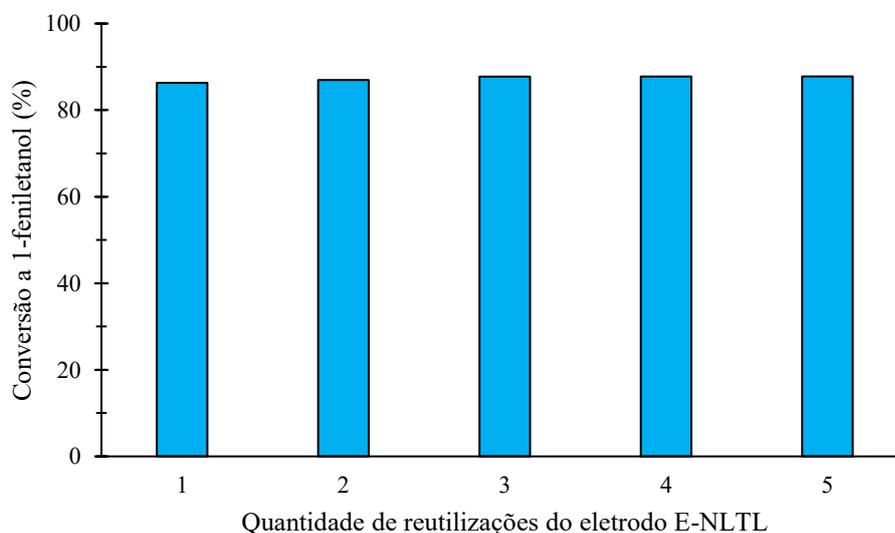
alteração no mecanismo de redução que leva à formação preferencial do intermediário precursor do álcool **2**. Nota-se, também, que a corrente de redução aumentou para 0,41 mA.

Figura 26 – Voltamogramas cíclicos de 0,05 mol L⁻¹ de **1** em cossolvente (CH₃CN/tampão acetato (0,1 mol L⁻¹) pH 5,0; 1/1) e TBAPF₆ (0,1 mol L⁻¹); taxa de varredura de 0,1 V s⁻¹; com W = Sn/Pb (63:37), Sn/Pb (63:37) + Nafion ou E-NLTL, R = Ag/AgCl e C = Pt



A eletrorredução da cetona **1** foi, ainda, realizada cinco vezes utilizando o mesmo eletrodo E-NLTL e os resultados estão representados em gráfico na Figura 27. As reações foram realizadas ao longo de cinco dias e pode-se observar que a conversão ao álcool **2** permaneceu constante. O eletrodo proposto é, portanto, estável e apto para armazenamento e reutilização.

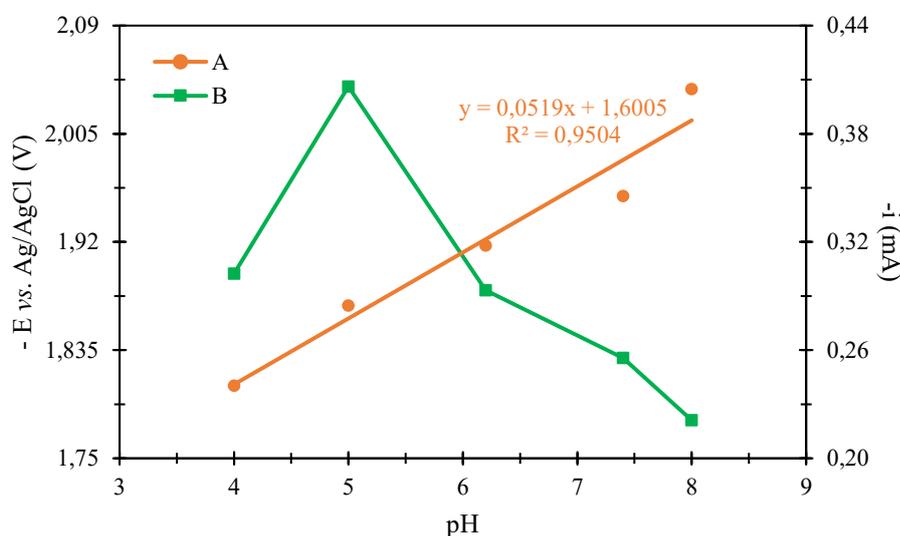
Figura 27 – Testes de reutilização do eletrodo E-NLTL para eletrorredução de 0,48 mmol de **1**, em 4,0 mL de tampão acetato (0,1 mol L⁻¹) pH 5,0, sob potencial de -2,0 V vs. Ag/AgCl, a 25 °C, durante 4 horas



4.4.3.1 Efeito do pH sobre a resposta voltamétrica

O efeito do pH sobre a corrente e o potencial do pico que corresponde à transferência de dois elétrons da superfície do eletrodo E-NLTL para a acetofenona (**1**), formando o intermediário precursor do 1-feniletanol, foi investigado por voltametria cíclica (Figura 28). Os ensaios foram realizados em soluções tampão acetato (pH 4,0 e 5,0) e fosfato (pH 6,2; 7,4 e 8,0) contendo $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de **1**, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de TBAPF₆ e acetonitrila como cossolvente.

Figura 28 – Influência do pH sobre (A) o potencial e (B) a corrente de pico resultantes da eletrorredução de **1**, com eletrodo de trabalho E-NLTL, em soluções tampão ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) acetato (pH 4-5) e fosfato (pH 6-8) contendo $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ do substrato e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de TBAPF₆, com acetonitrila como cossolvente. Resultados obtidos por voltametria cíclica.



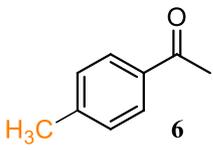
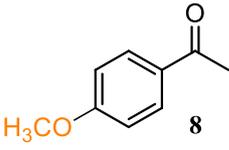
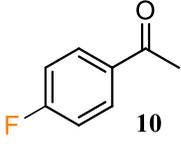
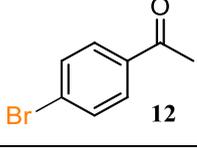
De acordo com o observado na Figura 28 (série A), o potencial de pico para eletrorredução da acetofenona (**1**) foi deslocado para maiores magnitudes com o aumento do pH da solução tampão. Essa relação apresenta uma linearidade, cuja inclinação da reta é de $-51,9 \text{ mV pH}^{-1}$, similar ao resultado obtido a partir da equação de Nernst para uma reação que envolve o mesmo número de prótons e elétrons ($-59,2 \text{ mV pH}^{-1}$). Por coulometria em potencial constante ($-2,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$), pode-se confirmar o envolvimento de dois elétrons e, por consequência, de dois prótons, na eletrorredução da acetofenona (**1**) em condições otimizadas.

Na Figura 28 (série B), por sua vez, é possível observar que a intensidade da corrente para eletrorredução de **1** foi maior em tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pH 5,0, o que há de ter influência sobre a formação do álcool **2** com maiores rendimentos nessa condição.

4.5 EXPANSÃO DA METODOLOGIA NAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE REAÇÃO

Utilizando o eletrodo de trabalho proposto, E-NLTL, alguns derivados da acetofenona (**1**) foram submetidos à (bio)eletrorredução em solução tampão acetato (0,1 mol L⁻¹) pH 5,0. O potencial aplicado foi de -2,0 V vs. Ag/AgCl, as reações foram finalizadas após 4 horas e os resultados estão dispostos na Tabela 8. Possíveis variações na magnitude do potencial de redução dos derivados, em relação ao potencial de redução de **1**, não foram consideradas.

Tabela 8 – Ensaio de eletrorredução para diferentes cetonas nas condições otimizadas

Entrada ¹	Substrato	Composição reacional final (%) ²		
		Cetona	Álcool	Dímero
1		2,2 ± 0,1	34,4 ± 1,2	63,4 ± 1,1
2		11,7 ± 0,9	26,4 ± 2,0	61,9 ± 2,8
3		8,4 ± 0,5	49,5 ± 3,6	42,1 ± 3,7
4		92,2 ± 1,5 ³	5,1 ± 0,3	2,7 ± 1,2

¹ Condições reacionais: eletrodo de trabalho E-NLTL, contra-eletrodo de Pt, substrato (0,48 mmol), tampão acetato pH 5,0 (4,0 mL), -2,0 V vs. Ag/AgCl, 25 °C, 4 h. ² Média ± desvio padrão; n = 2. Quantificação realizada por CG com base em curvas de calibração pré-definidas para cetonas e álcoois. ³ Soma da quantificação resultante de CG e da massa de substrato insolúvel excedente em relação ao volume da amostra.

Os resultados obtidos indicam que a presença de substituintes no anel aromático da acetofenona (**1**) impacta significativamente a (bio)eletrorredução. Para todos os substratos testados, observou-se uma diminuição da conversão do material de partidas aos produtos, principalmente ao álcool correspondente.

Os substituintes doadores de elétrons por efeito indutivo/de hiperconjugação e por efeito mesomérico (grupos metila e metoxila, respectivamente), são responsáveis por aumentar a densidade eletrônica da carbonila, o que contribui para a diminuição da velocidade e da eficiência da redução das cetonas **6** e **8** em questão em relação à cetona **1** [139,140]. Essa

diminuição é, portanto, diretamente proporcional à intensidade do efeito, o que foi confirmado pela análise dos dados descritos (Tabela 8, Entradas 1 e 2).

Quando a substituição de **1** se dá por halogênios (Tabela 8, Entradas 3 e 4), coexistem o mesmo efeito mesomérico doador de elétrons já mencionado e um novo efeito, indutivo retirador e de elétrons que, ao menos em parte, anula o primeiro. Ainda assim, para a cetona **10** (Tabela 8, Entrada 3), o efeito mesomérico doador de elétrons predomina devido à maior semelhança no volume do orbital contendo os elétrons não ligantes do flúor para com o orbital do carbono aromático, o que favorece a sobreposição e diminui a eficiência de redução [141,142].

No caso da cetona **12** (Tabela 8, Entrada 4), a sobreposição orbitalar é prejudicada [142], o que daria lugar ao efeito indutivo retirador de elétrons, apesar da menor eletronegatividade do substituinte em questão. Sob essa hipótese, era esperado o contrário do observado: um aumento nos rendimentos de eletrorredução do derivado substituído se comparado à acetofenona (**1**) [139,140].

De modo geral, é possível atribuir as porcentagens significativamente menores dos produtos de interesse no meio reacional final à solubilidade limitada das cetonas aromáticas substituídas em meio aquoso, o que há de tornar a reação lenta e, por vezes, ineficaz [140,143]. Isso se aplica especialmente à eletrorredução de **12** (Tabela 8, Entrada 4), para a qual se observou que grande parte do material de partida permaneceu intacto durante a aplicação do potencial nas condições de ensaio, tendo decantado da mistura reacional final ainda no estado original: sólido e praticamente insolúvel em água.

Por fim, é indubitavelmente importante destacar que a distribuição de carga eletrônica nas moléculas dos substratos substituídos testados pode estar influenciando sua orientação no sítio ativo da enzima selecionada [143], bem como sua interação com outras partes da estrutura tridimensional da lipase de *Thermomyces lanuginosus*, em especial com a “tampa”, afetando o desempenho do biocatalisador na eletrorredução.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, uma metodologia que concilia eletroquímica e biocatálise para a redução seletiva de cetonas foi desenvolvida. Na presença de lipase, a conhecida reação de eletrorredução da acetofenona (**1**) levou ao 1-feniletanol racêmico (**2**) como produto majoritário, evitando a formação significativa do dímero de pinacol correspondente (**3**).

Em testes iniciais de eletrossíntese com diversas combinações de eletrodos e solventes, a formação de **2** a partir de **1** foi observada somente com o emprego de eletrodo de trabalho combinado de estanho chumbo (63:37) em meio etanólico ou aquoso, sob aplicação de potencial elétrico de magnitude igual a -2,0 V vs. Ag/AgCl, com auxílio de eletrodo de platina e em tempos reacionais de 4 horas.

A inclusão das lipases disponíveis ao sistema eletroquímico proposto esteve condicionada à sua estabilidade frente à aplicação de potencial elétrico. Apesar do impacto causado na atividade enzimática dos exemplares livres, a imobilização da maioria destes em Celite® permitiu sua adição fracionada ao meio de eletrorredução, visto que lhes concedeu estabilidade satisfatória nas condições reacionais pré-otimizadas por, ao menos, 30 minutos. As lipases de *Rhizomucor miehei* (Novozym 388) e de *Thermomyces lanuginosus*, comercializadas em solução, foram adicionadas ao meio reacional após imobilização em alumina e MMT modificada, respectivamente, pois mostraram-se mais estáveis sobre esses suportes. Apenas as lipases de *Candida rugosa* tipo VII e AK (Amano) de *Pseudomonas fluorescens*, ambas liofilizadas, não responderam à imobilização como esperado e foram adicionadas livres à solução. Além disso, os ensaios de (bio)eletrorredução de **1** contemplaram, ainda, todos os exemplares comercializados em suas formas já imobilizadas, que se mostraram estáveis nas condições de teste, apesar de pouco ativos de modo geral.

Em todo caso, a estabilidade sob potencial elétrico das lipases investigadas não influenciou a conversão da cetona **1** no sentido da formação do álcool **2** de forma direta. Não obstante, a formação de **2** foi favorecida na presença das lipases de *Candida antarctica* B (Novozym 435), de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM-IM), de *Thermomyces lanuginosus* (imobilizada em MMT modificada e, comercialmente, em sílica gel (Lipolase 100T)) e de *Burkholderia cepacia* (PS-D Amano I), que foram selecionadas para dar continuidade a testes com adição de grupo protetor de silício ou em diferentes condições de pH.

Com a adição de TMSCl à reação de eletrossíntese em questão, esperava-se originar o éter de silício corresponde ao composto **14**, porém a reação de proteção não ocorreu. Os

produtos obtidos nesses ensaios foram o álcool **2** e o dímero **3**, porém a conversão ao primeiro foi prejudicada na presença do clorossilano.

Sob outra perspectiva, a eletrorredução de **1** foi desencadeada em meio ácido de solução tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) devido à influência do pH e à importância da natureza dos eletrólitos de suporte presentes no meio reacional, posteriormente confirmadas por voltametria cíclica. A partir desses ensaios, especificamente quando em pH 5,0, foram alcançados rendimentos superiores a 90% de 1-feniletanol (**2**) na presença da lipase de *Thermomyces lanuginosus*, tanto imobilizada em MMT modificada, quanto em sua forma comercial imobilizada em sílica gel (Lipolase 100T).

Finalmente, selecionados solvente e enzima, procedeu-se com a imobilização desta no eletrodo de trabalho por encapsulamento em micelas de Nafion. Uma vez que a estrutura da lipase de *Thermomyces lanuginosus* como um todo é o que deve diferenciá-la das demais quanto ao desempenho na eletrorredução de **1**, a porcentagem do álcool **2** na mistura reacional final da reação com E-NLTL se manteve alta. Além disso, um adendo de estabilidade para a enzima, de simplicidade e reprodutibilidade para o processo e de possibilidade de armazenamento e reutilização do eletrodo modificado tornou a proposta metodológica deveras viável.

