



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



Isabel Hoffmann

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM FILMES DE AMIDO: PREPARAÇÃO DE ÉSTERES DE AROMA DERIVADOS DO GERANIOL E RESOLUÇÃO ENZIMÁTICA DO (*R,S*)-1-FENILETANOL

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento

Florianópolis, março de 2010

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

Isabel Hoffmann

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM FILMES DE AMIDO: PREPARAÇÃO DE ÉSTERES DE AROMA DERIVADOS DO GERANIOL E RESOLUÇÃO ENZIMÁTICA DO *(R,S)*-1-FENILETANOL

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento

Florianópolis, março de 2010

Isabel Hoffmann

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM FILMES DE AMIDO: PREPARAÇÃO DE ÉSTERES DE AROMA DERIVADOS DO GERANIOL E RESOLUÇÃO ENZIMÁTICA DO (R,S)-1-FENILETANOL

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

Florianópolis, 3 de março de 2010.

Prof. Dr. Ademir Neves
Coordenador do Programa de Pós-Graduação

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria da G. Nascimento
Orientadora

Prof. Dr. Ricardo J. Nunes
(Dep. Química-UFSC)

Profa. Dra. Elisa H. Siegel Moecke
(Dep. Ciên. e Tec. Alimentos-UFSC)

Prof. Dr. Antônio C. Joussef
(Dep. Química-UFSC)

*A minha família,
especialmente aos meus
pais Valdir e Lucinda
pelo amor e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

- ✓ A Universidade Federal de Santa Catarina, pelo espaço físico fornecido.
- ✓ A Central de Análises, pelas várias análises realizadas.
- ✓ Ao CNPq e CAPES, pelo suporte e apoio financeiro.
- ✓ A Amano, Novozymes e Genzyme Biochemicals, pela doação das enzimas comerciais.
- ✓ A Profa. Dra. Sandra Patricia Zanotto, pela doação dos micélios UEA_53 e UEA_115.
- ✓ A Profa. Dra. Patricia O. Carvalho, pela doação das enzimas nativas.
- ✓ A Profa. Dra. Elisa H.S. Moecke pela gentileza e ajuda na extração e caracterização dos amidos.
- ✓ Aos professores do Departamento de Química que contribuíram para esta conquista.
- ✓ Especialmente, a Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento por sua orientação, amizade, dedicação e paciência.
- ✓ Aos queridos amigos e colegas do laboratório de Biocatálise: Cris, Vanessa, Dam, Thiago, Geovanni e Zana por toda ajuda, apoio e amizade.
- ✓ Aos amigos do Laboratório de Química de Produtos Naturais e a galera do “Procurando o Limoneno”, por todas as dicas e momentos de descontração com eles vividos.
- ✓ As minhas grandes amigas, pela força nos momentos difíceis e pelos sorrisos nas horas alegres.
- ✓ Aos meus pais, Valdir e Lucinda, aos meus irmãos, Rúbia, Susana, Ricardo e Eduardo, aos meus cunhados Claison e Fernando e especialmente ao meu sobrinho Johan pelo carinho, amor, apoio e incentivo que deles recebi.
- ✓ A Deus.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	v
ÍNDICE GERAL	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
ÍNDICE DE ESQUEMAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações Parciais	1
1.2 Enzimas	2
1.2.1 Classificação das enzimas	5
1.3 Lipases	7
1.4 Terpenos	12
1.5 Imobilização das enzimas	15
1.6 Amido	19
1.7 Estereosseletividade das enzimas	22
1.8 Resolução enzimática	24
1.9 Métodos analíticos de determinação da pureza enantiomérica	25
1.9.1 Método polarimétrico	25
1.9.2 Cromatografia Gasosa	27
2. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo geral	29

2.2	Objetivos específicos	29
3.	PARTE EXPERIMENTAL	31
3.1	Materiais	31
3.2	Equipamentos	32
3.3	Caracterização dos suportes	33
3.3.1	Micrografia dos grãos de amido	33
3.3.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	33
3.3.3	Determinação do teor de água pelo método de Karl-fischer	33
3.4	Caracterização dos compostos	34
3.4.1	Espectrofotometria no infravermelho	34
3.4.2	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio	34
3.4.3	Polarimetria	34
3.4.4	Cromatografia gasosa de fase quiral (CGQ)	34
3.5	Extração dos grãos de amidos de cará, taro e gengibre	35
3.6	Preparação dos filmes de amido e imobilização das lipases	36
3.7	Preparação dos álcoois e ésteres racêmicos por métodos químicos	37
3.7.1	Procedimento geral para a redução das acetofenonas substituídas	37
3.7.2	Preparação do (<i>R,S</i>)-acetato de 1-feniletila	40
3.8	Preparação de ésteres por método enzimático	41
3.8.1	Preparação do acetato e alcanóatos de geranoíla	41
3.8.2	Preparação de ésteres derivados do (<i>R,S</i>)-1-feniletanol	44
3.9	Condições usadas nas análises de CGQ	45
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
		vii

4.1	Extração e caracterização dos grãos de amido de cará, taro e gengibre	48
4.2	Determinação do teor de água nos filmes	52
4.3	Efeito do solvente e da temperatura nos filmes de amido	53
4.4	Reações de transesterificação e esterificação do geranio	54
4.4.1	Efeito da massa da LBC e reutilização dos filmes de amido de cará e taro	54
4.4.2	Efeito do tamanho da cadeia alquílica e do tempo na reação de esterificação para obtenção de alcanóatos de geranoíla	57
4.5	Resolução enzimática do (<i>R,S</i>)-1-feniletanol	60
4.5.1	Efeito da razão molar do acetato de vinila e de iso-propenila na obtenção do (<i>R</i>)-(+)-acetato de 1-feniletila	64
4.5.2	Emprego de diferentes lipases na resolução enzimática do (<i>R,S</i>)-1-feniletanol	69
4.5.3	Efeito do solvente orgânico	72
4.5.4	Imobilização da LBC em blendas de amido de gengibre/PEO	76
4.5.5	Influência do tempo na resolução do (<i>R,S</i>)-1-feniletanol	77
4.5.6	Resultados preliminares para a resolução enzimática de derivados do (<i>R,S</i>)-1-feniletanol	79
5.	CONCLUSÃO	84
6.	PERSPECTIVAS	87
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
8.	ANEXOS	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das estruturas primária, secundária, terciária e quaternária da insulina.	2
Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de ação enzimática.	3
Figura 3. Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de <i>Geobacillus thermocatenulatus</i> .	8
Figura 4. Mecanismo proposto para hidrólise enzimática de um éster.	9
Figura 5. Exemplos de monoterpenos.	13
Figura 6. Exemplo de ésteres de aromas obtidos pelo método enzimático.	14
Figura 7. Métodos de imobilização de enzimas. (adaptada das refs. (11; 41))	16
Figura 8. Estrutura da amilose.	20
Figura 9. Estrutura da amilopectina.	20
Figura 10. Complexo formado do iodo com a amilose.	21
Figura 11. Representação das estruturas (S) e (R) do limoneno.	23
Figura 12. Representação das estruturas (R) e (S) da talidomida.	23
Figura 13. Estruturas moleculares e dimensões das α -, β -, γ -CD.	27
Figura 14. Espectro de RMN- ¹ H comparando as áreas dos hidrogênios metilênicos do 22 com os do produto 23 , c: 56,5%, [400 MHz, CDCl ₃].	42

- Figura 15.** Espectro de infravermelho do acetato de geranoíla (23). 43
- Figura 16.** Meio reacional e análise dos produtos obtidos na resolução do (*R,S*)-11 e derivados. 45
- Figura 17.** Cromatograma de uma alíquota da reação de transesterificação do (*R,S*)-11 com acetato de vinila, c: 22,5% [(*R,S*)-11 (0,6 mL, 5 mmol); 4 (0,5 mL, 5 mmol); *n*-hexano (25 mL); LBC (60 mg), geng:PEO (5:5 m/m); t.a.; 24 h]. 47
- Figura 18.** Micrografia dos grãos de amido de taro (*Colocasia esculenta*). Aumento de 400 vezes. 49
- Figura 19.** Micrografia dos grãos de amido de cará (*Dioscorea* spp.). Aumento de 400 vezes. 49
- Figura 20.** Micrografia dos grãos de amido de gengibre (*Zingiber officinale*). Aumento de 200 vezes. 50
- Figura 21.** Microscopia eletrônica de varredura. (A) filme de gengibre (450x), (B) filme de gengibre:PEO (450x). [gengibre (1 g), gengibre:PEO (7:3 m/m)]. 51
- Figura 22.** Microscopia eletrônica de varredura. (C) filme de LBC/gengibre - superfície (1000x), (D) filme de LBC/gengibre - fratura (450x). [LBC (60 mg), gengibre (1 g)]. 52
- Figura 23.** Variação na conversão ao produto 23 em função da massa de LBC imobilizada em filme de amido de taro e da reutilização. [22 (0,9 mL, 5 mmol), 4 (0,5 mL, 5 mmol), *n*-hexano (25 mL), 35 °C, 72-96 h, número de utilizações dos filmes: ■ (1ª); ● (2ª); ▲ (3ª); ▼ (4ª) e ◀ (5ª)]. 55

- Figura 24.** Variação na conversão ao produto **23** em função da massa de LBC imobilizada em filmes de amido de cará e da reutilização, [**22** (0,9 mL, 5 mmol), **4** (0,5 mL, 5 mmol), *n*-hexano (25 mL), 35 °C, 72-144 h, número de utilizações dos filmes: ■ (1ª); ● (2ª); ▲ (3ª); ▼ (4ª) e ◀ (5ª)]. 56
- Figura 25.** Conversão aos alcanóatos de geranoíla **24-31** em função do tamanho da cadeia aquílica dos doadores acilas e do tempo de reação, utilizando como catalisador o sistema LBC/cará. [**22** (0,9 mL, 5 mmol), doadores acila (5 mmol), LBC (60 mg/g de amido), *n*-hexano (25 mL), 35 °C]. 58
- Figura 26.** Conversão aos alcanóatos de geranoíla **24-31** em função do tamanho da cadeia aquílica dos doadores acilas e do tempo de reação, utilizando como catalisador o sistema LBC/taro. [**22** (0,9 mL, 5 mmol), doadores acila (5 mmol), LBC (60 mg/g de amido), *n*-hexano (25 mL), 35 °C]. 59
- Figura 27.** Espectro de RMN-¹H do (*R*)-(+)-acetato de 1-feniletila (**12**) [400 MHz, CDCl₃]. 62
- Figura 28.** Espectro de IV do (*R*)-(+)-acetato de 1-feniletila (**12**). (filme) 63
- Figura 29.** Cromatograma do padrão racêmico (*R,S*)-**21** e de uma alíquota da reação enzimática para obtenção do (*R*)-(+)-**12**. [A (*R,S*)-**21**, B (*R*)-(+)-**12**, C (*R,S*)-**11**]. 64
- Figura 30.** Efeito da razão molar de **11:4** na obtenção do éster (*R*)-(+)-**12**, catalisada por LBC/taro. [(*R,S*)-**11** (0,6 mL, 5 mmol); **4** (0,5-4,6 mL, 5-50 mmol), LBC (60 mg/g amido), *n*-hexano (25 mL), 35 °C, 48 h]. 65

Figura 31. Efeito da razão molar de **11:4** na obtenção do éster (*R*)-(+)-**12**, catalisada por LBC/gengibre. [(*R,S*)-**11** (0,6 mL, 5 mmol); **4** (0,5-4,6 mL, 5-50 mmol), LBC (60 mg/g amido), *n*-hexano (25 mL), 35 °C, 48 h]. 66

Figura 32. Variação na conversão em (*R*)-(+)-**12** com acetato de *iso*-propenila em função do tempo e reutilização do sistema LBC/gengibre. [(*R,S*)-**11** (0,6 mL, 5 mmol), **32** (0,6 mL, 5 mmol), LBC (60 mg/g de amido), *n*-hexano (25 mL), t.a., ■ (1ª uso); ▼ (2ª uso); ▲ (*ee_p*)]. 68

Figura 33. Efeito da proporção de PEO no suporte amido:PEO para resolução da (*R,S*)-**11** com acetato de vinila. [(*R,S*)-**11** (0,6 mL, 5 mmol), **4** (0,5 mL, 5 mmol), LBC (60 mg/g de suporte), *n*-hexano (25 mL), t.a., 24 h, ■ (conversão (%)); ▼ (*ee_p*)]. 76

Figura 34. Variação da conversão (%) e excesso enantiomérico (*ee_p*%) em função do tempo na resolução enzimática do (*R,S*)-1-feniletanol (**11**) com acetato de vinila (**4**). [(*R,S*)-**11** (0,6 mL, 5 mmol), **4** (0,5 mL, 5 mmol), LBC (60 mg/g de suporte), amido:PEO (7:3 m/m), *n*-hexano/glicerol (10 mL 9:1 v/v), t.a., ■ (conversão (%)); ▼ (*ee_p*)]. 78

Figura 35. Cromatograma do padrão racêmico (*R,S*)-**20b** e de uma alíquota da reação enzimática para obtenção do éster **20c**. [A (*R,S*)-**20b**, B **20c**]. 81

Figura 36. Espectro de RMN-¹H do (*R,S*)-1-(4-nitrofenil)etanol (**16b**) [400 MHz, CDCl₃]. 98

Figura 37. Espectro de IV do (*R,S*)-1-(4-nitrofenil)etanol (**16b**). (filme) 98

Figura 38. Espectro de RMN-¹H do (*R,S*)-1-(3-nitrofenil)etanol (**17b**) [400 MHz, CDCl₃]. 99

Figura 39. Espectro de IV do (<i>R,S</i>)-1-(3-nitrofenil)etanol (17b). (filme)	99
Figura 40. Espectro de RMN- ¹ H do (<i>R,S</i>)-1-(3,4-metilenodioxifenil)etanol (18b) [400 MHz, CDCl ₃].	100
Figura 41. Espectro de IV do (<i>R,S</i>)-1-(3,4-metilenodioxifenil)etanol (18b). (filme)	100
Figura 42. Espectro de RMN- ¹ H do (<i>R,S</i>)-1-(4-metoxifenil)etanol (19b) [400 MHz, CDCl ₃].	101
Figura 43. Espectro de IV do (<i>R,S</i>)-1-(4-metoxifenil)etanol (19b). (filme)	101
Figura 44. Espectro de RMN-1H do (<i>R,S</i>)-1-(4-metilfenil)etanol (20b) [400 MHz, CDCl ₃].	102
Figura 45. Espectro de IV do (<i>R,S</i>)-1-(4-metilfenil)etanol (20b). (filme)	102

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das enzimas de acordo com a UIBBM.	6
Tabela 2. Determinação do teor de água nos filmes de amido com e sem lipase.	53
Tabela 3. Conversão ao (<i>R</i>)-(+)- 12 utilizando lipases de diferentes procedências.	70
Tabela 4. Efeito do solvente orgânico na conversão ao (<i>R</i>)-(+)- 12 , utilizando o sistema LBC/gengibre.	73
Tabela 5. Resolução enzimática dos derivados do (<i>R,S</i>)-1-feniletanol (16-20b)	80

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Hidrólise enantiosseletiva da (<i>R,S</i>)-1.	10
Esquema 2. Transesterificação do (<i>R,S</i>)-3, 6 e 8 com acetato de vinila catalisada pelas lipases CALB, PS-CII e LPF em diferentes solventes.	11
Esquema 3. Síntese do acetato de (<i>R</i>)-12 a partir da redução da acetofenona 10	12
Esquema 4. Extração do amido de cará.	35
Esquema 5. Preparação dos filmes de amido ou amido:PEO e imobilização das lipases.	36
Esquema 6. Redução das acetofenonas substituídas com NaBH ₄ /SiO ₂ .	37
Esquema 7. Preparação do (<i>R,S</i>)-21 pelo método químico.	40
Esquema 8. Preparação do acetato de geranoíla 23.	41
Esquema 9. Reação de esterificação para formação dos alcanoatos de geranoíla 24-31.	41
Esquema 10. Reação de transesterificação enantiosseletiva do (<i>R,S</i>)-1-feniletanol (11) catalisada por lipases.	61
Esquema 11. Resolução enzimática dos derivados do (<i>R,S</i>)-1-feniletanol (11).	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α	Alfa
β	Beta
δ	Deslocamento ou delta
γ	Gama
$[\alpha]_D^T$	Rotação ótica específica
c%	Porcentagem de conversão
[BMIm][PF ₆]	Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio
[EMIm][BF ₄]	Tetrafluorborato de 1-etil-3-metilimidazólio
[EMIm][Tf ₂ N]	Bis(trifluorometilsulfonilimida) de 1-etil-3-metilimidazólio
c	Conversão
CALB	Lipase de <i>Candida antarctica</i>
ccd	Cromatografia de camada delgada
CD	Ciclodextrina
CGQ	Cromatografia gasosa com fase quiral
CLEAS	Cross-linked enzyme aggregates
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E	Razão enantiomérica
E.C.	Enzyme Commission
EDAX	Energy-dispersive X-ray analysis
ee	Excesso enantiomérico
ES	Complexo enzima-substrato
IV	Infravermelho

J	Constante de acoplamento
K_M	Constante de Michaelis-Menten
LAN	Lipase de <i>Aspergillus niger</i>
LBC	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>
LCM	Laboratório de caracterização microestrutural
LCV	Lipase de <i>Chromobacterium viscosum</i>
$\log P$	Logaritmo do coeficiente de partição
LRO	Lipase de <i>Rhizopus oligosporus</i>
MHz	Mega Hertz (10^6 Hertz)
p.e	Ponto de ebulição
pdb	Protein data bank
PEO	Poli(óxido de etileno)
Rf	Fator de retenção
RNA	Ácido ribonucléico
t.a	Temperatura ambiente
t_R	Tempo de retenção
UIBBM	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
V_{max}	Velocidade máxima

RESUMO

Nestes estudos, inicialmente a lipase de *Burkholderia cepacia* (LBC) foi imobilizada em filmes de amido de taro (LBC/taro) e/ou cará (LBC/cará) e utilizada como catalisador na síntese de ésteres de aroma derivados do geraniol (**22**) com acetato de vinila (**4**). Foram avaliados o efeito da massa de LBC imobilizada, reutilização dos sistemas e a influência do tamanho da cadeia alquílica dos ácidos propiônico, butírico, hexanóico, caprílico, cáprico, láurico, palmítico e esteárico na obtenção de alcanosatos de geranoíla.

As conversões em acetato de geranoíla, incluindo a reutilização, foram de 10-87% e de 17-85% com os sistemas LBC/taro e LBC/cará, respectivamente. As conversões em alcanosatos de geranoíla foram dependentes do tempo de reação e tamanho da cadeia alquílica do ácido. Por exemplo, o estearato e o propionato de geranoíla, foram obtidos com conversões de 92,6% (48h) e 14,5% (24h), respectivamente usando o sistema LBC/taro.

Em outro estudo, foram utilizadas as lipases de *C. antarctica* (CALB), *B. cepacia* (LBC), *A. niger* (LAN), *R. oryzae* (LRO), *C. viscosum* (LVC) e os micélios 53 e 115 na forma livre ou imobilizadas em filmes de amido de taro, gengibre ou na blenda gengibre:PEO como catalisadores na resolução do (*R,S*)-1-feniletanol (**11**) e de alguns derivados com o acetato de vinila ou de *iso*-propenila. Foram usados diversos solventes orgânicos (*n*-heptano, *n*-hexano, CH₂Cl₂, éter etílico, acetonitrila e 1,4-dioxano) e misturas de *n*-hexano/glicerol 9:1 v/v ou *n*-hexano/[BMIm][PF₆] 9:1 v/v, como meio reacional.

A conversão ao *R*-(+)-acetato de 1-feniletila (*R*)-(+)-**12** foi dependente da razão molar do acetato de vinila e de *iso*-propenila. Na reação com acetato de vinila as conversões foram de 8,7-22,5% com o sistema LBC/taro e de 7,7-24,1% com LBC/gengibre. Usando o acetato de *iso*-propenila, as conversões foram de 4,1 (24h) e 12,6% (96h) ao utilizar o sistema LBC/gengibre. Com as razões molares de (*R,S*)-**11:4** de 1:1, 1:2 e 1:5, obteve-se $ee_p > 99$ e $E > 200$.

Utilizando as lipases de LRO, LAN, LVC, LBC, CALB e os micélios UEA_53 e UEA_115 na forma livre, as conversões ao éster (*R*)-(+)-**12** foram de 0,2-56,0%, ee_p de 85-99% e E de 39-200. Com as lipases LRO, LAN, LCV e LBC imobilizadas, a maior

conversão foi de 13% (t.a), e a menor de 0,8% (35°C) ambos usando o sistema LBC/gengibre. Porém, obteve-se $ee_p > 99$ e $E > 200$.

Ao utilizar os solventes com $\log P \geq 3,5$, as conversões ao éster (*R*)-(+)-**12** foram de 11,3-11,7% e com solventes com $\log P \leq 1,5$ de 1,3-4,7%. A maior conversão foi obtida em *n*-hexano:glicerol 9:1 v/v, sendo de 23% (t.a.,24 h), ao usar sistema LBC/gengibre como catalisador.

Utilizando a blenda polimérica gengibre:PEO (7:3 m/m), o éster (*R*)-(+)-**12** foi obtido com 21,9% (24h) em *n*-hexano. Este valor aumentou para 40% (72h) ao usar *n*-hexano:glicerol (9:1 v/v). Em todos os estudos o ee_p foi $> 99\%$ e $E > 200$.

Independente da condição experimental, as lipases livres ou imobilizadas em filmes de amido, mostraram grande preferência para a formação do enantiômero (*R*)-(+)-**12**.

Os dados preliminares para a resolução com os derivados do (*R,S*)-1-feniletanol foram promissores. Os acetatos de 1-(4-nitrofenil)etila e de 1-(3,4-dimetilenodioxifenil)etila foram obtidos com conversões de 56,1 e 26,5% (24h), respectivamente em *n*-hexano:glicerol 9:1v/v com o sistema LBC/gengibre:PEO (7:3 m/m).

Concluindo, os resultados obtidos mostraram que os filmes de amido de taro, cará, gengibre ou blendas de gengibre:PEO, podem ser usados como suportes para a imobilização de diferentes lipases. Estes sistemas foram usados, com sucesso, para a síntese de ésteres de aroma e na resolução enzimática de álcoois secundários, em condições suaves de reação.

ABSTRACT

In this study, lipase from *Burkholderia cepacia* (BCL) was firstly immobilized in starch films of taro (BCL/taro) and/or yam (BCL/yam) and these systems were used as catalysts in the synthesis of aroma esters derived from geraniol (**22**) with vinyl acetate (**4**). The influence of immobilized BCL mass, reuse of the systems and the alky chain length of propionic, butyric, hexanoic, caprylic, capric, lauric, palmitic and stearic acids was also evaluated in the formation of geraniol alkanooates.

The degrees of conversion into geraniol acetate, including the reuse, were 10-87% and 17-85% using BCL/taro and BCL/yam systems, respectively. The degrees of conversion into geraniol alkanooates were dependent on the reaction time and alky chain length. For instance, the values for geraniol stearate and propionate were 92.6% (48h) and 14.5% (24h), respectively, using the BCL /taro system.

In another study, lipases from *Candida antarctica* (CALB), *B. cepacia* (BCL), *Aspergillus niger* (ANL), *Rhizopus oryzae* (ROL), *Chromobacterium viscosum* (VCL) and the mycelia UEA_53 and UEA_115 in the free form or immobilized in starch films of taro, ginger or in ginger:PEO blends were used as catalysts in the resolution of (*R,S*)-1-phenylethanol (**11**) and some derivatives, with vinyl or *iso*-propenyl acetate. Various organic solvents (*n*-heptane, *n*-hexane, CH₂Cl₂, ethyl ether, acetonitrile and 1,4-dioxane) and mixtures of *n*-hexane/glycerol 9:1 (v/v) or *n*-hexane/[BMIm][PF₆] 9:1 (v/v), were screened as reaction media.

The conversion into (*R*)-(+)-1-phenylethyl acetate (*R*)-(+)-**12** was dependent on the molar ratio of vinyl or *iso*-propenyl acetate. In the reaction with vinyl acetate the conversion degrees were 8.7-22.5% using the BCL/taro system and 7.7-24.1% using the BCL/ginger system. Using *iso*-propenyl acetate, the conversion degrees were 4.1 (24 h) and 12.6% (96 h) with the BCL/ginger system. Using molar ratios of (*R,S*)-**11:4** of 1:1, 1:2 and 1:5, the values of ee_p and E were > 99% and > 200, respectively.

Using the lipases ROL, ANL, VCL, BCL, CALB and the mycelia UEA_53 and UEA_115 in the free form, the conversion degrees to the (*R*)-(+)-**12** ester were 0.2 - 56.0%, ee_p was 85-99% and E was 39-200. Using the immobilized lipases ROL, ANL, VCL and BCL the highest conversion degree was 13% (r.t)

and the lowest was 0.8% (35°C), both using the BCL/ginger system. However, the ee_p was > 99% and E was > 200.

Using solvents with $\log P \geq 3.5$, the conversion degrees for the (*R*)-(+)-**12** ester were 11.3-11.7%, and using solvents with $\log P \leq 1.5$ they were 1.3-4.7%. The highest conversion degree was obtained using a mixture of *n*-hexane:glycerol 9:1 (v/v), with a value of 23% (r.t., 24 h), with the BCL/ginger system. In these studies values of $ee_p > 99\%$ and $E > 200$ were obtained.

Regardless of the experimental conditions, free or immobilized lipases in starch films showed a pronounced preference for the enantiomer (*R*)-(+)-**12**.

The preliminary data obtained for the resolution of (*R,S*)-1-phenylethanol derivatives were promising. The 1-(4-nitrophenyl)ethyl and 1-(3,4-dimethylenedioxyphenyl)ethyl acetates were obtained in conversion degrees of 56.1 and 26.5% (24h), respectively, in the *n*-hexane:glycerol 9:1 (v/v) and BCL/ginger:PEO (7:3 m/m) systems.

In conclusion, the results reported herein show that the starch films of taro, yam, ginger or ginger:PEO blends can be used as supports for the immobilization of various lipases. These systems were successfully applied in the synthesis of aroma esters and in the resolution of enzymatic secondary alcohols, under mild conditions.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Parciais

A história da utilização de enzimas e biocatálise aplicada na transformação de compostos orgânicos são conhecidas a mais de 100 anos. Assim, as enzimas oriundas de microrganismos foram utilizadas na culinária antiga, panificação, fabricação de cerveja, produção de álcool e queijo. Entretanto, foi somente a partir da segunda metade da década de 80 que o verdadeiro potencial, que estes biocatalisadores representam em síntese orgânica, começou a ser explorado. Durante este período, um grande número de reações catalisadas por enzimas foram desenvolvidas e tornaram-se familiares aos químicos orgânicos. Uma das principais contribuições deste tipo de metodologia biosintética, tem sido na obtenção de compostos enantiomericamente puros ou enriquecidos, geralmente intermediários ou produtos finais de rotas sintéticas estereocontroladas. ^(1; 2)

É amplamente reconhecido que compostos biologicamente ativos usados como medicamentos, não devem ser empregados como racematos. Além disso, cada vez com mais intensidade, há uma absoluta necessidade de se desenvolver reagentes e processos ambientalmente compatíveis, uma das razões pelas quais os biocatalisadores tiveram este notável desenvolvimento nos últimos anos. ⁽³⁾

A partir da década 80 tem sido observado um interesse crescente no desenvolvimento de técnicas de imobilização de enzimas e/ou microrganismos, visando minimizar os efeitos causados pelo seu uso em ambientes adversos, tais como solventes orgânicos, variações no pH e/ou altas temperaturas. ^(4; 5)

A imobilização do biocatalisador em um suporte, sem prejuízo de sua atividade por um período razoável de tempo, pode assegurar sua repetida utilização ou mesmo o uso em reatores contínuos, resultando em economia nos processos industriais. Atualmente, os bioplásticos a base de amido vem ganhando destaque, pois são oriundos de fontes renováveis, biodegradáveis e de baixo custo. ^(5; 6)

1.2 Enzimas

As enzimas, com exceção de um pequeno grupo de moléculas de ácido ribonucléico (RNA) com propriedades catalíticas, são proteínas que atuam como catalisadores e controladores das velocidades de reações biológicas com grande eficiência. ⁽⁷⁾

As enzimas são constituídas por uma série de compostos orgânicos simples, α -aminoácidos, que se unem por ligações peptídicas. A sequência exata de aminoácidos da cadeia protéica é denominada estrutura primária. O arranjo espacial dessa sequência é chamado de estrutura secundária e o tridimensional é conhecido como estrutura terciária.

Algumas proteínas contêm duas ou mais unidades de cadeias polipeptídicas, ou subunidades, que podem ser idênticas ou diferentes. O arranjo destas subunidades protéicas em três complexos tridimensionais constitui a estrutura quaternária. ^(7; 8; 9)

A **Figura 1** mostra a representação destas estruturas para a insulina. ⁽¹⁰⁾

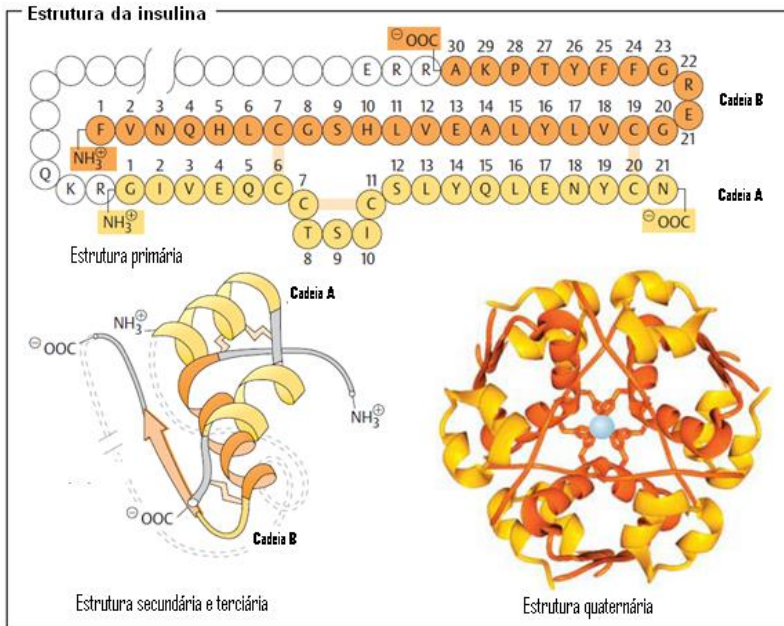


Figura 1. Representação esquemática das estruturas primária, secundária, terciária e quaternária da insulina.

