**Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos**

TESE DE DOUTORADO

**Imobilização do fungo *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 e
lipase de *Pseudomonas fluorescens* em biopolímeros para
aplicações em biocatálise**

Irlon Maciel Ferreira

São Carlos, 2016

**Imobilização do fungo *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 e
lipase de *Pseudomonas fluorescens* em biopolímeros para
aplicações em biocatálise**

Irlon Maciel Ferreira

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e
Biológica

Orientador: Prof. Dr. André Luiz M. Porto

São Carlos, 2016

“É preciso sonhar, mas com a condição de crer em nosso sonho, de observar com atenção a vida real, de confrontar a observação com nosso sonho, de realizar escrupulosamente nossas fantasias. Sonhos, acredite neles.”

Lênin

Dedico este trabalho aos meus pais, Ismael e Fátima, e a minha querida esposa Jociane.

AGRADECIMENTOS

À energia que nos vigora a cada dia.

Aos meus pais e irmãos por tudo que eles representam em minha vida, em especial a minha irmã, Adriana Maciel, por compartilhar de vários momentos dessa caminhada.

À minha querida esposa, Jociane, pela compreensão, companheirismo e colaboração durante todos esses anos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Luiz M. Porto, por proporcionar a oportunidade de trabalho em seu grupo de pesquisa e pela confiança ao longo desses anos.

Ao Prof. Dr. Sergio A. Yoshioka, pela colaboração e dicas valiosas no desenvolvimento do trabalho.

Ao Instituto de Química de São Carlos e à Universidade de São Paulo pelo oferecimento da estrutura na realização do curso de doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa concedida.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Química Orgânica e Biocatálise: Lenilson, Julieta, Ana Maria, Mariana, Willian, David, Paulo, Natália, Samuel, Darlisson e Sandra (*in memoriam*).

Aos colegas e amigos dos demais laboratórios em especial: Tiago, Adriel, Rafael e Isac não só pelos encontros de diversão, mas pelos momentos de discussão em torno da pesquisa.

Aos técnicos e amigos, Marília e João, pela disponibilidade ao suporte no dia-a-dia de trabalho.

Aos técnicos da Central de Análises Químicas Instrumentais – CAQI: André, Aldimar, Sylvana e Márcio por todo suporte concedido no desenvolvimento do projeto.

Ao prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira e a Técnica Luciana Vizotto (Laboratório de RMN - UFSCar) por análises realizadas.

Ao prof. Dr. Kleber Thiago e ao Prof. Dr. Timothy J. Brocksom (Laboratório de Química Bio-inorgânica - UFSCar) por análises de rotação óptica.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Dr. João V. Comasseto e Prof. Dr. Antônio Aprígio da S. Curvelo, pelas dicas e observações ao trabalho.

Ao Prof. Dr. Giuliano C. Clososki por gentilmente ceder alguns compostos utilizados neste trabalho.

À Prof^a Dr^a. Maria O. O. Rezende e a técnica Maria Diva Landgraff (Laboratório de Química Ambiental – IQSC-USP) por análises de GC/EM.

Em nome da Edvânia o meu agradecimento à equipe da manutenção, da limpeza e do cafezinho.

E a todos e todas que de alguma forma contribuíram para o sucesso deste trabalho e para os bons momentos que passamos.

Muito obrigado!

RESUMO

FERREIRA, I. M. **Imobilização do fungo *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 e lipase de *Pseudomonas fluorescens* em biopolímeros para aplicações em biocatálise.** 2016.

Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Diversos biomateriais podem ser aplicados como suportes na imobilização de células totais de fungos filamentosos ou enzimas isoladas, visando a manutenção e o prolongamento da atividade enzimática em processos biocatalíticos. Exemplos promissores de biomateriais são a fibroína da seda e o alginato de sódio. A fibroína é um material protéico com alta estabilidade térmica, elasticidade, resistência à tensão, não sofre ataque microbiano, baixo custo de purificação e alta tenacidade, o alginato é um biopolímero versátil, devido a suas propriedades gelificantes em soluções aquosas. Assim, neste trabalho empregou-se micélios do fungo derivado de ambiente marinho, *Penicillium citrinum* CBMAI 1186, livres e imobilizados em biopolímeros (fibra de algodão, fibra de fibroína da seda e fibra de paina) na biorredução quimiosseletiva, regioseletiva e enantiosseletiva da ligação α,β -C=C de enonas α,β -, $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ - e di- α,β -insaturadas previamente sintetizados pela a reação de condensação aldólica. Foi possível a utilização do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 na redução quimiosseletiva, regioseletiva e enantiosseletiva da ligação dupla carbono-carbono de sistemas α,β -insaturados. A imobilização do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 em biopolímeros (algodão, fibroína da seda, paina e quitosana) permitiu a prolongamento da atividade celular do fungo. O protocolo desenvolvido foi capaz de obter compostos até então descritos apenas por síntese clássica. Também foi realizado reações de resolução enzimática de derivados de halodrinas por diferentes lipases microbianas de: *Pseudomonas fluorescens*, *Candida cylindracea*, *Rhizopus niveus* e *Aspergillus niger*. A lipase de *P. fluorescens* foi imobilizada em esferas de fibroína do bicho da seda (método 1, via adsorção) e em blenda com alginato de cálcio (método 2, via encapsulação) em diferentes condições, tais como, variação de solvente, variação da quantidade de enzima imobilizada e tempo de reação. As condições otimizadas foram empregadas em diferentes halodrinas, rendendo elevados excessos enantioméricos ($ee > 99\%$) e alta razão enantiomérica ($E > 200$) para os produtos acetilados. Foi possível desenvolver um protocolo simples, barato e prático para a síntese enantiosseletiva de halodrinas reforçando a versatilidade da fibroína e do alginato como suportes de imobilização para catalisadores heterogêneos. Também foi possível utilizar a lipase imobilizada (método 2) na reação de transesterificação para obtenção do biodiesel etílico. As melhores condições para o bom funcionamento do biocatalisador foram: 30% do biocatalisador, 20% de *n*-hexano, relação óleo e etanol de 1:4 a 32 °C por 48 h em agitação magnética (400 rpm). Essas condições permitiram a formação de 42% de rendimento do biodiesel etílico. O biocatalisador apresentou algumas limitações reacionais, tais como, fragilidade frente a elevadas temperaturas (> 32 °C) e prolongado tempo de agitação magnética. Porém, permaneceu apto no meio por 4 ciclos consecutivos. Conclui-se que os biomateriais (fibroína, alginato e quitosana) podem ser utilizados como alternativas versáteis na imobilização de micélios de fungos filamentosos e de enzimas isoladas para aplicações em biocatalíticas.

Palavras-chave: Biocatálise; Imobilização; Biopolímeros; *P. citrinum*; Biodiesel.

ABSTRACT

FERREIRA, I. M. **Immobilization of *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 and a lipase from *Pseudomonas fluorescens* on biopolymers for biocatalysis.** 2016. (Doctorate Thesis) - São Carlos Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Carlos, 2016.

Various biomaterials have been used as matrices for immobilization of whole filamentous fungi or isolated enzymes in order to maintain and extend enzyme activity in biocatalytic processes. Promising examples of biomaterials include silk fibroin and sodium alginate. Fibroin is a protein with high thermal stability, elasticity, and tensile strength; the ability to resist microbial attacks; and low purification costs. Owing to its gelling properties in aqueous solutions, alginate is a versatile biopolymer. In this work, we used the mycelia of a marine fungus, *Penicillium citrinum* CBMAI 1186, in the free form as well as immobilized in biopolymers (cotton fiber, silk fibroin, and kapok fiber) for the chemoselective, regioselective, and enantioselective bioreduction of the α,β -C=C bond of unsaturated α,β -, $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -, and di- α,β -enones previously synthesized by aldol condensation. *P. citrinum* CBMAI 1186 successfully performed chemoselective, regioselective, and enantioselective reduction of the double carbon-carbon bond in unsaturated α,β -systems. Immobilization of *P. citrinum* CBMAI 1186 in biopolymers (cotton, silk fibroin, kapok fiber, and chitosan) prolonged the biocatalytic activity of the fungus. This protocol could be used to obtain compounds that have until now only been produced using classic synthesis methods. Enzymatic resolution of derivatives of halohydrins by lipases from *Pseudomonas fluorescens*, *Candida cylindracea*, *Rhizopus niveus*, and *Aspergillus niger* was also carried out. *P. fluorescens* lipase was immobilized in silk fibroin spheres (method 1, via adsorption) and in a calcium alginate blend (method 2, via encapsulation) under different conditions, i.e., different solvents, quantity of immobilized enzyme, and reaction time. The optimized conditions were used to resolve different halohydrins, and the acetylated products were obtained at high enantiomeric excess ($ee > 99\%$) and high enantiomeric ratio ($E > 200$). A simple, inexpensive, and convenient protocol was developed for the enantioselective synthesis of halohydrins. The results highlight the versatility of fibroin and alginate as immobilization matrices for heterogeneous catalysts. The lipase immobilized by method 2 was also used in a transesterification reaction to obtain ethyl biodiesel. The optimum conditions for biocatalysis were: 30% biocatalyst, 20% *n*-hexane, and oil-to-ethanol ratio of 1:4 at 32°C for 48 h on a magnetic stirrer (400 rpm). Under these conditions, the yield of ethyl biodiesel reached 42%. Biocatalysts have some limitations, such as low stability at temperatures $> 32^\circ\text{C}$ and prolonged time of magnetic stirring. However, the catalysts remained active for 4 consecutive cycles. In conclusion, biomaterials (fibroin, alginate, and chitosan) can be used as versatile alternatives for immobilization of fungal mycelium and isolated enzymes for use in biocatalysis.

Keywords: Biocatalysis; Immobilization; Biopolymers; *P. citrinum*; Biodiesel.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Principais áreas científicas que contribuem para o desenvolvimento da Biotecnologia.	27
Figura 2. Exemplos de a) biotransformação e b) biocatálise de compostos orgânicos	28
Figura 3. Formação de uma ligação peptídica entre dois grupos adjacentes de α -amino ácidos.	29
Figura 4. Modelo ilustrativo chave-fechadura proposto por Emil Fischer (adaptada)	33
Figura 5. Modelo ilustrativo encaixe induzido proposto por Koshland (adaptada).	34
Figura 6. Representação esquemática da regra de três pontos proposta por Ogston	36
Figura 7. Distribuição quantitativa do uso de enzimas por setores industriais.	40
Figura 8. Principais métodos de imobilização de enzimas. (a) por adsorção. (b) por ligação covalente. (c) por ligação cruzada. (d) por encapsulamento.	41
Figura 9. Análise de infravermelho da esfera de Novozym 435 [®] (CAL-B imobilizada)	42
Figura 10. Imobilização de enzimas por ligação covalente	43
Figura 11. Estrutura molecular de um possível monômero da quitosana	48
Figura 12. Biorredução do 1-(4-metoxifenil)etanona por células do fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 imobilizado em quitosana	49
Figura 13. Ilustração da estrutura molecular do alginato de sódio	51
Figura 14. Micrografia eletrônica de varredura da fibra de seda.	53
Figura 15. Ilustração do comprimento da ligação dos aminoácidos presentes na estrutura paralela e antiparalela folha- β da fibroína	54

CAPÍTULO 2

Figura 1. Colônia de <i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 935 em meio sólido (malte 2%).	56
Figura 2. Estrutura química do glicerol, manitol e trealose	58
Figura 3. Estrutura química do núcleo de chalcona	59
Figura 4. Compostos derivados de chalconas com propriedades biológicas	60
Figura 5. Possíveis transformações químicas a partir do composto (<i>E</i>)-4-fenilbut-3-en-2-ona.	61
Figura 6. Estrutura química da riboflavina, da FAD e da FMN	63
Figura 7. Cultivo dos fungos utilizados neste trabalho em meio sólido (malte 2%, 7 dias de incubação, 32 °C, 130 rpm)	73
Figura 8. Crescimento do fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 em meio líquido (malte 2%, 7 dias, 32 °C, 130 rpm)	74
Figura 9. Ilustração das etapas de síntese das cetonas α,β -, $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ - ou di- α,β -insaturadas	76

Figura 10. Ilustração das principais etapas na preparação da fibra de fibroína da seda como suporte.....	80
Figura 11. Frascos Erlenmeyer contendo o fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 imobilizado em biopolímeros: (A) algodão, (B) fibroína e (C) paina.....	81
Figura 12. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto (<i>E</i>)-3-(4-fluorofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (3a).....	99
Figura 13. Estrutura ORTEP para a chalcona 3a	100
Figura 14. Cromatogramas obtidos por CG-EM (70 eV) da redução quimiosseletiva da ligação dupla carbono-carbono (3a) pelos fungos: (a) <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186. (b) <i>M. racemosus</i> CBMAI 1147. (c) <i>A. sydowii</i> CBMAI 935. (d) <i>P. miczynskii</i> CBMAI 930.....	102
Figura 15. Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 4a obtido pela biotransformação com o fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186.....	103
Figura 16. Emprego do 3-(4-fluorofenil)-1-fenilpropan-1-ona (4a) na síntese de tiazol com atividade anti-HIV e do fármaco Nabumetona.....	105
Figura 17. Cromatogramas obtidos por CG-EM da redução quimiosseletiva da ligação dupla carbono-carbono (3a) pelo fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186. (A) Reação com 100 mg, (B) 75 mg, (C) 50 mg e (D) 25 mg da chalcona 3a após 6 dias de reação.	105
Figura 18. Cromatograma obtido por CG/EM da redução quimiosseletiva da ligação dupla carbono-carbono (3b) pelo fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186.....	109
Figura 19. Ilustração do sítio de uma nitro-redutase dependente da NAD(P)H.....	111
Figura 20. Micrografia eletrônica de varredura do fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186: (A) Micélios livres. (B) Micélios imobilizados em fibroína.....	114
Figura 21. Micrografia eletrônica de varredura: (A) Fibras de algodão. (B) Micélios do fungo de <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 imobilizados em fibras de algodão. (C) Fibras de fibroína. (D) Micélios do fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 imobilizados em fibras de fibroína. (E) Fibras de paina. (F) Micélios do fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 imobilizados em fibras de paina.	115
Figura 22. Fotografia dos micélios do fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 imobilizado em biopolímeros: A) Algodão; B) Fibroína; C) Paina.	116
Figura 23. Estudo da proporção de <i>n</i> -hexano e tampão fosfato para a biorredução da (1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona 3f pelo fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186.	120
Figura 24. Sítio ativo da enzima QR2 (esquerda) e interação do sítio ativo com o resveratrol (direita). O cofator FAD é representado em forma de vara.....	123
Figura 25. Cromatograma obtido por CG/EM (70 eV) da reação de bio-hidrogenação da cetona (<i>E</i>)-3-fenil-1-(tiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (3h) após a extração com 6 dias de incubação pelo fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186.	124
Figura 26. RMN de ^{13}C (125 Mz, CDCl_3) do produto 4j	125

Figura 27. Cromatogramas obtidos por CLAE em coluna quiral ODH do padrão do álcool racêmico 5 (A) e do produto isolado (<i>S</i>)- 5 (B) da reação de biorredução pelo fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 após purificação.	127
Figura 28. Cromatogramas obtidos por CG/EM: A) do aldeído padrão 3m ; b) da reação após extração da reação de biotransformação do aldeído 3m com fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186	130
Figura 29. RMN ¹³ C (125 Mz, CDCl ₃) do álcool 9	131
Figura 30. Cinética de biotransformação do (<i>E</i>)-2-metil-3-fenilacrilaldeído 3m pelo fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186	134
Figura 31. Cromatogramas obtidos por CG/EM da reação de biotransformação do aldeído 3m por micélios do fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 imobilizado em: A) Quitosana comercial; B) Quitosana modificada (desacetilada).....	137
Figura 32. Cromatogramas obtidos por CLAE em coluna quiral ODH do (A) padrão racêmico 9 ; (B) do produto (<i>S</i>)- 9 com micélios do fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 livre; (C) imobilizado em QM; (D) imobilizado em QC.	138
Figura 33. Micrografia eletrônica de varredura de micélios do fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 imobilizados em (A) e (B) Quitosana comercial (QC); (C) e (D) Quitosana modificada (desacetilada) (QM)	139

CAPÍTULO 3

Figura 1. Diagrama de energia de uma reação catalisada por enzima	143
Figura 2. Cloridrinas racêmicas (2f-m) cedidas pelo Prof. Dr. Giuliano César Clososki.....	152
Figura 3. Principais etapas de extração da sericina do casulo do bicho da seda	155
Figura 4. Aparato para a diálise da solução de fibroína da seda	155
Figura 5. Principais etapas na preparação das esferas de fibroína da seda. Solubilização da fibroína em solução ternária (A) e esferas congeladas para liofilização (B).....	156
Figura 6. Etapas utilizadas no preparo da FA-LPF	158
Figura 7. Cromatogramas obtidos por CG/FID na RCE da (<i>R,S</i>)- 2a pela lipases livres (48 h, 132 rpm, 32°C). (A) Padrão racêmico da (<i>R,S</i>)- 2a . (B) Padrão racêmico do (<i>R,S</i>)- 3a . (C) RCE por <i>C. cylindracea</i> . (D) RCE por <i>R. niveus</i> . (E) RCE por <i>A. niger</i> . (F) RCE por <i>P. fluorescens</i>	176
Figura 8. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da cloroidrina acetilada (<i>S</i>)- 2a por <i>P. fluorescens</i> livre.	177
Figura 9. Micrografia eletrônica de varredura de esferas da FS-LPF em (A) 400x e (B) 5000x de ampliação.....	178
Figura 10. Análise termogravimétrica (DTG) da esfera de: (A) FS (--). (B) FS-LPF (--)	180

Figura 11. Cromatogramas obtidos por CG/FID da resolução enzimática da (<i>R,S</i>)- 2a pela FS-LPF em diferentes concentração (a) 50 mg em 24 h (b) 150 mg em 24 h (c) 100 mg em 72 h.	182
Figura 12. Estrutura química dos principais aminoácidos presentes na fibroína da seda	183
Figura 13. Cromatogramas obtidos por CG/FID. (A) Padrão racêmico da (<i>R,S</i>)- 2a . (B) Padrão racêmico do (<i>R,S</i>)- 3a . (C) Resolução enzimática da (<i>R,S</i>)- 2a pela FS na ausência da lipase de <i>P. fluorescens</i>	183
Figura 14. Cromatogramas obtidos por CG/FID. (A) Padrão racêmico da (<i>R,S</i>)- 2c . (B) Padrão racêmico do (<i>R,S</i>)- 3c . (C) Resolução enzimática da (<i>R,S</i>)- 2c pela FS-LPF.....	186
Figura 15. Cromatograma obtido por CG/FID. (A) Oxirano enantiopuro (<i>S</i>)- 4b . (B) Oxirano racêmico (<i>R,S</i>)- 4b	188
Figura 16. Cromatograma obtido por CG-FID. (A) Oxirano racêmico (<i>R,S</i>)- 4b . (B) Oxirano enantiopuro (<i>S</i>)- 4c	188
Figura 17. Espectro de RMN ¹³ C (MeOD, 500 MHz) da (<i>S</i>)-1-(4-clorofenil)-2-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)etan-1-ol (5)	190
Figura 18. Substância que apresentam o bloco químico do composto 5	191
Figura 19. Reuso da FS-LPF na resolução do (<i>R,S</i>)-2-cloro-1-feniletanol (1a). Conversão (■), excesso enantiomérico do acetato (<i>S</i>)- 3a (*).	193
Figura 20. Medida do diâmetro externo da esfera de FS-LPF	196
Figura 21. Esferas de FA-LPF: Fotografia da amostra (A), MEV em (B) 70x, (C) 1000x e (D) 21000x.....	197
Figura 22. Micrografia eletrônica de varredura da esfera de FA-LPF (corte transversal) em: (A) 50x. (B) 100x. (C) 500x. (D) 1000x.....	198
Figura 23. Espectro no infravermelho de: (A) alginato de sódio; (B) FS e (C) esferas de FA-LPF.....	200
Figura 24. Micrografia eletrônica de varredura do biomaterial de alginato de cálcio contendo a lipase de <i>P. fluorescens</i> : (A) 50x. (B) 100x.	201
Figura 25. Cromatogramas obtidos por CG/FID da resolução enzimática da (<i>R,S</i>)- 2a em diferentes formas do biocatalisador.....	203
Figura 26. Cromatogramas obtidos por CG/FID da resolução cinética enzimática do (<i>R,S</i>)-2-cloro-1-feniletanol (2a) por lipase imobilizada em FS-AL em 120 h de reação (32 °C e 300 rpm). (A) 50 mg, (B) 40 mg, (C) 20 mg, (D) 15 mg.	205
Figura 27. Cromatogramas obtidos por CG/FID da resolução cinética enzimática do (<i>R,S</i>)-2-cloro-1-feniletanol 2a por FA-LPF (120 h, 32 °C e 300 rpm): (A) Tolueno, (B) DMSO, (C) Clorofórmio, (D) DMF, (E) Éter etílico.	208
Figura 28. RCE de cloridrinas (<i>R,S</i>)- 2f-I com esferas de FA-LPF.....	209

Figura 29. Cromatogramas obtidos por CG/FID: (a) Padrão do (<i>R,S</i>)-2-cloro-1-(4-fluorofenil)etanol (2f). (b) Padrão racêmico do (<i>R,S</i>)-acetato de 2-cloro-1-(4-fluorofenil)etila (3f). (c) RCE do (<i>S</i>)- 3f e (<i>R</i>)- 2f após 120 h de reação por FA-LPF (120 h, 32 °C e 300 rpm).	211
Figura 30. Cromatogramas obtidos por CG/FID: (a) Padrão do (<i>R,S</i>)-2-cloro-1- <i>p</i> -toliletanol 2g (b) Padrão racêmico do (<i>R,S</i>)-acetato-2-cloro-1- <i>p</i> -toliletanol 3g . (c) RCE do (<i>S</i>)- 3g e (<i>R</i>)- 2g após 120 h de reação por FA-LPF (120 h, 32 °C e 300 rpm).	212
Figura 31. Cromatogramas obtidos por CG/FID: (a) Padrão do (<i>R,S</i>)-2-cloro-1- <i>m</i> -tolietanol. (b) Padrão racêmico do (<i>R,S</i>)-acetato de 2-cloro-1- <i>m</i> -tolietila 3h . (c) Reação após 240 h de reação por FA-LPF (32 °C e 300 rpm).	212
Figura 32. Reuso da FA-LPF na resolução cinética do (<i>R,S</i>)-2-cloro-1-feniletanol (1a). Conversão (▪); excesso enantiomérico (*).	216

CAPÍTULO 4

Figura 1. Cultura de oleaginosas para produzir biodiesel por região no Brasil.	222
Figura 2. Cromatogramas obtidos pela análise de CG/FID. (A) Biodiesel (ésteres etílicos). (B) Padrão interno (P.I.) (tricapina). (C) Óleo de soja (triglicerídeo) (DTG).	239
Figura 3. Curva analítica obtida para a quantificação do biodiesel etílico por FA-LPF	240
Figura 4. Cromatogramas obtidos pela análise de CG/FID da reação de transesterificação do óleo de soja por FA-LPF. (A) 20% hexano. (B) 1% L.I. (C) 20% hexano com 1% L.I. MG: Monoglicerídeo. P.I. Padrão interno. DG: Diglicerídeo. TG: Triglicerídeo.	243
Figura 5. Efeito da quantidade do biocatalisador na formação do biodiesel etílico por FS-LPF	244
Figura 6. Efeito da razão óleo:etanol na transesterificação do óleo de soja catalisada por FA-LPF.	246
Figura 7. Efeito da concentração do co-solvente na transesterificação do óleo de soja catalisada por FA-LPF	247
Figura 8. Reação de transesterificação de óleo de soja por FS-LPF a 52°C. MG: Monoglicerídeo. P.I. Padrão interno. DG: Diglicerídeo. TG: Triglicerídeo.	248
Figura 9. Efeito do tempo na transesterificação de óleo de soja por FS-LPF	249
Figura 10. Reutilização da FA-LPF. Condições do processo: 150 mg de óleo de soja, 1:4 óleo:etanol, 30% biocatalisador, 20% de <i>n</i> -hexano, 32°C por 48 h em agitação magnética (400 rpm).	251
Figura 11. Micrografia da esfera de FS-LPF após o 3º ciclo consecutivo da reação de transesterificação do óleo de soja por etanol (1:4 óleo etanol, 32 °C, 400 rpm). (A) Micrografia da superfície. (B) Micrografia do interior.	251

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Classificação das enzimas segundo a IUBMB.	31
--	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Exemplos de microrganismos usados como fontes de flavoproteínas.....	63
Tabela 2. Síntese das enonas utilizadas nesta pesquisa via reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt	76
Tabela 3. Estudo da relação de micélios úmidos do fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 com a massa de chalcona 4a	104
Tabela 4. Biorredução da chalcona 3a para a diidrochalcona 3a por micélios livres e imobilizados do fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 (6 dias, 130 rpm, 32 °C).....	113
Tabela 5. Massa micelial produzida pelo fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 em sistema bifásico	118
Tabela 6. Biorredução de cetonas α,β - e $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturadas 3g-l em sistema bifásico contendo tampão fosfato e <i>n</i> -hexano (9:1) com micélios do fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186.....	121
Tabela 7. Comparação entre os valores de $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) obtidos para o produto 4j e o relatado na literatura.	125
Tabela 8. Comparação entre os valores de $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) obtidos para o álcool 9 e os dados descritos na literatura	132

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Triagem de lipases na resolução cinética do (<i>R,S</i>)-2-cloro-1-feniletanol (1a) e do (<i>R,S</i>)-2-bromo-1-feniletanol 2a-b	175
Tabela 2. Resolução cinética do (<i>R,S</i>)-2-cloro-1-(fenil)etanol (1a) por esferas de FS-LPF. ...	181
Tabela 3. Resolução cinética de halodrinas racêmicas 2a-e por esferas de FS-LPF.....	185
Tabela 4. Síntese de epóxidos (<i>S</i>)- 3a-d a partir dos acetatos (<i>S</i>)- 4a-c ^a	187
Tabela 5. Comparação entre os valores de $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) experimentais e os descritos na literatura para o álcool 5 . ¹⁴⁷	191
Tabela 6. Valores de rotação óptica para os produtos enantiopuros obtidos pela lipase de <i>P. fluorescens</i> imobilizada em esferas de FS-LPF comparados com os dados da literatura.	194
Tabela 7. Resolução cinética enzimática da cloridrina (<i>R,S</i>)- 2a em diferentes formas do biocatalisador livre e imobilizado ^a	203

Tabela 8. Efeito da quantidade do biocatalisador na resolução cinética enzimática do (<i>R,S</i>)- 2a por lipase de <i>P. fluorescens</i> imobilizada em esferas de fibroína da seda com alginato ^a	204
Tabela 9. Efeito do solvente na resolução da cloridrina 2a por lipase imobilizada em fibroína de seda com alginato ^a	207
Tabela 10. Resolução cinética de cloridrinas (<i>R,S</i>)- 2f-I por lipase de <i>P. fluorescens</i> imobilizada em fibroína de seda com alginato de cálcio ^a	210
Tabela 11. Valores de rotação óptica para os produtos enantiopuros obtidos pela lipase de <i>P. fluorescens</i> imobilizada em esferas de FA-LPF comparados com os dados da literatura.	213

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Comparação na produção de biodiesel por catálise enzimática e catálise alcalina... ..	228
Tabela 2. Produção de biodiesel etílico utilizando enzimas (lipases) imobilizadas em diferentes suportes.	229
Tabela 3. Preparo das soluções para obtenção da curva analítica para quantificação do biodiesel etílico por GC/FID via catálise básica.	234

LISTA DE ESQUEMAS

CAPÍTULO 1

Esquema 1. Exemplo da obtenção de acrilamida a partir de acrilonitrila por A) método químico e B) Método biocatalítico.....	38
Esquema 2. Exemplo da obtenção de epicloridrina a partir do 1,3-dicloro-2-propanol por A) método químico e B) método biocatalítico	39
Esquema 3. Imobilização de (<i>R</i>)-hidroxinitrilase em quitosana ativada com glutaraldeído.	44
Esquema 4. Redução assimétrica da 4-fenil-2-butanona por TeADH imobilizada em xerogel..	45
Esquema 5. Resolução cinética do (±)-ibuprofeno por lipase de <i>Candida rugosa</i> imobilizada em nanopartículas de quitosana.....	50
Esquema 6. Oxidação assimétrica e quimiosseletiva de grupamentos alquilas por células de <i>Bacillus megaterium</i> imobilizado em alginato	52

CAPÍTULO 2

Esquema 1. Biotransformação do 2-fenilacetonitrila pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934	59
Esquema 2. Biohidroxilação seletiva do (-)-Ambrox pelo fungo marinho <i>A. sydowii</i> CBMAI 934	59
Esquema 3. Reação de redução da ligação carbono-carbono promovida por cloreto de índio (III)	62
Esquema 4. Biorredução enantiosseletiva de α -bromo éster por OYE	65
Esquema 5. Biorredução de (<i>Z</i>)- e (<i>E</i>)- α -cloro ésteres seguida pela reação de hidrólise por <i>S. cerevisiae</i>	65
Esquema 6. Biorredução do (<i>E</i>)-3-(4-(terc-butil)fenil-2-metilacrilaldeído por <i>S. cerevisiae</i>	66
Esquema 7. Síntese quimioenzimática de γ -butirolactonas por ERs e ADHs.....	67
Esquema 8. Redução quimiosseletiva da ligação dupla carbono-carbono de 3a pelo fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186	102
Esquema 9. Redução da ligação C=C da α -metil-nitroestireno pelo fungo <i>Penicillium citrinum</i> MUT 4862.....	106
Esquema 10. Proposta da adição do íon hidreto por enoato redutase pelo fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186.....	107
Esquema 11. Redução quimiosseletiva da ligação dupla carbono-carbono para as chalconas 3b -e pelo fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186.....	108
Esquema 12. Redução da ligação dupla carbono-carbono e do grupo nitro da chalcona (<i>E</i>)-3-(3-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona 3e pelo fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186.....	110
Esquema 13. Proposta de redução do grupo nitro por nitro-redutase	111

Esquema 14. Redução quimiosseletiva e regioseletiva da ligação dupla carbono-carbono da cetona 3j por métodos químicos e enzimáticos.....	126
Esquema 15. Cromatograma de CG/EM (70 eV) da biotransformação da cetona 3l por micélios do fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 em sistema bifásico.	127
Esquema 16. Biotransformação de cetonas α,β -insaturadas por células do fungo <i>Pleurotus genus</i>	105
Esquema 17. Redução da cetona 3j por NaBH ₄ e ácido bórico, seguida da tentativa de biotransformação do álcool 7	129
Esquema 18. Reação de biotransformação do aldeído 3m por micélios do fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186.....	130
Esquema 19. Reação de biotransformação enantiosseletiva do aldeído 3m por micélios do fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186.	135
Esquema 20. Biotransformação do 2-metil-cinamaldeído 3m por micélios do fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 imobilizados.....	136

CAPÍTULO 3

Esquema 1. Resolução cinética enzimática. A) Reação de transesterificação enzimática do (<i>R,S</i>)-feniletanol. B) Reação de hidrólise do (<i>R,S</i>)-acetato feniletanol	146
Esquema 2. Síntese de haloidrinas racêmicas 2a-e	152
Esquema 3. Síntese dos acetatos racêmicos 3a-m	153
Esquema 4. Resolução cinética enzimática da haloidrina 2a e 2b pela lipase <i>P. fluorescens</i> ...	155
Esquema 5. Reação de RCE do (<i>R,S</i>)-2cloro-1-(fenil)etanol (2a) por FS-LPF	156
Esquema 6. Reação de RCE de (<i>R,S</i>)-haloidrinas (2b-e) por FS-LPF	158
Esquema 7. Reação de epoxidação a partir do (<i>S</i>)-éster 3a-d	162
Esquema 8. Síntese do (<i>S</i>)-1-(4-clorofenil)-2-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)etan-1-ol (5)	163
Esquema 9. Resolução cinética enzimática do (<i>R,S</i>)- 2f-m por FA-LPF	163
Esquema 10. Exemplos de aplicações sintéticas de epóxido quiral partindo da (<i>S</i>)-cloridrina 2a	189
Esquema 11. Síntese do intermediário chave na obtenção de agentes microbianos.	182

CAPÍTULO 4

Esquema 1. Representação simplificada da reação de transesterificação do triglicerídeo.....	222
Esquema 2. Proposta do mecanismo da reação de transesterificação por catálise ácida	239
Esquema 3. Proposta do mecanismo da reação de transesterificação por catálise básica.	240
Esquema 4. Proposta do mecanismo da reação de transesterificação por catálise enzimática.	240

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

c – Conversão
CALB – Lipase de *Candida antarctica*
CAQI – Central de Análises Químicas Instrumentais
CC – Cromatografia em coluna
CCD – Cromatografia em camada delgada
CG – Cromatografia à gás
CG/EM – Cromatografia à gás por espectrometria de massas
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
d – Dubleto
dd – Duplo dupleto
DMF - Dimetilformamida
dt - Duplo tripleto
E – Enantiosseletividade
E.C. – *Enzyme Commission*
ee – Excesso enantiomérico
*F*₂₅₄ - Fluorescência no 254 nm
FA-LPF – Lipase de *P. fluorescens* imobilizada em blenda de fibroína da seda e alginato
FS – Fibroína da seda
FS-LPF – Lipase de *P. fluorescens* imobilizada em esfera de fibroína da seda
J – Constante de acoplamento
LPF – Lipase de *P. fluorescens*
m – Multiplete
P.I. – Padrão interno
q - Quarteto
RCE – Resolução cinética enzimática
RMN – Ressonância magnética nuclear
s - Singleto
t.a. - Temperatura ambiente
tc – Tempo de corrida
Tf – Temperatura final
Ti – Temperatura inicial
TMS – Tetrametil silano
tr – Tempo de retenção
U – Atividade enzimática
UV - Ultravioleta
 α – alfa
 β – beta

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1..	26
1. INTRODUÇÃO GERAL	27
1.1. Biocatálise e Biotransformação.	27
1.2. Imobilização de enzimas e microrganismos	40
<i>1.2.1. Métodos de imobilização de enzimas</i>	41
1.3. Biopolímeros.	47
<i>1.3.1. Quitosana</i>	47
<i>1.3.2. Alginato de sódio</i>	50
<i>1.3.3. Fibroína da seda</i>	52
CAPÍTULO 2	55
BIORREDUÇÃO DE CETONAS α,β-, $\alpha,\beta,\gamma,\delta$- e di-$\alpha,\beta$-INSATURADAS PELO FUNGO <i>PENICILLIUM CITRINUM</i> CBMAI 1186	55
1. INTRODUÇÃO	56
1.1. Biotransformação e biocatálise com fungos de ambiente marinho	56
1.2. Chalconas	59
1.3. Redução quimiosseletiva da ligação C=C de compostos carbonílicos α,β-insaturados	61
<i>1.3.1. Método sintético</i>	61
<i>1.3.2. Método biocatalítico</i>	62
2. OBJETIVOS	68
2.1. Objetivo geral	68
2.2. Objetivos específicos	68
3. MATERIAIS E MÉTODOS	69
3.1. Reagentes	69
3.2. Equipamentos	69
<i>3.2.1. Cromatografia por adsorção.</i>	69
<i>3.2.2. Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)</i>	70
<i>3.2.3. Espectrometria de Infravermelho-Transformada de Fourier (IV)</i>	70
<i>3.2.4. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).</i>	71
<i>3.2.5. Agitador orbital rotativo termostatizado.</i>	71
<i>3.2.6. Ponto de fusão</i>	71
<i>3.2.7. Outros equipamentos utilizados</i>	71
3.3. Microrganismos derivados de ambiente marinho	72

3.3.1. Isolamento e identificação dos fungos filamentosos de ambiente marinho	72
3.3.2. Composição da água do mar artificial.....	72
3.3.3. Cultivo microbiano em meio sólido (malte 2%).....	73
3.3.4. Cultivo microbiano em meio líquido (malte 2%)	74
3.3.5. Cultivo microbiano do fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 em solventes orgânicos.	74
3.4. Software	130
3.5. Síntese das cetonas α,β-, $\alpha,\beta,\gamma,\delta$- e di-$\alpha,\beta$-insaturadas iguoras.....	75
3.6. Reação de biotransformação	78
3.6.1. Preparo da solução tampão de Sørensen ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$)	78
3.6.2. Reação de biorredução com fungo de ambiente marinho.....	78
3.6.3. Extração das reações microbianas	78
3.6.4. Preparação dos suportes para imobilização do fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186	79
3.6.5. Métodos de imobilização das células microbianas do fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 em biopolímeros.....	80
3.6.6. Análise por microscopia eletrônica de varredura dos micélios imobilizadas em biopolímeros.....	81
3.7. Dados espectroscópicos	82
3.7.1. (E)-3-(4-fluorofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (3a)	82
3.7.2. (E)-3-(4-bromofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (3b)	82
3.7.3. (E)-3-(4-metoxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (3c)	83
3.7.4. (E)-1-(4-metoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona (3d)	83
3.7.5. (E)-3-(3-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (3e)	84
3.7.6. (1E, 4E)-1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona (3f)	84
3.7.7. (1E,3E,6E,8E)-1,9-difenilnona-1,3,6,8-tetraen-5-ona (3g)	85
3.7.8. (E)-3-fenil-1-(tiofen-3-il)prop-2-en-1-ona (3h)	85
3.7.9. (2E,4E)-5-fenil-1-(tiofen-2-il)penta-2,4-dien-1-ona (3i)	86
3.7.10. (2E,4E)-1,5-difenilpenta-2,4-dien-1-ona (3j)	86
3.7.11. (3E,5E)-6-fenil-hexa-3,5-dien-2-ona (3k)	87
3.7.12. 3-(4-fluorofenil)-1-fenilpropan-1-ona (4a)	87
3.7.13. 3-(4-bromofenil)-1-fenilpropan-1-ona (4b)	88
3.7.14. 3-(4-metoxifenil)-1-fenilpropan-1-ona (4c)	88

3.7.15. 1-(4-metoxifenil)-3-fenilpropan-1-ona (4d)	89
3.7.16. 3-(3-aminofenil)-1-fenilpropan-1-ona (4e)	89
3.7.17. 1,5-difenilpentan-3-ona (4f)	90
3.7.18. 3-fenil-1-(tiofen-3-il)propan-1-ona (4h)	90
3.7.19. (E)-5-fenil-1-(tiofen-2-il)pent-4-en-1-ona (4i)	91
3.7.20. (E)-1,5-difenilpent-4-en-1-ona (4j)	91
3.7.21. (E)-6-fenilhex-5-en-2-ona (4k)	92
3.7.22. 4-fenilbutan-2-ona (4l)	92
3.7.23. 4-fenilbutan-2-ol (5)	93
3.7.24. Síntese do (2E,4E)-1,5-difenilpenta-2,4-dien-1-ol (6)	93
3.7.25. (2E,4E)-1,5-difenilpenta-2,4-dien-1-ol (6)	94
3.7.26. Síntese do (E)-2-metil-3-fenilprop-2-en-1-ol (9')	94
3.7.27. (E)-2-metil-3-fenilprop-2-en-1-ol (9')	95
3.7.28. Síntese do 2-metil-3-fenilpropan-1-ol (9)	95
3.7.29. 2-metil-3-fenilpropan-1-ol (9)	96
3.7.30. Síntese do ácido 2-metil-3-fenilpropanoico (10)	96
3.7.31. Ácido 2-metil-3-fenilpropanoico (10)	97
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
4.1. Bio-hidrogenação de chalconas por fungos de ambiente marinho	99
4.2. Redução de chalconas pelo fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 imobilizado em biopolímeros	112
4.3. Redução de enonas α,β- e $\alpha,\beta,\gamma,\delta$-insaturadas pelo fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 em sistemas bifásicos	117
4.4. Redução enantiosseletica da ligação C=C α,β-carbonílico por micélios do fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 imobilizado em quitosana	129
5. CONCLUSÃO	140
CAPÍTULO 3	141
RESOLUÇÃO ENZIMÁTICA DE HALOIDRINAS POR LIPASE DE <i>PSEUDOMONAS FLUORESCENS</i> IMOBILIZADA EM FIBROÍNA DA SEDA	141
1. INTRODUÇÃO	142
1.1. Resolução cinética enzimática ou quimio-enzimática	142
2. OBJETIVOS	147
2.1. Objetivo geral	147

2.2. Objetivos específicos	147
3. MATERIAIS E MÉTODOS	148
3.1. Enzimas	148
3.2. Reagentes	148
3.3. Equipamentos	148
3.3.1. Cromatografia por adsorção..	148
3.3.2. Cromatografia a gás acoplada ao detector de ionização em chama (CG/FID)	149
3.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	149
3.3.4. Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)	150
3.3.5. Espectrometria de Infravermelho-Transformada de Fourier (IV).	150
3.3.6. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).	150
3.3.7. Medida de rotação óptica	151
3.4. Síntese das haloidrinas racêmicas (2a-e)	151
3.5. Síntese das cloridrinas racêmicas (2f-m)	152
3.6. Síntese dos acetatos racêmicos	183
3.7. Resolução cinética enzimática das haloidrinas 2a e 2b pela lipase de <i>P. fluorescens</i>	186
3.8. Preparo das esferas de fibroína de seda utilizadas como suporte enzimático – Método 1	154
3.8.1. Extração da sericina	188
3.8.2. Solubilização das fibras de fibroína	155
3.8.3. Obtenção das esferas de FS	191
3.8.4. Imobilização da enzima lipase de <i>P. fluorescens</i> em esferas de fibroína – Método 1 (FS-LPF)	193
3.9. Preparo das esferas de fibroína de seda utilizadas como suporte enzimático – Método 2	157
3.9.1. Densidade aparente da FA-LPF	188
3.9.2. Sorção de solventes na FA-LPF	158
3.10. Determinação da atividade enzimática	191
3.11. Resolução cinética enzimática do (R,S)-2a por lipase de <i>P. fluorescens</i> imobilizada (Método 1)	193
3.12. Resolução cinética enzimática (R,S)-2a-e por FS-LPF (Método 1)	161
3.13. Síntese dos (S)-epóxidos (4a-c)	188
3.14. Síntese do (S)-1-(4-clorofenil)-2-(1H-imidazol-1-il)etan-1-ol (5)	162
3.15. Resolução cinética enzimática do (R,S)-2f-m por FA-LPf (Método 2)	191
3.16. Reuso do biocatalisador	164

3.17 Análise por microscopia eletrônica de varredura do biocatalisador imobilizado nas esferas de fibroína e alginato	164
3.18. Dados espectroscópicos	165
3.18.1. 2-cloro-1-feniletanol (2a)	165
3.18.2. 2-bromo-1-feniletanol (2b)	165
3.18.3. 2-bromo-1-(4-bromofenil)etan-1-ol (2c)	166
3.18.4. 2-bromo-1-(4-clorofenil)etan-1-ol (2d)	166
3.18.5. Acetato de 2-cloro-1-feniletila (3a)	167
3.18.6. Acetato de 2-bromo-1-feniletila (3b)	167
3.18.7. Acetato de 2-bromo-1-(4-bromofenil)etila (3c)	168
3.18.8. Acetato de 2-bromo-1-(4-clorofenil)etila (3d)	168
3.18.9. Acetato de 2-cloro-1-(4-fluorfenil)etila (3f)	169
3.18.10. Acetato de 2-cloro-1-p-toluietila (3g)	169
3.18.11. (E)- acetato de 1-cloro-4-fenilbut-3-en-2-ila (3i)	170
3.18.12. Acetato de 2-cloro-1-(4-nitrofenil)etila (3j)	170
3.18.13. Acetato-1-clorooctan-2-ila (3k)	171
3.18.14. Acetato de 2-cloro-1-(3,4-dimetoxifenil)etila (3l)	171
3.18.15. 2-feniloxirano (4a)	172
3.18.16. 2-(4-bromofenil)oxirano (4b)	172
3.18.17. 2-(4-clorofenil)oxirano (4c)	173
3.18.18. (S)-1-(4-clorofenil)-2-(1H-imidazol-1-il)etanol (5)	173
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	174
4.1. Triagem de lipases na resolução cinética de halodrinas	174
4.2. Caracterização das esferas de FS-LPF (método 1)	177
4.3. Resolução cinética enzimática de halodrinas por diferentes quantidades de FS-LPF	180
4.4. Resolução cinética enzimática de halodrinas por FS-LPF	184
4.5. Reutilização da lipase de <i>P. fluorescens</i> imobilizada em FS-LPF	192
4.6. Caracterização das esferas de FA-LPF (método 2)	195
4.7. Resolução cinética enzimática por lipase de <i>P. fluorescens</i> livre e imobilizada (FA-LPF) em diferentes tempos reacionais	200
4.8. Estudo da quantidade de lipase imobilizada (FA-LPF) na resolução cinética do (R,S)-2a	204

4.9. Estudo do solvente na resolução cinética do (R,S)-2a por lipase imobilizada (FA-LPF)	205
4.10. Resolução cinética por FA-LPF para diferentes cloridrinas racêmicas	208
4.11. Reutilização da enzima imobilizada	215
4.12. Densidade aparente da FA-LPF	216
4.13. Sorção de solvente	216
4.14. Atividade enzimática relativa	217
5. CONCLUSÃO	218
CAPÍTULO 4	219
PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR LIPASE DE <i>PSEUDOMONAS FLUORESCENS</i> IMOBILIZADA EM BLENDA DE FIBROÍNA-ALGINATO	219
1. INTRODUÇÃO	220
1.1. Características gerais sobre o biodiesel	220
1.2. Obtenção do biodiesel	222
1.2.1. Catálise ácida	223
1.2.2. Catálise básica	224
1.2.3. Catálise enzimática	225
1.3. Lipases imobilizadas na produção de biodiesel	228
2. OBJETIVOS	230
2.1. Objetivo geral	230
2.2. Objetivos específicos	230
3. MATERIAIS E MÉTODOS	231
3.1. Reagentes	231
3.2. Preparo das esferas de fibroína de seda utilizadas como suporte enzimático – Método 2 (FA-LPF)	231
3.3. Equipamentos	231
3.3.1. Cromatografia por adsorção	231
3.3.2. Espectrometria de Infravermelho-Transformada de Fourier (IV)	232
3.3.3. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	232
3.3.4. Análise por microscopia eletrônica de varredura das FS-LPF	232
3.4. Reação de transesterificação do óleo de soja por catálise básica (NaOH)	233
3.5. Quantificação por GC/FID do biodiesel obtido por catálise enzimática	233
3.6. Transesterificação enzimática do óleo de soja por FA-LPF	234

3.7. Estudo da influência do solvente na reação de transesterificação enzimática do óleo de soja por FA-LPF - Experimento 1	235
3.7.1. <i>Experimento 1a - Reação livre de solvente</i>	235
3.7.2. <i>Experimento 1b - Reação com adição de líquido iônico BMIM.BF₄</i>	235
3.7.3. <i>Experimento 1c - Reação com adição de líquido iônico BMIM.BF₄ e n-hexano</i>	235
3.7.4. <i>Experimento 1d - Reação com n-hexano</i>	236
3.8. Variação da quantidade de suporte contendo a lipase imobilizada - Experimento 2	236
3.9. Variação da relação óleo:etanol - Experimento 3	236
3.10. Variação da quantidade de n-hexano na reação de transesterificação do óleo de soja - Experimento 4	236
3.11. Variação da temperatura na reação de transesterificação do óleo de soja - Experimento 5	237
3.12. Reuso da esfera de FA-LPF na reação de transesterificação do óleo de soja	237
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	238
4.1. Efeito do solvente na obtenção do biodiesel etílico por FA-LPF	240
4.2. Efeito da quantidade de biocatalisador na reação	244
4.3. Efeito da razão óleo:etanol	245
4.4. Efeito da quantidade de co-solvente (<i>n</i> -hexano) na reação de transesterificação do óleo de soja por FA-LPF	246
4.5. Efeito da temperatura na reação de transesterificação do óleo de soja por FA-LPF	247
4.6. Efeito do tempo reacional na obtenção de biodiesel por FA-LPF	248
4.7. Reutilização de lipase imobilizada em FS-LPF	250
5. CONCLUSÃO	252
CAPÍTULO 5	253
REFERÊNCIAS	254
CAPÍTULO 6	274
ANEXOS	274
ESPECTROS DE SUBSTÂNCIAS OBTIDAS NO CAPÍTULO 2	275
ESPECTROS DE SUBSTÂNCIAS OBTIDAS NO CAPÍTULO 3	329
ESPECTROS DE SUBSTÂNCIAS OBTIDAS NO CAPÍTULO 4	366
CAPÍTULO 7	368
PUBLICAÇÕES	369

Capítulo 1

INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Biocatálise e Biotransformação

A Biocatálise é uma área da Biotecnologia que tem ampla aplicabilidade, principalmente na química orgânica assimétrica. Segundo a Federação Européia de Biotecnologia (*European Federation of Biotechnology*), a Biotecnologia pode ser definida como “*integração entre diversas áreas tanto das Ciências Naturais quanto das Ciências da Engenharia, a fim de alcançar aplicações dos organismos, células ou análogos moleculares para diversos produtos ou serviços de interesses à sociedade*”.^{1; 2;}

³ A aplicação da Biotecnologia requer conhecimentos em diversas áreas, como é mostrado na Figura 1.