Quanto à expansão das condições reacionais aqui descritas a cetonas mais complexas e na presença de diferentes grupos funcionais, ainda há muito para explorar. A adição de cossolventes ou a combinação de diferentes eletrólitos de suporte podem ser a chave para obtenção de conversões maiores para eletrorreduções ainda mais seletivas. Ademais, ensaios com novas enzimas, inclusive de diferentes classes, podem resultar na atividade óptica ainda almejada para os produtos formados e, futuramente, estudos mecanísticos aprofundados hão de detalhar as transformações observadas.

Cabe ainda destacar que, pela primeira vez, eletroquímica e biocatálise foram utilizadas em conjunto para realizar uma transformação orgânica, em uma nova metodologia de síntese, a (bio)eletrorredução. Com base no exposto e, devido aos resultados promissores alcançados, este estudo visa corroborar para o estabelecimento definitivo da eletrossíntese no portfólio das metodologias orgânico-sintéticas, oferecendo uma alternativa aliada à biocatálise para construção de blocos sintéticos versáteis de acordo com os princípios da química verde.

REFERÊNCIAS

- [1] LUND, H. A Century of Organic Electrochemistry. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 149, n. 4, p. S21, 2002.
- [2] JUTAND, A. Contribution of electrochemistry to organometallic catalysis. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 7, p. 2300–2347, 2008.
- [3] WIEBE, A. et al. Electrifying Organic Synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 57, n. 20, p. 5594–5619, 2018.
- [4] TANG, S.; LIU, Y.; LEI, A. Electrochemical Oxidative Cross-coupling with Hydrogen Evolution: A Green and Sustainable Way for Bond Formation. **Chem**, v. 4, n. 1, p. 27–45, 2018.
- [5] FRANCKE, R.; LITTLE, R. D. Redox catalysis in organic electrosynthesis: Basic principles and recent developments. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 8, p. 2492–2521, 2014.
- [6] YAN, M.; KAWAMATA, Y.; BARAN, P. S. Synthetic Organic Electrochemical Methods since 2000: On the Verge of a Renaissance. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 21, p. 13230–13319, 2017.
- [7] JIANG, Y.; XU, K.; ZENG, C. Use of Electrochemistry in the Synthesis of Heterocyclic Structures. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 9, p. 4485–4540, 2018.
- [8] BARD, A. J.; STRATMANN, M.; SCHÄFER, H. **Encyclopedia of Electrochemistry: Organic Electrochemistry**. 8. ed. [s.l.] Wiley-VCH, Weinheim, 2004.
- [9] SCHÄFER, H. J. Contributions of organic electrosynthesis to green chemistry. **Comptes Rendus Chimie**, v. 14, n. 7–8, p. 745–765, 2011.
- [10] SHATSKIY, A.; LUNDBERG, H.; KÄRKÄS, M. D. Organic Electrosynthesis: Applications in Complex Molecule Synthesis. **ChemElectroChem**, v. 6, n. 16, p. 4067–4092, 2019.
- [11] FRONTANA-URIBE, B. A. et al. Organic electrosynthesis: A promising green methodology in organic chemistry. **Green Chemistry**, v. 12, n. 12, p. 2099–2119, 2010.
- [12] MARTINS, G. M. et al. Organic electrosynthesis: Electrochemical alkyne functionalization. **Catalysis Science and Technology**, v. 9, n. 21, p. 5868–5881, 2019.
- [13] CARDOSO, D. S. P. et al. Organic Electrosynthesis: From Laboratorial Practice to Industrial Applications. **Organic Process Research and Development**, v. 21, n. 9, p. 1213–1226, 2017.
- [14] MITSUDO, K. et al. Combinatorial electrochemistry for organic synthesis. **Current Opinion in Electrochemistry**, v. 8, p. 8–13, 2018.

- [15] UTLEY, J. Trends in Organic Electrosynthesis. **Chemical Society Reviews**, v. 26, p. 157–167, 1997.
- [16] ELVING, P. J.; LEONE, J. T. Mechanism of the Electrochemical Reduction of Phenyl Ketones. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 5, p. 1021–1029, 1958.
- [17] FARNIA, G. et al. Electrochemical reduction of carbonyl compounds in aqueous media in the presence of β -cyclodextrin. Reduction of acetophenone and p-methoxyacetophenone in alkaline solution. **Electrochimica Acta**, v. 35, n. 7, p. 1149–1155, 1990.
- [18] SEEBACH, D.; OEI, H. A. Mechanism of Electrochemical Pinacolization. The First Asymmetric Synthesis in a Chiral Medium. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 14, n. 9, 1975.
- [19] FAN, Y. et al. Kinetic resolution of both 1-phenylethanol enantiomers produced by hydrolysis of 1-phenylethyl acetate with *Candida antarctica* lipase B in different solvent systems. **Kinetics and Catalysis**, v. 52, n. 5, p. 686–690, 2011.
- [20] KODAMA, Y. et al. Selective reduction of acetophenone to 1-phenylethanol in aqueous media. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 507, n. 1–2, p. 103–109, 2001.
- [21] LI, H. et al. Chiral electroorganic chemistry: An interdisciplinary research across electrocatalysis and asymmetric synthesis. **Molecular Catalysis**, v. 499, n. October 2020, p. 111296, 2021.
- [22] HORNER, L.; DEGNER, D. Studien zum vorgang der wasserstoffübertragung-33. Zur kenntnis des aufbaus der elektrochemischen doppelschicht. Die asymmetrische elektrochemische reduktion einiger alkyl-phenyl-ketone in gegenwart optisch aktiver leitsalze. **Electrochimica Acta**, v. 19, n. 10, p. 611–627, 1974.
- [23] HORNER, L.; SKALETZ, D. H. Studien zum vorgang der wasserstoffübertragung 24 asymmetrische induktion bei der reduktion von acetophenon-N-benzylimin an der quecksilberkathode mit chiralen leitsalzen. **Tetrahedron Letters**, v. 11, n. 42, p. 3679–3681, 1970.
- [24] KODAMA, Y. et al. Evidence for ionic interaction between cationic surfactant and anionic intermediate generated in cathodic reduction of acetophenone. **Chemistry Letters**, n. 3, p. 240–241, 2001.
- [25] YADAV, A. K.; SINGH, A. Enantioselective cathodic reduction of some prochiral ketones in the presence of (1R,2S)-(-)-N,N-dimethylephedrinium tetrafluoroborate at a mercury pool cathode. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 75, n. 3, p. 587–588, 2002.
- [26] YADAV, A. K.; MANJU, M.; CHHINPA, P. R. Enantioselective cathodic reduction of some prochiral ketones in the presence of (-)-N,N'-dimethylquininium tetrafluoroborate at mercury cathode. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 14, n. 8, p. 1079–1081, 2003.
- [27] MOUTET, J. C. et al. Heterogeneous and homogeneous asymmetric electrocatalytic hydrogenation with rhodium(III) complexes containing chiral polypyridyl ligands. **New**

Journal of Chemistry, v. 23, n. 9, p. 939–944, 1999.

[28] UTLEY, JAMES; SMITH, C. Modification of Pathways for Cathodic Reduction via Complexation with β -Cyclodextrin. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 492, p. 492–494, 1981.

[29] KARIV, E.; TERNI, H. A.; GILEADI, E. The role of quinidine in induction of asymmetric synthesis at mercury cathodes. **Electrochimica Acta**, v. 18, n. 6, p. 433–441, 1973.

[30] CHEN, B. L. et al. Alkaloid induced enantioselective electroreduction of acetophenone. **Electrochimica Acta**, v. 107, p. 320–326, 2013.

[31] HORNER, L.; BRICH, W. Studien zum Vorgang der Wasserstoffübertragung, 49: Zur Frage der Auslösung einer optischen Induktion durch Anwendung optisch aktiver Ephedrinderivate und optisch aktiver Kronenether als Leitsalze bei der Elektroreduktion von Acetophenon. **Chemische Berichte**, v. 111, n. 2, p. 574–578, 1978.

[32] XUE, Y. F. et al. Supramolecular chiral electrochemical reduction of acetophenone with hybridization of a chiral multifarene and Au nanoparticles. **Journal of Catalysis**, v. 404, p. 529–536, 2021.

[33] SILVERMAN, R. B. **The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions**. [s.l.] Elsevier Science, 2002.

[34] WECKBECKER, A.; GRÖGER, H.; HUMMEL, W. Regeneration of nicotinamide coenzymes: Principles and applications for the synthesis of chiral compounds. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 120, n. February, p. 195–242, 2010.

[35] ALKOTAINI, B. et al. Sustainable Bioelectrosynthesis of the Bioplastic Polyhydroxybutyrate: Overcoming Substrate Requirement for NADH Regeneration. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 6, n. 4, p. 4909–4915, 2018.

[36] MAYR, J. C. et al. Response-Surface-Optimized and Scaled-Up Microbial Electrosynthesis of Chiral Alcohols. **ChemSusChem**, v. 13, n. 7, p. 1808–1816, 2020.

[37] YUAN, R. et al. Asymmetric Electroreduction of Ketone and Aldehyde Derivatives to the Corresponding Alcohols Using Alcohol Dehydrogenase as an Electrocatalyst. **Journal of Organic Chemistry**, v. 62, n. 8, p. 2494–2499, 1997.

[38] SHELDON, R. A.; BRADY, D. The limits to biocatalysis: Pushing the envelope. **Chemical Communications**, v. 54, n. 48, p. 6088–6104, 2018.

[39] JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 305–313, 2004.

[40] FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry: A textbook**. 6. ed. [s.l.] Springer US, 2011.

[41] GANDHI, N. N. Applications of lipases. **Journal of the American Oil Chemists'**

Societ, v. 74, n. 6, p. 621–634, 1997.

[42] SUN, S. Y.; XU, Y.; WANG, D. Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solid-state fermentation: Biochemical characterization and its esterification potential for ester synthesis. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 9, p. 2607–2612, 2009.

[43] PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93–99, 2006.

[44] SAHIN, S. et al. Kinetic modeling of lipase-mediated one-pot chemo-bio cascade synthesis of R-1-phenyl ethyl acetate starting from acetophenone. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 2, p. 192–198, 2010.

[45] MOUSTY, C. Biosensing applications of clay-modified electrodes: A review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 1, p. 315–325, 2010.

[46] SOARES, C. M. F. et al. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77, n. 9, p. 745–757, 1999.

[47] MITTERSTEINER, M. et al. Easy and simple SiO₂ immobilization of lipozyme CaLB-L: Its use as a catalyst in acylation reactions and comparison with other lipases. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 7, p. 1185–1192, 2017.

[48] CARVALHO, N. B.; LIMA, Á. S.; SOARES, C. M. F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. **Química Nova**, v. 38, n. 3, p. 399–409, 2014.

[49] SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 489–511, 2012.

[50] HU, C. et al. Electrochemically Facilitated Oxidative Coupling of Quinoxalin-2(1H)-Ones with Diarylphosphine Oxides and Pyrroles: A Green Protocol for C–P, C–C(sp²) Bond Formation. **Asian Journal of Organic Chemistry**, v. 8, n. 11, p. 2092–2096, 2019.

[51] MARTINS, G. M. et al. A Green Approach: Vicinal Oxidative Electrochemical Alkene Difunctionalization. **ChemElectroChem**, v. 6, n. 5, p. 1300–1315, 2019.

[52] HOU, Z.-W. et al. Electrochemical Synthesis of Imidazo-Fused N-Heteroaromatic Compounds through a C–N Bond-Forming Radical Cascade. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 130, n. 6, p. 1652–1655, 2018.

[53] SAUERMAN, N. et al. Electrocatalytic C–H Activation. **ACS Catalysis**, v. 8, n. 8, p. 7086–7103, 2018.

[54] YUAN, Y. et al. Electrochemical Oxidative Clean Halogenation Using HX/NaX with Hydrogen Evolution. **iScience**, v. 12, p. 293–303, 2019.

[55] SCHEIDE, M. R. et al. Electrohalogenation of organic compounds. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 19, n. 12, p. 2578–2602, 2021.

- [56] ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green Chemistry: Principles and Practice. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 1, p. 301–312, 2010.
- [57] YUAN, Y.; LEI, A. Is electrosynthesis always green and advantageous compared to traditional methods? **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 2018–2020, 2020.
- [58] WALDVOGEL, S. R. et al. Electrochemical Arylation Reaction. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 14, p. 6706–6765, 2018.
- [59] ELGRISHI, N. et al. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 95, n. 2, p. 197–206, 2018.
- [60] SANDFORD, C. et al. A synthetic chemist's guide to electroanalytical tools for studying reaction mechanisms. **Chemical Science**, v. 10, n. 26, p. 6404–6422, 2019.
- [61] PLETCHER, D. Organic electrosynthesis – A road to greater application. A mini review. **Electrochemistry Communications**, v. 88, n. January, p. 1–4, 2018.
- [62] TESHIMA, T. ChemInform Abstract: In situ Reaction Analysis of Ketones Reduction Using NaBH₄/MeOH. **ChemInform**, v. 42, n. 44, p. no-no, 2011.
- [63] DAUBEN, W.; BOZAK, R. Lithium Aluminum Hydride Reduction of Methylcyclohexanones. **Journal of Organic Chemistry**, v. 24, p. 1596–1597, 1959.
- [64] MCMURRY, J. **Química Orgânica**. 7. ed. [s.l.] CENGAGE Learning, 2014.
- [65] ZHAO, S. F. et al. A unique proton coupled electron transfer pathway for electrochemical reduction of acetophenone in the ionic liquid [BMIM][BF₄] under a carbon dioxide atmosphere. **Green Chemistry**, v. 13, n. 12, p. 3461–3468, 2011.
- [66] CHENG, P.-C. The Application of Ionic Liquids in Cathodic Coupling of Acetophenone. **Energy Research Journal**, v. 1, n. 2, p. 111–115, 2010.
- [67] SUAN, C. L.; SARMIDI, M. R. Immobilised lipase-catalysed resolution of (R,S)-1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 28, n. 2–3, p. 111–119, 2004.
- [68] ZHOU, Y. et al. Study of the biochemical formation pathway of aroma compound 1-phenylethanol in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) flowers and other plants. **Food Chemistry**, v. 258, n. March, p. 352–358, 2018.
- [69] FRINGS, K.; KOCH, M.; HARTMEIER, W. Kinetic resolution of 1-phenyl ethanol with high enantioselectivity with native and immobilized lipase in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 3–5, p. 303–309, 1999.
- [70] LIN, Q.; LI, L.; LUO, S. Asymmetric Electrochemical Catalysis. **Chemistry - A European Journal**, v. 25, n. 43, p. 10033–10044, 2019.
- [71] HÖLLRIGL, V.; OTTO, K.; SCHMID, A. Electroenzymatic asymmetric reduction of rac-3-methylcyclohexanone to (1S,3S)-3-methylcyclohexanol in organic/aqueous media

catalyzed by a thermophilic alcohol dehydrogenase. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 349, n. 8–9, p. 1337–1340, 2007.

[72] NC-IUBMB. **Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology**. San Diego: Academic Press, 1992.