As enzimas possuem um sítio ativo, o qual constitui somente uma pequena porção do volume total e que está usualmente próximo ou na superfície, de forma a estar acessível às moléculas de substratos. O sítio ativo contém aminoácidos cujas cadeias laterais formam uma superfície tridimensional complementar ao substrato. Para algumas enzimas, estudos de difração de Raios-X têm revelado na enzima uma pequena área ou fissura claramente definida, na qual o substrato, ou mesmo parte dele, pode se fixar. ⁽¹¹⁾

As enzimas são catalisadores versáteis, existindo para cada tipo de reação orgânica um processo enzimático equivalente.

A função de um catalisador é diminuir a barreira de energia de ativação entre os reagentes e produtos. Esta habilidade ocorre devido à capacidade de aproximar os substratos em uma orientação tal que favorece a formação do complexo enzima-substrato (ES), para posteriormente formar os produtos. ^(9; 10)

Figura 2

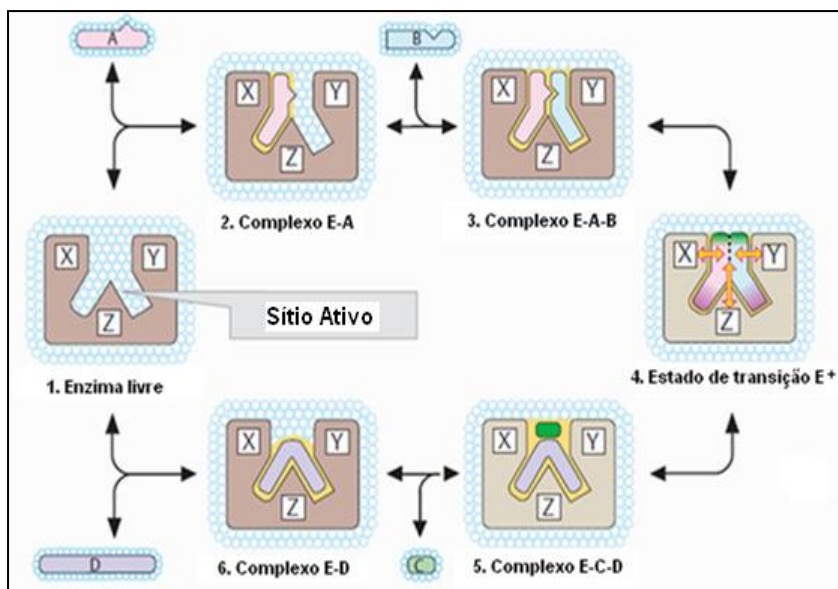


Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de ação enzimática. ⁽¹⁰⁾

Diferente de outras proteínas, as enzimas possuem atividade catalítica. Isto significa que na sua presença, e sem serem

consumidas durante o processo, elas conseguem acelerar os processos químicos que de outra maneira ocorreriam muito lentamente ou não totalmente. Ao contrário de catalisadores inorgânicos, como ácidos, bases, metais e óxidos metálicos as enzimas são muito específicas. Em outras palavras, cada enzima somente poderá hidrolisar ou sintetizar um composto em particular. Por apresentarem tais propriedades, elas têm sido amplamente utilizadas em síntese orgânica. ^(11; 12; 13)

Algumas das vantagens de utilização das enzimas são:

- ✓ **Aumentam a velocidade das reações:** as velocidades de reações catalisadas por enzimas podem ser na ordem de 10^6 a 10^{20} vezes mais rápidas que as correspondentes não catalisadas.
- ✓ **Atuam em condições suaves:** as reações ocorrem em condições suaves de temperatura (20-50 °C), sob pressão atmosférica e em um meio de pH e concentração salina praticamente constante. Estas condições minimizam problemas de isomerização, racemização e rearranjos que frequentemente ocorrem na metodologia tradicional.
- ✓ **Apresentam diversos tipos de seletividade, tais como:**
 - **Quimiosseletividade:** as enzimas podem atuar em somente um tipo de grupo funcional mesmo na presença de outros grupos reativos na mesma molécula.
 - **Regio e diastereosseletividade:** as enzimas podem distinguir entre grupos funcionais somente com a mudança do meio reacional.
 - **Enantiosseletividade:** as enzimas são catalisadores quirais e suas especificidades podem ser exploradas para sínteses seletivas e assimétricas.
- ✓ **Apresentam alto grau de especificidade:** as reações raramente formam produtos laterais ou secundários.

- ✓ **Agem como reguladores de processos:** a atividade catalítica de muitas enzimas varia dependendo da concentração de outras substâncias que não são seus substratos.
- ✓ **Catalisam um grande número de reações:** aceleram a velocidade das reações sem alterar o equilíbrio termodinâmico, e podem catalisar um grande número de reações.

Porém, o uso destes biocatalisadores em síntese orgânica pode apresentar algumas desvantagens:

- ✓ São encontradas na natureza somente em uma forma enantiomérica, a L;
- ✓ Requerem o controle dos parâmetros reacionais tais como de temperatura e pH;
- ✓ Apresentam maior atividade catalítica em água;
- ✓ São propensas a sofrerem inibição por agentes químicos e físicos, ex: altas temperaturas.

Recentemente, tais desvantagens têm sido amenizadas pelo aperfeiçoamento e desenvolvimento de diversas técnicas para as reações biocatalisadas. Quando o processo não for satisfatoriamente seletivo, modificações simples nas condições experimentais podem influenciar tanto a estereoquímica quanto a enantiosseletividade.

As modificações mais comuns envolvem o uso de solventes orgânicos, adição de inibidores, utilização de enzimas mais resistentes (extremoenzimas) e técnicas de imobilização. ^(4; 5; 11; 14; 15)

1.2.1 Classificação das enzimas

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM) classifica as enzimas em seis grupos, e cada uma delas em subgrupos de acordo com o tipo de reações que catalisam. ⁽⁹⁾

Tabela 1

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

sub-subclasse e **D** é o número individual da enzima em sua sub-subclasse.

Tabela 1. Classificação das enzimas de acordo com a UIBBM.

N°	Classe	Rreação catalisada	Subclasse
1	oxidoredu-tases	transferência de elétrons ou remoção de hidrogênio	hidrogenases, oxidases, peroxidases
2	transferases	reações de transferência de grupos	transaldolases, transcetolases
3	hidrolases	reações de hidrólise	esterases, lipases , peptidases, fosfatases
4	liases	reações de adição de grupos a dupla ligação ou formação de duplas ligações por remoção de grupos.	descarboxilases, fosfatases
5	isomerases	transferência de grupos dentro da molécula para produzir isômeros.	racema-ses, epimerases oxiredu-tases, mu-tase
6	ligases	formação e clivagem de ligações C-C, C-S, C-O, C-N e ésteres de fosfato.	sintetases, carboxi-lases

As enzimas hidrolíticas são os biocatalisadores mais comumente empregados em síntese orgânica. Nesta classe estão incluídas as amidases, proteases, nitrilases, fosfatases, epoxidases, sendo que as lipases são de grande e particular interesse.

(11)

Neste trabalho as lipases serão utilizadas como catalisadores na síntese de ésteres de aroma e na resolução de álcoois racêmicos.

1.3 Lipases

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases - E.C. 3.1.1.3) são enzimas da família das hidrolases presentes em diversos organismos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias. Elas podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de microorganismos tais como os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum* sp, *Achromobacter* sp e *Staphylococcus* sp. Destes microorganismos, as lipases *Aspergillus* sp, *Mucor* sp, *Rhizopus* e *Candida* sp estão comercialmente disponíveis. Do ponto de vista econômico e industrial, as lipases de microrganismos são preferíveis às de fontes animais e plantas devido ao alto custo do seu isolamento. ^(15; 16; 17)

Em seu ambiente natural, estas enzimas possuem a função de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis aos correspondentes ácidos carboxílicos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e gliceróis. ^(15; 16)

Além das funções metabólicas, as lipases possuem um papel importante em biotecnologia, principalmente na indústria de óleo e de alimentos, e na síntese de fármacos enantiomericamente enriquecidos. ^(18; 19; 20)

As vantagens de trabalhar com lipases são principalmente o baixo custo e a alta versatilidade catalítica destas enzimas. Além disso, não requerem o uso de cofatores, atuam em faixa de pH bastante ampla, são estereosseletivas e enantiosseletivas. ^(2; 11)

Uma maior compreensão sobre os mecanismos de ação das lipases foi obtida somente a partir de 1900, quando as duas primeiras estruturas foram resolvidas por cristalografia de Raios-X. ⁽²¹⁾ Todas as lipases cujas estruturas têm sido elucidadas fazem parte da família α, β -hidrolases pregueada com uma arquitetura comum composta de uma sequência de fitas α -hélice e β -pregueada. Estas enzimas hidrolisam as ligações de ésteres e/ou amidas através de uma tríade catalítica composta de um resíduo de serina nucleofílico ativado por ligações de hidrogênio, em con-

junto com histidina, aspartato ou glutamato (Ser-His-Asp/Glu).^(9; 11; 21)

Na **Figura 3** pode-se observar a representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de *Geobacillus thermocatenulatus*, com a ampliação do sítio ativo formado pelos resíduos de aminoácidos de histidina (His 359), serina (Ser 114) e aspartato (Asp 318).^(22; 23)

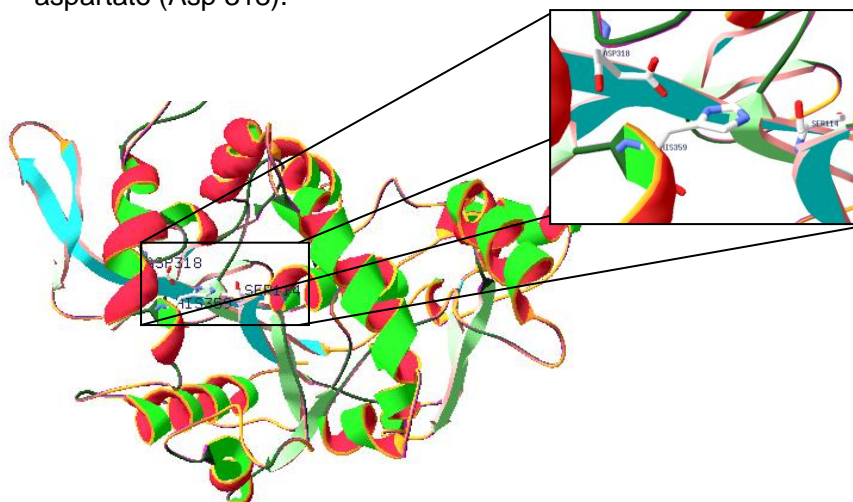


Figura 3. Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipases de *Geobacillus thermocatenulatus*.

Todos os membros da família de estruturas α,β -hidrolases possuem um mecanismo comum de hidrólise de ésteres, que consiste em cinco etapas:

- 1- Ligação ao substrato éster;
- 2- Formação do primeiro intermediário tetraédrico por ataque nucleofílico da serina catalítica, com oxianion estabilizado por duas ou três ligações de hidrogênio, conhecida como "cavidade oxianion";
- 3- Quebra da ligação éster e saída da porção alcoólica;
- 4- Formação e estabilização do segundo intermediário tetraédrico;
- 5- Liberação do produto (ácido) e regeneração do sítio catalítico.

Essas etapas estão representadas na **Figura 4.** ⁽²⁴⁾

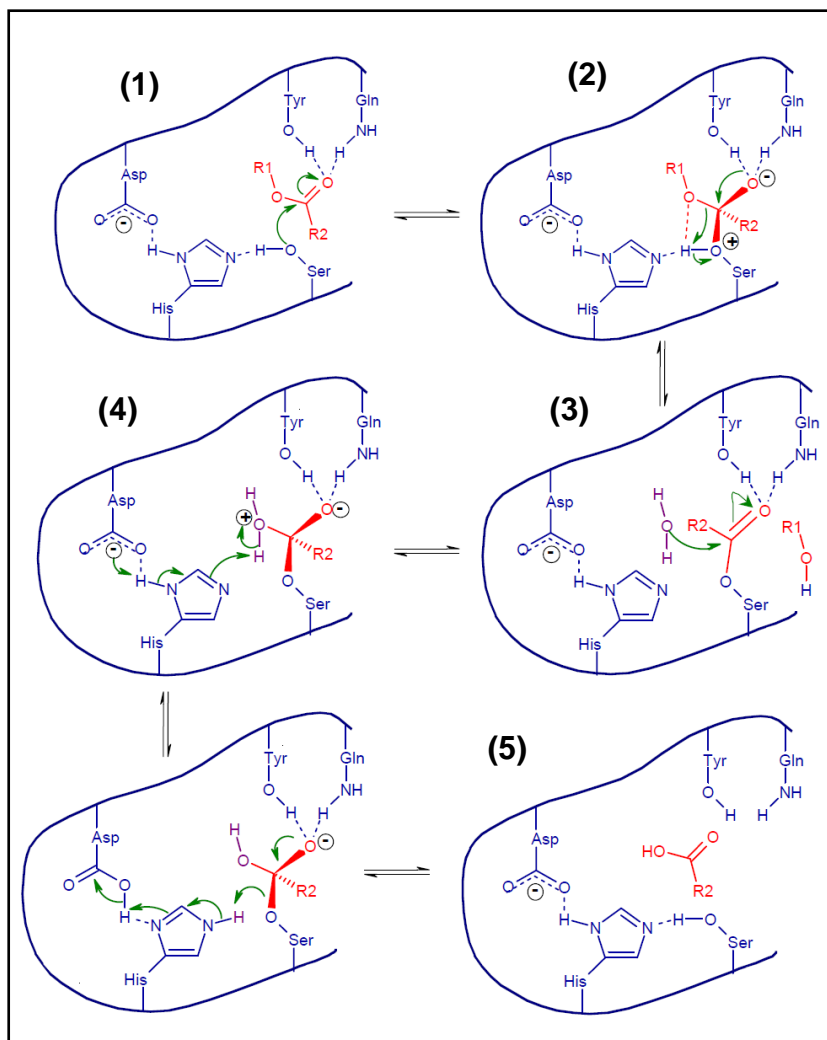


Figura 4. Mecanismo proposto para hidrólise enzimática de um éster. ⁽²⁴⁾

Em solventes orgânicos, as lipases catalisam a transferência de grupos acilas de compostos doadores para uma ampla variedade de compostos aceptores diferentes da água. Depen-

dendo do tipo de doador acila e do aceptor, as reações catalisadas por lipases incluem esterificação, tioesterificação, amidação, transesterificação, síntese de peptídeos e formação de perácidos.^(25; 26)

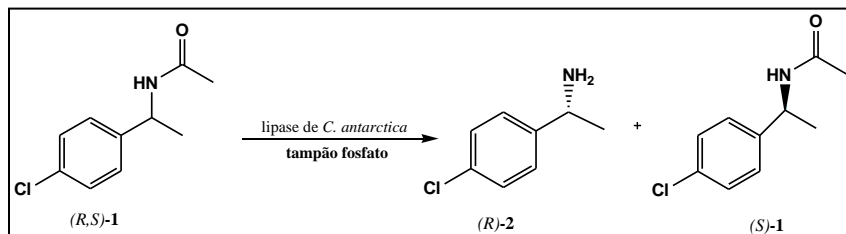
Estes últimos podem ser utilizados na síntese de epóxidos a partir de compostos insaturados.⁽²⁷⁾

O emprego crescente de lipases na indústria justifica-se pela sua especificidade e eficiência com que catalisam as diferentes reações.^(2; 16)

Hasan e *col.* revisaram os trabalhos que reportam a aplicação industrial de várias lipases microbianas em detergentes, alimentos, indústria de sabor e aromas, síntese de fármacos e cosméticos, ésteres e outros derivados de aminoácidos, fabricação de produtos para química fina e agroquímicos.⁽²⁶⁾

As lipases também têm sido usadas em biossensores, biorremediação e em tratamentos de efluentes.^(26; 28)

O **Esquema 1** mostra a hidrólise da (*R,S*)-acetamida (**1**) usada pela Bayer A.G para a obtenção do furoato de mometasona (Topinon), que é um creme usado para aliviar afecções da pele de pessoas sensíveis à corticóides.⁽¹⁹⁾



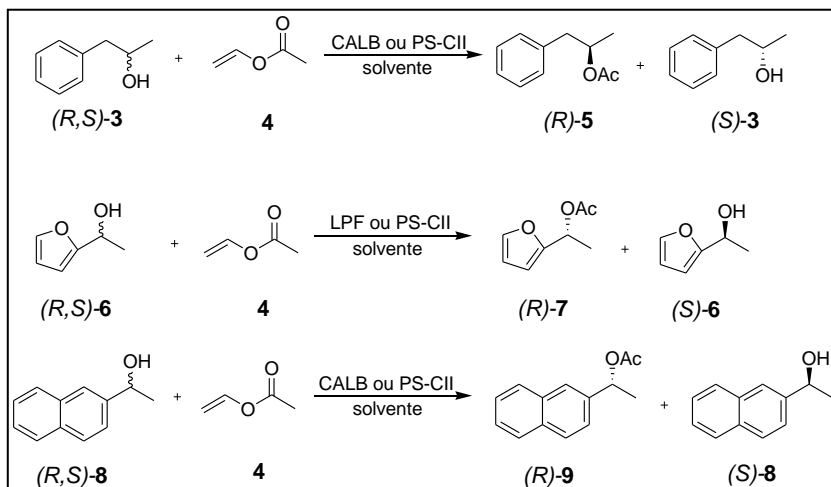
Esquema 1. Hidrólise enantiosseletiva da (*R,S*)-1.

A seguir serão mostradas mais detalhadamente algumas aplicações de lipases, em especial na resolução enantiosseletiva de álcoois racêmicos e de ésteres de aroma.

Ball e *col.* investigaram o efeito dos solventes *n*-hexano, tolueno, clorofórmio, éter *t*-butil metílico (MTBE), acetato de vinila e os hidrofluorcarbonos (C₃HF₇) **R-227ea** e (C₂H₂F₄) **R-134a** na resolução do (*R,S*)-1-fenil-2-propanol (**3**), (*R,S*)-1-(2-furanil) etanol (**6**) e (*R,S*)-1-(1-naftil) etanol (**8**) com acetato de vinila (**4**) utilizando as lipases comerciais *Candida antarctica* (Novozyme

435 – CALB), *Pseudomonas cepacia* (Amano PS-CII) e *Pseudomonas fluorescens* (LPF).⁽²⁹⁾ **Esquema 2**

Utilizando a lipase de *C. antarctica* as maiores conversões foram de 34% para (*R*)-**5** (*ee_p* 97%) utilizando o solvente **R134a**, e de 55% para (*R*)-**9** (*ee_p* 82%) em *n*-hexano, em 24 h de reação.



Esquema 2. Transesterificação do (*R,S*)-**3**, **6** e **8** com acetato de vinila catalisada pelas lipases CALB, PS-CII e LPF em diferentes solventes.

Quando utilizou-se a lipase de *P. cepacia* as maiores conversões foram de 25 (*ee_p* 99%) e 61% (*ee_p* 80%), respectivamente para o (*R*)-**5** e (*R*)-**7** em **R227ea**, e de 55% (*ee_p* 82%) para (*R*)-**9** utilizando tanto *n*-hexano como tolueno, em 24 h.

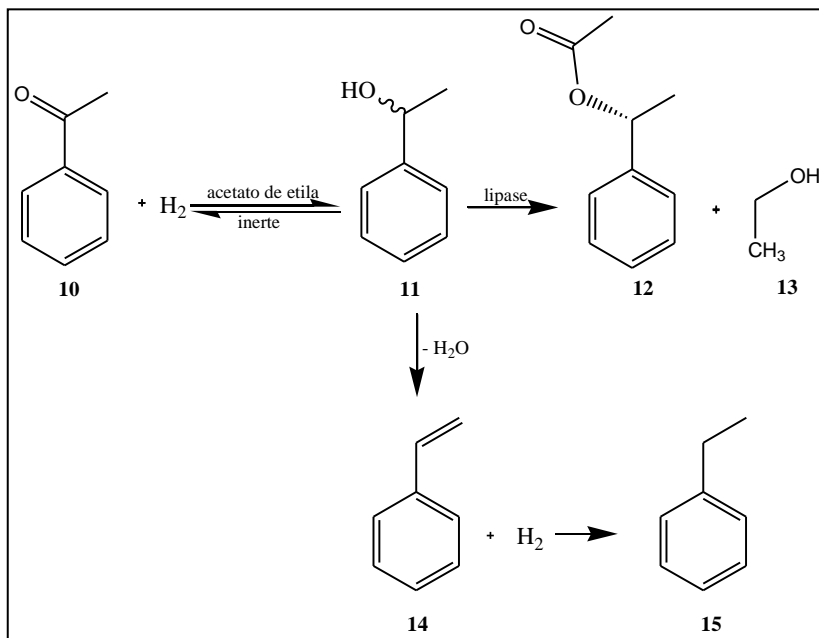
Com a lipase de *P. fluorescens* as maiores conversões em (*R*)-**7** foram de 17 (*ee_p* 96%) e 10% (*ee_p* 95%), respectivamente ao utilizar os solventes MTBE e **R134a**, em 24 h de reação.

Mäki-Arvela e col. Propuseram, em uma única etapa, a síntese do acetato de (*R*)-1-feniletila a partir da redução da acetofenona, utilizando sistema heterogêneo.⁽²⁵⁾ **Esquema 3**

Foram testados cinco catalisadores na síntese do (*R*)-**12** sendo eles os Pd/MgO, Pd/ZrO₂, Pd/Al₂O₃ (**I**) (comercial), Pd/Al₂O₃ (**II**) (não comercial) e Pd/C, juntamente com a lipase de *C. antarctica*.

Os resultados mostraram que o catalisador mais promissor para a etapa de hidrogenação foi Pd/Al₂O₃ (**II**), que em combina-

ção com a lipase de *C. antarctica* resultou em conversão máxima de 22% para o produto (*R*)-12.



Esquema 3. Síntese do acetato de (*R*)-12 a partir da redução da acetofenona 10.

Como já citado anteriormente outra aplicação das lipases encontra-se na síntese de aromas e fragrâncias amplamente empregados na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. Destacam-se os ésteres de aromas derivados de compostos terpenóides, tais como os de citronelol e geraniol. ^(30; 31)

1.4 Terpenos

Os compostos terpenóides representam a segunda classe com maior número de constituintes ativos, e são produzidos por uma variedade de plantas, animais e microorganismos. Os terpenóides, também conhecidos como isoprenóides, são definidos como estruturas moleculares contendo esqueletos de carbono formado de unidades de isopreno (2-metilbuta-1,3-dieno) e inclu-

em produtos de degradação de terpenóides em átomos de carbono que podem ter sido perdidas através de processos químicos e bioquímicos. ^(32; 33)

Estes constituintes possuem uma fórmula molecular típica $C_{10}H_{15}$, e são assim denominados devido sua origem na espécie *Pistacia terebinthus*. São classificados de acordo com as unidades de cinco carbonos, e com as várias formas de ciclicização. Estão subdivididos em monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterpenos (C25), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40). ^(33; 34)

Na **Figura 5** tem-se a estrutura de alguns compostos monoterpênicos.

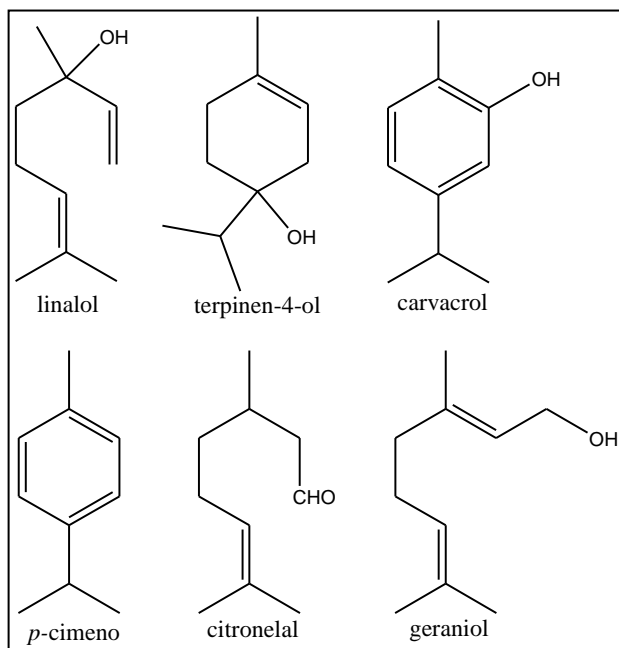


Figura 5. Exemplos de monoterpenos. ⁽³³⁾

Dentre os compostos monoterpênicos destaca-se o geraniol, que pode ser esterificado formando ésteres que são muito utilizados em perfumes e flavorizantes. ⁽³¹⁾

Os ésteres de aromas são ingredientes importantes para a obtenção de vários produtos na indústria de alimentos, e são encontrados em muitos óleos essenciais. São geralmente usados como compostos de sabor e fragrâncias em alimentos e bebidas, gerando aromas de frutas.

Embora estes produtos possam ser obtidos por um método químico que utiliza catalisadores mais agressivos, desenvolvimentos recentes nas últimas duas décadas mostram que o método de esterificação enzimática utilizando biocatalisadores e principalmente as lipases mostra-se cada vez mais propulsor na síntese de ésteres de aroma.^(31; 35)

A **Figura 6** mostra alguns exemplos de ésteres de aroma que vem sendo obtidos pelo método da catálise enzimática, com lipases.^(31; 36)



Figura 6. Exemplo de ésteres de aromas obtidos pelo método enzimático.

Ozyilmas e col. produziram três ésteres de aroma industrialmente importantes, tais como o acetato isoamila (sabor banana), valerato de etila (aroma de maçã verde) e acetato de butila (sabor abacaxi) utilizando a lipase de *Candida rugosa* (LCR) e a pancreática suína (LPP) imobilizadas em alginato de cálcio (Ca-Alg). Os ésteres foram obtidos com altos rendimentos utilizando as lipases LCR e LPP em *n*-hexano, a 40 e 50 °C. Além disso, a conversão em éster foi dependente da concentração do substrato e da enzima. O maior rendimento foi obtido para o acetato de isoamila utilizando a LPP imobilizada em Ca-Alg.⁽³⁶⁾

Barros e col. esterificaram os ácidos acético, butírico, valérico, capróico, octanóico, decanóico e oleíco com etanol, na presença da lipase de *Fusarium solani pisi* cutinase, em *iso*-octano. Ao utilizar a cutinase obteve-se alta velocidade inicial de esterificação em *iso*-octano, sendo de 1,15 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ para o buta-

noato de etila (C4) e $1,06 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ para o valerato de etila (C5). Após 6 h de reação, obtiveram-se os valerato, butanoato e caproato de etila com 96, 84 e 62% de rendimentos, respectivamente. O rendimento do oleato de etila (C18) foi de 43%, após 8 h de reação.

Os resultados mostraram que a cutinase apresentou maior afinidade para ácidos carboxílicos de cadeias curtas (C4-C6) na síntese de ésteres de aroma, em *iso*-octano.⁽³⁰⁾

Muitas enzimas são cataliticamente ativas em ambientes hidrofóbicos, com eficiência similar àquela encontrada em solução aquosa. Porém, estes catalisadores estão sujeitos à inativação em meio orgânico, por fatores químicos, físicos ou biológicos. Visando protegê-los das interações com o solvente, têm sido desenvolvidas técnicas de imobilização.^(4; 5; 11)

1.5 Imobilização das enzimas

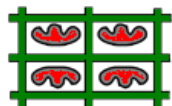
O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos. A imobilização consiste no confinamento de enzimas ou microorganismos em uma região restrita (suporte ou biorreator), conferindo aos mesmos uma maior resistência à temperatura, solventes de baixa polaridade, pH, etc. As interações entre os biocatalisadores e os suportes utilizados são muito importantes, pois estas podem influenciar diretamente na estabilidade e nos efeitos cinéticos da catálise.^(4; 11; 37)

A imobilização pode ocorrer através de diferentes métodos, tais como a adsorção em materiais insolúveis, confinamento em géis poliméricos, encapsulamento em membranas, ligação cruzada com reagentes bifuncional ou multifuncional e ligação a um suporte solúvel.^(5; 11; 37; 38)

Métodos de Imobilização de Enzimas

Enzimas Encapsuladas

Em matriz polimérica



Organogéis de micro emulsão óleo-água como gelatina, agarose ou k-carragenanas, gel de agar, PEO, caseinato de sódio, amido.

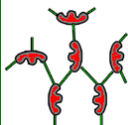
Em microcápsulas



Quitosana com alginato de cálcio e gliceraldeído, alginatos ou carragenanas com cloreto de cálcio ou potássio, nanoesferas de sílica.

Enzimas Ligadas

Ligação Cruzada



Quitosana (QTS), PVA ou QTS/PVA com glutaraldeído.

Ligação Covalente



glutaraldéido.

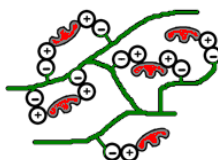
Sílica, sílica porosa, celulose, algodão poli(etilenoglicol) (PEG), resina metacrílico,

Adsorção Física



Álcool polivinílico (PVA), galactomana, xantana, quitosana, poli-óxido de etileno (PEO), poli(ácido acrílico) (Carbopol), nanopartículas.

Adsorção Iônica



Resina de trocas iônicas (DEAE-sefadex, CM-celulose, Dowex 66, Duolite 568N).