Figura 1. Principais áreas científicas que contribuem para o desenvolvimento da Biotecnologia.

Os termos *biotransformação* e *biocatálise* abrangem os processos em que o catalisador biológico, tanto as enzimas isoladas, quanto as que fazem parte de

organismos vivos, são utilizados para converterem um substrato xenobiótico em um produto de interesse via reações metabólicas.

O termo *biotransformação* é empregado quando as enzimas contidas em células de organismos vivos são utilizadas (processos fermentativos ou não) (Figura 2). Neste caso, geralmente é feita uma triagem cautelosa para evitar reações secundárias ou competitivas à reação de interesse, como por exemplo, a hidroxilação regioseletiva do fármaco fluvastatina de sódio que pode render diferentes compostos hidroxilados por diferentes microrganismos^{1,4} (Figura 2a).

Enquanto que, o termo *biocatálise* é utilizado com maior frequência por químicos orgânicos, que empregam as enzimas nas formas isoladas, imobilizadas ou mesmo contidas em organismos vivos, para catalisar um determinado substrato orgânico xenobiótico em produto (Figura 2b), como por exemplo, a síntese do éster de alanina ribavirina via esterificação regioseletiva, um importante antiviral, após otimização da reação foi produzido 80 Kg do pró-fármaco com 85% de rendimento por lipase de *Candida antarctica* (CAL-B) em THF à 60°C por 45 h de reação.⁴

Figura 2. Exemplos de a) biotransformação e b) biocatálise de compostos orgânicos.

As enzimas são macromoléculas protéicas compostas por uma sequência de aminoácidos. Esses aminoácidos estão ligados entre si por ligações covalentes (ligações peptídicas), formadas por um átomo de carbono de um grupo carboxila e por um átomo de nitrogênio de um grupo amino, levando à formação de uma ligação amídica. De acordo com o grupo presente na cadeia lateral (grupo R_1 ou R_2) o aminoácido pode ser mais polar ou de menor polaridade e sua distribuição ao longo da cadeia peptídica irá determinar o comportamento estrutural e conformacional da enzima (Figura 3).⁵

Figura 3. Formação de uma ligação peptídica entre dois grupos adjacentes de α -amino ácidos.

Para cada proteína existe uma condição sequencial de aminoácidos, chamada de *estrutura primária*, que é o nível estrutural mais simples e mais importante, pois dele deriva todo o arranjo espacial da molécula. Já a *estrutura secundária* é resultado das interações de resíduos de aminoácidos próximos à *estrutura primária*. A *estrutura terciária* é resultado das interações entre resíduos de aminoácidos localizados além da estrutura primária que produz uma conformação compacta e traçada onde a superfície é rica em resíduos de aminoácidos polares, enquanto a parte inerte é abundante em resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. Tal estrutura é fundamental para o funcionamento biológico da proteína.⁶

Além das ligações peptídicas destaca-se outros tipos de interações intermoleculares responsáveis pela estrutura terciária das proteínas: ligações de

hidrogênio, interações de Van der Waals, interações apolares, ligações dissulfetos e interações eletrostáticas que são responsáveis pela conformação enzimática.⁶

Diversas enzimas requerem o uso de pequenas moléculas ou íons inorgânicos para agirem como catalisadores. Essas moléculas são chamadas de *coenzimas* ou *cofatores*. O termo *coenzima*, também conhecido como *cossustrato*, é usado em referência às moléculas com baixa massa molecular em relação à enzima que está associada reversivelmente à enzima, porém não participa da estrutura enzimática. As *coenzimas* geralmente funcionam como intermediários durante o processo reacional na transferência de elétrons, por exemplo, NADH / FADH₂, ou transferências de grupos funcionais, por exemplo, *coenzima A* na transferência de grupos acilas. Em geral o *cofator* também está ligado reversivelmente à enzima.^{2; 3; 7}

Neste sentido, as enzimas podem ser classificadas em grupos, como mostrado na Tabela 1. Uma apresentação detalhada da classificação e nomenclatura das enzimas é definida pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB – *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) ([w.w.w.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme](http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme)).

Tabela 1. Classificação das enzimas segundo a IUBMB.

Classes	Subclasses	Reações
Oxidorrredutases		Reação de oxidação e redução, formação de ligação dupla por eliminação de hidrogênio.
		Exemplo: Hidroxilação da 2-adamantanona por citocromo P450. ⁸
	Redutases	<p>2-adamantanona</p> <p>5-hidroxi-2-adamantanona rend. = 5,9 g/L</p>
	Oxidases	
	Desidrogenases	
Transferases		Transferência de grupo aldeídico, cetônico, acila, fosforila, amino.
	Quinases	Exemplo: Síntese da Sitagliptina por transaminase. ⁹
	Transaminases	<p>Prositagliptina</p> <p>transaminase de <i>Arthrobacter</i> sp.</p> <p>50 % DMSO</p> <p>acetona</p> <p>sitagliptina ee = 99%</p>
Hidrolases		Hidrólise-formação de ésteres, amidas, lactonas, epóxidos, nitrilas, anidridos, glicosídeos.
	Lipases	Exemplo: Acetilação do tianfenicol por CAL-B. ¹⁰
	Nucleases	<p>(±)-tianfenicol</p> <p>rend. = 99%</p>
	Proteases	
	Esterases	
Liases		Adição ou eliminação de pequenas moléculas nas ligações C=C, C≡N, C=O e N=N.
	Descarboxilases	Exemplo: Síntese da acrilamida por nitrila hidratase. ¹¹
	Desidratases	<p>acrilonitrila</p> <p>acrilamida c = 90%</p>
	Hidratase	

Isomerases	Epimerases	Isomerização de um centro estereogênico, epimerização, racemização.
	Glicose isomerase	Exemplo: Conversão da glicose em frutose por glicose isomerase. ¹²
		<p>glicose $\xrightleftharpoons[\text{pH 7,5, 85 } ^\circ\text{C}]{\text{glicose isomerase de } \textit{Streptomyces} \text{ sp.}}$ frutose</p>
<hr/>		
Ligases	Acetona carboxilase	<p>Formação ou clivagem das ligações C-C, C-O, C-N concomitante participação de ATP.</p> <p>Exemplo: Formação da ligação carbono-carbono por treonina aldolase.¹³</p> <p>red. = 50% ee >99% r.d. = 60:40</p>
	Piruvato carboxilase	

As enzimas atuam como catalisadores acelerando o processo de quebra e formação da ligação que ocorrem entre os substratos presentes na reação. Elas interagem com os reagentes (substratos) formando o complexo enzima-substrato ou complexo enzimático (ES). Na maioria dos casos a associação entre a enzima e o substrato é do tipo não-covalente (ligação iônica, ligação de hidrogênio, interações hidrofóbicas, etc.).⁵

A região da enzima envolvida na formação do complexo enzimático é chamada de sítio ativo ou sítio catalítico. O sítio ativo enzimático está localizado em uma espécie de “fenda” formada a partir do enovelamento da estrutura terciária da enzima. Ele apresenta resíduos de aminoácidos, onde as cadeias laterais são capazes de interagir

com o substrato. A estrutura do sítio ativo não é importante apenas para a atividade catalítica da enzima, mas também para a enantiosseletividade e regioseletividade.¹⁴

O sítio ativo deve possuir um formato definido e ajustável, capaz de acomodar algumas moléculas, como os substratos, mas que dificulte outras espécies de entrar em contato com o sítio ativo da enzima.^{5;14} Entre várias teorias para compreender o mecanismo de ação de uma enzima com o seu substrato os mais ilustrativos são:

a) *Mecanismo chave-fechadura*

O modelo de mecanismo “chave-fechadura”, proposto por Emil Fischer em 1894, descreve que as interações entre uma enzima e seu substrato seriam estruturalmente complementares, em tamanho, forma e natureza química, formando um sistema rígido e definido (Figura 4).¹⁵ Esta complementariedade molecular, seria observada através de interações intermoleculares (interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, etc.) capazes de estabilizar a energia livre do complexo enzima-substrato.¹⁶ Este modelo falha ao considerar que a estrutura tridimensional da enzima é rígida.

Figura 4. Modelo ilustrativo chave-fechadura proposto por Emil Fischer (adaptada).

Fonte: Autoria própria

b) *Mecanismo encaixe induzido*

O mecanismo do encaixe induzido foi proposto inicialmente por Koshland. Esta teoria sugere que, durante a formação do complexo enzimático, o substrato induz uma mudança conformacional nas subunidades da enzima a qual ele interage. Esta mudança pode ser transmitida às subunidades vizinhas, induzindo na enzima a conformação responsável pelo processo catalítico (Figura 5). Assim, a teoria do encaixe induzido considera a capacidade do ligante de induzir a modificação da estrutura tridimensional do receptor biológico, ao mesmo tempo em que este receptor tem a propriedade de reconhecer uma ou um conjunto de conformações do(s) ligante(s) ou dos substratos. O substrato, após provocar esta ligeira alteração conformacional de seu receptor, estará induzindo a enzima a adotar uma conformação que será responsável para seu reconhecimento.¹⁷

Este mecanismo enzimático atualmente é o mais aceito, pois explica as transformações de inúmeros substratos xenobióticos (não naturais) pela mesma enzima, o que vem contribuindo na aplicação de síntese de moléculas quirais em reações biocatalíticas.¹⁸

Figura 5. Modelo ilustrativo encaixe induzido proposto por Koshland (adaptada).

Fonte: Autoria própria

c) *Regra dos três pontos*

A regra dos três pontos é amplamente usada para explicar a enantiosseletividade das enzimas e foi sugerida por Ogston (1948). Para obter um alto grau de enantiosseletividade, um substrato deve estar firmemente “preso” no espaço em 3 dimensões. Portanto, eles devem ter pelo menos 3 pontos diferentes de ataque do substrato ao sítio ativo da enzima. Isto exemplifica a discriminação dos enantiômeros do substrato racêmico 1 e 2 (Figura 6) com centro estereogênico. Para compostos que possuem uma quiralidade axial ou planar envolvendo um átomo de carbono sp ou sp^2 , respectivamente, figuras análogas foram propostas. No *caso I*, o enantiômero 1 é um bom substrato, permitindo uma interação complementar dos grupos (A, B, C). Isto permite uma orientação apropriada do grupo reativo através do operador químico (D), o qual é requerido para que as transformações ocorram. Nos *casos II à IV*, o enantiômero 2 é um substrato com mínima afinidade entre os grupos, dificultando que o processo enzima-substrato ocorra. Assim, é observada uma catálise menos favorecida em termos de reatividade e enantiosseletividade.¹⁹

Figura 6. Representação esquemática da regra de três pontos proposto por Ogston.¹⁹

As classes de enzimas, isoladas ou presentes em microrganismos, mais utilizadas em reações de química orgânica, tanto em escala industrial como acadêmica, ou no desenvolvimento de novas rotas sintéticas ou na produção de blocos quirais são as hidrolases e as oxidorreduções.

As hidrolases são responsáveis por aproximadamente 40% das aplicações industriais enzimáticas. Lipases e esterases representam cerca de 64% de toda publicação científica que tratam de enzimas hidrolíticas.²⁰ Esta preferência se deve a algumas vantagens:

- As reações são termodinamicamente favoráveis em água;
- Enantiosseletividade, permitindo resolução cinética, resolução dinâmica e desracemização de racematos fornecendo produtos com elevados excessos enantioméricos;

- Ausência de *coezima*, portanto as reações ocorrem em meio de reação simples e de menor custo;
- Estáveis em solventes orgânicos;
- Disponíveis comercialmente;
- Facilidade de isolamento, obtenção e purificação;
- Estáveis fora do ambiente celular.

A hidrolase mais utilizada nos processos biotecnológicos são as Lipases (hidrolases triacilglicerídeos; EC 3.1.1.3) que em condições naturais catalisam a reação de hidrólise, transesterificação e esterificação de ésteres carboxílicos. Já em condições não aquosas sua função pode ser reorientada para reações de alcoólise, esterificação, interesterificação e transferência de grupo acila e outros nucleófilos como aminas ou tiois.²¹

O uso de enzimas em síntese orgânica é uma alternativa ou complemento aos métodos químicos não enzimáticos, uma vez que apresentam alta químio-, régio- e estereosseletividade. As condições reacionais são brandas podendo ser usadas em diferentes tipos de reações químicas.^{22; 23} Estima-se que em 2020 os processos enzimáticos serão responsáveis pela produção global de 20% de todas as substâncias químicas sintéticas.

Alguns exemplos mostram a substituição de processos químicos convencionais por processos biocatalíticos mais seguros e eficientes. Um exemplo é a síntese da acrilamida, um importante produto químico utilizado para sintetizar poliacrilamida que por sua vez é empregada em tratamento de águas residuais, recuperação de petróleo e fabricação de papel.²⁴

Tradicionalmente, a acrilamida pode ser produzida quimicamente por oxidação de acrilonitrila usando cobre ou ácido sulfúrico como catalisador a altas temperaturas.²⁵ No entanto, ambos os métodos são conhecidos por causar diversos tipos de poluição ambiental.

Recentemente, a enzima nitrila hidratase (EC 4.2.1.84) vem sendo utilizada como alternativa para a produção de acrilamida. Nitrila hidratase converte eficientemente acrilonitrila em acrilamida em até 45% (m/m) sob condições brandas de reação (Esquema 1). No Japão, este processo biocatalítico produz mais de 650 mil toneladas por ano de acrilamida.²⁴

Esquema 1. Exemplo da obtenção de acrilamida a partir de acrilonitrila por A) método químico e B) método biocatalítico.

Outro exemplo da substituição de processos químicos convencionais por processos biocatalíticos é na obtenção de epicloridrina com purezas enantioméricas. A epicloridrina é um bloco de construção quiral versátil para síntese de moléculas bioativas²⁶ e pode ser normalmente produzida a partir da reação de cloreto de acila com adição de ácido hipocloroso, que produz 1,3- e 2,3- dicloroidrina. Em seguida esta mistura reage com uma base para gerar o epóxido.

Já o método biocatalítico envolve a biotransformação do substrato 1,3-dicloro-2-propanol, pela haloidrina desalogenase (E.C 4.5.1) e epoxidoidrolases (E.C 3.3.2.3) (Esquema 2). Embora a epicloridrina espontaneamente hidrolisa em meio aquoso, essas

deficiências podem ser superadas com uso de solventes orgânicos. Jin *et al.*²⁷ utilizaram epoxidoidrolases a partir de células de *Aspergillus niger* para hidrolisar epicloridrina racêmica partindo de 153,6 mM de substrato, o enantiômero (S)-epicloridrina foi obtido com 19% de rendimento e 98% de excesso enantiomérico.

Esquema 2. Exemplo da obtenção de epiclorldrina a partir do 1,3-dicloro-2-propanol por A) método químico e B) método biocatalítico.

Numerosas reações de biotransformação em escala industrial (comercializada em escala > 100 kg por ano) estão operando em várias partes do mundo. Por exemplo, o Laboratório *Pfizer* usa etapas quimioenzimáticas na produção do fármaco Lipitor®, responsável pela redução de triglicéridio no sangue.

No entanto, a grande parte de processos biocatalíticos ainda são utilizados para produzir bebidas e alimentos, seguido pela demanda da indústria farmacêutica. A distribuição estimada do uso de enzimas como biocatalisadores em escala industrial está representada pela Figura 7.²⁸

Figura 7. Distribuição quantitativa do uso de enzimas por setores industriais.²⁸

1.2. Imobilização de enzimas e microrganismos

As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ainda perder suas atividades quando estocadas ou durante o uso. Para que a enzima seja eficiente em um determinado processo, há a necessidade de protegê-la, sem deixar comprometer sua atividade catalítica. Frente a esta situação, técnicas de imobilização são desenvolvidas para fornecer maior estabilidade às enzimas.²⁹

Uma enzima imobilizada é a “enzima fisicamente confinada ou presa em uma matriz” com objetivo de aumentar ou prolongar sua atividade catalítica e ser reutilizada por inúmeras vezes.³⁰ A imobilização de enzimas começou a ser estudada no início do século XIX, ao se observar que o carvão ativado, ao qual havia sido adicionada uma preparação biológica com a atividade invertásica, mantinha a capacidade de hidrolisar sacarose mesmo após ser lavado.¹ Com o aperfeiçoamento tecnológico diferentes métodos, físicos e químicos, passaram a ser empregados para imobilização de enzimas a partir da década de 60 visando principalmente a reutilização e estabilidade das enzimas.³¹

A necessidade de imobilizar enzimas é atribuída a capacidade de reuso da enzima, sem perda na atividade catalítica e a fácil recuperação da enzima na reação, consequentemente proporciona redução de custo operacional, um fator importante em processo industrial catalisado por enzimas.²⁸ No entanto, a imobilização em alguns casos pode causar inativação da enzima, devido a novas interações entre o suporte e a enzima, provocando modificação na estrutura secundária, ou à limitação de transferência de massa (substrato) ou a diminuição da superfície de contato do substrato ao sítio ativo da enzima.

1.2.1. Métodos de imobilização de enzimas

Quatro estratégias de imobilização de enzimas ou microrganismos são tipicamente utilizadas: adsorção, ligação covalente, encapsulamento e ligação cruzada (Figura 8).

Figura 8. Principais métodos de imobilização de enzimas. (a) Por adsorção. (b) Por ligação covalente. (c) Por ligação cruzada. (d) Por encapsulamento.

a) *Imobilização por adsorção*: É o método mais empregado para imobilização de enzimas, conhecido também pelo seu simples modo de preparo, já que sua superfície tipicamente não requer funcionalização. Neste caso, o suporte pode ser orgânico como Dowex ou inorgânico como a alumina, dentre outros. A eficiência da adsorção de uma

enzima em um suporte, que em geral é na superfície, depende de vários fatores e parâmetros, tais como, tamanho e carga da enzima ou da parede microbiana, área superficial do adsorvente e, principalmente, da porosidade e tamanho dos poros do suporte.³²

O método por adsorção é de fácil aplicação, porém seu uso não está na preferência dos processos de grandes escalas, devido às fracas interações entre a enzima ou microrganismo no suporte.³³ Um interessante exemplo de imobilização enzimática por adsorção é utilizado pela CAL-B, comercializada como Novozym 435[®], o suporte é composto por acrilato, polímero VP OC 1600. A enzima fica distribuída de forma homogênea na parede externa da resina (Figura 9).^{34; 35}

Figura 9. Análise de infravermelho da esfera de Novozym 435[®] (CAL-B imobilizada).³⁵

b) Imobilização por ligação covalente: Este é o método mais estudado e difundido, e a seleção das condições de imobilização é mais difícil que os demais métodos. O uso de agentes funcionalizantes (grupos tiois, epóxidos, vinilas e aminas) na etapa de ativação do suporte promove um maior custo na obtenção do biocatalisador imobilizado. A

ligação covalente entre grupos funcionais não ativos da enzima, ou seja, grupos não essenciais para a atividade catalítica, ligada a grupos reativos na superfície sólida do suporte insolúvel são fortes e efetivos, o que torna a imobilização por ligação covalente mais estável frente à imobilização por adsorção. Como as interações entre a enzima e o suporte são fortes, pode ocorrer perda da atividade catalítica causada por modificações na conformação da enzima.³⁶ Por exemplo o Eupergits® C, um copolímero macroporoso, foi utilizado na imobilização de enzimas. Grupos aminos livres da enzima reagiram com grupos oxiranos presentes na superfície do copolímero (Figura 10), a formação desta ligação garantiu alta estabilidade da atividade enzimática em uma faixa de pH de 1 a 12. O uso do Eupergits® C em imobilização de enzimas vem sendo aplicado com sucesso nas indústrias. *Penicillin amidase* imobilizada em Eupergits® C apresentou 60% da atividade inicial em 850 ciclos na transesterificação do *para* nitrofenilfosfato.³⁷

Figura 10. Imobilização de enzimas por ligação covalente.

Fonte: Autoria própria

c) *Imobilização por entrelaçamento ou ligação cruzada*: Este método utiliza reagentes bifuncionais, tal como o glutaraldeído, que reage diretamente com o grupo amino livre da enzima. A técnica envolve a modificação química de resíduos de aminoácidos com um material insolúvel em água. A imobilização com glutaraldeído é largamente empregada, pois a enzima geralmente é mantida em um ambiente semelhante ao seu meio natural, concedendo estabilidade às variações de pH, presença de solventes orgânicos e temperaturas elevadas. A imobilização por ligação cruzada ocorre também por ligação covalente.³⁸ No entanto, essa metodologia possui alguns pontos desfavoráveis, tais como, baixa retenção de atividade e pouca reprodutibilidade. Por exemplo, Gröger *et al.*³⁹ imobilizaram (*R*)-hidroxinitrilase em uma mistura de quitosana com glutaraldeído. A enzima imobilizada foi reutilizada por 20 vezes consecutivas sem perda de rendimento e enantiosseletividade (Esquema 3).

Esquema 3. Imobilização de (*R*)-hidroxinitrilase em quitosana ativada com glutaraldeído.³⁹

d) *Imobilização por encapsulamento ou aprisionamento*: Este método consiste na retenção física do biocatalisador no interior de uma matriz polimérica semipermeável, sem qualquer alteração estrutural ou interação com o centro ativo da enzima. A vantagem de usar esta técnica é que a enzima não interage quimicamente com o meio reacional, evitando sua desnaturação ou retardando a perda de atividade. Porém, as velocidades de difusão do substrato e produto através do suporte pode ser um fator limitante dependendo do tipo de material utilizado e das condições reacionais empregadas.⁴⁰ Musa *et al.*⁴¹ imobilizaram a enzima álcool desidrogenase W 110A mutante de *Thermoanerobacter ethanolicus* (TeADH) por encapsulamento em sol-gel na redução assimétrica da 4-fenil-2-butanona para o correspondente (S)-4-fenil-2-butanol, utilizado na rota sintética de fármacos anti-hipertensivos como por exemplo do *bufeniode* (Esquema 4). O biocatalisador imobilizado foi capaz de manter a atividade enzimática por quatro ciclos reacionais consecutivos.

Esquema 4. Redução assimétrica da 4-fenil-2-butanona por TeADH imobilizada em xerogel.

Na obtenção de enzimas ou microrganismos imobilizados vários materiais podem ser utilizados como suportes. As principais propriedades a serem consideradas no suporte são: resistência a pH, pressão, temperatura, agitação, natureza hidrofóbica e hidrofílica, morfologia, estabilidade, custo, biodegradabilidade e permeabilidade.⁴² Estes fatores durante a imobilização da enzima influenciam sua conformação e o modo

como vai ligar-se ao suporte, sua atividade, bem como na transferência de massa dos reagentes e produtos da reação envolvida, afetando todo o processo enzimático. Inúmeros suportes, modificados ou não, estão sendo empregados para imobilização de enzimas. Os suportes podem ser:

a) orgânicos naturais: celulose, agar, quitina, quitosana, amido, fibras de coco, palha de arroz e bagaço cana de açúcar;⁴³ b) orgânicos sintéticos: poliacrilatos, *nylon*, poliestireno e polivinílicos;⁴³ c) inorgânicos: vidro, cerâmica, sílica mesoporosa, óxidos de ferro e celite.⁴⁰

O uso de materiais poliméricos como suporte para imobilização de enzimas tem se estendido devido às diversas características que apresentam, por serem inertes e versáteis permitem o uso de diferentes técnicas de imobilização. Contudo, o grande limitante destes materiais para uso em bioprocessos em escalas maiores, ainda é o custo destes materiais.

A busca por suportes economicamente viáveis, com maior resistência e biocompatibilidade, tem direcionado alguns estudos para os materiais lignocelulósicos, que são constituídos principalmente por lignina, celulose e hemicelulose. São materiais abundantes em vários resíduos agroindustriais como o bagaço de cana de açúcar, a palha de cana, a palha de soja, a palha de arroz, o sabugo de milho, o farelo de trigo, o sisal, dentre outros, bem como outros biopolímeros.

1.3. Biopolímeros

Assim como os polímeros, os biopolímeros são macromoléculas constituídas por longas cadeias orgânicas, com unidades menores repetidas ao longo da cadeia química (monômeros). Os biopolímeros são produzidos a partir de um organismo vivo, portanto biodegradáveis e renováveis. Biopolímeros derivados de proteínas (fibroína da seda, gelatina e colágeno) e polissacarídeos (quitosana, alginato e celulose) estão entre as classes de biopolímeros mais empregados nos processos biotecnológicos, porque apresentam várias vantagens entre elas biocompatibilidade, biodegradabilidade, estabilidade a temperaturas e pressão, podendo resultar em hidrogéis, fibras, filmes e micro- e nanopartículas.^{44; 45}

Ye *et al.*⁴⁶ imobilizaram a lipase de *Candida rugosa* em membranas nanofibrosa de poli(acrilonitrila) modificada com quitosana e gelatina. A atividade residual para lipase de *Candida rugosa* imobilizada em quitosana foi de 55%, já para a enzima imobilizada em nanofibra modificada em gelatina foi de 60%, após 10 ciclos.

Enzimas imobilizadas em biopolímeros são aplicadas em diversas áreas de interesse da sociedade. Como exemplo Liu *et al.*⁴⁷ utilizaram a transglutaminase microbiana, enzima responsável pela transaminação entre glutamina e lisina em resíduos de proteínas. Uma solução contendo gelatina e uma rede de hidrogel foi formada, garantido a este gel propriedades selantes excelentes. O bioadesivo vem sendo utilizado para impedir hemorragias e servindo como selante hemostático.

1.3.1. Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo linear baseado em sub-unidades de glucosamina, pode ser obtida a partir da desacetilação química (hidrólise básica) ou enzimática da quitina, que é o componente principal das carapaças de crustáceos, além

de ser o segundo polissacarídeo com maior disponibilidade na natureza, depois da celulose.⁴⁸ Os principais fatores que afetam o grau de desacetilação e consequentemente as características da quitosana obtida são temperatura e tempo de reação, concentração da solução do álcali, razão quitina/álcali e tamanho das partículas de quitina.^{49; 50; 51}

A quitosana é considerada um suporte ideal para imobilização de enzimas ou células microbianas, devido à alta densidade de grupos aminos (-NH₂) e hidroxilas (-OH) disponíveis (Figura 11), ela pode ser modificada pela presença de aldeídos ou oxiranos.^{52; 53}

Figura 11. Estrutura molecular de um possível monômero da quitosana.

Grupos aminos livres da quitosana podem ser ativados diretamente com glutaraldeído, para formar a base de Schiff (ligação imina) (Esquema 3) com outros grupos aminos da enzima e a outra porção do aldeído fica livre para reagir com a enzima ou reagente de interesse. A ligação covalente entre o grupo amino do biopolímero e o aldeído terminal do glutaraldeído é irreversível e aumenta a estabilidade da enzima em diferentes pHs e temperaturas.^{54; 55}

Derivados de oxiranos (glicidol e epícloridrina) são menos reativos e menos específicos que os aldeídos.⁵⁶ O mecanismo de reação da epícloridrina com quitosana é similar ao do glutaraldeído, no entanto, a epícloridrina reage preferencialmente com os grupos hidroxilas da quitosana. Estas reações podem ser efetuadas entre grupos

hidroxilas de duas moléculas de quitosana (reticulação intermolecular) ou reagir somente com um grupo hidroxila.⁵⁵

A quitosana possui facilidade na interação com outros biopolímeros tais como, gelatina, alginato ou carragena, além disso, apresenta atividade antibacteriana e é biodegradável. Também é comumente empregada na medicina, em produtos farmacêuticos, na agricultura e na indústria de cosméticos.⁵⁷

Recentemente, Rocha *et al.*⁵⁸ imobilizaram células do fungo derivado de ambiente marinho, *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 em quitosana e aplicaram na redução da 1-(4-metoxifenil)etanona. O fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 imobilizado em quitosana foi capaz de converter quantitativamente a 1-(4-metoxifenil)etanona para o (S)-1-(4-metoxifenil)etanol com excelente enantiosseletividade (*ee* >99%), enquanto que, células não imobilizadas do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 foram utilizadas e a conversão da reação foi de apenas 69% para o (R)-1-(4-metoxifenil)etanol com baixa enantiosseletividade (*ee* 35%) (Figura 12).

Figura 12. Biorredução do 1-(4-metoxifenil)etanona por células do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 imobilizado em quitosana.

Siódmiak *et al.*⁵⁹ imobilizaram a lipase de *Candida rugosa* em nanopartículas de quitosana modificada com epícloridrina. A lipase imobilizada foi utilizada na

resolução cinética do ($\pm$)-Ibuprofeno, por esterificação com diferentes álcoois (metanol, etanol, *n*-propanol e *n*-butanol). O (*R*)-Ibuprofeno foi obtido com excessos enantioméricos (68-93%) e conversões (36-50%) moderadas. Porém, a lipase imobilizada em nanopartícula foi capaz de manter 90% da atividade inicial depois de 5 ciclos de reuso (Esquema 5).

Esquema 5. Resolução cinética do ($\pm$)-Ibuprofeno por lipase de *Candida rugosa* imobilizada em nanopartículas de quitosana.

1.3.2. Alginato de sódio

O alginato é um polissacarídeo natural, extraído principalmente das algas marrons como *Laminaria hyperborean*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystispyrifer*. A estrutura química desse polissacarídeo se apresenta na forma linear, randômica e aniônica a qual contém unidades de (1,4)- β -D-manuronato (M) e (1,4)- α -L-guluronato (G) (Figura 13).⁶⁰

É um biopolímero versátil, devido a suas propriedades gelificantes em soluções aquosas, devido à interação entre os grupos carboxílicos com contra-íons divalentes, tais como, cálcio, bário e cobre. Características como porosidade, biocompatibilidade e facilidade de manipulação vem chamando atenção para o uso em microencapsulação de

enzimas e formação de membranas e encapsulação de fármacos.⁶¹ Seu uso em imobilização de enzimas ou microrganismos é atrativo devido: *i.* Processo de imobilização a temperatura ambiente e livre de solvente orgânico; *ii.* Ambiente inerte ao interior celular; *iii.* Alta porosidade do gel permitindo altas taxas de difusão; *iv.* Biodegradação sob condições fisiológicas normais.

Figura 13. Ilustração da estrutura molecular do alginato de sódio.⁶⁰

Adam *et al.*⁶² imobilizaram cepas de *Bacillus megaterium*, isolado do solo, em gel de alginato de cálcio para oxidação assimétrica de grupamentos alquilas. Além disso, a imobilização dessa bactéria em alginato aumentou a formação dos produtos oxidados bem como os excessos enantioméricos e prolongou a atividade bacteriana por mais cinco ciclos (Esquema 6).

Esquema 6. Oxidação assimétrica e quimiosseletiva de grupamentos alquilas por células de *Bacillus megaterium* imobilizado em alginato.⁶²

1.3.3. Fibroína da seda

A fibra da seda é produzida por glândulas especializadas de alguns artrópodes, principalmente pelo bicho da seda (*Bombyx mori*) e com menor capacidade de produção estão as aranhas, ácaros e escorpiões.⁶³ O comprimento da fibra de seda produzida pelo *Bombyx mori* varia de 600-1500 m, enquanto que, o comprimento da seda produzida por aranhas é de 137 m em média.^{64; 65}

A fibroína da seda (FS) tem várias vantagens sobre outros biopolímeros à base de proteínas, dentre elas a estabilidade térmica, elasticidade, resistência à tensão, não sofre ataque microbiano, baixo custo de purificação e alta tenacidade.

A fibra da seda é composta predominantemente por duas proteínas, a fibroína (200 a 350 kDa) e sericina (20 a 310 kDa) (Figura 14). A fibroína é responsável por aproximadamente 70 à 80% do peso da fibra, sendo responsável pela porção hidrofóbica da fibra. Essas proteínas são revestidas por uma película de sericina, proteína de caráter hidrofílico, de estrutura amorfa responsável por 20 a 30% do peso da fibra.⁶⁶ A sericina contém duas subunidades a α -sericina e β -sericina que são encontradas nas camadas externas e internas do casulo, respectivamente. A sericina pode ser isolada através de um processo termoquímico conhecido como degomagem.⁶⁷

Figura 14. Micrografia eletrônica de varredura da fibra de seda.⁶⁸

A estrutura cristalina da FS tem sido estudada por difração de raios-X, revelando que as cadeias moleculares estão alinhadas ao longo do eixo das fibras de seda.⁶³ Juntamente com as análises químicas, foi proposto que as cadeias são compostas majoritariamente por aminoácidos do tipo glicina e alanina com substituição ocasional por outro aminoácido, caracterizando a formação de uma estrutura de folha- β antiparalelas, que se mantêm juntas por interações fortes, como ligações de hidrogênio entre as cadeias adjacentes (Figura 15).^{69;70}

Figura 15. Ilustração do comprimento da ligação dos aminoácidos presentes na estrutura paralela e antiparalela folha- β da fibroína.

Kuzuhara *et al.* imobilizaram a glicose-oxidase em membranas de fibroína da seda. A FS após degomagem foi tratada com solução de metanol (80%) e comparada com a enzima na forma livre. A enzima imobilizada em membrana de fibroína tratada com metanol mostrou atividade relativa de 98,7%, perdendo apenas 0,05% da atividade inicial após 36 d de estocagem, além disso, permaneceu mais estável a variação de temperatura e pH que a enzima livre.⁷¹

Neste sentido, este trabalho apresenta um estudo do uso de células microbianas de fungos filamentosos, isolados do ambiente marinho, imobilizados em biopolímeros (algodão, fibroína da seda e quitosana) para a biotransformação quimiosseletiva, regiosseletiva e enantiosseletiva de diferentes enonas, seguida pela imobilização da lipase de *Pseudomonas fluorescens* também em biopolímeros (fibroína da seda e alginato de cálcio) para a resolução cinética de álcoois racêmicos e na produção de biodiesel pelo óleo de soja.

Capítulo 2

**BIORREDUÇÃO DE CETONAS α,β -, $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ - e
di- α,β -INSATURADAS PELO FUNGO *PENICILLIUM*
CITRINUM CBMAI 1186**

1. INTRODUÇÃO

1.1. Biotransformação e biocatálise com fungos de ambiente marinho

Os fungos são organismos eucarióticos que utilizam componentes orgânicos como fontes de energia. Apesar de serem na maioria aeróbios, existem ainda os fungos anaeróbios ou facultativos. Eles reproduzem-se de forma assexuada ou sexuada. Alguns fungos apresentam na parede celular quitina e celulose. Sua classificação é baseada em aspectos morfológicos macro e microscópico, bem como aspectos genômicos.^{72; 73}

Os fungos podem se desenvolver em colônias do tipo filamentosas, essas colônias são formadas por organismos multicelulares cuja aparência pode ser algodonosa ou aveludada. As colônias são formadas por hifas, longos filamentos de células conectadas e entrelaçadas, o conjunto de hifas é conhecido como micélio (massa fúngica visível) (Figura 1).^{72; 73}

Figura 1. Colônia de *Aspergillus sydowii* CBMAI 935 em meio sólido (malte 2%).

Fonte: Autoria própria

Mares e oceanos cobrem aproximadamente 70% da superfície terrestre, permitindo uma vasta quantidade de microrganismos marinhos que vem sendo

empregados em biocatálise como fonte de compostos bioativos e/ou biomateriais com importantes benefícios e aplicações para a sociedade.^{74; 75}

Microrganismos marinhos são encontrados em simbiose com outros organismos vivos, em animais marinhos (vertebrados ou invertebrados), no interior e na superfície de algas, moluscos e em corais marinhos. Tais organismos simbióticos geralmente possuem diversas enzimas que são utilizadas pelo organismo hospedeiro.^{75;}

⁷⁶

Os microrganismos marinhos são fontes de novos metabólitos e enzimas, capazes de apresentar funções específicas, apropriados a serem utilizados com sucesso em reações de biocatálise ou biotransformação de compostos orgânicos. A versatilidade enzimática está relacionada com a forma de vida desses microrganismos, criando diferentes adaptações para prosperar em nichos ecológicos específicos como: baixas temperaturas, condições e variações extremas de pH, elevada concentração de sais, alta pressão, variação de correntes marítimas e robustez aos seus mecanismos metabólicos.⁷⁷

Apesar da importância dos microrganismos marinhos ainda pouco se conhece sobre a diversidade microbiana do ambiente marinho, bem como, suas funções e interações ecológicas. A partir da década de 90 a investigação química e biológica sobre os microrganismos marinhos foi aprofundada, porém em biocatálise ainda são raros os estudos que envolvem tais microrganismos ou enzimas isoladas desse ambiente.⁷⁸

Os microrganismos derivados de ambiente marinho são classificados como marinhos obrigatórios e facultativos. Um *microrganismo obrigatório* é definido como aquele isolado de sedimentos ou organismos presentes no mar e que crescem exclusivamente em condições do ambiente marinho, enquanto que, *marinhos facultativos* são aqueles microrganismos capazes de desenvolverem-se em ambiente marinho ou adaptado a outras condições fora dele.⁷⁹

Fungos derivados de ambiente marinho têm despertado interesse biotecnológico devido à sua capacidade de produzir metabólitos secundários e enzimas extracelulares diferentes daqueles produzidos por seus homólogos terrestres, pois os fungos de ambiente marinho são adaptados às condições diferenciadas nos seus ecossistemas, como por exemplo, altas concentrações de sais. Em geral, o ambiente marinho possui baixo potencial hídrico, logo esses organismos que nele vivem, necessitam manter o potencial hídrico de suas células menor que o potencial externo (água do mar) para que possam absorver a água.⁸⁰ Para manter o potencial hídrico nas células, os fungos derivados de ambiente marinho acumulam osmólitos, tais como: glicerol, manitol e trealose (Figura 2).⁸¹

Figura 2. Estrutura química do glicerol, manitol e trealose.

Desde 2009 o Grupo de Química Orgânica e Biocatálise (IQSC-USP) vêm utilizando células de fungos derivados de ambiente marinho em reações biocatalíticas. Como exemplo, a utilização de células totais do fungo filamentoso *Aspergillus sydowii* CBMAI 934 em água do mar artificial que biotransformou a fenilacetona nitrila ao ácido 2-hidroxifenilacético (Esquema 1).⁸² Células microbianas também do fungo *A. sydowii* CBMAI 934, catalisaram a reação de hidroxilação regioseletiva do (-)-ambrox em 10 dias de fermentação (Esquema 2Esquema).⁸³

Esquema 1. Biotransformação da 2-fenilacetonnitrila pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Esquema 2. Bio-idroxilação seletiva do (-)-ambrox pelo fungo marinho *A. sydowii* CBMAI 934.

1.2. Chalconas

Chalconas ou (*E*)-1,3-difenil-2-propeno-1-onas são definidas como cetonas α,β -insaturadas, onde dois núcleos aromáticos estão ligados a um sistema carbonílico α,β -insaturado (Figura 3). São abundantemente encontradas em plantas e são precursoras de flavonóides, isoflavonóides, flavonas e diidrochalconas. O termo chalcona foi apresentado primeiramente por Kostanecki e Tabor que sintetizaram uma série de produtos naturais contendo grupos cromóforos.⁸⁴

Figura 3. Estrutura química do núcleo de chalcona.