[73] BEISSON, F. et al. Methods for lipase detection and assay: a critical review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, n. 2, p. 133–153, 2000.

[74] OLIVEIRA CARVALHO, P. DE et al. Application of microbial lipases to concentrate polyunsaturated fatty acids. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 75–80, 2003.

[75] BORGSTON, B.; BROCKMAN, H. L. **Lipases**. Amsterdam: Elsevier, 1984.

[76] MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1942–1947, 2008.

[77] PANDEY, A. et al. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 29 (Pt 2), p. 119–31, 1999.

[78] PAULA, A. V. DE; BARBOZA, J. C. DE S.; CASTRO, H. F. DE. Estudo da influência do solvente, carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcares. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 792–796, 2005.

[79] JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396–403, 1998.

[80] JAEGER, K.-E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. BACTERIAL BIOCATALYSTS: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 315–351, 1999.

[81] OLLIS, D. L. et al. The α/β hydrolase fold. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 5, n. 3, p. 197–211, 1992.

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

[83] EGGERT, T. et al. Biochemical properties and three-dimensional structures of two extracellular lipolytic enzymes from *Bacillus subtilis*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 26, n. 1–2, p. 37–46, 2002.

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

[85] REIS, P. et al. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147–148, n. C, p. 237–250, 2009.

[86] ALEXANDER M. KLIBANOV. Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, n. 4, p. 194–211, 1989.

- [87] HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235–251, 2006.
- [88] DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D. G.; SOLDI, V. Synthetic applications of immobilized lipases in polymers. **Quimica Nova**, v. 27, n. 4, p. 623–630, 2004.
- [89] 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.
- [90] DICOSIMO, R. et al. Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6437–6474, 2013.
- [91] FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1–2, p. 185–197, 1998.
- [92] SECUNDO, F. et al. Effective immobilization of *Candida antarctica* lipase B in organic-modified clays: Application for the epoxidation of terpenes v. 109, p. 350 – 361, 2008. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 109, p. 350–361, 2008.
- [93] PALOMO, J. M.; ORTIZ, C.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G. Lipase–lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 4, p. 447–454, 2005.
- [94] FERNÁNDEZ-LORENTE, G. et al. Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 5, p. 565–569, 2007.
- [95] JEGANNATHAN, K. R. et al. Production of biodiesel using immobilized lipase - A critical review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 253–264, 2008.
- [96] ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6406–6436, 2013.
- [97] BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 6, p. 392–416, 1996.
- [98] VILLENEUVE, P. et al. Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 9, n. 4–6, p. 113–148, 2000.
- [99] BASRI, M. et al. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on synthetic polymer beads for use in the synthesis of fatty esters. **Journal of Technology and Biotechnology**, v. 66, p. 169–173, 1996.
- [100] HERNÁIZ, M. J.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M.; SINISTERRA, J. V. Modification of purified lipases from *Candida rugosa* with polyethylene glycol: a systematic study. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 181–190, 1999.
- [101] AL-DURI, B.; YONG, Y. P. Characterisation of the equilibrium behaviour of lipase PS

(from *Pseudomonas*) and lipolase 100L (from *Humicola*) onto Accurel EP100. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 3, n. 1–4, p. 177–188, 1997.

[102] MEREDITH, S. et al. Hydrophobic salt-modified nafion for enzyme immobilization and stabilization. **Journal of Visualized Experiments**, n. 65, p. 1–6, 2012.

[103] MOORE, C. M. et al. Improving the environment for immobilized dehydrogenase enzymes by modifying nafion with tetraalkylammonium bromides. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 4, p. 1241–1247, 2004.

[104] MANI, P. et al. Laccase Immobilization Strategies for Application as a Cathode Catalyst in Microbial Fuel Cells for Azo Dye Decolourization. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. January, p. 1–11, 2021.

[105] ZHENG, J. et al. Selective reduction of carboxylic acids to aldehydes through manganese catalysed hydrosilylation. **Chemical Communications**, v. 49, n. 85, p. 10010–10012, 2013.

[106] BRUNEAU-VOISINE, A. et al. Transfer Hydrogenation of Carbonyl Derivatives Catalyzed by an Inexpensive Phosphine-Free Manganese Precatalyst. **Organic Letters**, v. 19, n. 13, p. 3656–3659, 2017.

[107] YOSHIDA, M. et al. Iridium-catalyzed transfer hydrogenation of ketones and aldehydes using glucose as a sustainable hydrogen donor. **Catalysts**, v. 9, n. 6, 2019.

[108] FERNANDES, J. L. N. et al. Reduction of acetophenones using Borohydride Exchange Resins (BER) and a BER-Lithium salt system. **Synthesis**, n. 23, p. 4058–4062, 2009.

[109] CASTRO, L. C. M. et al. Iron dihydride complex as the pre-catalyst for efficient hydrosilylation of aldehydes and ketones under visible light activation. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 353, n. 8, p. 1279–1284, 2011.

[110] BONDUE, C. J. et al. Structural principles to steer the selectivity of the electrocatalytic reduction of aliphatic ketones on platinum. **Nature Catalysis**, v. 2, n. 3, p. 243–250, 2019.

[111] BALTRUSCHAT, H.; ERNST, S. Molecular adsorbates at single-crystal platinum-group metals and bimetallic surfaces. **ChemPhysChem**, v. 12, n. 1, p. 56–69, 2011.

[112] SORIAGA, M. P.; HUBBARD, A. T. Determination of the Orientation of Adsorbed Molecules at Solid-Liquid Interfaces by Thin-Layer Electrochemistry: Aromatic Compounds at Platinum Electrodes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, n. 10, p. 2735–2742, 1982.

[113] JERKIEWICZ, G. et al. Underpotential deposition of hydrogen on benzene-modified Pt(111) in aqueous H₂SO₄. **Langmuir**, v. 21, n. 8, p. 3511–3520, 2005.

[114] BONDUE, C. J.; KOPER, M. T. M. Electrochemical Reduction of the Carbonyl Functional Group: The Importance of Adsorption Geometry, Molecular Structure, and Electrode Surface Structure. **Journal of the American Chemical Society**, v. 141, n. 30, p. 12071–12078, 2019.

- [115] TSUNASHIMA, K.; NONAKA, T. **Product-Selectivity Control in an Electroorganic Process by Temperature. Electroreduction of Acetophenone** *Chemistry Letters*, 1995.
- [116] ZHOU, Z.; HARTMANN, M. Progress in enzyme immobilization in ordered mesoporous materials and related applications. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 9, p. 3894–3912, 2013.
- [117] MALCATA, F. X. et al. Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, n. 6, p. 426–446, 1992.
- [118] SAHIN, S. et al. Lipase-catalyzed acylation in a continuous down-flow fixed-bed reactor. **Kinetics and Catalysis**, v. 53, n. 6, p. 673–683, 2012.
- [119] MURRAY, D. R. P.; LEVY, B. W. Molecular constitution and accessibility to enzymes: The effect of various substances on the velocity of hydrolysis by pancreatic lipase. **The Biochemical Journal**, v. 23, n. 2, p. 292–308, 1929.
- [120] ABBATE, V. et al. Enzyme-catalyzed transesterification of alkoxy silanes. **Catalysts**, v. 3, n. 1, p. 27–35, 2013.
- [121] BRONDANI, P. B. et al. Synthetic Versatility of Lipases: Application for Si-O Bond Formation and Cleavage. **Synthesis (Germany)**, v. 51, n. 2, p. 477–485, 2019.
- [122] ABBATE, V. et al. A large scale enzyme screen in the search for new methods of silicon-oxygen bond formation. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, n. 2, p. 268–275, 2011.
- [123] MARAITE, A. et al. On the biocatalytic cleavage of silicon-oxygen bonds: A substrate structural approach to investigating the cleavage of protecting group silyl ethers by serine-triad hydrolases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, n. 1, p. 24–28, 2009.
- [124] FIELDING, C. J.; FIELDING, P. E. Mechanism of salt mediated inhibition of lipoprotein lipase. **Journal of Lipid Research**, v. 17, n. 3, p. 248–256, 1976.
- [125] MILED, D. D. BEN; ZARROUK, M.; CHÉRIF, A. Environmental Effects on Lipids : Salts and Heavy Metals. p. 0–3, 2000.
- [126] LOKHA, Y. et al. Modulating the properties of the lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on octyl agarose beads by altering the immobilization conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 133, n. October 2019, p. 109461, 2020.
- [127] ZAAK, H. et al. Effect of high salt concentrations on the stability of immobilized lipases: Dramatic deleterious effects of phosphate anions. **Process Biochemistry**, v. 62, n. July, p. 128–134, 2017.
- [128] ARANA-PEÑA, S.; LOKHA, Y.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of eversa lipase on octyl agarose beads and preliminary characterization of stability and activity features. **Catalysts**, v. 8, n. 11, 2018.
- [129] HOLMQUIST, M. et al. Probing a functional role of Glu87 and Trp89 in the lid of

Humicola lanuginosa lipase through transesterification reactions in organic solvent. **Journal of Protein Chemistry**, v. 14, n. 4, p. 217–224, 1995.

[130] MARTINELLE, M. et al. The role of Glu87 and Trp89 in the lid of Humicola lanuginosa lipase. **Protein Engineering**, v. 9, n. 6, p. 519–524, 1996.

[131] FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from Thermomyces lanuginosus: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 3–4, p. 197–212, 2010.

[132] HOLMQUIST, M. Alpha Beta-Hydrolase Fold Enzymes Structures, Functions and Mechanisms. **Current Protein and Peptide Science**, v. 1, n. 2, p. 209–235, 2005.

[133] VILLO, L. et al. Thermomyces lanuginosus lipase with closed lid catalyzes elimination of acetic acid from 11-acetyl-prostaglandin E2. **ChemCatChem**, v. 6, n. 7, p. 1998–2010, 2014.

[134] GODOY, C. A.; PARDO-TAMAYO, J. S.; BARBOSA, O. Microbial Lipases and Their Potential in the Production of Pharmaceutical Building Blocks. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 17, p. 9933, 2022.

[135] CHEN, H. et al. The molecular basis for lipase stereoselectivity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 8, p. 3487–3495, 2018.

[136] HARRISON, D. J.; TURNER, R. F. B.; BALTES, H. P. Characterization of Perfluorosulfonic Acid Polymer Coated Enzyme Electrodes and a Miniaturized Integrated Potentiostat for Glucose Analysis in Whole Blood. **Analytical Chemistry**, v. 60, n. 19, p. 2002–2007, 1988.

[137] TURNER, R. F. B. et al. A biocompatible enzyme electrode for continuous in vivo glucose monitoring in whole blood. **Sensors and Actuators: B. Chemical**, v. 1, n. 1–6, p. 561–564, 1990.

[138] COONEY, M. J. et al. Enzyme catalysed biofuel cells. **Energy and Environmental Science**, v. 1, n. 3, p. 320–337, 2008.

[139] BOWDEN, K.; HARDY, M. The reduction of substituted acetophenones by sodium borohydride. **Tetrahedron**, v. 22, n. 4, p. 1169–1174, 1966.

[140] CHANY SHEVA, A. R.; VOROBYOVA, T. E.; ZORIN, V. V. Relative reactivity of substituted acetophenones in enantioselective biocatalytic reduction catalyzed by plant cells of Daucus carota and Petroselinum crispum. **Tetrahedron**, v. 75, n. 36, p. 130494, 2019.

[141] NARAYAN, B.; MURRELL, J. N. An analysis of the photo-electron and U.V. spectra of the fluorobenzenes and its relevance to the position of the second π -ionization potential of benzene. **Molecular Physics**, v. 19, n. 2, p. 169–176, 1970.

[142] STREETS, D. G.; STREETS, D. G.; CEASAR, G. P. Inductive and mesomeric effects on the π orbitals of halobenzenes. **Molecular Physics**, v. 26, n. 4, p. 1037–1052, 1973.

[143] NAIK, H. G. et al. Investigation of asymmetric alcohol dehydrogenase (ADH) reduction of acetophenone derivatives: Effect of charge density. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 10, n. 25, p. 4961–4967, 2012.

APENDICE A – Tabelas Informativas

Tabela 9 – Estudo de estabilidade da lipase de *Candida antarctica* B

Condição	Potencial Aplicado (V)	Atividade Enzimática (U g ⁻¹) ²				
		Tempo reacional antes da análise (min) ¹				
		0	15	30	60	120
Livre em solução (Lipozyme CAL-B L)	-1,5	35,90	30,34	22,54	20,54	9,93
	-2,0		11,44	9,07	7,12	5,98
Imobilizada em sílica gel	-1,5	52,92	28,18	23,93	30,82	19,06
	-2,0		29,16	8,06	3,72	3,97
Imobilizada em alumina	-1,5	41,77	57,87	52,87	51,72	42,28
	-2,0		25,53	22,36	21,57	23,66
Imobilizada em Celite®	-1,5	198,14	193,56	150,97	105,81	45,22
	-2,0		85,55	34,09	19,83	11,61
Imobilizada em haloisita	-1,5	15,80	18,37	20,62	13,31	16,17
	-2,0		19,22	15,32	11,31	15,54
Imobilizada em MMT modificada	-1,5	8,30	10,61	14,62	15,57	11,44
	-2,0		12,07	15,13	20,97	20,31
Imobilizada em resina de troca iônica (Lipozyme 435) ³	-1,5	4,00	4,35	3,13	5,75	5,49
	-2,0		4,38	3,38	4,74	3,71
Imobilizada em resina acrílica (Novozym 435) ³	-1,5	9,84	3,70	3,32	4,62	3,33
	-2,0		8,39	5,20	2,47	3,73

¹ Condições reacionais: eletrodo de trabalho combinado Sn/Pb (63:37), contra-eletrodo de Pt, eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹), 25 °C. ² Velocidade inicial de hidrólise de 1 µmol min⁻¹ de butirato de 4-nitrofenila (4), calculada a partir de uma curva de calibração (absorbância × concentração em mmol L⁻¹) construída para o 4-nitrofenol (5). ³ Exemplar comercialmente imobilizado.

Tabela 10 – Estudo de estabilidade da lipase de *Rhizomucor miehei*

Condição	Potencial Aplicado (V)	Atividade Enzimática (U g ⁻¹) ²				
		Tempo reacional antes da análise (min) ¹				
		0	15	30	60	120
Livre em solução (Novozym 388)	-1,5	19,60	23,01	18,47	14,10	15,32
	-2,0		16,96	11,18	13,10	10,06
Imobilizada em sílica gel	-1,5	25,43	19,39	25,49	12,60	10,65
	-2,0		16,02	13,85	9,58	13,19
Imobilizada em alumina	-1,5	34,22	31,46	30,93	29,60	15,32
	-2,0		20,57	20,04	16,06	15,43
Imobilizada em Celite®	-1,5	49,22	27,03	16,07	14,39	9,12
	-2,0		18,32	13,19	3,19	5,52
Imobilizada em haloisita	-1,5	16,06	13,33	16,90	29,86	25,09
	-2,0		13,38	22,72	23,06	13,63
Imobilizada em MMT modificada	-1,5	20,00	15,68	10,41	14,84	12,44
	-2,0		13,60	14,35	11,65	9,86
Imobilizada em resina de troca iônica Duolite (Lipozyme RM-IM) ³	-1,5	5,42	5,22	4,75	4,39	5,89
	-2,0		5,36	5,56	4,94	3,57

¹ Condições reacionais: eletrodo de trabalho combinado Sn/Pb (63:37), contra-eletrodo de Pt, eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹), tampão fosfato pH 7,4 (3,0 mL), 25 °C. ² Velocidade inicial de hidrólise de 1 μmol min⁻¹ de butirato de 4-nitrofenila (**4**), calculada a partir de uma curva de calibração (absorbância × concentração em mmol L⁻¹) construída para o 4-nitrofenol (**5**). ³ Exemplar comercialmente imobilizado.