Figura 7. Métodos de imobilização de enzimas. (adaptada das refs. ^(11; 41))

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

O procedimento de adsorção de uma proteína é simples, e é um dos métodos mais utilizados. A enzima é imobilizada em um suporte sólido por ligação de baixa energia, tais como interação de van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio ou iônicas. ⁽³⁹⁾

Boscolo e col. relataram a caracterização preliminar de um sistema de adsorção para a lipase de *P. fluorescens* em uma ciclodextrina recém-sintetizada em nanoesponja de carbonato (CD-NS-1:4). Os parâmetros avaliados foram a atividade e estabilidade estrutural da lipase adsorvida sobre este novo suporte, o efeito da temperatura, pH e solventes orgânicos (metanol) na estrutura e função da enzima, que foram comparados com os da forma livre em solução. ⁽⁴⁰⁾

Os estudos mostraram que as interações não-covalente da lipase *P. fluorescens* com o CD-NS-1:4 resultaram na estabilização estrutural e funcional da enzima, pois a mesma manteve-se ativa após 66 dias de incubação a $t \sim 18^\circ\text{C}$. Ao contrário da enzima solubilizada, a lipase adsorvida foi ativa em $t > 40^\circ\text{C}$, em pH 5, após 24 h de incubação com 70% (v/v metanol), (atividade residual de 13%). ⁽⁴⁰⁾

- ✓ **Ligação cruzada:** as enzimas estão ligadas umas as outras ou a proteínas inativas (gelatina, albumina), formando uma estrutura tridimensional complexa. Pode ser obtida por métodos físicos ou químicos. Quando obtidas por métodos químicos são resultantes das ligações covalentes entre as enzimas e são favorecidas pelo uso de agentes bi- ou multifuncionais. ^(41; 42)

Gupta e col. utilizaram a técnica de imobilização cruzada (CLEAS – *cross-linked enzyme aggregates*) para imobilizar a lipase de *Thermomyces lanuginosa*. Foi observada uma maior eficiência da ligação cruzada quando o sulfato de amônio foi utilizado como precipitantes, juntamente com um duplo aumento na atividade na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS). As microfotografias de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos CLEAs formados

revelaram que os agregados são maiores em tamanho em relação à lipase livre devido à ligação cruzada da enzima com o glutraldeído. Este sistema manteve mais de 90% da atividade residual mesmo após 10 ciclos de utilização, na hidrólise do azeite de oliva. ⁽⁴³⁾

- ✓ **Encapsulamento:** este método está dividido em imobilização em matriz e em microcápsula. A imobilização da enzima por inclusão ou micro encapsulamento consiste em “prender” uma proteína em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula. Este é um processo similar ao de inclusão, embora neste caso a enzima seja envolvida totalmente pelo suporte. ^(5; 41)

A vantagem de utilizar esta técnica é que a enzima interage quimicamente com o polímero, evitando assim a desnaturação. Entretanto, a transferência de massa através da membrana pode ser um problema. A velocidade de difusão dos substratos e produtos através da membrana é um fator limitante, e geralmente concentrações altas dos substratos são necessárias a fim de limitar esta influência. As enzimas encapsuladas apresentam melhor atividade com substratos pequenos do que com grandes, por estes não serem capazes de vencer a barreira imposta pela membrana e se aproximar do sítio ativo do biocatalisador. ^(11; 44; 45)

Jegannathan e col. estudaram a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* encapsulada em K-carragenana pelo método de co-extrusão para formação de uma cápsula do núcleo líquido. O diâmetro da lipase encapsulada encontrado foi da ordem de 1,3-1,8 mm e com uma espessura de membrana média de 200 μm . A eficiência do encapsulamento foi de 42,6% com 97% de umidade. Após o encapsulamento, a lipase permaneceu estável entre pH 6 e 9 e até 50 °C, e em diferentes solventes orgânicos tais como o metanol, etanol, *iso*-propanol, *n*-hexano e *n*-heptano. Os parâmetros K_M e V_{max} para a lipase livre foram de 0,22 mM e 0,06 $\mu\text{mol}/\text{min}$ e de 0,25 mM e 0,05 $\mu\text{mol}/\text{min}$ para lipase encapsulada, respectivamente. ⁽⁴⁵⁾

A escolha da matriz é muito importante, para uma boa atuação do sistema. As características desejáveis para um bom suporte são área superficial grande, boa permeabilidade, características hidrofílicas, estabilidade química, mecânica e térmica,

alta rigidez, forma e tamanhos adequados, resistência ao ataque de microorganismos e poder ser reutilizado. ^(4; 5; 37; 39)

A utilização de filmes produzidos a partir de proteínas ou polissacarídeos tem contribuído para que haja um aumento da biocompatibilidade entre suporte e o biocatalisador, formando um micro ambiente favorável, e beneficiando desta forma a atividade enzimática. Dentre as vantagens de utilizar estes biofilmes como suportes para biocatalisadores em síntese orgânica, destacam-se suas boas propriedades mecânicas, resistência a solvente de baixa polaridade, hidrofiliçidade, atoxicidade, e o fato de serem biodegradáveis e de baixo custo. A escolha do suporte é baseada em função das propriedades desejadas e do biopolímero selecionado. ^(38; 46; 47)

Os filmes de polissacarídeos ou de proteínas podem ser produzidos a partir do glúten de trigo, zeína do milho, proteína de soja, colágeno, ovalbumina, proteínas do soro do leite, caseína e caseinatos. Por serem biodegradáveis e solúveis em água, estes suportes tornam os processos econômicos e ambientalmente favoráveis, preenchendo desta forma os requisitos necessários para o desenvolvimento de uma “química limpa”. ^(4; 47)

1.6 Amido

O amido é a principal reserva de nutrientes das plantas superiores e fornece de 70 a 80% das calorias consumidas pelo homem. É uma matéria-prima abundante, renovável, biodegradável e não tóxico. Pode ser encontrado em raízes e tubérculos, como a batata e a mandioca e em cereais, como o milho, o arroz e o trigo. Os processos industriais permitem que o amido seja extraído com alto grau de pureza. ^(48; 49)

O amido é constituído por uma mistura de dois polissacarídeos, amilose e amilopectina, em proporções variadas dependendo da procedência da espécie vegetal. Em geral, os amidos com baixa concentração de amilose contêm 15%, normal 20-35%, e alta cerca de 40%. ^(13; 48)

A amilose é um polissacarídeo linear, formado por unidades de D-glucopiranoses unidas entre si por ligações glicosídicas α -(1 \rightarrow 4) (99%) e α -(1 \rightarrow 6) (1%). **Figura 8**

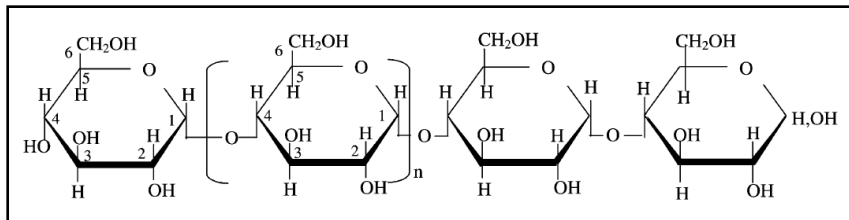


Figura 8. Estrutura da amilose.

A amilopectina constitui a fração altamente ramificada do amido, é formada por várias cadeias de α -D-glucopiranoses unidas em α -(1 \rightarrow 4) (95%) e α -(1 \rightarrow 6) (5%).^(48; 50) **Figura 9**

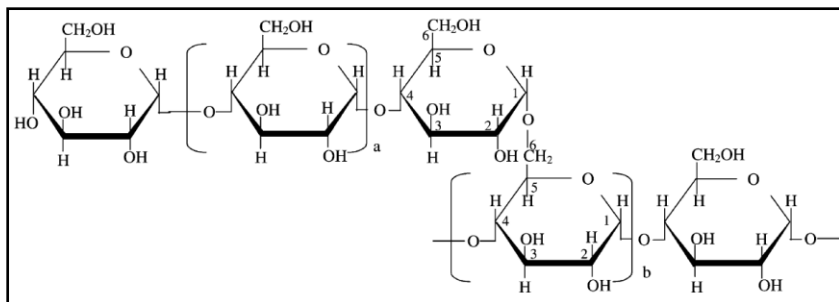


Figura 9. Estrutura da amilopectina.

A observação microscópica de um grão de amido pode revelar a presença de um ponto ou ranhura simples ou cruzada, central ou excêntrica, formações estas denominadas de hilos. Ao redor dos hilos pode-se observar ou não a presença de zonas claras ou escuras, as quais são denominadas lamelas, estrias ou capas. São características da planta de origem, e são importantes na identificação de amidos e féculas; principalmente com relação a forma, a estrutura, o tipo de hilo e o estado de agregação.^(48; 49)

O reconhecimento da origem botânica do amido, através de técnicas microscópicas é importante, pois possibilita a descoberta de fraudes em amidos, ocasionadas por misturas indevidas de produtos amiláceos de diferentes fontes botânicas.⁽⁴⁹⁾

O amido adquire cor azul-arroxeadada característica, quando tratado com solução de iodo. Este forma um complexo com a amilose, originando compostos de inclusão nos quais a cor varia do azul ao arroxeadado, de acordo com o tamanho da cadeia polisacarídica. ^(13; 48) **Figura 10**

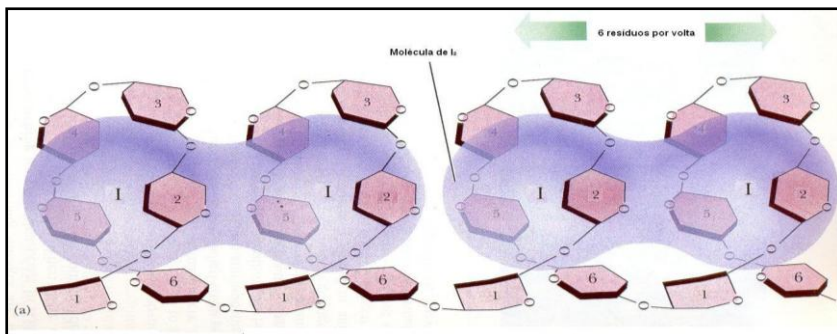


Figura 10. Complexo formado do iodo com a amilose.

O uso do amido oriundo de fontes naturais no Brasil possui diversas aplicações. Tradicionalmente é empregado na indústria alimentícia como ingrediente, sendo utilizado ao mesmo tempo com valor calórico e melhorador de propriedades funcionais em sistemas alimentícios. ⁽⁴⁹⁾

O amido também pode ser utilizado na indústria papelreira como em prensas de colagem, colas, produtos de acabamento, produção e tratamento de papel, na indústria química, em resinas, tintas e plásticos, agroquímica, metalúrgica, mineração, construção, cosmética, farmacêutica, têxtil, entre outras. ^(6; 49) Porém, atualmente um dos principais usos vem sendo para a produção de bioplásticos. Estes podem ser produzidos com amidos nativos ou com pequenas modificações, isolados ou em conjunto com moléculas naturais ou sintéticas. ^(6; 47; 49)

Os filmes a base de amido existentes no mercado são compostos principalmente de amido complexado com poliésteres termoplásticos, tais como as policaprolactonas (PCL) para formar produtos biodegradáveis e compostáveis. Estes filmes vêm sendo empregados em sacos para reciclagem de lixo orgânico, embalagens de produtos de consumo e alimentares, sacos de compostagem, em materiais de higiene, e em artigos funerários. ⁽⁶⁾

Neste trabalho foi utilizado o amido proveniente do taro (*Colocasia esculenta*), cará (*Dioscorea* spp.) e gengibre (*Zingiber officinale*), na preparação de filmes a serem utilizados como suportes para imobilização de diferentes lipases. Estes suportes foram empregados em reações de esterificação, transesterificação e na resolução de álcoois racêmicos derivados do 1-feniletanol.

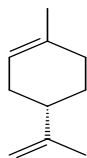
1.7 Estereosseletividade das enzimas

A quiralidade na química orgânica começou em 1815 quando o físico francês Jean Baptiste Biot descobriu que certas substâncias foram hábeis para desviar o plano da luz polarizada, um fenômeno chamado atividade ótica. Parte do enigma foi resolvido quando Louis Pasteur separou os cristais de um racemato de um sal de ácido tartárico e reconheceu que as imagens não sobreponíveis desviavam do plano a luz polarizada em direções opostas.⁽⁵¹⁾

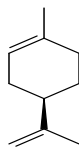
As moléculas que não podem sobrepor-se as respectivas imagens em um espelho plano são chamadas quirais. A maioria das moléculas presentes na estrutura dos organismos vivos são quirais, tais como o ácido desoxiribonucléico (DNA), enzimas, hormônios e anticorpos. Por esta razão, observa-se a relevância da quiralidade em organismos vivos. Quiralidade é a condição necessária e suficiente para a existência de enantiômeros. Estes possuem propriedades químicas e físicas (ponto de ebulição, fusão, solubilidade) semelhantes, porém o sentido da rotação do plano da luz polarizada é o contrário. A mistura formada por quantidades equimolares dos enantiômeros é chamada de mistura racêmica ou racemato.^(51; 52)

Os enantiômeros podem apresentar atividade biológica completamente diferente, pois interagem de maneira distinta com outros sistemas quirais. Por exemplo, o (*R*)-limoneno possui aroma de laranja e seu enantiômero (*S*)-limoneno têm aroma de limão. A distinção no odor ocorre porque os receptores também são constituídos de moléculas quirais e reconhecem a diferença nos enantiômeros.^(52; 53)

Figura 11



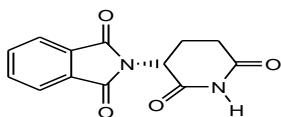
(S)-aroma de limão



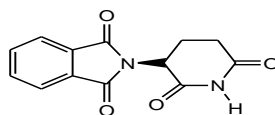
(R)-aroma de laranja

Figura 11. Representação das estruturas (S) e (R) do limoneno.

Nos fármacos quirais, em geral, somente um dos enantiômeros é o responsável pela atividade de interesse e em certos casos o outro enantiômero pode ser prejudicial ou inativo. O exemplo mais expressivo que marcou a história da química biológica foi à tragédia da talidomida, a qual era prescrita na forma racêmica. O enantiômero *R* era efetivo contra náusea matutina de mulheres grávidas, enquanto que o *S* teve efeitos devastadores que causaram a má formação em muitos fetos. Esta teoria está sendo questionada, particularmente, porque os dois enantiômeros da talidomida podem ser facilmente interconvertidos no organismo. ^(53; 54) **Figura 12**



(R)- efeito sedativo



(S)- teratogênico

Figura 12. Representação das estruturas (R) e (S) da talidomida.

Os compostos enantiomericamente puros são de importância crescente na indústria farmacêutica, de alimentos, agroquímica, sabores e de fragrâncias. ^(2; 15; 19; 26)

A resolução de racematos ainda é a metodologia mais importante para a síntese industrial de produtos enantiopuros. Os métodos para resolução incluem a cinética química ou enzimática, clássica por cristalização preferencial ou separação de diastereoisômeros. ^(52; 53; 54; 55)

1.8 Resolução enzimática

Quando um substrato racêmico é submetido a uma reação enzimática, este sofre discriminação quiral entre os enantiômeros. Devido à quiralidade da enzima, o enantiômero que melhor se ajusta no seu sítio ativo sofre reação em uma velocidade maior. Para assegurar uma alta seletividade para ambos os enantiômeros, a diferença na velocidade de reação dos enantiômeros individuais deve ser a maior possível. Em alguns casos ideais a velocidade é tão extrema, que o “bom” enantiômero é transformado rapidamente e o outro não é convertido. Então, na resolução do racemato a reação enzimática cessaria automaticamente em 50% de conversão, quando já não existe o enantiômero reativo. Como consequência, cada enantiômero pode ser obtido somente com 50% de conversão em uma resolução enzimática. ⁽¹¹⁾

Em 1982, Sih e *col.* sob a base teórica de Sharpless e Fajans descreveu a dependência da conversão (c), excesso enantiomérico do substrato (ee_s) e excesso enantiomérico do produto (ee_p) na resolução cinética enzimática. ^(11; 56)

O parâmetro que indica a discriminação de uma enzima entre dois enantiômeros foi introduzido como razão enantiomérica (E).

Holmberg e Karlsson utilizando as equações propostas por Sih e *col.* distinguiram entre a razão enantiomérica do substrato (E_s) e do produto (E_p), onde E_s e E_p podem ser calculados de acordo com as **Equações 1 e 2**. ^(11; 57)

$$E_s = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_s)]}{\ln[(1-c)(1+ee_s)]}$$

Eq. 1

$$E_p = \frac{\ln[(1-c)(1+ee_p)]}{\ln[(1-c)(1-ee_p)]}$$

Eq.2

$$\text{onde, } c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p}$$

Valores de razão enantiomérica menores que 15 são inaceitáveis para propósitos práticos. Podem ser considerados de moderados os bons entre 15-30, e acima deste valor excelentes. Deve ser enfatizado que $E > 200$ não pode ser determinado com

precisão, devido às imprecisões oriundas dos métodos da determinação do excesso enantiomérico, onde uma pequena variação do ee_s ou ee_p pode causar uma mudança significativa no valor numérico de E. ⁽¹¹⁾

1.9 Métodos analíticos de determinação da pureza enantiomérica

O desenvolvimento de métodos de análise estereoquímica sensível, especialmente os cromatográficos de alta resolução para a determinação da pureza enantiomérica, foi fundamental para o desenvolvimento da síntese assimétrica, pois permite a avaliação precisa do grau de seletividade obtido em uma determinada reação. ^(11; 53)

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

O excesso enantiomérico de 0% corresponde a uma mistura (1:1) de enantiômeros, conhecida como mistura racêmica ou racemato, denotada pelo prefixo (\pm). ^(11; 53)

Diferentes técnicas têm sido empregadas para determinação dos excessos enantioméricos de compostos racêmicos tais como método polarimétrico, cromatografia gasosa quiral (CGQ), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-¹H) e cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE.

A seguir, os métodos analíticos utilizados neste trabalho serão apresentados mais detalhadamente.

1.9.1 Método polarimétrico

O método clássico para determinar o excesso enantiomérico de uma amostra é medir sua pureza óptica através de um polarímetro. Uma solução contendo moléculas opticamente ativas é colocada em um tubo de amostra e a luz-plana polarizada passa através deste tubo, ocorrendo uma rotação do plano de polarização. Esta rotação observada é simbolizada pela letra grega α (alfa) e expressa em graus. ^(51; 58)

Além de determinar o ângulo de rotação pode-se também determinar o sentido da rotação. As moléculas opticamente ativas que giram a luz polarizada para a esquerda (anti-horário) são denominadas levógiras (-), e as que giram a luz polarizada para a direita (horário) são denominadas dextrógiras (+). Para fins de comparação devem-se padronizar as condições de medida, e assim a rotação específica, $[\alpha]_D^T$, de um composto é definida como a rotação observada quando o caminho óptico (l) é de 1 dm, a concentração (c) da amostra é 1 g mL^{-1} , o comprimento de onda utilizado é de 589 nm, conhecida como linha D do sódio, e T a temperatura em que a análise foi realizada. ⁽⁵¹⁾ **Equação 3**

$$[\alpha]_D^T = \frac{\text{rotação observada (graus)}}{\text{caminho óptico (dm)} \times \text{concentração (g mL}^{-1})} = \frac{\alpha}{l \times c} \quad \text{Eq. 3}$$

Na literatura encontram-se valores de $[\alpha]_D^T$ para vários compostos opticamente ativos. Esse dado não só é utilizado como critério de identificação de uma substância, mas também para avaliar a pureza óptica ou a sua porcentagem em uma mistura. A pureza enantiomérica, também chamada de excesso enantiomérico (ee), pode ser calculada pela **Equação 4**.

$$ee = \frac{\text{rotação específica observada}}{\text{rotação específica do enantiômero puro}} \times 100 \quad \text{Eq. 4}$$

Embora este método seja uma das técnicas usadas para determinar a pureza enantiomérica, ela apresenta algumas desvantagens. A amostra sob análise deve ser homogênea, não deve conter traços de impurezas quirais e deve ser isolada de uma mistura reacional sem enriquecimento enantiomérico acidental. ^(53; 58)

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

1.9.2 Cromatografia Gasosa

Um método muito utilizado para a análise de mistura de enantiômeros é a cromatografia gasosa com fase quiral (CGQ). Esse método sensível não é afetado por traços de impurezas e é em sua maioria das vezes rápido e simples de ser realizado. Está baseado em associações moleculares que podem levar a um reconhecimento quiral suficiente que resulte em uma resolução enantiomérica. A razão dos picos fornece uma medida da composição enantiomérica da amostra precisa e quantitativa. Tais medidas podem ser realizadas com um alto grau de precisão. ^(59; 60)

As ciclodextrinas (CD) são um grupo de sacarídeos estruturalmente relacionados, que são produzidos pela ciclização enzimática do amido, catalizada pela enzima ciclodextrina-glicosil-transferase, formando uma espiral helicoidal de unidades de glicose unidas por ligações α -(1-4). Devido à falta de rotação livre em volta das ligações de ligação das unidades de glicose, as CDs não são moléculas cilíndricas, tendo a forma tronco-cônica. Podem conter entre 6 e 8 unidades de glicose, denominando-se respectivamente, α -, β -, γ -CD. ^(61; 62) **Figura 13**

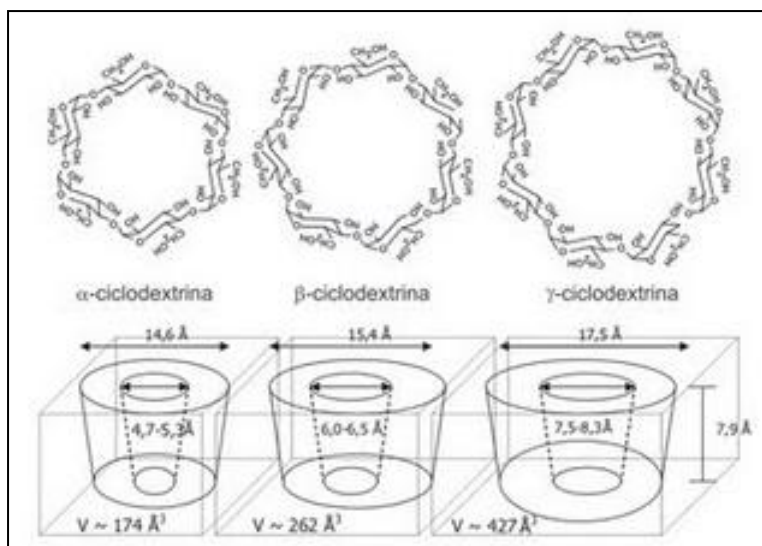


Figura 13. Estruturas moleculares e dimensões das α -, β -, γ -CD. ⁽⁶³⁾

As ciclodextrinas vêm sendo aplicadas com muita ênfase na separação de enantiômeros na cromatografia líquida ou gasosa, através do desenvolvimento de colunas com fases estacionárias quirais.

Nesta técnica utiliza-se uma fase estacionária quiral (ex. β -CD), a qual tem um agente de alta pureza enantiomérica que auxilia na resolução.^(60; 64)

O enantiômero a ser analisado é submetido a interações diastereoisoméricas rápidas e reversíveis com a fase estacionária e, portanto, pode ser eluído em diferentes velocidades. A resolução dos enantiômeros pela cromatografia baseia-se na diferença entre energias livres de formação dos intermediários diastereoisoméricos transitórios formados durante a eluição. A designação da configuração absoluta, portanto, envolverá a correlação da configuração molecular com a ordem da eluição do enantiômero.^(59; 60; 64)

Através da **Equação 5** é calculado o excesso enantiomérico (*ee*), e a conversão é calculada pela razão das áreas dos picos referentes ao reagente e aos produtos.

$$ee (\%) = \frac{\text{Área do pico do produto } A_1 - \text{Área do pico do produto } A_2}{\sum \text{Áreas dos picos dos produtos } (A_1 + A_2)} \times 100 \quad \text{Eq. 5}$$

Certamente existem limitações para este método, algumas das quais são características para a cromatografia gasosa. As amostras deverão ser suficientemente voláteis e termicamente estáveis e, é claro, deverá ser quantitativamente resolvida na fase quiral do CG.⁽⁶⁰⁾

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Imobilizar a lipase de *Burkholderia cepacia* (e/ou de outras procedências) em diferentes filmes de amido tais como de taro, cará e gengibre, e utilizar esses sistemas na obtenção de ésteres de aroma e na resolução de álcoois racêmicos.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Extrair e caracterizar por micrografia ótica os grãos de amido de taro, cará e gengibre provenientes de fontes naturais;
- ✓ Preparar os filmes de amido de taro, cará e gengibre com e sem lipases;
- ✓ Caracterizar os mesmos pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e determinar o teor de água pelo método de titulação de Karl-Fischer;
- ✓ Avaliar a estabilidade dos filmes em função de solventes orgânicos e da temperatura;
- ✓ Avaliar o efeito da variação da massa, reutilização e estocagem da lipase *Burkholderia cepacia* (LBC) imobilizada nos filmes de taro e cará na reação de obtenção do acetato de geranoíla;
- ✓ Investigar o efeito do tamanho da cadeia alquílica de diversos ácidos carboxílicos alifáticos na obtenção de alcanatoatos de geranoíla, com a LBC imobilizada em filmes de amido de taro e cará;
- ✓ Sintetizar por método químico o acetato de 1-feniletíla a partir do (*R,S*)-1-feniletanol e do anidrido acético.
- ✓ Reduzir as 3-nitroacetofenona, 4-nitroacetofenona, 4-metilacetofenona, 4-metoxiacetofenona e a 3,4-dimetilenodioxiacetofenona com borihidreto de sódio (NaBH_4), para obtenção dos respectivos álcoois racêmicos;

- ✓ Caracterizar todos os compostos racêmicos (álcoois e ésteres) por técnicas espectroscópicas de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-¹H), cromatografia gasosa com fase estacionária quirál (CGQ) e polarimetria;
- ✓ Monitorar as reações de resolução do (*R,S*)-1-feniletanol e derivados por CGQ.
- ✓ Avaliar a eficiência das lipases de *B. cepacia*, *Rhizopus oligosporus*, *Aspergillus niger*, *Chromobacterium viscosum* e dos micélios UEA_53 e UEA_115 imobilizadas ou não nos filme de amido de gengibre, na reação de transesterificação do (*R,S*)-1-feniletanol com acetato de vinila;
- ✓ Investigar a influência do tempo, solvente orgânico e razão molar na reação de obtenção do acetato de 1-feniletila, utilizando a LBC imobilizada em filme de amido de gengibre;
- ✓ Avaliar a influência de diferentes proporções de poli(óxido de etileno) (PEO) nos filmes de amido de gengibre, utilizados como catalisador para obtenção do acetato de 1-feniletila;
- ✓ Avaliar a influência do acetato de vinila e de *iso*-propenila na reação de obtenção dos diferentes ésteres, utilizando a LBC imobilizada em filmes de amido de gengibre:PEO;
- ✓ Verificar a influência de grupos retiradores e/ou doadores de elétrons nos derivados do (*R,S*)-1-feniletanol, na reação de transesterificação com o acetato de vinila utilizando a LBC imobilizada em filme de amido de gengibre:PEO (7:3 m/m).
- ✓ Comparar os resultados obtidos com outros já reportados na literatura.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais

Para a preparação dos suportes foram utilizados amidos provenientes de diferentes tubérculos tais como os de taro, cará e gengibre.

Todos os amidos foram extraídos e caracterizados conforme descrito no item **3.5**, pg. 35.

Para a realização deste trabalho, utilizaram-se as seguintes lipases: lipase de *Candida antarctica* (imobilizada em macroporos de resina acrílica) (Novozym 435 – CALB) ($10,000 \text{ PLU g}^{-1}$) fornecida pela Novozymes; lipase de *Burkholderia cepacia* (LBC) ($30,000 \text{ U g}^{-1}$) fornecida pela Amano; e a lipase de *Chromobacterium viscosum* (LCV) ($5138,7 \text{ U mg}^{-1}$) fornecida pela Genzyme Biochemicals.

As lipases de *Rhizopus oligosporus* (LRO) ($14,9 \text{ U mL}^{-1}$) e de *Aspergillus niger* (LAN) ($18,4 \text{ U mL}^{-1}$) foram doadas pela Profa. Dra. Patrícia O. Carvalho da Universidade de São Francisco (USF), Bragança Paulista–SP, e foram isoladas de microorganismos da região de Bueno Brandão–MG.⁽¹⁷⁾

Foram também utilizados os micélios UEA_53 e UEA_115 isolados de plantas da região amazônica e foram fornecidos pela Profa. Dra. Sandra P. Zanotto da Universidade Estadual do Amazonas (UEA), Manaus – AM.⁽⁶⁵⁾

Os solventes e reagentes utilizados foram de grau de pureza > 95% ou P.A., e foram das seguintes procedências:

- ✓ **Vetec:** *n*-heptano, *t*-butanol, acetonitrila, tetracloreto de carbono, anidrido acético, bicarbonato de sódio, glicerol e os ácidos propiônico, butírico, caprílico, láurico e esteárico;
- ✓ **Aldrich:** (*R,S*)-1-feniletanol, ácidos hexanóico e palmítico, 4-metilacetofenona, 3,4-dimetilenodioxiacetofenona, e hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIm][PF₆];
- ✓ **Acros Organics:** poli(óxido de etileno) (MM=300.000), geraniol, 3-nitroacetofenona e 4-nitroacetofenona;
- ✓ **Fluka Chemika:** acetato de vinila, acetato de *iso*-propenila e o ácido cáprico;

- ✓ **Merck:** 4-metoxiacetofenona,
- ✓ **Quimex:** ácido sulfúrico;
- ✓ **Nuclear:** sulfato de magnésio anidro;
- ✓ **Synth:** diclorometano, *n*-hexano;
- ✓ **Grupo Química:** acetato de etila;
- ✓ **CRQ:** álcool etílico absoluto, clorofórmio;

Os solventes *n*-hexano (p.e. = 69 °C) e *n*-heptano (p.e. = 98,4 °C) foram previamente destilados e secos com peneira molecular para depois serem utilizados nas reações de resolução dos álcoois racêmicos.

3.2 Equipamentos

Os equipamentos utilizados para a realização deste trabalho foram:

- ✓ Agitador magnético - Dist;
- ✓ Chapa de aquecimento - Dist;
- ✓ Processador de alimentos – Walita
- ✓ Rotaevaporador - Buchi 461 water bath;
- ✓ Balanças analíticas - Sartorius basic/ Marte A500/ AND EK-200i;
- ✓ Banho termostatizado tipo Dubnoff - Marconi/TE-053/TE-093;
- ✓ Shaker – Certomat MO B. Braum Biotech International;
- ✓ Centrífuga refrigerada – Nova Técnica;
- ✓ Estufa de secagem – Fanem 313/2.

3.3 Caracterização dos suportes

3.3.1 Micrografia dos grãos de amido

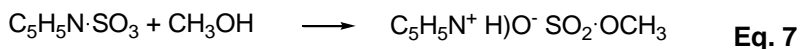
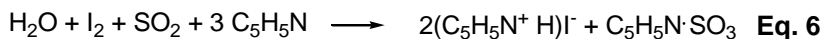
As micrografias dos grãos de amido de taro, cará e gengibre foram realizadas no Laboratório de Microscopia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFSC, por microscopia ótica através da preparação direta de lâminas usando uma pequena quantidade de cada amido com água glicerinada 2% ou em solução de iodo. Foram utilizados o microscópio ótico Olympus BX 40 e a câmera digital media cybernetics coolSNAP - PRO cf color.

3.3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As microscopias dos filmes de amido de taro, cará e gengibre com ou sem as lipases foram realizada no Laboratório de Caracterização Microestrutural (LCM) do Departamento de Engenharia Mecânica – UFSC, utilizando como pulverizador catódico um Sputter Coater com ouro modelo SCD 005 – Bal-tec e um microscópio eletrônico de varredura Philips – XL30 com análise química EDAX para caracterização dos filmes.