Chalconas e seus derivados podem ser sintetizados pela reação de condensação aldólica cruzada de Claisen-Schmidt, envolvendo um derivado de aldeído aromático e um derivado de cetona aromática na presença de uma base forte como o NaOH (6 M).⁸⁴

A química de chalconas naturais ou sintéticas tem sido extensivamente estudada, devido à facilidade de síntese para obter um grande número de derivados e pela variedade de atividade biológica que apresentam, tais como, propriedade anti-tuberculose,⁸⁵ anti-leishmaniose,⁸⁶ anti-inflamatória,⁸⁷ anti-*Trypanosoma cruzi*, anti-malária⁸⁸ e anti-câncer⁸⁹ (Figura 4).

Figura 4. Compostos derivados de chalconas com propriedades biológicas.

1.3. Redução quimiosseletiva da ligação C=C de composto carbonílico α,β -insaturado

1.3.1. Método sintético

A reação de hidrogenação da ligação carbono-carbono de composto carbonílico α,β -insaturado é comumente usada em síntese orgânica. A maior dificuldade nesta reação é a quimiosseletividade que em alguns casos favorecem a redução exclusiva da ligação C=O através do ataque nucleofílico 1,2, ou a redução exclusiva da ligação dupla α,β -C=C através do ataque nucleofílico 1,4, ou ainda, podendo ocorrer ambos os ataques levando a uma mistura de produtos. A predominância do ataque nucleofílico ocorre entre a natureza do aceptor, a natureza do nucleófilo e as condições reacionais.⁹⁰ A presença de dois sítios reativos podem formar misturas de produtos (Figura 5).

Figura 5. Possíveis transformações químicas a partir do composto (*E*)-4-fenilbut-3-en-2-ona

Durante décadas, vários metais como o In, Pd, Rh ou Ti foram empregados como catalisadores em reações de redução quimiosseletiva da ligação dupla carbono-carbono de cetonas e aldeídos α,β -insaturados (Esquema 3). Em alguns casos essas

metodologias à base de metais ou de seus correspondentes complexos tem um alto custo financeiro e exigem condições drásticas de pressão, temperatura e meios inertes.^{91; 92; 93;}

94

Esquema 3. Reação de redução da ligação carbono-carbono promovida por NaBH₄ na presença de InCl₃.

1.3.2. Método biocatalítico

Neste contexto, a biocatálise é uma alternativa ambientalmente desejável, gerando menor quantidade de resíduos, menor custo de reação e pelo o uso de solvente aquoso na redução quimiosseletiva, regioseletiva e estereosseletiva de cetonas e aldeídos α,β -insaturados.⁹⁵

A maioria das enzimas responsáveis pela biorredução da ligação dupla C=C são chamadas de enoato-redutase (E.C. 1.6.99.1) ou eno-redutase (E.C. 1.6.99.1), em geral catalisam reações de oxidação-redução. O processo de redução por essas enzimas ocorrem em ligações duplas ativadas por um ou mais grupos eletrorretiradores, tais como, carbonilas, nitro-olefinas, ciano-olefinas ou iminas.^{96,97}

As eno-redutases também são conhecidas como flavoproteínas (Latin: *flavus* = amarelo) e utilizam como *coenzimas* tanto os mononucleotídeos de flavina [*Flavin mononucleotide* (FMN)] quanto os dinucleotídeos de flavina-adenina [*Flavin adenine dinucleotide* (FAD)]. Essas coenzimas são derivadas da vitamina B₂ (riboflavina) que contém um anel isoaloxazina e em geral esses nucleotídeos estão fortemente ligados às enzimas, para as quais servem de grupos prostéticos (Figura 6). Em geral as

flavoproteínas são complexas, algumas possuem além de um nucleotídeo de flavina íons inorgânicos fortemente ligados (ferro ou molibdênio) capazes de participar da transferência de elétrons,⁵ muitas dessas enzimas podem ser isoladas a partir de fungos, bactérias ou plantas (Tabela 1).⁹⁸ Comercialmente essas enzimas são vendidas na forma de sal dissódio (FADH-Na₂) e 1,0 g pode ser adquirido por aproximadamente US\$ 808,00.

Figura 6. Estrutura química da riboflavina, da FAD e da FMN.

Tabela 1. Exemplos de microrganismos usados como fontes de flavoproteínas.

Microrganismo	Ano	Origem
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1995	Fermento biológico ⁹⁹
<i>Pseudomonas fluorescens</i> I-C	1999	Solo contaminado com nitroglicerina ¹⁰⁰
<i>Thermus scotoductus</i> SA-01	2008	Minas de ouro ¹⁰¹
<i>Kazachstania spencerorum</i>	2011	Intestino de larvas <i>Psychidae</i> sp. ¹⁰²
<i>Acaryochloris marina</i> MBIC11017A	2013	Ambiente marinho ¹⁰³

A maior parte das eno-redutases que foram identificadas nas últimas décadas pertencem à família da *Old Yellow Enzymes* (OYE) que leva este nome devido à

presença de um mononucleotídeo de flavina (FMN) que confere uma cor amarela nas amostras de proteínas purificadas ou nos extratos microbianos. A primeira OYE isolada e caracterizada foi a partir da *Saccharomyces pastorianus* (anteriormente conhecida como *carlsbergensis*), desde então novos microrganismos e novas aplicações foram desenvolvidas para essas enzimas.^{96; 104; 105; 106}

Apesar desses biocatalisadores (microrganismos ou enzimas isoladas) serem conhecidos há muito tempo, sua aplicação em química orgânica sintética começou a ser explorada nas últimas décadas, produzindo interessantes moléculas biologicamente ativas, fármacos ou intermediários chaves na síntese total de produtos naturais.^{107; 108; 109}

Por exemplo, enzimas OYE3 expressas em *S. cerevisiae* foram utilizadas na redução estereosseletiva de ésteres α,β -insaturados contendo um átomo de bromo na posição α -carbonílica. Ambos estereoisômeros (Z)-2-bromobut-2-enoato de metila e (E)-2-bromobut-2-enoato de metila foram reduzidos ao correspondente (S)-2-bromobutanoato de metila com altos excessos enantioméricos e altos rendimentos.¹⁰⁷ Tais compostos são intermediários chaves na síntese de agentes farmacêuticos usados no tratamento de diabetes (Esquema 4).

Esquema 4. Biorredução enantiosseletiva de α -bromo éster por OYE. ¹⁰⁷

No entanto, a estereosseletividade da redução da ligação carbono-carbono mediada por enoato-redutase pode ser controlada a depender do substrato empregado.

Brenna *et al.* utilizaram células de *S. cerevisiae* na redução do (Z)- e do (E)- α -cloro éster seguida pela reação de hidrólise. O isômero (E)- forneceu o ácido (S)-2-clorobutanoico com um excesso enantiomérico de >98% e 20% de rendimento, enquanto o isômero (Z)- produziu o ácido (R)-2-clorobutanoico com um excesso enantiomérico de 68% e 10% de rendimento (Esquema 5). ¹⁰⁸

Esquema 5. Biorredução de (Z)- e (E)- α -cloro ésteres seguida pela reação de hidrólise por *S. cerevisiae*.

Outra aplicação quimioenzimática por enoato-redutase foi empregada na redução da ligação carbono-carbono do (E)-3-(4-(*terc*-butil)fenil-2-metilacrilaldeído. O

correspondente (*S*)-álcool foi produzido em rendimentos quantitativos e com alta pureza enantiomérica (>99%) por *S. cerevisiae*. O (*S*)-álcool pode ser utilizado como intermediário na síntese do fungicida (*S*)-Fempropidina® (Esquema 6).¹¹⁰

Esquema 6. Biorredução do (*E*)-3-(4-(*tert*-butil)fenil)-2-metilacrilaldeído por *S. cerevisiae*

Lactonas enantiomericamente puras também foram sintetizadas em duas etapas quimioenzimáticas, a primeira envolveu o uso da enoato-redutase e a segunda etapa foi realizada com a utilização de álcool desidrogenase (ADH). Primeiramente a enzima foi utilizada na redução da ligação dupla carbono-carbono do composto carbonílico α,β -insaturado, tanto o isômero *Z* como o isômero *E* renderam o enantiômero (*R*) em bons rendimentos (60 e 80% respectivamente) e 99% de excesso enantiomérico para ambos os casos. Em seguida, diferentes ADHs foram usadas na reação de lactonização. Foi possível obter lactonas do tipo Prelog e *anti*-Prelog, ambas com >99% de excesso enantiomérico e 80% de rendimento (Esquema 7).¹¹¹

Esquema 7. Síntese quimioenzimática de γ -butirolactonas por ERs e ADHs

Como observado, há um campo extenso para ser explorado sobre a identificação de novos microrganismos que apresentam enzimas do tipo ERs e suas aplicações em reações quimioenzimáticas. Assim neste trabalho foi utilizado fungos de ambiente marinho para promover a redução da ligação dupla C=C de compostos carbonilados.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste capítulo foi a triagem de fungos derivados de ambiente marinho na biorredução da ligação dupla carbono-carbono de sistemas α,β -carbonílicos.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Estudo da redução quimiosseletiva de chalconas por fungos derivados de ambiente marinho;

2.2.2. Imobilização do microrganismo *P. citrinum* CBMAI 1186 em fibras de biopolímeros (algodão, fibroína da seda e paina) para aplicar na biorredução da ligação dupla carbono-carbono da (*E*)-3-(4-fluorofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona;

2.2.3. Aplicação da metodologia de biorredução quimiosseletiva e regiosseletiva de enonas α,β -, $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ - e di- α,β -insaturadas por micélios do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 em sistema bifásico (tampão fosfato e hexano);

2.2.4. Estudo da redução enantiosseletiva da ligação C=C α,β -insaturada por micélios do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 imobilizado em quitosana.

3. MATERIAIS E METÓDOS

3.1. Reagentes

Acetofenona **1a** (99%), 4-metoxiacetofenona **1b** (99%), acetona **1c** (99%), 1-(tiofen-3-il)etanona **1d**, (99%), 4-fluorobenzaldeído **2a** (99%), 4-bromobenzaldeído **2b** (99%), benzaldeído **2d** (99%), 3-nitrobenzaldeído **2e** (99%), foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®]. O 4-anisalaldeído **2c** (98%) e cinamalaldeído **2f** (98%) foram adquiridos da Vetec[®]. Os compostos (*E*)-4-fenilbut-3-en-2-ona (98%) **3l** (*E*)-2-metil-cinamalaldeído (98%) **3m** foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®]. Hidróxido de sódio (97%) e ácido clorídrico (37%) foram adquiridos da Quemis[®]. Todos os sais utilizados na preparação da água do mar artificial foram da Vetec e Synth[®]. Os solventes *n*-hexano, isopropanol, acetato de etila, tolueno, diclorometano e acetonitrila grau (CLAE) foram adquiridos da Panreac. O dimetilsufóxido (97%) da Synth e os meios de cultura foram da marca Acumedia[®].

3.2. Equipamentos

3.2.1. Cromatografia por adsorção

A purificação dos compostos orgânicos foi realizada por cromatografia em coluna (cromatografia *flash*) usando sílica gel *flash* 60 e uma mistura apropriada de solventes orgânicos (hexano e acetato de etila). As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em folhas cromatográficas com sílica gel 60 F₂₅₄ suportada em placa de alumínio (revelador para UV e espessura de 0,2 mm). A visualização dos compostos orgânicos impregnados nas cromatoplasas foi obtida pela exposição à luz ultravioleta (254 nm) ou por meio de solução de ácido fosfomolibdico (H₃PMo₁₂O₄₀) (7% em etanol).

3.2.2. Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)

As análises por espectrometria de massas foram realizadas em um aparelho Shimadzu/GC 2010, acoplado a um auto injetor Shimadzu/AOC-5000 e um detector de massas (Shimadzu MS2010 Plus) com impacto de elétrons (70 eV) equipado com uma coluna de sílica fundida DB-5MS (Agilent J&W Advanced 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O gás de arraste foi o hélio a 65 kPa. As análises foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica e Biocatálise (IQSC-USP).

3.2.3. Espectroscopia de Infravermelho-Transformada de Fourier (IV)

Os espectros no Infravermelho (IV) foram realizados em um espectrômetro de marca Bomem modelo MB-102 e no espectrômetro de marca SHIMADZU IRAffinity, ambos operando com Transformada de Fourier. As análises foram realizadas na Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI), do Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo (IQSC-USP). Os espectros foram obtidos na região de 4.000 a 400 cm⁻¹ usando pastilhas de KBr (amostras sólidas) e cristal de silício (amostras líquidas). As amostras sólidas, previamente secas em alto vácuo, foram preparadas misturando-se uma certa quantidade do compostos com o sal de KBr (grau espectroscópico) seco em estufa (100 °C, 24 h), a mistura foi triturada e prensada até a formação da pastilha fina e translúcida. As amostras líquidas, secas em alto vácuo, foram preparadas com adição de uma alíquota pura diretamente no cristal de silício.

3.2.4. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C foram obtidos em um espectrômetro de marca Agilent Technologies 500/54 Premium Shielded ou Agilent Technologies 400/54 Premium Shielded, ambos pertencentes à CAQI do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (ISCQ-USP). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e a constante de acoplamento (J) em Hz, utilizando o próprio solvente (CDCl_3) ou tetrametilsilano (TMS) como sinal de referência. As amostras foram preparadas com a solubilização de 10 a 20 mg do composto em 600 μL de CDCl_3 .

3.2.5. Agitador orbital rotativo termostatizado

O crescimento dos fungos marinhos e as reações de biotransformação foram realizados em agitadores rotativos de marca Nova Analítica *SI 600R*, Tecnal TE-421 ou Superohn.

3.2.6. Ponto de fusão

Os valores de ponto de fusão foram reportados sem correção e foram determinados em capilares fechados por um aparelho de marca Fisaton FT-500 pertencente ao Laboratório de Síntese Orgânica, coordenado pelo Prof. Dr. Antônio C. B. Burtoloso (IQSC-USP).

3.2.7. Outros equipamentos utilizados

A balança analítica utilizada foi a de modelo AY 220 – Shimadzu. A câmara de fluxo laminar de marca Veco. A autoclave vertical de modelo Phoenix. Medidor de pH modelo 8010 de marca Qualxtron.

3.3. Microrganismos derivados de ambiente marinho

3.3.1. Isolamento e identificação dos fungos filamentosos de ambiente marinho

Os fungos *Penicillium miczynskii* CBMAI 930, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935 foram isolados da esponja *Chelonaplysilla erecta*. O fungo *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 foi isolado a partir da alga marinha *Caulerpa* sp. e o fungo *Mucor racemosus* CBMAI 847 foi isolado da alga *Mussismilia hispida*. A alga e a esponja marinha foram coletadas pelo Grupo de Química Orgânica de Sistemas Biológicos (IQSC/USP), coordenado pelo Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck, na cidade de São Sebastião, Litoral Norte do Estado de São Paulo, Brasil. O isolamento dos fungos foi realizado em colaboração com o Grupo de Pesquisa em Ecologia de Microrganismos Aquáticos, sob coordenação da Prof^a Dra. Mirna H. R. Seleghim (Universidade Federal de São Carlos).

Os fungos foram identificados pelo método convencional e pelo método molecular no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade de Campinas (Unicamp). O armazenamento, a manipulação e as inoculações foram realizadas de acordo com os protocolos já descritos em microbiologia.⁷² Os fungos foram depositados na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria – CBMAI (<http://webdrm.cpqba.unicamp.br/cbmai/>).

3.3.2. Composição da água do mar artificial

A composição da água do mar artificial empregada foi constituída por uma mistura de sais: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($1,36 \text{ g.L}^{-1}$), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($9,68 \text{ g.L}^{-1}$), KCl ($0,6 \text{ g.L}^{-1}$), NaCl ($30,0 \text{ g.L}^{-1}$), Na_2HPO_4 ($0,014 \text{ mg.L}^{-1}$), Na_2SO_4 ($3,47 \text{ g.L}^{-1}$), NaHCO_3 ($0,17 \text{ g.L}^{-1}$), KBr ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$), $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($0,040 \text{ g.L}^{-1}$), H_3BO_3 ($0,030 \text{ g.L}^{-1}$).¹¹² Todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos.

3.3.3. Cultivo microbiano em meio sólido (malte 2%)

Em um frasco Schott de 250 mL adicionou-se 2 g de extrato de malte e 2 g de ágar em 100 mL de solução de água do mar artificial. Em seguida o pH da solução foi ajustado para 8,0 utilizando-se uma solução de KOH 0,7 mol.L e o meio líquido foi autoclavado por 20 min (121 °C, 1,5 KPa). Esta solução foi vertida em placa de Petri e após a solidificação do meio realizou-se o repique dos fungos. Por fim, as placas permaneceram em estufa por 7 dias à temperatura de 32 °C, permitindo o crescimento dos fungos (Figura 7).

Figura 7. Cultivo dos fungos utilizados neste trabalho em meio sólido (malte 2%, 7 dias de incubação, 32 °C, 130 rpm).

Penicillium miczynskii CBMAI 930

Mucor racemosus CBMAI 847

Penicillium citrinum CBMAI 1186

Aspergillus sydowii CBMAI 935

Fonte: Autoria própria

3.3.4. Cultivo microbiano em meio líquido (malte 2%)

A inoculação dos fungos de ambiente marinho em meio líquido foi realizada em ambiente estéril com a transferência de 20 fragmentos circulares do meio sólido (0,5 cm de diâmetro) contendo micélios da cultura estoque. O crescimento microbiano foi realizado com 600 mL de meio de cultura em extrato de malte 2% com água do mar artificial em um frasco Erlenmeyer (2 L) fechado com tampão de algodão. O pH da solução foi ajustado para 8 com solução de KOH 0,7 M ou HCl 0,5 M. O frasco permaneceu em agitação rotativa (7 dias, 32 °C, 130 rpm) (Figura 8).

Figura 8. Crescimento do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 em meio líquido (malte 2%, 7 dias, 32 °C, 130 rpm).

Fonte: Autoria própria.

3.3.5. Cultivo microbiano do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 em solventes orgânicos

Para estudar o efeito dos solventes orgânicos no crescimento do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186, cinco fragmentos circulares do meio sólido, a partir da cultura estoque (0,5 cm x 0,5 cm), foram cultivados a 32 °C em um frasco Erlenmeyer (250 mL) contendo 95 mL de água do mar artificial (pH 7,0) e 5 mL do respectivo solvente orgânico (acetona, acetato de etila, *n*-butanol, diclorometano, *n*-hexano ou tolueno). Após seis dias de incubação em agitador rotativo (32 °C, 130 rpm) os micélios foram

removidos por filtração em funil de Büchner, em seguida a massa fúngica foi seca em estufa (32 °C) e determinou-se a quantidade de massa micelial total produzida nestas condições.

3.4. Software

Os nomes dos compostos apresentados foram atribuídos segundo o software ChemBioDraw Ultra, Versão 11.0, que segue a regra da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC). Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram analisados pelo software Mestre Nova versão 9.0.

3.5. Síntese das cetonas α,β -, $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ - e di- α,β -insaturadas

Em um balão de 250 mL foi adicionado 30 mL de etanol, o correspondente aldeído e a correspondente cetona em quantidade indicada na Tabela 2. A reação permaneceu por 5 min em agitação magnética. Em seguida foi adicionado lentamente 5 mL de NaOH (6 mol.L⁻¹) e a reação permaneceu em agitação magnética por 12 h à temperatura ambiente. Após este período, transferiu-se a mistura para um frasco Béquer (500 mL) contendo aproximadamente 100 g de gelo picado e 15 mL de HCl 10%.¹¹³ O precipitado formado foi filtrado a vácuo e lavado (5 x 100 mL) com água gelada, quando necessário os produtos foram recristalizados em EtOH a quente. Os produtos foram obtidos em bons rendimentos, caracterizados por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , espectroscopia no Infravermelho (IV), Cromatografia a Gás - Espectrometria de Massas (GC-EM) e ponto de fusão (p.f.) (Figura 9).

Figura 9. Ilustração das etapas de síntese das cetonas α,β -, $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ - ou di- α,β -insaturadas

Fonte: Autoria própria

Tabela 2. Síntese das enonas utilizadas nesta pesquisa via reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt.

	$R_1-C(=O)CH_3 + R_2-C(=O)H \xrightarrow[EtOH, 24 h, t.a.]{NaOH (6 M)} R_1-C(=O)-CH=CH-R_2$		
Reação	Cetona (mmol)	Aldeído (mmol)	Produto (%)
	1a-d	2a-d	3a-k
1			
	1a (10 mmol)	2a (11 mmol)	3a (96%)
2			
	1a (10 mmol)	2b (11 mmol)	3b (90%)
3			
	1a (10 mmol)	2c (11 mmol)	3c (92%)
4			

	1b (10 mmol)	2d (11 mmol)	3d (87%)
5
	1a (10 mmol)	2e (11 mmol)	3e (96%)
6
	1c (10 mmol)	2d (20 mmol)	3f (65%)
7
	1c (10 mmol)	2f (20 mmol)	3g (82%)
8
	1d (10 mmol)	2d (11 mmol)	3h (83%)
9
	1d (11 mmol)	2f (10 mmol)	3i (89%)
10
	1a (10 mmol)	2f (11 mmol)	3j (78%)
11
	1c (10 mmol)	2f (5 mmol)	3k (93%)

3.6. Reação de biotransformação

3.6.1. Preparo da solução tampão de Sørensen ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$)

Para cada 1 L de solução tampão fosfato de sódio foi utilizado 11,876 g de NaH_2PO_4 e para cada 1 L de solução tampão fosfato de potássio foi utilizado 9,078 g de KH_2PO_4 . O pH esperado foi obtido com uma mistura apropriada de cada solução.¹¹⁴

3.6.2. Reação de biorredução com fungo de ambiente marinho

Todas as reações de biotransformação das cetonas α,β -, $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ - ou di- α,β -insaturadas foram realizadas em meio líquido e em frascos Erlenmeyer de 250 mL. Micélios úmidos do fungo derivado de ambiente marinho (5 g) foram ressuspensos em 100 mL de uma solução tampão (pH 7) e em seguida foi adicionado 50 mg da cetona α,β -, $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ - ou di- α,β -insaturada (**3a-k**) ou 50 mg do (*E*)-2-metil-3-fenilacrilaldeído (**3m**) previamente dissolvido em 400 μL de DMSO. As reações foram mantidas em agitação orbitalar (32 °C e 130 rpm). O progresso da reação foi acompanhado a cada 24 h com a retirada de uma alíquota de 1 mL do meio reacional e adição de 1 mL de acetato de etila. A mistura foi agitada em vortex e centrifugada (6000 rpm, 6 min). A fase orgânica foi retirada para análise em CCD e/ou CG/EM.

3.6.3. Extração das reações microbianas

Após a reação permanecer por 6 dias em agitação orbitalar os micélios (contidos na reação) foram filtrados a vácuo em funil de Büchner e transferidos para um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL de água destilada e 25 mL de acetato de etila, permanecendo em agitação magnética por 30 min. Por fim, as células foram novamente filtradas a vácuo em funil de Büchner e a mistura final foi extraída por partição líquido-líquido com acetato de etila (3 x 30 mL). À fase orgânica foi

adicionado Na_2SO_4 anidro a qual foi posteriormente filtrada e transferida para um balão de fundo redondo de 125 mL. O solvente foi removido a pressão reduzida por evaporador rotativo.

3.6.4. Preparação dos suportes para imobilização do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186

A preparação dos suportes deu-se primeiramente com a manipulação do casulo do bicho da seda picotado (3,0 g) e transferido para uma solução previamente aquecida à temperatura próxima de 100 °C, contendo uma solução de Na_2CO_3 2% (500 mL) em agitação magnética por 30 min. Lavou-se o material com água destilada (3 x 1000 mL). Posteriormente a fibra foi colocada para secar em estufa (70°C, 24 h). Por fim, a fibroína foi desfiada e picotada em moinho de facas (SOLAB, modelo SL31 - Embrapa). O casulo do bicho da seda – *Bombyx mori* foi fornecido pelo sericultor Hélio Hatshugai, da cidade de Bastos, SP. Já as fibras de algodão foram adquiridas comercialmente (APOLO[®], Brasil), sendo esterilizada à temperatura de 121 °C por 20 min para posterior uso. As fibras de paina foram coletadas a partir do fruto da *Ceiba speciosa*, em 20 de março de 2013 na cidade de São Carlos, SP, Brasil. As fibras de paina foram lavadas com 500 mL de tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH = 7) para remover as impurezas, em seguida o material foi esterilizado à temperatura de 121 °C durante 20 min para posterior uso (Figura 10).

Figura 10. Ilustração das principais etapas na preparação da fibra de fibroína da seda como suporte.

Fonte: Autoria própria

*3.6.5. Métodos de imobilização das células microbianas do fungo *P. citrinum* CBMAI*

1186 em biopolímeros

Após o cultivo do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 em meio líquido (Seção 2.3.3) os micélios foram recolhidos por filtração (5,0 g massa úmida) e ressuspensos em 100 mL de tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, $\text{pH} = 7$) com 0,5 g do respectivo biopolímero (fibras de algodão, fibroína ou fibras de paineira) em um frasco Erlenmeyer (250 mL). O meio contendo o suporte e micélios do fungo foram incubados durante 48 h em um agitador orbital (32 °C, 130 rpm) (Figura 11). O fungo imobilizado foi filtrado por funil de Büchner e utilizado imediatamente na reação de biotransformação da chalcona **3a**. O biocatalisador imobilizado foi caracterizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV) antes e após o uso.

Figura 11. Frascos Erlenmeyer contendo o fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 imobilizado em biopolímeros: (A) algodão, (B) fibroína e (C) paina.

Fonte: Autoria própria

3.6.6. Análise por microscopia eletrônica de varredura dos micélios imobilizadas em biopolímeros

As células imobilizadas foram previamente lavadas com água destilada para remover o suporte em excesso (3 x 20 mL). Em seguida, o material biológico foi desidratado por sucessivas lavagens contendo 10 mL de uma solução de água e etanol (10%, 25%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100%) em frascos Erlenmeyer de 50 mL por 15 min em cada etapa. As amostras foram secas em dessecador e revestidas com ouro (*sputtering*). As imagens digitalizadas foram obtidas com aumentos que variaram de 1.000 a 5.000 vezes em um microscópio eletrônico de varredura (Leica-Zeiss LEO modelo 440 SEM) operando na tensão de 20 kV. Estas análises foram realizadas na CAQI – IQSC.

3.7. Dados espectroscópicos

3.7.1. (E)-3-(4-fluorofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (**3a**)

$C_{15}H_{11}FO$, 226 $g \cdot mol^{-1}$. **Rendimento** 2,169 g (96%), sólido amarelo; **p.f.** : 90-91 °C (lit ¹¹⁵ 88-90 °C); **RMN 1H** (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7,09-7,16 (m, 2H), 7,47 (d, $J = 16$ Hz, 1H), 7,50-7,55 (m, 2H), 7,57-7,68 (m, 3H), 7,79 (d, $J = 16$ Hz, 1H), 8,03 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H); **RMN ^{13}C** (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 191,3, 164 (d, $J_{ipsoC-F} = 200$ Hz), 138,1, 132,8, 131,1 (d, $J_{paraC-F} = 3,0$ Hz), 130,3 (d, $J_{metaC-F} = 6,9$ Hz), 128,6, 128,4, 125, 116 (d, $J_{ortoC-F} = 20$ Hz). **CG/EM** (IE, 70 eV) m/z (%): 226 (100), 197 (23), 149 (53), 121 (39), 105 (45), 77 (71); **IV** ν_{max} (cm^{-1}): 1660, 1600, 1508.

3.7.2. (E)-3-(4-bromofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (**3b**)

$C_{15}H_{11}BrO$, 286 $g \cdot mol^{-1}$. **Rendimento** 2,57 g (90%), sólido amarelo; **p.f.** = 121 °C (lit. ¹¹⁶ 123 °C); **RMN 1H** (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7,49-7,54 (m, 4H), 7,54-7,56 (m, 3H), 7,56-7,63 (m, 1H), 7,75 (d, $J = 15,7$ Hz, 1H), 8,01 (t, $J = 1,7$ Hz, 1H), 8,0 (dd, $J = 1,7$ Hz e 1,1 Hz, 1H); **RMN ^{13}C** (125 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 190,2, 143,4, 138,0, 133,8, 132,9, 132,2, 129,8, 128,7, 128,5, 124,8, 122,6; **CG/EM** (IE, 70 eV) m/z (%): 286 (42), 207 (100), 179 (50), 130 (33), 102 (89), 77 (90); **IV** ν_{max} (cm^{-1}): 1657, 1607, 1594, 1485.

3.7.3. (E)-3-(4-metoxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (**3c**)

$C_{16}H_{14}O_2$, 238 g.mol⁻¹. **Rendimento** 2,070 g (87%), sólido amarelo; **p.f.:** 77 °C (lit. ¹¹⁷ 77-78 °C); **RMN ¹H** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3,90 (s, 3H), 6,97-7,01 (m, 2H), 7,39-7,44 (m, 3H), 7,55 (d, *J* = 15 Hz, 1H), 7,62-7,67 (m, 2H), 7,83-7,81 (d, *J* = 15,6 Hz, 1H); **RMN ¹³C** (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 188,7, 163,4, 143,9, 135,1 131,1 130,8, 130,3 128,9, 128,3, 121,9 113,8, 55,5; **CG/EM** (IE, 70 eV) *m/z* (%): 238 (100), 223 (22), 195 (15), 167 (13), 135 (66), 103 (26), 77 (56). **IV** ν_{max} (cm⁻¹): 1657, 1599, 1512, 1445.

3.7.4. (E)-1-(4-metoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona (**3d**)

$C_{16}H_{14}O_2$, 238 g.mol⁻¹. **Rendimento** 2,165 g (91%), sólido amarelo; **p.f.:** 108-109 °C (lit. ¹¹⁸ 109-110 °C); **RMN ¹H** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3,86 (s, 3H), 6,92-6,96 (m, 2H), 7,42 (d, *J* = 15,6 Hz, 1H), 7,48-7,50 (m, 2H), 7,55-7,59 (m, 1H), 7,59-7,63 (m, 2H), 7,76-7,82 (d, *J* = 15,6 Hz, 1H), 8,00 (t, *J* = 1,8 Hz, 1H), 8,02 (dd, *J* = 1,7 Hz e 1,1 Hz, 1H); **RMN ¹³C** (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 188,7, 163,4, 143,9, 135,1, 131,1, 130,8, 130,3, 128,9, 128,3, 121,9, 113,8, 55,5; **CG/EM** (IE, 70 eV) *m/z* (%): 238 (100), 223 (22), 161 (44), 133 (23), 108 (43), 77 (41); **IV** ν_{max} (cm⁻¹): 1653, 1600, 1570, 1491.

3.7.5. (E)-3-(3-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (**3e**)

$C_{15}H_{11}NO_2$, 253 g.mol⁻¹. **Rendimento** 2,428 g (96%), sólido amarelo; **p.f.**: 146 °C (lit. ⁴⁸ 144-145 °C); **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,55 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,63 (dd, $J = 7,7$ Hz e 3,2 Hz, 1H), 7,67 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H), 7,85 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H), 7,94 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H), 8,0 (s, 2H); **RMN** ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 189,6, 148,7, 141,6, 136,6, 134,3, 133,3, 130, 128,8, 128,7, 124,6, 124,6, 122,3; **CG/EM** (IE, 70 eV) m/z (%): 253 (55), 236 (37), 206 (30), 178 (32), 105 (89), 77 (100); **IV** ν_{max} (cm⁻¹): 1664, 1608, 1527, 1446.

3.7.6. (1E,4E)-1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona (**3f**)

$C_{17}H_{14}O$, 234,10 g.mol⁻¹. **Rendimento** 1,521 g (65 %), sólido amarelo, **p.f.**: 106 °C (lit. ¹¹⁹ 108-110 °C); **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,74 (d, $J = 16,0$ Hz, 2H), 7,65-7,59 (m, 4H), 7,45-7,39 (m, 6H), 7,09 (d, $J = 16,0$ Hz); **RMN** ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 188,9, 143,3, 134,8, 130,5, 128,9, 128,4, 125,4; **CG/EM** (IE, 70 eV) m/z (%): 234 (100), 205 (13), 156 (12), 131 (40), 103 (76), 91 (32), 77 (64); **IV** ν_{max} (cm⁻¹): 1693, 1651, 1494, 1336.

3.7.7. (1E,3E,6E,8E)-1,9-difenilnona-1,3,6,8-tetraen-5-ona (**3g**)

$C_{21}H_{18}O$, 286 $g \cdot mol^{-1}$. **Rendimento** 2,396 g (82%), sólido amarelo, **p.f.** = 139 °C (lit.¹²⁰ 142 °C); **RMN 1H** (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7,53-7,43 (m, 6H), 7,39-7,26 (m, 6H), 7,05-6,86 (m, 4H), 6,57 (d, J = 15,2 Hz, 2H); **RMN ^{13}C** (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 188,9, 143, 141,5, 136,2, 129,1, 129, 128,8, 127,3, 127; **CG/EM** (IE, 70 eV) m/z (%): 286 (100), 258 (15), 195 (21), 167 (51), 117 (42), 91 (34), 77 (14); **IV** ν_{max} (cm^{-1}): 1654, 1612, 1600, 1446, 1355.

3.7.8. (E)-3-fenil-1-(tiofen-3-il)prop-2-en-1-ona (**3h**)

$C_{13}H_{10}OS$, 214.05 $g \cdot mol^{-1}$. **Rendimento** 1,667 mg (78 %), sólido amarelado, **p.f.:** 85 °C (lit.¹²¹ 73-74°C); **RMN 1H** (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7,93-7,86 (m, 2H), 7,69-7,63 (m, 3H), 7,47-7,37 (m, 4H), 7,19 (dd, J = 4,8, 3,9 Hz); **RMN ^{13}C** (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 182,0, 145,5, 144,1, 134,7, 133,8, 131,8, 130,6, 128,9, 128,5, 128,2, 121,6; **CG/EM** (IE, 70 eV) m/z : 214 (100), 185 (27), 111 (10), 103 (40), 77 (26); **IV** ν_{max} (cm^{-1}): 1651, 1593, 1516, 1413.

3.7.9. (2E,4E)-5-fenil-1-(tiofen-2-il)penta-2,4-dien-1-ona (**3i**)

$C_{15}H_{12}OS$ (240 g.mol⁻¹). **Rendimento** 2,350 g (93%), sólido amarelo, **p.f.:** 91 °C (lit.¹²² 80-84 °C); **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,78 (dd, $J = 3,8, 0,9$ Hz, 1H), 7,67-7,58 (m, 2H), 7,52-7,47 (m, 2H), 7,40-7,30 (m, 3H), 7,15 (dd, $J = 4,9, 3,9$ Hz, 1H), 7,0 (dd, $J = 12,5, 9$ Hz, 3H); **RMN** ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 182,1, 145,7, 144,0, 142,1, 136,1, 133,6, 131,5, 129,3, 128,9, 128,2, 127,3, 126,7, 125; **CG/EM** (EI, 70 eV) m/z (%): 240 (100), 211 (24), 178 (20), 163 (22), 128 (50), 111 (45), 77 (15); **IV** $\nu_{\max}(\text{cm}^{-1})$: 1639, 1583, 1516, 1416.

3.7.10. (2E,4E)-1,5-difenilpenta-2,4-dien-1-ona (**3j**)

$C_{17}H_{14}O$, 234,10 g.mol⁻¹. **Rendimento** 1,948 g (83 %), sólido amarelo, **p.f.:** 101 °C (lit.¹²³ 103-104 °C); **RNM** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,99 (m, 2H), 7,66-7,55 (m, 2H), 7,54-7,47 (m, 4H), 7,42-7,30 (m, 3H), 7,11 (d, $J = 14,9$ Hz, 1H), 7,06-7,02 (m, 2H); **RMN** ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 190,5, 144,8, 141,9, 138,2, 136,1, 132,6, 129,2, 128,8, 128,6, 128,4, 127,3, 126,9, 125,4; **CG/EM** (IE, 70 eV) m/z (%): 234 (100), 215 (11), 157 (39), 128 (65), 104 (49), 77 (75); **IV** $\nu_{\max}(\text{cm}^{-1})$: 1654, 1598, 1575, 1446.

3.7.11. (3E,5E)-6-fenil-hexa-3,5-dien-2-ona (**3k**)

$C_{12}H_{12}O$, 172 $g \cdot mol^{-1}$. **Rendimento** 1,769 g (89%) sólido amarelo, **p.f.:** 65 °C (lit. ¹²⁴ 67-68 °C); **RMN 1H** (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7,47-7,46 (d, $J = 6,9$ Hz, 2H), 7,39-7,28 (m, 4H), 6,95 (d, $J = 15,3$ Hz, 1H), 6,89 (d, $J = 10,1$ Hz, 1H), 6,25 (d, $J = 15,3$ Hz, 1H), 2,31 (s, 3H); **RMN ^{13}C** (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 198,4, 143,4, 141,3, 135,9, 130,4, 129,2, 128,8, 127,2, 126,6, 27,3; **CG/EM** (IE, 70 eV) m/z (%): 172 (92), 157 (64), 129 (100), 95 (25), 77 (21), 51 (20), 43 (28); **IV** ν_{max} (cm^{-1}): 1708, 1670, 1653, 1583, 1490.

3.7.12. 3-(4-fluorofenil)-1-fenilpropan-1-one (**4a**)

$C_{15}H_{13}FO$, 228 $g \cdot mol^{-1}$. **Rendimento** 0,039 mg (78%) óleo amarelo; **RMN 1H** (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 3,07 (t, $J = 8,0$ Hz, 2H), 3,31 (t, $J = 7,8$ Hz, 2H), 6,97-7,02 (m, 2H), 7,21-7,25 (m, 2H), 7,45-7,50 (m, 2H), 7,56-7,61 (m, 1H), 7,96-7,99 (m, 2H); **RMN ^{13}C** (125 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 199, 161,4 (d, $J J_{C-F} = 242,5$ Hz), 136,8, 133,1, 129,8 (d, $J_{C-F} J = 7,6$ Hz), 128,6, 128, 115,2 (d, $J_{C-F} J = 21,4$ Hz), 40,4, 29,3; **CG/EM** (EI, 70 eV) m/z (%): 228 (40), 105 (100), 77 (49), 51 (13); **IV** ν_{max} (cm^{-1}): 2927, 2854, 1743, 1681, 1600.

3.7.13. 3-(4-bromofenil)-1-fenilpropan-1-ona (**4b**)

$C_{15}H_{13}BrO$, 288 $g \cdot mol^{-1}$. **Rendimento** 0,010 g (20%), sólido amarelo; **p.f.** : 65 °C (lit. 66-67 °C); **RMN 1H** (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 3,03 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 3,28 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 7,12-7,14 (m, 2H), 7,42-7,62 (m, 5H) 7,93-7,97 (m, 2H); **RMN ^{13}C** (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 198,8, 140,2, 136,7, 133,2, 131,6, 130,2, 128,6, 128,0, 119,9, 40, 29,4; **CG/EM** (EI, 70 eV) m/z (%): 288 (16), 209 (5), 105 (100), 77 (43); **IV** ν_{max} (cm^{-1}): 2926, 2852, 1743, 1687, 1598.

3.7.14. 3-(4-metoxifenil)-1-fenilpropan-1-ona (**4c**)

$C_{16}H_{16}O_2$, 240 $g \cdot mol^{-1}$. **Rendimento** 0,0192 g (37%); Sólido amarelo; **p.f.**: 60 °C (lit.¹²⁵ 60-61 °C); **RMN 1H** (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 2,96 (t, $J = 8,0$ Hz, 2H), 3,24 (t, $J = 8,0$ Hz, 2H), 3,78 (s, 3H), 6,86 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,20 (d, $J = 10$ Hz, 2H), 7,42-7,60 (m, 2H), 7,55 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H), 7,98 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); **RMN ^{13}C** (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 199,4, 157,9, 136,9, 133,3, 133,03, 129,3, 128,5, 128,1, 113,9, 55,3, 40,7, 29,3; **CG/EM** (IE, 70 eV) m/z (%): 240 (31), 135 (100), 107 (10), 92 (10), 77 (21); **IV** ν_{max} (cm^{-1}): 2971, 2932, 1653, 1600, 1570.

3.7.15. 1-(4-metoxifenil)-3-fenilpropan-1-ona (**4d**)

$C_{16}H_{16}O_2$, 240 g.mol⁻¹. **Rendimento** 0,025 g (50%); sólido amarelo; **p.f.**: 95 °C (lit.¹²⁶ 96-98 °C); **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3,01(t, J = 8,0 Hz, 2H), 3,27 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 3,78 (s, 3H), 6,84 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 7,17 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,45 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 7,55 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,95 (d, J = 8,8 Hz, 2H); **RMN** ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 197,8, 163,4, 141,5, 130,3, 129,9, 128,5, 128,4, 126,1, 113,7, 55,5, 40,1, 30,3; **CG/EM** (IE, 70 eV) m/z (%): 240 (31), 135 (12), 121 (100), 105 (39), 77 (30); **IV** ν_{max} (cm⁻¹): 2989, 2951, 1657, 1599, 1512.

3.7.16. 3-(3-aminofenil)-1-fenilpropan-1-ona (**4e**)

$C_{15}H_{15}NO$, 225 g.mol⁻¹. **Rendimento** 0,014 g (30%), óleo amarelo; **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3,26 (t, J = 7,0 Hz, 2H), 3,37 (td, J = 7,0 Hz and 0,7 Hz, 2H), 7,44-7,49 (m, 3H), 7,58 (tt, J = 7,4 Hz e 1,3 Hz, 1H), 7,60-7,63 (m, 1H), 7,94-7,98 (m, 2H), 8,07 (ddd, J = 8,3 Hz, 3,0 Hz e 1,3 Hz, 1H), 8,12-8,14 (1H, m); **RMN** ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 198,19, 148,41, 143,29, 136,55, 134,97, 133,35, 129,36, 128,70, 128,00, 123,29, 121,36, 39,55, 29,51; **CG/EM** (EI, 70 eV) m/z (%): 225 (3), 133 (35), 105 (100), 77 (38); **IV** ν_{max} (cm⁻¹): 2960, 2926, 1680, 1595, 1529.

3.7.17. 1,5-difenilpentan-3-ona (**4f**)

$C_{17}H_{18}O$, 238.14 g.mol⁻¹. **Rendimento** 0,024 g (46 %), óleo amarelado; **RMN** ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,32-7,23 (m, 4H), 7,23-7,11 (m, 6H), 2,89 (t, $J = 7,6$ Hz, 4H), 2,72 (t, $J = 7,6$ Hz, 4H); **RMN** ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 209,1, 141,0, 128,5, 128,3, 126,1, 44,5, 29,7; **CG/EM** (IE, 70 eV) m/z (%): 238 (43), 133 (72), 105 (100), 91 (99), 77 (18); **IV** $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 2924, 2852, 1741, 1714, 1454.

3.7.18. 3-fenil-1-(tiofen-3-il)propan-1-ona (**4h**)

$C_{13}H_{12}OS$, 216,06 g.mol⁻¹. **Rendimento** 0,032 g (64 %), óleo incolor. **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,68 (dd, $J = 3,8, 1,1$ Hz, 1H), 7,61 (dd, $J = 5,0, 1,1$ Hz, 1H), 7,33-7,17 (m, 5H), 7,10 (dd, $J = 4,9, 3,8$ Hz), 3,26-3,19 (m, 2H), 3,07 (t, $J = 7,7$ Hz); **RMN** ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 192,1, 144,1, 141,0, 133,5, 131,8, 128,5, 128,4, 128,0, 126,2, 41,1, 30,4; **CG/EM** (IE, 70 eV) m/z (%): 216 (25), 131 (6), 111 (100), 104 (25), 91 (16), 77 (8); **IV** $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 2927, 1662, 1519, 1417.