Tabela 11 – Estudo de estabilidade da lipase de *Aspergillus oryzae*

Condição	Potencial Aplicado (V)	Atividade Enzimática (U g ⁻¹) ²				
		Tempo reacional antes da análise (min) ¹				
		0	15	30	60	120
Livre em solução (Lipolase 100L)	-1,5	79,71	31,64	20,07	14,49	9,17
	-2,0		10,45	7,07	5,83	3,28
Imobilizada em sílica gel	-1,5	67,43	56,43	37,33	47,45	11,86
	-2,0		22,53	9,64	5,63	7,07
Imobilizada em alumina	-1,5	152,76	36,21	24,66	21,54	9,24
	-2,0		33,42	17,38	17,70	9,44
Imobilizada em Celite®	-1,5	338,60	266,76	69,03	77,07	13,16
	-2,0		175,56	60,38	16,36	15,67
Imobilizada em haloisita	-1,5	34,70	34,09	36,57	30,55	29,81
	-2,0		17,00	18,48	21,50	18,41
Imobilizada em MMT modificada	-1,5	58,77	56,03	87,56	76,17	78,42
	-2,0		74,11	55,29	37,52	31,63

¹ Condições reacionais: eletrodo de trabalho combinado Sn/Pb (63:37), contra-eletrodo de Pt, eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹), tampão fosfato pH 7,4 (3,0 mL), 25 °C. ² Velocidade inicial de hidrólise de 1 μmol min⁻¹ de butirato de 4-nitrofenila (4), calculada a partir de uma curva de calibração (absorbância × concentração em mmol L⁻¹) construída para o 4-nitrofenol (5).

Tabela 12 – Estudo de estabilidade da lipase de *Thermomyces lanuginosus*

Condição	Potencial Aplicado (V)	Atividade Enzimática (U g ⁻¹) ²				
		Tempo reacional antes da análise (min) ¹				
		0	15	30	60	120
Livre em solução	-1,5	141,68	71,16	52,94	28,78	8,30
	-2,0		9,84	9,25	8,84	12,58
Imobilizada em sílica gel	-1,5	83,32	72,38	96,82	18,44	9,54
	-2,0		6,04	8,91	6,63	6,24
Imobilizada em alumina	-1,5	112,56	70,56	36,79	26,07	9,43
	-2,0		13,72	13,45	15,03	12,77
Imobilizada em Celite®	-1,5	135,81	127,20	103,37	60,72	35,28
	-2,0		56,96	34,11	12,38	16,15
Imobilizada em haloisita	-1,5	27,42	13,34	33,72	29,85	17,86
	-2,0		20,45	17,15	20,90	16,82
Imobilizada em MMT modificada	-1,5	136,00	121,16	141,29	140,20	131,24
	-2,0		106,28	87,53	34,90	26,93
Imobilizada em sílica gel (Lipolase 100T) ³	-1,5	54,97	65,24	40,79	33,38	13,50
	-2,0		18,14	12,45	14,76	16,84

¹ Condições reacionais: eletrodo de trabalho combinado Sn/Pb (63:37), contra-eletrodo de Pt, eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹), tampão fosfato pH 7,4 (3,0 mL), 25 °C. ² Velocidade inicial de hidrólise de 1 µmol min⁻¹ de butirato de 4-nitrofenila (**4**), calculada a partir de uma curva de calibração (absorbância × concentração em mmol L⁻¹) construída para o 4-nitrofenol (**5**). ³ Exemplar comercialmente imobilizado.

Tabela 13 – Estudo de estabilidade da lipase F-AP15 (Amano) de *Rhizopus oryzae*

Condição	Potencial Aplicado (V)	Atividade Enzimática (U g ⁻¹) ²				
		Tempo reacional antes da análise (min) ¹				
		0	15	30	60	120
Liofilizada livre	-1,5	40,96	48,43	33,38	50,50	39,53
	-2,0		48,10	30,46	30,93	13,38
Imobilizada em Celite®	-1,5	126,03	108,74	112,35	83,56	83,46
	-2,0		70,12	57,18	62,92	55,24

¹ Condições reacionais: eletrodo de trabalho combinado Sn/Pb (63:37), contra-eletrodo de Pt, eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹), tampão fosfato pH 7,4 (3,0 mL), 25 °C. ² Velocidade inicial de hidrólise de 1 µmol min⁻¹ de butirato de 4-nitrofenila (4), calculada a partir de uma curva de calibração (absorbância × concentração em mmol L⁻¹) construída para o 4-nitrofenol (5).

Tabela 14 – Estudo de estabilidade da lipase M (Amano) de *Mucor javanicus*

Condição	Potencial Aplicado (V)	Atividade Enzimática (U g ⁻¹) ²				
		Tempo reacional antes da análise (min) ¹				
		0	15	30	60	120
Liofilizada livre	-1,5	22,74	23,05	24,93	49,60	40,29
	-2,0		23,57	15,04	14,52	15,03
Imobilizada em Celite®	-1,5	60,54	51,66	49,12	48,42	51,54
	-2,0		48,20	40,04	31,60	49,40

¹ Condições reacionais: eletrodo de trabalho combinado Sn/Pb (63:37), contra-eletrodo de Pt, eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹), tampão fosfato pH 7,4 (3,0 mL), 25 °C. ² Velocidade inicial de hidrólise de 1 µmol min⁻¹ de butirato de 4-nitrofenila (4), calculada a partir de uma curva de calibração (absorbância × concentração em mmol L⁻¹) construída para o 4-nitrofenol (5).

Tabela 15 – Estudo de estabilidade da lipase A (Amano) de *Aspergillus niger*

Condição	Potencial Aplicado (V)	Atividade Enzimática (U g ⁻¹) ²				
		Tempo reacional antes da análise (min) ¹				
		0	15	30	60	120
Liofilizada livre	-1,5	18,31	16,40	15,94	13,10	13,73
	-2,0		11,78	11,57	14,02	11,49
Imobilizada em Celite®	-1,5	50,42	45,53	31,78	28,91	41,58
	-2,0		46,39	60,03	61,47	47,57

¹ Condições reacionais: eletrodo de trabalho combinado Sn/Pb (63:37), contra-eletrodo de Pt, eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹), tampão fosfato pH 7,4 (3,0 mL), 25 °C. ² Velocidade inicial de hidrólise de 1 µmol min⁻¹ de butirato de 4-nitrofenila (4), calculada a partir de uma curva de calibração (absorbância × concentração em mmol L⁻¹) construída para o 4-nitrofenol (5).

Tabela 16 – Estudo de estabilidade da lipase de *Candida rugosa* tipo VII

Condição	Potencial Aplicado (V)	Atividade Enzimática (U g ⁻¹) ²				
		Tempo reacional antes da análise (min) ¹				
		0	15	30	60	120
Liofilizada livre	-1,5	344,92	245,65	165,97	228,71	222,71
	-2,0		149,42	211,97	65,08	35,48
Imobilizada em Celite®	-1,5	527,85	295,44	590,72	582,55	294,72
	-2,0		110,36	72,35	57,58	55,98

¹ Condições reacionais: eletrodo de trabalho combinado Sn/Pb (63:37), contra-eletrodo de Pt, eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹), tampão fosfato pH 7,4 (3,0 mL), 25 °C. ² Velocidade inicial de hidrólise de 1 µmol min⁻¹ de butirato de 4-nitrofenila (4), calculada a partir de uma curva de calibração (absorbância × concentração em mmol L⁻¹) construída para o 4-nitrofenol (5).

Tabela 17 – Estudo de estabilidade da lipase AK (Amano) de *Pseudomonas fluorescens*

Condição	Potencial Aplicado (V)	Atividade Enzimática (U g ⁻¹) ²				
		Tempo reacional antes da análise (min) ¹				
		0	15	30	60	120
Liofilizada livre	-1,5	82,71	142,52	128,78	133,67	80,79
	-2,0		86,95	83,43	64,44	39,01
Imobilizada em Celite®	-1,5	140,10	133,66	162,69	64,30	48,86
	-2,0		78,66	49,12	46,71	51,27
Imobilizada em sol-gel ³	-1,5	6,80	5,59	4,86	4,82	4,54
	-2,0		6,59	4,92	4,82	5,13

¹ Condições reacionais: eletrodo de trabalho combinado Sn/Pb (63:37), contra-eletrodo de Pt, eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹), tampão fosfato pH 7,4 (3,0 mL), 25 °C. ² Velocidade inicial de hidrólise de 1 µmol min⁻¹ de butirato de 4-nitrofenila (4), calculada a partir de uma curva de calibração (absorbância × concentração em mmol L⁻¹) construída para o 4-nitrofenol (5). ³ Exemplar comercialmente imobilizado.

Tabela 18 – Estudo de estabilidade da lipase de pâncreas de porco tipo II

Condição	Potencial Aplicado (V)	Atividade Enzimática (U g ⁻¹) ²				
		Tempo reacional antes da análise (min) ¹				
		0	15	30	60	120
Liofilizada livre	-1,5	139,25	89,68	73,64	41,35	15,89
	-2,0		35,27	18,30	13,20	10,75
Imobilizada em Celite®	-1,5	63,64	58,22	63,27	41,78	46,21
	-2,0		49,15	37,76	47,32	45,40

¹ Condições reacionais: eletrodo de trabalho combinado Sn/Pb (63:37), contra-eletrodo de Pt, eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹), tampão fosfato pH 7,4 (3,0 mL), 25 °C. ² Velocidade inicial de hidrólise de 1 µmol min⁻¹ de butirato de 4-nitrofenila (4), calculada a partir de uma curva de calibração (absorbância × concentração em mmol L⁻¹) construída para o 4-nitrofenol (5).

Tabela 19 – Estudo de estabilidade da lipase PS (Amano) de *Burkholderia cepacia*

Condição	Potencial Aplicado (V)	Atividade Enzimática (U g ⁻¹) ²				
		Tempo reacional antes da análise (min) ¹				
		0	15	30	60	120
Liofilizada livre (PS-SD)	-1,5	257,23	235,12	151,10	101,11	21,74
	-2,0		18,76	22,45	20,54	22,53
Imobilizada em Celite®	-1,5	190,97	139,13	102,01	81,83	77,06
	-2,0		70,61	71,70	70,07	51,52
Imobilizada em cerâmica (PS-C) ³	-1,5	5,42	5,21	4,75	4,39	5,89
	-2,0		5,36	5,56	4,95	3,57
Imobilizada em diatomita (PS-D) ³	-1,5	130,28	87,70	68,47	33,37	33,00
	-2,0		44,35	41,77	42,31	26,91

¹ Condições reacionais: eletrodo de trabalho combinado Sn/Pb (63:37), contra-eletrodo de Pt, eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹), tampão fosfato pH 7,4 (3,0 mL), 25 °C. ² Velocidade inicial de hidrólise de 1 µmol min⁻¹ de butirato de 4-nitrofenila (**4**), calculada a partir de uma curva de calibração (absorbância × concentração em mmol L⁻¹) construída para o 4-nitrofenol (**5**). ³ Exemplar comercialmente imobilizado.

Tabela 20 – Testes com adição de TMSCl à (bio)eletrorredução da acetofenona (1)

Entrada ¹	Enzima ²	Condição	Composição reacional final (%) ³		
			[1]	[2]	[3]
1	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> (Lipozyme RM-IM) ⁴	Imobilizada em Duolite	-	54,5 ± 2,8	45,5 ± 2,8
2	Lipase de <i>Thermomyces</i> <i>lanuginosus</i> (Lipolase 100T) ⁴	Imobilizada em sílica gel	-	54,4 ± 7,1	45,6 ± 7,1
3	Lipase de <i>Candida</i> <i>antarctica</i> B (Novozym 435) ⁴	Imobilizada em resina acrílica	-	51,3 ± 1,8	48,7 ± 1,8
4	Lipase PS-D (Amano) de <i>Burkholderia</i> <i>cepacia</i> ⁴	Imobilizada em diatomita	-	47,5 ± 4,5	55,6 ± 4,5
5	Lipase de <i>Thermomyces</i> <i>lanuginosus</i>	Imobilizada em MMT modificada	2,0 ± 0,4	28,4 ± 2,6	69,6 ± 2,1

¹ Condições reacionais: eletrodo de trabalho combinado Sn/Pb (63:37), contra-eletrodo de Pt, **1** (0,48 mmol), TMSCl (0,67 mmol), tampão fosfato pH 7,4 (4,0 mL), -2,0 V vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹), 25 °C, 4 h. ² Adição de 20 mg da enzima. ³ Média ± desvio padrão; n = 2. Quantificação realizada por CG com base em curvas de calibração pré-definidas para **1** e **2**. ⁴ Exemplar comercial imobilizado.