3.3.3 Determinação do teor de água pelo método de Karl-fischer

A determinação do teor de água nos filmes de amido de taro, cará e gengibre foi realizada na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC, utilizando-se o Titulador 633 Automático Karl Fischer, Metrohm AG CH-9100 Herisau. Este método baseia-se na determinação quantitativa da água em uma solução anidra de dióxido de enxofre e iodo. ⁽⁶⁶⁾ **Equações 6 e 7**



3.4 Caracterização dos compostos

Os compostos foram caracterizados por análises espectroscópicas de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-¹H), polarimetria e por cromatografia gasosa com fase quiral (CGQ) por comparação com padrões.

3.4.1 Espectrofotometria no infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro ABB Bomem FTLA 2000-100, em pastilha de KBr ou filme.

3.4.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-¹H) foram obtidos no espectrômetro Varian 400 MHz, utilizando como referência interna o tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$). O solvente utilizado foi o clorofórmio deuterado (CD-Cl₃).

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

3.4.3 Polarimetria

As medidas polarimétricas foram realizadas em um Polarímetro - Schimidt + Haensch, utilizando uma quantidade conhecida de amostra (g), diluída em balão volumétrico de 10 mL com clorofórmio. A rotação óptica específica foi calculada conforme descrito do item 1.9.1, através da **Equação 3**, pg. 26.

3.4.4 Cromatografia gasosa de fase quiral (CGQ)

Os excessos enantioméricos dos produtos e substratos das reações de biocatálise foram monitorados no cromatógrafo gasoso da marca Shimatzu-14B. A coluna capilar utilizada foi da

Restek constituída da fase RT – BetaDex – SM (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm).

A programação utilizada para separar os enantiômeros dos substratos e produtos será descrita no item **3.9**, pg 45.

3.5 Extração dos grãos de amidos de cará, taro e gengibre

Esta etapa do trabalho foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Elisa H. Moecke, do Laboratório de Microscopia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos - UFSC.

Cerca de 1,0 Kg de tubérculos de cará, taro ou gengibre foram selecionados para extração do amido. Os tubérculos foram lavados, descascados e posteriormente picados e colocados em um liquidificador comercial com aproximadamente 500 mL de água para 500 g de tubérculo. A seguir foram triturados para ruptura das células e liberação do amido, peneirados e lavados com água corrente por diversas vezes, para que o amido desprendesse das fibras.

O filtrado contendo o amido foi deixado em repouso por 48 h para decantar. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e o amido colocado na estufa a 50 °C por 24 h para secagem.

O **Esquema 4** mostra a extração do amido dos tubérculos de cará.



Esquema 4. Extração do amido de cará.

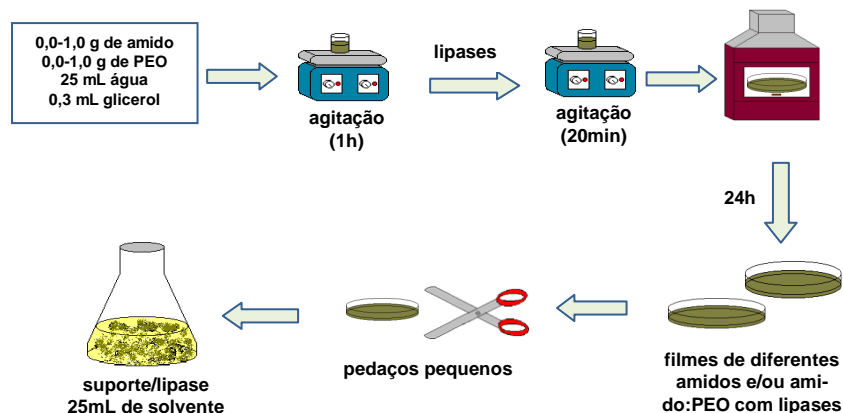
3.6 Preparação dos filmes de amido e imobilização das lipases

Para imobilização das lipases no filmes de amido puro foram solubilizados de 0,0-1,0 g de amido de taro, cará ou de gengibre em 25 mL de água destilada e 0,3 mL de glicerol, esta solução foi mantida sob agitação magnética e aquecimento brando ($\sim 90^\circ\text{C}$) por 1 h, até completa dissolução dos grãos.

Após a solubilização dos amidos, a solução foi resfriada a temperatura ambiente para adição de 0-100 mg das lipases LBC, LCV, LRO e LAN, e o sistema agitado por mais 20 minutos. A seguir a solução foi transferida para uma placa de Petri e aquecida em um banho de areia por volta de $30\text{-}40^\circ\text{C}$ para evaporação da água. Os filmes com as enzimas imobilizadas foram cortados em pequenos pedaços e transferidos para um erlenmeyer de 250 mL, para serem empregados nas reações biocatalisadas.

Para imobilização da lipase LBC (60 mg) em blendas poliméricas (amido/PEO), os mesmos foram solubilizados em 25 mL de água destilada, sob aquecimento brando e agitação magnética por 1 h.

As blendas foram preparadas variando-se a composição dos polímeros amido e PEO de 0-100% (m/m), sendo a massa total de 1 g. A adição do glicerol, enzima e evaporação do solvente foi idêntica ao procedimento efetuado com os filmes de amido puro. **Esquema 5**



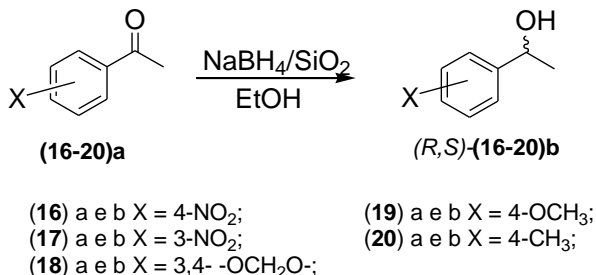
Esquema 5. Preparação dos filmes de amido ou amido:PEO e imobilização das lipases.

Foram também preparados filmes de amido de taro, cará e gengibre com glicerol na ausência das lipases. Estes foram usados nos estudos de estabilidade em diversos solventes orgânicos, de termoestabilidade, nas análises de MEV, e para a determinação do teor de água pelo método de titulação de Karl-Fischer.

3.7 Preparação dos álcoois e ésteres racêmicos por métodos químicos

3.7.1 Procedimento geral para a redução das acetofenonas substituídas

As 4-metil-; 4-nitro-; 3-nitro-; 4-metoxi- e 3,4-metilenodioxiacetofenonas foram reduzidas com $\text{NaBH}_4/\text{SiO}_2$, de acordo com o procedimento já descrito na literatura.⁽⁶⁷⁾ **Esquema 6**

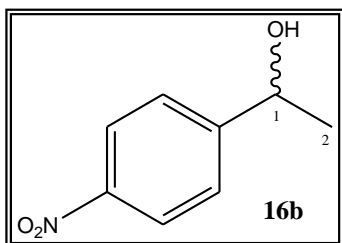


Esquema 6. Redução das acetofenonas substituídas com $\text{NaBH}_4/\text{SiO}_2$.

Em um erlenmeyer de 250 mL foram reduzidas as seguintes acetofenonas: 4-nitro, 3-nitro, 3,4-metilenodioxiacetofenonas **(16-18)a** (2,5 g, 1,5 mmol), 4-metoxiacetofenona **19a** (2,5 g, 2,0 mmol) e 4-metilacetofenona **20a** (3,0 g, 2,2 mmol), utilizando NaBH_4 (1,72-2,55 g, 4,5-6,7 mmol), SiO_2 (1 g) e etanol (30 mL). A mistura foi mantida sob agitação até completa redução das acetofenonas e formação dos respectivos álcoois. A formação dos álcoois racêmicos foi acompanhada por cromatografia de cama-

da delgada (ccd), utilizando como eluente *n*-hexano:acetato de etila (7:3 v/v).

Após este período, as soluções foram filtradas e colocadas em um balão de 100 mL para evaporação do solvente. O precipitado foi solubilizado em CH₂Cl₂ (25 mL) e novamente a solução foi evaporada. Os produtos obtidos foram analisados por de IV, RMN-¹H e medidas polarimétricas.



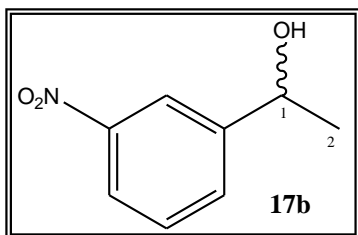
Rend: 76,8% (1,92 g), óleo alaranjado.

$[\alpha] = 0,00$ [$2,06 \cdot 10^{-2}$ CHCl₃].

Rf= 0,50 (*n*-hexano/acetato de etila 7:3 v/v).

RMN-¹H (CDCl₃), δ 8,07 (d, 2H, $J=8,8$ Hz, C-H aromático), 7,46 (d, 2H, $J=8,8$ Hz, C-H aromático), 4,94 (q, 1H, $J=6,8$ Hz, H-1), 1,44 (d, 3H, $J=6,8$ Hz, H-2).

IV (KBr, cm⁻¹), 3373 [ν (OH)], 2976-2867 [ν (C-H alifático)] 1089 [ν (C-O)].



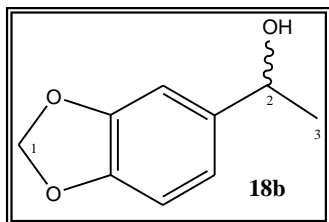
Rend: 62,8% (1,57 g), óleo alaranjado

$[\alpha] = 0,00$ [$8,46 \cdot 10^{-3}$ CHCl₃].

Rf= 0,52 (*n*-hexano/acetato de etila 7:3 v/v).

RMN-¹H (CDCl₃), δ 8,20 (s, 1H, C-H aromático), 8,07 (d, 1H, $J=8,0$ Hz, C-H aromático), 7,68 (d, 1H, $J=8,0$, C-H aromático), 7,49 (t, 1H, $J=8,0$ Hz, C-H aromático), 4,98 (q, 1H, $J=6,8$ Hz, H-1), 1,50 (d, 3H, $J=6,8$ Hz, H-2).

IV (KBr, cm⁻¹), 3393 [ν (OH)], 2976-2873 [ν (C-H alifático)] 1068 [ν (C-O)].



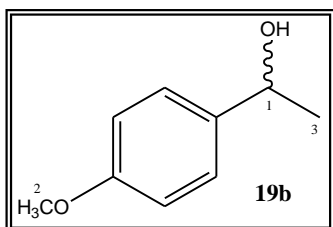
Rend: 46,4% (1,16 g), óleo rosado.

$[\alpha] = 0,00$ [$8,63 \cdot 10^{-3}$ CHCl₃].

Rf= 0,51 (*n*-hexano/acetato de etila 7:3 v/v).

RMN-¹H (CDCl₃), δ 6,88 (d, 1H, $J=2,0$, C-H aromático), 6,79 (d, 1H, $J=2,0$, C-H aromático), 6,76 (s, 1H, C-H aromático), 5,93 (s, 2H, H-1), 4,79 (q, 1H, $J=6,4$ Hz, H-2), 1,44 (d, 3H, $J=6,4$ Hz, H-3).

IV (KBr, cm⁻¹), 3361 [ν (OH)], 2922-2890 [ν (C-H alifático)] 1243 [ν (C-O)].



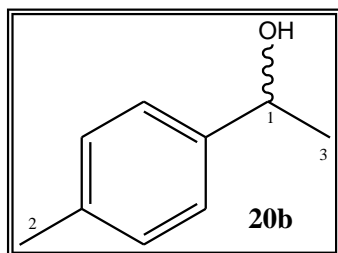
Rend: 32,0% (0,8 g), óleo amarelado.

$[\alpha] = 0,00$ [$6,81 \cdot 10^{-3}$ CHCl₃].

Rf= 0,49 (*n*-hexano/acetato de etila, 7:3 v/v).

RMN-¹H (CDCl₃), δ 7,23 (d, 2H, $J=8,4$ Hz, C-H aromático), 6,83 (d, 2H, $J=8,4$ Hz, C-H aromático), 4,74 (q, 1H, $J=6,4$ Hz, H-1), 3,74 (s, 3H, H-2), 1,41 (d, 3H, $J=6,4$ Hz, H-3).

IV (KBr, cm⁻¹), 3386 [ν (OH)], 2971-2836 [ν (C-H alifático)] 1246 [ν (C-O)].



Rend: 65,0% (1,95 g), óleo amarelado.

$[\alpha] = 0,00$ [$70,9 \cdot 10^{-3}$ CHCl₃].

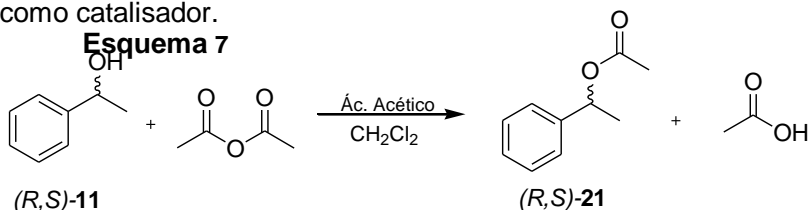
Rf= 0,51 (*n*-hexano/acetato de etila 7:3 v/v).

RMN-¹H (CDCl₃), δ 7,27 (d, 2H, $J=7,2$, C-H aromático), 7,18 (d, 2H, $J=7,2$, C-H aromático), 4,84 (q, 1H, $J=6,4$ Hz, H-1), 2,39 (s, 3H, H-2), 1,49 (d, 3H, $J=6,4$ Hz, H-3).

IV (KBr, cm⁻¹), 3352 [ν (OH)], 2973-2924 [ν (C-H alifático)] 1088 [ν (C-O)].

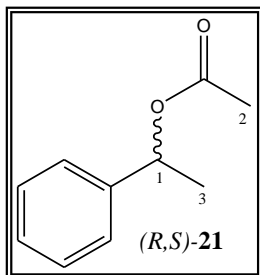
3.7.2 Preparação do (*R,S*)-acetato de 1-feniletila

Em um balão de 250 mL adicionou-se o (*R,S*)-1-feniletanol (4,9 mL, 4,1 mmol), anidrido acético (19,4 mL, 20,5 mmol), diclorometano (30 mL) e algumas gotas de ácido acético para atuar como catalisador.



Esquema 7. Preparação do (*R,S*)-21 pelo método químico.

O sistema foi mantido em refluxo por 24 h e a formação do produto acompanhada por ccd, utilizando como eluente *n*-hexano:acetato de etila (7:3 v/v). Após a formação completa do produto, a solução foi transferida para um funil de separação e lavada com H₂O (3x 25 mL), seguida por solução de bicarbonato de sódio (2x 20 mL) até remoção de todo ácido acético. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro (MgSO₄), filtrada e em seguida rota-evaporada. O composto obtido, (*R,S*)-21, foi analisado por técnicas espectroscópicas de RMN-¹H, IV e medida polarimétrica.



$[\alpha] = 0,00 [2,56 \cdot 10^{-2} \text{ CHCl}_3]$.

Rf = 0,71 (*n*-hexano/acetato de etila 7:3 v/v).

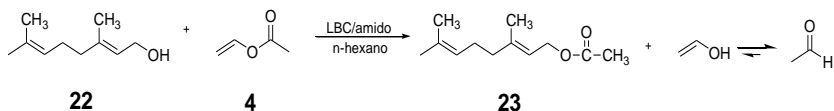
RMN-¹H (CDCl₃), δ 7,23 (m, 5H, C-H aromático), 5,82 (q, 1H, $J=6,8$, H-1), 2,10 (s, 3H, H-2), 1,50 (d, 3H, $J= 6,8$ Hz, H-3).

IV (KBr, cm⁻¹), 3064-2872 [ν (C-H alifático)], 1734 [ν (C=O)], 1242 [ν (C-O)].

3.8 Preparação de ésteres por método enzimático

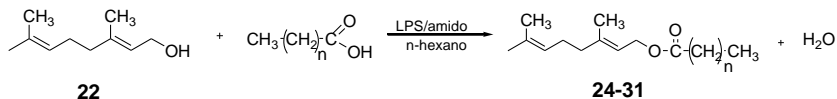
3.8.1 Preparação do acetato e alcanatoos de geranoíla

Para as reações de transesterificação adicionou-se em um erlenmeyer de 250 mL, *n*-hexano (25 mL), geraniol (0,9 mL, 5 mmol), acetato de vinila (0,5 mL, 5 mmol), e a lipase *Burkholderia cepacia* (LBC) imobilizada ou não em filmes de taro ou de cará. A mistura reacional foi mantida a 35 °C, por 24 a 144 h, em banho termostatzado tipo Dubnoff. **Esquema 8**



Esquema 8. Preparação do acetato de geranoíla **23**.

Para a reação de esterificação adicionou-se em um erlenmeyer de 250 mL, *n*-hexano (25 mL), geraniol (0,9 mL, 5 mmol) e os ácidos propiônico (0,37 mL, 5 mmol), butírico (0,45 mL, 5 mmol), hexanóico (0,62 mL, 5 mmol), caprílico (0,8 mL, 5 mmol), cáprico (0,86 g, 5 mmol), láurico (1,00 g, 5 mmol), palmítico (1,28 g, 5 mmol) ou esteárico (1,42 g, 5 mmol) e a lipase LBC imobilizada em filmes de taro e/ou cará. A mistura reacional foi mantida durante 48 h, em banho termostatzado tipo Dubnoff, a 35 °C. **Esquema 9**



(24) n=1 (25) n=2 (26) n=4 (27) n=6 (28) n=8 (29) n=10 (30) n=14 (31) n=16

Esquema 9. Reação de esterificação para formação dos alcanatoos de geranoíla **24-31**.

As reações de transesterificação e esterificação foram acompanhadas periodicamente por cromatografia de camada delgada (ccd), utilizando como eluente *n*-hexano:acetato de etila (7:3 v/v). Os valores encontrados de R_f para os compostos **23**, **24-31** e **22** foram em média, 0,67, 0,65 e 0,44, respectivamente.

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

Cessada as lavagens, os filmes com as lipases foram guardados em pequenos frascos fechados contendo *n*-hexano e estocados em geladeira (10-15 °C). O solvente contendo o produto foi evaporado no rotaevaporador e em seguida estes foram quantificados por análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-¹H) por comparação da área dos hidrogênios metilênicos vizinhos da função álcool (~3,9 ppm) com os do éster (4,4-4,6 ppm). **Figura 14**

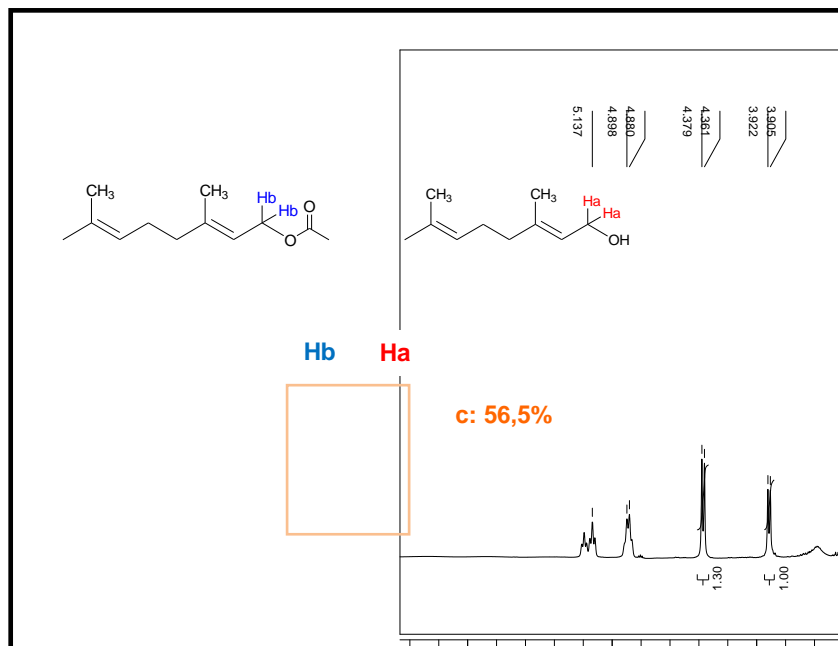


Figura 14. Espectro de RMN-¹H comparando as áreas dos hidrogênios metilênicos do **22** com os do produto **23**, c: 56,5%, [400 MHz, CDCl₃].

Outro método empregado para verificar a formação dos ésteres foi através da análise por espectroscopia de infravermelho (IV). Para esta análise o acetato de geranoíla foi purificado por coluna tipo flash (sílica gel 200 mesh), utilizando-se como eluente *n*-hexano:acetato de etila (7:3 v/v). Foram coletadas alíquotas de 5 mL e estas analisadas por cromatografia de camada delgada (ccd), para observar a obtenção do éster puro.

As alíquotas que apresentaram o mesmo valor de R_f (0,67), correspondente ao éster, foram reunidas e o solvente evaporado no rotaevaporador. Após a purificação do produto **23** foram observadas as seguintes bandas características na região do IV: 2966, 2921 e 2858 cm⁻¹ [ν (C-H), m], 1740 cm⁻¹ [ν (C=O, éster, f)], 1234 cm⁻¹ [ν (C-O, éster), f]. **Figura 15**

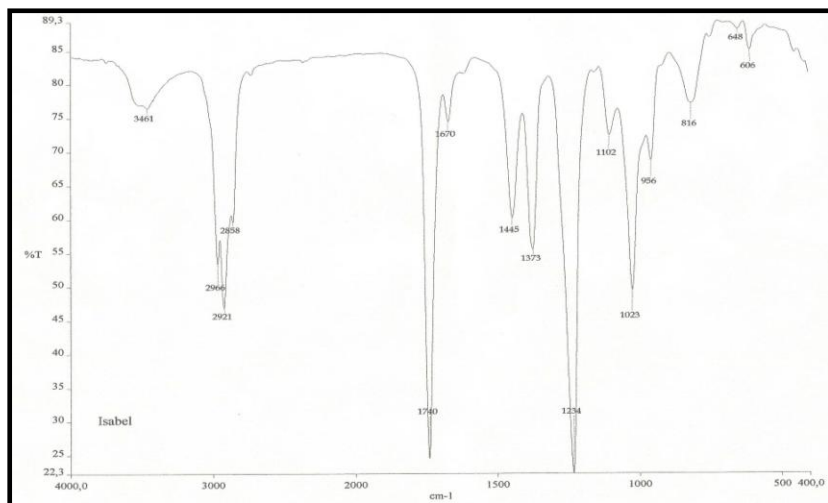


Figura 15. Espectro de infravermelho do acetato de geranoíla (**23**).

Mesmo após as purificações, ainda é observada uma banda pequena em 3461 cm⁻¹, que deve ser do álcool (**22**) ou água remanescente.

3.8.2 Preparação de ésteres derivados do (*R,S*)-1-feniletanol

As reações de transesterificação e esterificação dos álcoois racêmicos foram realizadas conforme **Esquema 10** (pg. 61) e **Esquema 11** (pg. 79), utilizando diferentes lipases imobilizadas ou não em filmes de amido de taro e gengibre, em diversos solventes orgânicos e/ou mistura de solvente orgânico com líquido iônico ou glicerol.

Em um erlenmeyer de 250 mL adicionou-se o (*R,S*)-**11** (0,6 mL, 5,0 mmol), ou os álcoois: (*R,S*)-1-(4-nitrofenil)etanol **16b** (0,84 g, 5,0 mmol,), (*R,S*)-1-(3-nitrofenil)etanol **17b** (0,84 g, 5,0 mmol,), (*R,S*)-1-(3,4-metilenodioxifenil)etanol **18b** (0,47 g, 2,5 mmol,), (*R,S*)-1-(4-metoxifenil)etanol **19b** (0,65 g, 4,3 mmol) e (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol **20b** (0,68 g, 5,0 mmol). A seguir, adicionou-se o acetato de vinila **4** (0,5 – 4,6 mL, 5 - 50 mmol) ou o acetato de *iso*-propenila **32** (0,6 mmol, 5 mmol).

Foram utilizados os seguintes solventes orgânicos (25 mL), *n*-heptano (log *P* 4,0), *n*-hexano (log *P* 3,5), CH₂Cl₂ (log *P* 1,5), éter etílico (log *P* 0,83), acetonitrila (log *P* -0,33), 1,4-dioxano (log *P* -1,1) e as misturas dos solventes *n*-hexano/glicerol ou *n*-hexano/[BMim][PF₆] (10 mL) ambos na proporção 9:1 v/v.

As lipases usadas (20–60 mg) foram as de *C. antarctica* (CALB), *B. cepacia* (LBC), *R. oligosporus* (LRO), *A. niger* (LAN) e a de *C. viscosum* (LCV) imobilizadas ou não em filmes de amido de taro, gengibre ou gengibre:PEO. Foram também utilizados os micélios UEA_ 53 e UEA_ 115.

As reações foram mantidas sob agitação por um período pré-determinado de 6 – 96 h em shaker ou banho termostatizado tipo Dubnoff nas temperaturas de 20 a 35 °C. Após este período, a mistura reacional foi transferida para um balão de fundo redondo e os filmes contendo as lipases foram lavados com *n*-hexano por diversas vezes para completa remoção dos reagentes e/ou produtos.

Os solventes orgânicos foram evaporados, e o líquido iônico [BMim][PF₆] foi separado em funil de separação e mantido em dissecador a vácuo por 24 h, para posterior reutilização. O glicerol não pode ser recuperado.

Os produtos obtidos foram analisados por cromatografia gasosa com fase quiral.

Figura 16

O composto (*R*)-acetato de 1-feniletila (**12**) foi purificado em coluna cromatográfica utilizando como eluente *n*-hexano/acetato de etila (9:1v/v) ($R_f=0,7$) e posteriormente foi analisado por RMN- ^1H , IV e polarimetria.

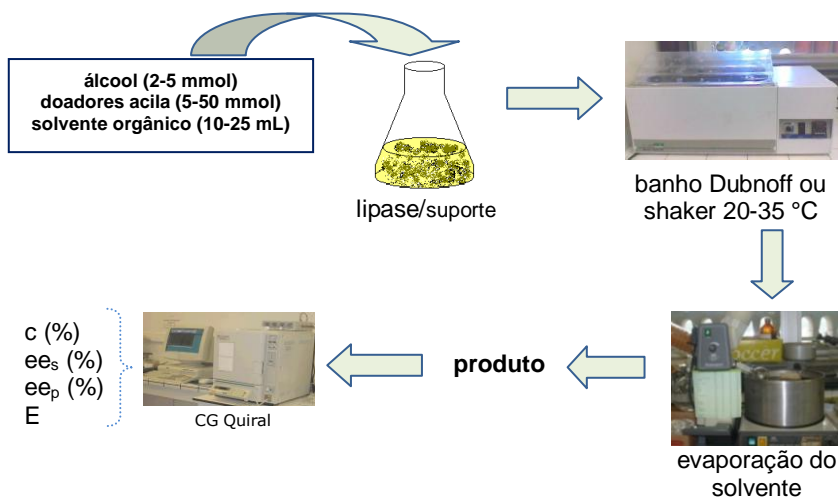


Figura 16. Meio reacional e análise dos produtos obtidos na resolução do (*R,S*)-11 e derivados.

3.9 Condições usadas nas análises de CGQ

As condições de análise da CGQ foram determinadas para cada composto. Inicialmente, os padrões sintetizados por métodos químicos foram submetidos à CQG para obtenção das melhores condições de separação dos enantiômeros. Posteriormente, os produtos das sínteses enzimáticas foram analisados sob as mesmas condições.

As condições de análises utilizadas foram: pressão do gás carregador (H_2) – 75 kPa; temp. do injetor (Split 200) – 230 °C; temp. do detector (FID) – 230 °C; volume da amostra – 1 μL .

A temperatura inicial (t.i) (°C), a taxa de aquecimento (°C/min), temperatura final (t.f) (°C) e o tempo de retenção serão especificados para cada composto.

- *(R,S)*-1-feniletanol (**11**): 100 °C, 3 °C/min, 200 °C por 40 min. t_{R1} = 5,8 min (*R*); t_{R2} = 6,1 min (*S*).
- *(R,S)*-acetato de 1-feniletila (**21**): 100 °C, 3 °C/min, 200 °C por 40 min. t_{R1} = 5,0 min (*S*); t_{R2} = 5,4 min (*R*).
- *(R,S)*-1-(4-nitrofenil)etanol (**16b**): 100 °C, 10 - 2 °C/min, 120 - 200 °C por 20 min. t_{R1} = 28,2 min; t_{R2} = 28,6 min.
- *(R,S)*-acetato de 1-(4-nitrofenil)etila (**16c**): 100 °C, 10 - 2 °C/min, 120 - 200 °C por 20 min. t_{R1} = 23,9 min;
- *(R,S)*- 1-(3-nitrofenil)etanol (**17b**): 100 °C, 10 - 2 °C/min, 150 - 200 °C por 20 min. t_{R1} = 15,9 min;*
- *(R,S)*-acetato de 1-(3-nitrofenil)etila (**17c**): 100 °C, 10 - 2 °C/min, 150 - 200 °C por 20 min. t_{R1} = 12,1 min;
- *(R,S)*-1-(3,4-metilenodioxifenil)etanol (**18b**): 100 °C, 3 °C/min, 200 °C por 40 min. t_{R1} = 17,6 min; t_{R2} = 17,8 min;
- *(R,S)*-acetato de 1-(3,4-metilenodioxifenil)etila (**18c**): 100 °C, 3 °C/min, 200 °C por 40 min. t_{R1} = 17,1 min;
- *(R,S)*-1-(4-metoxifenil)etanol (**19b**): 100 °C, 2 °C/min, 200 °C por 40 min. t_{R1} = 15,5 min; t_{R2} = 15,8 min;
- *(R,S)*-acetato de 1-(4-metoxifenil)etila (**19c**): 100 °C, 2 °C/min, 200 °C por 40 min. t_{R1} = 16,8 min;
- *(R,S)*-1-(4-metilfenil)etanol (**20b**): 100 °C, 2 °C/min, 200 °C por 40 min. t_{R1} = 8,2 min; t_{R2} = 8,8 min.
- *(R,S)*-acetato de 1-(4-metilfenil)etila (**20c**): 100 °C, 2 °C/min, 200 °C por 40 min.*

* Não houve resolução nas condições experimentais testadas.
Ver item 4.5.7.