3.7.19. (E)-5-fenil-1-(tiofen-2-il)pent-4-en-1-ona (**4i**)

$C_{15}H_{14}OS$, 242 $g \cdot mol^{-1}$. **Rendimento** 0,0345 g (69%), óleo amarelo; **RMN 1H** (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 2,69-2,61(m, 2H); 3,07 (t, $J=7,4$ Hz, 2H); 6,26 (dt, $J = 15,8$, 6,9 Hz, 1H), 6,45 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H), 7,12 (dd, $J = 4,9$, 3,8 Hz, 1H), 7,21-7,15 (m, 1H), 7,33-7,27 (m, 4H), 7,62 (dd, $J = 4,9$, 1,1 Hz, 1H), 7,2 (dd, $J = 3,8$, 1,1 Hz, 1H); **RMN ^{13}C** (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 27,8 , 39,0, 126, 127,1, 128,0, 128,5, 128,8, 130,9, 131,7, 133,5, 137,3, 144,2, 192,2; **CG/EM** (IE, 70 eV) m/z (%): 242 (48), 151 (9), 111 (100), 91 (26), 77 (5); **IV** (cm^{-1}): 3022, 2997, 1639, 1583, 1516.

3.7.20. (E)-1,5-difenilpent-4-en-1-ona (**4j**)

$C_{17}H_{16}O$, 236.12 $g \cdot mol^{-1}$. **Rendimento** 0,031 g (64 %), óleo amarelo; **RMN 1H** (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 8,00 (dd, $J = 8,3$, 1,3 Hz, 2H), 7,61-7,55 (m, 1H), 7,50-7,48 (m, 2H), 7,38-7,33 (m, 2H), 7,33-7,28 (m, 2H), 7,24-7,19 (m, 1H), 6,48 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H), 6,31 (dt, $J = 15,8$, 6,9 Hz, 1H), 3,17 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H), 2,71-2,63 (m, 2H); **RMN ^{13}C** (125 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 199,3, 137,5, 136,9, 130,8, 133, 129,1, 128,6, 128,5, 128,0, 127,1, 126,0, 38,3, 27,5; **CG/EM** (IE, 70 eV) m/z (%): 236 (15), 115 (13), 105 (100), 77 (36); **IV** $\nu_{max}(cm^{-1})$: 2927, 2854, 1739, 1665, 1240.

3.7.21. (E)-6-fenilhex-5-en-2-ona (**4k**)

$C_{12}H_{14}O$, 174 $g \cdot mol^{-1}$. **Rendimento** 0,0345 g (69%), óleo incolor; **RMN 1H** (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 2,17 (s, 3H), 2,48 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H), 2,62 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H), 6,19 (dt, $J = 15,8, 6,8$ Hz, 1H), 6,41 (d, $J = 15,8$, 1H), 7,23-7,14 (m, 1H), 7,35-7,26 (m); **RMN ^{13}C** (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 27,1, 30, 43,2, 126, 127,1, 128,5, 128,8, 130,7, 137,4, 208; **CG/EM** (EI, 70 eV) m/z (%): 174 (32), 131 (49), 115 (50), 91 (72), 43 (100), 77 (16); **IV** ν_{max} (cm^{-1}): 3022, 2997, 1654, 1598, 1446.

3.7.22. 4-fenilbutan-2-ona (**4l**)

$C_{10}H_{12}O$, 148,09 $g \cdot mol^{-1}$. **Rendimento** 0,0290 g (57%), óleo incolor; **RMN 1H** (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7,28 (m, 2H), 7,22-7,15 (m, 3H), 2,90 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,76 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,14 (s, 3H); **RMN ^{13}C** (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 207,9, 140,9, 128,5, 128,2, 126,1, 45,1, 30,0, 29,7; **CG/EM** (EI, 70 eV) m/z : 148 (100), 133 (20), 105 (95), 91 (63), 77 (16); **IV** ν_{max} (cm^{-1}): 2953, 2926, 1716, 1496.

3.7.23. 4-fenilbutan-2-ol (**5**)

$C_{10}H_{14}O$, 150,10 g.mol⁻¹. **Rendimento** 0,0192 g (37%), óleo incolor; **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,32-7,24 (m, 2H), 7,23-7,15 (m, 3H), 3,87-3,78 (m, 1H), 2,84-2,58 (m, 2H), 1,87-1,69 (m, 2H), 1,23 (d, $J = 6,2$ Hz, 3H); **RMN** ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 142,0, 128,4, 125,8, 67,5, 40,8, 32,1, 23,6; **CG/EM** (IE, 70 eV) m/z (%): 150 (12), 132 (62), 117 (100), 77 (20); **IV** ν_{max} (cm⁻¹): 3361, 2966, 2927, 1494, 1373.

3.7.24. Síntese do (2*E*,4*E*)-1,5-difenilpenta-2,4-dien-1-ol (**6**)

Em um balão de 50 mL foi adicionado a (2*E*,4*E*)-1,5-difenilpenta-2,4-dien-1-ona (**3j**) (2 mmol), 10 mL de dimetilformamida (DMF), 3 eq. de ácido bórico (6 mmol) e 5 eq. de NaBH₄ (10 mmol). A mistura permaneceu em agitação magnética por 1 h à temperatura ambiente. O solvente foi evaporado e adicionado 1 mL da solução de HCl (10%). Realizou-se a extração com acetato de etila (3 x 50 mL). A fase orgânica foi seca com NaSO₄ anidro, filtrada e purificada por cromatografia em coluna em sílica gel eluída com uma mistura de *n*-hexano e acetato de etila (7:3)¹²⁷.

3.7.25. (2*E*,4*E*)-1,5-difenilpenta-2,4-dien-1-ol (**6**)

$C_{10}H_{14}O$, $150.10 \text{ g.mol}^{-1}$. **Rendimento** 0,440 g (93%) sólido branco; **p.f.:** 77 °C (lit.¹²⁸ 78-80 °C); **RMN 1H** (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7,42 – 7,34 (m, 6H), 7,33 – 7,27 (m, 3H), 7,23-7,20 (m, 1H), 6,78 (dd, $J = 15,6, 10,5 \text{ Hz}$, 1H), 6,58 (d, $J = 15,7 \text{ Hz}$, 1H), 6,48 (dd, $J = 15,2, 10,6 \text{ Hz}$, 1H), 6,0 (dd, $J = 15,2, 6,6 \text{ Hz}$, 1H), 5,32 (d, $J = 6,5 \text{ Hz}$, 1H), 1,98 (s, 1H); **RMN ^{13}C** (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 142,8, 137,1, 135,5, 133,2, 131, 128,6, 128,6, 128,1, 127,8, 127,7, 126,4, 126,3, 74,9.

3.7.26. Síntese do (*E*)-2-metil-3-fenilprop-2-en-1-ol (**9'**)

Em um balão de 50 mL foi adicionado o aldeído **3m** (3 mmol, 0,438 g ou 421 μL), 1,1 eq. de NaBH_4 (3,3 mmol, 0,234 g) e metanol (20 mL). A mistura permaneceu em agitação por 60 min à temperatura ambiente. O progresso da reação foi acompanhado por CCD. Após confirmação da redução do α -metil-*trans*-cinamaldeído **3m** ao correspondente (*E*)-2-metil-3-fenilprop-2-en-1-ol (**9'**), o solvente foi removido por rotaevaporação a pressão reduzida. Em seguida foi adicionado 25 mL de água destilada e 1 mL da solução de HCl (10%), a extração foi com acetato de etila (3 x 25 mL). A fase orgânica foi combinada, seca com MgSO_4 anidro, filtrada e o composto foi purificado por cromatografia em coluna (CC) em sílica gel eluída com uma mistura de *n*-hexano e acetato de etila (7:3).

3.7.27. (*E*)-2-metil-3-fenilprop-2-en-1-ol (**9'**)

$C_{10}H_{12}O$, 148,09 g.mol⁻¹. **Rendimento** 0,364 g (82%), óleo incolor; **RMN** ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,37-7,34 (m, 2H), 7,22-7,31 (m, 3H), 6,55 (s, 1H), 4,21 (s, 2H), 1,92 (s, 3H); **RMN** ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 137,6, 137,5, 128,9, 128,1, 126,4, 125, 69, 15,3; **CG/EM** (EI, 70 eV) *m/z* (%): 148 (49), 133 (26), 115 (53), 91 (100), 77 (32). **IV** ν_{max} (cm⁻¹): 3504, 1708, 1367, 1230, 891.

3.7.28. Síntese do 2-metil-3-fenilpropan-1-ol (**9**)

Em um balão de 25 mL foi adicionado o (*E*)-2-metil-3-fenilprop-2-en-1-ol (**3'**) (2 mmol, 0,3 g) e Pd/C (10%, 5 mg) como catalisador em metanol (10 mL). A reação foi mantida em agitação magnética à temperatura ambiente por 24 h em atmosfera de gás hidrogênio. A mistura reacional foi filtrada através de Celite[®] e concentrada sob vácuo. A mistura resultante foi filtrada com o uso de Celite, concentrada no rotaevaporador e purificada por cromatografia em coluna com sílica gel eluída com uma mistura de *n*-hexano e acetato de etila (9:1).

3.7.29. 2-metil-3-fenilpropan-1-ol (**9**)

$C_{10}H_{14}O$, 150.10 g.mol⁻¹. **Rendimento** 0,285 g (95%), óleo incolor; **RMN** ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,30-7,26 (m, 2H), 7,21-7,16 (m, 3H), 3,56-3,47 (m, 2H), 2,76 (dd, $J = 13,4, 6,3$ Hz, 1H), 2,42 (dd, $J = 13,4, 8$ Hz, 1H), 1,95 (qd, $J = 12,7, 6,2$ Hz, 1H), 0,92 (d, $J = 6,7$ Hz, 3H); **RMN** ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 140,6, 129,1, 128,2, 125,8, 67,5 39,7, 37,7, 16,4; **CG/EM** (EI, 70 eV) m/z : 150 (18), 107 (24), 117 (64), 91 (100), 77 (8); **IV** ν_{max} (cm⁻¹): 3354, 2974, 2885, 1161, 1465, 925.

3.7.30. Síntese do ácido 2-metil-3-fenilpropanoico (**10**)

Em um balão de 25 mL foi adicionado o aldeído **3m** (1 mmol, 0,146 g), 1,5 eq. de TMSCN (1,5 mmol, 0,148 g), 0,2 eq. DBU (mmol, 0,030 g) e THF (5 mL). Após 30 min agitação foi adicionado 10 eq. EtOH (400 μ L) a 0 °C. A reação permaneceu por mais 30 min em agitação. Após confirmação da transformação foi adicionado uma solução saturada de NaHCO₃ (2 mL) misturada com acetato de etila (2 mL). A fase orgânica foi extraída com acetato de etila (3 x 25 mL). A fase orgânica foi combinada e adicionada solução saturada de NaCl (5 mL), posteriormente seca com NaSO₄ anidro, filtrada e concentrada a vácuo.¹²⁹ Em seguida foi adicionado 3 mL de uma solução de NaOH (0,3 g) em EtOH a 0 °C por 3 em agitação. A reação foi acidificada por HCl (3M) pH 2 e adicionada solução saturada de NaCl (5 mL). Em seguida extraída com

acetato de etila (3 x 25 mL), seca com NaSO₄ anidro, filtrada, concentrada a vácuo e purificada por CC em sílica gel com acetato e hexano (2:8).¹³⁰

3.7.31. *Acido 2-metil-3-fenilpropanoico (10)*

C₁₀H₁₂O₂, 164 g.mol⁻¹. **Rendimento** 0,102 g (63%), óleo incolor; **RMN** ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,20 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H), 2,69 (dd, *J* = 13,5, 8 Hz, 1H), 2,83-2,73 (m, 1H), 3,10 (dd, *J* = 13,5, 6,5 Hz, 1H), 7,20-7,27 (m, 3H), 7,29-7,32 (m, 2H); **RMN** ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 16,5, 39,3, 41,2, 126,4, 128,4, 129, 139, 181; **CG/EM** (EI, 70 eV) *m/z*: 164 (16), 118 (7), 91 (100), 66 (10).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Bio-hidrogenação de chalconas por fungos de ambiente marinho

As substâncias sintetizadas nesse capítulo, obtidas via reação de condensação aldólica (reação de Claisen-Schmidt), resultaram na síntese de diversos compostos α,β -, $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ - e di- α,β -insaturados em bons rendimentos. As enonas α,β -insaturadas foram caracterizadas por espectroscopia de RMN ^1H , onde apresenta dois dupletos na região de 7 a 8 ppm com uma constante de acoplamento característica de 16 Hz, correspondentes a olefina de geometria *trans* (Figura 12).

Para a chalcona **3a**, o conjunto de hidrogênios **Ha** é referente a um multipletto de 7,12-7,16 ppm envolvendo acoplamentos com o átomo de flúor. O hidrogênio **Hb** aparece como um dubleto em 7,80 ppm ($J = 16$ Hz). Já o terceiro e o quarto conjuntos (**Hc** e **Hd**) aparecem como um multipletto de 7,51-7,64 ppm. O conjunto de hidrogênio **He** aparece como multipletto em 7,62-7,67 ppm. O hidrogênio **Hf** é um dupleto em 7,49 ppm com constante de acoplamento de 16 Hz. Por fim, o conjunto de hidrogênio **Hg** é um multipletto de 8,02-8,04 ppm (Figura 12).

Figura 12. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto (*E*)-3-(4-fluorofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (**3a**).

Algumas chalconas formam monocristais por recristalização (evaporação) em etanol a quente, neste caso os melhores cristais foram selecionados e encaminhados para coleta de dados no difratômetro no IQSC-USP pelo Prof. Dr. Victor Deflon. As dimensões do cristal foram de 0,540 x 0,200 x 0,140 mm³. A chalcona **3a** elucidada está representada pela estrutura ORTEP e o volume da cela foi de 1165,59 Å³ (Figura 13).

Figura 13. Estrutura ORTEP para a chalcona **3a**.

Uma vez sintetizadas as chalconas **3a-e**, partiu-se para a seleção do fungo com maior atividade na redução quimiosseletiva da ligação α,β -carbono-carbono. Assim, realizou-se um *screening* com as cepas dos fungos *Penicillium miczynskii* CBMAI 930, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 e *Mucor racemosus* CBMAI 847 em tampão fosfato pH 7 com o substrato **3a**, já que estudos prévios realizados em nosso laboratório indicaram resultados promissores em reações de biocatálise empregando estes fungos.^{58; 112; 131}

Observou-se por CG/EM que todos os fungos derivados de ambiente marinho, utilizados neste trabalho, foram capazes de reduzir a ligação dupla α,β -carbono-carbono da chalcona **3a**. Porém, o emprego da linhagem do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 levou a maior conversão (98%) na redução quimiosseletiva da ligação dupla α,β -carbono-carbono da chalcona **3a** quando comparado aos demais fungos utilizados. As enzimas presentes nas células totais da linhagem *M. racemosus* CBMAI 847 apresentaram atividade moderada frente a reação de redução da ligação dupla α,β -carbono-carbono da chalcona **3a** (62%). Já a atividade enzimática dos micélios do microrganismo *A. sydowii* CBMAI 935 na redução da ligação dupla α,β -carbono-

carbono foi de 78% na formação do produto **4a**. As enzimas da linhagem do fungo *P. miczynskii* CBMAI 930 reduziram a ligação dupla α,β -carbono-carbono pelo ataque-1,4 em 40% de conversão. Os cromatogramas obtidos nas análises com ias de reação com os fungos utilizados são apresentados na Figura 14.

Embora reações catalisadas por células totais de microrganismos vivos em alguns casos são competitivas, a reação com os fungos derivados de ambiente marinho foi totalmente quimiosseletiva para redução exclusiva da ligação dupla α,β -carbono-carbono nessas condições experimentais, resultado do exclusivo ataque-1,4 ao sistema α,β -carbonílico. Entre os diferentes gêneros e espécies utilizadas, o fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 apresentou maior atividade para enzima ER nessas condições, rendendo 98% do produto 3-(4-fluorofenil)-1-fenilpropan-1-ona (**4a**) (Esquema 8).

Figura 14. Cromatogramas obtidos por CG/EM (70 eV) da redução quimiosseletiva da ligação dupla carbono-carbono (**3a**) pelos fungos: (a) *P. citrinum* CBMAI 1186; (b) *M. racemosus* CBMAI 847; (c) *A. sydowii* CBMAI 935 e (d) *P. miczynskii* CBMAI 930.

Condições de análises: CG/EM: Ti=50 °C, Tf=270°C (5 min), r = 5°C/min, tc = 49 min. tr **4a**= 28 min; tr **3a** = 30,5 min.

Esquema 8. Redução quimiosseletiva da ligação dupla carbono-carbono (**3a**) pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186.

O produto formado foi identificado pela elucidação estrutural por RMN ^1H após purificação por cromatografia em coluna (CC) (Figura 15). Tal produto é derivado da classe das diidrochalconas, substâncias também encontradas em plantas e que apresentam diversas atividades biológicas.¹³² As diidrochalconas apresentam como principal característica no espectro de RMN de ^1H dois tripletos com constante de acoplamento (J) de 7,5 a 8 Hz, próximos à região de 3 a 3,4 ppm (Figura 15).¹¹⁵ Tanto o produto **5** oriundo do exclusivo ataque-1,2 do sistema α,β -carbonílico como o produto **6** que é resultado da redução total do sistema α,β -carbonílico não foram detectados na reação com células do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 em 6 dias.

Figura 15. Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **4a** obtido pela biotransformação com o fungo *P. citrinum* CBMAI 1186.

Uma vez identificado o fungo com maior capacidade de reduzir a ligação C=C do sistema carbonílico do substrato **3a** foi avaliada a relação de micélios úmidos (5 g) com a quantidade de massa do composto **3a** (25, 50, 75 e 100 mg) (Tabela 3).

Quando 25 mg do substrato **3a** foi utilizado uma conversão quantitativa (100%) foi obtida e 98% de conversão em 50 mg da chalcona **3a**. Para as reações contendo 75 e 100 mg da chalcona **3a** em 5 g de massa úmida do micélio do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 após 6 dias de incubação a conversão foi de 62% e 51%, respectivamente (Tabela 3 e Figura 16).

Uma relação de 5 g de micélios úmidos do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 para 50 mg do composto carbonílico α,β -insaturado passou a ser utilizada na redução quimiosseletiva da ligação α,β -carbono-carbono para outros derivados de chalconas.

Tabela 3. Estudo da relação de micélios úmidos do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 com a massa de chalcona **4a**.

Reação*	3a (mg)	Conversão 4a (%)
1	25	100
2	50	98
3	75	62
4	100	51

*Reação com 5 g de micélios úmidos do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 em tampão fosfato (pH 7, 6 dias, 32 °C, 130 rpm).

Diidrochalconas também são importantes blocos de construção na síntese de derivados de tiazóis com atividade anti-HIV¹³³ ou em síntese total com a do analgésico e anti-inflamatório Nabumetona (Figura 17).

Figura16. Cromatogramas obtidos por CG/EM da redução quimiosseletiva da ligação dupla carbono-carbono **3a** pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186. (A) Reação com 100 mg, (B) 75 mg, (C) 50 mg e (D) 25 mg da chalcona **3a** após 6 dias de reação.

Condições de análises em CG/EM: $T_i=50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f=270^{\circ}\text{C}$ (5 min), $r = 5^{\circ}\text{C/min}$, $t_c = 49\text{ min}$. $\text{tr } \mathbf{4a} = 28\text{ min}$; $\text{tr } \mathbf{3a} = 30,5\text{ min}$

Figura 17. Emprego do 3-(4-fluorofenil)-1-fenilpropan-1-ona (**4a**) na síntese de tiazol com atividade anti-HIV e do fármaco Nabumetona.

A redução quimiosseletiva da ligação dupla α,β -carbono-carbono pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 na chalcona **3a** (50 mg) também foi realizada apenas com extrato do caldo enzimático desse fungo (100 mL). Segundo a análise por CG/EM ocorreu um decréscimo na produção do composto **4a** (68% de conversão). Conclui-se que as enzimas presentes no microrganismo *P. citrinum* CBMAI 1186 responsáveis pela redução da ligação C=C da chalcona **3a** são majoritariamente intracelulares.

Vale destacar que o fungo *Penicillium citrinum* MUT 4862 isolado da alga verde *Flabellia petiolata* na cidade de Punta Manara-Itália foi estudado por [Romagnolo et al.](#)¹⁰⁹ também como fonte da enzima enoato-redutase, na redução da ligação C=C do α -metil-nitroestireno, forneceu o correspondente produto diidrogenado com 99% de rendimento em 7 dias de reação (Esquema 9).

Esquema 9. Redução da ligação C=C da α -metil-nitroestireno pelo fungo *Penicillium citrinum* MUT 4862

O mecanismo da redução catalítica da ligação C=C do sistema carbonílico α,β -insaturado por enoato-redutase foi elucidado com a participação de um íon hidreto, derivado de FADH_2 , o qual é transferido estereosseletivamente para o carbono- β , enquanto que um próton a partir de um resíduo do aminoácido *Tyr* (ou do próprio meio reacional) é transferido para o carbono- α do lado oposto a entrada do íon hidreto. Consequentemente a estereoquímica global deste mecanismo é uma adição *trans*- $[\text{H}_2]$.¹³⁴ Baseado no mecanismo descrito na literatura pode-se propor uma ilustração na

redução da ligação C=C em chalconas por células do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 (Esquema 10).

Esquema 10. Proposta da adição do íon hidreto por enoato redutase pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186.

O carbono- β do sistema α,β -insaturado apresenta menor coeficiente do orbital LUMO em enonas e enais quando comparados a ácidos carboxílicos. Quando a reação é controlada pelos orbitais de fronteira, é nesse carbono que ocorre a maior probabilidade de interação com o HOMO da espécie nucleofílica, neste caso o íon hidreto.⁹⁰

A redução da ligação dupla α,β -carbono-carbono do composto **3a** permitiu a reação de redução da ligação C=C de forma quimiosseletiva do sistemas α,β -carbólico, desta forma após avaliar as melhores condições para ocorrer a redução quimiosseletiva da ligação dupla α,β -carbono-carbono por células do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 na chalcona **3a** expandiu-se o escopo metodológico para outras chalconas **3b-3e** (Esquema 11).

Esquema 11. Redução quimiosseletiva da ligação dupla carbono-carbono para as chalconas **3b-e** pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186. ^a Conversão. ^b Rendimento isolado.

Foi considerado o efeito eletrônico e estérico de substituintes ligados ao anel B e/ou no anel A das chalconas utilizadas. Como esperado, todas as chalconas **3b-e**, independente dos substituintes, grupos retiradores ou doadores de elétrons, foram quimiosseletivamente reduzidas às diidrochalconas **4a-e** em boas conversões por flavoproteínas presentes nos micélios do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186.

A chalcona 3-(4-bromofenil)-1-fenilpropan-a-ona (**3b**) contendo o bromo na posição *para* do anel B, foi convertida em 49% para a correspondente diidrochalcona **4b**. Este resultado permite comparar os efeitos dos átomos halogenados na molécula frente às propriedades, tais como, lipofilicidade relativa, volume atômico e eletronegatividade. Quanto maior a lipofilicidade e menor o volume atômico mais fácil a difusão do substrato através da membrana celular ao receptor biológico, consequentemente mais rápida e eficiente será a reação entre o substrato e o receptor.¹³⁵ Neste caso, além do volume atômico ser menor na molécula **3a** o caráter lipofílico na molécula contendo o átomo de flúor foi maior que na molécula que contém o átomo de bromo (Figura 18).

Figura 18. Cromatograma obtido por CG/EM da redução quimiosseletiva da ligação dupla carbono-carbono (**3b**) pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186.

Condições de análises em CG/EM: $T_i = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 270\text{ }^{\circ}\text{C}$ (5 min), $r = 5\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_c = 49\text{ min}$. $t_r\text{ }4b = 34\text{ min}$; $t_r\text{ }3b = 36,5\text{ min}$.

Para avaliar a influência de isômeros na reação de biotransformação pelo fungo marinho *P. citrinum* CBMAI 1186, empregou-se a chalcona **3c** contendo o substituinte -OMe na posição *para* do anel B e obteve-se 72% de conversão para a diidrochalcona **4c**. Enquanto que, para a chalcona *para* substituída pelo grupo metoxila no anel A, a conversão foi de 91% na diidrochalcona **4d**. O grupo -OMe ligado na posição *para* do anel B da chalcona diminui a reatividade do carbono β -carbonílico e consequentemente, diminui a taxa de redução da ligação dupla carbono-carbono. Neste caso o anel B possui maior influência eletrônica na reatividade de redução do carbono β -carbonílico. Este resultado pode ser associado com o estudo de Bello *et al.*¹³⁶ que demonstraram um perfil de atividade maior contra *Leishmania braziliensis* quando o substituinte -OMe está ligado na posição *para* do anel A das chalconas comparado à substituição na posição *para* do anel B. Segundo Bello *et al.*, o substituinte -OMe ligado na posição *para* do anel A reduz a liberdade conformacional da estrutura e garante menor densidade eletrônica quando comparado ao substituinte -OMe ligado na posição *para* do anel B.

A chalcona **3e** contendo o substituinte $-\text{NO}_2$, um forte grupo retirador de elétrons, quando incubada com células do *P. citrinum* CBMAI 1186 resultou em uma elevada conversão para a diidrochalcona **4e** (97%) (Esquema 12).

Esquema 12. Redução da ligação dupla carbono-carbono e do grupo nitro da chalcona (*E*)-3-(3-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona **3e** pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186.

O composto **3e** foi bioconvertido no 3-(3-aminofenil)-1-fenilpropan-1-ona (**4e**) pela ação de duas enzimas, porém ao final da reação foi encontrado apenas um único produto **4e**. A ação da enzima enoato-redutase na redução da ligação dupla carbono-carbono seguida pela redução do grupo -NO_2 para o grupo -NH_2 através da nitro-redutases.

As nitro-redutases também integram a classe das flavoproteínas dependentes da NAD(P)H que reduzem o nitro ao grupo amino por um mecanismo que envolve uma sequência multi-enzimática de reações de oxidação-redução.^{137; 138} Os nitro-compostos podem ser metabolizados ou degradados por microrganismos como fonte de nitrogênio e carbono. Estruturalmente, as nitro-redutases são proteínas homodiméricas, com subunidades constituídas por α -hélices e estruturas β , sendo que as subunidades se unem formando uma cavidade hidrofóbica onde ficam localizados o grupo prostético e o sítio ativo da enzima (Figura 19).¹³⁹

Figura 19. Ilustração do sítio de uma nitro-redutase dependente da NAD(P)H.¹³⁹

A redução completa do grupo nitro ao grupo amino envolve sequencialmente a transferência de elétrons a partir da NAD(P)H ao grupo nitro do composto nitro-substituído na presença ou ausência de oxigênio, resultando na formação do ânion nitroso e hidroxalamina como intermediários e finalizada com a obtenção do grupo amina (Esquema 13).¹⁴⁰

Esquema 13. Proposta de redução do grupo nitro por nitro-redutase.⁶⁹

Por tanto, nestes estudos o fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 apresentou-se como uma importante fonte de biotransformação na redução quimiosseletiva de chalconas.

4.2. Redução de chalconas pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 imobilizado em biopolímeros

Seguindo os excelentes resultados na redução de chalconas com células livres do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 novos experimentos foram realizados com micélios deste fungo, porém imobilizados em biopolímeros (algodão, fibroína e paina). Para esses experimentos empregou-se a chalcona **3a**.

Os biopolímeros empregados (algodão, fibroína e paina) foram selecionados para auxiliar na busca de novas alternativas para imobilização de fungos filamentosos utilizados em processos biocatalíticos. Esses materiais são resistentes aos ataques microbiológicos, são de fácil acesso, consequentemente baratos, biodegradáveis e de fácil manipulação.

A reação com micélios do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 imobilizados em algodão forneceu a diidrochalcona **3a** em 92% de conversão (75% de rendimento isolado), enquanto a reação de biotransformação com micélios imobilizados em fibroína a conversão foi de 80% (78% de rendimento isolado). Finalmente, em paina a conversão foi de 93% (73% de rendimento isolado) (Tabela 4). Nota-se que os micélios imobilizados de *P. citrinum* CBMAI 1186 mantiveram uma excelente atividade biocatalítica quando estavam suportados nos biopolímeros. Mostrando uma biocompatibilidade entre os micélios e os suportes utilizados.

A fim de avaliar a reutilização das células/micélios imobilizadas sobre o algodão, fibroína e paina a biorredução da chalcona **3a** foi realizada após o armazenamento em temperatura de 4 °C por um mês. Deve-se ressaltar que após o fungo imobilizado, utilizado no primeiro ciclo reacional, o mesmo foi lavado com acetato de etila e preservado em refrigerador. Neste caso, observou-se uma diminuição na formação do produto desejado para todos os suportes utilizados (Tabela 4).

Provavelmente, a perda de atividade deu-se principalmente à lavagem do fungo com acetato de etila.

Tabela 4. Biorredução da chalcona **3a** para a diidrochalcona **4a** por micélios livres e imobilizados do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 (6 dias, 130 rpm, 32 °C).

Reação	Matriz	Conversão (%)	Conversão da biotransformação após reuso e estocagem (%)
1	Micélio livre	98 ^a (79) ^b	15 ^a (08) ^b
2	Fibra de algodão	92 ^a (75) ^b	30 ^a (25) ^b
3	Fibra de fibroína	80 ^a (68) ^b	22 ^a (19) ^b
4	Fibra de paina	93 ^a (73) ^b	36 ^a (27) ^b

^aConversão determinada por GC/EM (70 eV); ^bRendimento isolado após purificação.

No entanto, a reação realizada com micélios livres de *P. citrinum* CBMAI 1186 exibiu uma diminuição mais acentuada na conversão da diidrochalcona (*E*)-3(4-fluorofenil)-1-fenil-prop-2-en-1-ona (**3a**) em comparação com as células imobilizadas após reuso e estocagem por 30 dias, apontam que o fungo mantém uma atividade superior quando imobilizado nos respectivos biomateriais. Portanto, os biopolímeros (algodão, fibroína e paina) podem ser empregados como suportes alternativos para imobilizar os fungos filamentosos, tal como o *P. citrinum* CBMAI 1186, e preservar a atividade enzimática das enzimas (Tabela 4).

Cerca de 60% da proteína de fibroína da seda é composto essencialmente de aminoácidos de cadeias laterais curtas, tais como, glicina, serina e alanina. Estes aminoácidos formam uma estrutura cristalina de folha β pregueada muito estável e resistente à hidrólise enzimática.¹⁴¹

Por microscopia eletrônica de varredura (MEV) observou-se que o fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 teve forte aderência com a superfície da fibra (Figura 20). Essa forte adesão do micélio com a fibroína pode diminuir o contato entre o microrganismo e

o substrato, pois a área de contato do fungo com o meio é reduzida (Figura 20). Esta hipótese explica em parte a menor conversão da diidrochalcona **5a** (80%) quando este fungo foi suportado em fibra de fibroína em comparação às demais matrizes biopoliméricas, com o algodão e a paina, ambas compostas majoritariamente por celulose (Figura 21).

Figura 20. Micrografia eletrônica de varredura do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186: (A) Micélios livres. (B) Micélios imobilizados em fibroína.

Figura 21. Micrografia eletrônica de varredura: (A) Fibras de algodão. (B) Micélio do fungo de *P. citrinum* CBMAI 1186 imobilizados em fibras de algodão. (C) Fibras de fibroína. (D) Micélio do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 imobilizados em fibras de fibroína. (E) Fibras de paina. (F) Micélio do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 imobilizados em fibras de paina.

Pelas análises de MEV foi observado que as fibras de algodão e paina também estão interligadas com as hifas do fungo, porém sem a adesão observada nas fibras de fibroína. Na Figura 22 tem-se a fotografia dos micélios do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 imobilizados em fibras de algodão, fibroína e paina após a utilização na reação, recolhidos por filtração a vácuo.

Figura 22. Fotografia dos micélios do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 imobilizado em biopolímeros: A) Algodão; B) Fibroína; C) Paina.

Em todos os biopolímeros empregados na imobilização do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 na redução quimiosseletiva da chalcona **3a**, as enzimas presentes nos micélios do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 mantiveram a atividade catalítica. Considerando a versatilidade das propriedades desses biopolímeros em processos biotecnológicos, ambientalmente aceitos, de baixo custo e biodegradáveis,¹⁴² pode-se concluir que são alternativas viáveis a imobilização de micélios de fungos filamentosos empregados em processos biocatalíticos.

4.3. Redução de enonas α,β - e $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturadas pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 em sistemas bifásicos

As desvantagens da biotransformação como ferramenta na síntese orgânica são baixa solubilidade da maioria dos compostos orgânicos e a dificuldade de extração dos produtos do meio aquoso, esses fatores acarretam em perda de rendimento. Para superar esta dificuldade, sistemas bifásicos estão sendo cada vez mais utilizados em reações de biotransformação. Em alguns casos, a atividade catalítica em meio orgânico é menor que em meio aquoso, no entanto, através de uma seleção cuidadosa do tipo de solvente orgânico empregado é possível alcançar um nível de atividade enzimática semelhante ou superior ao meio aquoso. Alguns pontos importantes devem ser levados em consideração na escolha do meio orgânico ou bifásico a serem utilizados em reações biocatalíticas, tais como, efeito de ionização, polaridade e transferência de massa, já que a presença de um solvente orgânico pode produzir diversos efeitos físico-químicos na estrutura enzimática.¹⁴³

Assim, empregou-se o fungo filamentoso *P. citrinum* CBMAI 1186 na biotransformação de cetonas α,β - e $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturadas em sistemas bifásicos.

Inicialmente, diferentes solventes orgânicos (acetona, acetato de etila, diclorometano, *n*-butanol, *n*-hexano e tolueno) com diferentes valores de $\log P$ (coeficiente de partição entre octanol/água) e polaridades, foram selecionados para avaliar a influência do meio reacional no crescimento das células microbianas do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 (Tabela 5) em mistura com água do mar artificial e malte 2% (Seção 3.3.5.). Segundo os dados obtidos a massa micelial seca produzida pelo microrganismo *P. citrinum* CBMAI 1186 no meio contendo 5% (v/v) de *n*-hexano foi 92% (m/m) em relação a massa produzida pelo mesmo fungo no meio contendo apenas

água do mar artificial após 6 dias de incubação. Já para os demais solventes a massa micelial produzida por esse microrganismo variou de 1,5 a 25%.

Tabela 5. Massa micelial produzida pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 em sistema bifásico.

Reação	Solventes (5%)	$\log P^c$	Massa seca (mg)
1	água do mar artificial ^a	-	783
2	acetona ^b	-0.24	193
3	acetato de etila ^b	0.73	16
4	<i>n</i> -butanol ^b	0.88	12
5	diclorometano ^b	0.93	12
6	<i>n</i> -hexano ^b	3.98	724
7	tolueno ^b	2.73	32

^a100 mL de água do mar artificial; ^b95 mL de água do mar artificial, pH 8 e 5 mL do respectivo solvente (6d, 130 rpm, 32°C); ^cCoefficiente do logaritmo de partição.

O resultado vai de acordo com a regra empírica do logaritmo de partição, um solvente com um $\log P$ maior do que 4,0 tende a diminuir a toxicidade frente às células microbianas, enquanto que aqueles com baixos valores de $\log P$ tendem a inativar a célula microbiana com maior velocidade. Alguns estudos demonstraram que os solventes não polares, como o *n*-hexano tendem a não desidratar a enzima, o que os torna bons candidatos para efetuar a reação num sistema bifásico por biocatálise.¹⁴⁴

Cabe ressaltar que o uso de 5% de acetona como co-solvente no meio de cultura promoveu um crescimento micelial significativo (25%) do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186, frente aos demais solventes com $\log P < 3$. Segundo Faber¹⁴⁵ um co-solvente orgânico que apresenta um valor de $\log P$ -0,25 a 0 tende a ser completamente miscível na solução aquosa e seus efeitos na atividade enzimática são mínimos em concentração de 10-20% (v/v). Enquanto que, co-solvente orgânico de $\log P$ 0 a 1,5 são parcialmente miscíveis em solução aquosa e causam sérias distorções na estrutura enzimática. Os solventes *n*-butanol e diclorometano apresentaram maiores potenciais de

inibição celular para este fungo. Alguns solventes orgânicos no meio podem interferir no processo de crescimento celular, inclusive podendo levar à lise celular.¹⁴⁵

Conhecendo o solvente que menos influenciou na manutenção celular e no crescimento do microrganismo *P. citrinum* CBMAI 1186, paralelamente foi realizada a reação de biotransformação na ausência e na presença de diferentes concentrações de *n*-hexano (5-100% v/v) e de tampão fosfato (pH 7; 0,1 mol.L⁻¹). Este estudo visou avaliar o efeito da concentração do co-solvente frente a reação de redução da ligação C=C em enonas pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186.

Em todos os casos estudados a biotransformação da (1*E*,4*E*)-1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona (**3f**) levou a obtenção do composto di-reduzido **4f** após 6 dias de incubação com micélios de *P. citrinum* CBMAI 1186 (32 °C e 132 rpm), contudo em diferentes rendimentos. De acordo com os dados da Figura 23, a concentração de 10 a 20% *n*-hexano produziu excelentes resultados na bio-hidrogenação do substrato **3f**, com redução seletiva de ambas as ligações duplas carbono-carbono da cetona **3f** em 90% de conversão (Figura 23). A preferência da hidrogenação pelas ligações duplas carbono-carbono em relação à redução do grupo carbonílico não foi afetada pelas concentrações de *n*-hexano nesta reação. Em todos os casos, observou-se apenas a formação de composto 1,5-difenilpentan-3-ona **4f**.

Figura 23. Estudo da proporção de *n*-hexano e tampão fosfato para a biorredução da (1*E*,4*E*)-1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona **3f** pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186.

Condição da reação: 5,0 g de micélio (massa úmida) e 50 mg de cetona **3f** (6 dias , 32 °C, 130 rpm)

Ao adicionar 60% de *n*-hexano ao meio de cultura líquido uma diminuição significativa foi observada na hidrogenação enzimática da cetona pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186, levando a conversão de apenas 36% para o composto **4f**. Concomitantemente com a adição de 100% de *n*-hexano nenhuma conversão foi obtida. A razão para o decréscimo da taxa de redução da enona **3f** com o acréscimo do volume de *n*-hexano deve-se a diversos fenômenos, incluindo inativação e a desnaturação das enzimas enoato-redutases, responsáveis por esta reação. Notou-se que, quanto maior a quantidade de *n*-hexano menos disperso ficava o micélio do fungo ao meio reacional, ou seja, na presença do solvente ocorreu destruição ou inativação dos micélios formando uma massa agregada não dispersa no frasco Erlenmeyer. Assim, a quantidade apropriada de *n*-hexano foi crucial para melhorar o desempenho da reação e optou-se em empregar o meio reacional contendo apenas 10% de *n*-hexano em tampão fosfato pH 7 para obtenção de diferentes α,β - e $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturadas enonas **3g-l** biorreduzidas

pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186. Os resultados da bio-hidrogenação quimiosseletiva e regioseletiva estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Biorredução de cetonas α,β - e $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturadas **3g-l** em sistema bifásico contendo tampão fosfato e *n*-hexano (9:1) com micélios do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186.

Reação	Substrato 3g-l	Produto (conversão) ^a 4g-l
1	<p>3g</p>	Não biotransformado
2	<p>3h</p>	<p>4h (99%)</p>
3	<p>3i</p>	<p>4i (92%)</p>
4	<p>3j</p>	<p>4j (97%)</p>
5	<p>3k</p>	<p>4k (76%)</p>
6	<p>3l</p>	<p>4l (62%) 5 (37%) 6 (1%)</p>

^a Conversão determinada por CG/EM pela integração das área dos picos.

Para o substrato (1*E*,3*E*,6*E*,8*E*)-1,9-difenilnon-1,3,6,8-tetraen-5-ona (**3g**) (Tabela , reação 2) em contraste com os demais substratos não foi observado a biotransformação para este composto. É o primeiro registro na literatura que relata o uso da cetona (1*E*,3*E*,6*E*,8*E*)-1,9-difenilnon-1,3,6,8-tetraen-5-ona (**3g**) na tentativa de biotransformação por células microbianas. A extensão da cadeia carbônica insaturada não levou a redução dos sistemas conjugados provavelmente devido ao “tamanho” do substrato, impedindo sua interação/encaixe com o sítio catalítico da enzima ou o seu transporte até o interior das células onde há maior concentração das enzimas ERs pelo o *P. citrinum* CBMAI 1186. O nosso resultado pode ser relacionado com o estudo de [Buryanovsky et al. \(2004\)¹⁴⁶](#), que descreveram a interação da FAD presente na cavidade do sítio ativo da enzima quinino-redutase 2 (QR2) com o substrato resveratrol. Para que ocorresse a catálise de forma efetiva a molécula do substrato deveria ser ancorada de forma planar ao anel da isoaloxazina da FAD (Figura 24). Possivelmente o volume atômico do substrato **3g** impossibilitou a ancoragem ao sítio ativo, impedindo a ação da enzima enoato-redutase para essa enona di- $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturadas.

Figura 24. Sítio ativo da enzima QR2 (esquerda) e interação do sítio ativo com o resveratrol (direita). O cofator FADH₂ é representado em forma de vara.¹⁴⁶

No entanto, a cetona (*E*)-3-fenil-1(tiofen-3-il)prop-2-en-1-ona (**3h**) foi transformada ao **4h** em excelente conversão (99%) (Figura 25). Enquanto a cetona (2*E*,4*E*)-5-fenil-1(tiofen-2-il)penta-2,4-dien-1-ona (**3i**) foi quimio e regioseletivamente reduzida pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 fornecendo uma ótima conversão (92%) em sistema bifásico de tampão fosfato e *n*-hexano (9:1). Demonstrando também a versatilidade da reação para sistemas heteroatomos.

Figura 25. Cromatograma obtido por CG/EM (70 eV) da reação de bio-hidrogenação da cetona (*E*)-3-fenil-1-(tiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (**3h**) após a extração com 6 dias de incubação pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186.

Condições de análises em CG/EM (70 eV): $T_i=80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (2 min), $T_f=200\text{ }^{\circ}\text{C}$ (4 min), $r=5\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_c=30$ min. $t_r\text{ }4h=22,1\text{ min}$; $t_r\text{ }3h=23,5\text{ min}$.

A redução regioseletiva e quimiosseletiva da ligação $C=C$ pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 também foi obtida para a (3*E*,5*E*)-6-fenil-hexa-3,5-dien-2-ona (**3j**), uma vez que o composto (3*E*,5*E*)-6-fenil-hexa-3,5-dien-2-ona (**3j**) foi transformado exclusivamente na produto **4j** em ótimo rendimento 97% (Tabela 6, reação 3). A cetona **4j** foi caracterizada por espectroscopia de RMN ^1H e RMN ^{13}C (Figura 26) e os dados espectroscópicos de RMN ^{13}C foram comparados aos dados descritos na literatura (Tabela 7).

Figura 26. RMN de ^{13}C (125 Mz, CDCl_3) do produto **4j**.

Tabela 7. Comparação entre os valores de $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) obtidos para o produto **4j** e o relatado na literatura.¹⁴⁷

$\delta^{13}\text{C}$ Observado (ppm) (125 MHz, CDCl_3)	$\delta^{13}\text{C}$ Literatura (ppm) (75 MHz, CDCl_3) ⁷⁶
199,3	199,8
137,5	137,9
136,9	137,3
133,0	133,5
130,8	131,2
129,1	129,6
128,6 (2C)	129,1 (2C)
128,5 (2C)	128,9 (2C)
128,0 (2C)	128,5 (2C)
127,1	127,5
126,0 (2C)	126,5 (2C)
38,3	38,7
27,5	27,9

A obtenção do produto **4j** por biorredução permitiu a comparação com alguns métodos sintéticos já citados para redução da ligação $\alpha\text{-C}=\text{C}$. Como exemplo, [Xu et al.](#)¹⁴⁸ utilizaram o éster de Hantzsch como fonte de hidreto para reduzir a ligação dupla carbono-carbono de derivados de enonas, em refluxo com xileno durante 30 minutos à temperatura de 130 °C forneceu 86% de rendimento. A obtenção da cetona **4j** também

foi descrita com o uso do NaBH₄ na presença de InCl₃ como catalisador em agitação magnética por 1h à temperatura de 22 °C, com 91% de rendimento⁹³ (Esquema 14).

Esquema 14. Redução quimiosseletiva e regioseletiva da ligação dupla carbono-carbono da cetona **3j** por métodos químicos e enzimáticos.

A reação de biotransformação do (2*E*,4*E*)-1,5-difenilpenta-2,4-dien-1-ona (**3k**) por micélios do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 apresentou semelhança no valor de conversão e seletividade ao correspondente produto **4k** em 76% de conversão (Tabela 6, reação 5).