APÊNDICE B – Espectros e Cromatogramas

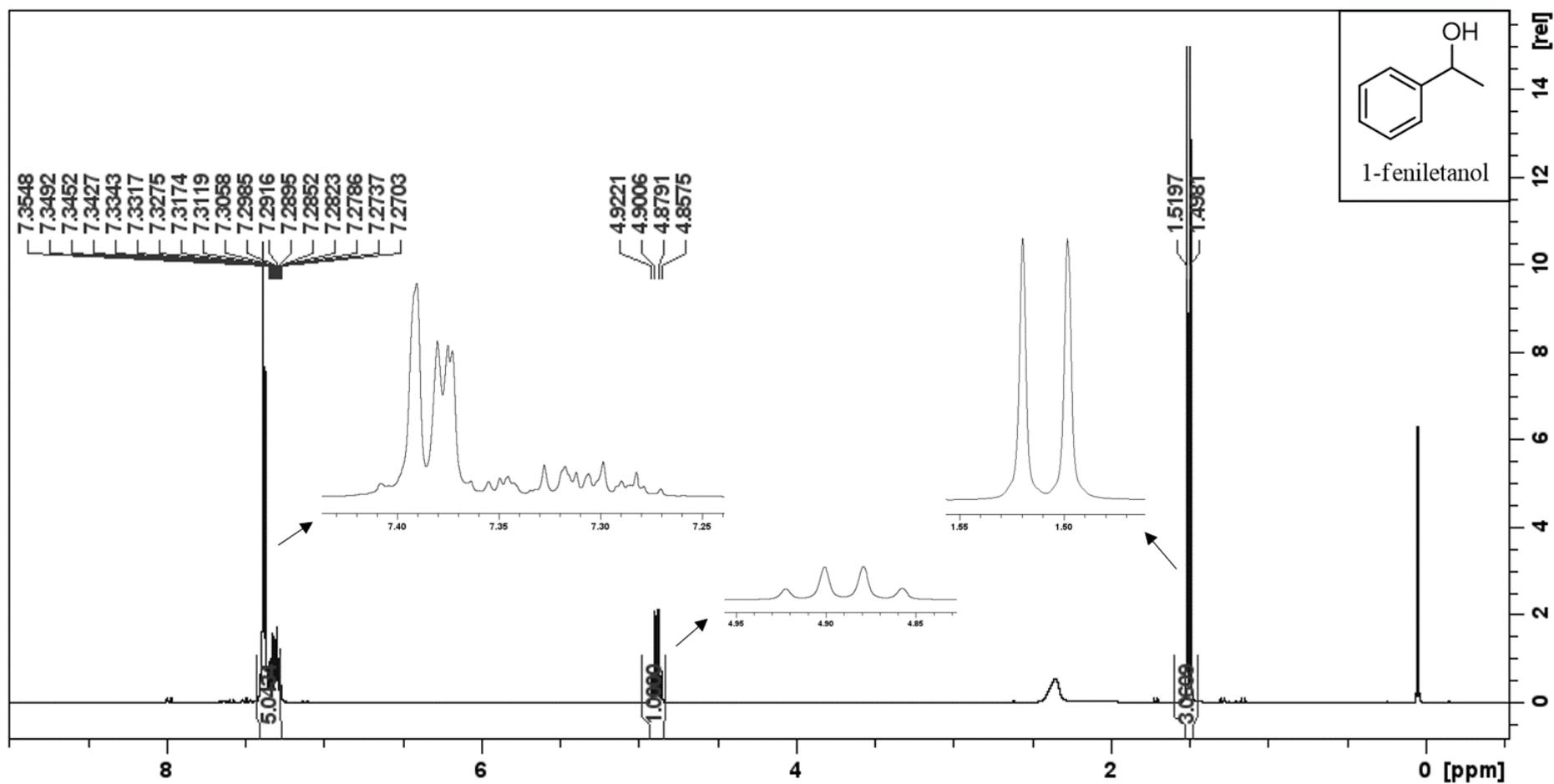
Figura 29 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz) para o composto **2** em CDCl_3 

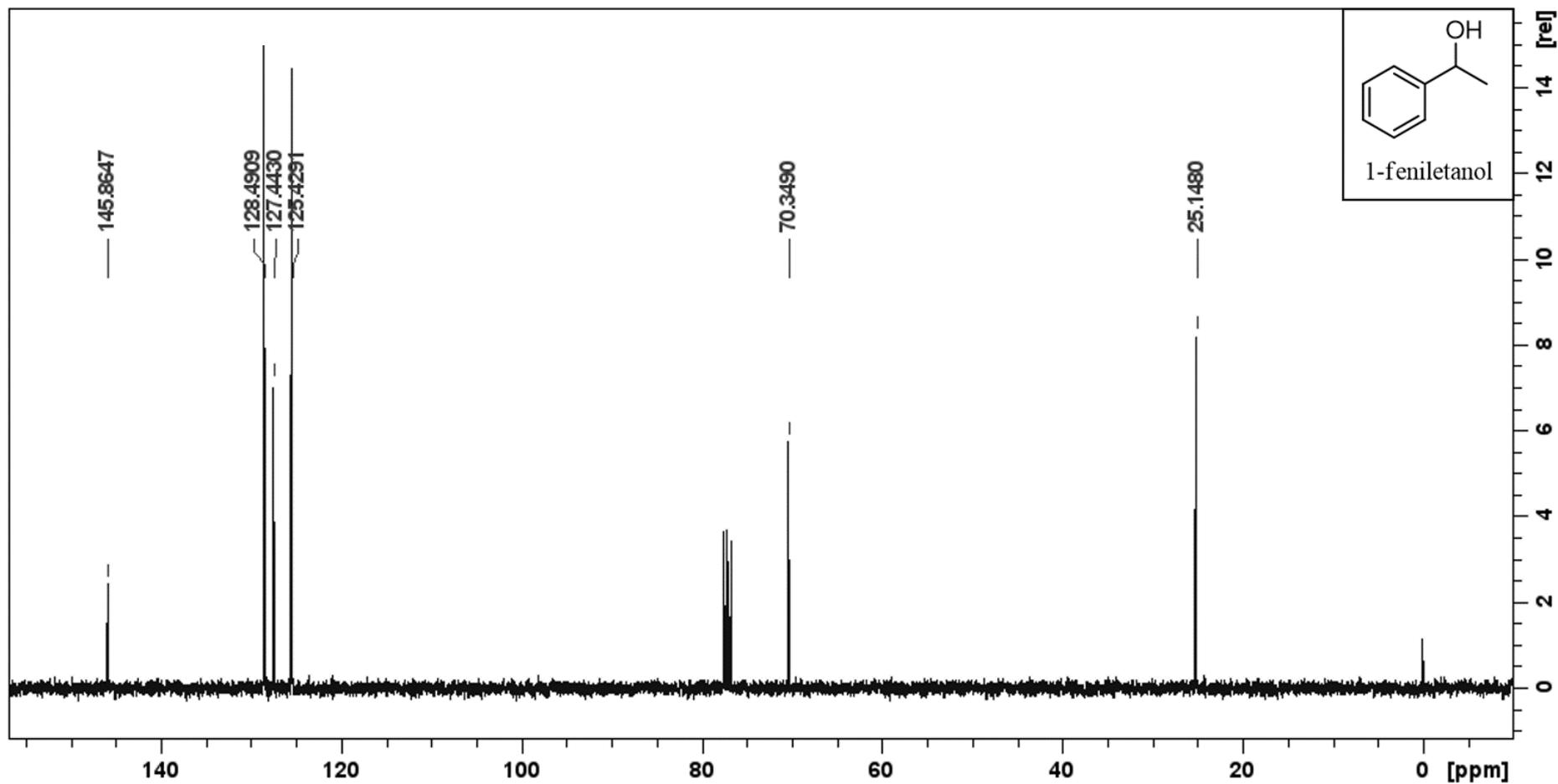
Figura 30 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz) para o composto **2** em CDCl_3 

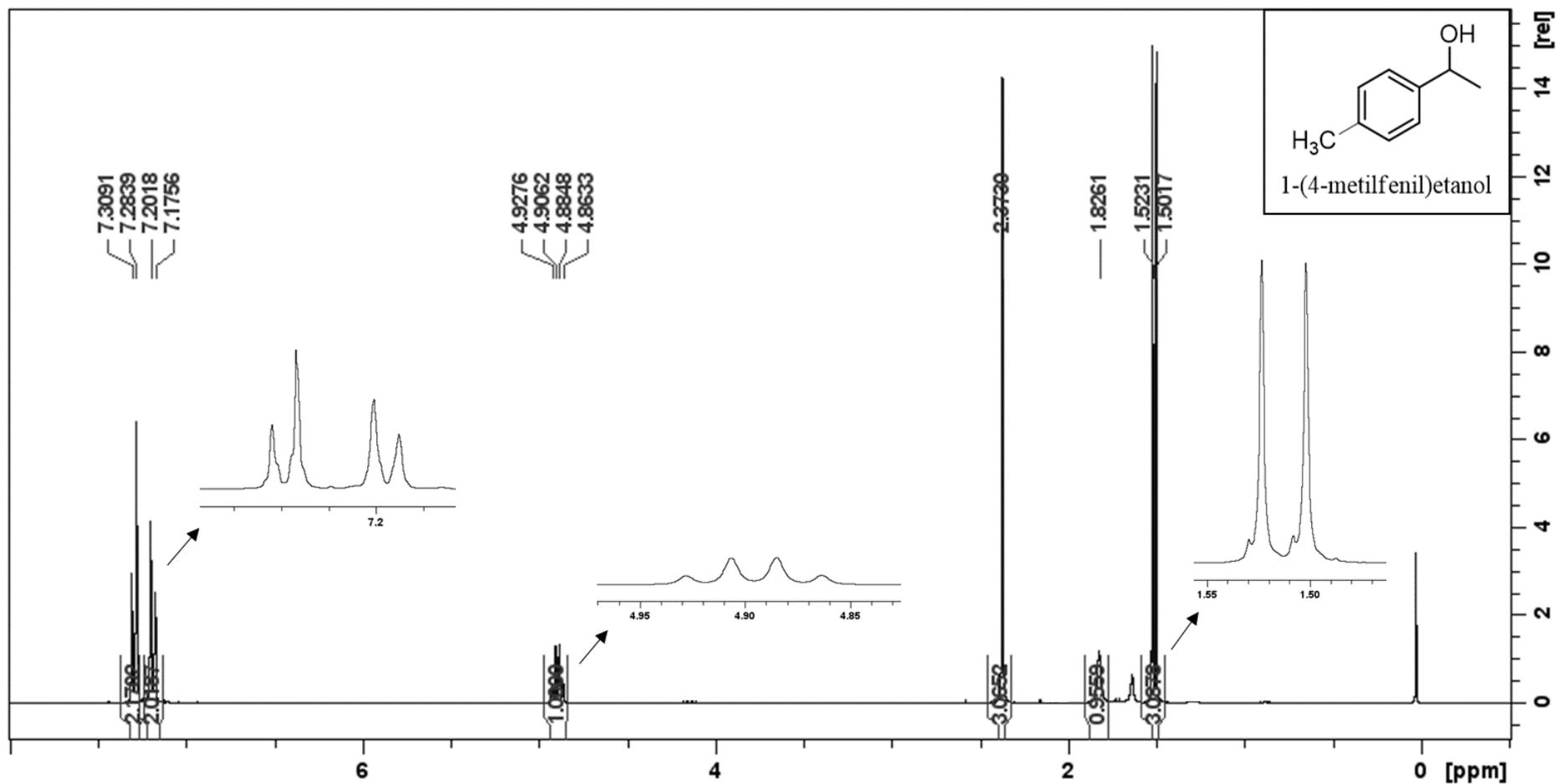
Figura 31 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz) para o composto 7 em CDCl_3 

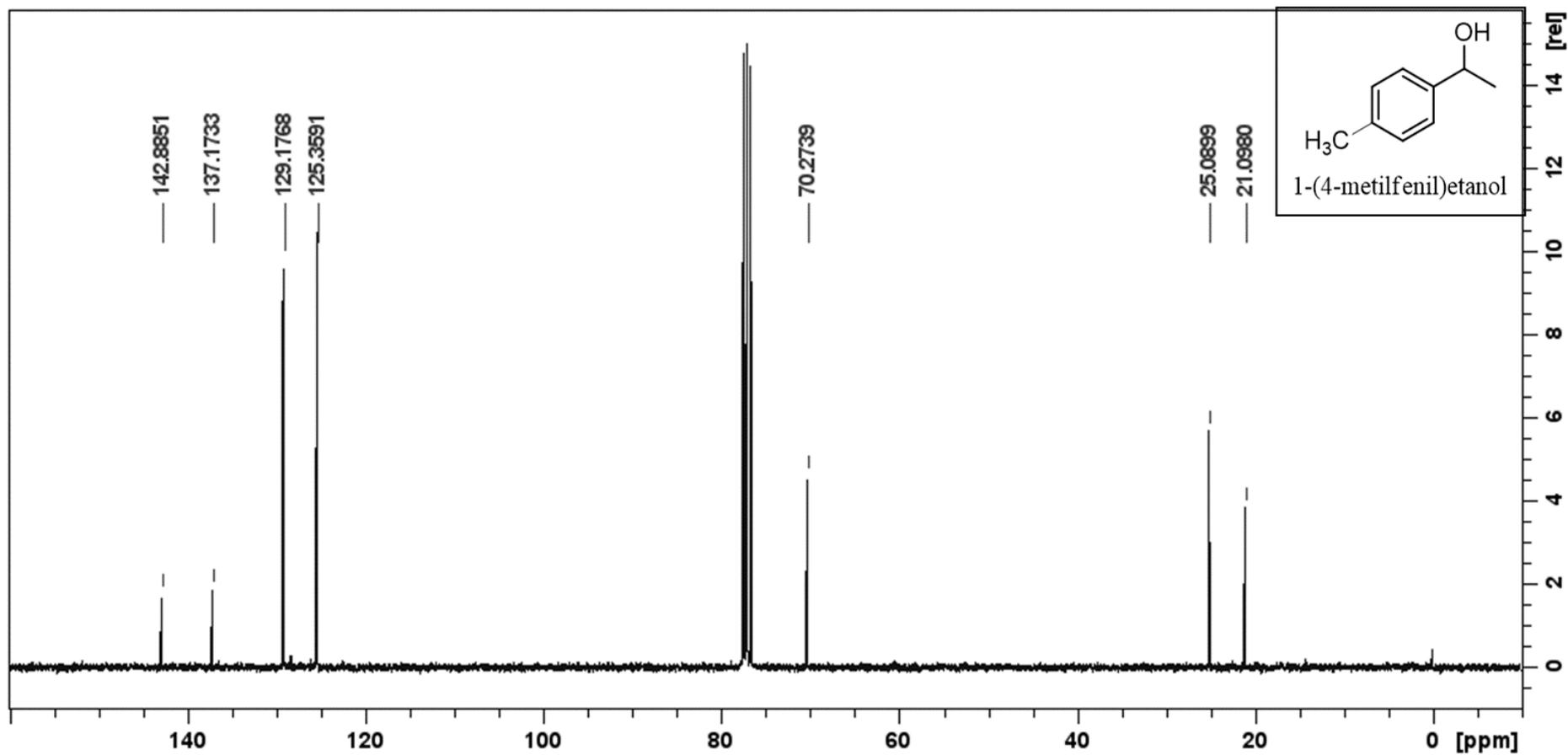
Figura 32 – Espectro de ^{13}C (75 MHz) para o composto 7 em CDCl_3 