As porcentagens de conversão (c%) foram calculadas por comparação da área dos picos dos produtos e reagente, conforme a **Figura 17**. O excesso enantiomérico ($\epsilon\epsilon$) foi calculado através da **Equação 5** (pg. 28), e a razão enantiomérica (E) pelo programa para o cálculo da seletividade de resolução cinética que está disponível na Internet. (www.orgc.tugraz.at)

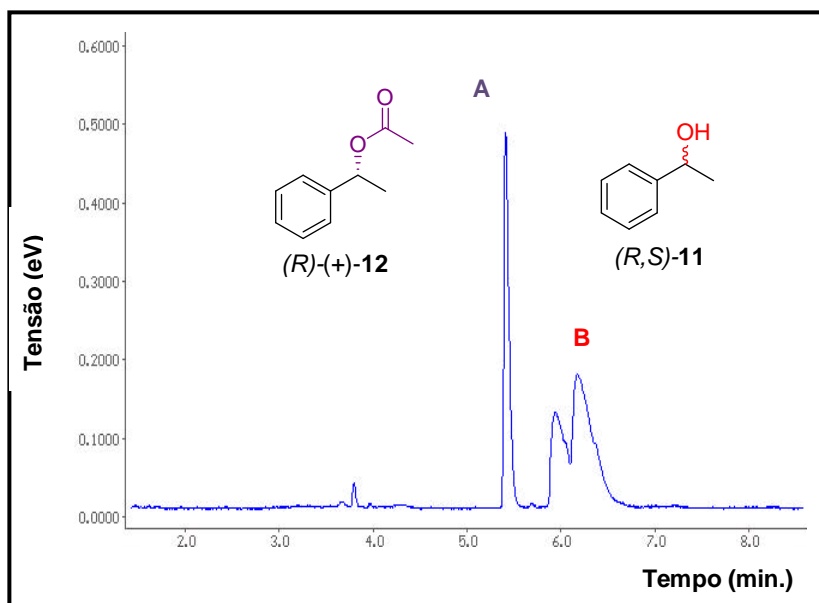


Figura 17. Cromatograma de uma alíquota da reação de transesterificação do (R,S)-11 com acetato de vinila, c: 22,5% [(R,S)-11 (0,6 mL, 5 mmol); **4** (0,5 mL, 5 mmol); *n*-hexano (25 mL); LBC (60 mg), geng:PEO (5:5 m/m); t.a.; 24 h].

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho imobilizaram-se lipases de diferentes procedências em filmes de amido de taro, cará e de gengibre. Estes suportes foram utilizados para obtenção de ésteres de aroma e na resolução de álcoois racêmicos.

Os padrões racêmicos foram sintetizados por métodos químicos e caracterizados por RMN-¹H, IV, polarimetria e CGQ. Os produtos obtidos nas reações enzimáticas foram monitorados por CGQ e comparados com os padrões racêmicos. As conversões foram determinadas pela área dos produtos e reagentes.

Todos os amidos utilizados neste trabalho foram extraídos de fontes vegetais e caracterizados por microscopia ótica. Os filmes, com e sem lipases, foram também caracterizados por MEV, e a quantidade de água determinada por titulação Karl-Fischer. Os itens a seguir apresentam os resultados obtidos.

4.1 Extração e caracterização dos grãos de amido de cará, taro e gengibre

A extração dos grãos de amido de taro, cará e gengibre mostrou-se vantajosa, sendo um procedimento simples e barato, e obteve-se em média 60-100 g de amido/ kg de tubérculo.

Após a extração e secagem todos os amidos foram analisados por técnicas microscópicas, que é um método muito utilizado para identificar e caracterizar as estruturas histológicas de vegetais, animais e outros materiais. ⁽⁶⁸⁾

O tamanho e a forma de grânulos são importantes na determinação dos usos potenciais dos amidos. Por exemplo, grânulos pequenos (2,0 µm) podem ser usados como substitutos de gordura devido ao tamanho ser semelhante ao dos lipídeos. Outras aplicações, nas quais o tamanho dos grânulos é importante, é para produção de filmes plásticos biodegradáveis e de papéis para fax. ⁽⁶⁸⁾

As **Figuras 18** e **19** mostram as microscopias para os grãos de amido de taro e cará, respectivamente.

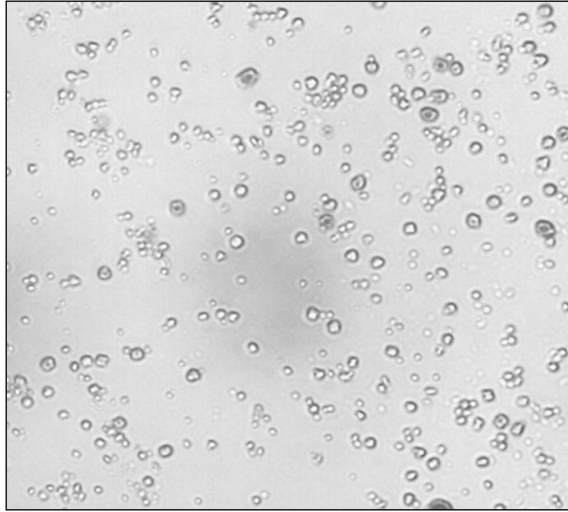


Figura 18. Micrografia dos grãos de amido de taro (*Colocasia esculenta*). Aumento de 400 vezes.

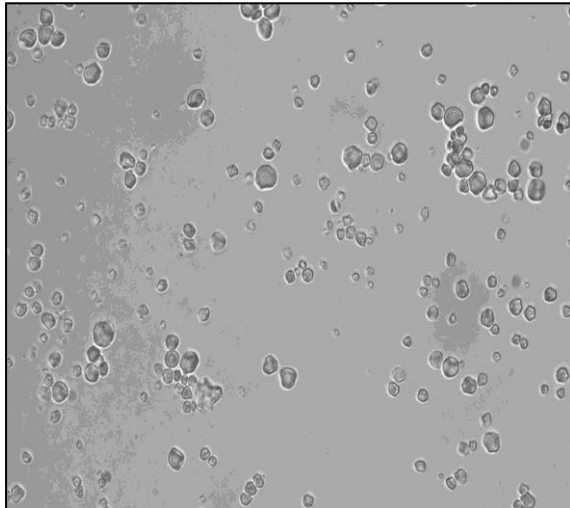


Figura 19. Micrografia dos grãos de amido de cará (*Dioscorea* spp.). Aumento de 400 vezes.

Analisando as **Figuras 18 e 19**, observa-se que os grãos de amido de taro e cará apresentam algumas semelhanças. Os grãos são pequenos e variam em torno de 5 - 20 μm , são esféricos ou irregularmente arredondados e o hilo nem sempre é visível, mas os que apresentam, possuem hilo puntiforme no centro do grão. As lamelas ou estrias não são visíveis, e os grãos não estão agrupados.

Estes resultados estão de acordo com os reportados por Cereda e *col.* que descreve os grãos de amido de cará com forma regular, elipsóide e ovóide, podendo variar de 5 -18 μm .⁽⁷¹⁾

Pode-se notar uma grande diferença na morfologia dos grãos de amido de taro e cará com os de gengibre. **Figura 20**

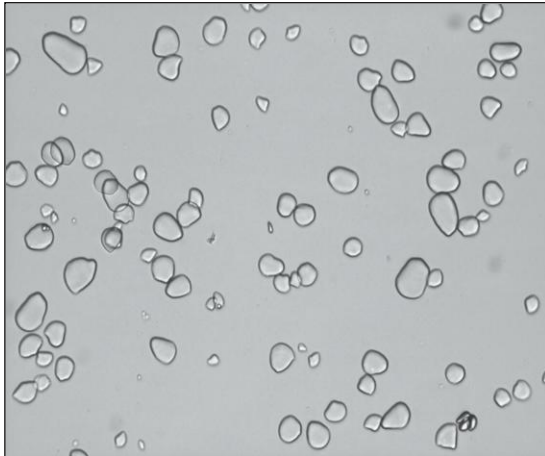


Figura 20. Micrografia dos grãos de amido de gengibre (*Zingiber officinale*). Aumento de 200 vezes.

Este último possui grãos maiores podendo variar de 15–30 μm , apresentam forma oval ou circular levemente achatada e as estrias e lamelas são visíveis, porém não apresentam hilo e nem agrupamento de grãos.

Estes resultados também estão de acordo com Leonel, que em seus estudos de microscopia ótica e de MEV descrevem os grãos de amido de gengibre como sendo oval e possuindo tamanho médio de 17 μm .⁽⁶⁸⁾

Após estas análises os amidos de taro, cará e de gengibre foram usados para a preparação de filmes. Utilizou-se também o amido de gengibre em diferentes proporções com poli(óxido de etileno) (PEO). Foram preparados filmes na presença e ausência da lipase de *B. cepacia* (LBC).

Esta técnica foi empregada para verificar a homogeneidade dos filmes e se a LBC está localizada na superfície e/ou no interior do suporte polimérico. Foram analisados os filmes de amido de taro, cará, gengibre e de gengibre:PEO (7:3 m/m), na ausência e presença da LBC.

Os filmes de amido de taro, cará e gengibre com e sem a LBC imobilizada, apresentaram morfologias semelhantes. Por exemplo, a **Figura 21** mostra as micrografias de fraturas obtidas para os filmes de amido de gengibre e gengibre:PEO sem LBC.

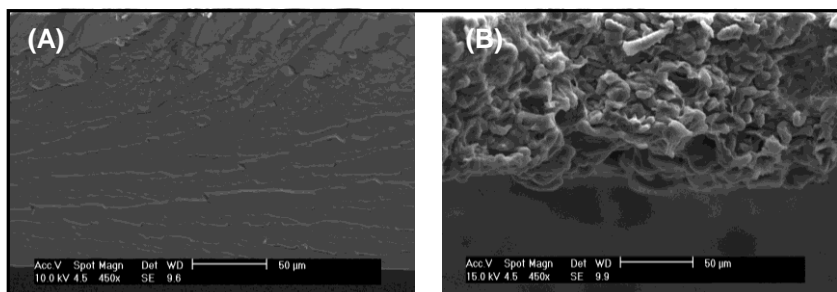


Figura 21. Microscopia eletrônica de varredura. **(A)** filme de gengibre (450x), **(B)** filme de gengibre:PEO (450x). [gengibre (1 g), gengibre:PEO (7:3 m/m)].

Analisando a **Figura 21**, pode-se notar que os filmes de amido de gengibre **(A)** e os formados por gengibre:PEO **(B)** sem LBC apresentam características morfológicas bem distintas. O filme formado pela blenda polimérica **(B)** apresenta um grau bem maior de porosidade quando comparado com o de amido de gengibre puro.

Este resultado é interessante, pois a difusão de reagentes e produtos são fatores importantes em processos biocatalíticos. (Ver item **4.5.4** pg. 76)

Para analisar também as características morfológicas dos filmes com a LBC imobilizada, fez-se as micrografias de superfície e fratura do sistema LBC/gengibre. **Figura 22**

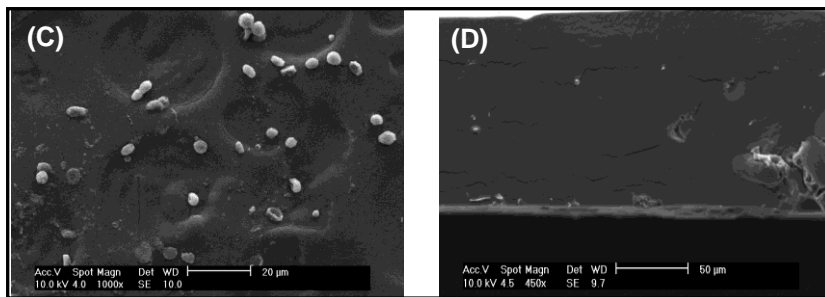


Figura 22. Microscopia eletrônica de varredura. **(C)** filme de LBC/gengibre - superfície (1000x), **(D)** filme de LBC/gengibre - fratura (450x). [LBC (60 mg), gengibre (1 g)].

Pode-se notar que na superfície do filme **(C)**, e dependendo da região analisada, observam-se pequenos grãos. Estes podem ser provenientes de grãos de amido que não foram dissolvidos completamente, uma vez que o filme de amido de gengibre puro também apresentou grãos aglomerados em sua superfície. Porém, estes podem ser também da lipase de LBC, pois analisando a microscopia de fratura do mesmo filme **(D)** não foi possível observar a presença da LBC em seu interior.

Este fato indica que a LBC está provavelmente adsorvida principalmente na superfície dos filmes de amidos ou da blenda.

Resultados similares foram observados por Crespo e col. na imobilização das lipases de *Candida cylindracea* e da Pancreática do porco em filmes de poli(óxido de etileno) (PEO), ou seja, as lipases localizam-se preferencialmente na superfície do material polimérico.⁽⁷²⁾

4.2 Determinação do teor de água nos filmes

O teor de água nos filmes de amido de taro, cará e gengibre foi determinado pelo método de titulação Karl-Fischer. Os filmes preparados com 60 mg de LBC e sem a mesma apresentaram 10,9-14,0% de água. Estes valores estão mostrados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Determinação do teor de água nos filmes de amido com e sem lipase.

Sistemas	Teor de água (%)
cará	14,0
LBC/cará	10,9
taro	11,8
LBC/taro	12,6
gengibre	13,1
LBC/gengibre	12,5

Os resultados apresentados na **Tabela 2** estão de acordo com alguns descritos da literatura, pois já está estabelecido que as enzimas necessitam de uma quantidade mínima de água para manutenção da conformação nativa, e assim da sua atividade catalítica. ^(11; 39)

A preservação da atividade catalítica poderá ser avaliada melhor, quando estes sistemas biocatalíticos forem empregados nas reações de esterificação e transesterificação.

4.3 Efeito do solvente e da temperatura nos filmes de amido

Os filmes de amido de taro, cará e gengibre sem lipase foram submetidos aos testes de temperatura e de estabilidade em diversos solventes orgânicos.

A influência da temperatura foi analisada para observar se ocorreria ou não decomposição dos filmes em temperaturas mais elevadas que a ambiente. Os filmes foram aquecidos com *n*-hexano, em banho-maria até 80-90°C por 30 minutos. Após este tempo não houve mudança significativa no aspecto macroscópico, verificando assim que estes são resistentes a altas temperaturas.

Os outros solventes utilizados para verificar a estabilidade dos filmes foram o *n*-heptano, etanol, acetonitrila, diclorometano (CH₂Cl₂), éter etílico e éter *t*-butil metílico (MTBE).

Os filmes foram colocados em tubos de ensaio com 1 mL dos solventes citados acima por 24 h a temperatura ambiente. Todos permaneceram estáveis, sem alterações macroscópicas. Assim, estes solventes poderão ser usados nas reações de obtenção de ésteres de aroma derivados do geraniol e na resolução dos álcoois racêmicos.

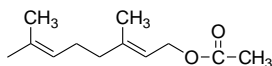
4.4 Reações de transesterificação e esterificação do geraniol

Conforme citado, neste trabalho foram estudadas as reações de transesterificação do acetato de vinila com o geraniol (**Esquema 8**, pg 41), bem como a reação de esterificação dos ácidos propiônico, butírico, hexanóico, caprílico, cáprico, láurico, palmítico e esteárico com este álcool (**Esquema 9**, pg 41).

As duas reações foram realizadas utilizando-se a LBC imobilizada em filmes de amido de taro e cará como catalisadores. Os parâmetros experimentais que foram avaliados serão apresentados nos próximos itens.

4.4.1 Efeito da massa da LBC e reutilização dos filmes de amido de cará e taro

Neste estudo analisou-se a conversão em acetato de geranoíla (**23**), variando-se a massa de LBC e a possibilidade de reutilização dos filmes após estocagem.



23

A **Figura 21** mostra a conversão em **23** em função da massa de LBC imobilizada em filme de amido de taro e do número de reutilizações deste sistema.

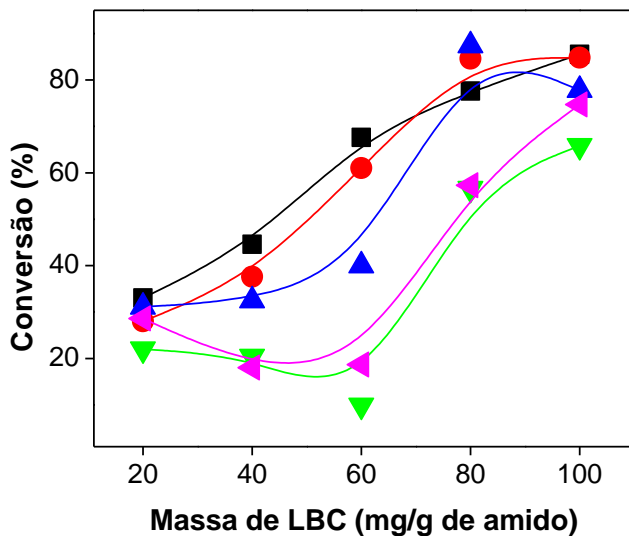


Figura 23. Variação na conversão ao produto **23** em função da massa de LBC imobilizada em filme de amido de taro e da reutilização. [**22** (0,9 mL, 5 mmol), **4** (0,5 mL, 5 mmol), *n*-hexano (25 mL), 35 °C, 72-96 h, número de utilizações dos filmes: ■ (1ª); ● (2ª); ▲ (3ª); ▼ (4ª) e ▲ (5ª)].

Na primeira utilização, após 72 h, as conversões em **23** variaram de 33-85%, dependendo da massa de LBC. A menor conversão foi de 33,0% com 20 mg de LBC e a maior de 85,5% com 100 mg da mesma. Este resultado demonstra que a conversão em éster foi dependente da massa de lipase utilizada.

Após esta primeira reação foram feitas mais duas reutilizações utilizando o sistema acima, porém em 96 h de reação. As conversões variaram de 28-87%, sendo que a menor foi de 28% com 20 mg de LBC na primeira reutilização e a maior foi de 87,4% com 80 mg de LBC, no segundo reuso.

Para a terceira e quarta reutilização, os filmes foram estocados em geladeira a temperatura de 10-15 °C com *n*-hexano por um período de 110 e 730 dias, respectivamente. Após esse período, as conversões na terceira reutilização variaram de 10-

65%, em 96 h. Na quarta reutilização do sistema LBC/taro, a menor conversão obtida ao produto **23** foi de 18,0% com 40 mg de LBC e a maior de 74,7% com 100 mg da lipase, em 96 h.

Resultados semelhantes foram obtidos quando a lipase LBC foi imobilizada em filme de cará. **Figura 24**

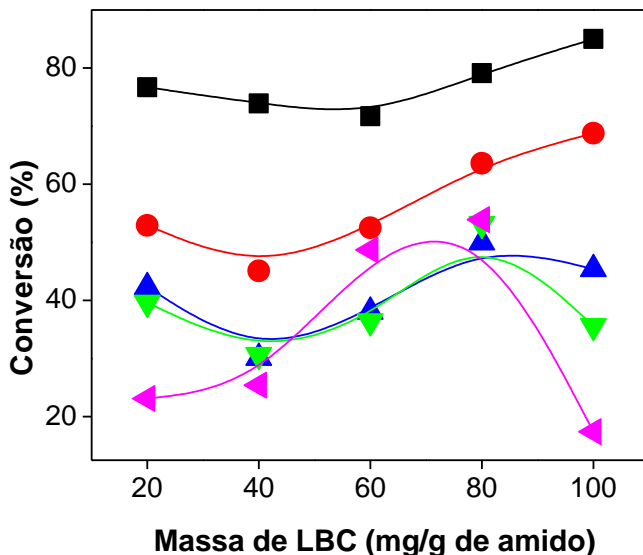


Figura 24. Variação na conversão ao produto **23** em função da massa de LBC imobilizada em filmes de amido de cará e da reutilização, [22 (0,9 mL, 5 mmol), 4 (0,5 mL, 5 mmol), *n*-hexano (25 mL), 35 °C, 72-144 h, número de utilizações dos filmes: ■ (1ª); ● (2ª); ▲ (3ª); ▼ (4ª) e ◄ (5ª)].

Na primeira utilização, após 144h de reação, pode-se observar que as conversões ao produto **23** variaram de 71-85%, sendo que a menor foi de 71,7% com 60 mg de LBC e a maior de 85,0% com 100 mg. Após esta primeira reação, foram feitas mais duas reutilizações com este sistema. A primeira foi em 96 h e a segunda em 72 h. As conversões variaram de 30-68%, sendo que a menor foi de 30,1% com 40 mg de LBC na segunda reutilização, e a maior de 68,8% com 100 mg na primeira reutilização.

Estes filmes foram também estocados em *n*-hexano, a temperatura de 10-15 °C para serem reutilizados novamente. Após 81 dias de estocagem as conversões ao produto **23** variaram de 30-53%, e após 730 dias a menor conversão foi de 17,4% utilizando 100 mg de LBC e a maior de 53,9% com 80 mg de LBC.

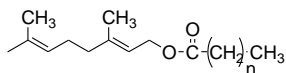
Nota-se que em algumas reutilizações dos sistemas LBC/taro e LBC/cará obtiveram-se conversões ao produto **23** maiores do que na utilização anterior. Este é um resultado inesperado, pois é previsto a manutenção ou diminuição da atividade catalítica da LBC, após o uso. Pode-se explicar esse fato através da lavagem não adequada dos filmes, podendo ter ficado produto e/ou reagentes das reações anteriores.

Estes resultados mostram também que a imobilização da LBC em filmes de amido de taro e cará é vantajosa, e que a estocagem mesmo após um período muito longo e em baixas temperaturas não alterou significativamente a atividade catalítica da mesma. A manutenção da estabilidade da LBC deve ter ocorrido devido à proteção do solvente orgânico externo e a presença de certa quantidade de água presente nos filmes (10-14%). Conforme discutindo anteriormente a presença de certa quantidade de água é importante também para preservar a estrutura terciária da lipase, bem como a do sítio ativo.

Resultados similares foram obtidos com a lipase de *P. cepacia* e de *R. oryzae* imobilizadas em filmes de caseinato de sódio na síntese do oleato de *n*-pentila, em diferentes solventes orgânicos. ⁽⁴⁾

4.4.2 Efeito do tamanho da cadeia alquílica e do tempo na reação de esterificação para obtenção de alcanos de geranoíla

As reações para a obtenção dos propanoato **24**, butanoato **25**, hexanoato **26**, octanoato **27**, decanoato **28**, lauriato **29**, palmitato **30** e estearato de geranoíla **31** foram realizadas utilizando como catalisador a lipase de *B. cepacia* (LBC) imobilizada em filmes de amido de taro e de cará. (**Esquema 9**, pg. 41). Para analisar o efeito do tempo nesta reação, retiraram-se alíquotas de 3 mL após 24, 48 e 144 h.



24-31

(24) n=1 (25) n=2 (26) n=4 (27) n=6 (28) n=8 (29) n=10 (30) n=14 (31) n=16

Utilizando-se como catalisador o sistema LBC/cará as conversões obtidas aos produtos **24**, **25** e **26** foram de 28–30%, 44–53% e de 83–90% em 24, 48 e 144h, respectivamente. **Figura 25**

Com o sistema LBC/taro as conversões aos mesmos produtos variaram de 14–50%, 30–80% e de 85–90% em 24, 48 e 144h, respectivamente. **Figura 26**

As conversões aumentaram em função do tempo, mostrando a influência deste parâmetro na conversão ao éster. As maiores conversões com ambos os sistemas foram de 83-90%, após 144 h, independente do tamanho da cadeia alquílica do ácido carboxílico.

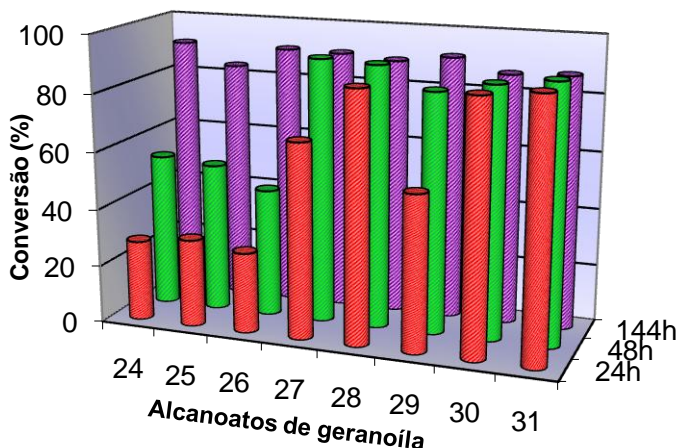


Figura 25. Conversão aos alcanoatos de geranoíla **24-31** em função do tamanho da cadeia alquílica dos doadores acilas e do tempo de reação, utilizando como catalisador o sistema LBC/cará. [22 (0,9 mL, 5 mmol), doadores acila (5 mmol), LBC (60 mg/g de amido), *n*-hexano (25 mL), 35 °C].

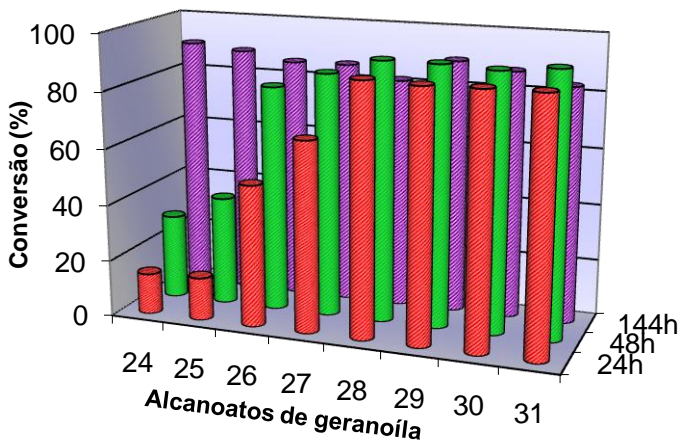


Figura 26. Conversão aos alcenoatos de geranoíla **24-31** em função do tamanho da cadeia alquílica dos doadores acilas e do tempo de reação, utilizando como catalisador o sistema LBC/taro. [22 (0,9 mL, 5 mmol), doadores acila (5 mmol), LBC (60 mg/g de amido), *n*-hexano (25 mL), 35 °C].

A formação dos alcenoatos de geranoíla de cadeia alquílica maiores, tais como **27-31** não foi dependente do tempo e os ésteres foram obtidos com boas conversões, após 24 h. Utilizando os sistemas LBC/cará e LBC/taro foram de 54-91% e 67-92% respectivamente, nos períodos de 24, 48 e 144 h.

Para melhor comparação do grau de conversão aos correspondentes alcenoatos de geranoíla em função do tamanho da cadeia alquílica do ácido, os resultados foram avaliados em 48 h.

Com os sistemas LBC/taro e LBC/cará as conversões aos alcenoatos de geranoíla **27-31**, foram de 83,3 a 92,6%.

Com o sistema LBC/taro a maior conversão foi obtida na reação de esterificação do ácido esteárico e a menor do propiônico, sendo de 92,6 e 30,7%, respectivamente. A conversão em alcenoatos de geranoíla utilizando este sistema foi superior a 90%, quando o doador acila variou de C10 a C18.

Com o sistema LBC/cará a maior conversão foi obtida para o octanoato de geranoíla e a menor para o hexanoato de geranoíla, sendo respectivamente de 91,7 e 44,7%.

Resultados similares foram reportados na literatura. Segundo diversos autores, a afinidade entre o doador acila e a enzima que ocorre na primeira etapa de reação formando o “complexo acil-enzima” é fundamental para o decorrer da mesma. Cadeias alquílicas pequenas podem inibir a atividade catalítica das lipases através da reação com o resíduo da serina no sítio ativo e podem também ocasionar danos na camada de hidratação na estrutura protéica, resultando numa diminuição parcial ou total da atividade catalítica. Esse efeito negativo pode ser atribuído a alta polaridade de substratos com cadeias alquílicas menores, o que ocasiona uma partição (migração) do ácido para a fase sólida (enzima/ suporte), resultando numa saturação do micro-ambiente da enzima. Desta forma, uma certa quantidade de água contida na preparação enzimática pode ser removida, podendo diminuir a atividade catalítica das lipases. ^(4; 11; 73; 74; 75)

Doadores acila com cadeias alquílica muito grandes, por ex. superiores a 20 átomos de carbonos, podem por efeito estérico dificultar a formação do “complexo acil-enzima” e assim, formar os correspondentes produtos em conversões menores. ^(11; 73)

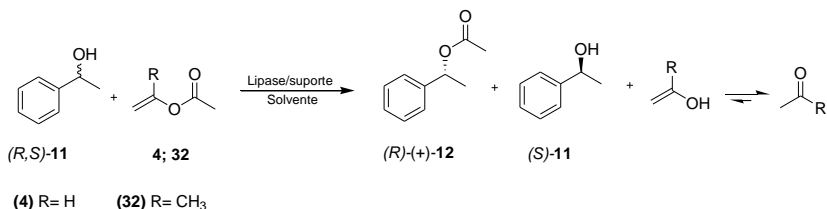
A utilização dos filmes de amido de taro e cará como suporte para imobilização da lipase de *B. cepacia* mostrou-se promissora. Os ésteres de aroma derivados do geraniol foram obtidos, em geral, com conversões elevadas. Portanto considerando a boa estabilidade da LBC imobilizada nestes filmes, estes sistemas serão usados nos estudos de resolução enzimática de álcoois secundários.

4.5 Resolução enzimática do (R,S)-1-feniletanol

Como já citado, neste trabalho também foi estudada a resolução enzimática do (R,S)-1-feniletanol (**11**) com acetato de vinila (**4**) ou de *iso*-propenila (**32**) em diferentes solventes orgânicos e/ou em misturas de solvente orgânico com líquido iônico ou glicerol.

Foram usadas diferentes lipases livres ou imobilizadas em filmes de amido de taro, gengibre ou gengibre:poli(óxido de etileno) (PEO), em várias condições experimentais. **Esquema 10**

Os resultados serão discutidos e comparados com outros já reportados pela literatura.



Lipases = lipases de *C. antarctica* (CALB), *B. cepacia* (LBC), *R. oligosporus* (LRO), *A. niger* (LAN) e a de *C. viscosum* (LCV) e os micélios UEA 53 e UEA 115.

Solventes = *n*-heptano, *n*-hexano, CH₂Cl₂, éter etílico, acetonitrila, 1,4-dioxano, glicerol.

Líquido iônico = hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIm][PF₆].

Esquema 10. Reação de transesterificação enantiosseletiva do (*R,S*)-1-feniletanol (**11**) catalisada por lipases.

Outro estudo realizado foi a resolução enzimática de derivados do álcool (*R,S*)-**11** com o acetato de vinila, catalisada pela lipase de *B. cepacia* imobilizada em filmes de amido de gengibre:PEO. (**Esquema 11**, pg. 79)

Para estes experimentos os reagentes e padrões foram preparados e caracterizados conforme descrito nos itens **3.7.6** e **3.7.7**.

Após a purificação do acetato de 1-feniletila (**12**), determinou-se por polarimetria a rotação óptica específica do éster, obtendo-se $[\alpha]_D^{25} = +36$ [0,03 CHCl₃]. Através da comparação com dados da literatura para o (*R*)-acetato de 1-feniletila, cujo valor de $[\alpha]_D^{23}$ é de +43 [2,1 CHCl₃] ⁽⁷⁶⁾, confirmou-se a configuração absoluta do éster (*R*)-(+)-**12** como produto da reação de transesterificação. A diferença no valor de α obtido com o reportado na literatura pode ser devido a impurezas ainda presentes no produto ou as diferenças das condições experimentais empregadas, tais como concentração e temperatura. O composto (*R*)-(+)-**12** também foi caracterizado por RMN-¹H e IV.