Porém, a biotransformação do composto **3l** pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 produziu três diferentes compostos, a 4-fenilbutan-2-ona (**4l**) com 62% em relação a mistura produzida, a (*S*)-4-fenilbutan-2-ol (**5**) com 37% e traços do álcool alílico (*E*)-4-fenilbut-3-en-2-ol (**6**) onde foram detectados 1% (Esquema 15). O álcool (*S*)-**5** foi obtido com excesso enantiomérico moderado de 46% (Figura 27). O valor de rotação óptica obtido para este composto foi de $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +1.8$ (*c* 1,2, CHCl₃, *ee* = 46%) e o valor encontrado na literatura foi de $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +3.8$ (*c* 1,84, CHCl₃, *ee* = 94%)¹⁴⁹. A estereosseletividade da reação seguiu a regra de Prelog, ataque do íon hidreto pela face *Re*. Pode-se concluir que o composto **3l** foi submetido a duas reações enzimáticas pelo

fungo *P. citrinum* CBMAI 1186, a primeira reação foi catalisada por ERs, enquanto que a segunda por cabonil-redutases.

Esquema 15. Cromatograma de CG/EM (70 eV) biotransformação da cetona **3I** por micélios do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 em sistema bifásico.

Figura 27. Cromatogramas obtidos por CLAE em coluna quiral ODH, do padrão do álcool racêmico **5** (A) e do produto isolado (S)-**5** (B), da reação de biorredução pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 após purificação.

Condições de análise: 10% isopropanol e 90% hexano, fluxo $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

A quimiosseletividade da biotransformação da (*E*)-4-fenilbut-3-en-2-ona (**31**) é fortemente influenciada por grupos substituintes do anel aromático, em geral a enona **31** quando biotransformada acarreta na mistura de produtos. Por exemplo, Skrobiszewski *et al.*¹⁵⁰ aplicaram células do fungo *Pleurotus genus* na redução e derivados da (*E*)-4-fenilbut-3-en-2-ona e o curso da biotransformação foi dependente da estrutura do substrato. O composto sem a presença do substituinte no anel aromático foi biotransformado pelo fungo *Pleurotus genus* e gerou uma mistura de produtos e nas mesmas condições reacionais quando a (*E*)-4-(4-metoxifenil)but-3-en-2-ona foi utilizada apenas a ligação C=C do sistema carbonílico foi reduzida (Esquema 16).

Esquema 16. Biotransformação de cetonas α,β -insaturadas por células do fungo *Pleurotus genus*.⁷⁹

Para demonstrar a influência do grupo carbonílico durante o processo de redução da ligação C=C de cetonas α,β -insaturadas, utilizou-se o (2*E*,4*E*)-1,5-difenilpenta-2,4-dien-1-ol (**7**) na reação de biotransformação com células do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186. Segundo as análises por CG/EM não foi observada a biotransformação do álcool **7** no produto reduzido **8** (Esquema 17). Indicando que o grupo carbonílico foi essencial para a ação das enzimas ERs do fungo *P. citrinum*.

CBMAI 1186 dias urante o processo de redução da ligação α,β -insaturada carbono-carbono.

Esquema 17. Redução da cetona **3j** por NaBH_4 e ácido bórico, seguida da tentativa de biotransformação do álcool **7**.

A importância desse estudo (redução da ligação dupla $\text{C}=\text{C}$) foi a elevada redução quimio- e regioseletiva da ligação carbono-carbono α,β -insaturada. Por fim, foi desenvolvido uma nova abordagem biocatalítica para reduzir quimio- e regioseletivamente ligações do sistema carbonílico em cetonas α,β -insaturadas por micélios do fungo de ambiente marinho *P. citrinum* CBMAI 1186 como biocatalisador em sistema bifásico (10% de *n*-hexano).

4.4 Redução enantiosseletica da ligação $\text{C}=\text{C}$ α,β -carbonílico por micélios do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 imobilizado em quitosana

Ainda sobre os estudos de bio-hidrogenação do sistema carbonílico α,β -insaturados por micélio do fungo de ambiente marinho *P. citrinum* CBMAI 1186 foi decidido utilizar o (*E*)-2-metil-3-fenilacrilaldeído (**3m**) como substrato pró-quiral, para avaliar o potencial enantiosseletivo do fungo a partir da redução da ligação $\text{C}=\text{C}$ α,β -insaturada.

Inicialmente, investigou-se a viabilidade da biorredução enantiosseletiva e quimiosseletiva da ligação carbono-carbono do sistema α,β -insaturado empregando o

substrato **3m**, disponível comercialmente, a partir dos micélios livres do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 em tampão fosfato pH = 7, pelo procedimento descrito anteriormente (Seção 3.6).

Segundo as análises por CG/EM foi observado que após 5 dias de incubação o substrato **3m** foi totalmente consumido, levando a formação majoritária dos correspondentes 2-metil-3-fenilpropan-1-ol (**9**) com 65% de conversão e do ácido 2-metil-3-fenilpropanoico (**10**) com 35 % de conversão (Esquema 18 e Figura 28).

Esquema 18. Reação de biotransformação do aldeído **3m** por micélios do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186

Figura 28. Cromatogramas obtidos por CG/EM: A) do aldeído padrão **3m**; b) da reação após extração da reação de biotransformação do aldeído **3m** com fungo *P. citrinum* CBMAI 1186.

Condições de análises em CG/EM: $T_i = 80 \text{ } ^\circ\text{C}$ (2 min), $T_f = 200 \text{ } ^\circ\text{C}$ (4 min), $tr = 5 \text{ } ^\circ\text{C/min}$, $t_c = 30 \text{ min}$.

Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna com sílica gel e caracterizados por técnicas espectroscópicas. Para o álcool **9** no espectro vibracional no IV foi possível observar uma banda em 3354 cm^{-1} correspondente a deformação axial da ligação O-H e o desaparecimento da banda em 1750 cm^{-1} do grupo carbonílico do aldeído **3m**, além disso, a análise de RMN de ^{13}C mostrou o aparecimento dos sinais em 37,7 e 39,7 ppm referentes aos carbonos metileno benzílico e metílico, respectivamente, oriundos da redução da ligação C=C α,β -insaturada e o sinal em 67,5 ppm referente-se ao carbono $-\text{CH}_2-$ ligado ao grupo hidroxila que é desblindado pelo oxigênio proveniente da redução do grupo aldeído (Figura 29). Os dados espectroscópicos RMN ^{13}C foram comparados com os dados fornecidos pela literatura¹⁵¹ (Tabela 8).

Figura 29. RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do álcool **9**.

Tabela 8. Comparação entre os valores de $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) obtidos para o álcool **9** e os dados descritos na literatura.¹⁵¹

$\delta^{13}\text{C}$ Observado (ppm) (125 MHz, CDCl_3)	$\delta^{13}\text{C}$ Literatura (ppm) (75 Mz, CDCl_3) ⁸⁰
16,4	16,5
37,7	37,8
39,7	39,7
67,5	67,7
125,8	125,9
128,2 (2C)	128,3 (2C)
129,1 (2C)	129,2 (2C)
140,6	140,6

O processo biocatalítico para obtenção do correspondente 2-metil-3-fenilpropan-1-ol (**9**) e do ácido 2-metil-3-fenilpropanoico (**10**) a partir do substrato **3m** não é trivial, uma vez que as enzimas envolvidas nas etapas de redução-oxidação presente no microrganismo operam simultaneamente. Em geral o ataque nucleofílico 1,2 é mais favorecido em aldeídos do que cetonas, devido à alta eletrofilicidade do grupo formil ($-\text{COH}$) dos aldeídos. O grupo aldeído por ser mais reativo que a correspondente cetona favorece a competição entre as enzimas desidrogenases do tipo aldeído desidrogenase (ALDH) e aldeído oxidase (AO) no grupo carbonílico e as ERs na redução da ligação $\text{C}=\text{C}$ do sistema carbonílico α,β -insaturado.

Desta forma, o progresso da biotransformação com o fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 a partir do 2-metil-cinamaldeído **3m** passou a ser monitorado por CG/EM em função do tempo, a cada 24 h foi retirada de uma alíquota do meio reacional. A partir das análises constatou-se o aparecimento de vários intermediários até os produtos finais ao longo de 5 dias. Nas primeiras 24 h, ocorreu o aparecimento majoritário do 2-metil-3-fenilpropan-1-ol (**9**), produto de redução do grupo aldeído por ação de enzimas do tipo ALDHs seguida pela redução da ligação $\alpha,\beta\text{-C}=\text{C}$ por ERs e do ácido 2-metil-3-fenilpropanoico (**10**), produto de oxidação do aldeído para o grupo ácido carboxílico por enzimas do tipo AOs seguida pela redução da ligação $\text{C}=\text{C}$ α,β -insaturado por ERs. Em

proporções menores formaram o 2-metil-3-fenilpropanal e o ácido (*E*)-2-metil-3-fenilacrilico. Após 48 h ocorreu um consumo quase que total do álcool alílico **9'** e o 2-metil-3-fenilpropanal **3'** e o ácido (*E*)-2-metil-3-fenilacrilico **10'** mantiveram-se praticamente constante. Em 72 h o composto **9** sofreu um decréscimo em relação a composição total da mistura, o 2-metil-3-fenilpropanoico e o ácido (*E*)-2-metil-3-fenilacrilico aumentaram significativamente no meio. Portanto ocorreu nesta etapa uma oxidação do álcool primário por AOs.

Por fim, em 96 h de incubação o álcool saturado **9'** apresentou um ligeiro acréscimo e assim permaneceu constante até as 120 h de reação. Já a concentração do correspondente ácido 2-metil-3-fenilpropanoico (**10**) foi praticamente inalterada entre 96 a 120 h de incubação com micélios do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 (Figura 30). Em geral as ERs apresentam maior atividade catalítica em pH 7.¹⁵²

Baseado no mecanismo de biorredução por ERs, onde a ligação de hidrogênio entre o grupo C=O do aldeído com grupos -NH de resíduos de aminoácidos desempenha um papel crucial na ativação eletrônica da ligação dupla C=C α,β -insaturada ou na orientação do substrato para o sítio catalítico da enzima. A redução da ligação dupla C=C a partir do álcool **9** é desfavorecida pela ação das ERs, por outro lado este composto tende a ser oxidado ao aldeído α,β -aldeído insaturado pela ação das AO, só então é capaz de reduzir a ligação dupla C=C pela ação das ERs o que por sua vez é reduzido ao álcool saturado **9**.

Figura 30. Cinética de biotransformação do (*E*)-2-metil-3-fenilacrilaldeído **3m** pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186.

A estereoquímica do álcool **9** foi atribuída com base no mecanismo já discutido anteriormente, onde o íon hidreto proveniente da FMN-H ataca o C β da C=C do do sistema insaturado, em seguida um íon H $^+$ do meio ou de algum resíduo de aminoácido da enzima é abstraído pela face *Re* do C α do íon enolato (Esquema 19). Os valores de rotação óptica determinados para o (*S*)-álcool **9** foi de $[\alpha]^{20}_D = -5,14$ (1,0 g/mL, *ee* = 40%), o valor descrito na literatura foi de $[\alpha]^{20}_D = -8,5$ (1,0 g/mL, *ee* = 70%)¹⁵³ e o valor determinado para o (*S*)-ácido **10** foi de $[\alpha]^{20}_D = + 10,3$ (1,0 g/mL) e o descrito na literatura foi de $[\alpha]^{22}_D = + 26,3$ (1,0 g/mL, *ee* = 95%).¹⁵⁴ A separação dos enantiômeros de **10** não foi possível em coluna quiral (ODH ou ASH) por CLAE.

Pela cinética da reação (Figura 30) sugere-se que a configuração do ácido **10** é a mesma do álcool **9**, uma vez que o álcool **9** foi oxidado ao correspondente ácido.

Esquema 19. Reação de biotransformação enantiosseletiva do aldeído **3m** por micélios do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186.

Vale destacar que no controle abiótico a presença do álcool **9** e do ácido **10**, produzidos por eventos físico-químicos a partir do 2-metil-cinamaldeído **3m** não foi observada por análises em CG/EM. Contudo, os produtos obtidos ao final da reação por células do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 de fato foram oriundos de biotransformação do substrato **3m**.

Com o intuito de avaliar a influência das células imobilizadas do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 na quimiosseletividade e na enantiosseletividade da biotransformação do (*E*)-2-metil-3-fenilacrilaldeído **3m**, o microrganismo *P. citrinum* CBMAI 1186 foi imobilizado em 2 tipos de quitosana, tais como, a quitosana comercial (QC) e a quitosana modificada (QM) na forma desacetilada (gentilmente cedida pelo grupo do Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho) e os micélios totais foram utilizados na biotransformação do 2-metil-cinamaldeído **3m** (Esquema 20). Os suportes escolhidos foram baseados em dados já reportados na literatura sobre imobilização de fungos filamentosos em biopolímeros.¹⁵⁵

Esquema 20. Biotransformação do 2-metil-cinamaldeído **3m** por micélios do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 imobilizados.

Para ambos os casos a quimiosseletividade dos micélios do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 foi alterada em comparação ao uso do micélio na forma livre. Quando os micélios suportados em QC foram utilizados, os produtos majoritários obtidos foram o 2-metil-3-fenilpropan-1-ol (**9**) e o 2-metil-3-fenilpropanal (**3'**) em 48 e 41% da mistura formada, em proporções menores formaram-se o álcool alílico **9'** com 8% e o ácido (*E*)-2-metil-3-fenilacrílico (**10'**) com 3%. Já com o uso de células totais suportadas em QM ocorreu a formação majoritária do 2-metil-3-fenilpropan-1-ol (**9**) com 49% e do ácido (*E*)-2-metil-3-fenilacrílico (**10'**) com 35% e em proporções menores apareceu o composto **9'** com 7% e o composto **10** em 9% (Figura 31). O tempo de retenção e os espectros de massas do (*E*)-2-metil-3-fenilprop-2-en-1-ol (**9'**) e do 2-metil-3-fenilpropanal (**3'**) foram comparados com seus respectivos padrões paralelamente sintetizados. Os valores da concentração dos compostos analisados por CG/EM foram fornecidos pela integração das áreas dos picos correspondentes.

Figura 31. Cromatogramas obtidos por CG/EM da reação de biotransformação do aldeído **3m** por micélios do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 imobilizado em: A) Quitosana comercial; B) Quitosana modificada (desacetilada).

Condições de análises em CG/EM (70 eV): Ti=80 °C (2 min), Tf=200 °C (4 min), r = 5 °C/min, tc = 30 min.

O tipo de suporte utilizado na imobilização do microrganismo pode influenciar drasticamente o curso da reação biocatalítica.

A estereosseletividade da reação não foi alterada, em todos os casos (livre e imobilizado) ocorreu formação do (*S*)-álcool **9**, no entanto o excesso enantiomérico variou de acordo com a método empregado. Quando as células do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 foram imobilizada em QM o excesso enantiomérico do (*S*)-álcool **9** foi de

10%, enquanto que, o excesso enantiomérico do (*S*)-álcool **9** obtido por micélios imobilizados em QC foi de 40%, valor equivalente ao obtido pelos micélios na forma livre (Figura 32).

Figura 32. Cromatogramas obtidos por CLAE em coluna quiral ODH do (A) padrão racêmico **9**; (B) do produto (*S*)-**9** com micélios do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 livre; (C) imobilizado em QM; (D) imobilizado em QC.

Condições de análise CLAE: 10% isopropanol e 90% hexano, fluxo 0,5 mL.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (Figura 33) dos micélios microbianos do fungo filamentoso *P. citrinum* CBMAI 1186 mostram a aderência do micélio ao suporte de quitosana desacetilada de forma mais efetiva em relação a quitosana comercial. A diferença de interações entre o suporte e os micélios foi responsável pela alteração no percurso da reação de biotransformação do aldeído **3m** pelos micélios do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186. Entretanto, tais suportes, uma vez estabelecidos, podem ser utilizados em reações de biocatálise na redução da ligação C=C de compostos insaturados.

Figura 33. Micrografia eletrônica de varredura de micélios do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 imobilizados em (A) e (B) Quitosana comercial (QC); (C) e (D) Quitosana modificada (desacetilada) (QM).

A biotransformação do aldeído **3m** com células do fungo filamentoso *P. citrinum* CBMAI 1186 apresentou um comportamento distinto em relação ao micélio livre e imobilizado em quitosana (comercial ou modificada) sob as mesmas condições. O álcool **9** apareceu como o principal composto em todos os casos (micélios livres e imobilizados em QC e QM). O ácido **10** também ocorreu como produto majoritário nas reações em micélios livres ou imobilizados em QM. Já o aldeído **3'** ocorreu como majoritário apenas na reação com os micélios imobilizados em QC.

5. CONCLUSÃO

O principal objetivo do capítulo foi alcançado, uma nova espécie de fungo derivado de ambiente marinho foi identificada com alta atividade para a enzima enoato-redutase.

Foi possível a utilização de micélios do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 na redução quimiosseletiva, regioseletiva e enantiosseletiva da ligação dupla carbono-carbono de sistemas α,β -, $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ - e di- α,β -insaturados.

A imobilização de células do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 por biopolímeros (algodão, fibroína da seda, paina e quitosana) de certa maneira permitiu o prolongamento da atividade celular deste fungo.

Compostos até então adquiridos apenas por meio da química convencional foram obtidos via reações de biocatalise com micélios do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186.

Assim, foi criado um protocolo onde os produtos formados são dependentes do suporte de imobilização do fungo para a biotransformação de compostos α,β -insaturados com micélios do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186.

Capítulo 3

**RESOLUÇÃO ENZIMÁTICA DE HALOIDRINAS POR
LIPASE DE *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* IMOBILIZADA
EM FIBROÍNA DA SEDA**

1. INTRODUÇÃO

1.1. Resolução cinética enzimática ou quimio-enzimática

A síntese de compostos enantiomericamente puros ainda é um desafio para a química orgânica.^{22; 156}

Moléculas quirais desempenham um papel importante na indústria farmacêutica, pois a maioria das moléculas biológicas são quirais.^{157; 158} Os fármacos, utilizados nas formas enantiopuras são de grande importâncias para o mercado farmacêutico, obviamente é crucial para a indústria produzir rotas alternativas para obter produtos (medicamentos, aditivos alimentares e vitaminas) nas formas enantioméricas.⁴

Louis Pasteur em 1848 foi capaz de separar os enantiômeros partindo da mistura racêmica do ácido tartárico que se formava dos tonéis de vinho por recristalização. Desde então, a separação de um racemato em seus respectivos enantiômeros (substâncias com propriedades físicas idênticas, porém diferem na direção em que suas soluções desviam o plano da luz polarizada) ficou conhecida como resolução e tem sido a forma mais empregada para separação de dois enantiômeros. Esta resolução foi realizada pela adição de um composto auxiliar (enantiomericamente puro) na formação preferencial de um diastereoisômero, que em seguida foram separados com base nas diferenças das suas propriedades físicas.¹⁵⁹

Outra técnica utilizada na separação de enantiômeros é a Resolução Cinética Enzimática (RCE) que utiliza um catalisador biológico (enzimas) na resolução de substratos racêmicos. A enzima é capaz de converter preferencialmente um dos enantiômeros em produto, enquanto o outro enantiômero permanece intocado, assim essas substâncias terão propriedades física e química diferentes e poderão ser prontamente separadas.^{160; 161} Essa resolução cinética já vem sendo empregada a nível laboratorial e em processos industriais.

As enzimas aceleram as reações biocatalisadas por diminuírem a energia de ativação existente entre o substrato e o produto. A origem do poder catalítico está relacionada à capacidade enzimática de estabilizar o estado de transição da reação, o que ocorre devido às interações de orientação favorável existente entre a enzima e o seu substrato, gerando dois estados de transição diastereoisoméricos com diferentes energias livre de Gibbs, portanto com diferente velocidade de reação (Figura 1).¹⁶¹

Figura 1. Diagrama de energia de uma reação catalisada por enzima.¹⁶¹

Enz = Enzima; **A** e **B** = substratos enantioméricos; **P** e **Q** produtos enantioméricos

Como mostrado na Figura 1, as condições iniciais consistem na participação da $[Enz + (A \text{ ou } B)]$. Se o enantiômero **B** reagir a coordenada da reação segue no sentido a direita formando o produto **Q**. Caso o enantiômero **A** reagir, a coordenada da reação segue em sentido a esquerda formando o produto **P**. A estabilidade relativa dos dois produtos **P** e **Q** são as mesmas porque essas espécies são pares de enantiômeros. Porém, para levar a formação do produto **P** será necessário romper uma barreira energética maior do que aquela necessária para formação do produto **Q**. Neste caso, quanto maior a

diferença energética ($\Delta\Delta G^\ddagger$) maior será a velocidade de formação de um dos enantiômeros e consequentemente maior será a enantiosseletividade do processo.¹⁶¹

Durante o percurso de uma resolução cinética as purezas enantioméricas do substrato remanescente e do produto formado tem a possibilidade de variar à medida que a reação prossegue. A eficiência ou grau de seletividade na obtenção preferencial de um dos enantiômeros é conhecido como excesso enantiomérico (*ee*). Em uma RCE os valores do excesso enantiomérico do produto (*ee_p*) e do substrato (*ee_s*) podem ser determinados experimentalmente (Equação 1), podendo ser utilizado para estimar a enantiosseletividade do processo por meio do cálculo da razão enantiomérica (*E*) cujo o valor é a razão entre as constantes de velocidade da reação de cada enantiômero (Equação 2).^{4; 161}

$$ee_{\text{substrato}} = \frac{(A-B)}{(A+B)} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

$$E = \frac{v_R}{v_S} \quad (\text{Equação 2})$$

Uma razão enantiomérica de 1 ($E = 1$) é o resultado de uma reação que não apresenta enantiosseletividade, ou seja, o catalisador quiral não conseguiu distinguir os enantiômeros presentes na mistura racêmica e a velocidade da reação foi a mesma para ambos os enantiômeros. Por outro lado, reação com elevada razão enantiomérica ($E \geq 100$) assegura não só um alto excesso enantiomérico mas um rendimento proporcionalmente alto. Em uma situação ideal de RCE o rendimento máximo deve ser 50% para cada composto enantiopuro (produto e substrato remanescente).¹⁶²

Através da necessidade de desenvolver um método mais adequado para o tratamento quantitativo dos dados bioquímicos, [Chen *et al.* \(1982\)](#) desenvolveram uma equação que é utilizada para o cálculo do valor da razão enantiomérica (E) de uma reação irreversível, a partir dos valores experimentais da conversão da reação “ c ” (Equação 3) e dos excessos enantioméricos do substrato (ee_s) e do produto (ee_p) (Equação 4).¹⁶³

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \quad \text{(Equação 3)}$$

Para o substrato	Para o produto	
$E = \frac{\ln [(1 - c) (1 + ee_s)]}{\ln [(1 - c) (1 - ee_s)]}$	$E = \frac{\ln [(1 - c) (1 + ee_p)]}{\ln [(1 - c) (1 - ee_p)]}$	(Equação 4)

Substituindo o termo “ c ” em uma das equações a cima e simplificando os termos tem-se a Equação 5.¹⁶¹

$$E = \frac{\frac{\ln [(ee_p (1 - ee_s))]}{(ee_p + ee_s)}}{\frac{\ln [(ee_s (1 - ee_p))]}{(ee_p + ee_s)}} \quad \text{(Equação 5)}$$

A separação de enantiômeros de álcoois secundários pró-quirais por RCE é realizada por reações do tipo hidrólise, esterificação ou transesterificação. Tradicionalmente na reação de transesterificação enzimática é utilizado um agente acilante (Esquema 1A) já na reação de hidrólise emprega-se um determinado composto acetilado racêmico em meio aquoso (Esquema 1B). De modo geral ambos os processos

se baseiam em uma reação enantiosseletiva mediada por enzimas na formação de uma nova substância com propriedades químicas e físicas diferentes.^{4; 161; 162}

Esquema 1. Resolução cinética enzimática. A) Reação de transesterificação enzimática do (R,S)-feniletanol. B) Reação de hidrólise do (R,S)-acetato feniletanol.

Neste trabalho, empregou-se a RCE em halodrinas racêmicas na obtenção de intermediárias de fármacos ou compostos enantiomericamente puros com lipase de *Pseudomonas fluorescens* livre e imobilizada em biomateriais compostos à base de fibroína da seda.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste capítulo foi a imobilização da lipase de *Pseudomonas fluorescens* Amano AK em biopolímeros (fibroína da seda e/ou alginato de sódio) na obtenção de moléculas enantiopuras.

2.1. Objetivos específicos

2.1.1. Imobilização da lipase de *Pseudomonas fluorescens* Amano AK em esferas de fibroína da seda por adsorção.

2.1.2. Imobilização da lipase de *P. fluorescens* Amano AK em blendas de fibroína da seda com alginato de sódio por encapsulação.

2.1.3. Caracterização dos suportes utilizados na imobilização da lipase de *P. fluorescens*.

2.1.4. Uso da lipase imobilizada na RCE de diferentes halodrinas racêmicas.

2.1.5. Síntese de moléculas enantiopuras derivadas de compostos resolvidos por lipase imobilizada em fibroína da seda e alginato.

2.1.6. Avaliação do processo de reuso da lipase imobilizada em RCE de halodrinas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Enzimas

Todas as enzimas, lipases de *Pseudomonas fluorescens* (≥ 20000 U/mg), *Candida cylindracea* (4,9 U/mg), *Rhizopus niveus* (4,49 U/mg) e *Aspergillus niger* (184 U/mg), foram adquiridas da Sigma-Aldrich e estocadas a 4 °C.

3.2. Reagentes

Acetato de vinila, α -halocetonas **1a-e**, boroidreto de sódio, anidrido acético, piridina, hidróxido de lítio e imidazol foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Brasil). Os solventes, acetato de etila, *n*-hexano, metanol, DMF, isopropanol e clorofórmio foram adquiridos comercialmente da Tedia (Brasil), Panreac (Espanha) e J.T Baker (USA). Os solventes, CDCl_3 (98,8% + 0,05 de TMS) e CD_3OD (98,8% + 0,05 TMS) foram obtidos da Cambridge Isotope.

3.3. Equipamentos

3.3.1. Cromatografia por adsorção

A purificação dos compostos orgânicos foi realizada por cromatografia em coluna *flash* com sílica gel como fase estacionária e uma mistura de solvente (hexano e acetato de etila). Análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em folhas cromatográficas com sílica gel 60 F_{254} suportada em placa de alumínio (revelador para UV e espessura de 0,2 mm). A visualização dos compostos orgânicos impregnados nas cromatoplasmas foi obtida pela exposição à luz ultravioleta (254 nm) ou por solução de ácido fosfomolibdico (7% em etanol).

3.3.2. Cromatografia a gás acoplada ao detector de ionização em chama (CG-FID)

Foi utilizado um cromatógrafo de marca Shimadzu modelo GC 2010, equipado com auto-injetor AOC 20i, um detector de ionização de chama (FID – *Flame Ionization Detector*) e uma coluna quiral CP-Chiralsil-DEX (β -ciclodextrina) (25 m x 0,25 mm x 0,39 mm).

O tempo de retenção para os enantiômeros (*R,S*)-álcoois foram em: **2a**, (*R*) = 20,5 min e (*S*) = 19,8 min; **2b**, (*R*) = 13,8 min e (*S*) = 13,5 min; **2c**, (*R*) = 23,1 min e (*S*) = 22,4 min; **2d**, (*R*) = 28,5 min e (*S*) = 27,9 min; **2f**, (*R*) = 22,3 min e (*S*) = 21,7 min; **2g**, (*R*) = 23,3 min e (*S*) = 22,5 min; **2h**, (*R*) = 24,5 min e (*S*) = 23,7 min; **2i**, (*R*) = 27,3 min e (*S*) = 26,4 min. O tempo de retenção para os (*R,S*)-acetatos deu-se em: **3a**, (*R*) = 16,1 min e (*S*) = 16,7 min; **3b**, (*R*) = 10,1 min e (*S*) = 10,6 min; **3c**, (*R*) = 18,3 min e (*S*) = 18,6 min; **3d**, (*R*) = 22,5 min e (*S*) = 22,8 min; **3f**, (*R*) = 16,5 min e (*S*) = 17,5 min; **3g**, (*R*) = 19,8 min e (*S*) = 20,6 min; **3h**, (*R*) = 20,6 min e (*S*) = 20,0 min; **3i**, (*R*) = 27,8 min e (*S*) = 25,5 min.

3.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu modelo LC-10AD equipado com detector de UV (190-254 nm) e uma coluna quiral Chiralcel® OD-H (0,46 cm x 25 cm x 5 μ m) como fase estacionária. Uma mistura de hexano e 2-propanol (90:10) foi utilizada como fase móvel, a razão de fluxo foi de 0,5 mL.min⁻¹. O tempo total de análise foi de 35 min. O tempo de retenção para os enantiômeros (*R,S*)-álcoois deu-se em: **2j**, (*R*) = 24.3 min e (*S*) = 18.2 min; **2k**, (*R*) = 28.5 min e (*S*) = 27.3 min; **2l**, (*R*) = 29.1 min e (*S*) = 25.9 min. E o tempo de retenção para os (*R,S*)-acetatos foram em: **3j**, (*R*) = 11.2 min e (*S*) = 9.2 min; **3k**, (*R*) = 20.3 min e (*S*) = 19 min; **3l**, (*R*) = 16.5 min. (*S*) = 14.9 min.

3.3.4. Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)

Análises por espectrometria de massas foram realizadas em um aparelho Shimadzu/GC 2010 acoplado a um auto injetor Shimadzu/AOC-5000 e um detector de massas (Shimadzu MS2010 Plus) com impacto de elétrons (70 eV) equipado com uma coluna de sílica fundida DB-5MS (Agilent J&W Advanced 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O gás de arraste utilizado foi o hélio (65 kPa). As análises foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica e Biocatálise (IQSC-USP).

3.3.5. Espectrometria de infravermelho-Transformada de Fourier (IV)

Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrômetro de marca Bomem modelo MB-102 e no espectrômetro de marca SHIMADZU IRAffinity, ambos operando com Transformada de Fourier. As análises foram realizadas na Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (IQSC-USP). Os espectros foram obtidos na região de 4.000 a 400 cm⁻¹ usando pastilhas de KBr (amostras sólidas) e cristal de silício (amostras líquidas). As amostras sólidas, previamente secas em alto vácuo, foram preparadas misturando-se uma certa quantidade dos compostos com o sal de KBr (grau espectroscópico) seco em estufa (100 °C, 24h), a mistura foi triturada e prensada até a formação da pastilha fina e translúcida. As amostras líquidas, previamente secas em alto vácuo, foram preparadas com adição de uma alíquota pura diretamente no cristal de silício.

3.3.6. Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)

Espectros de Ressonância Magnética Nuclear ¹H e de ¹³C foram adquiridos em um espectrômetro da marca Agilent Technologies 500/54 Premium Shielded ou Agilen

Technologies 400/54 Premium Shielded, ambos pertencentes à CAQI do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (ISCQ-USP). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e a constante de acoplamento (J) em Hz, utilizando o próprio solvente (CDCl_3 ou CD_3OD) ou tetrametilsilano (TMS) como sinal de referência.

3.3.7. Medida de rotação óptica

Os valores de rotação óptica foram obtidos em um polarímetro Perkin-Elmer 241 (Waltham, MA, USA), equipado com lâmpada de sódio ($\lambda = 589 \text{ nm}$) e uma cela de 1 dm de comprimento com concentrações expressas em g/100 mL, no laboratório do Prof. Dr. Timothy Jonh Brocksom (DQ-UFSCar) ou em um polarímetro Jasco modelo P2000, equipado com lâmpada de sódio ($\lambda = 589 \text{ nm}$) e uma cela de 1 dm comprimento com concentrações expressas em g/100 mL, pertencente a CAQI do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (ISCQ-USP)

3.4. Síntese das haloidrinas racêmicas (2a-e)

Em um balão de fundo redondo (50 mL) foi adicionado a α -halobenzofenona (**1a-e**) (5 mmol), metanol (25 mL) seguida da adição de NaBH_4 (3 mmol, 0,114 mg). A mistura permaneceu em agitação magnética por 30 min a 0°C e por 1,5 h a temperatura ambiente, em seguida o metanol foi rotaevaporado por pressão reduzida e HCl (1 mL, 10%) foi adicionado na mistura reacional. Os compostos orgânicos foram extraídos com acetato de etila (3 x 20 mL). A fase orgânica foi combinada e seca com Na_2SO_4 anidro,

filtrada e concentrada por rotaevaporação a pressão reduzida. O produto de interesse foi purificado por cromatografia em coluna *flash* por sílica gel eluída com hexano e acetato de etila (8:2) (Esquema 2). O rendimento de cada reação foi determinado e o produto foi caracterizado por técnicas espectroscópicas (RMN de ^1H e ^{13}C , CG/EM e IV).

Esquema 2. Síntese de halodrinas racêmicas **2a-e**.

3.5. Síntese das cloridrinas racêmicas (**2f-l**)

As α -cloridrinas racêmicas **2f-l** foram cedidas pelo Prof. Dr. Giuliano César Clososki (FCFRP-USP), preparadas como descrito por Nishimura *et al.*¹⁶⁴ (Figura 2).

Figura 2. Cloridrinas racêmicas (**2f-m**) cedidas pelo Prof. Dr. Giuliano César Clososki (FCFRP-USP).

3.6. Síntese dos acetatos racêmicos

Os acetatos racêmicos **3a-l** foram sintetizados a partir da esterificação das haloidrinas racêmicas **2a-l**. Em um balão de 25 mL foi adicionado a haloidrina racêmica (**2a-l**) (1 mmol), o anidrido acético (0,6 mmol, 56,3 µL) e piridina (2 mmol, 161,5 µL). A mistura foi agitada por 24 h à temperatura ambiente em seguida adicionou-se HCl (1 mL, 10%) e extraiu-se os compostos orgânicos com acetato de etila (3 x 20 mL). A fase orgânica foi combinada e seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada em rotaevaporação à pressão reduzida. O produto de cada reação foi purificado por cromatografia em coluna por sílica *flash* com uma mistura de hexano e acetato de etila (9:1) como eluente (Esquema 3).

Esquema 3. Síntese dos acetatos racêmicos 3a-l

3.7. Resolução cinética enzimática das haloidrinas 2a e 2b pela lipase de *P. fluorescens*

Em um frasco *epENDORF*[®] (2 mL) foram adicionados o (*R,S*)-2-halo-1-(fenil)etanol (*R,S*)-**2a** ou (*R,S*)-**2b** (0,12 mmol), acetato de vinila (0,35 mol, 0,030 mg), 5 mg de lipase e hexano (500 µL). A reação permaneceu em agitação orbital (32 °C, 130 rpm) monitorada por CCD. O excesso enantiomérico (*ee*) do acetato [(*R*)-**3a-b**] formado e do álcool [(*S*)-**2a-b**] remanescente foram determinados por CG/FID por coluna quiral

com a retirada de alíquota (100 µL) do meio reacional a cada 24 h. Em seguida a mistura foi filtrada e o solvente evaporado por pressão reduzida. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna por sílica *flash* com hexano e acetato de etila (9:1) como eluente. O Esquema 4 ilustra a reação química da RCE das haloidrinas **2a** e **2b** por *P. fluorescens*.

Esquema 4. Resolução cinética enzimática da haloidrina **2a** e **2b** pela lipase de *P. fluorescens*.

3.8. Preparo das esferas de fibroína da seda utilizadas como suporte enzimático –

Método 1

3.8.1. Extração da sericina

Essa etapa do trabalho foi realizada em colaboração e supervisão do Prof. Dr. Sérgio A. Yoshioka no Instituto de Química de São Carlos – USP.

As principais etapas na extração da sericina são apresentadas na Figura 3. O casulo do bicho da seda – *Bombyx mori* foi fornecido pelo sericultor Hélio Hatshugai, da cidade de Bastos, SP (Figura 3, etapa A). As esferas de fibroína da seda (FS) foram preparadas a partir do casulo do bicho da seda (3,0 g) que foi picotado com tesoura (Figura 3, etapa B) e posteriormente transferido para a uma solução de Na₂CO₃ 2% (500 mL) aquecida à temperatura próxima de 100 °C e mantida em agitação magnética por 30 min (Figura 3, etapa C). Lavou-se o biomaterial com água destilada (3 x 1000 mL). Por fim, a fibra foi colocada para secar em estufa (70°C, 24 h) (Figura 3, etapa D) e picotada em moinho de facas (SOLAB, modelo SL31 - Embrapa) (Figura 3, etapa E).

Figura 3. Principais etapas de extração da sericina do casulo do bicho da seda

Fonte: Autoria própria

3.8.2. Solubilização das fibras de fibroína

A solubilização das fibras de fibroína da seda previamente tratadas foi realizada na presença de 50 mL de uma solução ternária $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}:\text{CaCl}_2$ (8:2:1 proporção molar) a 50 °C por 12 h em agitação magnética. A solução foi dialisada por 3 dias à temperatura ambiente, sendo que a água de diálise trocada à cada 24 h (Figura 4). Para remover as partículas maiores ou impurezas a solução de fibroína foi centrifugada a 6000 rpm por 10 min. A concentração final da solução de FS foi determinada pelo método gravimétrico. A solução de FS foi estocada a 10 °C para posterior uso.

Figura 4. Aparato para a diálise da solução de fibroína da seda

Fonte: Autoria própria

3.8.3. Obtenção das esferas de FS

A determinação da concentração da solução de FS foi realizada pelo método termogravimétrico. A solução dialisada de FS (5% m/m) foi transferida para um borrifador de vidro acoplado com ar comprimido e a formação das esferas se deu com o borrifamento em nitrogênio líquido. As esferas congeladas foram coletadas e liofilizadas por 12 h. Em seguida as esferas secas passaram por peneiras granulométricas separando-se as partículas entre 6 a 13 *mesh* (Figura 5)

Figura 5. Principais etapas na preparação das esferas de fibroína da seda. Solubilização da fibroína em solução ternária (A) e esferas congeladas para liofilização (B).

Fonte: Autoria própria

3.8.4. Imobilização da enzima lipase de *P. fluorescens* em esferas de fibroína – Método 1 (FS-LPF)

Em um bérquer (50 mL) foi adicionado as esferas de fibroína (1,0 g), lipase de *P. fluorescens* (100 mg) e água destilada (10 mL). A mistura foi mantida em agitação magnética por 60 min à temperatura ambiente. Em seguida o material foi congelado em N₂(liq.) e liofilizado por 12 h. O material a base de

fibroína da seda e a lipase de *P. fluorescens* (FS-LPF) foi estocado a 4 °C para posterior uso nas reações de biocatálise.

3.9. Preparo das esferas de fibroína da seda utilizadas como suporte enzimático – Método 2 (FA-LPF)

Foi preparada 10 mL de uma solução de alginato de sódio (3% m/v) em agitação magnética à temperatura ambiente por 12 h. Na solução de alginato de sódio foi adicionado a lipase de *P. fluorescens* (3% m/v) e a mistura permaneceu em agitação magnética à temperatura ambiente por 30 min. Em seguida 10 mL da solução de FS (preparada como descrita na *Seção 2.8.2.*) foi adicionada na solução de alginato de sódio e agitada por mais 30 min.

A solução contendo fibroína, alginato de sódio e lipase de *P. fluorescens* foi gotejada lentamente com o auxílio de uma seringa em uma solução de 250 mL de cloreto de cálcio (3% m/v). As esferas de FA-LPF foram formadas em contato com a solução de cloreto de cálcio via precipitação. As esferas formadas permaneceram em agitação magnética por 30 min à temperatura ambiente e armazenadas em geladeira *overnight* (Figura 6). O material foi filtrado, liofilizado e caracterizados por espectroscopia de infravermelho (IV), microscopia de varredura eletrônica (MEV) e análise termogravimétrica (TG).

Figura 6. Etapas utilizadas no preparo da FA-LPF

Fonte: Autoria própria

3.9.1. Densidade aparente da FA-LPF

A densidade aparente do material FA-LPF foi calculada de acordo com a ASTM D 3574 (*American society for testing and materials*). Uma amostra de FA-LPF foi medida com um paquímetro e pesada em uma balança eletrônica com precisão de $\pm 0,0001\text{g}$. O valor da densidade foi reportado com massa total (kg) da amostra por unidade de volume (m^3).¹⁶⁵ A determinação foi realizada em duplicada.

3.9.2. Sorção de solventes na FA-LPF

A capacidade de sorção de solventes pela FS-LPF foi baseada na ASTM F 726. Em um frasco *vial* (1,5 mL) com tampa as amostras previamente pesadas foram completamente imersas nos líquidos contidos nos frascos. Após 24 h as amostras foram retiradas dos frascos e pesada novamente. Os resultados foram representados pela Equação 5. Onde S_m é a massa do material após o contato com o líquido e S_0 é a massa

do material antes do contato com o líquido.¹⁶⁶ A determinação foi realizada em duplicada.

$$Sorção = \frac{S_m - S_0}{S_0} \quad (\text{Equação 5})$$

3.10. Determinação da atividade enzimática

Foi determinada a atividade enzimática para a lipase de *P. fluorescens* livre e imobilizada pelo método de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP), baseada na metodologia de *Ye et al.*¹⁶⁷ Em um tubo de ensaio (15 mL) foi adicionado 0,5 mL da solução estoque de *p*NPP [14,4 mM] e 0,5 mL de uma solução de tampão fosfato (pH = 7, 0,1 M). A reação iniciou-se com adição de 2 mg de lipase de *P. fluorescens*, ou 20 mg da lipase imobilizada (FS-LPF ou FA-LPF). O tubo permaneceu incubado a 32 °C por 5 min em agitação magnética (300 rpm). Após o período de incubação a reação foi finalizada com adição de 0,5 mL da solução de Na₂CO₃ (0,5 M) seguida de centrifugação (6000 rpm, 6 min). Em seguida 100 µL do sobrenadante foi diluído 10 x com água destilada e a absorbância da concentração de *p*-nitrofenol (*p*-NP) liberado na reação foi medida em 410 nm no espectrofotômetro de UV-vis (UV, Thermo Scientific, Genesys 10 uv), adotando como branco ou controle a solução sem enzima, tratada paralelamente.

Foi adotado como coeficiente de extinção molar $\varepsilon = 12444 \text{ mmol.cm}^{-1}$ determinado pela curva analítica da solução padrão de *p*-NP e o cálculo da atividade foi realizado pela Equação 6. A atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade que o biocatalisador libera em 1,0 µmol de *p*-NP / min nestas condições.

$$a = \frac{k \times \varepsilon \times f_{\text{diluição}}}{c_e} \quad (\text{Equação 6})$$

$$\text{sendo que } k = \frac{A_{410}}{t}$$

a = atividade enzimática

ε = coeficiente de extinção molar

c_e = concentração da enzima

A_{410} = absorbância em 410 nm

t = tempo (min)

$f_{\text{diluição}}$ = fator de diluição

3.11. Resolução cinética enzimática do (*R,S*)-2a por lipase de *P. fluorescens* imobilizada (Método 1)

Em um frasco *vial* (2 mL) foi adicionado o (*R,S*)-2-cloro-1-(fenil)etanol (0,12 mmol, 20 mg) (**2a**), acetato de vinila (0.35 mol, 0,030 mg), hexano (1 mL) e diferentes quantidades da FS-LPF (50, 100 e 150 mg). A reação foi mantida em agitação orbital (32°C, 130 rpm) e ao final do processo foi filtrada e extraída com acetato de etila (3 x15 mL). As fases orgânicas foram combinadas e secas com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente foi removido por rotaevaporação à pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna com sílica *flash* eluída com uma mistura de hexano e acetato de etila (8:2) (Esquema 5).

Esquema 5. Reação de RCE do (*R,S*)-2-cloro-1-(fenil)etanol (**2a**) por FS-LPF

3.12. Resolução cinética enzimática (*R,S*)-**2a-e** por FS-LPF (Método 1)

Em um frasco *vial* (2 mL) foi adicionado o (*R,S*)-2-cloro-1-(fenil)etanol (0,36 mmol, 60 mg) (**2a**), acetato de vinila (0,75 mol, 0,060 mg), hexano (2 mL) e a FS-LPF (450 mg). A reação permaneceu em agitação orbital (32°C, 130 rpm). Ao final do processo a reação foi filtrada e as esferas de FS-LPF foram recolhidas para posterior reuso. A reação foi extraída com acetato de etila (3 x 15 mL), seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente foi removido em rotaevaporação à pressão reduzida. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna em sílica *flash* eluída com hexano e acetato de etila (8:2). A mesma metodologia foi adotada para a resolução cinética enzimática das demais (*R,S*)-haloidrinas (**2b-e**) (Esquema 6).