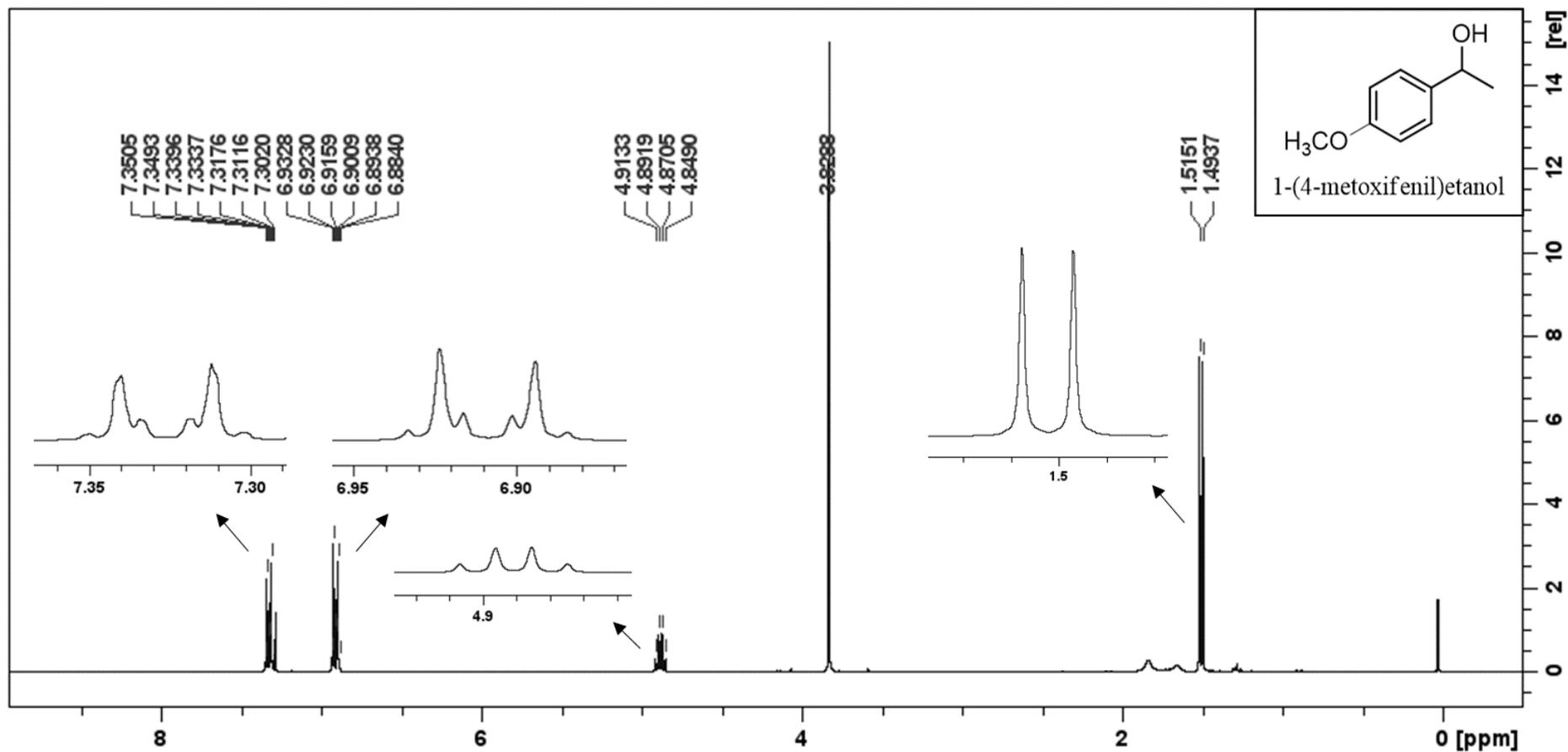
Figura 33 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz) para o composto **9** em CDCl_3 

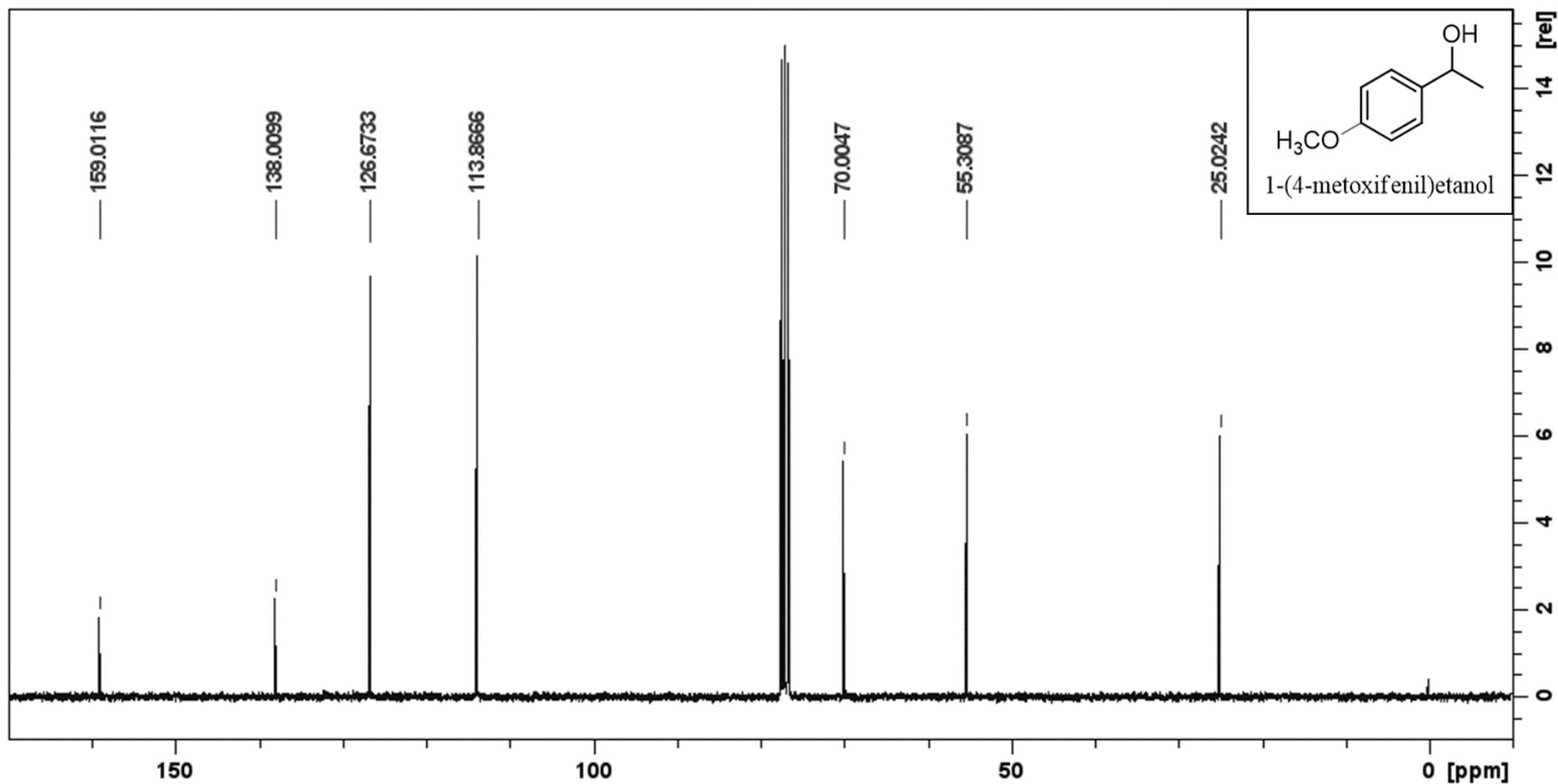
Figura 34 – Espectro de ^{13}C (75 MHz) para o composto **9** em CDCl_3 

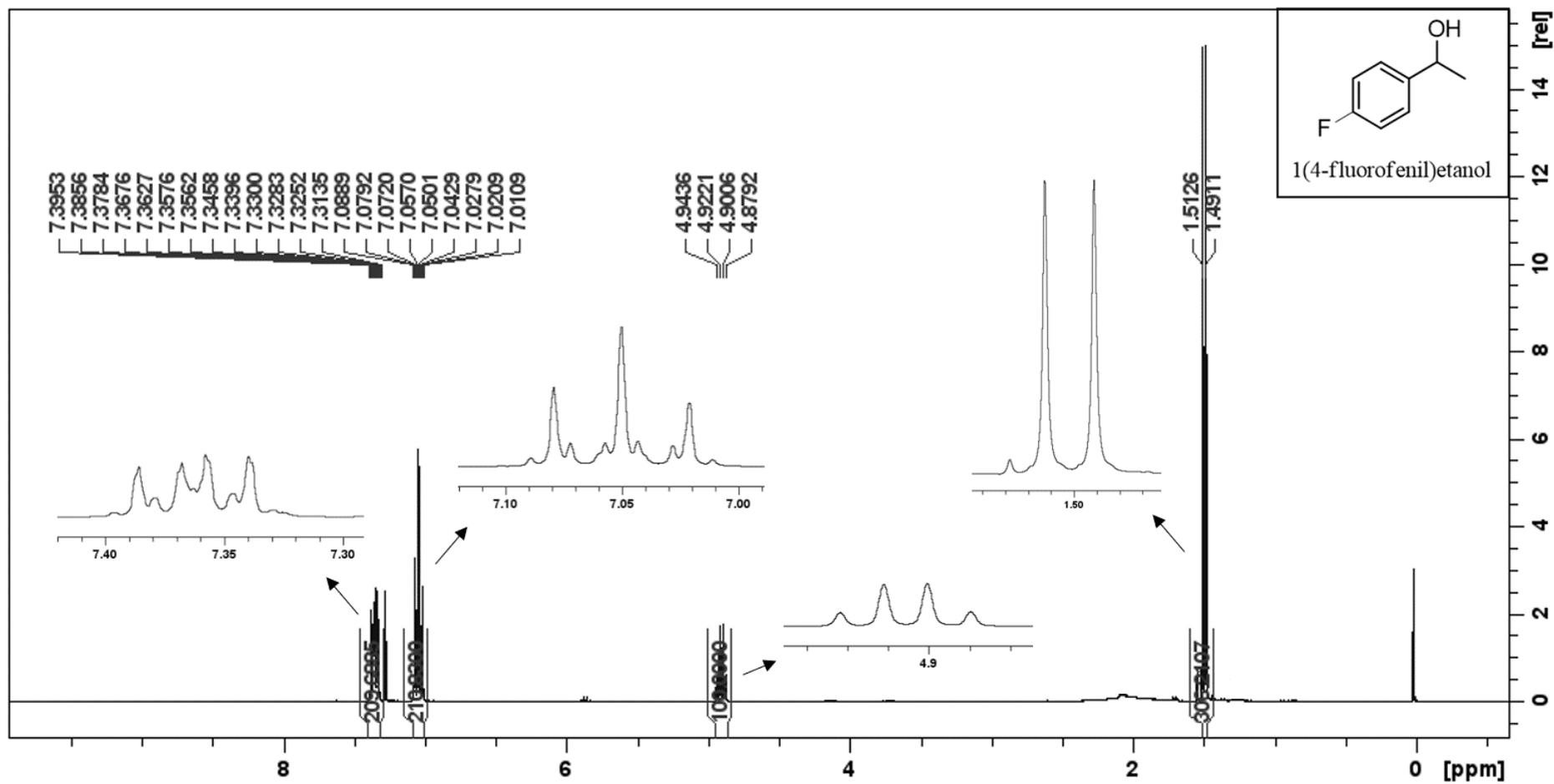
Figura 35 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz) para o composto **11** em CDCl_3 

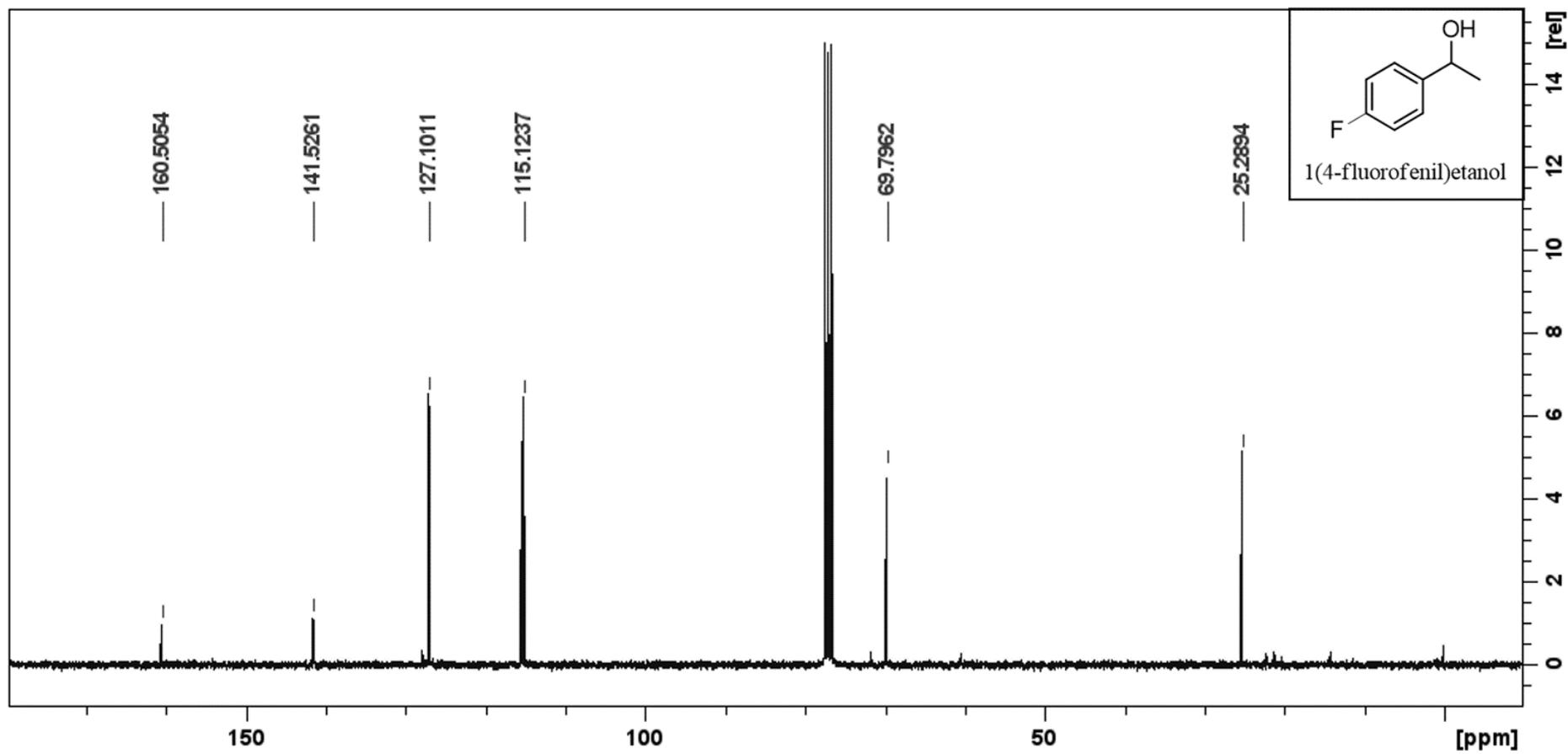
Figura 36 – Espectro de ^{13}C (75 MHz) para o composto **11** em CDCl_3 