As **Figuras 27** e **28** mostram respectivamente o espectro de RMN-¹H e de IV para o produto (*R*)-(+)-**12**. Através das áreas

dos picos e regiões características dos hidrogênios, bem como das análises das bandas na região do IV, é possível identificar e caracterizar este composto.

Os picos nas regiões de 7,26-7,34 ppm foram atribuídos aos 5 hidrogênios relativos ao anel aromático que está representado por um multipletto, H₃ a H₇. O quarteto em 5,8 ppm corresponde ao hidrogênio H₁ do carbono ligado ao oxigênio, o singletto na região de 2,0 ppm corresponde aos hidrogênios H₈ do grupo metila ligado a carbonila do éster e o dublete em 1,5 ppm corresponde aos hidrogênios H₂ do outro grupo metila. **Figura 27**

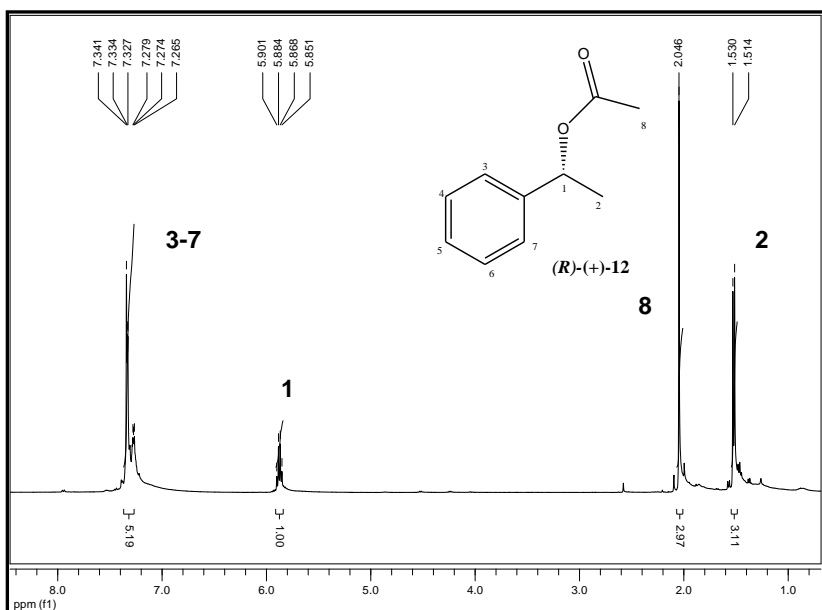


Figura 27. Espectro de RMN-¹H do (*R*)-(+)-acetato de 1-feniletila (**12**) [400 MHz, CDCl₃].

Analisando a **Figura 29**, observam-se na região de 3086-2871 cm⁻¹ as bandas características das ligações C-H de alifáticos, em 1744 cm⁻¹, tem-se o estiramento correspondente a carbonila de éster alifático (C=O) e em 1241 cm⁻¹ o estiramento da ligação C-O também de éster.

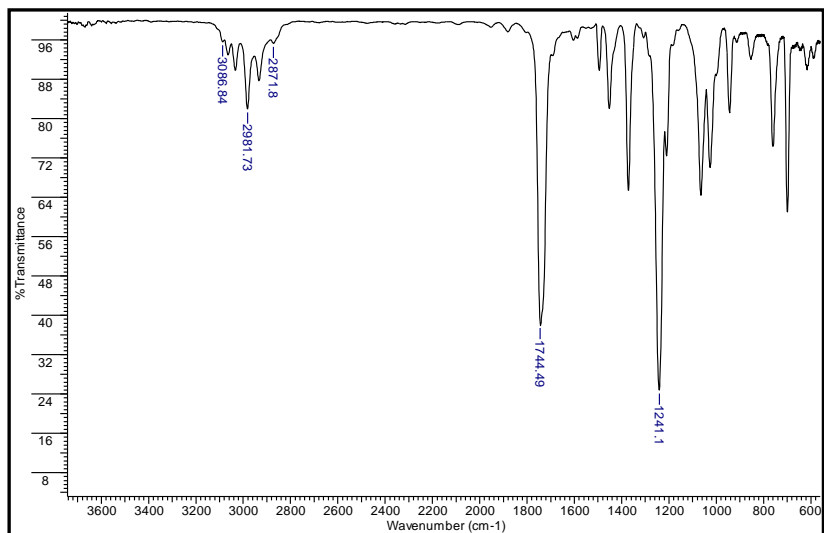


Figura 28. Espectro de IV do (*R*)-(+)-acetato de 1-feniletila (**12**). (filme)

A **Figura 29** mostra o cromatograma do padrão racêmico do (*R,S*)-acetato de 1-feniletila (**21**) obtido pelo método químico, e o de uma alíquota da reação enzimática demonstrando a alta enantiosseletividade com relação ao produto (*R*)-(+)-**12**.

A literatura mostra que além da lipase de *B. cepacia*, as de *C. rugosa*, *C. antarctica* e de *A. niger* também possuem este-reopreferência para o isômero-*R*, tanto para a resolução de álcoois secundários, bem como para algumas aminas alquil-arílicas. (77; 78; 79)

Após a purificação e caracterização do éster (*R*)-(+)-**12**, fez-se a reação de resolução enzimática do (*R,S*)-1-feniletanol (**11**) utilizando-se como catalisadores os sistemas LBC/taro ou LBC/gengibre em diferentes condições experimentais.

Os itens a seguir apresentam os resultados obtidos.

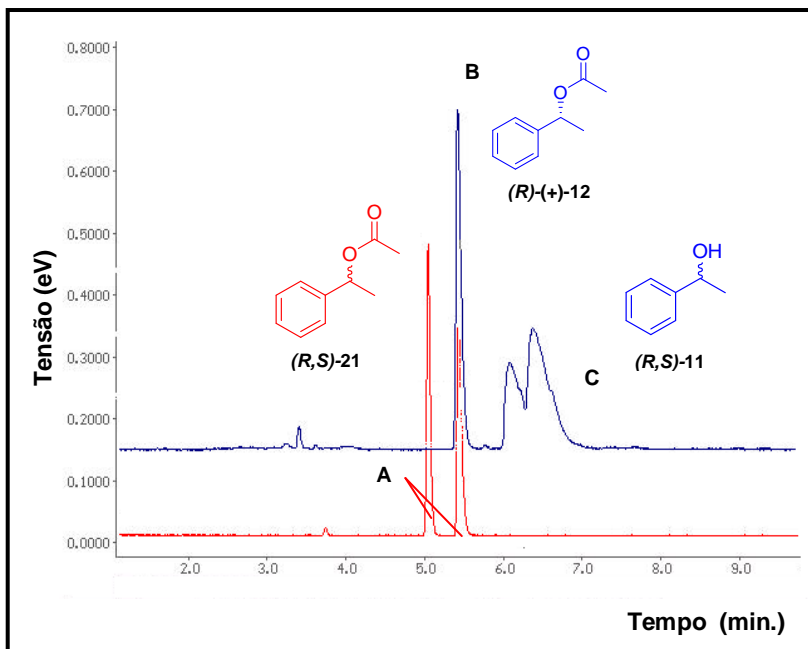


Figura 29. Cromatograma do padrão racêmico *(R,S)*-**21** e de uma alíquota da reação enzimática para obtenção do *(R)*-(+)-**12**. [A *(R,S)*-**21**, B *(R)*-(+)-**12**, C *(R,S)*-**11**].

4.5.1 Efeito da razão molar do acetato de vinila e de isopropenila na obtenção do *(R)*-(+)-acetato de 1-feniletila

A afinidade entre o doador acila e a enzima é de grande importância para a formação do intermediário “acil-enzima”. Devido às suas características e alta reatividade, os ésteres enólicos ativados como, por exemplo: os acetato de vinila e de isopropenila, são amplamente utilizados neste tipo de reação.

A razão molar entre álcool e doador acila também é um dos parâmetros mais importantes investigados nas reações de transesterificação enzimática, pois como a reação é reversível, espera-se que um aumento na concentração de doador acila desloque o equilíbrio para a formação dos produtos.

Para investigar este efeito na resolução do *(R,S)*-1-feniletanol (**11**) foram utilizadas diferentes razões molares de **11** e de acetato de vinila (**4**), sendo de 1:1; 1:2; 1:5; 1:8 e 1:10

mmol de cada. Como catalisador da reação foi utilizada a LBC imobilizada em filmes de taro e de gengibre.

As **Figuras 30** e **31** mostram os resultados obtidos ao utilizar os filmes de amido de taro e gengibre, respectivamente.

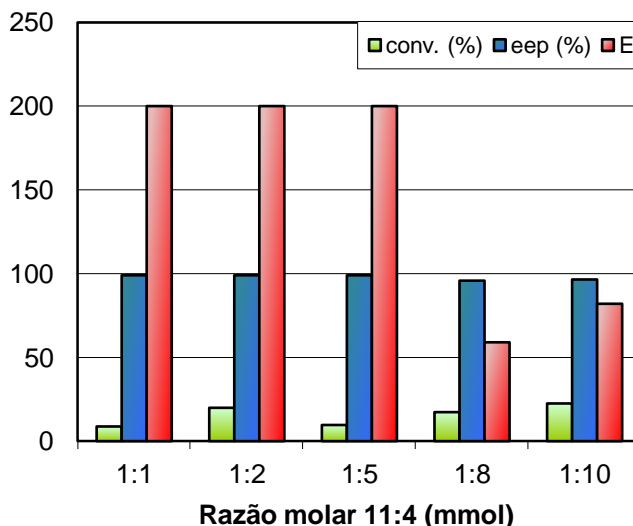


Figura 30. Efeito da razão molar de 11:4 na obtenção do éster (*R*)-(+)-12, catalisada por LBC/taro. [(*R,S*)-11 (0,6 mL, 5 mmol); 4 (0,5-4,6 mL, 5-50 mmol), LBC (60 mg/g amido), *n*-hexano (25 mL), 35 °C, 48 h].

As conversões ao éster (*R*)-(+)-12 variaram de 8,7-22,5%, sendo a menor com a proporção de 1:1 e a maior com 1:10 mmol de (*R,S*)-11:4, respectivamente. Em geral, a conversão em éster aumentou, porém com pouca variação, conforme foram utilizadas razões molares maiores de acetato de vinila.

Ao utilizar as proporções de 1:1; 1:2; ou 1:5 mmol obteve-se ee_p > 99% e E > 200, mantendo a seletividade com relação ao éster (*R*)-(+)-12. Com as razões molares de 1:8 e 1:10, observou-se uma diminuição na seletividade, sendo de 59 e 82, respectivamente. **Figura 30**

Resultados semelhantes foram obtidos o sistema LBC/gengibre. A menor conversão foi de 7,7% utilizando a razão molar de 1:1 mmol e a maior foi de 24,1% com a razão molar 1:8. Somente ao utilizar a razão molar de 1:1 obteve-se $ee_p > 99$ e $E > 200$. Observou-se que a seletividade com relação ao éster (*R*)-(+)-**12** diminuiu conforme aumentou-se a proporção de acetato de vinila na reação. **Figura 31**

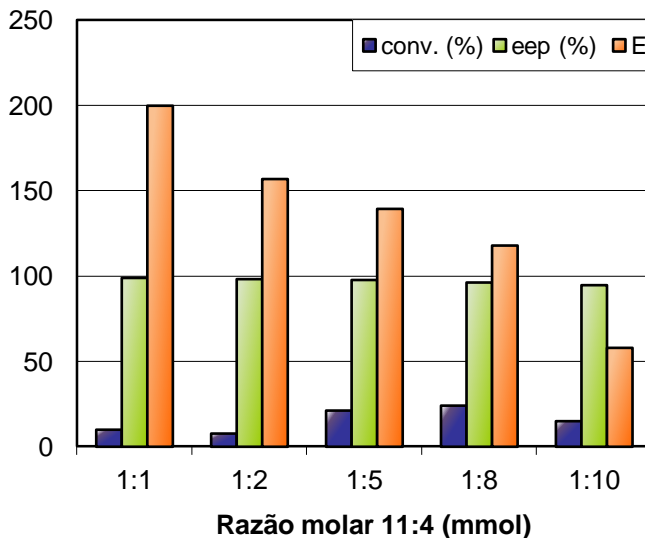


Figura 31. Efeito da razão molar de 11:4 na obtenção do éster (*R*)-(+)-**12**, catalisada por LBC/gengibre. [(*R,S*)-**11** (0,6 mL, 5 mmol); **4** (0,5-4,6 mL, 5-50 mmol), LBC (60 mg/g amido), *n*-hexano (25 mL), 35 °C, 48 h].

Como esperado, foram obtidas maiores conversões ao éster (*R*)-(+)-**12** quando aumentou a proporção de acetato de vinila na reação catalisada pela lipase LBC, imobilizada tanto em filmes de amido de taro quanto de gengibre.

Segundo Habulin *et al.* que em seus estudos também investigaram o efeito da razão molar do acetato de vinila na resolução do (*R,S*)-1-feniletanol, foi sugerido que um rápido acúmulo do intermediário “acil-enzima” formado na primeira etapa de rea-

ção, favorece o ataque nucleofílico do álcool e assim são obtidas maiores conversões em éster.⁽⁸⁰⁾

Porém, a seletividade da reação com relação ao enantiômero (*R*) foi mantida apenas com razões molares de **11:4** mais baixas, dependendo do sistema catalítico empregado. A utilização de proporções de acetato de vinila muito elevadas é uma desvantagem com relação à seletividade do processo biocatalítico. Esta diminuição pode estar relacionada também com a formação do subproduto acetaldeído, pois este é tóxico para as enzimas.^(11; 80)

Em outro estudo foi investigado o efeito do acetato de *iso*-propenila (**32**) na obtenção do acetato de 1-feniletila (**12**) utilizou-se a razão molar 1:1 de (*R,S*)-**11:32**. Foram avaliados também o tempo de reação e a reutilização do sistema LBC/gengibre. Retiraram-se alíquotas de 3 mL em 24, 48, 72 e 96 h e estas foram analisadas por CGQ. Os resultados obtidos estão apresentados na

Figura 32.
Analisando a

Figura 32 pode-se observar que utilizando o sistema LBC/gengibre as conversões ao produto (*R*)-(+)-**12** foram dependentes do tempo e da reutilização do sistema, variando de 5,7-12,6% na primeira utilização e de 4,1-9,8% quando o sistema foi reutilizado.

A menor conversão ao produto foi de 4,1%, em 24 h no segundo uso do sistema LBC/gengibre e a maior foi de 12,6% após 96 h no primeiro uso. Estes resultados mostram que a reutilização dos filmes de amido de gengibre com a LBC é vantajosa, uma vez que a conversão ao produto manteve-se praticamente inalterada e a seletividade da reação foi mantida na primeira e segunda utilização, sendo $ee_p > 99$ e $E > 200$.

A conversão em éster (*R*)-(+)-**12** com acetato de *iso*-propenila (7,8%) foi semelhante a obtida com o acetato de vinila (7,7%), em *n*-hexano, 48 h.

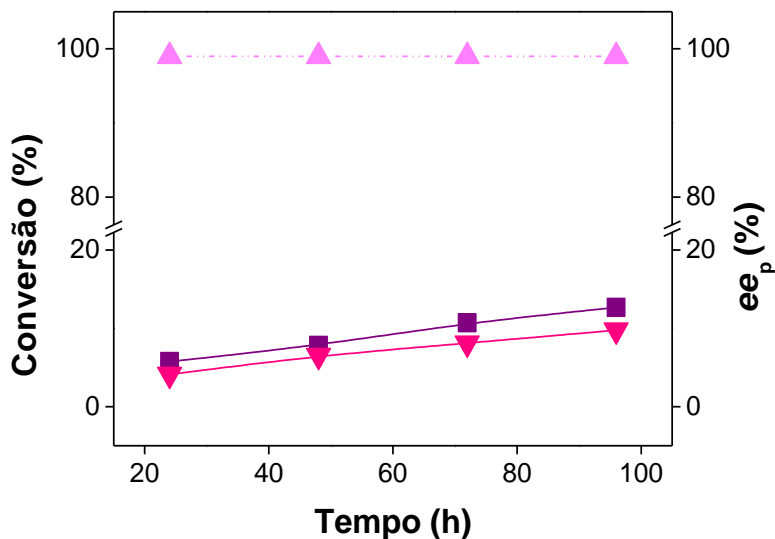


Figura 32. Variação na conversão em (*R*)-(+)-**12** com acetato de *iso*-propenila em função do tempo e reutilização do sistema LBC/gengibre. [(*R,S*)-**11** (0,6 mL, 5 mmol), **32** (0,6 mL, 5 mmol),

LBC (60 mg/g de amido), *n*-hexano (25 mL), t.a., ■ (1ª uso); ▼ (2ª uso); ▲ (eep)].

A utilização destes ésteres enólicos ativados é de grande interesse, pois os álcoois vinílico formados, rapidamente se tautomerizam para acetaldeído ou acetona, respectivamente, não atuando mais como substrato para a enzima. Porém, a sua concentração não deverá ser muito alta para evitar a diminuição da atividade e seletividade da enzima, devido a formação do acetaldeído, conforme já discutido e reportado por vários autores. ^(76; 80)

De los Ríos e *col.* também investigaram o efeito de diferentes ésteres vinílicos tais como o acetato, propionato, butirato, decanoato, laurato, acrilato e metacrilato de vinila na resolução enzimática do (*R,S*)-1-butanol catalisada pela lipase de *C. antarctica* (CALB). Foram avaliados diferentes tamanhos de cadeia aquílicas dos doadores acilas. As maiores conversões em éster foram de 45,9, 77,7 e 79,1%, utilizando os acetato, propionato e butirato de vinila, respectivamente. ⁽⁸¹⁾

De maneira geral, neste trabalho as conversões ao éster (*R*)-(+)-**12** não mostraram dependência com relação ao doador acila utilizado, com o tempo de reação e também não foi observada uma grande diferença na conversão ao produto utilizando os sistemas LBC/taro ou LBC/gengibre. Sendo assim, foi escolhido para os estudos subseqüentes o emprego do acetato de vinila na razão molar de 1:1 de (*R,S*)-**11:4**, em 24 h e como catalisador, a lipase de LBC imobilizada em filmes de amido de gengibre.

4.5.2 Emprego de diferentes lipases na resolução enzimática do (*R,S*)-1-feniletanol

O interesse na exploração da biodiversidade e utilização de lipases de diferentes procedências como biocatalisadores, tem aumentado constantemente. O uso de lipases comerciais ou não, torna-se uma alternativa mais “limpa” ao emprego de métodos catalíticos químicos. ^(16; 17; 65; 78)

Tendo em vista estes fatores, utilizaram-se lipases de diferentes procedências imobilizadas em filme de amido de gengibre como catalisadores na reação de transesterificação do (*R,S*)-1-

feniletanol (**11**) com o acetato de vinila (**4**). Para fins comparativos fez-se a reação sem a presença da lipase e/ou sem imobilizá-la. Com o sistema LBC/gençibre analisou-se também a influência da temperatura na obtenção do acetato de 1-feniletila (**12**). Os resultados obtidos encontram-se na

Tabela 3.

Tabela 3. Conversão ao (*R*)-(+)-**12** utilizando lipases de diferentes procedências.

Enzimas	c (%)	ee _s (%)	ee _p (%)	E
LCV ^a	53,4	89,4	85,9	39
LRO ^a	14,0	13,5	> 99	> 200
LAN ^a	56,1	> 99	97,6	> 200
LBC ^a	55,4	94,6	98,6	> 200
CALB ^a	50,9	96,6	98,6	> 200

UEA_53 ^a	0,2	1,9	> 99	> 200
UEA_115 ^a	3,5	6,5	> 99	> 200
LCV/geng ^a	5,5	3,5	> 99	> 200
LRO/geng ^a	0,8	3,6	> 99	> 200
LAN/geng ^a	10,0	8,2	> 99	> 200
LBC/geng ^a	3,1	17,7	> 99	> 200
LBC/geng ^b	13,0	27,3	> 99	> 200
Sem lipase ^b	-	-	-	-

(*R,S*)-**11** (0,6 mL, 5 mmol), **4** (0,5 mL, 5 mmol), LCV (20 mg), LBC, LAN, LRO, CALB, UEA_53 e UEA_115 (60 mg), *n*-hexano (25 mL), ^a 35 °C, ^bt.a., 96 h.

Pode-se observar pelos dados da

Tabela 3, que a reação feita na ausência do catalisador não formou o produto após 96 h de reação, demonstrando que a utilização do mesmo é indispensável para a obtenção do éster.

Utilizando-se as lipases de *C. antarctica* (CALB-10,000 PLU g⁻¹), *B. cepacia* (LBC-30,000 U g⁻¹), *C. viscosum* (LCV-5138,7 U mg⁻¹), *R. oligosporus* (LRO-14,9 U mL⁻¹) e de *A. niger* (LAN-18,4 U mL⁻¹) na forma livre, foram obtidas boas conversões ao éster (*R*)-(+)-**12**. Apesar de estas lipases apresentarem atividades catalíticas distintas, em geral, as conversões ao produto foram próximas ou superiores a 50%, sendo a menor de 14,0% com a LRO e a maior de 56,1% utilizando a lipase LAN, em 96 h de reação. Os valores de ϵ_e e E foram respectivamente de 85,9-

99% e de 39-200, sendo considerados bons em processos biocatalíticos.

Estes resultados estão de acordo com outros reportados na literatura para a resolução enzimática do (*R,S*)-1-feniletanol, utilizando diversas lipases na forma livre. ^(76; 82; 83; 84)

Chênevert e col. investigaram a resolução enzimática do (*R,S*)-1-feniletanol com acetato de vinila utilizando as lipases de *C. antarctica*, *B. cepacia* e de *C. rugosa*. Com estas lipases as conversões ao acetato de 1-feniletila foram de 45 ($ee_p > 98$), 45 ($ee_p 98$) e 30% ($ee_p 21$), respectivamente. ⁽⁷⁶⁾

De Souza e col. também investigaram o efeito da utilização de lipases comerciais como catalisadores na reação de obtenção do éster (*R*)-(+)-**12**. As conversões foram dependentes da temperatura e da lipase empregada, sendo as maiores de 54, 33 e 23% utilizando-se as lipases de *C. antarctica* (CALB), *P. cepacia* (PS-CI) e de *P. fluorescens* (lipase AK), respectivamente, a 40 °C. ⁽⁸⁴⁾

Quando os micélios UEA_53 e UEA_115 foram usados, as conversões ao produto foram menores sendo de 0,2 e 3,5%, respectivamente. Porém a enantiosseletividade da reação foi mantida, sendo $ee_p > 99$ e $E > 200$.

Zanotto e col. utilizaram diferentes micélios como catalisadores na resolução do 2-octanol com acetato de vinila. As maiores conversões ao correspondente éster foram de 18 e 22%, após 120 h de reação, utilizando-se também os micélios 53 e 115, respectivamente. ⁽⁶⁵⁾

Apesar da utilização das lipases na sua forma livre apresentarem boas conversões ao éster (*R*)-(+)-**12**, algumas desvantagens são observadas como por exemplo, a diminuição na enantiosseletividade da reação. Além disto, a reutilização dos biocatalisadores é dificultada, aumentando os custos do processo. Visando minimizar estas desvantagens, pode-se empregar técnicas de imobilização.

Para investigar este efeito, fez-se a mesma reação com as lipases LCV, LRO, LAN e LBC imobilizadas em filmes de amido de gengibre. Com o sistema LBC/gengibre a reação foi realizada em duas temperaturas, a 35 °C e a temperatura ambiente (~ 20 °C). As conversões ao éster (*R*)-(+)-**12** utilizando as lipases imobilizadas foram de baixas a moderadas, sendo a menor de 0,8%

com o sistema LRO/gengibre, a 35 °C e a maior de 13% com o sistema LBC/gengibre, a temp. ambiente.

Dalla-Vecchia e *col.* em seus estudos propuseram que a interação entre enzima e suporte deve ser efetiva, deixando-a acessível aos substratos, mantendo sua atividade por um longo período e permitindo que o sistema (suporte/enzima) seja regenerado ao final. ⁽⁷³⁾

A presença de cerca de 10% de água no filme de amido, como já discutido no item **4.3** (pg. 52), ajuda a preservar a atividade catalítica da LBC. Porém visando melhorar as conversões ao éster (*R*)-(+)-**12** outros parâmetros foram avaliados como, por exemplo, a utilização de misturas de polímeros (blendas) como suporte para a LBC, o uso de diferentes solventes orgânicos e/ou meios reacionais e a influência do tempo.

Para estes estudos, realizou-se a reação de resolução do (*R,S*)-1-feniletanol com a LBC imobilizada em filmes de amido de gengibre ou em mistura com poli(óxido de etileno) (PEO), a temperatura ambiente.

4.5.3 Efeito do solvente orgânico

Os critérios mais importantes para a seleção do solvente orgânico em reações catalisadas por enzimas são a alta capacidade de solubilizar tanto o produto e o substrato, bem como a biocompatibilidade. Entretanto, outras características são desejáveis, tais como estabilidade química e térmica, baixa tendência de formar emulsão com a água, não biodegradabilidade, baixa periculosidade no manuseio, toxicidade e preços baixos. ^(1; 85)

O parâmetro mais frequentemente utilizado para classificar os solventes orgânicos em termos de biocompatibilidade é o $\log P$, que é definido como logaritmo do coeficiente de partição do solvente no sistema octanol/água. ⁽⁸⁶⁾

Para avaliar o efeito do solvente na reação de transesterificação do (*R,S*)-1-feniletanol (**11**) com acetato de vinila (**4**) catalisada pela LBC imobilizada em filme de amido de gengibre, foram utilizados solventes de diferentes polaridades ($4,0 < \log P > -1,1$) e misturas de solventes como *n*-hexano/[BMIm][PF₆] e *n*-hexano/glicerol. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Efeito do solvente orgânico na conversão ao (*R*)-(+)-**12**, utilizando o sistema LBC/gengibre.

Solventes	log ₍₈₆₎ <i>P</i>	<i>c</i> (%)	<i>ee</i> _s (%)	<i>ee</i> _p (%)	<i>E</i>
<i>n</i> -heptano	4,0	11,7	24,9	91,3	27
<i>n</i> -hexano	3,5	11,3	35,4	> 99	> 200
CH ₂ Cl ₂	1,5	1,3	16,8	>99	>200
éter etílico	0,83	1,4	14,7	>99	>200
acetonitrila	-0,33	4,7	14,7	>99	>200
1,4-dioxano	-1,1	4,3	13,4	>99	>200
<i>n</i> -hexano/[BMLm][PF ₆] ^a	-	6,1	18,5	>99	>200
<i>n</i> -hexano/glicerol ^a	-	23,0	36	>99	>200

(*R,S*)-**11** (0,6 mL, 5 mmol), **4** (0,5 mL, 5 mmol), LBC/gengibre (60 mg/g de amido), solvente (25 mL) e ^a[10 mL (9:1 v/v)], t.a, 24 h.

Os resultados obtidos demonstram que ao utilizar solventes menos polares ($\log P \geq 3,5$) como *n*-heptano, *n*-hexano as conversões para o acetato de 1-feniletila (**12**) foram moderadas, sendo de 11,3 e 11,7%, respectivamente. Utilizando solventes mais polares ($\log P \leq 1,5$) como CH₂Cl₂, éter etílico, acetonitrila e 1,4-dioxano as conversões foram menores, sendo de 1,3-4,7%. Porém a seletividade ao éster (*R*)-(+)-**12** foi mantida em solventes apolares e polares, com exceção do *n*-heptano que foi um pouco menor, obtendo-se *ee*_p de 91,3% e *E* de 27.

Estes resultados estão de acordo com dados obtidos na literatura. Laane e col. descreveram que a atividade catalítica das enzimas, em geral, é menor em solventes com $\log P < 2$, pois estes são hidrofílicos não sendo adequados para biocatálise porque alteram fortemente a interação água/biocatalisador, tornando-o inativo ou ocasionando desnaturação. A atividade é moderada em solventes com $\log P$ entre 2 e 4, pois estes também são hidrofílicos, mas perturbam menos a interação á-

gua/biocatalisador e alta em solventes com $\log P > 4$, sendo que estes são hidrofóbicos e não alteram estas interações e deixam o biocatalisador no seu estado ativo. ^(1; 86)

A baixa conversão em éster obtida com solventes mais polares deve estar relacionada ao fato destes serem hidrofílicos e assim retirarem a camada de água essencial ao redor da enzima, causando distorção na conformação nativa e, portanto, alteram a atividade catalítica do biocatalisador. ^(1; 11; 87)

Visando melhorar as conversões ao éster (*R*)-(+)-**12** e manter a seletividade, utilizou-se como co-solvente o líquido iônico hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIm][PF₆]. Já está bem relatado na literatura que o uso destes solventes na biocatálise pode aumentar a atividade, seletividade, estabilidade e enantiosseletividade da enzima quando comparado aos solventes orgânicos convencionais, além de poder ser reutilizado. ^(88; 89)

Utilizando a mistura *n*-hexano/[BMIm][PF₆] (9:1 v/v), a conversão ao acetato de 1-feniletila foi de apenas 6,1%, mas com $ee_p > 99\%$ e $E > 200$. Este resultado apesar de ser baixo em termos de conversão, ainda foi melhor que com os obtidos utilizando solventes mais hidrofílicos como, por exemplo, CH₂Cl₂ (1,3%), éter etílico (1,4%), acetonitrila (4,7%) e 1,4-dioxano (4,3%).

Na literatura é descrito que o [BMIm][PF₆] tem comportamento mais hidrofóbico e assim apresenta um comportamento similar aos solventes orgânicos apolares puros em processos biocatalíticos, dependendo da composição no meio reacional. ⁽⁸⁹⁾

Hara e col. investigaram o efeito e a proporção dos líquidos iônicos [EMIm][BF₄] (hidrofílico), [EMIm][Tf₂N] e [BMIm][PF₆] (hidrofóbicos) com tolueno, na resolução enzimática de diferentes álcoois entre eles o (*R,S*)-1-feniletanol com acetato de vinila, catalisada pela lipase de *B. cepacia* imobilizada em CLEA (LBC-CLEA), em 24 h. A conversão em acetato de 1-feniletila foi dependente da mistura de solvente utilizado, sendo de 41, 20 e 11% com as misturas [EMIm][BF₄]:tolueno (1:2), [BMIm][PF₆]:tolueno (1:2) e [EMIm][Tf₂N]:tolueno (2:1), respectivamente. ⁽⁸⁸⁾

A seguir, o glicerol também foi utilizado como co-solvente para investigar seu efeito na resolução do (*R,S*)-**11**. Este solvente tem recebido grande atenção especialmente porque é um subproduto do biodiesel, que pode ser obtido a partir de fontes

renováveis. A combinação água-glicerol leva a um sistema homogêneo e evita as limitações de transferência de massa, que é comum em sistemas bifásicos. Além disso, o glicerol solubiliza vários compostos orgânicos, mas é imiscível com solventes hidrofóbicos, e esta funcionalidade permite que ele possa ser recuperado ao final da reação por simples extração com um solvente hidrofóbico.⁽⁹⁰⁾

Utilizando-se a mistura *n*-hexano/glicerol (9:1 v/v) as conversões ao éster (*R*)-(+)-**12** melhoram consideravelmente, aumentando de 11,3% com o *n*-hexano puro para 23% quando o glicerol foi utilizado como co-solvente. A seletividade da reação manteve-se, sendo $ee_p > 99$ e $E > 200$.