Esquema 6. Reação de RCE de (*R,S*)-haloidrinas (**2b-e**) po FS-LPF

3.13. Síntese dos (*S*)-epóxidos (**4a-c**)

Conforme descrito por Annika *et al.*²⁶ em um balão de 5 mL foi adicionado EtOH (1 mL), H₂O (500 µL), LiOH (26 mg, 1,1 mmol) e os correspondentes (*S*)-acetatos **3a-d**. A reação permaneceu em agitação magnética por 1 h à temperatura

ambiente. O excesso de EtOH foi removido por rotaevaporação à pressão reduzida e uma solução de NaHCO₃ (3 mL, 6 eq.) e NaCl (5 mL) foram adicionados. Os compostos foram extraídos com éter dietílico (3 x 25 mL), a fase orgânica foi combinada, seca com Na₂SO₄ anidro e filtrada. O solvente foi removido por rotaevaporação à pressão reduzida. Os produtos (S)-**3a-d** foram purificados por cromatografia em coluna em sílica *flash* eluída com hexano e acetato de etila (9:1) (Esquema 7).

Esquema 7. Reação de epoxidação a partir do (S)-éster **3a-d**

3.14. Síntese do (S)-1-(4-clorofenil)-2-(1*H*-imidazol-1-il)etan-1-ol (**5**)

Em um frasco *vial* (3 mL) foi adicionado o 1,3-imidazol (100 mg, 1.5 mmol), o (S)-**3d** (60 mg, 0,39 mmol) e 1,4-dioxano (500 µL). A reação permaneceu em agitação magnética por 24 h a 100 °C. Em seguida o solvente foi removido por rotaevaporação à pressão reduzida. O produto de interesse foi purificado por cromatografia em coluna *flash* eluída com MeOH e AcOEt (0,5:9,5).¹⁶⁸ A reação forneceu 52 mg do produto (S)-**4** isolado como um sólido branco, cujo rendimento foi de 60% (Esquema 8).

Esquema 8. Síntese do (S)-1-(4-clorofenil)-2-(1H-imidazol-1-il)etan-1-ol (**5**)

3.15. Resolução cinética enzimática do (R,S)-2f-m por FA-LPf (Método 2)

Em um frasco *vial* (3 mL) foi adicionado o solvente (1 mL), acetato de vinila (0,100 mL) e FA-LPf (30 mg). A reação foi mantida em agitação magnética (32°C, 300 rpm). O progresso da reação foi monitorado por análise de CG/FID ou CLAE por alíquotas retiradas do meio reacional (50 µL). A reação foi filtrada e as esferas de FA-LPf foram recolhidas, lavadas com hexano (3 x 1 mL) e armazenadas para posterior reuso. Os compostos orgânicos foram extraídos com acetato de etila (3 x 15 mL). A fase orgânica foi combinada, seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente foi removido por rotaevaporação à pressão reduzida. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna por sílica *flash* eluída com uma mistura de hexano e acetato de etila (8:2) (Esquema 9).

Esquema 9. Resolução cinética enzimática do (R,S)-2f-m por FA-LPF

3.16. Reuso do biocatalisador

Após a resolução cinética da (*R,S*)-**1a** a enzima (imobilizada) foi recuperada por filtração simples e lavada com hexano (3 x 1 mL). As reações consecutivas foram realizadas conforme a metodologia descrita na seção anterior (2.11 e 2.15).

3.17. Análise por microscopia eletrônica de varredura do biocatalisador imobilizado nas esferas de fibroína e alginato

As esferas foram secas em dessecador e revestidas por pulverização catódica (*sputtering*). As imagens digitalizadas foram obtidas com aumentos que variaram de 70 a 21000 vezes em um microscópio eletrônico de varredura (Leica-Zeiss LEO modelo 440 SEM) operando na tensão de 20 kV. Estas análises foram realizadas na CAQI – IQSC.

3.18. Dados espectroscópicos

3.18.1. 2-cloro-1-feniletanol (2a)

C_8H_9ClO , $156.03 \text{ g.mol}^{-1}$. **Rendimento** 0,032 g (81%); óleo amarelado; **RMN 1H** (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 3,71 (dd, $J = 11,7$ e $4,6$ Hz, 1H), 3,78 (dd, $J = 11,7$ e $8,0$ Hz, 1H), 5,95 (dd, $J = 8,0$ e $4,6$ Hz, 1H), 7,37 – 7,32 (m, 5H); **RMN ^{13}C** (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 50,9, 74, 126, 128,4, 128,6, 139,9; **CG/EM** (IE, 70 eV) m/z (%): 156 (11), 107 (100), 79 (77), 51 (17); **IV** ν_{max} (cm^{-1}): 3404, 2956, 1494, 1064, 725.

3.18.2. 2-bromo-1-feniletanol (2b)

C_8H_9BrO , $199.98 \text{ g.mol}^{-1}$. **Rendimento** 0,044 g (89%); óleo amarelado; **RMN 1H** (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 1,57 (s, 1H), 3,48 (dd, $J = 10,5$ e $8,8$ Hz, 1H), 3,60 (dd, $J = 10,5$ e $3,4$ Hz, 1H), 4,89 (dd, $J = 8,8$ e $3,2$ Hz, 1H), 7,25-7,46 (m, 5H); **RMN ^{13}C** (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 39,9, 73,1, 127,3, 128,8, 134,2, 138,7; **CG/EM** (EI, 70 eV) m/z (%): 200 (4), 107 (100), 79 (28), 51 (12); **IV** ν_{max} (cm^{-1}): 3398, 2954, 2926, 1429, 1454, 1377, 1068, 759.

3.18.3. 2-bromo-1-(4-bromofenil)etan-1-ol (**2c**)

$\text{C}_8\text{H}_8\text{Br}_2\text{O}$, 277,9 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. **Rendimento** 0,055 g (80%); **p.f.**: 59 °C (lit.¹⁶⁹ 69-71); **RMN** ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3,49 (dd, $J = 10, 8$ Hz, 1H), 3,61 (dd, $J = 10,5, 4$ Hz, 1H), 4,91 (m, 1H), 7,27 (d, $J = 8$ Hz), 7,51 (d, $J = 8$ Hz); **RMN** ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 39,9, 73, 122,3, 127,6, 131,7, 139,2; **CG/EM** (EI, 70 eV) m/z (%): 280 (8), 185 (100), 157 (23), 77 (75), 51 (20); **IV**_{vmax} (cm^{-1}): 3398, 2954, 2926, 1492, 1454, 1068, 759, 700.

3.18.4. 2-bromo-1-(4-clorofenil)etan-1-ol (**2d**)

$\text{C}_8\text{H}_8\text{BrClO}$, 235,51 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. **Rendimento** 0,050 g (86 %); **p.f.**: 59 °C (lit.¹⁷⁰ 61-62 °C); **RMN** ^1H (400 MHz, CHCl_3) δ (ppm): 3,50 (dd, $J = 10,4$ e 8,8 Hz, 1H), 3,61 (dd, $J = 10,5$ e 3,4 Hz, 1H), 4,91 (dt, $J = 8,6$ e 3,1, 1H), 7,28–7,39 (m, 4H); **RMN** ^{13}C (100 MHz, CHCl_3) δ (ppm): 138,7, 128,8, 127,3, 126,8, 73,0, 39,9; **CG/EM** (IE, 70 eV) m/z (%): 236 (6), 141 (100), 113 (20), 77 (54), 51 (8); **IV**_{vmax} (cm^{-1}): 3390, 2960, 2865, 1597, 1429, 1091, 833, 727, 702.

3.18.5. Acetato de 2-cloro-1-feniletila (**3a**)

$C_{10}H_{11}ClO_2$, 198,04 g.mol⁻¹. **Rendimento** 0,055 g (80%); **p.f.**: 47 °C; **RMN ¹H** (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm): 3,71 (dd, $J = 11,7$ e 4,6 Hz, 1 H), 3,78 (dd, $J = 11,7$ e 8 Hz, 1 H), 5,95 (dd, $J = 8,4$ e 4,9 Hz, 1 H), 7,48 - 7,30 (m, 5 H) ppm; **RMN ¹³C** (100 MHz, CHCl₃) δ (ppm): 20,98, 46,50, 75,0, 126,6, 128,7, 128,8, 137,1, 169,8; **CG/EM** (IE, 70 eV) m/z (%): 196 (5), 154 (35), 77 (8), 43 (100); **IV_{vmax}** (cm⁻¹): 2960, 2929, 1747, 1373, 1230, 1024, 761, 689.

3.18.6. Acetato de 2-bromo-1-feniletila (**3b**)

$C_{10}H_{11}BrO_2$, 241,99 g.mol⁻¹. **Rendimento** 0,022 g (95%); óleo amarelado; **RMN ¹H** (500 MHz, CHCl₃) δ (ppm): 7,40 – 7,28 (m, 1H), 5,05 (dd, $J = 7,5$ e 6,2 Hz, 1H), 4,46 – 4,39 (m, 2H), 2,05 (s, 3H); **RMN ¹³C** (125 MHz, CHCl₃) δ (ppm): 169,7, 136,6, 131,9, 128,3, 122,9, 74,1, 33,7, 20,9; **CG/EM** (IE, 70 eV) m/z (%): 242 (8), 198 (16), 141 (32), 103 (36), 77 (78), 40 (100); **IV_{vmax}** (cm⁻¹): 2964, 1745, 1489, 1236, 758.

3.18.7. Acetato de 2-bromo-1-(4-bromofenil)etila (**3c**)

$C_{10}H_{10}Br_2O_2$, 322,00 g.mol⁻¹. **Rendimento** 0,028 g (86%); óleo amarelado; **RMN** ¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm): 7,49 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,25 – 7,21 (m, 2H), 5,90 (dd, J = 7,6 e 5,1 Hz, 1H), 3,60 (dd, J = 10,8 e 7,7 Hz, 1H), 3,54 (dd, J = 10,8 e 5,1 Hz, 1H), 2,12 (s, 3H); **RMN** ¹³C (100 MHz, CHCl₃) δ (ppm): 169,7, 136,6, 131,9, 128,3, 122,9, 74,1, 33,7, 20,9; **CG/EM** (IE, 70 eV) m/z (%): 322 (0,3), 242 (15), 200 (31), 183 (26), 157 (6), 102 (21), 77 (23), 43 (100); **IV**_{vmax} (cm⁻¹): 2962, 2926, 1745, 1489, 1371, 1236, 1070, 1012, 821, 723.

3.18.8. Acetato de 2-bromo-1-(4-clorofenil)etila (**3d**)

$C_{10}H_{10}BrClO_2$, 277,94 g.mol⁻¹. **Rendimento** 0,021 g (75%); óleo amarelado; **RMN** ¹H (500 MHz, CHCl₃) δ (ppm): 7,34 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,28 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 5,92 (dd, J = 7,7 e 5,0 Hz, 1H), 3,60 (dd, J = 10,8 e 7,7 Hz, 1H), 3,54 (dd, J = 10,8 e 5,0 Hz, 1H), 2,12 (d, J = 2,4 Hz, 3H); **RMN** ¹³C (125 MHz, CHCl₃) δ (ppm): 169,66, 136,12, 134,70, 128,90, 128,00, 126,54, 74,07, 33,83, 20,89; **CG/EM** (IE, 70 eV) m/z (%): 278 (0,15), 196 (20), 154 (45), 137 (40), 103 (14), 77 (17), 43 (100); **IV**_{vmax} (cm⁻¹): 3032, 2964, 1745, 1492, 1373, 1238, 1091, 827.

3.18.9. *Acetato de 2-cloro-1-(4-fluorfenil)etila (3f)*

$C_{10}H_{10}ClFO_2$, 216,04 g.mol⁻¹. **Rendimento** 0,021 g (94%); óleo incolor; **RMN ¹H** (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2,11(s, 3H), 3,68 (dd, $J = 11,6$ e 4,8 Hz, 1H), 3,76 (dd, $J = 11,6$ e 7,7 Hz, 1H), 5,91(dd, $J = 7,6$ e 4,9 Hz, 1H), 7,05 (t, $J_{H-F} = 8,6$ Hz, 2H), 7,33 (dd, $J = 8,6$ e 5,3 Hz, 2H); **RMN ¹³C** (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 20,9, 46,3, 74,3, 115,6 (d, $^2J_{F-C} = 22$ Hz), 128,5 (d, $^3J_{F-C} = 9$ Hz), 133,1 (d, $^4J_{F-C} = 4$ Hz), 162,8 (d, $^1J_{F-C} = 242$ Hz), 169,7; **CG/EM** (IE, 70 eV) m/z (%): 216 (1), 180 (29), 167 (46), 164 (38), 131 (32), 129 (32), 97 (11), 44 (100); **IV_{vmax}** (cm⁻¹): 2958, 2926, 1747, 1514, 1373, 1224, 839.

3.18.10. *Acetato de 2-cloro-1-p-toluietila (3g)*

$C_{11}H_{13}ClO_2$, 212,06 g.mol⁻¹. **Rendimento** 0,020 g (95%); óleo incolor; **RMN ¹H** (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2,14 (s, 3 H) 2,36 (s, 3 H) 3,69 - 3,74 (m, 1 H) 3,77-3,83 (m, 1 H), 5,94 (dd, $J = 8,19$ e 4,52 Hz, 1 H) 7,17-7,22 (m, 2 H), 7,26-7,27 (m, 2 H); **RMN ¹³C** (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 21,0, 21,1, 46,5, 75, 126,6, 129,4, 134,2, 138,7, 169,9; **CG/EM** (IE, 70 eV) m/z (%): 212 (0,5), 176 (34), 134 (85), 121 (100), 93 (32), 77 (12), 43 (58); **IV_{vmax}** (cm⁻¹): 2949, 1720, 1402, 1263, 1014, 889.

3.18.11. (E)- acetato de 1-cloro-4-fenilbut-3-en-2-ila (**3i**)

$C_{12}H_{13}ClO_2$, 224,06 g.mol⁻¹. **Rendimento** 0,018 g (82%); óleo amarelado; **RMN** ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2,15 (s, 1 H) 3,71 (dd, $J = 5,75$ e $2,57$ Hz, 2 H), 5,54 - 5,71 (m, 1 H) 5,61 - 5,67 (m, 1 H) 6,18 (dd, $J = 15,89$ e $7,09$ Hz, 1 H), 6,73 (d, $J = 15,89$ Hz, 1 H), 7,26 - 7,31 (m, 1 H), 7,34 (t, $J = 7,34$ Hz, 1 H) 7,38 - 7,4 (m, 1 H). **RMN** ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 21,1, 45,6, 73,6, 123,6, 126,7, 128,4, 128,6, 134,8, 135,7, 169,8; **CG/EM** (IE, 70 eV) m/z (%): 224 (2), 188 (25), 146 (100), 133 (70), 105 (23), 77 (17), 43 (53); **IV**_{vmax} (cm⁻¹): 3028, 2960, 1743, 1699, 1230, 1028, 756.

3.18.12. Acetato de 2-cloro-1-(4-nitrofenil)etila (**3j**)

$C_{10}H_{10}ClNO_4$, 243,03 g.mol⁻¹. **Rendimento** 0,020 g (84%); **p.f.**: 108 °C; **RMN** ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2,18 (s, 3 H) 3,74 - 3,79 (m, 1 H) 3,79 - 3,83 (m, 1 H) 6,02 (dd, $J = 6,36$ e $5,38$ Hz, 1 H) 7,55 (d, $J = 8,5$ Hz, 2 H) 8,23 - 8,27 (m, 2 H); **RMN** ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 20,8, 45,8, 73,8, 123,9, 127,6, 144,6, 148,1, 169,6; **CG/EM** (IE, 70 eV) m/z (%): 243 (0,02), 207 (8), 194 (6), 165 (13), 102 (5), 77 (6), 43 (100); **IV**_{vmax} (cm⁻¹): 2960, 1747, 1517, 1342, 1222, 732.

3.18.13. *Acetato-1-clorooctan-2-ila* (**3k**)

$C_{10}H_{19}ClO_2$, 206,11 g.mol⁻¹. **Rendimento** 0,019 g (92%); óleo amarelado; **RMN ¹H** (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0,89 (t, J = 6,91 Hz, 3 H), 1,23-1,36 (m, 10 H), 1,63-1,70 (m, 2 H), 2,09 (s, 3 H), 3,56 (dd, J = 11,62 e 5,50 Hz, 1 H) 3,63 (dd, J = 11,74 4,40 Hz, 1 H) 5,01-5,06 (m, 1 H); **RMN ¹³C** (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 14, 20,9, 22,5, 24,9, 28,9, 31,5, 31,6, 45,7, 72,9, 170,5; **CG/EM** (IE, 70 eV) m/z (%): 207 (0,1), 157 (2), 97 (34), 81 (8), 70 (11), 43(100); **IV_{vmax}** (cm⁻¹): 2956, 2929, 2858, 1745, 1373, 1236, 1033.

3.18.14. *Acetato de 2-cloro-1-(3,4-dimetoxifenil)etila* (**3l**)

$C_{12}H_{15}ClO_4$, 258,07 g.mol⁻¹. **Rendimento** 0,024 g (94%); óleo amarelado; **RMN ¹H** (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2,14 (s, 3 H), 3,68 - 3,75 (m, 1 H), 3,77 - 3,83 (m, 1 H), 3,89 (s, 3 H), 3,91 (s, 3 H), 5,92 (dd, J = 8,31 e 4,52 Hz, 1 H), 6,85 - 6,90 (m, 2 H), 6,92 - 6,97 (m, 1 H); **RMN ¹³C** (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 21, 46,4, 55,9, 55,9, 75, 109,8, 111,1, 119,2, 129,6, 149,1, 149,5, 169,9; **CG/EM** (IE, 70 eV) m/z (%): 258 (23), 222 (30), 180 (90), 167 (100), 139 (62), 77 (20), 43 (48); **IV_{vmax}** (cm⁻¹): 2991, 1485, 1348, 1130, 1002, 825.

3.18.15. 2-feniloxirano (**4a**)

C_8H_8O , 120,06 g.mol⁻¹. **Rendimento** 0,015 g (95%); óleo incolor; **RMN** ¹H (500 MHz, CHCl₃) δ (ppm): 2,82 (dd, $J = 5,5$ e 2,6 Hz, 1H), 3,17 (dd, $J = 5,5$, 4,1 Hz, 1H), 3,88 (dd, $J = 4,0$ e 2,6 Hz, 1H), 7,55 – 7,13 (m, 5H); **RMN** ¹³C (125 MHz, CHCl₃) δ (ppm): 137,6 (s), 128,5, 128,1, 125,5, 52,3, 51,1; **CG/EM** (IE, 70 eV) m/z (%): 120 (43), 119 (67), 91 (100), 77 (10), 51 (20); **IV**_{vmax} (cm⁻¹): 2913, 1495, 1453, 876, 760.

3.18.16. 2-(4-bromofenil)oxirano (**4b**)

C_8H_7BrO , 197,07 g.mol⁻¹. **Rendimento** 0,010 g (98%); óleo amarelado; **RMN** ¹H (500 MHz, CHCl₃) δ (ppm): 2,75 (dd, $J = 5,4$ e 2,5 Hz, 1H); 3,14 (dd, $J = 5,3$ e 4,2 Hz, 1H), 3,84 – 3,81 (m, 1H), 7,15 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,47 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H); **RMN** ¹³C (125 MHz, CHCl₃) δ (ppm): 51,2, 58,8, 122, 127, 131, 137; **CG/EM** (IE, 70 eV) m/z (%): 198 (13), 169 (20), 119 (55), 89 (100), 77 (7), 63 (32); **IV**_{vmax} (cm⁻¹): 2958, 1745, 1517, 1230, 1026.

3.18.17. 2-(4-clorofenil)oxirano (**4c**)

C_8H_7ClO , 154,07 g.mol⁻¹. **Rendimento** 0,012 g (95%); óleo incolor; **RMN** ¹H (500 MHz, CHCl₃) δ (ppm): 7,30 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 7,19 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 3,82 (dd, *J* = 3,7 e 2,8 Hz, 1H), 3,13 (dd, *J* = 5,4 e 4,1 Hz, 1H), 2,73 (dd, *J* = 5,4 e 2,5 Hz, 1H) ppm; **RMN** ¹³C (125 MHz, CHCl₃) δ (ppm): 136,1, 133,9, 128,7, 126,8, 51,7, 51,2 ppm; **CG/EM** (IE, 70 eV) *m/z* (%): 154 (23), 119 (69), 89 (100), 63 (20); **IV**_{vmax} (cm⁻¹): 2927, 2854, 1215, 759.

3.18.18. (S)-1-(4-clorofenil)-2-(1H-imidazol-1-il)etanol (**5**)

$C_{11}H_{11}ClN_2O$, 222,06 g.mol⁻¹. **Rendimento** 0,052 g (60%); **p.f.**: 185-186 °C (lit.¹⁷¹ 160-164); $[\alpha]^{25}_D = + 2,5$ (c 1,0 g/100 mL, CHCl₃); **RMN** ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 4,14 (dd, *J* = 14,1 e 6,9 Hz, 1H), 4,21 (dd, *J* = 14,1 e 4,4 Hz, 1H), 7,46 (s, 1H), 4,91 (dd, *J* = 6,9 e 4,5 Hz, 1H), 7,03 (t, *J* = 1,3 Hz, 1H), 6,88 (s, 1H), 7,34-7,22 (m, 4H); **RMN** ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 141,8, 139, 134,5, 129,4, 128,7, 128,4, 121,5, 73,4, 55; **CG/EM** (IE, 70 eV) *m/z* (%): 222 (5), 141 (19), 113 (13), 82 (100), 77 (40), 51 (7); **IV**_{vmax} (cm⁻¹) = 3116, 2929, 2856, 1514, 1408, 1072, 748, 661.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Triagem de lipases na resolução cinética de haloidrinas

Um dos aspectos importantes de viabilidade na síntese quimioenzimática é a reutilização do biocatalisador em reações sucessivas. No entanto, a disponibilidade comercial desses biocatalisadores imobilizados em alguns casos é restrita. Assim se faz necessário estudar novos materiais como suportes enzimáticos capazes de prolongar a atividade da enzima por vários ciclos consecutivos.

Inicialmente foi realizado a otimização das condições de análises cromatográficas em CG/FID por coluna quiral para obtenção da separação enantiomérica dos padrões racêmicos dos álcoois **2a-l** e os acetatos **3a-l**.

Após otimização das condições de análise dos padrões racêmicos (*R,S*)-**2a-l**, iniciaram-se os estudos de resolução cinética enzimática com a otimização da reação assimétrica do (*R,S*)-2-cloro-1-feniletanol (**2a**) e do (*R,S*)-2-bromo-1-feniletanol (**2b**) por diferentes lipases, com o objetivo de encontrar a lipase capaz de transformar os álcoois **2a-b** em maiores quantidades aos respectivos acetatos **3a-b**. As condições reacionais utilizadas inicialmente foram baseadas em trabalhos já descritos na literatura.^{172; 173} Foi selecionado o acetato de vinila como dador do grupo acila, pois é amplamente utilizado com sucesso em resolução cinética enzimática de álcoois secundários, *n*-hexano como solvente em agitação orbital (32 °C, 130 rpm).^{172; 173} Na Tabela 1 e Figura 7 encontram-se os resultados para esse estudo.

Tabela 1. Triagem de lipases na resolução cinética do (*R,S*)-2-cloro-1-feniletanol **1a** e do (*R,S*)-2-cloro-1-feniletanol **2a-b**^a

Reação	Lipase	X	Tempo (h)	<i>c</i> ^b (%)	<i>ee</i> _p ^c (3)	<i>ee</i> _s ^c (2)	<i>E</i> ^d
1	<i>Candida cylindracea</i>	Cl	24	14	53	9	3,5
2		Cl	48	17	73	15	7,4
3		Br	24	23	54	16	3,9
4		Br	48	36	48	27	3,7
5	<i>Rhizopus niveus</i>	Cl	24	Nr	-	-	-
6		Cl	48	Nr	-	-	-
7		Br	24	Nr	-	-	-
8		Br	48	Nr	-	-	-
9	<i>Aspergillus niger</i>	Cl	24	3	14	0,5	7
10		Cl	48	18	51	11	3,4
11		Br	24	4	12	0,5	1,3
12		Br	48	10	12	1	1,4
13	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Cl	24	28	98	38	144
14		Cl	48	35	98	53	168
15		Br	24	35	96	52	82
16		Br	48	48	92	88	70

^aCondição geral: substrato (0,10 mmol), lipase (20 mg), acetato de vinila (0,35 mol, 0,030 mg), *n*-hexano (1 mL). ^bDeterminado por análise em coluna quiral GC-FID. ^cConversão: $c = ee_s / (ee_s + ee_p)$. ^d $E = \ln[ee_p(1 - ee_s)] / (ee_p + ee_s) / \ln[ee_p(1 + ee_s)] / (ee_p + ee_s)$. Nr: não reagiu.

Observou-se que a lipase de *Candida cylindracea* exibiu uma baixa conversão ($c = 17\%$) e moderada seletividade ($ee = 73\%$) para o acetato (*S*)-**3a** em 48 h de reação (reação 2, Tabela 1). Já o acetato (*S*)-**3b** apresentou moderada conversão ($c = 36\%$) e baixa seletividade ($ee = 48\%$) em 48 h de reação (reação 4, Tabela 1) para a lipase de *Candida cylindracea*.

A lipase de *Rhizopus niveus* não apresentou atividade na RCE para ambas os álcoois (*R,S*)-**2a-b** (32 °C, 130 rpm por 48 h). Ao utilizar a lipase de *Aspergillus niger* o acetato (*S*)-**3a** foi formado com baixa conversão ($c = 18\%$) e baixa seletividade ($ee =$

51%) em 48 h de reação (reação 10, Tabela 1). Já a RCE do *(R,S)*-**2b** por lipase de *Aspergillus niger* rendeu o acetato *(S)*-**3b** com 10% de conversão e apenas 12% de excesso enantiomérico.

O maior valor de conversão e de excesso enantiomérico entre as lipases utilizadas foi obtido para a lipase de *Pseudomonas fluorescens* em 48 h de reação (32 °C, 130 rpm) que produziu o acetato *(S)*-**3a** com uma excelente pureza enantiomérica (*ee* = 98%), conversão de 35% e seletividade de *E* = 168 (reação 14, Tabela 1). Já o acetato *(S)*-**3b** foi obtido com alta conversão (*c* = 48%) e com 92% de pureza enantiomérica (reação 16, Tabela 1).

Figura 7. Cromatogramas obtidos por CG/FID na RCE da *(R,S)*-**2a** por lipases livres (48 h, 132 rpm, 32°C). (A) Padrão racêmico da *(R,S)*-**2a**. (B) Padrão racêmico do *(R,S)*-**3a**. (C) RCE por *C. cylindracea*. (D) RCE por *R. niveus*. (E) RCE por *A. niger*. (F) RCE por *P. fluorescens*.

O produto acetilado (*S*)-**3a** foi purificado por CC e analisado por espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C em CDCl_3 . O conjunto de hidrogênios **H1** é referente a um singlete em 2,13 ppm. Já o conjunto de sinais **H2** aparecem como um duplo duplete em 3,71 ppm ($J = 11,7$ e 4,6 Hz) referente ao hidrogênio do grupo $-\text{CH}_2$ e o outro duplo duplete caindo em campo menor em 3,78 ppm ($J = 11,7$ e 8 Hz) também é atribuído ao conjunto de hidrogênio do grupo $-\text{CH}_2$. O conjunto em 5,95 ppm aparecem como um duplo duplete ($J = 8,4$ e 4,9 Hz) referente ao hidrogênio benzílico $-\text{CH}-$ (**3**) e o conjunto de hidrogênios é um mutipletos entre 7,48-7,30 ppm (**4**) (Figura 8).

Figura 8. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da cloroidrina acetilada (*S*)-**2a** por *P. fluorescens* livre.

4.2. Caracterização das esferas de FS-LPF (método 1)

Através dos resultados obtidos no estudo anterior, ficou estabelecido que a lipase de *P. fluorescens* seria imobilizada em esferas de biopolímeros constituídos por

fibroína da seda com intuito de prolongar a atividade enzimática durante o processo de reuso consecutivo do biocatalisador.

Devido a facilidade do método por adsorção física, utilizado até mesmo na CAL-B (Novozyme 435[®]), esse método foi escolhido inicialmente para a imobilização da lipase de *P. fluorescens* em FS. Este método foi apropriado para o propósito do trabalho, pois permitiu a criação de um catalisador heterogêneo viável no meio reacional, proveniente de organismo vivo e biodegradável.

As esferas de FS obtidas por borrifamento em N₂ (conforme descrito na seção experimental 2.8.3.) foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura. Observou-se que as partículas de fibroína resultaram em esferas de superfícies irregulares, tal fato pode ser relacionado com a presença de proteínas do tipo folha- β preguiada na FS ou ao congelamento imediato na solução em N₂. Por análise de microscopia de varredura eletrônica não foi possível observar nenhuma mudança estrutural do material de fibroína na presença e na ausência da lipase de *P. fluorescens*. No entanto, as esferas de fibroína produzidas apresentaram cavidades, o que as torna interessantes do ponto de vista biotecnológico, uma vez que a lipase de *P. fluorescens* pode ser aprisionada/aderida ao biopolímero de forma mais efetiva (Figura 9).

Figura 9. Micrografia eletrônica de varredura de esferas da FS-PLFem (A) 400x e (B) 5000x de ampliação.

As esferas de FS e as esferas de FS-LPf também foram caracterizadas por análise termogravimétrica (DTG). Segundo os termogramas, ambas as amostras apresentaram alta similaridade de decomposição térmica.

No termograma **A**, com o aumento da temperatura a amostra apresentou um momento de decomposição térmica próximo de 295 °C, relacionado a decomposição dos grupos de aminoácidos presentes na FS.

Vale ressaltar que fibras bem orientadas normalmente apresentam pico de decomposição térmica acima de 300 °C, em contraste materiais de fibroína com configuração folha- β não orientada tendem a apresentar decomposição térmica próxima a 290 °C. Resultado semelhante foi observado em trabalhos realizados por [Weska et al.](#)¹⁷⁴ em amostras de FS.

Observa-se no termograma **B**, as esferas de FS contendo a lipase de *P. fluorescens* adsorvida fisicamente, além da decomposição em 295 °C a amostra também apresentou uma perda de massa em 285 °C evidenciando a presença da lipase de *P. fluorescens* na FS (Figura 10).

Também é importante ressaltar que as esferas de FS analisadas foram congeladas em N₂ e liofilizadas, o que pode ter ocasionado formação de mais estruturas folha- β pregueada através da desitração das cadeias moleculares da fibroína da seda.

Figura 10. Análise termogravimétrica (DSC) da esfera de: (A) FS (—). (B) FS-LPF (—)

4.3. Resolução cinética enzimática de halodrinas por diferentes quantidades de FS-LPF

A resolução cinética enzimática do (*R,S*)-**2a** também foi realizada com diferentes quantidades de FS-LPF (50, 100 e 150 mg) em agitação orbital por 24 h. O (*S*)-**3a** foi produzido com baixa taxa de conversão (6%, 10% e 12%, respectivamente), no entanto, com alta enantiosseletividade ($E > 200$) em todos os casos. A reação contendo 100 mg de FS-LPF foi prolongada a 48 e 72 h de agitação orbital (32 °C, 132 rpm). Em 48 h a conversão para o (*S*)-**3a** foi de 26% e 99% de excesso enantiomérico com excelente enantiosseletividade ($E > 200$). Em 72 h ocorreu um aumento na conversão para o acetato (*S*)-**3a** (39%), porém foi observado um leve decréscimo no excesso enantiomérico (98%) para o acetato (*S*)-**3a**. A diminuição no valor de excesso enantiomérico do (*S*)-**3a** pode estar relacionada com o processo de dessorção da enzima ao suporte de fibroína, disponibilizando enzimas livres ao meio reacional.

Nota-se que o material FS-LPF apresentou maior enantiosseletividade para a obtenção do acetato (*S*)-**3a** pela reação de transesterificação em comparação aos valores relacionados a lipase livre. A razão enantiomérica para esta resolução em 48 h foi de E

>200 (reação 1, Tabela 2), um aumento significativo frente a razão calculada para lipase de *P. fluorescens* livre $E = 168$ (reação 14, Tabela 2) e no tempo de 72 h a reação contendo a FS-LPF atingiu uma boa conversão de 62% para o (S)-**3a**, porém um leve decréscimo da razão enantiomérica ($E = 187$) foi observado. A FS pode contribuir com alterações na conformação da enzima, favorecendo a ligação preferencial do *S*-enantiômero ao sítio ativo da enzima. Porém, a taxa de conversão para o acetato (S)-**3a** na reação contendo a enzima livre foi maior quando comparado ao uso da FS-LPF. A enzima quando imobilizada catalisou de maneira mais lenta devido à barreira existente entre o biocatalisador e o substrato disponível (Tabela 2 e Figura 11). No entanto, reações de RCE de compostos α -halogenados em geral ocorrem em tempos muito longos.

Tabela 2. Resolução cinética do (*R,S*)-2-cloro-1-(fenil)etanol (**1a**) por esferas de FS-LPF^a.

ClCC(O)c1ccccc1 (R,S)-**2a** + CC(=O)OC=C (vinyl acetate) $\xrightarrow[\text{FS-LPF}]{\text{tempo (h), 32 }^{\circ}\text{C, 130 rpm, n-hexano}}$ ClCC(OC(=O)C)c1ccccc1 (S)-**3a** + ClCC(O)c1ccccc1 (R)-**2a**

Reação	Massa de FS-LPF (mg)	Tempo (h)	c^b (%)	ee_p^c (%) (S)- 3a	ee_s^c (%) (R)- 2a	E^d
1	50	24	6	99	10	>200
2	100	24	10	99	11	>200
3	150	24	12	99	14	>200
4	100	48	26	99	34	>200
5	100	72	39	98	62	187

^aCondição geral: (*R,S*)-2-cloro-1-(fenil)etanol (**1a**) (0,12 mmol, 20 mg), acetato de vinila 25 μ L (0,25 mmol), *n*-hexano (1 mL), 32 $^{\circ}$ C, 130 rpm. ^bConversão: $c = ee_S/(ee_S + ee_P)$. ^c ee : excesso enantiomérico. ^d $E = \ln[ee_P(1 - ee_S)]/(ee_P + ee_S)/\ln[ee_P(1 + ee_S)]/(ee_P + ee_S)$.

Figura 11. Cromatogramas obtidos por CG/FID da resolução enzimática da (*R,S*)-**2a** pela FS-LPF em diferentes concentrações (a) 50 mg em 24 h (b) 150 mg em 24 h (c) 100 mg em 72 h.

Condições de análises em CG-FID: $T_i=120\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f=165\text{ }^{\circ}\text{C}$ (8 min), $r = 2\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_c = 32,5\text{ min}$. t_r (*R*)-**1a** = 20,3 min; t_r (*S*)-**2a** = 16,4 min.

A fibroína da seda é um material proteico com alto peso molecular (cerca de 390 kDa), entre os aminoácidos mais comuns estão a glicina, alanina e serina (Figura 12) o que deixa com alto caráter hidrofóbico. Portanto, foi realizado a reação controle, nas

mesmas condições da reação 5 (Tabela 2) na ausência da lipase de *P. fluorescens*. Como pode ser observado através do cromatograma da reação de transesterificação enantiosseletiva da (*R,S*)-**2a** catalisada por FS-LPF não produziu o acetato (*S*)-**3a**. Conclui-se que a FS na reação cinética enzimática do álcool (*R,S*)-**2a** atua apenas como suporte para a lipase de *P. fluorescens* (Figura 13).

Figura 12. Estrutura química dos principais aminoácidos presentes na fibroína da seda.

Figura 13. Cromatogramas obtidos por CG/FID. (A) Padrão racêmico da (*R,S*)-**2a**. (B) Padrão racêmico do (*R,S*)-**3a**. (C) Resolução enzimática da (*R,S*)-**2a** pela FS na ausência da lipase de *P. fluorescens*.

4.4. Resolução cinética enzimática de haloidrinas por FS-LPF

Diante dos resultados obtidos pela lipase de *P. fluorescens* imobilizada em esfera de FSA e tendo estabelecido um processo eficiente na resolução de haloidrina (*R,S*)-**2a-b** a reação de resolução cinética enzimática com FS-LPF foi estendida a outros substratos racêmicos (*R,S*)-**2c-e**, contendo diferentes substituintes no anel aromático.

A resolução enzimática do (*R,S*)-2-bromo-1-(4-bromofenil)etanol (**1c**) com esferas de FS-LPF, produziu o acetato (*S*)-**2c** com 35% de conversão e >99% de excesso enantiomérico (reação 3, Tabela 3 e Figura 14). Para o composto (*R,S*)-**2d**, contendo um átomo de cloro *para* substituído, o acetato (*S*)-**3d** foi formado com menor valor de conversão (24%), porém o excesso enantiomérico também foi de 99% (reação 4, Tabela 3).

Apesar do composto (*R,S*)-**2c** possuir maior volume molecular que o composto (*R,S*)-**2d**, o encaixe do sítio ativo da lipase de *P. fluorescens* ao substrato (*R,S*)-**1c** foi favorecido. Já para o composto (*R,S*)-**2e**, contendo átomos de cloro *orto* e *para* substituídos, a reação de transesterificação quimioenzimática na formação do (*R,S*)-**2e** não ocorreu, mesmo no tempo de 120 h de agitação orbital (reação 5, Tabela 3). O efeito estérico provocado pelo átomo de cloro na posição *orto* desfavoreceu a ligação do substrato (*R,S*)-**2e** ao sítio ativo da enzima causando um efeito negativo à reação de resolução. Efeito semelhante foi observado no trabalho de Xu, *et al.*¹⁷⁵ onde a enzima carbonil-redutase *Kluyveromyces thermotolerans* apresentou menor atividade na presença de átomos de cloro *orto* substituídos que em relação aos *para* substituídos em derivados da α -cloroacetofenona.

Tabela 3. Resolução cinética de haloidrinas racêmicas **2a-e** por esferas de FS-LPF.

Reação	Substrato	Tempo (h)	c^a (%)	ee_p^b (%) (S)- 3	ee_s^b (%) (R)- 2	E^c
1	 (R,S)- 2a	72	39	98	62	187
2	 (R,S)- 2b	96	19	98	23	120
3	 (R,S)- 2c	96	35	99	55	>200
4	 (R,S)- 2d	96	24	99	32	>200
5	 (R,S)- 2e	120	Nc	(-)	(-)	(-)

^aCondição geral: (R,S)-haloidrina (**2a-e**) (60 mg), FS-LPF (450 mg) acetato de vinila 25 μ L (0,25 mmol), *n*-hexano (2 mL), 32 $^\circ$ C, 130 rpm. ^bConversão: $c = ee_s/(ee_s + ee_p)$. ^c*ee*: excesso enantiomérico. ^d $E = \ln[ee_p(1 - ee_s)]/(ee_p + ee_s)/\ln[ee_p(1 + ee_s)]/(ee_p + ee_s)$. Nc = Não Converteu.

Figura 14. Cromatogramas obtidos por CG/FID. (A) Padrão racêmico da (*R,S*)-**2c**. (B) Padrão racêmico do (*R,S*)-**3c**. (C) Resolução enzimática da (*R,S*)-**2c** pela FS-LPF

As cloridrinas enantiopuras da Tabela 4 são precursores importantes para obtenção de epóxidos quirais. Para demonstrar a versatilidade das haloidrinas enantiopuras, obtidas via imobilização da lipase de *P. fluorescens* em FS, os acetatos (*S*)-**3a-d** foram transformados em óxidos de estirenos com elevados excessos enantioméricos e altos rendimentos (Tabela 4). As Figuras 15 e 16 apresentam os

Figura 15. Cromatograma obtido por CG/FID. (A) Oxirano enantiopuro (*S*)-**4b**. (B) Oxirano racêmico (*R,S*)-**4b**.

Figura 16. Cromatograma obtido por CG/FID. (A) Oxirano racêmico (*R,S*)-**4c**. (B) Oxirano enantiopuro (*S*)-**4c**.

Esquema 10. Exemplos de aplicações sintéticas de epóxido quiral partindo da (*S*)-cloridrina **2a**.

A partir da obtenção do oxirano (*S*)-**4d** decidiu-se sintetizar um intermediário chave na síntese de análogos de agentes antifúngicos. A reação ocorreu com o epóxido (*S*)-**4d**, imidazol (1,5 mmol) em dioxano, em agitação magnética por 24 h a 100 °C. Após purificação por cromatografia em coluna *flash* por sílica gel eluída com MeOH e AcOEt (05:9,5) o composto (*S*)-**5** foi obtido como sólido branco em 60% de rendimento (52 mg) (Esquema 11).

Esquema 11. Síntese do intermediário chave na obtenção de agentes microbianos enantiopuros.

O azol (*S*)-**5** foi caracterizado por espectroscopia de RMN ¹H e RMN ¹³C (Figura 17 e Tabela 5), os dados espectroscópicos de RMN ¹³C foram comparados aos

dados descritos na literatura. Observa-se pelo o espectro de RMN ^{13}C os sinais em 120,1; 127,0 e 140,4 ppm, característicos de carbonos imidazólicos (a, b e c) respectivamente, e no espectro de infravermelho a banda em 3113 cm^{-1} atribuída ao estiramento C-N. A preparação do (*S*)-1-(4-clorofenil)-2-(1*H*-imidazol-1-il)etan-1-ol (**5**) a partir da FS-LPF contribui para a obtenção das cloridrinas enantiopuras como bloco de construção na preparação de moléculas bioativas. Destacamos também a presença da estrutura do composto **5** em alguns agentes antifúngicos tais como miconazol, isoconazol e econazol (Figura 18), apesar de comercializados na forma racêmica, a avaliação biológica dos racematos e das espécies enantiopuras apresentam diferenças consideráveis para o enantiomêro *S*.¹⁶⁸

Figura 17. Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 500 MHz) do (*S*)-1-(4-clorofenil)-2-(1*H*-imidazol-1-il)etan-1-ol (**5**)

Tabela 5. Comparação entre os valores de $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) experimentais e os descritos na literatura para o álcool **5**.¹⁴⁷

$\delta^{13}\text{C}$ Observado (ppm) (125 MHz, CD_3OD)	$\delta^{13}\text{C}$ Literatura (ppm) (100 MHz, DMSO_{d6}) ¹⁴⁷
140,4	141,6
137,6	137,7
133,1	131,8
128,0	128,0
127,3	127,9
127,0	127,8
120,1	120,0
72,0	71,3
53,6	53,3

Figura 18. Substâncias que apresentam o bloco químico do composto **5**

Pode-se notar que este método de imobilização da lipase de *P. fluorescens* em esfera de fibroína da seda foi propício para a estabilização da enzima na reação de RCE de diferentes cloridrinas, algumas cloridrinas levam a interessantes moléculas com ações biológicas.

4.5. Reutilização da lipase de *P. fluorescens* imobilizada em FS-LPF

A reciclagem do biocatalisador é outro parâmetro importante em escala industrial, consequentemente leva a redução de custos operacionais.

Para avaliar o potencial de reuso consecutivo da lipase imobilizada nas esferas de fibroína da seda, o biomaterial contendo a lipase imobilizada foi recolhido por filtração e reutilizado em condições similares. A Figura 19 apresenta resumidamente os dados obtidos para o processo de reciclagem da FS-LPF na reação de RCE do (*R,S*)-**2a** por 5 ciclos. No primeiro reuso a enzima imobilizada manteve sua capacidade catalítica em 56% do valor inicial de conversão. No terceiro ciclo a taxa de conversão para o (*S*)-**3a** foi de 21% o que correspondeu a 53% da atividade inicial. No entanto, houve uma elevada queda de atividade no quinto ciclo, apenas 12% da capacidade inicial ($c = 5\%$). Os valores de excesso enantiomérico do produto (*S*)-**3a** sofreram baixa interferência ao longo da reutilização da enzima. O excesso enantiomérico que foi de 98% na primeira reação passou para 97% a partir da terceira reação consecutiva e permanecendo estável ao quinto ciclo reacional.