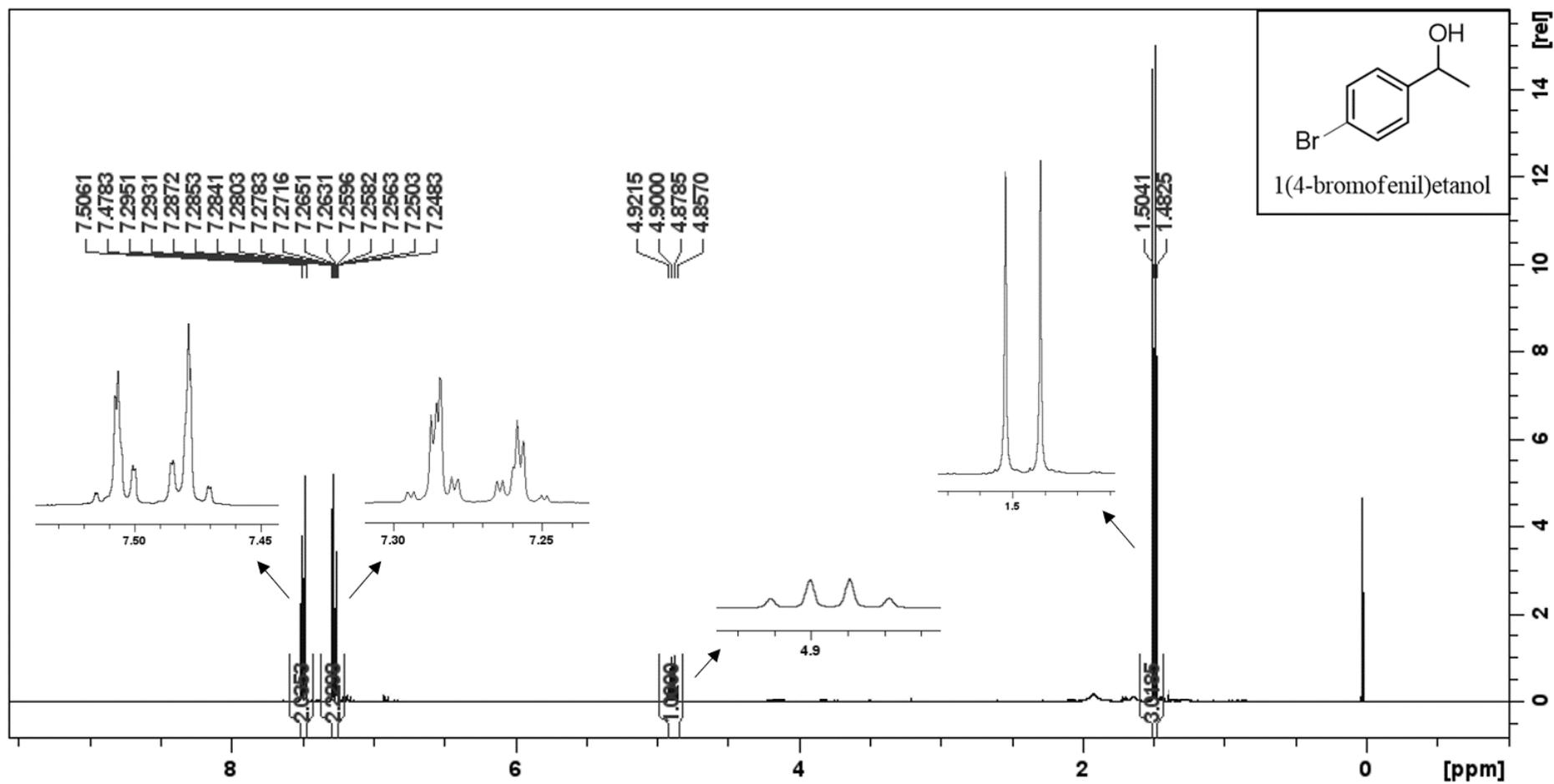
Figura 37 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz) para o composto **13** em CDCl_3 

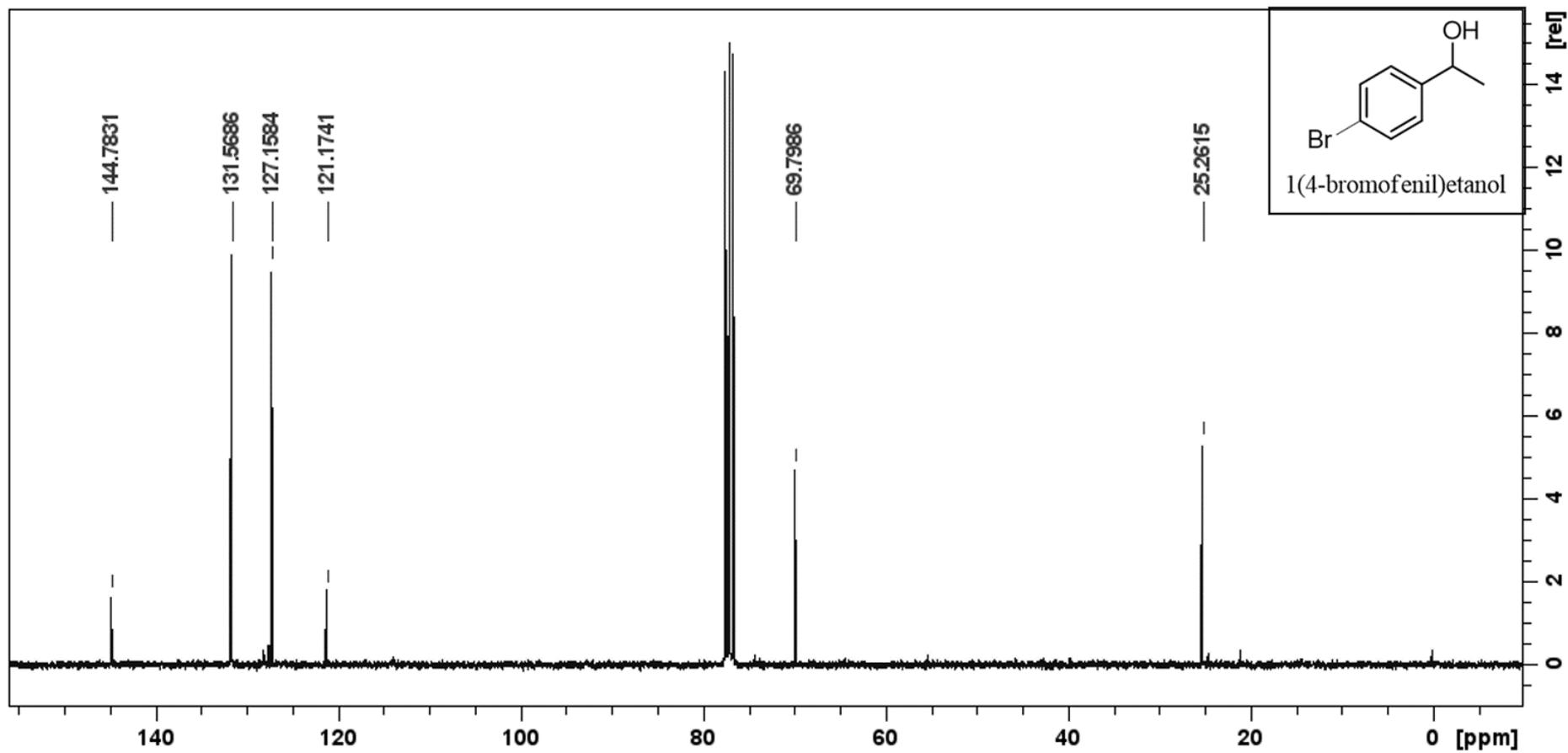
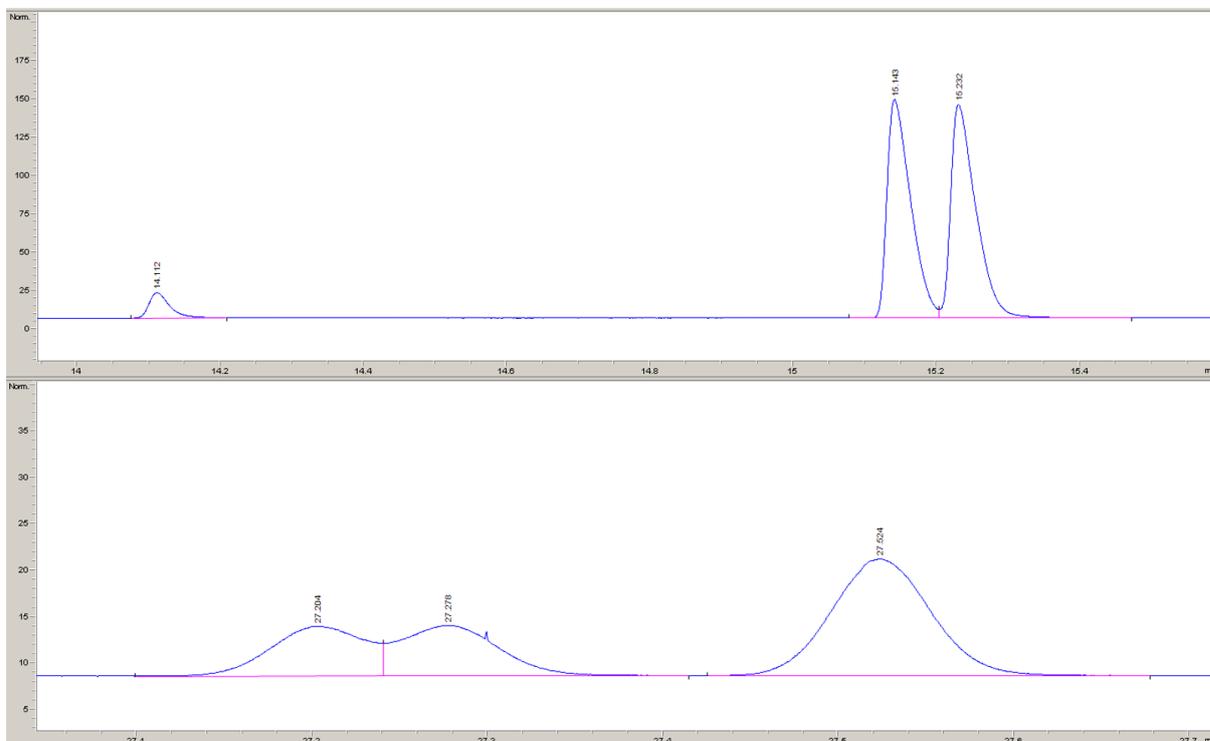
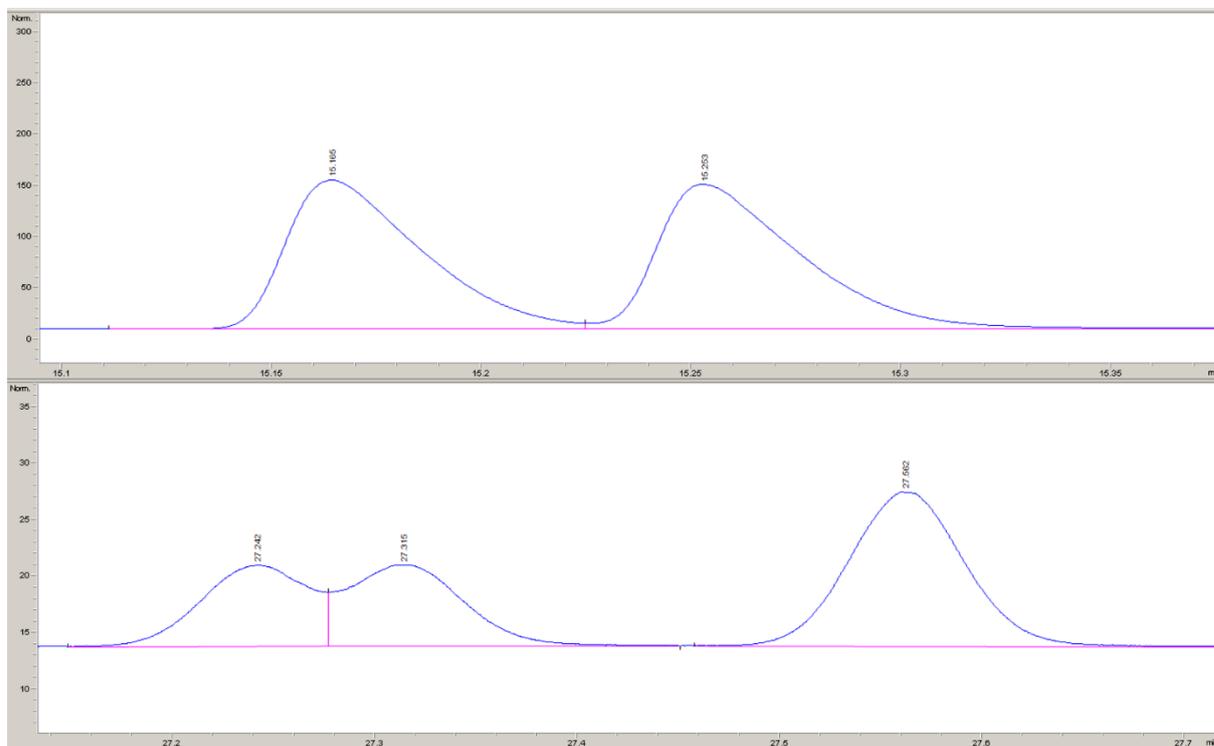
Figura 38 – Espectro de ^{13}C (75 MHz) para o composto **13** em CDCl_3 

Figura 39 – Cromatograma obtido por CG da mistura reacional final de eletrorredução da acetofenona (**1**) com eletrodo combinado de Sn/Pb (63:37), na presença de lipase de *Thermomyces lanuginosus* immobilizada em sílica gel (Lipolase 100T), em tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pH 5,0, sob potencial de $-2,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ por 4 horas (Tabela 6, Entrada 11)



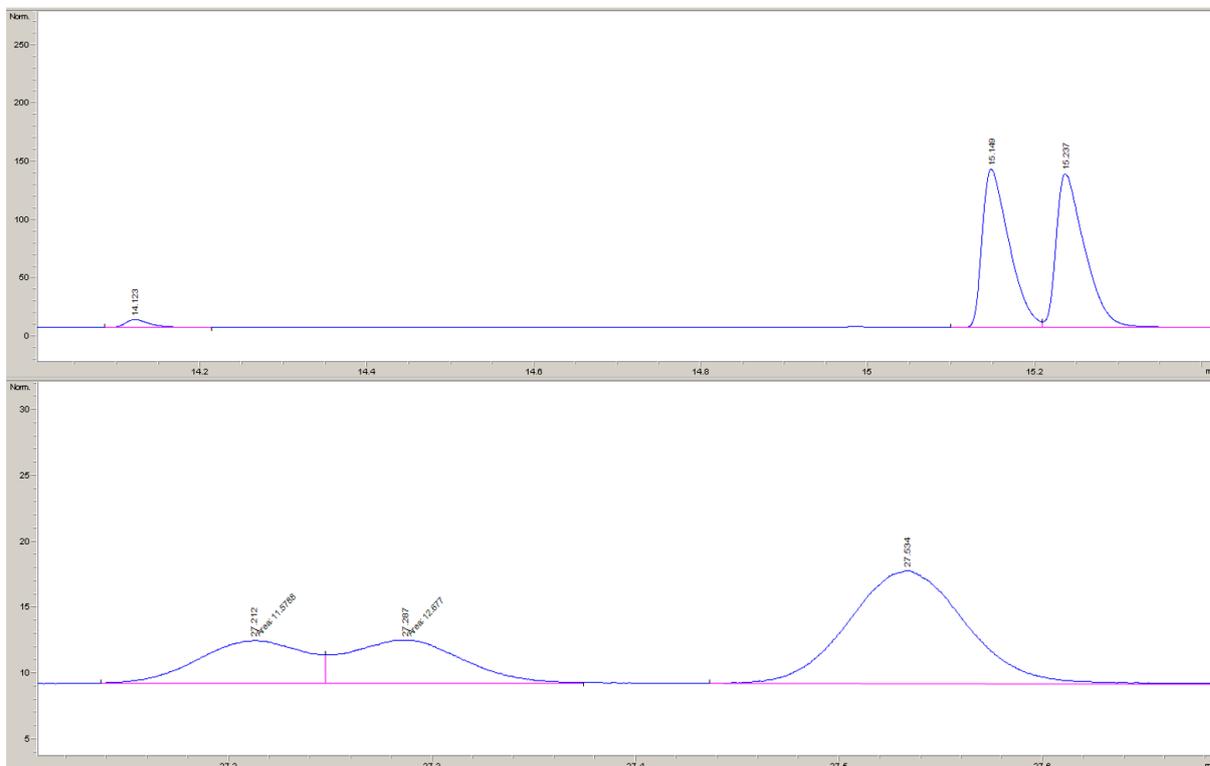
Espécie	T _R	Área	Altura	Largura	Simetria
Acetofenona	14,112	33,1	16,4	0,03	0,599
(R)-1-feniletanol	15,143	328,1	142,5	0,0349	0,464
(S)-1-feniletanol	15,232	338,7	139,4	0,0356	0,431
Dímero	27,204	20	5,4	0,0564	1,065
Dímero	27,278	21,3	5,4	0,0562	0,86
Dímero	27,524	50,1	12,6	0,0624	0,909