Resultados semelhantes foram obtidos por Andrade e col., que também investigaram a influência do glicerol como co-solvente em estudos de bio-redução enantiosseletiva de cetonas aromáticas empregando-se os microorganismos de *Aspergillus terreus* e de *Rhizopus oryzae*. Ao utilizar o glicerol nestas reações as conversões melhoraram até > 99%, e a enantiosseletividade foi de 99% quando comparadas às reações em solução aquosa ou em outros meios orgânicos, tais como tetrahidrofurano, éter etílico, tolueno, dimetilsulfóxido e acetonitrila.⁽⁹⁰⁾

Este aumento na conversão ao produto utilizando o glicerol deve estar relacionado com o fato deste “mimetizar” o papel da água, que através das ligações de hidrogênio atuam na conservação estrutural do sítio ativo e na manutenção da atividade catalítica e enantiosseletividade da enzima.^(91; 92)

A partir destes resultados, optou-se por utilizar a mistura *n*-hexano/glicerol (9:1 v/v) como solvente nos estudos subsequentes, bem como investigar a influência do suporte na conversão ao (*R*)-(+)-**12** utilizando blendas poliméricas formadas por amido e PEO para a imobilização da LBC.

4.5.4 Imobilização da LBC em blendas de amido de gengibre/PEO

Mistura de dois ou mais polímeros são denominados blendas poliméricas. As mesmas podem apresentar propriedades

intermediárias ou superiores as dos componentes puros que as constituem. Essas modificações podem fazer com que este material adquira propriedades específicas, com um custo menor do que a síntese de um novo polímero.⁽⁹³⁾

Tendo em vista estas características, avaliou-se o efeito da adição de poli(óxido de etileno) (PEO) em diferentes proporções nos filmes de amido de gengibre. Estes foram usados como suportes para imobilização da lipase de *B. cepacia* (LBC), e posterior aplicação na resolução do (*R,S*)-1-feniletanol (**11**) com acetato de vinila (**4**), em *n*-hexano, t.a., por 24 h. Os resultados obtidos estão mostrados na **Figura 33**.

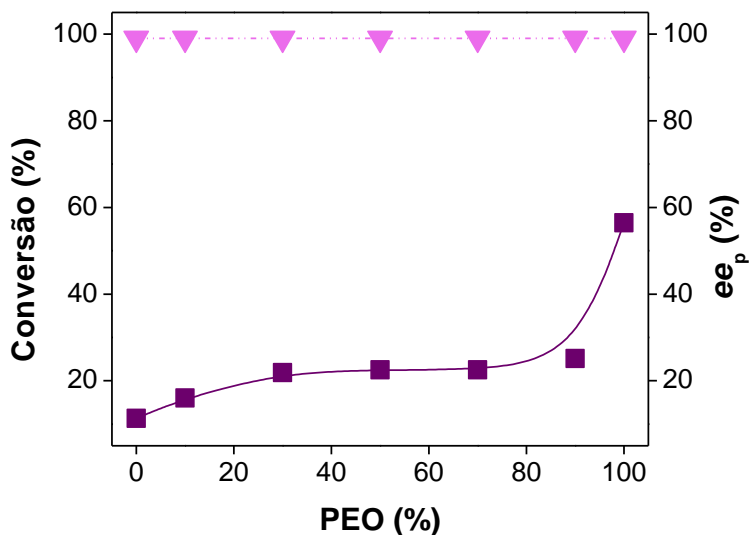


Figura 33. Efeito da proporção de PEO no suporte amido:PEO para resolução da (*R,S*)-**11** com acetato de vinila. [(*R,S*)-**11** (0,6 mL, 5 mmol), **4** (0,5 mL, 5 mmol), LBC (60 mg/g de suporte), *n*-hexano (25 mL), t.a., 24 h, ■ (conversão (%); ▼ (*ee*_p)].

Ao utilizar como suporte para imobilização da LBC o filme formado somente por amido de gengibre a conversão em acetato de 1-feniletila (**12**) foi de 11,3%. Aumentando a proporção de PEO nos filmes de 10, 30, 50, 70, 90%, notou-se um aumento na

conversão ao produto, sendo de 16,0-25,1%, mostrando a influência deste material polimérico.

A maior conversão em (R)-(+)-**12** foi obtida com a LBC imobilizada em filme formado somente por PEO, sendo de 56,5%. A enantiosseletividade do éster (R)-(+)-**12** não foi influenciada pela proporção de PEO nos filmes, obtendo-se $ee_p > 99\%$ e $E > 200$, ao utilizar as diferentes proporções deste polímero.

Este aumento nas conversões ao produto deve estar relacionado com a diferença de porosidade observado nos filmes de amido de gengibre puro quando comparados com os formados pela blenda polimérica gengibre:PEO, como discutido no item **4.1**, pg 46.

Suportes mais porosos provavelmente aumentam a interação da enzima/suporte e facilitam a difusão dos reagentes e produtos, favorecendo assim a catálise enzimática.

Crespo, investigou a utilização de blendas poliméricas formadas pelo poli(ácido acrílico) (Carbopol) e poli(óxido de etileno) (PEO) como suporte para a imobilização da lipase de *C. cylindracea* e posterior aplicação na síntese do laurato de *n*-pentila, a 25 C. A maior conversão ao produto foi de 93%, ao utilizar o suporte formado somente por Carbopol e a menor foi de 50% com a proporção Carbopol:PEO de 40:60 (% m/m).⁽⁹⁴⁾

A utilização de suportes para lipases a base de polímero natural (amido) e de um sintético (PEO) mostrou-se promissora. Para os próximos estudos utilizou-se como suporte para a LBC filmes a base de amido de gengibre/PEO na proporção de 7:3 m/m.

4.5.5 Influência do tempo na resolução do (R,S)-1-feniletanol

Após obter um aumento nas conversões ao acetato de 1-feniletila (**12**) utilizando a LBC imobilizada em filmes de amido de gengibre:PEO e em *n*-hexano:glicerol, investigou-se novamente o efeito do tempo para a obtenção deste éster. Foram retiradas pequenas alíquotas (~3 mL) da reação no intervalo de 6 a 96 h e estas analisadas por CGQ. Os resultados obtidos encontram-se na **Figura 34**.

Pode-se observar que a conversão ao éster (R)-(+)-**12** foi dependente do tempo. Nota-se que a partir de 24 h a reação,

tem-se um platô e a variação da conversão ao éster manteve-se na faixa de 33 a 40%.

A maior conversão foi obtida após 72 h, sendo de 39,1% e a menor de 19,1%, após 6 h de reação. A enantiosseletividade da reação foi mantida em todos os tempos avaliados, sendo $ee_p > 99$ e $E > 200$.

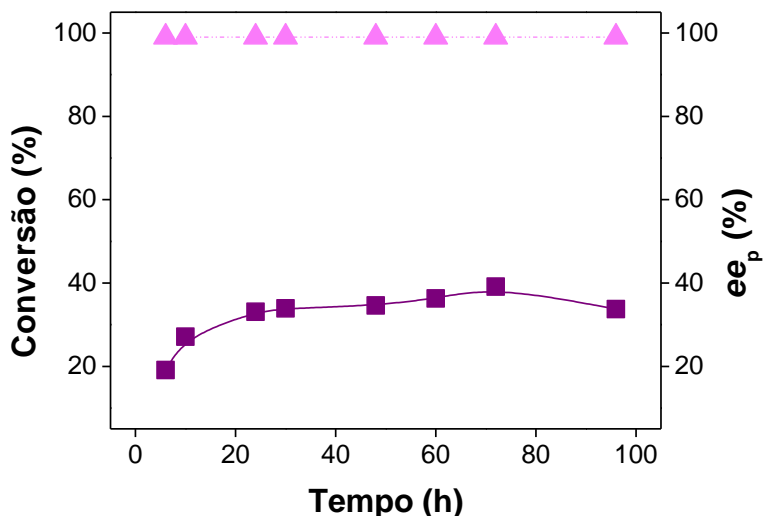


Figura 34. Variação da conversão (%) e excesso enantiomérico (ee_p %) em função do tempo na resolução enzimática do (R,S)-1-feniletanol (11) com acetato de vinila (4). [(R,S)-11 (0,6 mL, 5 mmol), 4 (0,5 mL, 5 mmol), LBC (60 mg/g de suporte), amido:PEO (7:3 m/m), *n*-hexano/glicerol (10 mL 9:1 v/v), t.a., ■ (conversão (%); ▼ (ee_p)].

O emprego das melhores condições obtidas até aqui para a resolução enzimática do (R,S)-1-feniletanol como, por exemplo, a utilização de co-solvente (glicerol) e de blends poliméricas (gingibre:PEO) aumentaram a conversão ao produto (R)-(+)-12 de 11,3% para 33,1%, a temperatura ambiente e em 24 h.

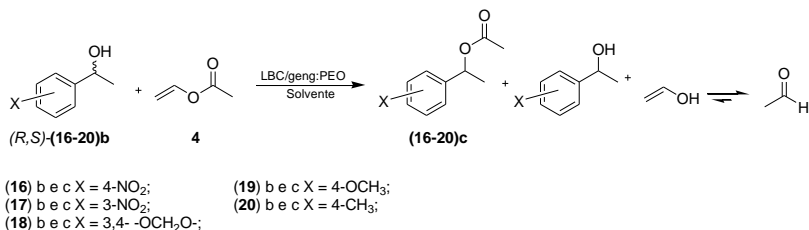
A imobilização da lipase de *B. cepacia* em blends poliméricas de gengibre:PEO, e posterior utilização na reação de

resolução de álcoois secundários mostrou-se ser bastante promissora. O emprego de condições brandas de reação e a possibilidade da utilização e posterior reutilização desses catalisadores sem grandes perdas na atividade catalítica das enzimas, foram algumas das vantagens observadas na utilização destes sistemas.

Considerando os resultados obtidos, utilizou-se a blenda gengibre:PEO como suporte para a imobilização da LBC e posterior aplicação na resolução enzimática de derivados do (*R,S*)-1-feniletanol.

4.5.6 Resultados preliminares para a resolução enzimática de derivados do (*R,S*)-1-feniletanol

Neste trabalho foi também investigado a influência de grupos retiradores e doadores de elétrons (4-nitro, 3-nitro, 3,4-metilenodioxí, 4-metoxi e 4-metil) na reação de transesterificação de derivados do (*R,S*)-1-feniletanol (**11**) com o acetato de vinila (**4**), catalisada pela lipase de *B. cepacia* imobilizada em filmes de gengibre:PEO (7:3 m/m) e na presença de glicerol como co-solvente. **Esquema 11**



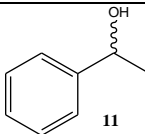
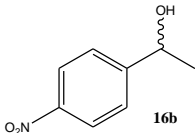
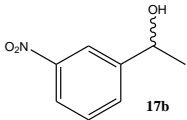
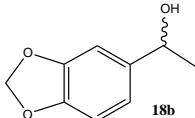
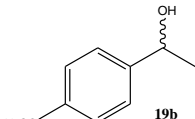
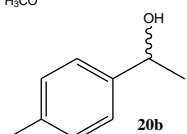
Esquema 11. Resolução enzimática dos derivados do (*R,S*)-1-feniletanol (**11**).

Primeiramente, as 4-nitro-; 3-nitro-; 3,4-metilenodioxí-; 4-metoxi-; e 4-metil-acetofenonas foram reduzidas com NaBH₄ para a formação dos correspondentes álcoois racêmicos. Após a completa reação de redução, todos os álcoois racêmicos foram caracterizados conforme descrito no item 3.7.1, pg. 39.

Estes compostos foram utilizados nas reações de transesterificação com o acetato de vinila, conforme descrito acima.

Os resultados preliminares estão apresentados na **Tabela 5**, incluindo o composto **11**, estudado anteriormente.

Tabela 5. Resolução enzimática dos derivados do (*R,S*)-1-feniletanol (**16-20b**).

Substrato	Conversão (%)
	33,1
	56,1
	45,5
	26,5
	28,9
	a

[**11** (0,6 mL, 5 mmol), **16b** (0,84 g, 5 mmol), **17b** (0,84 g, 5 mmol), **18b** (0,47 g, 2,5 mmol), **19b** (0,65g, 4,3 mmol) e **20b** (0,68g 5 mmol), **4** (2,5-5,0 mmol), LBC (60 mg/g de suporte), amido:PEO (7:3 m/m), *n*-hexano/glicerol (10 mL 9:1 v/v), t.a, 24h, a-não houve separação na CGQ].

Analisando os dados da **Tabela 5**, observou-se que para o acetato de 1-(4-metilfenil)etila (**20c**) não houve separação eficiente na CGQ nas condições experimentais testadas, conforme

pode ser observado na **Figura 35**. O pico do produto **B** não pode ser quantificado, pois está muito próximo ao do álcool **A**, usado como reagente. Outras condições de análises deverão ser utilizadas.

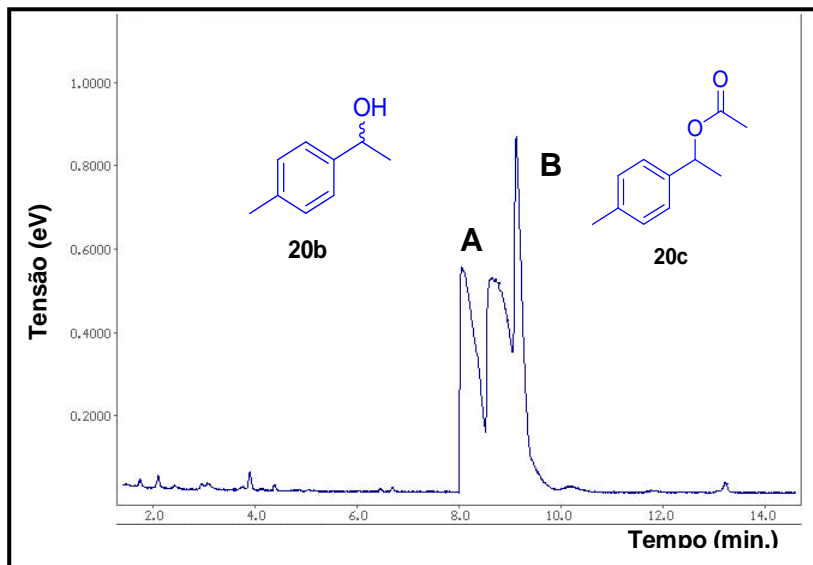


Figura 35. Cromatograma do padrão racêmico (*R,S*)-**20b** e de uma alíquota da reação enzimática para obtenção do éster **20c**. [A (*R,S*)-**20b**, B **20c**].

Utilizando o sistema LBC/gengibre:PEO (7:3 m/m) em *n*-hexano:glicerol (9:1 v/v), as maiores conversões aos correspondentes ésteres foram de 56,1 e 45,5% para o acetato de 1-(4-nitrofenil) e 1-(3-nitrofenil)etila, respectivamente. Quando os substratos foram os álcoois, 1-(3,4-metilenodioxifenil)etanol e 1-(4-metoxifenil)etanol as conversões foram menores, sendo de 26,5 e 28,9%, respectivamente, em 24 h.

Comparando estes resultados com os obtidos para o (*R*)-(+)-acetato de 1-feniletila **12** (33,1%), observou-se que as maiores conversões aos produtos foram obtidas com os derivados contendo grupos substituintes retiradores de elétrons, por ex. os 4- e 3-NO₂.

Estes dados são inesperados, pois sabe-se que grupos retiradores de elétrons diminuem o caráter nucleofílico da hidroxila e desfavorecem o ataque a carbonila do intermediário “acil-enzima” formado na primeira etapa da reação de transesterificação ou esterificação. (Ver mecanismo item 1.3, pg. 9)

Portanto, outros fatores devem ser considerados tais como a solubilidade e a estrutura dos substratos. Substratos como o **18b** e **19b** que possuem grupos substituintes volumosos podem por efeito estereo não se ajustar perfeitamente no sítio ativo da lipase e assim formar os produtos com conversões menores.

Outros autores investigaram o efeito de grupos substituintes em derivados do (*R,S*)-1-feniletanol. ^(83; 95; 96)

Netto e col. avaliaram a seletividade da lipase de *C. antarctica* (CALB) imobilizada em nanopartículas superparamagnéticas (CALB-APTS-MagNP) na transesterificação enantiosseletiva de derivados do (*R,S*)-1-feniletanol com acetato de vinila, em MTBE, a 32 °C, em 24 h. Em geral, as conversões aos produtos variaram de 17-36%, e não mostraram dependência com relação ao grupo substituinte no anel aromático do álcool. As maiores conversões foram obtidas para os acetatos de 1-(4-metoxifenil)-, 1-(4-nitrofenil)- e 1-feniletila, sendo de 36, 32 e 32%, respectivamente. A seletividade da reação foi mantida em todas as reações, sendo $ee_p > 99$ e $E > 200$ e o sistema (CALB-APTS-MagNP) pode ser reutilizado por até 5 ciclos sem grandes perdas na atividade catalítica da enzima. ⁽⁹⁵⁾

A interpretação dos resultados obtidos neste trabalho, ainda requer muita atenção pois outras condições de análise precisam ser testadas, tais como um controle rigoroso de temperatura e agitação dos sistemas biocatalíticos, além da utilização dos reagentes com alto grau de pureza. Estes ésteres também devem ser preparados por métodos químicos e purificados para serem utilizados como padrões racêmicos para que seja determinada as melhores condições de análises na CGQ para a separação dos enantiômeros, e assim calcular corretamente os valores de ee_p e E de cada produto.

A utilização de blendas poliméricas (amido:PEO) como suporte para a imobilização de lipases e de mistura de solvente (*n*-hexano:glicerol) mostrou-se muito vantajosa na resolução enzimática do (*R,S*)-1-feniletanol e seus derivados. O amido por ser encontrado em abundância nos vegetais e o glicerol por ser um

subproduto do biodiesel, tornam-se materiais baratos de se trabalhar, além de não prejudicarem o meio ambiente contribuindo para uma química mais “limpa”.

5. CONCLUSÃO

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

- A extração dos amidos de taro, cará e gengibre mostrou-se viável, obtendo-se cerca de 60-100 g de amido, após secagem.
- As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes de amidos de taro, cará e gengibre apresentaram características morfológicas semelhantes, enquanto que o filme formado pela blenda polimérica de gengibre:PEO (7:3 m/m) apresentou maior porosidade.
- A quantidade de água nos filmes com e sem LBC variou de 10,9-14,0%, contribuindo para a manutenção da atividade catalítica da enzima.
- Os filmes de amido de taro, cará e gengibre mostraram-se estáveis em diversos solventes orgânicos e em elevadas temperaturas.
- Utilizando os sistemas LBC/taro e LBC/cará na reação de obtenção do acetato de geranoíla, as conversões foram de 33-85% e de 71-85% respectivamente.
- A reutilização destes sistemas foi eficiente mesmo após um 730 dias de estocagem a 10-15 °C, obtendo-se o acetato de geranoíla com conversões de 10-87% com o sistema LBC/taro, e de 30-68% com LBC/cará.
- A reação de formação dos alcanóatos de geranoíla foi dependente do tempo e do tamanho da cadeia alquílica do ácido.
- Utilizando o sistema LBC/cará as maiores e menores conversões foram obtidas para o estearato e propanoato de geranoíla, sendo de 92,6 e 30,7% em 48 h, respectivamente.
- Utilizando o sistema LPS/taro as maiores e menores conversões foram obtidas para o caprilato e hexanoato de geranoíla, sendo de 91,7-44,7% em 48 h, respectivamente.
- A resolução enzimática do (*R,S*)-1-feniletanol (**11**) utilizando a lipase de LBC imobilizada em filmes de amido de

taro e gengibre, mostrou-se promissora, e formou preferencialmente o enântiômero *R*.

- Quando a reação foi catalisada pelo sistema LBC/taro e variando a proporção de acetato de vinila, as conversões ao (*R*)-(+)-acetato de 1-feniletila foram de 8,7-22,5%. Somente com as razões molares de 1:1, 1:2 e 1:5 mmol de (*R,S*)-**11:4** obteve-se $ee_p > 99\%$ e $E > 200$.
- Com o sistema LBC/gengibre as conversões variaram de 7,7-24,1%, e somente com a razão molar de 1:1 obteve-se $ee_p > 99$ e $E > 200$.
- Com as lipases livres as conversões ao éster variaram de 14-56% sendo a menor obtida com a LRO e a maior com a LAN. Com os micélios UEA_53 e UEA_115 as conversões foram de 0,2 e 3,5%, respectivamente. Quando utilizou-se a LRO e os micélios UEA_53 e UEA_115, o ee_p foi de 99%.
- Utilizando os sistemas lipase/gengibre para a obtenção do (*R*)-(+)-**12** a menor conversão foi de 0,8% com o sistema LRO/gengibre, a 35 °C e a maior de 13% com LBC/gengibre, a t.a. A seletividade da reação foi mantida, sendo $ee_p > 99$ e $E > 200$.
- Utilizando o acetato de *iso*-propenila as conversões ao (*R*)-(+)-acetato de 1-feniletila foram de 5,7-12,6%, com LBC/gengibre. Na reutilização deste sistema as conversões variaram de 4,1-9,8% com $ee_p > 99\%$.
- Usando solventes apolares ($\log P > 1,5$) como *n*-heptano e *n*-hexano as conversões ao éster (*R*)-(+)-**12** foram de 11,7 e 11,3% e ee_p 91,3 e 99%, respectivamente. Com solventes mais polares ($\log P < 1,5$) estas foram menores, sendo de 1,3-4,7% e $ee_p > 99\%$.
- Utilizando misturas de solventes como *n*-hexano/[BMIm][PF₆] a conversão em éster foi de 6,1% e $ee_p > 99\%$. Ao utilizar o *n*-hexano/glicerol (9:1 v/v), obteve-se o éster (*R*)-(+)-**12** com 23% e $ee_p > 99\%$.
- Aumentando a proporção de PEO (0-100% m/m) nos filmes de amido de gengibre observou-se um aumento na conversão ao produto, sendo de 16,0-56,5% com $ee_p > 99$ e $E > 200$.
- A maior conversão ao éster (*R*)-(+)-**12** foi obtida com o sistema LBC/gengibre:PEO em *n*-hexano:glicerol (9:1

v/v), em 72 h, sendo de 39,1% e a menor de 19,1%, após 6 h de reação. A enantiosseletividade foi mantida, sendo $ee_p > 99$ e $E > 200$.

- Utilizando o sistema LBC/gengibre:PEO, em *n*-hexano:glicerol as conversões aos ésteres derivados do (*R,S*)-**11** foram de 26,5-56,1%, sendo a maior para o acetato de 1-(4-nitrofenil)etila, t.a., em 24 h.
- Os filmes de amido e/ou amido:PEO mostraram-se suportes eficientes para a imobilização de diversas lipases com aplicação em biocatálise.

6. *PERSPECTIVAS*

- Preparar os padrões racêmicos dos ésteres derivados do (*R,S*)-1-feniletanol, por métodos químicos tradicionais e caracterizá-los por CGC;
- Purificar os ésteres derivados do (*R,S*)-1-feniletanol, obtidos pelo método enzimático e caracterizá-los por RMN-¹H, IV e polarimetria;
- Utilizar outras colunas cromatográficas com fase quiral e/ou diferentes programações de temperatura e taxa de aquecimento para melhorar a resolução dos enantiômeros dos álcoois e ésteres derivados do (*R,S*)-1-feniletanol;
- Imobilizar simultaneamente duas ou mais lipases no mesmo suporte. Esse método é chamado “coquetel enzimático”;
- Avaliar a influência de outros plastificantes (por ex. sorbitol) na preparação dos filmes de amido;
- Avaliar a influência da temperatura e de outros LIs na resolução do (*R,S*)-1-feniletanol e derivados;
- Utilizar as blendas poliméricas de amido e PEO para a imobilização de outras lipases e posteriormente utilizá-los na resolução de álcoois secundários, tais como o (*R,S*)-mentol e o (*R,S*)-2-octanol.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Costa, V. E. U.; De Amorim, H. L. N.** O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. *Quím. Nova* 1999, Vol. 22 (6), pp. 863-873.
2. **Ghanem, A.** Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron* 2007, 63, pp. 1721-1754.
3. **De Conti, R.; Rodrigues, J. A. R.; Moran, P. J. S.** Biocatálise: avanços recentes. *Quím Nova* 2001, Vol. 24 (5), pp. 672-675.
4. **Sebrão, D.; Dutra, V. S.; Nascimento, M. G.; Moreira, M. A.** Imobilização de lipases em filme de caseinato de sódio/glicerol: aplicação na síntese de ésteres. *Quím Nova* 2007, Vol. 30 (5), pp. 1182-1187.
5. **Mateo, C.; Palomo, J. M.; Lorente-Fernandez, G.; Guisan, J. M.; Lafuente-Fernandez, R.** Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol* 2007, 40, pp. 1451-1463.
6. **Vilpoux, O. F.; Averous, L.** *Cultura de tuberosas amiláceas latino americanas*. 1 Ed. Campinas : Fundação Cargill, 2003. Cap 18. pp. 499-529. Vols. 3 - Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas.
7. **Campbell, M. K.; Farrell, S. O.** *Bioquímica*. 3 Ed. Orlando : Thomson, 2007. Vol. Combo.
8. **Murray, R. K.; Granner, D. K.; Mayer, P. A.; Rodwell, V. W.** *Harper: Bioquímica*. 6 Ed. São Paulo : Atheneu, 1990.
9. **Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M.** *Lehninger: Principles of Biochemistry*. 4 Ed. Madison : Worth Publishers, 2004.
10. **Koolman, J.; Roehm, K. H.** *Color Atlas of Biochemistry*. 2 Ed. New York : Thieme, 2005.
11. **Faber, K.** *Biotransformation in Organic Chemistry*. 3 Ed. Berlim : Springer, 1997. pp. 1-116.

12. **Arantes, G. M.** Uma perspectiva computacional sobre catálise enzimática. *Quím. Nova* 2008, Vol. 31 (2), pp. 377-383.

13. **Voet, D.; Voet, J. G.** *Biochemistry*. 2 Ed. New York : John Wiley & Sons inc., 1994. pp. 141-190.

14. **Da Silva, D. M.; Contesini, F. J.; Carvalho, P. O.** Characterization and catalytic activity of free and immobilized lipase from *Aspergillus niger*: a comparative study. *J. Braz. Chem. Soc.* 2008, Vol. 19, pp. 1468-1474.

15. **Haki, G. D.; Rakshit, S. K.** Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour. Technol.* 2003, Vol. 89, pp. 17-34.

16. **Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, U. C.** Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* 2001, Vol. 19, pp. 627-662.

17. **Carvalho, P. O.; Calafatti, S. A.; Marassi, M.; Da Silva, D. M.; Contesini, F. J.; Bizaco, R.** Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. *Quím. Nova* 2005, Vol. 28 (4), pp. 614-621.

18. **Nascimento, M. G.; Neto, P. R. C.; Mazucco, L. M.** Biotransformação de óleos e gorduras. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*. 2001, Vol. 19, Ano III, pp. 28-31.

19. **Gotor-Fernandez, V.; Brieva, R.; Gotor, V.** Lipases: useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2006, Vol. 40, pp. 111-120.

20. **Queiroz, N.; Nascimento, M. G.** *Pseudomonas* sp. lipase immobilized in polymers versus the use of free enzyme in the resolution of (*R,S*)-methyl mandelate. *Tetrahedron Lett.* 2002, Vol. 43 (30), pp. 5225-5227.

21. **Schmid, R. D.; Verger, R.** Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem.* 1998, Vol. 37 (12), pp. 1608-1633.

22. www.pdb.org. *RCSB Protein Data Bank*. [Online] [Citado em: 8 de Janeiro de 2010.]

23. **Carrasco-López, C.; Godoy, C.; De las Rivas, B.; Fernández-Lorente, G.; Palomo, J. M.; Guisán, J. M.;**

Fernández-Lafuente, R.; Martínez-Ripoll, M.; Hermoso, J. A. Activation of bacterial thermoalkalophilic lipases is spurred by dramatic structural rearrangements. *J. Biol. Chem.* 2009, Vol. 284 (7), pp. 4365-4372.

24. **Cygler, M.; Grochulski, P.; Kazlauskas, J. R.; Schrag, D. J.; Bouthillier, F.; Rubin, B.; Serreji, N. A.; Gupta, K. A.** A structural basis for the chiral preferences of lipases. *J. Am. Chem. Soc.* 1994, Vol. 116 (8), pp. 3180-3186.

25. **Mäki-Arvela, P.; Sahin, S.; Kumar, N.; Mikkola, J.; Eränen, K.; Salmi, T.; Murzin, D. Y.** One-pot utilization of heterogeneous and enzymatic catalysis: synthesis of R-1-phenylethyl acetate from acetophenone. *Catal. Today* 2009, Vol. 140, pp. 70-73.

26. **Hasan, F.; Shah, A. A.; Hameed, A.** Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.* 2006, Vol. 39 (2), pp. 235-251.

27. **Moreira, M. A.; Bittencourt, T. B.; Nascimento, M. G.** Optimization of chemo-enzymatic epoxidation of cyclohexene mediated by lipases. *Synth. Commun.* 2005, Vol. 35 (15), pp. 2107-2114.

28. **Rejeb, I. B.; Arduini, F.; Amine, A.; Gargouri, M.; Palleschi, G.** Amperometric biosensor based on prussian blue-modified screen-printed electrode for lipase activity and triacylglycerol determination. *Anal. Chim. Acta.* 2007, 594, pp. 1-8.

29. **Ball, A. J.; Corr S.; Micklefield J.** Lipase-catalysed kinetic resolutions of secondary alcohols in pressurised liquid hydrofluorocarbons. *Tetrahedron Lett.* 2009, Vol. 50, pp. 3543-3546.

30. **De Barros, P. C. D.; Fonseca, P. L.; Fernandes, P.; Cabral, M. S. J.; Mojovic, L.** Biosynthesis of ethyl caproate and other short ethyl esters catalyzed by cutinase in organic solvent. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* 2009, Vol. 60, pp. 178-185.