Como a lipase de *P. fluorescens* estava apenas adsorvida na esfera de fibroína, pode-se concluir que um processo de dessorção da enzima durante a reação nos repetidos ciclos ou a inibição natural da atividade enzimática provocada pela exposição do sítio ativo da enzima ao solvente orgânico ou a lavagem com hexano, os substratos e temperatura, diminui a atividade catalítica do biocatalisador disponível para a reação.

Figura 19. Reuso da FS-LPF na resolução do (*R,S*)-2-cloro-1-feniletanol (**1a**). Conversão (■), excesso enantiomérico do acetato (*S*)-**3a** (*).

A configuração absoluta dos acetatos (**2a-e**) foi designada com sendo *S*-configuração, em comparação com os valores de rotação óptica descritos na literatura. É possível relacionar a enantiosseletividade da lipase pela estereoquímica *S* na reação de esterificação de halodrinas. Os valores de rotação óptica para os produtos enantiopuros obtidos foram medidos e comparados com os dados da literatura (Tabela 6).

Tabela 6. Valores de rotação óptica para os produtos enantiopuros obtidos pela lipase de *P. fluorescens* immobilizada em esferas de FS-LPF comparados com os dados da literatura.

Compostos	$[\alpha]_D^T = \text{experimental}$	$[\alpha]_D^T = \text{literatura}$
(R)-2a	$[\alpha]_D^{26} = -39,2$ (<i>c</i> 1,0 g/100 mL, CHCl ₃) ^a	$[\alpha]_D^{20} = -45,1$ (<i>c</i> 1,0 g/100 mL, CHCl ₃) ¹⁸³
(R)-2b	$[\alpha]_D^{26} = -16,2$ (<i>c</i> 0,8 g/100 mL, CHCl ₃) ^a	$[\alpha]_D^{20} = -39,5$ (<i>c</i> 0,5 g/100 mL, CHCl ₃) ¹⁸⁴
(R)-2c	$[\alpha]_D^{26} = -10,8$ (<i>c</i> 1,0 g/100 mL, CHCl ₃) ^a	$[\alpha]_D^{20} = -31,8$ (<i>c</i> 2,85 g/100 mL, CHCl ₃) ¹⁸⁵
(R)-2d	$[\alpha]_D^{26} = -31,2$ (<i>c</i> 1,1 g/100 mL, CHCl ₃) ^a	$[\alpha]_D^{20} = -59,5$ (<i>c</i> 1,0 g/100 mL, CHCl ₃) ¹⁸³
(S)-3a	$[\alpha]_D^{26} = +82,40$ (<i>c</i> 1,5 g/100 mL, CHCl ₃) ^a	$[\alpha]_D^{20} = +77,7$ (<i>c</i> 1,0 g/100 mL, EtOAc) ¹⁸⁶
(S)-3b	$[\alpha]_D^{26} = +30,4$ (<i>c</i> 0,5 g/100 mL, CHCl ₃) ^a	-
(S)-3c	$[\alpha]_D^{20} = +26,7$ (<i>c</i> 2 g/100 mL, CHCl ₃) ^a	$[\alpha]_D^{25} = +56,6$ (<i>c</i> 3,4 g/100 mL, CHCl ₃) ¹⁸⁵

(S)-3d	$[\alpha]_D^{26} = + 44,7$ (c 1,0 g/100 mL, CHCl_3) ^a	$[\alpha]_D^{20} = + 38,6$ (c 1,15 g/100 mL, CHCl_3) ¹⁸⁷
(S)-4a	$[\alpha]_D^{26} = + 13,6$ (c 0,4 g/100 mL, CHCl_3) ^a	$[\alpha]_D^{24} = + 25,1$ (c 1,0 g/100 mL, CHCl_3) ¹⁸⁸
(S)-4b	$[\alpha]_D^{26} = + 11,8$ (c 0,6 g/100 mL, CHCl_3) ^a	$[\alpha]_D^{24} = + 14,6$ (c 1,0 g/100 mL, CHCl_3) ¹⁸⁸
(S)-4c	$[\alpha]_D^{25} = + 10,3$ (c 0,6 g/100 mL, CHCl_3) ^a	$[\alpha]_D^{24} = + 24,9$ (c 1,0 g/100 mL, CHCl_3) ¹⁸⁸
(S)-5	$[\alpha]_D^{25} = + 2,5$ (c 0,4 g/100 mL, CHCl_3) ^b	-

^a A rotação óptica foi medida em CHCl_3 em um polarímetro Perkin-Elmer 241 equipado com uma lâmpada de Na-589nm. ^b A rotação óptica foi medida em CHCl_3 em um polarímetro JASCO P2000 equipado com uma lâmpada de Na-589nm.

4.6. Caracterização das esferas de FA-LPF (método 2)

Além do método de absorção, a lipase de *P. fluorescens* também foi imobilizada por encapsulamento em esferas constituídas por FS e alginato de cálcio.

Vale lembrar que o processo de fabricação das esferas de FA-LPF se deu pelo gotejamento da solução de alginato-fibroína-lipase na solução de CaCl_2 de forma manual com o auxílio de uma seringa, o que provocou pequenas variações nos tamanhos das esferas. O diâmetro das esferas de FA-LPF foi de aproximadamente 2,65 mm a 2,32 mm (Figura 20), o peso variou de 0,0054 g a 0,0046 g. Nota-se entre as imagens de MEV que as esferas de FA-LPF apresentaram uma morfologia superficial

uniforme. As superfícies das esferas foram recobertas com filamentos/fibras de fibroína da seda e alginato de cálcio, assegurando maior estabilidade na matriz polimérica (Figura 21). Em 21000x de ampliação (Figura 21) nota-se que a esfera de FA-LPF contém uma superfície porosa, característica de materiais à base de alginato, a porosidade contribui para a permeabilidade e difusão do substrato/produto.

Figura 20. Medida do diâmetro externo da esfera de FS-LPF

Fonte: Autoria própria

Figura 21. Esferas de FA-LPF: Fotografia da amostra (A), MEV em (B) 70x, (C) 1000x e (D) 21000x.

A técnica de liofilização por alto vácuo pode gerar materiais com alta porosidade e interconectividade entre os poros do material. Na Figura 22, tem-se a micrografia do interior da esfera de FS-LPF através do corte transversal, nota-se a formação de poros ordenados e camadas finamente divididas, presente em todo interior da esfera. A formação de alguns poros pode ser favorecida pela liofilização da água contida no interior do biomaterial ou a combinação do conteúdo fibroso da proteína da seda (FS) com o alginato de cálcio.

Figura 22. Micrografia eletrônica de varredura da esfera de FA-LPF (corte transversal) em: (A) 50x. (B) 100x. (C) 500x. (D) 1000x.

Alginato de sódio é um polímero aniônico natural, obtido a partir de algas marrons, é amplamente utilizado em estudos biomédicos, pois apresenta baixa toxicidade, baixo custo, biocompatibilidade e a capacidade de formar um gel em adição com cátions divalentes. Neste estudo, o cloreto de cálcio foi utilizado como o agente de gelificação. As propriedades de formação de gel e espumas são as características mais valorizadas nesse biopolímero.^{189; 190; 191} No entanto, dada a natureza porosa do alginato de cálcio, a maioria dos produtos incorporados a uma matriz de alginato de cálcio podem ser liberados durante o processo catalítico.

A principal limitação do método por aprisionamento físico é que alguns substratos e produtos macromoleculares não podem ser difundidos facilmente de dentro para fora do gel. Uma maneira de superar esta limitação é a formação de misturas com outros biopolímeros, aditivos usados como estabilizadores ou pelo aprisionamento dos produtos na matriz da esfera (FS-LPF).

A espectroscopia de infravermelho também foi usada para auxiliar na caracterização das amostras de FS-LPF, FS e aginato de sódio (Figura 23). Observou-se que no espectro do aginato de sódio (Espectro A, Figura 23) os sinais em 1681 e 1529 cm^{-1} são característicos de vibrações de estiramentos assimétricos e simétricos do grupo carboxilato do sal algínico.

No espectro contendo apenas a FS (Espectro B, Figura 23), existem dois sinais característicos da proteína de fibróina da seda em 1626 cm^{-1} e 1418 cm^{-1} .^{192; 193} Respectivamente atribuídos a Amida I em conformação paralela folha- β preguiada e desdobramento de grupos $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$ de aminoácidos presentes na cadeia protéica.

A banda em 1027 cm^{-1} é atribuída aos diferentes modos de vibração da ligação carbono-nitrogênio dos amino-ácidos presentes nas cadeias laterais da proteína (Figura 23). O espectro da esfera de FA-LPF (Espectro C, Figura 23) apresentou alta semelhança com os espectros das amostras anteriores em 1626 cm^{-1} e 1418 cm^{-1} . Todas as amostras analisadas por espectroscopia de infravermelho apresentaram uma banda larga em 3377 cm^{-1} , atribuída ao estiramento vibracional de $-\text{OH}$ e/ou $-\text{NH}$.¹⁹⁴

Figura 23. Espectro no infravermelho de: (A) alginato de sódio; (B) FS e (C) esferas de FA-LPF

4.7. Resolução cinética enzimática por lipase de *P. fluorescens* livre e imobilizada (FA-LPF) em diferentes tempos reacionais

O estudo da resolução cinética enzimática do (*R,S*)-**2a** foi realizada com diferentes formas do biocatalisador. Os resultados são descritos na Tabela 6. Quando a lipase de *P. fluorescens* na forma livre foi utilizada na resolução do (*R,S*)-**2a** em agitação magnética (300 rpm, 32 °C) o acetato (*S*)-**2a** foi obtido com 29% de conversão e 97% de excesso enantiomérico com razão enantiomérica de $E = 98$ em 24 h (reação 1, Tabela 6). Entretanto, quando as esferas de FA-LPF foram utilizadas paralelamente na resolução do (*R,S*)-**2a** a conversão para o acetato (*S*)-**3a** foi de 22% com excesso enantiomérico de $> 99\%$ e razão enantiomérica $E > 200$ (reação 2, Tabela 6).

Não houve formação do respectivo éster quando a reação foi realizada com a lipase de *P. fluorescens* (Amano AK) imobilizada somente em alginato de cálcio (reações 3, 7 e 11, Tabela 6).

O resultado foi inesperado, pois vários trabalhos relatam o uso do alginato de cálcio na imobilização de lipases.^{195; 196} Neste caso o processo de imobilização da lipase

no alginato de cálcio pode ter comprometido o sítio ativo da enzima. Ainda assim, vale ressaltar que o processo de liofilização por alto vácuo, caso não esteja em condições adequadas favorece o acúmulo de água na superfície do material acarretando sérios problemas estruturais, como a retenção do processo de difusão do substrato na matriz polimérica. A morfologia desse material a partir do alginato de cálcio é mostrada na Figura 24. Consequentemente, o produto (*S*)-**3a** não foi formado com esferas contendo lipase imobilizada (reações 3, 7 e 11, Tabela 6) e paralelamente a reação contendo apenas esferas de alginato de cálcio (ausência da lipase - reação controle) (reações 4, 8 e 12, Tabela 6) também não ocorreu. O produto formado na reação é específico do processo catalítico da lipase de *P. fluorescens* e não pelos suportes.

Figura 24. Micrografia eletrônica de varredura do biomaterial de alginato de cálcio contendo a lipase de *P. fluorescens*: (A) 50x. (B) 100x.

Na Figura 25 observa-se a comparação entre os cromatogramas obtidos da reação de transesterificação enantiosseletiva com a lipase livre e imobilizada com diferentes biopolímeros em agitação magnética (300 rpm, 32 °C).

Quando a RCE do (*R,S*)-**2a** com lipase de *P. fluorescens* livre e FA-LPF foi acompanhada em agitação magnética por 48 h, os excessos enantioméricos do álcool

remanescente (*R*)-**2a** e do produto acetilado (*S*)-**3a** se mantiveram inalterados em comparação à reação de 24 h (*ee* = 95 e *ee* = 99%, respectivamente), porém a taxa de conversão aumentou para ambos os casos, sendo 41% e 35%, respectivamente. Neste caso, o biocatalisador imobilizado continuou apresentando maior enantiosseletividade que a lipase livre (reações 5 e 6, Tabela 7).

Em 96 h de reação a lipase imobilizada converteu o (*S*)-**3a** em 48%, um valor próximo ao ideal de 50% com excesso enantiomérico de 98% e alta razão enantiomérica $E = >200$ (reação 10, Tabela 7). Para a lipase livre uma conversão semelhante foi observada (*c* = 49%), porém com menor excesso e razão enantiomérica (*ee* = 91, $E = 124$). Os resultados da Tabela 7 mostram que a imobilização da lipase de *P. fluorescens* (Amano AK) em esferas produzidas por blendas de FS e alginato de cálcio pelo método de encapsulamento favoreceu a seletividade da reação em comparação com a enzima livre. A Figura 25 compara os cromatogramas obtidos na reação de transesterificação enantiosseletiva com a lipase livre e imobilizada em diferentes biopolímeros em agitação mecânica (300 rpm, 32 °C).

Nota-se que o tipo de frasco reacional, velocidade e o tipo de agitação da reação influenciaram nos resultados de RCE para a (*R,S*)-**2a**. Em 48 h de reação a enzima livre foi capaz de apresentar maior conversão para o éster (*S*)-**3a** em agitação magnética (300 rpm) que a lipase livre em agitação orbital (132 rpm).

Tabela 7. Resolução cinética enzimática da clorídina (*R,S*)-**2a** em diferentes formas do biocatalisador livre e imobilizado^a

Reação	Biocatalisador	Tempo (24 h)		<i>c</i> (%) ^c	<i>E</i> ^d
		<i>ee</i> (%)			
		(<i>S</i>)- 3a ^b	(<i>R</i>)- 2a ^b		
1	Lipase livre	97	41	29	98
2	Fib-Alg-Lip	>99	28	22	>200
3	Alg-Lip	-	-	Nr	-
4	Alg	-	-	Nr	-
Tempo (48 h)					
5	Lipase livre	95	68	41	80
6	Fib-Alg-Lip	99	53	35	>200
7	Alg-Lip	-	-	Nr	-
8	Alg	-	-	Nr	-
Tempo (96 h)					
9	Lipase livre	91	95	49	124
10	Fib-Alg-Lip	98	94	48	>200
11	Alg-Lip	-	-	Nr	-
12	Alg	-	-	Nr	-

^aCondição geral: lipase de *P. fluorescens* imobilizada em esferas de fibroína-alginato (30 mg), substrato (40 mg), acetato de vinila (75 μ L), *n*-hexano (1 mL), 32 $^\circ$ C, 300 rpm. ^b $c_{GC-FID} = ee_S/ee_P + ee_S$, ^cconversão: $c = ee_S/ee_S + ee_P$. ^d $E = \ln[ee_P(1 - ee_S)/(ee_P + ee_S)] / \ln[ee_P(1 + ee_S)/(ee_P + ee_S)]$. Nr = Não reagiu.

Figura 25. Cromatogramas obtidos por CG/FID da resolução enzimática da (*R,S*)-**2a** em diferentes formas do biocatalisador.

Condições de análises em CG-FID: $T_i=120\text{ }^\circ\text{C}$, $T_f=165\text{ }^\circ\text{C}$ (5 min), $r = 2\text{ }^\circ\text{C/min}$, $t_f = 32,5$ min.
 t_r (*R*)-**2a** = 20,3 min; t_r (*S*)-**3a** = 16,4 min.

4.8. Estudo da quantidade de lipase imobilizada (FA-LPF) na resolução cinética do (*R,S*)-2a

Para o estudo da concentração do biocatalisador pela porcentagem de conversão, a reação foi realizada com diferentes quantidades da FA-LPF (0,015, 0,02, 0,03, 0,04, e 0,05 g) como é apresentado na Tabela 8. Após 48 h de reação o *ee* máximo foi de 99% com 0,05 g de lipase imobilizada (reação 1, Tabela 8) e após 96 h de reação, o aumento da quantidade de biocatalisador a partir de 0,03 g, 0,04 g e 0,05 g (reações 8, 9 e 10, Tabela 8, respectivamente) não alterou o valor do rendimento e do excesso enantiomérico do éster formado (*S*)-3a, uma vez que acetato (*S*)-3a foi obtido em 49% de conversão e 98% de excesso enantiomérico (Figura 26).

Tabela 8. Efeito da quantidade do biocatalisador na resolução cinética enzimática do (*R,S*)-2a por lipase de *P. fluorescens* imobilizada em esferas de fibroína da seda com alginato^a.

Reação	Lipase imobilizada (mg)	Tempo (48 h)		<i>c</i> (%) ^c	<i>E</i> ^d
		<i>ee.</i> (%)			
		(<i>S</i>)-3a ^b	(<i>R</i>)-2a ^b		
1	15	99	61	38	>200
2	20	99	36	27	>200
3	30	99	53	35	>200
4	40	99	66	40	>200
5	50	99	78	44	>200
Tempo (96 h)					
6	15	99	61	38	>200
7	20	97	94	49	>200
8	30	98	94	49	>200
9	40	98	96	49	>200
10	50	98	96	49	>200

^aCondição geral: lipase de *P. fluorescens* imobilizada em esferas de fibroína-alginato, substrato (40 mg), acetato de vinila (75 µL), *n*-hexano (1 mL), 32 °C, 300 rpm. ^bc_{GC-FID} = *ee*_S/*ee*_P + *ee*_S, ^cconversão: *c* = *ee*_S/*ee*_S + *ee*_P. ^d*E* = ln[*ee*_P(1 - *ee*_S) / (*ee*_P + *ee*_S)] / ln[*ee*_P(1 + *ee*_S) / (*ee*_P + *ee*_S)].

Figura 26. Cromatogramas obtidos por GC-FID da resolução cinética enzimática do (*R,S*)-2-cloro-1-feniletanol **2a** por lipase imobilizada em Fib-Alg em 120 h de reação (32 °C e 300 rpm). (A) 50 mg, (B) 40 mg, (C) 20 mg, (D) 15 mg.

Assim pode-se concluir que, 30 mg da esfera contendo a lipase de *P. fluorescens* imobilizada em blendas de FS-alginato foi estabelecido como sendo a quantidade ideal para alcançar uma ótima conversão, alto excesso enantiomérico e uma ideal razão enantiomérica $E > 200$ para o (*S*)-**2a**.

4.9. Estudo do solvente na resolução cinética do (*R,S*)-**2a** por lipase imobilizada (FA-LPF)

Solventes orgânicos podem oferecer inúmeras vantagens na RCE. O efeito de diferentes solventes, polares ou apolares na resolução da cloridrina (*R,S*)-**2a** com a lipase imobilizada (FA-LPF) foi estudado. Os resultados são mostrados na Tabela 9. Em *n*-hexano o produto acetilado apresentou alta enantiosseletividade, com excesso de 99% em 48 h e 98% em 96 h de reação. (reações 1 e 7, Tabela 9). Solventes hidrófobicos

com valores de $\log P \geq 4$ provocam distorções insignificantes na enzima e em geral garantem alta atividade enzimática.¹⁶¹

Alguns solventes orgânicos podem afetar a atividade ou estabilidade das enzimas. Esses efeitos foram observados quando éter etílico, DMF e DMSO foram utilizados (Tabela 9) na RCE do álcool (*R,S*)-**2a** por FA-LPF. A RCE usando DMF e DMSO como solvente apresentaram altos excessos enantioméricos, porém baixas conversões, mesmo em 96 h de reação. Quando o éter etílico foi utilizado como solvente, a conversão do produto não foi obtida (reações 3 e 9, Tabela 9). Sabe-se que o $\log P$ para o éter etílico é de 0,83, a não conversão para o éster provavelmente deve-se ao fato que este retira moléculas de água essenciais ao redor da enzima, causando distorções na conformação nativa da lipase, logo alterando a atividade catalítica do biocatalisador.

Em tolueno como em clorofórmio as conversões foram moderadas quando comparadas com os valores obtidos por *n*-hexano (reações 10 e 11, Tabela 9). Pode-se concluir que conversão e excesso enantiomérico foram influenciados pelo solvente utilizado na RCE da cloridrina (*R,S*)-**2a** com a FA-LPF (Figura 27)

Em éter etílico a resolução enzimática do (*R,S*)-**2a** também não foi obtida com lipase de *P. fluorescens* livre. Oposto a este resultado, Hiratake *et al.* (1988)¹⁸⁵ apresentaram a resolução de (*R,S*)-**2a** com sucesso pela lipase de *P. fluorescens* livre em éter di-isopropílico como solvente em 17 h de agitação à temperatura ambiente.

Tabela 9. Efeito do solvente na resolução da cloridrina **2a** por lipase imobilizada em fibroína da seda com alginato^a.

Reação	Solvente	Tempo (48 h)		<i>c</i> (%) ^c	<i>E</i> ^d
		<i>ee</i> (%)			
		(<i>S</i>)- 3a ^b	(<i>R</i>)- 2a ^b		
1	Hexano	99	53	35	>200
2	DMSO	>99	4	4.3	>200
3	Éter etílico	-	-	Nr	-
4	Tolueno	>99	4	4.3	>200
5	Clorofórmio	>99	3	3	>200
6	DMF	99	0.5	0.6	200
Tempo (96 h)					
7	Hexano	98	94	49	>200
8	DMSO	96	3	3	50
9	Éter etílico	-	-	Nr	-
10	Tolueno	98	17	15	116
11	Clorofórmio	98	13	12	112
12	DMF	83	1	1	11

^aCondição geral: lipase de *P. fluorescens* imobilizada em esferas de fibroína-alginato (30 mg), substrato (40 mg), acetato de vinila (75 µL), solvente (1 mL), 32 °C, 300 rpm. ^b*c*_{GC-FID} = *ee*_S/*ee*_P + *ee*_S, ^cconversion: *c* = *ee*_S/*ee*_S + *ee*_P. ^d*E* = ln[*ee*_P(1 - *ee*_S) / (*ee*_P + *ee*_S)] / ln[*ee*_P(1 + *ee*_S) / (*ee*_P + *ee*_S)]. Nr = Não reagiu.

Figura 27. Cromatogramas obtidos por GC/FID da resolução cinética enzimática do (*R,S*)-2-cloro-1-feniletanol (**2a**) por FA-LPF (120 h, 32 °C e 300 rpm): (A) Tolueno, (B) DMSO, (C) Clorofórmio, (D) DMF, (E) Éter etílico.

Como observado nos resultados da Tabela 9 e Figura 27 com o uso de diferentes solventes na RCE da cloridrina (*R,S*)-**2a**, o hexano foi o melhor solvente na produção enantiosseletiva do acetato (*S*)-**2a** por FA-LPF em agitação magnética.

4.10. Resolução cinética por FA-LPF para diferentes cloridrinas racêmicas

Após otimização da reação de resolução cinética enzimática do (*R,S*)-**2a**, o protocolo desenvolvido foi aplicado a outras cloridrinas racêmicas (*R,S*)-**2f-l**. Os compostos (*R,S*)-**2f-l** foram sintetizados pelo Grupo de Síntese de Produtos Naturais (FCFRP-USP) coordenado pelo Prof. Dr. Giuliano C. Clososki.

A reação foi realizada com FS-LPF (0,03 g), *n*-hexano à temperatura de 32 °C, em agitação magnética (300 rpm) e acetato de vinila como doador de acila (Tabela 10).

O consumo do substrato foi monitorado por análises de CG/FID ou CLAE retirando-se alíquotas (100 μ L) da reação a cada 24 horas.

Exceto para a cloridrina (*R,S*)-**2h** que não reagiu mesmo em 240 h de agitação (reação 3, Tabela 10) todos os demais substratos foram resolvidos aos correspondentes acetatos com moderadas conversões e altos excessos enantioméricos ($E > 200$, $ee > 99\%$) em 120 h de reação. Na Figura 28 tem-se as esferas de FA-LPF contidas em um frasco *vial* (3 mL) para a reação de resolução cinética enzimática de cloridrinas **2f-e**.

Figura 28. RCE de cloridrinas (*R,S*)-**2f-l** com esferas de FA-LPF.

Fonte: Autoria própria

Tabela 10. Resolução cinética de cloridrinas (*R,S*)-**2f-l** por lipase de *P. fluorescens* imobilizada em fibroína da seda com alginato de cálcio^a.

Reação	Cloridrina	<i>ee</i> (%)		<i>E</i> ^d	<i>c</i> (%) ^c	Tempo (h)
		(<i>S</i>)- 3	(<i>R</i>)- 2			
1 ^b	(RS)- 2f	99	82	510	45	120
2 ^b	(RS)- 2g	99	43	304	30	120
3 ^b	CH ₃ (RS)- 2h	-	-	-	Nr	240
4 ^c	(RS)- 2i	99	43	304	30	120
5 ^c	O ₂ N (RS)- 2j	99	47	317	32	120
6 ^b	(RS)- 2k	39	99	292	71	120
7 ^c	(RS)- 2l	99	15	230	13	120

^aCondição geral: FA-LPF (30 mg), substrato (40 mg), acetato de vinila (75 μL), hexano (1 mL), 32 °C, 300 rpm. ^bc_{GC-FID} = *ee*_S/*ee*_P + *ee*_S, ^cc_{CLAE}: *c* = *ee*_S/*ee*_S + *ee*_P. ^d*E* = ln[*ee*_P(1 - *ee*_S) / (*ee*_P + *ee*_S)] / ln[*ee*_P(1 + *ee*_S) / (*ee*_P + *ee*_S)]. Nr = Não reagiu.

Em geral, a enantiosseletividade foi suficiente para a produção de álcoois e acetatos em boas conversões e purezas enantioméricas. Por exemplo, a resolução de (*R,S*)-**2f** proporcionou o correspondente acetato (*S*)-**3f** com *ee* = 99% e 45% de conversão (reação 1, Tabela 10 e Figura 29).

A RCE da cloridrina (*R,S*)-**2g** produziu o composto acetilado (*S*)-**3g** com 30% de conversão com *ee* de 99% em 120 h (reação 2, Tabela 10 e Figura 30) e o álcool remanescente com *ee* de 43%. A reação com o isômero (*R,S*)-**2h** não produziu o correspondente acetilado, o grupo metila substituído na posição *meta* no anel aromático influenciou drasticamente sobre a interação entre o substrato e o sítio ativo dessa enzima, impedindo a ligação do substrato com o sítio ativo da enzima (Figura 31).

Figura 29. Cromatogramas obtidos por CG-FID: (a) Padrão do (*R,S*)-2-cloro-1-(4-fluorofenil)etanol (**2f**). (b) Padrão racêmico do (*R,S*)-acetato-2-cloro-1-(4-fluorofenil)etil (**3f**). (c) RCE do (*S*)-**3f** e (*R*)-**2f** após 120 h de reação por FA-LPF (120 h, 32 °C e 300 rpm).

Figura 30. Cromatogramas obtidos por CG-FID: (a) Padrão do (*R,S*)-2-cloro-1-*p*-toliletanol (**2g**). (b) Padrão racêmico do (*R,S*)-acetato-2-cloro-1-*p*-toluiletanol (**3g**). (c) RCE do (*S*)-**3g** e (*R*)-**2g** após 120 h de reação por FA-LPF (120 h, 32 °C e 300 rpm).

Figura 31. Cromatogramas obtidos por CG-FID: (a) Padrão do (*R,S*)- 2-cloro-1-*m*-toluiletanol (**2h**). (b) Padrão racêmico do (*R,S*)-acetato- 2-cloro-1-*m*-toluiletil (**3h**). (c) Reação após 240 h de reação por FA-LPF (32 °C e 300 rpm).

A configuração absoluta dos acetatos (**3f-1**) foi designada como sendo *S*-configuração, em comparação com os valores de rotação óptica descritos na literatura (Tabela 11). Por conseguinte, foi possível constatar que a lipase imobilizada teve preferência pela estereoquímica *S* na reação de esterificação. Assim, a preferência na esterificação, está de acordo com as previsões da regra empírica de Kazlauskas, que é baseada nos tamanhos relativos dos grupos substituintes ligados ao centro estereogênico e prevê qual enantiômero reage mais rápido. Esta enantiopreferência previsível de lipases permite sugerir empiricamente a determinação da configuração absoluta dos álcoois secundários. Os valores de rotação óptica para os produtos enantiopuros obtidos foram medidos e comparados com os dados da literatura (Tabela 11).

Tabela 11. Valores de rotação óptica para os produtos enantiopuros obtidos pela lipase de *P. fluorescens* imobilizada em esferas de FA-LPF comparados com os dados da literatura.

Compostos	$[\alpha]_D^{22} = \text{experimental}^a$	$[\alpha]_D^{20} = \text{literatura}$
(R)-2f	$[\alpha]_D^{22} = -39,2$ (c 0,7 g/100 mL, CHCl ₃)	$[\alpha]_D^{20} = -51,1$ (c 0,9 g/100 mL, CHCl ₃) ¹⁸³
(R)-2g	$[\alpha]_D^{22} = -68,6$ (c 1,2 g/100 mL, CHCl ₃)	$[\alpha]_D^{20} = -54,2$ (c 1,1 g/100 mL, CHCl ₃) ¹⁹⁷
(R)-2i	$[\alpha]_D^{22} = -12,4$ (c 1,2 g/100 mL, CHCl ₃)	-
(R)-2j	$[\alpha]_D^{22} = -15,2$ (c 2,4 g/100 mL, CHCl ₃)	$[\alpha]_D^{22} = -40,4$ (c 1,0g/100 mL, CHCl ₃) ¹⁹⁸

$$[\alpha]_D^{22} = -2,8 \text{ (c 0,6 g/100 mL, CHCl}_3\text{)}$$

$$[\alpha]_D^{20} = -2,4 \text{ (c 0,89 g/100 mL, CHCl}_3\text{)}^{199}$$

$$[\alpha]_D^{22} = -8,8 \text{ (c 0,5 g/100 mL, CHCl}_3\text{)}$$

$$[\alpha]_D^{25} = -43,1 \text{ (c 1,0 g/100 mL, CHCl}_3\text{)}^{185}$$

$$[\alpha]_D^{22} = +45,15 \text{ (c 1,3 g/100 mL, CHCl}_3\text{)}$$

$$[\alpha]_D^{20} = +58,6 \text{ (c 1,0 g/100 mL, AcOEt)}^{186}$$

$$[\alpha]_D^{22} = +68,60 \text{ (c 1,1 g/100 mL, CHCl}_3\text{)}$$

$$[\alpha]_D^{20} = +87,5 \text{ (c 1,0 g/100 mL, AcOEt)}^{186}$$

$$[\alpha]_D^{22} = +61,12 \text{ (c 0,9 g/100 mL, CHCl}_3\text{)}$$

-

$$[\alpha]_D^{22} = +38,01 \text{ (c 0,6 g/100 mL, CHCl}_3\text{)}$$

-

$$[\alpha]_D^{22} = +2,26 \text{ (c 0,5 g/100 mL, CHCl}_3\text{)}$$

-

$$[\alpha]_D^{22} = +92,86 \text{ (c 0,6 g/100 mL, CHCl}_3\text{)}$$

$$[\alpha]_D^{25} = +83,2 \text{ (c 1,02 g/100 mL, CHCl}_3\text{)}^{185}$$

^a A rotação óptica foi medida em CHCl₃ como solvente em um polarímetro JASCO P2000 equipado com uma lâmpada de Na-589nm.

A presença de diferentes substituintes no anel aromático, alifático ou até mesmo a presença de cadeia α,β -insaturada nas cloridrinas não mostraram influências nas enantiosseletividades para a enzima de *P. fluorescens* (Amano AK). Exceto, quando o anel aromático apresentou substituinte na posição *meta*.

4.11. Reutilização da enzima imobilizada

O potencial de reutilização da FA-LPF na reação de RCE do (*R,S*)-2-cloro-1-feniletanol (**1a**) também foi avaliado. Ao final de cada processo, as esferas catalíticas contendo a lipase imobilizada foram recolhidas por filtração e usadas novamente em condições similares. Como mostrado na Figura 31 a enzima imobilizada manteve a sua atividade com 55% do valor inicial de conversão após o sexto ciclo de reuso.

Os valores de conversão e de excesso enantiomérico do produto (*S*)-**2a** foram estabilizados após o quarto ciclo em 23% e 98%, respectivamente. No entanto, no sexto reuso ocorreu total destruição das esferas (FA-LPF), impossibilitando o prolongamento da reutilização. Vale lembrar que a atividade da lipase imobilizada em FS-alginato na reação de RCE do (*R,S*)-2-cloro-1-feniletanol (**1a**) foi maior que a lipase imobilizada por adsorção física em fibroína da seda.

Conclui-se que a lipase imobilizada pelo **Método 2** está melhor protegida dos efeitos físico-químicos refletindo em maior desempenho na RCE da cloridrina (*R,S*)-**2a** em processos consecutivos. Segundo [Carpenter et al.²⁰⁰](#) sugeriram que certos carboidratos podem proteger a conformação da enzima devido a formação da ligação de hidrogênio com a enzima, servindo portanto como um substituinte da água quando a hidratação da proteína é removida.

Figura 31. Reuso da FA-LPF na resolução cinética do (*R,S*)-2-cloro-1-feniletanol (**1a**). Conversão (■); excesso enantiomérico (*).

4.12. Densidade aparente da FA-LPF

A densidade aparente está ligada diretamente às propriedades físicas do material, tais como porosidade interna ela se refere a real densidade do material. A densidade aparente calculada para o material FA-LPF foi de 289 kg/m^3 a 28°C , uma densidade menor que a densidade da água (997 kg/m^3).

4.13. Sorção de solvente

Para avaliar a capacidade de penetração do solvente na matriz porosa da esfera constituída por fibroína da seda e alginato de cálcio foi escolhido três solventes, a água como solvente de referência, o hexano, pois estava presente nas reações de RCE de cloridrinas racêmicas e o etanol porque reações posteriores apresentadas no **Capítulo 4** farão uso de etanol na presença desse biocatalisador.

Na análise de sorção de solvente, o biopolímero não apresentou resistência na penetração dos solventes utilizados. A esfera de FA-LPF apresentou maior capacidade de sorção para a água. Cerca de $4,9 \text{ g/g}$ de água em relação a massa da esfera foi capaz

de penetrar a matriz porosa do boipolímero. Em hexano a difusão foi de 3,3 g/g. A fibroína da seda apresenta um alto número de resíduos de aminoácidos apolares, o que a deixa com característica hidrofóbica, porém como a matriz polimérica também é constituído por o alginato de cálcio e lipase de *P. fluorescens* (Amano AK) grupos polares ficaram expostos, contribuindo com a menor capacidade de resistência a penetração de água. Conclui-se que o material contendo a lipase (FS-LPF) assume uma característica hidrofílica.

4.14. Atividade enzimática relativa

A atividade enzimática específica para a lipase livre de *P. fluorescens* foi determinada pelo método colorimétrico em 410 nm do produto da hidrólise do *p*NPP.

Seguindo as condições descritas na *seção experimental 2.10* a atividade específica para a lipase livre de *P. fluorescens* foi de 3.907 U/mg. A atividade enzimática relativa para a lipase imobilizada em FS foi de 82%, já para a lipase de *P. fluorescens* imobilizada em blendas de fibroína e alginato de cálcio foi de 48% em relação à atividade enzimática da lipase livre.

Uma observação interessante para a baixa atividade enzimática da lipase imobilizada por encapsulamento leva-se em consideração que a enzima não está distribuída apenas na superfície do material, o que diminui a concentração de enzima disponível ao meio e também se deve considerar o limite de difusão entre a solução da reação ao sítio ativo da lipase imobilizada, diminuindo o contato do sítio ativo da lipase com o substrato. Enzima imobilizada por encapsulamento pode sofrer diferentes interações enzima-suporte, consequentemente diminuindo a atividade enzimática.^{201; 202}

5. CONCLUSÃO

Novas formas de materiais à base de fibroína da seda e alginato foram descritos para a imobilização da lipase de *P. fluorescens* (Amano AK) aplicados na RCE de halodrinhas racêmicas. O uso da fibroína do bicho da seda em processos biotecnológicos foi ampliado, demonstrando que além de ser simples, barato e prático reforça a versatilidade de fibroína da seda como suporte para catalisadores heterogêneos a partir de lipases.

A metodologia de imobilização descrita possibilitou a preparação de diversas halodrinhas acetiladas, oxiranos e do composto (S)-imidazólico com altos excessos enantioméricos 99%.

O método de imobilização por encapsulamento (**Método 2**) da lipase *P. fluorescens* (Amano AK) em FS-alginato foi capaz de prolongar com mais eficiência a atividade de reuso quando comparado ao método de imobilização por adsorção física (método 1).

Conclui-se também que a atividade relativa da FA-LPF imobilizada por encapsulamento (**Método 2**) foi menor que a enzima FS-LPF (**Método 1**) imobilizada por adsorção.

Capítulo 4

PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR LIPASE DE *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* IMOBILIZADA EM BLENDAS DE FIBROÍNA-ALGINATO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Características gerais sobre o biodiesel

O biodiesel é definido como ésteres monoalquílicos de cadeias longas derivados de ácidos graxos que são obtidos a partir de óleos vegetais ou gorduras animais.²⁰³

O biodiesel vem recebendo a atenção de vários pesquisadores, governos e sociedade por apresentar pontos importantes, tais como, baixa toxicidade, é biodegradável, obtido de fontes renováveis para fornecer energia. Pode ser produzido por óleos vegetais não refinados ou reutilizados, apresenta baixa emissão de gases poluentes como CO₂, pois as emissões são apenas aquelas previamente emitidas pela fotossíntese e reduz a emissão dos principais contaminantes atmosféricos como os gases de SO_x.²⁰⁴ Além disso, devido a suas propriedades químicas e físicas serem semelhantes ao diesel convencional, pode ser utilizado em qualquer motor diesel na forma pura (100%) ou em mistura com o diesel, sem exigir grandes modificações no sistema automotor, também pode ser armazenado e manipulado usando a mesma infraestrutura e equipamentos normalmente empregada para o diesel de petróleo. Como o biodiesel não produz vapores explosivos e tem alto ponto de fulgor (próximo a 150 °C) o transporte e armazenamento são mais seguros do que no diesel convencional.^{203; 205}

Mesmo com tantas vantagens frente ao diesel convencional, economicamente o biodiesel ainda não é viável devido à falta de subsídios governamentais. Contudo, com a necessidade de reduzir a utilização de combustíveis derivados do petróleo, evitando preocupações sobre a diminuição da oferta nas zonas tradicionais de produção, instabilidade do preço e instabilidade política em algumas regiões de produção do petróleo este cenário está sendo alterado.^{206; 207} Ainda, mais recentemente também por questões ambientais, busca-se a redução na emissão de gases do efeito estufa para reduzir o avanço do aquecimento global.

No Brasil (2004) foi lançado o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) a fim de estimular a produção de biodiesel e desenvolver aspectos técnicos e econômicos a partir de diversas oleaginosas. Junto ao PNPB foi aprovado a Lei 11.097/2005 que estabeleceu que a partir de 2008 seria adicionado 2% (B2) de biodiesel ao óleo diesel comercializado no Brasil. Em junho de 2008 o Conselho Nacional de Políticas Energéticas aprovou a adição de 3% (B3) de biodiesel como mistura obrigatória ao óleo diesel e de 5% (B5) para 2010, o que desde então resulta na produção de 2,5 bilhões de toneladas por ano de biodiesel.^{207; 208}

O biodiesel pode ser produzido por óleos vegetais tais como, de soja, milho, girassol, palma e dentre outras fontes menos empregadas como babaçu, andiroba e pequi (Figura 1). A soja é a principal oleaginosa utilizada na produção de biodiesel no Brasil (cerca de 80%). Porém, o óleo de soja possui uma baixa produtividade, somente 18% da massa do grão é relativa a triglicerídeos, sua produção possui concorrência com a indústria alimentícia e seu preço varia de acordo com a demanda e especulação do mercado internacional.^{207; 209; 210}

O Brasil dispõe de diversos tipos de matérias-primas, viabilidade climática e extensão de área produtível. O esforço governamental no Brasil tem o objetivo de acompanhar o crescimento da produção do biodiesel na América do Sul. No entanto, a Região Europeia domina a produção de biodiesel desde 2005, seguida pela região da América do Norte, liderada pelos Estados Unidos (EUA) até 2009, quando a produção caiu devido à recessão econômica. Os cinco países mais produtores de biodiesel (55% da produção mundial em 2010) foram a Alemanha, EUA, Brasil, França e Argentina.^{206;}

^{207; 209; 210}

Figura 1. Cultura de oleaginosas para produzir biodiesel por região no Brasil.²¹⁰

1.2. Obtenção do biodiesel

O biodiesel é comumente produzido pela reação de transesterificação com os triglicerídeos (ésteres presentes em óleos e gorduras) na presença de um álcool de cadeia curta, geralmente o metanol ou etanol, na presença de um catalisador químico (base ou ácido) ou biológico (enzima) produz novos ésteres (mono ésteres também conhecido como biodiesel) (Esquema 1).²¹¹

Esquema 1. Representação simplificada da reação de transesterificação de triglicerídeo

Estequiometricamente a reação de transesterificação para formação do biodiesel requer 3 mol do álcool e 1 mol do triglicerídeo, formando 3 mol do éster monoalquílico (biodiesel) e 1 mol de glicerina. A reação de transesterificação pode ser realizada por diferentes processos catalíticos, tais como: (1) alcalinos (NaOH, KOH, NaOMe); (2) ácidos (H₂SO₄, HCl, H₃PO₄); (3) enzimáticos (lipases); (4) heterogêneos (Al₂O₃, enzimas imobilizadas).^{203; 211} Porém, o uso de catalisadores ácidos ou básicos requerem etapas adicionais como a neutralização e lavagem da solução para retirada de resíduos de sais e sabões. Na catálise homogênea o processo de extração e recuperação do catalisador é comprometido.

1.2.1. Catálise ácida

A reação catalisada por ácido em geral é mais lenta e requer temperaturas mais altas, porém é possível obter excelentes rendimentos quando a quantidade de ácidos graxos livres presentes no óleo é superior a 1%.²¹² A necessidade de condições mais drásticas torna a sua implementação inviável a nível industrial. Ácidos de Lewis também já foram utilizados como catalisadores na obtenção do biodiesel, tais como, complexos contendo cátions de Sn(II), Zn(II), Pb(II).²¹³

O mecanismo de transesterificação por catálise ácida é demonstrado no Esquema 2. Primeiramente ocorre a protonação do grupo carbonílico possibilitando o ataque nucleofílico do álcool gerando uma espécie intermediária tetraédrica que elimina uma molécula de álcool (glicerol) regenerando o catalisador.

Esquema 2. Proposta do mecanismo da reação de transesterificação por catálise ácida

1.2.2. Catálise básica

A reação via catálise básica na produção de biodiesel é majoritariamente praticada na indústria. Exige condições menos drásticas (temperatura, tempo e quantidade de catalisador) quando comparada à catálise ácida. Para que a reação ocorra de forma satisfatória é necessário que o óleo contenha até 3% de ácidos graxos livres, quanto maior a umidade do óleo menor a eficiência da reação, pois pode ocorrer a

formação de sabões. Entretanto, os efluentes gerados pelo processo alcalino envolvem um alto consumo de água durante etapas de purificação (lavagens).

O mecanismo da reação por catálise básica consiste na formação do íon alcóxido com posterior ataque nucleofílico ao grupo carbonílico do triglicerídeo, formando um intermediário tetraédrico seguido da eliminação do alcóxido derivado do glicerol, o catalisador é regenerado pela desprotonação do ácido conjugado da base catalítica (Esquema 3).