Figura 40 – Cromatograma obtido por CG da mistura reacional final de eletrorredução da acetofenona (**1**) com eletrodo combinado de Sn/Pb (63:37), na presença de lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em MMT modificada, em tampão acetato (0,1 mol L⁻¹) pH 5,0, sob potencial de -2,0 V vs. Ag/AgCl por 4 horas (Tabela 6, Entrada 12)



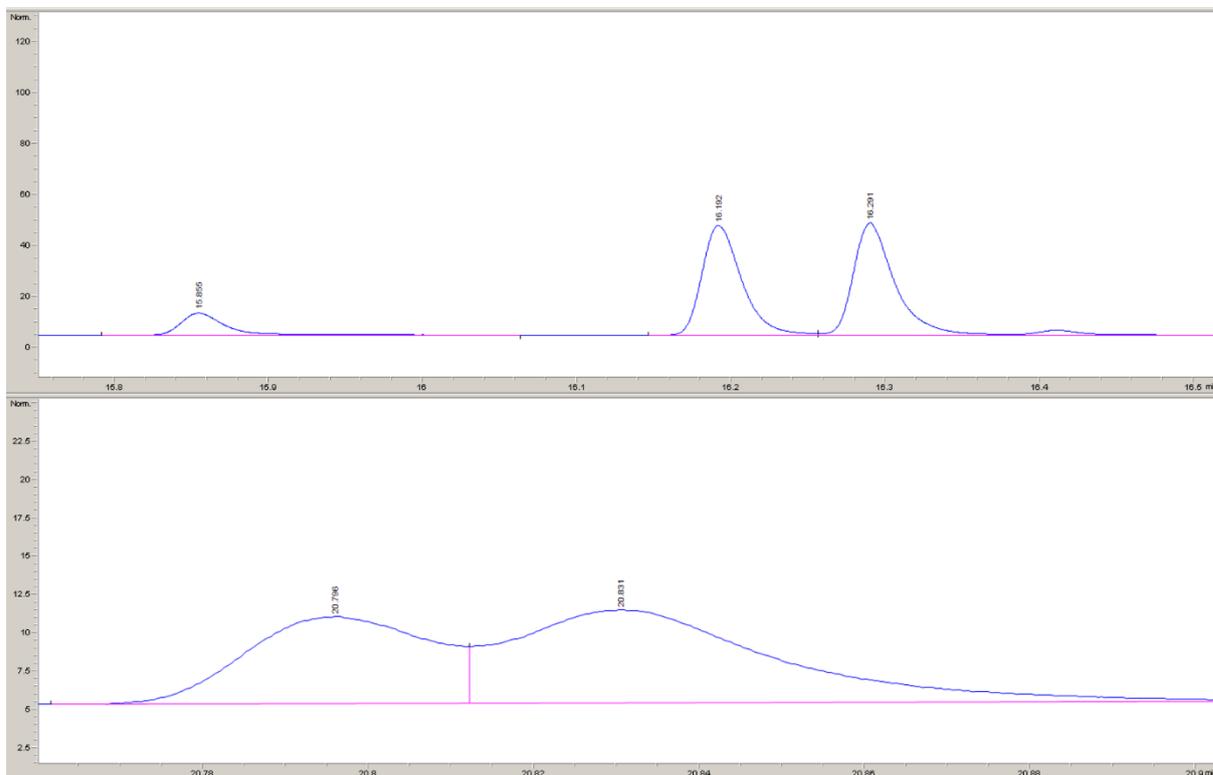
Espécie	T _R	Área	Altura	Largura	Simetria
Acetofenona	14,132	37,6	18,6	0,0307	0,62
(R)-1-feniletanol	15,165	326	145	0,0342	0,492
(S)-1-feniletanol	15,253	336,6	140,5	0,0352	0,455
Dímero	27,242	26,6	7,2	0,0553	1,139
Dímero	27,315	28,7	7,2	0,0592	0,847
Dímero	27,562	54,6	13,7	0,0618	0,932

Figura 41 – Cromatograma obtido por CG da mistura reacional final de eletrorredução da acetofenona (**1**) com E-NLTL, em tampão acetato (0,1 mol L⁻¹) pH 5,0, sob potencial de -2,0 V vs. Ag/AgCl por 4 horas (Tabela 7, Entrada 2)



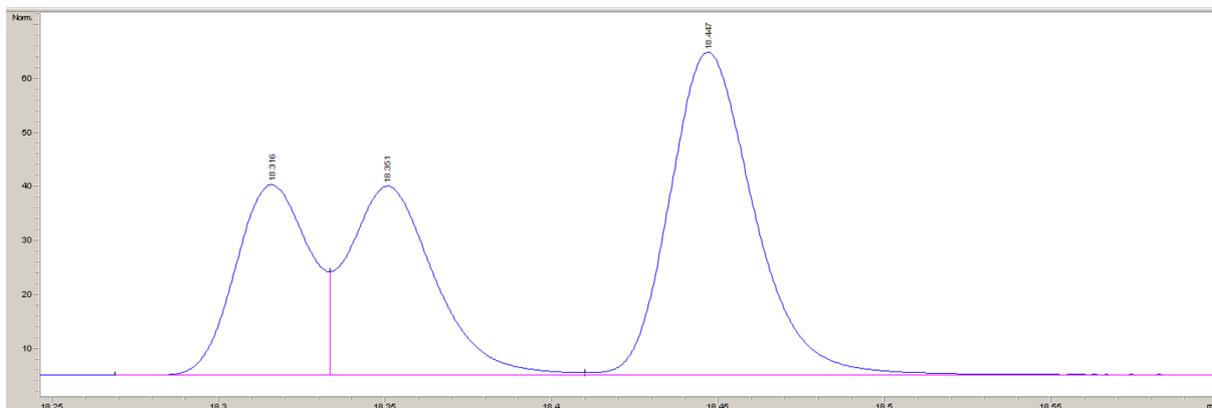
Espécie	T _R	Área	Altura	Largura	Simetria
Acetofenona	14,123	14,2	6,8	0,0316	0,619
(R)-1-feniletanol	15,149	304,1	135,9	0,0341	0,486
(S)-1-feniletanol	15,237	313,3	132	0,0349	0,451
Dímero	27,212	11,6	3,2	0,0598	0
Dímero	27,287	12,7	3,2	0,0653	0,985
Dímero	27,534	34,1	8,6	0,0617	0,961

Figura 42 – Cromatograma obtido por CG da mistura reacional final de eletrorredução da 4-metilacetofenona (**6**) com E-NLTL, em tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pH 5,0, sob potencial de $-2,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ por 4 horas (Tabela 8, Entrada 1)



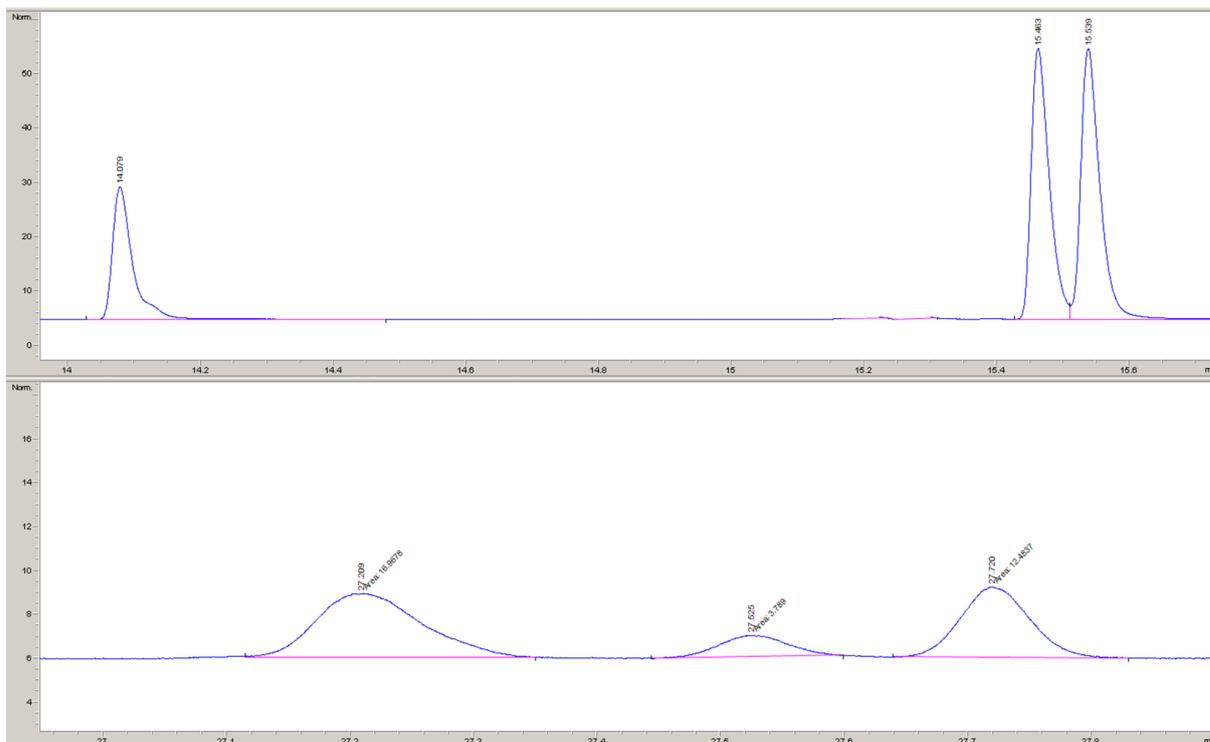
Espécie	T_R	Área	Altura	Largura	Simetria
4-metilacetofenona	15,855	18,3	8,7	0,318	0,56
(R)-1-(4-fenilmetil)etanol	16,192	76,9	42,8	0,274	0,672
(S)-1-(4-fenilmetil)etanol	16,291	85,8	43,8	0,0293	0,566
Dimero	20,796	8,8	5,6	0,0246	0,95
Dimero	20,831	13,5	6	0,0325	0,61

Figura 43 – Cromatograma obtido por CG da mistura reacional final de eletrorredução 4-metoxiacetofenona (**8**) com E-NLTL, em tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pH 5,0, sob potencial de $-2,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ por 4 horas (Tabela 8, Entrada 2)



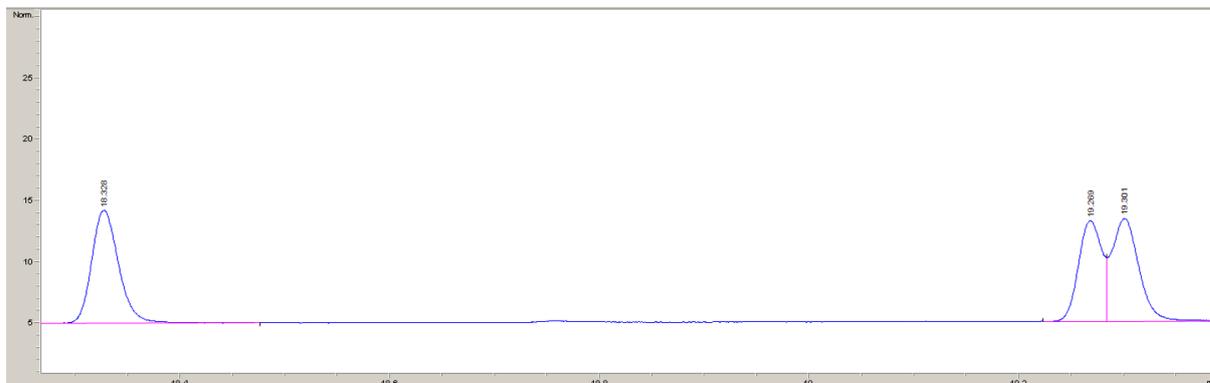
Espécie	T_R	Área	Altura	Largura	Simetria
(<i>R</i>)-1-(4-fenilmetoxi)etanol	18,316	54,7	35,2	0,0245	0,955
(<i>S</i>)-1-(4-fenilmetoxi)etanol	18,351	63,4	35	0,0275	0,757
4-metoxiacetofenona	18,447	105,6	59,7	0,0278	0,766

Figura 44 – Cromatograma obtido por CG da mistura reacional final de eletrorredução 4-fluoroacetofenona (**10**) com E-NLTL, em tampão acetato (0,1 mol L⁻¹) pH 5,0, sob potencial de -2,0 V vs. Ag/AgCl por 4 horas (Tabela 8, Entrada 3)



Espécie	T _R	Área	Altura	Largura	Simetria
4-fluoroacetofenona	14,079	52,9	24,4	0,0317	0,496
(R)-1-(4-fluorofenil)etanol	15,463	94,2	49,7	0,0285	0,583
(S)-1-(4-fluorofenil)etanol	15,539	99,6	49,7	0,0298	0,584
Dimero	27,209	17	2,9	0,098	0,717
Dimero	27,525	3,8	3,6	0,065	0,907
Dimero	27,72	12,5	3,2	0,0652	0,826

Figura 45 – Cromatograma obtido por CG da mistura reacional final de eletrorredução 4-bromoacetofenona (**12**) com E-NLTL, em tampão acetato (0,1 mol L⁻¹) pH 5,0, sob potencial de -2,0 V vs. Ag/AgCl por 4 horas (Tabela 8, Entrada 4)



Espécie	T _R	Área	Altura	Largura	Simetria
4-bromoacetofenona	18,328	16,6	9,2	0,0283	0,76
(<i>R</i>)-1-(4-bromofenil)etanol	19,269	12,9	8,2	0,0239	1,044
(<i>S</i>)-1-(4-bromofenil)etanol	19,301	15,1	8,4	0,0267	0,774