31. **Bezbradica, D.; Mijin, D. S.; Siler-Marinkovi, S.; Knezevic, Z.** The effect of substrate polarity on the lipase-

catalyzed synthesis of aroma esters in solvent-free systems. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2007, Vol. 45, pp. 97-101.

32. **Joll, C. A.; Alessandrino, M. J.; Heitz, A.** Disinfection by-products from halogenation of aqueous. *Water Res.* 2010, Vol. 44, pp. 232-242.

33. **Di Stasi, L. C.** *Plantas Mediciniais: Arte e Ciência. Um Guia de Estudo Interdisciplinar.* São Paulo : Unesp, 1996. pp. 109-128.

34. **Degenhardt, J.; Köllner, T. G.; Gershenzon, J.** Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochem.* 2009, Vol. 70, pp. 1621–1637.

35. **Aragão, V. C.; Anschau, A.; Porciuncula, B. A. D.; Thiesen, C.; Kalil, S. J.; Burkert, C. V. A.; Burkert, J. M. F.** Síntese enzimática de butirato de isoamila empregando lipases microbianas comerciais. *Quím. Nova* 2009, 32 (9), pp. 2268-2272.

36. **Ozyilmaz, G.; Gezer, E.** Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* doi:10.1016/j.molcatb.2009.04.013.

37. **Mileti, N.; Vukovi, Z.; Nastasovi, A.; Loos, K.** Macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins—Versatile immobilization supports for biocatalysts. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2009, Vol. 56 (4), pp. 196-201.

38. **Haider, T.; Husain, Q.** Immobilization of β -galactosidase by bioaffinity adsorption on concanavalin a layered calcium alginate–starch hybrid beads for the hydrolysis of lactose from whey/milk. *Int. Dairy J.* 2009, Vol. 19 (3), pp. 172-177.

39. **Dalla-Vecchia, R.; Nascimento, M. G.; Soldi, V.** Aplicação sintética de lipases imobilizadas em polímeros. *Quím. Nova* 2004, Vol. 27 (4), pp. 623-630.

40. **Boscolo, B.; Trotta, F.; Ghibaudi, E.** High catalytic performances of *Pseudomonas fluorescens* lipase adsorbed on a

new type of cyclodextrin-based nanosponges. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* 2010, Vol. 62, pp. 155–161.

41. **Cardoso, C. L.; De Moraes, M. C.; Cass, Q. B.** Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. *Quím Nova* 2009, Vol. 32 (1), pp. 175-187.

42. **Orrego, E. C.; Salgado, N; Valencia, S. J.; Giraldo, I. G.; Giraldo, H. O.; Cardona, A. C.** Novel chitosan membranes as support for lipases immobilization: characterization aspects. *Carbohydr. Polym.* 2010, Vol. 79, pp. 9–16.

43. **Gupta, P.; Dutt, K.; Misra, S.; Raghuwanshi, S.; Saxena, K. R.** Characterization of cross-linked immobilized lipase from thermophilic mould *Thermomyces lanuginosa* using glutaraldehyde. *Bioresour. Technol.* 2009, Vol. 100 (18), pp. 4074–4076.

44. **Yang, G.; Wu, J.; Xu, G.; Yang, L.** Improvement of catalytic properties of lipase from *Arthrobacter* sp. by encapsulation in hydrophobic sol–gel materials. *Bioresour. Technol.* 2009, Vol. 100 (19), pp. 4311–4316.

45. **Jegannathan, K. R.; Chan, E.; Ravindra, P.** Physical and stability characteristics of *Burkholderia cepacia* lipase encapsulated in K-carrageenan. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* 2009, Vol. 58, pp. 78-83.

46. **Wang, Z.; Wan, L.; Liu, Z.; Huang, X.; Xu, Z.** Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: an overview. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* 2009, Vol. 56 (4), pp. 189-195.

47. **Wu, R.; Wang, X.; Li, F.; Li, H.; Wang, Y.** Green composite films prepared from cellulose, starch and lignin in room-temperature ionic liquid. *Bioresour. Technol.* 2009, 100 (9), pp. 2569-2574.

48. **Bobbio, F. O.; Bobbio, P. A.** *Introdução a Química de Alimentos*. 1 Edição. Campinas : Fundação Cargill, 1985. pp. 56-61.

49. **Franco, C. M. L.; Daiuto, E. R.; Demiate, I. M.; Carvalho, L. J. C. B.; Leonel, M.; Cereda, M. P.; Vilpoux, O. F.; Sarmiento, S. B. S.** *Cultura de tuberculosas amiláceas latino*

americanas. Campinas : Fundação Cargill, 2002. pp. 13-133. Vols. 1 - Propriedades Gerais dos Amidos.

50. **Jayakody, L.; Hoover, R.** Effect of annealing on the molecular structure and physicochemical properties of starches from different botanical origins – A review. *Carbohydr. Polym.* 2008, Vol. 74 (4), pp. 691-703.

51. **Mc Murry, J.** *Química Orgânica*. 1 Ed. São Paulo : Pioneira Thomson Learning, 2006. pp. 275-276. Vol. 1 e 2.

52. **Pilli, R. A.** Catálise assimétrica e o prêmio nobel de química de 2001. Novos paradigmas e aplicações práticas. *Quím. Nova na Escola*. 2001, Vol. 14, pp. 16-25.

53. **Solomons, G. T. W.; Fryhle, C. B.** *Química Orgânica*. 7 Ed. Rio de Janeiro : Livros Técnicos e Científicos (LTC), 2001. pp. 169-173. Vol. 1.

54. **Lima, L. M.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J.** O renascimento de um fármaco: Talidomida. *Quim. Nova* 2001, Vol. 24 (5), pp. 683-688.

55. **Wang, P.; Tsai, S.** Enzymatic hydrolytic resolution of (R,S)-tropic acid esters and (R,S)-ethyl α -methoxyphenyl acetate in biphasic media. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* 2009, Vol. 57, pp. 158-163.

56. **Karnik, A. V.; Kamath, S. S.** Enantioselective benzylation of racemic amines using chiral benzimidazolide as a benzoylating agent. *Tetrahedron: Asymmetry* 2008, Vol. 19 (1), pp. 45-48.

57. **Chen, C.; Wu, S.; Girdaukas, G.; Sih, C. J.** Quantitative analyses of biochemical kinetic resolution of enantiomers. Enzyme-catalyzed esterifications in water-organic solvent biphasic systems. *J. Am. Chem. Soc.* 1987, 109, pp. 2812-2817.

58. **Holmberg, P.; Karlssona, J.; Gogollb, A.** Enzymatic kinetic resolution of 1-(3-furyl)-3-buten-1-ol. *Tetrahedron: Asymmetry* 2005, Vol. 16, pp. 2397-2399.

59. **Marples, B. A.** *Elementary Organic Stereochemistry and Conformational Analysis*. London : The Royal Society of Chemistry, 1981. pp. 1-27.

60. **Canevarolo, S. V.** *Técnicas de Caracterização de Polímeros*. São Paulo : Artliber, 2004. pp. 95-115.

61. **Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S.** *Fundamentos de Cromatografia*. 1 Ed. Campinas : Unicamp, 2006. pp. 203-272.

62. **Biwer, A.; Antranikian, G.; Heunzle, E.** Enzymatic production of cyclodextrins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002, 59, pp. 609-617.

63. **Szejtli, J.** Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.* 1998, 98, pp. 1743-1753.

64. **Rama, A. R. C.; Veiga, F.; Figueiredo, I. V.; Sousa, A.; Caramona, M.** Aspectos biofarmacêuticos da formulação de medicamentos para neonatos. Fundamentos da complexação de indometacina com hidroxipropil- β -ciclodextrina para tratamento oral do fechamento do canal arterial. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 2005, 41 (3), pp. 281-299.

65. **Machida, Y; Nishi, H; Nakamura K; Nakai, H; Sato, T;** Enantiomer separation of amino compounds by a novel chiral stationary phase derived from crown ether. *J. Chromatogr. A.* 1998, Vol. 805, pp. 85-92.

66. **Zanotto, S. P.; Romano, I. P.; Lisboa, L. U. S.; Duvoisin, S.; Martins, M. K.; Lima, F. A.; Silva, S. F.; Albuquerque, P. M.** Potencial application in biocatalysis of mycelium-bound lipases from amazonian fungi. *J. Braz. Chem. Soc.* 2009, 20 (6), pp. 1046-1059.

67. **Morita, T.; Assumpção, M. V. R.** *Manual de Soluções, Reagentes e Solventes*. 2 Ed. São Paulo : Edgard Blucher LTDA, 1972. p. 316.

68. **Zeynizadeh, B.; Behyar, T.** Fast and efficient method for reduction of carbonyl compounds with NaBH_4 /Wet SiO_2 . *J. Braz. Chem. Soc.* 2005, Vol. 16 (6A), pp. 1200-1209.

69. **Leonel, M.** Análise da forma e tamanho de grânulos de amidos de diferentes fontes botânicas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2007, Vol. 27(3), pp. 579-588.

70. **Cereda, M. P.; Daiúto, E. R.** *Cultura de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas*. Campinas: Fundação Cargill, 2003. Cap 8. pp. 176-190. Vols. 3 - Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas.

71. **Crespo, J. S.; Queiroz, N.; Nascimento, M. G.; Soldi, V.** The use of lipases immobilized on poly(ethylene oxide) for the preparation of alkyl esters. *Process Biochem.* 2005, 40 (1), pp. 401-409.

72. **Dalla-Vecchia, R.; Sebrão, D.; Nascimento, M. G.; Soldi, V.** Carboxymethylcellulose and poly(vinyl alcohol) used as a film support for lipases immobilization. *Process Biochem.* 2005, 40 (8), pp. 2677-2682.

73. **Langrand, G.; Rondol, N.; Triantaphylides, C.; Baratti, J.** Short chain flavour ester synthesis by microbial lipases. *Biotechnol. Lett.* 1990, 12 (8), pp. 581-586.

74. **Castro, H. F.; Oliveira, P. C.; Soares, C. M. F.** Síntese de ésteres terpenóides por *via* enzimática: Influência do tamanho da cadeia alifática do ácido graxo e da estrutura do álcool de terpeno. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 1997, 17 (3), pp. 224-228.

75. **Chênevert, R.; Pelchat, N.; Morin, P.** Lipase-mediated enantioselective acylation of alcohols with functionalized vinyl esters: acyl donor tolerance and applications. *Tetrahedron: Asymmetry* 2009, 20, pp. 1191-1196.

76. **Cygler, M.; Schrag, J. D.** Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase. *Biochim. Biophys. Acta* 1999, 1441, pp. 205-214.

77. **Pilissão, C.; Carvalho, P. O.; Nascimento, M. G.** Potencial application of native lipases in the resolution of (*RS*)-phenylethylamine. *J. Braz. Chem. Soc.* 2010, in press.

78. **Pilissão, C.; Carvalho, P. O.; Nascimento, M. G.** Enantioselective acylation of (*RS*)-phenylethylamine catalysed by lipases. *Process Biochem.* 2009, 44, pp. 1352-1357.

79. **Habulin, M.; Knez, Z.** Optimization of (*R,S*)-1-phenylethanol kinetic resolution over *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* 2009, 58, pp. 24-28.
80. **De los Ríos, A. P.; Hernández-Fernández, F. J.; Tomás-Alonso F.; Gómez, D.; Villora, G.** Synthesis of esters in ionic liquids. The effect of vinyl esters and alcohols. *Process Biochem.* 2008, 43, pp. 892–895.
81. **Csajági, C.; Szatzker, G.; Töke, E.; Üрге, L.; Darvas, F.; Poppe, L.** Enantiomer selective acylation of racemic alcohols by lipases in continuous-flow bioreactors. *Tetrahedron: Asymmetry.* 2008, 19, pp. 237-246.
82. **Goswami, A.; Goswami, J.** DMSO-triggered enhancement of enantioselectivity in Novozyme [435]-catalyzed transesterification of chiral 1-phenylethanol. *Tetrahedron Lett.* 2005, 46, pp. 4411-4413.
83. **De Souza, R. O. M. A.; Antunes, O. A. C.; Kroutil, W.; Kappe, C. O.** Kinetic resolution of rac-1-phenylethanol with immobilized lipases: A critical comparison of microwave and conventional heating protocols. *J. Org. Chem.* 2009, 74, pp. 6157-6162.
84. **León, R.; Fernandes, P.; Pinheiro, H. M.; Cabral, J. M. S.** Whole-cell biocatalysis in organic media. *Enzyme Microb. Technol.* 1998, 23 (7-8), pp. 483-500.
85. **Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veeger, C.** Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 1987, 30 (1), pp. 81-87.
86. **Roberts, M. S.** *Biocatalysis for Fine Chemical Synthesis.* England : John Wiley & Sons, 1999.
87. **Hara, P.; Hanefeld, U.; Kanerva, L.** Immobilised *Burkholderia cepacia* lipase in dry organic solvents and ionic liquids: A comparison. *Green Chem.* 2009, 11, pp. 250-256.
88. **Durand, J.; Teuma, E.; Gómez, M.** Ionic liquids as a medium for enantioselective catalysis. *C. R. Chimie* 2007, 10, pp. 152-177.

89. **Andrade, L. H.; Piovan, L.; Pasquini, M. D.** Improving the enantioselective bioreduction of aromatic ketones mediated by *Aspergillus terreus* and *Rhizopus oryzae*: the role of glycerol as a co-solvent. *Tetrahedron: Asymmetry* 2009, Vol. 20, pp. 1521-1525.

90. **Chua, L. S.; Sarmidi, M. R.** Effect of solvent and initial water content on (*R,S*)-1-phenylethanol resolution. *Enzyme Microb. Technol.* 2006, 38, pp. 551-556.

91. **Gubicza, L.; Kelemen-Horvath, I.** Effect of water-mimicking solvents on the lipase-catalyzed esterification using *Candida cylindracea* lipase. *J. Mol. Catal.* 1993, 84, pp. L27-32.

92. **Mano, E. B.** *Polímeros como materiais de engenharia*. São Paulo : Edgard Blücher, 1991.

93. **Crespo, J. da S.** Imobilização de lipases em materiais poliméricos. *Dissertação de mestrado*. Florianópolis : Curso de Pós-Graduação em Química - UFSC, 1999. p. 34.

94. **Netto, C. G. C. M.; Andrade, L. H.; Toma, H. E.** Enantioselective transesterification catalysis by *Candida antarctica* lipase immobilized on superparamagnetic nanoparticles. *Tetrahedron: Asymmetry* 2009, 20, pp. 2299-2304.

95. **Zhang, Y.; Li, J.; Han, D.; Zhang, H.; Liu, P.; Li, C.** An efficient resolution of racemic secondary alcohols on magnetically separable biocatalyst. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008, 365, pp. 609-613.

8. ANEXOS

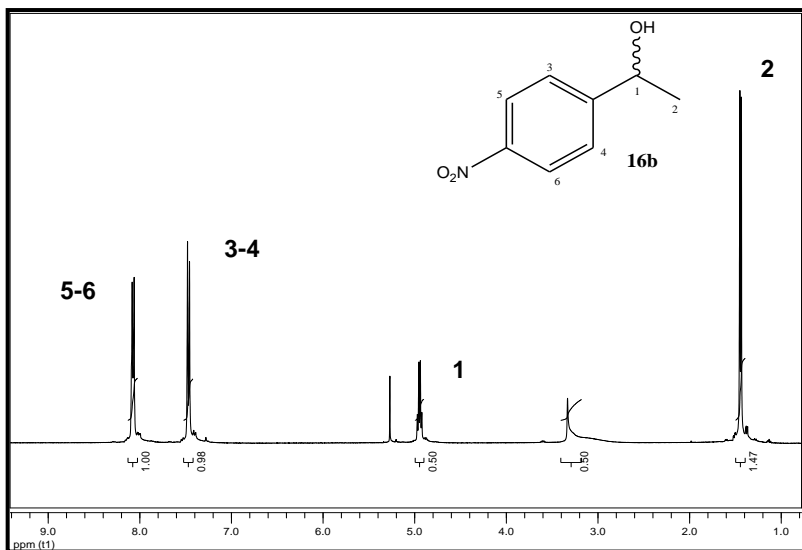


Figura 36. Espectro de RMN- ^1H do (R,S) -1-(4-nitrofenil)etanol (**16b**) [400 MHz, CDCl_3].

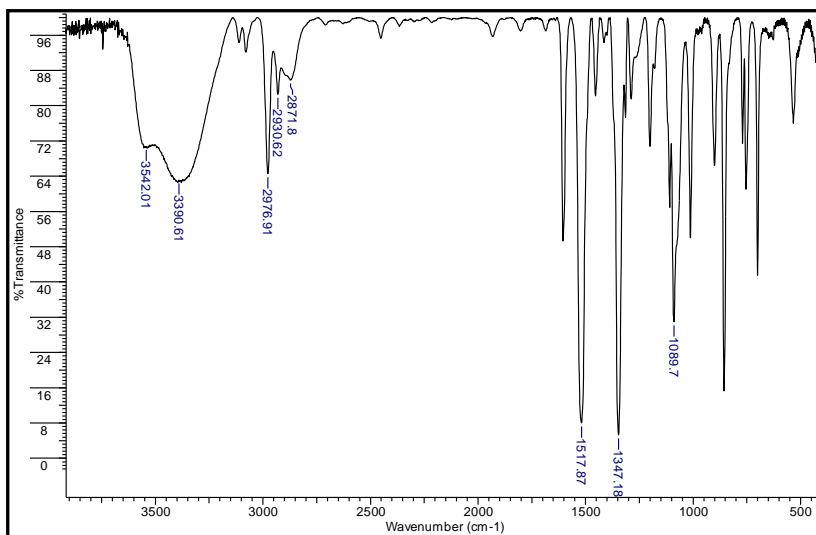


Figura 37. Espectro de IV do (R,S) -1-(4-nitrofenil)etanol (**16b**). (filme)

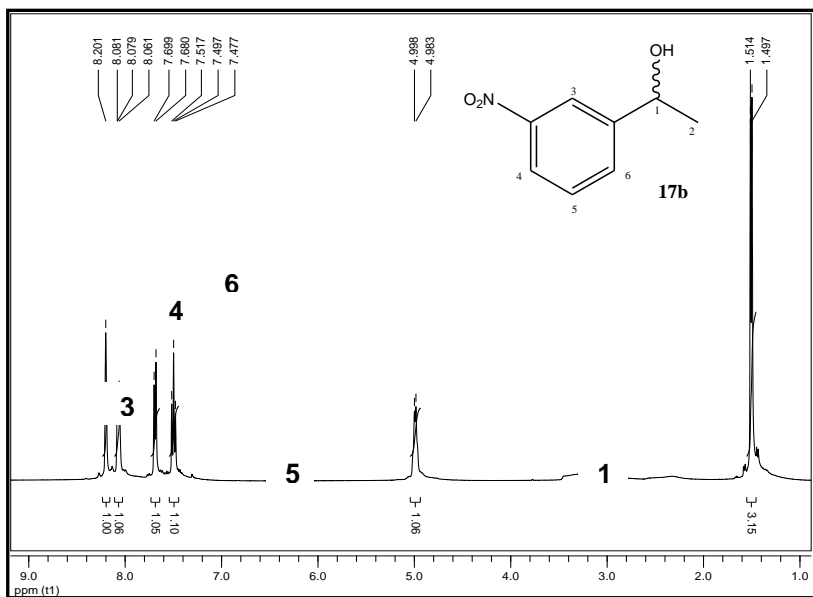


Figura 38. Espectro de RMN- ^1H do (*R,S*)-1-(3-nitrofenil)etanol (**17b**) [400 MHz, CDCl_3].

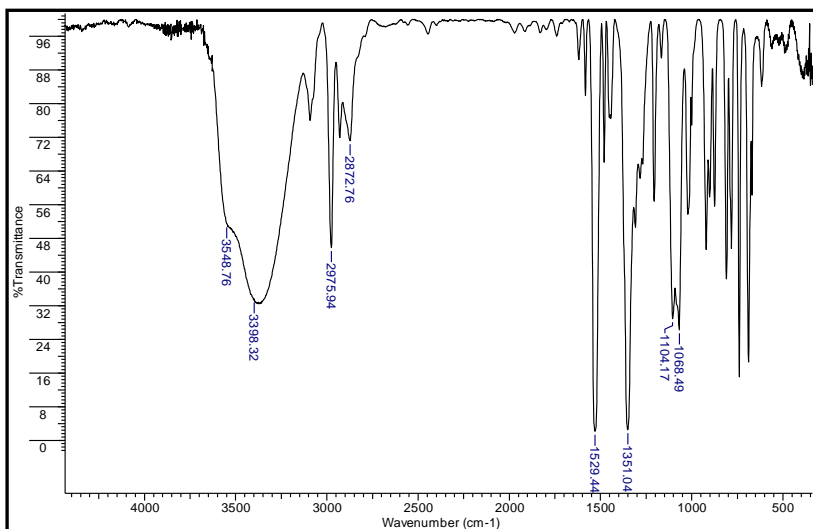


Figura 39. Espectro de IV do (*R,S*)-1-(3-nitrofenil)etanol (**17b**). (filme)

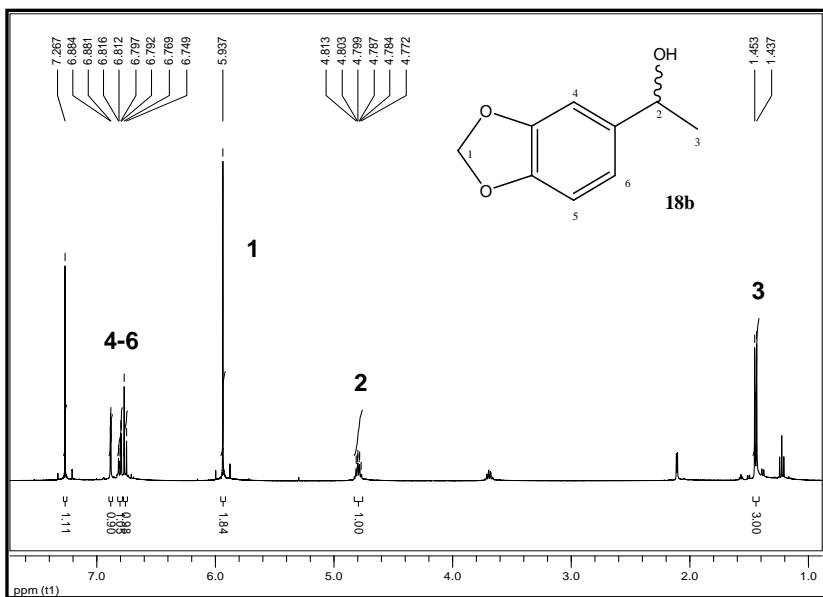


Figura 40. Espectro de RMN- ^1H do (R,S)-1-(3,4-metilenodioxifenil)etanol (18b) [400 MHz, CDCl_3].

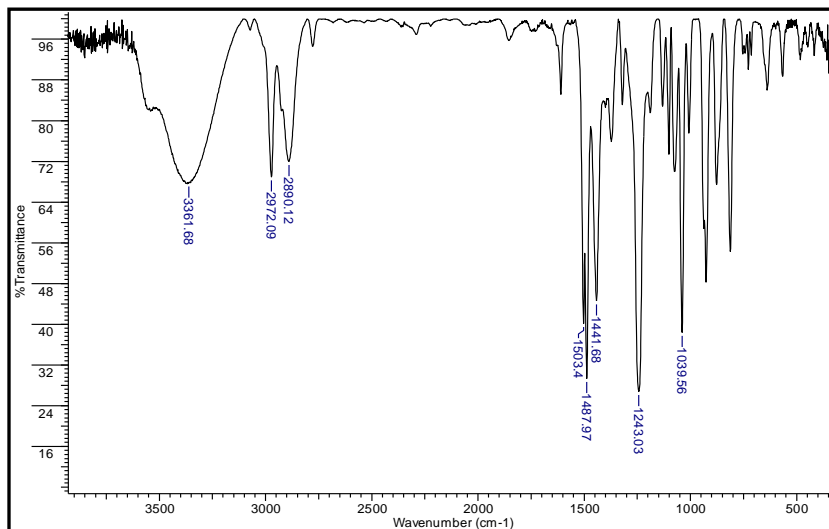


Figura 41. Espectro de IV do (R,S)-1-(3,4-metilenodioxifenil)etanol (18b) (filme)

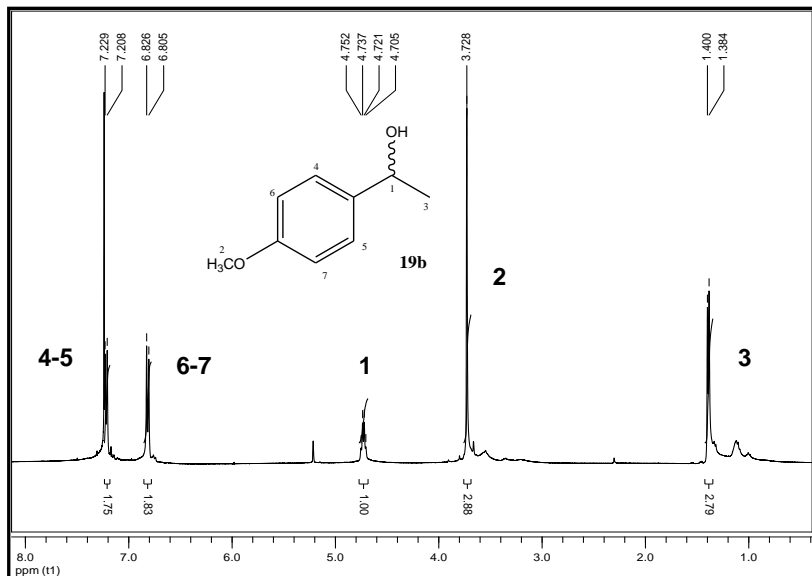


Figura 42. Espectro de RMN-¹H do (*R,S*)-1-(4-metoxifenil)etanol (**19b**) [400 MHz, CDCl₃].

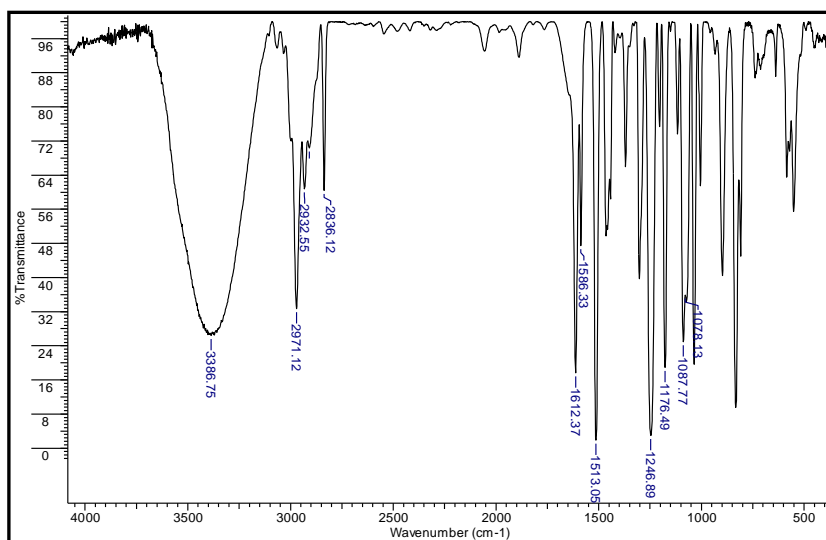


Figura 43. Espectro de IV do (*R,S*)-1-(4-metoxifenil)etanol (**19b**). (filme)

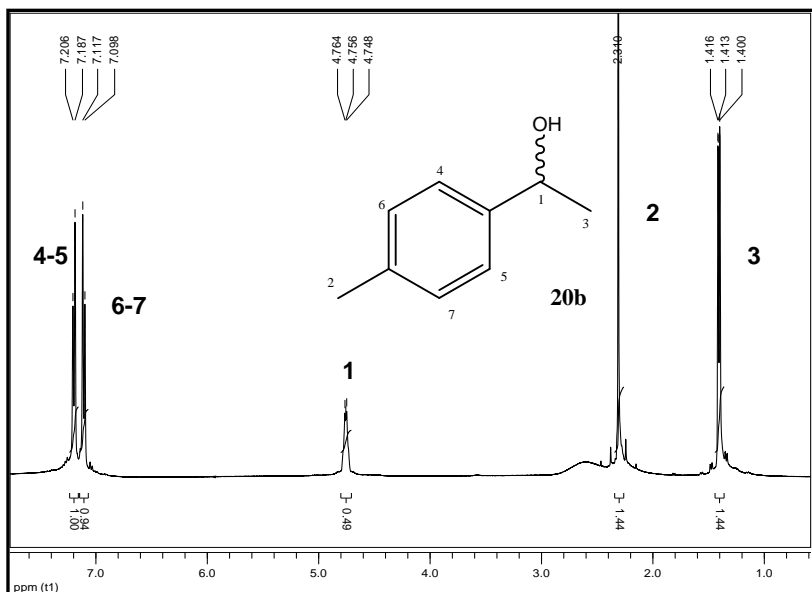


Figura 44. Espectro de RMN- ^1H do *(R,S)*-1-(4-metilfenil)etanol (**20b**) [400 MHz, CDCl_3].

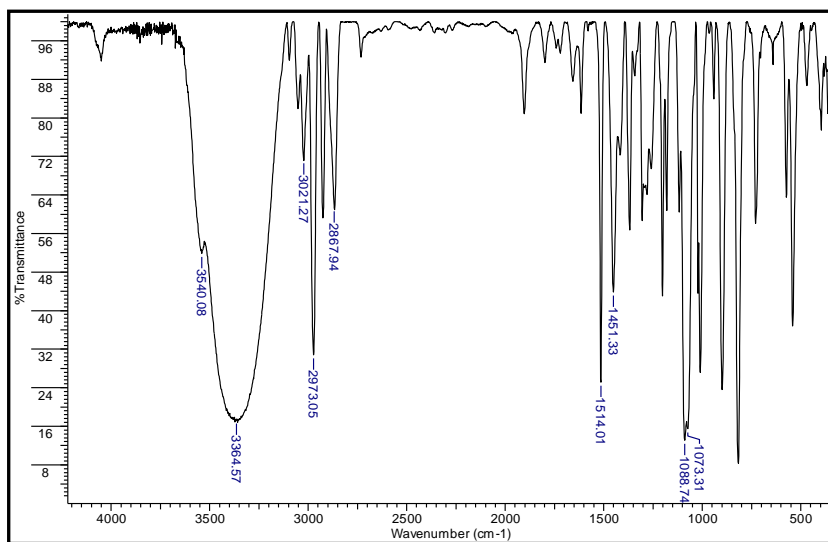


Figura 45. Espectro de IV do *(R,S)*-1-(4-metilfenil)etanol (**20b**). (filme)