Esquema 3. Proposta do mecanismo da reação de transesterificação por catálise básica

1.2.3. Catálise enzimática

Reações de transesterificação por catálise enzimática (lipases) vêm se mostrando como uma excelente alternativa para a produção de biodiesel, pois os produtos (mono ésteres e glicerina) em geral são produzidos em elevadas purezas, o que diminui o custo de purificação e recuperação do glicerol. Desta forma o glicerol também terá valorização no mercado. ^{214; 215; 216}

Os biocatalisadores enzimáticos podem ser divididos em duas grandes categorias: (1) lipases extracelulares, a enzima é recuperada a partir do caldo do microrganismo vivo e em seguida purificada. Os microrganismos de maior produção são *Mucor meihei*, *Candida antarctica* e *Pseudomonas cepacia*; (2) lipases intracelulares, a enzima ainda permanece no interior ou nas paredes celulares do microrganismo produtor.²⁰³ Além disso as lipases podem ser produzidas a partir de microrganismos geneticamente modificados permitindo aumentar a sua eficiência catalítica e/ou de termoestabilidade.²¹⁷

Na transesterificação enzimática o mecanismo consiste primeiramente na adição nucleofílica para formar o complexo enzima-substrato, onde o nucleófilo será o grupo -OH de um resíduo de aminoácido (serina). Posteriormente ocorre a transferência de um próton ácido conjugado da amina para o átomo de oxigênio do glicídio do substrato, ocorrendo à quebra da ligação C-O do intermediário enzima-substrato, formando uma molécula de diglicerídeo. Em seguida outra molécula de álcool promove o ataque ao grupo carbonílico do intermediário acil-enzima para formar o complexo tetraédrico acilado álcool-enzima. Por fim, a ligação C-O do complexo tetraédrico formado rompe-se com uma transferência de próton do ácido conjugado da amina, o que resulta em uma molécula de éster de ácido graxo (biodiesel) e regeneração da enzima ao sítio catalítico (Esquema 4).²¹⁸

O mecanismo enzimático procede quando o diglicerídeo (DG) gera o monoglicerídeo (MG) e uma molécula de biodiesel, que por sua vez o MG libera mais uma molécula de biodiesel e uma de glicerol.

As vantagens e desvantagens dos catalisadores enzimáticos em relação aos catalisadores alcalinos são demonstradas na Tabela 1.

Em geral as lipases são empregadas em condições mais brandas que os catalisadores alcalinos e ácidos (o que implica em menor consumo de energia), com diferentes óleos de diferentes propriedades químicas e físicas (elevada acidez) e alto teor de umidade.

Esquema 4. Proposta de mecanismo da reação de transesterificação enzimática de um triglicerídeo.

Tabela 1. Comparação na produção de biodiesel por catálise enzimática e catálise alcalina.²⁰³

Característica da reação	Processo enzimático	Processo alcalino
Presença de ácidos graxos livres no óleo (substrato)	Ácidos graxos livres são transformados em biodiesel	Ácidos graxos livres são transformados em sabões
Presença de água no óleo (substrato)	Não é prejudicial a lipase até certa quantidade.	Pode hidrolisar o óleo e mais sabões são formados
Custo de energia	Baixo, temperatura entre 20 a 50 °C	Médio, temperatura entre 60 a 80 °C
Rendimento do biodiesel	Alto, acima de 90%	Alto, acima de 95%
Glicerina	Alta pureza	Baixa pureza
Custo do catalisador	Alto	Baixo

1.3. Lipases imobilizadas na produção de biodiesel

O custo operacional da enzima ainda é o entrave dessa metodologia para produção de biodiesel em escala industrial, porém com o avanço da tecnologia enzimática sua aplicação vem sendo ampliada. A primeira indústria de produção de biodiesel por catálise enzimática com capacidade operacional de 20.000 t/ano foi instalada na China.²¹⁹

A economia é essencial a aplicação industrial, portanto a imobilização é vital para o processo. Em média o custo da lipase é da ordem de 90% do custo total da produção de biodiesel. Geralmente o maior custo na produção de biodiesel por catálise enzimática é relativo ao material a qual a enzima está imobilizada ou ao processo de imobilização. Portanto, a busca por suportes mais econômicos e métodos de imobilização garantindo a longevidade da atividade enzimática é essencial.²²⁰

Entre os métodos mais utilizados para imobilização de lipases na produção de biodiesel a adsorção continua sendo o mais barato e mais utilizado em comparação a outras técnicas de imobilização, o que contribui para este fato são as condições suaves de operação, o baixo custo de materiais utilizados no procedimento de imobilização sem

a exigência de aditivos químicos durante a adsorção e alta recuperação da atividade enzimática.²²¹

Vários materiais já foram estudados como suportes para imobilização de lipases na produção de biodiesel. Uma lista de tipos de suportes utilizados é apresentada na Tabela 2 na produção do biodiesel etílico por catálise enzimática.

Tabela 2. Produção de biodiesel etílico utilizando enzimas (lipases) imobilizadas em diferentes suportes.

Matriz polimérica	Fonte de lipase	Óleo	Conversão (%)	Referência
Celite	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Óleo de jatropa	98	²²²
Celite	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Óleo de soja	76	²²³
Carbano ativado	<i>Candida antarctica</i>	Óleo de palma	57	²²⁴
Fibras de Poliacrilonitrila	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Óleo de soja	94	²²⁵
Organossilicato	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Óleo de girassol	91	²²⁶
Sílica	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Óleo de girassol	58	²²⁶

Desta forma, buscou-se nessa etapa do trabalho desenvolver uma metodologia capaz de utilizar a lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em blenda de fibroína da seda com alginato de cálcio na obtenção do biodiesel etílico.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo neste capítulo foi o uso da lipase de *Pseudomonas fluorescens* Amano AK imobilizada em blenda a base de fibroína da seda com alginato de cálcio na obtenção de biodiesel etílico.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Estudo da influência do co-solvente, da quantidade do biocatalisador, do tempo e da temperatura na obtenção do biodiesel etílico por lipase de *P. fluorescens* imobilizada em FS-alginato.

2.2.2. Aplicação da lipase imobilizada no processo de reuso da reação de transesterificação pelo álcool etílico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

O *n*-hexano e o etanol (grau cromatográfico) foram obtidos na Panreac e o acetato de etila (AcOEt) (99,5%) foi adquirido na Synth Brasil. O líquido iônico tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio (BMIm.BF₄), tricaprina (> 99%) (tridecanoato de glicina), *p*-nitrofenol (*p*-NP) (> 95,5), palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NPP) (> 98%) foram obtidos na Sigma-Aldrich. Os reagentes, hidróxido de sódio (NaOH), sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) foram adquiridos da Synth Brasil e carbonato de sódio (Na₂CO₃) na Merck, RJ, Brasil. O óleo de soja refinado (Liza[®]) foi adquirido no mercado local da cidade. O alginato de sódio foi adquirido da SAFC.

3.2. Preparo das esferas de fibroína da seda utilizadas como suporte enzimático – Método 2 (FA-LPF)

O preparo do material à base de fibroína da seda com alginato de cálcio contendo a lipase de *P. fluorescens* (FA-LPF) seguiu a metodologia já descrito no **Capítulo 2** (*Seção 2.9*)

3.3. Equipamentos

3.3.1. Cromatografia por adsorção

A purificação dos compostos orgânicos foi realizada por cromatografia em coluna (cromatografia *flash*) usando sílica gel *flash* 60 e uma mistura apropriada de solventes orgânicos (hexano e acetato de etila). Análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em folhas cromatográficas com sílica gel 60 F₂₅₄ fixada em placa de alumínio (revelador para UV e espessura de 0,2 mm). A visualização dos compostos orgânicos impregnados nas cromatoplas foi obtida com vapor de iodo.

3.3.2. Espectroscopia de Infravermelho-Transformada de Fourier (IV)

Os espectros no infravermelho (IV) foram realizados em um espectrômetro de marca Bomem modelo MB-102 e no espectrômetro de marca SHIMADZU IRAffinity, ambos operando com Transformada de Fourier. As análises foram realizadas na Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (IQSC-USP). Os espectros foram obtidos na região de 4.000 a 400 cm^{-1} usando cristal de silício (amostras líquidas).

3.3.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H foram obtidos em um espectrômetro da marca Agilent Technologies 400/54 Premium Shielded, pertencente à CAQI do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (IQSC-USP). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz, utilizando o próprio solvente (CDCl_3) ou tetrametilsilano (TMS) como sinais de referências.

3.3.4. Análise por microscopia eletrônica de varredura das FS-LPF

As esferas foram secas em dessecador e revestidas por pulverização catódica (*sputtering*). As imagens digitalizadas foram obtidas com aumentos que variaram de 70 a 21000 vezes em um microscópio eletrônico de varredura (Leica-Zeiss LEO modelo 440 SEM) operando na tensão de 20 kV. Estas análises foram realizadas na CAQI – IQSC.

3.4. Reação de transesterificação do óleo de soja por catálise básica (NaOH)

A obtenção do biodiesel por catálise básica seguiu-se a metodologia já descrita por Rosset *et al.* ²¹⁵ Em um balão de três bocas (250 mL), equipado com um condensador de refluxo, foi adicionado o óleo de soja (50 g) em agitação magnética (moderada) até 70 °C. Paralelamente, em um béquer (50 mL) foi adicionado o NaOH (0,5 g) em 25 mL de etanol. Em seguida, a mistura foi adicionada vagarosamente com o auxílio de uma seringa de plástico ao óleo de soja pré-aquecido. A mistura foi agitada por mais 30 min. Posteriormente, deixou-a resfriar a temperatura ambiente, e transferiu-se para um funil de separação onde permaneceu por 24 h em repouso. A fase inferior (glicerol) foi separada, enquanto a fase superior (biodiesel) foi lavada com água destilada (2 x 10 mL), seguida por uma solução de 10% de HCl (2 x 10 mL) e novamente lavada com água destilada (2 x 10 mL). O biodiesel foi seco com sulfato de sódio anidro e filtrado. Purificou-se o produto por cromatografia em coluna com sílica gel *flash* com uma mistura de acetato de etila e *n*-hexano (9:1) e caracterizado por RMN ¹H. O biodiesel sintetizado por catálise química foi utilizado para obtenção da curva analítica.

3.5. Quantificação por GC/FID do biodiesel obtido por catálise enzimática

Foi utilizado um método cromatográfico para quantificar as reações de transesterificação por lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em (FA-LPF). O método desenvolvido seguiu os parâmetros: razão de *split* 1:20, gás de arraste: nitrogênio, volume de injeção: 1,0 µL, temperatura do injetor: 270 °C, temperatura do detector: 350 °C, temperatura inicial da coluna: 100 °C, permanecendo por 1 minuto, taxa de aquecimento: 15 °C/minuto até 180 °C, posteriormente uma taxa de aquecimento de 7 °C/minuto até 350 °C permanecendo por 15 minutos. O tempo total da análise foi de 24 minutos. A coluna utilizada

foi a *Select Biodiesel for Glycerides Ulti Metal* (Varian - 15 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,45 mm de diâmetro externo).

Para a quantificação do biodiesel etílico formado por catálise enzimática preparou-se uma solução de 20 mg/mL de biodiesel etílico em hexano e uma solução de tricaprina de 4 mg/mL como padrão interno para obtenção da curva analítica. As concentrações utilizadas estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Preparo das soluções para obtenção da curva analítica para quantificação do biodiesel etílico por GC/FID via catálise básica.

Concentração de biodiesel (mg/mL)	Volume de biodiesel (µL)	Volume de tricaprina (µL)	Volume de <i>n</i> -hexano (µL)
0,5	25	500	475
1	50	500	450
2	100	500	400
3	150	500	350
5	250	500	250
7	350	500	150
8	400	500	100
9	450	500	50
10	500	500	0

3.6. Transesterificação enzimática do óleo de soja por FA-LPF

Para o estudo da reação de transesterificação enzimática do óleo de soja foi utilizado um frasco *vial* (3 mL). Foram realizados quatro experimentos para avaliar os principais fatores capazes de influenciar o rendimento da reação, tais como, característica do solvente (**Experimento 1**), a quantidade do biocatalisador (**Experimento 2**), relação óleo/etanol (**Experimento 3**) e temperatura (**Experimento 4**). As reações foram realizadas em agitação magnética (IKA) a 400 rpm. As enzimas foram recolhidas por filtração e lavadas com hexano (3 x 1 mL). A reação foi lavada com água destilada (3 x 1 mL), seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o excesso de solvente foi removido em rotaevaporador a pressão reduzida. A

quantificação do biodiesel por GC/FID foi realizada pela diluição das amostras em 7,5 mL de *n*-hexano, retirou-se 500 µL da solução do analito e adicionou-se 500 µL da solução do padrão interno. Os rendimentos obtidos foram expressos em % de conversão do biodiesel. As esferas de FA-LPF foram recuperadas para posterior avaliação do reuso do biocatalisador imobilizado.

3.7. Estudo da influência do solvente na reação de transesterificação enzimática do óleo de soja por FA-LPF - Experimento 1

3.7.1. *Experimento 1a - Reação livre de solvente*

Em um frasco *vial* (3 mL) foi adicionado o óleo de soja (150 mg), o etanol (450 µL) e a lipase imobilizada (20% m/m) em relação à massa do óleo de soja. A reação foi mantida à temperatura de 32 °C em agitação magnética por 48 h.

3.7.2. *Experimento 1b - Reação com adição de líquido iônico BMIM.BF₄*

Em um frasco *vial* (3 mL) foi adicionado o óleo de soja (150 mg), o líquido iônico BMI.BF₄ (1% m/m) em relação à massa do óleo de soja, o etanol (450 µL), e a lipase imobilizada (20% m/m). A reação foi mantida à temperatura de 32 °C em agitação magnética por 48 h.

3.7.3. *Experimento 1c - Reação com adição de líquido iônico BMIM.BF₄ e n-hexano*

Em um frasco *vial* (3 mL) foi adicionado 150 mg de óleo de soja, 1% (m/m) de líquido iônico BMIM.BF₄ e 30% (m/v) de *n*-hexano, etanol (450 µL) e a lipase imobilizada (20% m/m). A reação foi mantida à temperatura de 32 °C em banho de óleo em agitação magnética por 48 h.

3.7.4. **Experimento 1d** - Reação com *n*-hexano

Em um frasco *vial* (3 mL) foi adicionado o óleo de soja (150 mg), *n*-hexano (30% m/v), etanol (450 µL) e a lipase imobilizada (20% m/m). A reação foi mantida à temperatura de 32 °C em agitação magnética (400 rpm) por 48 h.

3.8. Variação da quantidade de suporte contendo a lipase imobilizada - Experimento 2

A variação de massa do biocatalisador foi realizado a partir do **Experimento 1d**. Em um frasco *vial* (3 mL) foi adicionado o óleo de soja (150 mg), *n*-hexano (30% m/v), etanol (450 µL), separadamente transferiu-se 10, 20, 30 e 40% (m/m) de lipase imobilizada à temperatura de 32 °C por 48 h em agitação magnética. Em seguida realizou-se a quantificação do biodiesel formado por CG/FID.

3.9. Variação da relação óleo:etanol - Experimento 3

A partir do **Experimento 2** variou-se a relação óleo e etanol em 1:2; 1:3; 1:4 e 1:6 com adição do óleo de soja (150 mg), 30% do biocatalisador, *n*-hexano (20%) à temperatura de 32 °C em agitação magnética por 48 h. Em seguida realizou-se a quantificação do biodiesel formado por CG/FID.

3.10. Variação da quantidade de *n*-hexano na reação de transesterificação do óleo de soja - Experimento 4

A partir das condições obtidas no **Experimento 2** variou-se a quantidade de *n*-hexano no meio reacional a fim de aumentar o rendimento do biodiesel etílico.

O experimento foi dirigido com adição do óleo de soja (150 mg), etanol (450 µL), 20% (m/m) do biocatalisador em relação à massa do óleo de soja e separadamente, adicionou-se 5, 10, 20, 30 e 40% (m/v) de *n*-hexano no *vial* (3 mL) à temperatura de 32 °C em agitação

magnética por 48 h. Em seguida realizou-se a quantificação do biodiesel formado por CG-FID.

3.11. Variação da temperatura na reação de transesterificação do óleo de soja - Experimento 5

O experimento foi realizado com adição do óleo de soja (150 mg), etanol (450 µL), 20% (m/m) do biocatalisador, *n*-hexano (20%) e 1:4 óleo:etanol no *vial* (3 mL) à temperatura de 32 e 52 °C em agitação magnética por 48 h. Em seguida realizou-se a quantificação do biodiesel formado por CG/FID sem qualquer purificação.

3.12. Reuso da esfera de FA-LPF na reação de transesterificação do óleo de soja

Para avaliar a estabilidade da lipase encapsulada, a reação de transesterificação do óleo de soja com etanol foi conduzida repetidamente pela adição do mesmo biomaterial por 4 ciclos. Ao final de cada ciclo, o biomaterial foi filtrado e lavado com *n*-hexano (3 x 1 mL) para posterior reutilização. As condições reacionais foram às mesmas descritas na *Seção 2.3*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Recentemente Rosset *et al.* utilizaram várias lipases disponíveis (Laboratório de Biocatálise e Química Orgânica) na produção do biodiesel por reação de transesterificação do óleo de soja em etanol, utilizando 5% (m/m) das seguintes lipases não imobilizadas, *Candida rugosa*, *Candida cylindracea*, *Porcine pâncreas*, *Hog pâncreas*, *Rhizopus niveus* e *Pseudomonas fluorescens*. Dentre essas enzimas a lipase de *P. fluorescens* AK Amano produziu o biodiesel etílico em maior rendimento (23%). Portanto, esta enzima foi imobilizada posteriormente em blendas de fibroína-alginato e utilizada na produção de biodiesel etílico.

O biomaterial utilizado na imobilização da lipase de *P. fluorescens* para produção do biodiesel etílico foi o mesmo empregado no estudo anterior (**Capítulo 3, Seção 2.9**).

Primeiramente foi estabelecido o melhor método de análise por CG/FID, para o analito, o padrão interno e o triglicerídeo. Os cromatogramas para cada amostra estão representados pela Figura 2.

Nota-se que a curva analítica obtida para a quantificação do biodiesel etílico utilizando a tricaprina como padrão interno apresentou uma boa correlação entre os pontos da curva. O gráfico (Figura 3) foi construído pela razão das áreas do ($A_{\text{analito}}/A_{\text{P.I.}}$) e das concentrações ($C_{\text{analito}}/C_{\text{P.I.}}$) desta forma obteve-se a equação da reta ($Y = A + BX$), onde A = coeficiente linear, B = coeficiente angular, X = razão das concentrações e Y = razão das áreas dos sinais, que foi utilizada para quantificação do analito durante as reações.

Figura 2. Cromatogramas obtidos pela análise de CG-FID. (A) Biodiesel (ésteres etílicos). (B) Padrão interno (P.I.) (tricapina). (C) Óleo de soja (triglicerídeo) (TG).

Figura 3. Curva analítica obtida para a quantificação do biodiesel etílico por FA-LPF

4.1. Efeito do solvente na obtenção do biodiesel etílico por FA-LPF

Em geral, os co-solventes aumentam a produção de biodiesel nas reações de transesterificação enzimática, isso porque muitos solventes são capazes de aumentar a solubilidade do álcool e do óleo na reação. Consequentemente melhoras significativas podem ser alcançadas pela adição de um co-solvente, menor tempo de reação, aumento do rendimento e o uso de temperatura ambiente.^{227; 228}

- a. Baseado na literatura, diversos experimentos foram realizados para determinar a influência do solvente na reação de transesterificação do óleo de soja pela FA-LPF, tais como:
 - i. **Experimento 1a:** reação sem solventes (reação controle).
 - ii. **Experimento 1b:** adição de 1% (m/v) do líquido iônico BMIm.BF₄.
 - iii. **Experimento 1c:** adição de 1% (m/v) de líquido iônico BMIm.BF₄ e adição de 30% (m/v) de n-hexano.
 - iv. **Experimento 1d:** adição de 30% (m/v) de n-hexano. O valor de porcentagem foi em relação à massa de óleo de soja (150 mg) e 20 % (m/m) de lipase imobilizada à temperatura de 32 °C, 400 rpm (agitação magnética) por 48 h.

Conforme é observado no cromatograma A (Figura 5) quando a reação de transesterificação do óleo de soja com esferas de FA-LPF foi realizada sem solvente, o rendimento do biodiesel etílico produzido por FA-LPF foi de 18%.

Os líquidos iônicos são sais orgânicos em fase líquida, cujo ponto de fusão não é superior à temperatura ambiente. Os sais são anfóteros constituídos por um cátion orgânico e um ânion inorgânico/orgânico. Eles estão sendo aceitos como co-solventes e como agentes de separação de fase na síntese de biodiesel por catálise enzimática.^{229; 230; 231}

No entanto, na reação contendo o líquido iônico como co-solvente rendeu apenas 13% de biodiesel produzido pela enzima imobilizada em FS-alginato. Um resultado semelhante foi obtido quando a reação foi realizada na presença de 1% (m/v) de líquido iônico e 30% de *n*-hexano, o rendimento do biodiesel etílico produzindo foi de 14%. Observou-se que o desempenho catalítico da lipase foi afetado na presença do L.I. (BMIm.BF₄). É possível que o L.I. promova alterações na conformação da enzima afetando diretamente a atividade catalítica da lipase.²³² Davi *et al.*²³³ também alcançaram baixos rendimentos quando utilizaram o líquido iônico BMIm.BF₄ como co-solvente na reação de transesterificação do óleo de soja por CALB (2,3%). No entanto, Sunitha *et al.*²³⁴ reportaram um aumento na produção de biodiesel por catálise enzimática (CALB) quando o líquido iônico BMIm.BF₆ foi usado como co-solvente. Segundo Liu *et al.* os L.I. podem provocar mudanças na estrutura secundária da enzima, quanto maior o teor de α -hélice menor a conformação aberta do sítio ativo, consequentemente menor a interação com o substrato ao sítio ativo da lipase.

Observa-se na Figura 5 que a reação de transesterificação do óleo de soja por FA-LPF em etanol na presença de 20% de hexano, produziu o biodiesel etílico com 34% de rendimento. A solubilidade do óleo de soja em *n*-hexano aumentou a área de contato do óleo junto às enzimas da lipase de *P. fluorescens*. Vale destacar que a taxa de sorção do óleo de

soja a esfera de FS-PFL foi de 1,5 g/g, cerca de três vezes menor que o valor encontrado para o hexano (3,27 g/g).

Pode-se concluir que o hexano foi o melhor co-solvente para esta reação na presença da lipase imobilizada (FS-PFL). Segundo a literatura o *n*-hexano aumenta significativamente a velocidade de reação quando comparado ao sistema livre de co-solvente, através da redução da viscosidade do óleo o hexano assegura um meio reacional mais homogêneo e evita reações colaterais, como a hidrólise.^{203; 235} Uma mistura menos viscosa aumenta a taxa de difusão do substrato e promove a transferência para o sítio ativo da enzima imobilizada. Os solventes não polares podem manter moléculas de água em torno da enzima, garantido a sua atividade e estabilizando a conformação da enzima preservando o sítio catalítico.

Figura 4. Cromatogramas obtidos pela análise de CG/FID da reação de transesterificação do óleo de soja por FA-LPF. (A) 20% hexano. (B) 1% L.I. (C) 20% hexano + 1% L.I. MG: Monoglicerídeo. P.I. Padrão interno. DG: Diglicerídeo. TG: Triglicerídeo.

4.2. Efeito da quantidade de biocatalisador na reação

A quantidade de lipase imobilizada na reação de transesterificação foi testada pela adição de 10 (15 mg), 20 (30 mg), 30 (45 mg) e 40% (60 mg) em relação ao óleo de soja (150 mg) com 20% de *n*-hexano (400 rpm, 48 h e 32 °C). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 5.

Neste estudo observou-se que 30% (45 mg) do biocatalisador alcançou um rendimento máximo de 42% de ésteres monoalquílicos. O aumento da quantidade do biocatalisador heterogêneo não foi proporcional ao aumento da produção de biodiesel etílico, pois 40% (60 mg) do biocatalisador foi responsável pela formação de apenas 41% do biodiesel etílico. Vale destacar que a quantidade de biocatalisador adicionado à reação (em frasco *vial* de 3 ml), limitou a agitação das esferas e consequentemente a transferência de massa através da lipase imobilizada foi comprometida.^{236; 237}

Figura 5. Efeito da quantidade do biocatalisador na formação do biodiesel etílico por FS-LPF

Conclui-se que 30% da massa do biocatalisador, em relação ao óleo de soja, são favoráveis a maior produção de mono éster alquílico (biodiesel) nesta reação.

4.3. Efeito da razão óleo:etanol

A razão molar entre o álcool (etanol) e o triglicerídeo (óleo de soja) também é um fator limitante no rendimento da reação de transesterificação.

Para verificar a relação molar óleo:etanol ideal, a reação foi promovida com diferentes proporções de óleo e etanol (1:2, 1:3, 1:4 e 1:6), com 150 mg de óleo e 30% (m/m) do biocatalisador em 20% de *n*-hexano (400 rpm, 48 h e 32 °C) (Experimental, seção 3.2).

Constata-se pela Figura 6 que a relação óleo e etanol 1:4 foi responsável por 49% da produção do monoéster alquílico. E quando 1:6 (óleo:etanol) foi utilizado o rendimento foi alterado para 17%. Já a relação 1:2 não foi satisfatória na produção do biodiesel etílico pela lipase imobilizada nestas condições.

A diminuição da produção de biodiesel etílico pelo aumento da quantidade do álcool utilizado por catálise enzimática também foi observada para outras lipases em outros óleos. O álcool em excesso (não dissolvido na reação) é suscetível a cobrir a superfície da lipase causando inibição ou desativação da enzima.^{203; 238}

Apesar da estequiometria da reação de transesterificação ser de 3 equivalentes do álcool para uma molécula do triglicerídeo frequentemente utiliza-se um excesso na quantidade do álcool. Portanto, conclui-se que na reação de transesterificação enzimática por FA-LPF necessitou-se de 1:4 (óleo:etanol) para alcançar o maior rendimento na reação de transesterificação do óleo de soja.

Figura 6. Efeito da razão óleo:etanol na transesterificação do óleo de soja catalisada por FA-LPF

4.4. Efeito da quantidade de co-solvente (*n*-hexano) na reação de transesterificação do óleo de soja por FA-LPF

Uma vez selecionado os parâmetros ideais tais como: a concentração do biocatalisador, a razão óleo:etanol e o tipo de co-solvente, na transesterificação enzimática do óleo de soja por lipase de *P. fluorescens* imobilizada (FA-LPF). Variou-se a concentração do co-solvente entre 5, 10, 20, 30 e 40% de hexano ao meio reacional (Experimental, seção 3.3).

Observa-se pela Figura 7 que o aumento da concentração do co-solvente (hexano) promoveu uma alteração significativa no rendimento da reação. Destaca-se que uma quantidade menor de *n*-hexano (10%) foi capaz de produzir 38% do éster mono alquílico, um rendimento menor quando comparado à concentração já utilizada em processos anteriores (20% de co-solvente). A partir da concentração de 30% de hexano a concentração do co-solvente interferiu negativamente no rendimento da reação, passando para 27% e 13% em 30 e 40% de hexano, respectivamente. Neste caso, o melhor rendimento foi na condição de 20% de hexano, fornecendo 42% de biodiesel.

Figura 7. Efeito da concentração do co-solvente na transesterificação do óleo de soja catalisada por FA-LPF

Alguns problemas relacionados com a inibição do biocatalisador ocorre pelos efeitos de sub-produtos da reação, tal como o glicerol. O glicerol é hidrofílico e insolúvel no óleo e pode ser adsorvido na superfície da lipase imobilizada diminuindo a estabilidade da enzima e/ou a estabilidade operacional.²³⁹

4.5. Efeito da temperatura na reação de transesterificação do óleo de soja por FA-LPF

O efeito da temperatura sobre a atividade catalítica das esferas de FA-LPF na reação de transesterificação do óleo de soja com etanol em 48 h foi estudado nas temperaturas de 32 e 52 °C.

Dentre as temperaturas estudadas a mais favorável para ocorrer a transesterificação do óleo de soja pelo biocatalisador FA-LPF foi a 52 °C, o rendimento produzido foi de 62% (Figura 8). Em certas temperaturas ocorre inativação ou inibição do poder catalítico da enzima. Vale destacar que a lipase *P. fluorescens* Amano AK possui estabilidade ótima a 55 °C. Ressalta-se que na temperatura de 52 °C foi observado desintegração parcial das esferas (matriz-biocatalisador). A FS é resistente a altas temperaturas (121°C), porém o alginato deixa

a matriz menos resistente a temperaturas mais elevadas, neste caso o uso do biocatalisador foi limitado à temperatura de 32 °C.

Conclui-se que apesar do ótimo rendimento na reação de transesterificação por lipase imobilizada em FS-LPF a 52° C, optou-se em trabalhar com a temperatura ambiente (32 °C), pois além de preservar a integridade do biomaterial a produção do biodiesel em baixas temperaturas é economicamente e ambientalmente vantajosa. ²⁴⁰

Figura 8. Reação de transesterificação de óleo de soja por FS-LPF a 52 °C. MG: Monoglicerídeo. P.I. Padrão interno. DG: Diglicerídeo. TG: Triglicerídeo.

4.6. Efeito do tempo reacional na obtenção de biodiesel por FA-LPF

O tempo na reação de transesterificação do óleo de soja por catálise enzimática é uma variável importante. Com o objetivo de avaliar a cinética da reação variou-se o tempo em intervalos de 24, 48 e 72 e 96 h com 150 mg de óleo e 30% do biocatalisador com 20% de *n*-hexano a 32 °C e 1:4 óleo:etanol, em seguida analisada por CG-FID.

Os resultados obtidos são apresentados na Figura 9. Em 24 h, o rendimento do biodiesel etílico foi de 13%. Acima de 72 e 96 h de agitação ocorreu um aumento considerável na formação de mono éster etílico, 60% e 63%, respectivamente. Porém vale ressaltar que no tempo de 96 h as esferas de FA-LPF foram parcialmente destruídas pelo atrito da agitação magnética, além disso, tempos longos para a reação de transesterificação passam a ser impraticáveis nestas condições.

Portanto, optou-se em realizar a produção de biodiesel etílico, a partir do óleo de soja por lipase imobilizada (FA-LPF), em 48 h sob agitação magnética a 32 °C com 30% de *n*-hexano. [Lew et al.](#) ²⁴¹ alcançaram 72% de biodiesel a partir do óleo de *Jatrofa* por lipase de *P. fluorescens* imobilizada em matriz de alginato de sódio à temperatura de 40 °C por 48 h de agitação utilizando o hexano como co-solvente.

Figura 9. Efeito do tempo na transesterificação de óleo de soja por FS-LPF

Várias condições foram testadas com o objetivo de aumentar a produção do biodiesel etílico sem comprometer a estrutura da matriz polimérica do suporte. Após determinadas condições reacionais o rendimento foi de 63%, porém algumas limitações do suporte FS-

Alginato foram apresentadas, tais como fragilidade em temperatura de 52 °C e longos tempos de agitação (> 96 h).

Pode-se concluir que a melhor condição para promover a formação do biodiesel sem o comprometimento da esfera foi quando empregou-se: hexano (20%), óleo e etanol (1:4) em 48 h a 32 °C em agitação mecânica (400 rpm). Nestas condições o rendimento de biodiesel foi de 42% em FS-LPF.

4.7. Reutilização de lipase imobilizada em FS-LPF

A principal vantagem de imobilizar uma enzima por catálise heterogênea é a fácil recuperação do biocatalisador e a sua reutilização sem danos a capacidade catalítica. A reutilização da lipase imobilizada reduz significativamente os custos operacionais de produção de biodiesel em escala industrial. Como é possível observar na Figura 10, a lipase imobilizada manteve 81% da atividade inicial após a segunda reação (2º ciclo). Com um decréscimo mais significativo na terceira reação (3º ciclo), o rendimento do biodiesel formado foi de 29%, correspondendo a 69% do valor inicial. Na quarta reação (4º ciclo) de reuso da esfera de FA-LPF o rendimento obtido foi de 26%, mantendo-se estável frente ao rendimento da terceira reação. A diminuição na atividade da enzima imobilizada ao longo de 4 reações é atribuída a exposição da enzima durante a utilização contínua frente aos substratos do meio (óleo, etanol e hexano), contribuindo para a diminuição da estabilidade enzimática.

Vale destacar que no 4º ciclo de reuso as esferas passam a não suportar o atrito da agitação magnética (400 rpm) e sofreram grandes danos ou até mesmo destruição completa do material. De acordo com a Figura 11 é possível observar áreas danificadas, causando a exposição do interior da esfera até sua completa destruição.

Figura 10. Reutilização da FA-LPF. Condições do processo: 150 mg de óleo de soja, 1:4 óleo:etanol, 30% biocatalisador, 20% de *n*-hexano, 32 °C por 48 h em agitação magnética (400 rpm).

Figura 11. Micrografia da esfera de FS-LPF após o 3º ciclo da reação de transesterificação do óleo de soja em etanol (1:4 óleo etanol, 32 °C, 400 rpm). (A) Microimagem da superfície. (B) Microimagem do interior.

5. CONCLUSÃO

Dentro dos objetivos propostos, foi possível obter o biodiesel etílico pela reação de transesterificação por lipase de *P. fluorescens* imobilizada por encapsulamento em blenda de fibroína da seda com alginato de cálcio. Foi o primeiro relato do uso da combinação desse material na produção do biodiesel etílico. As melhores condições para bom funcionamento do biocatalisador foram: 30% do biocatalisador, 20% de *n*-hexano, relação óleo e etanol de 1:4 a 32 °C por 48 h em agitação magnética (400 rpm). Nessas condições foi possível alcançar 42% de biodiesel etílico formado.

O biocatalisador (FS-LPF) apresentou algumas limitações reacionais, tais como, fragilidade frente a elevadas temperatura (> 32 °C) e exposição prolongada da agitação magnética. Porém, permaneceu apto em 4 reações (4 ciclos) de transesterificação. Conclui-se que o biocatalisador (FS-LPF) é uma alternativa na obtenção do biodiesel etílico, pois foi possível utilizar um catalisador heterogêneo de fácil acesso, baixo custo e biodegradável à temperatura ambiente.

Capítulo 5

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ¹ GRUNWALD, P. **Biocatalysis** - biochemical fundamentals and applications. London: Imperial College Press, 2009.
- ² GOLDBERG, K. SCHROER, K. LUTZ, S. LIESE, A. Biocatalytic ketone reduction - a powerful tool for the production of chiral alcohols - part I: processes with isolated enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 2, p. 237-248, 2007.
- ³ GOLDBERG, K. SCHROER, K. LUTZ, S. LIESE, A. Biocatalytic ketone reduction - a powerful tool for the production of chiral alcohols - part II: whole-cell reductions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 2, p. 249-255, 2007.
- ⁴ ADAMS, J. P; COLLIS, A. J; HENDERSON, R. K; WHITTAL, J; SUTTON, P.W. Biotransformation in small-molecule pharmaceutical development. In: John Whittall; Peter W. Sutton (Eds). **Practical methods for biocatalysis and biotransformation**. Uniter Kingdom: WILEY, 2009. p.1-82.
- ⁵ NELSON, D. L; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. New York: W. H. Freeman 2004.p. 520-521.
- ⁶ ILLANES, A. **Enzyme biocatalysis**: principles and applications. 2008. p.4-10
- ⁷ KULA, M. R. Cofactor and coenzymes. In: Drauiz K. Waldmam H. and Oliver M. **Enzymes catalysis in organic synthesis**. Weinheim: WILEY, 2002.
- ⁸ FURUYA, T; KANNO, T; YAMAMOTO, H; KIMOTO, N; MATSUYAMA, A; KINO, K. Biocatalytic production of 5-hydroxy-2-adamantanone by P450cam coupled with NADH regeneration. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 94, p. 111-118, 2013.
- ⁹ DESAI, A. A Sitagliptin Manufacture: A compelling tale of green chemistry, process intensification, and industrial asymmetric catalysis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 9, p. 1974-1976, 2011.
- ¹⁰ SILVA, M. R. DA; MONTENEGRO, T. G. C; MATTOS, M. C. DE; OLIVEIRA, M. DA C. F. DE; LEMOS, T. L. G. DE; GONZALO, G; DE; LAVANDERA, I; GOTOR-FERNÁNDEZ, V; GOTOR, V; Regioselective preparation of thiamphenicol esters through lipase-catalyzed processes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 987-994, 2014.
- ¹¹ MARTINEZ, S. KUHN, M. L; RUSSELL, J. T; HOLZ, R. C; ELGREN T. E. Acrylamide production using encapsulated nitrile hydratase from *Pseudonocardia thermophila* in a sol-gel matrix. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 100, p. 19-24, 2014.
- ¹² CHANITNUN, K.; PINPHANICHAKARN, P. Glucose(xylose) isomerase production by *Streptomyces* sp. CH7 grown on agricultural residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 1084-1093, 2012.

- ¹³ KURJATSCHIJ, S.; KATZBERG, M.; BERTAU, M. Production and properties of threonine aldolase immobilisates. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 103, p. 3-9, 2014.
- ¹⁴ PALMER, T; BONNER, P. L. **The investigation of active site structure**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2007. p.173-188.
- ¹⁵ FISCHER, E. Einfluss der configuration auf die wirkung der enzyme. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 27, n. 3, p. 2985-2993, 1894.
- ¹⁶ FUKUI, T.; SODA, K. **Molecular aspects of enzyme catalysis**. New York: Willey 2008. p. 80-95.
- ¹⁷ KOSHLAND, D.; NEMETHY, G.; FILMER, D. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. **Biochemistry**, v. 5, n. 1, p. 365, 1966.
- ¹⁸ VERLI, H.; BARREIRO, E. J. Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. **Química Nova**, v. 28, p. 95-102, 2005.
- ¹⁹ FABER, K. **Biotransformation in organic chemistry**. New York: Springer, 2011. p. 3-27,
- ²⁰ HASAN, F.; SHAH, A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.
- ²¹ STERGIOU, P. Y.; FOUKIS, A; FILIPPOU, M.; KOUKOURITAKI, M.; PARAPOULI, M.; THEODOROU, L. G.; HATZILOUKAS, E.; AFENDRA, A.; PANDEY, A.; PAPAMICHAEL, E. M. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1846-1859, 2013.
- ²² GONZÁLEZ-SABÍN, J.; GOTOR, V.; REBOLLEDO, F. CAL-B-catalyzed resolution of some pharmacologically interesting β -substituted isopropylamines. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 13, n. 12, p. 1315-1320, 2002.
- ²³ GONZÁLEZ-SABÍN, J.; GOTOR, V.; REBOLLEDO, F. Chemoenzymatic preparation of optically active β -amino-cyclohexanols and their application in the enantioselective addition of diethylzinc to benzaldehyde. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 15, n. 8, p. 1335-1341, 2004.
- ²⁴ CHOI, J.-M.; HAN, S.-S.; KIM, H.-S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 7, p. 1443-1454, 2015.
- ²⁵ PADMAKUMAR, R.; ORIEL, P. Bioconversion of acrylonitrile to acrylamide using a thermostable nitrile hydratase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-9, p. 671-679, 1999.
- ²⁶ WU, S.; FOGIEL, A. J.; PETRILLO, K. L.; JACKSON, R. E.; PARKER, K. N.; DICOSIMO, R.; BEN-BASSAT, A.; O'KEEFE, D. P.; PAYNE, M. S. Protein engineering of

nitrilase for chemoenzymatic production of glycolic acid. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 99, n. 3, p. 717-720, 2008.

²⁷ JIN, H.; HU, Z.; ZHENG, Y. Enantioselective hydrolysis of epichlorohydrin using whole *Aspergillus niger* ZJB-09173 cells in organic solvents. **Journal of Biosciences**, v. 37, n. 4, p. 695-702, 2012.

²⁸ DICOSIMO, R.; MCAULIFFE, J.; POULOSE, A. J.; BOHLMANN, G. Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6437-6474, 2013.

²⁹ WANG, Z.; WANG, J.; XU, Z. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on electrospun polysulfone nanofibrous membranes by adsorption. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 42, n. 1-2, p. 45-51, 2006.

³⁰ VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.

³¹ TOMOTANI, E. J.; VITOLO, M. Method for immobilizing invertase by adsorption on Dowex® anionic exchange resin. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 245-249, 2006.

³² FRANSSEN, M. C. R.; STEUNENBERG, P.; SCOTT, E. L.; ZUILHOF, H.; SANDERS, J.P. M. Immobilised enzymes in biorenewables production. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6491-6533, 2013.

³³ KALANTARI, M.; KAZEMEINI, M.; TABANDEH, F.; ARPANAEI, A. Lipase immobilisation on magnetic silica nanocomposite particles: effects of the silica structure on properties of the immobilised enzyme. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 17, p. 8385-8393, 2012.

³⁴ MEI, L.; ZHU, X.; CHENG, J. A soluble polymer-supported NADH model: Synthesis and application. **Chinese Science Bulletin**, v. 55, n. 25, p. 2824-2828, 2010.

³⁵ MEI, Y.; MILLER, L.; GAO, W.; GROSS, R. A. Imaging the Distribution and secondary structure of immobilized enzymes using infrared microspectroscopy. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 1, p. 70-74, 2003.

³⁶ HOFFMANN, F.; CORNELIUS, M.; MORELL, J.; FROBA, M. Silica-based mesoporous organic-inorganic hybrid materials. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 45, n. 20, p. 3216-3251, 2006.

³⁷ KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D. M. Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, n. 1-3, p. 157-176, 2000.

³⁸ SUCKLING, C. J. Immobilized enzymes. **Chemical Society Reviews**, v. 6, n. 2, p. 215-233, 1977.

- ³⁹ GROGER, H.; HAMMER, B. Catalytic concepts for the enantioselective synthesis of alpha-amino and alpha-hydroxy phosphonates. **Chemistry-a European Journal**, v. 6, n. 6, p. 943-948, 2000.
- ⁴⁰ ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6406-6436, 2013.
- ⁴¹ MUSA, M. M. ZIEGELMANN-FJELD, K. I.; VIEILLE, C.; PHILLIPS, R. S. Activity and selectivity of W110A secondary alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* in organic solvents and ionic liquids: mono- and biphasic media. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 6, n. 5, p. 887-892, 2008.
- ⁴² CAO, L. Immobilised enzymes: science or art? **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, n. 2, p. 217-226, 2005.
- ⁴³ DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.
- ⁴⁴ REDDY, N. A review on completely biodegradable composites developed using soy-based matrices. **Journal of Reinforced Plastics and Composites**, v. 34, n. 18, p. 1457-1475, 2015.
- ⁴⁵ REDDY, N.; REDDY, R.; JIANG, Q. Crosslinking biopolymers for biomedical applications. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 6, p. 362-369, 2015.
- ⁴⁶ YE, P.; XU, Z. K.; WU, J.; INNOCENT, C.; SETA, P. Nanofibrous poly(acrylonitrile-co-maleic acid) membranes functionalized with gelatin and chitosan for lipase immobilization. **Biomaterials**, v. 27, n. 22, p. 4169-4176, 2006.
- ⁴⁷ LIU, S.; ZHANG, D. X.; LIU, L.; WANG, M.; DU, G. C.; CHEN, J. Enhanced water absorption of wheat gluten by hydrothermal treatment followed by microbial transglutaminase reaction. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 4, p. 658-663, 2010.
- ⁴⁸ ALJAWISH, A.; CHEVALOT, I.; JASNIEWSKI, J.; SCHER, J.; MUNIGLIA, L. Enzymatic synthesis of chitosan derivatives and their potential applications. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 112, p. 25-39, 2015.
- ⁴⁹ BATTISTI, M.; CAMPANA, S. P. Preparation and characterization of alpha-chitin and chitosan from the shells of *Macrobrachium rosenbergii*. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2014-2019, 2008.
- ⁵⁰ CERRUTTI, B. M.; LAMAS, J. C.; CAMPANA, S. P.; FROLLINI, E. Carboxymethyl chitosan: preparation and use in colloidal ceramic processing. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 21, n. 3, p. 816-825, 2013.
- ⁵¹ PAVINATTO, A.; SOUZA, A. L.; DELEZUK, J. A. M.; PAVINATTO, F. J.; CAMPANA-FILHO, S. P.; OLIVEIRA, JR., OSVALDO N. Interaction of O-acetylated chitosans with biomembrane models: Probing the effects from hydrophobic interactions and hydrogen bonding. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 114, p. 53-59, 2014.

- ⁵² BIRÓ, E.; NÉMETH, ÁGNES S.; SISAK, C.; FECZKÓ, T.; GYENIS, J. Preparation of chitosan particles suitable for enzyme immobilization. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, n. 6, p. 1240-1246, 2008.
- ⁵³ TAQIEDDIN, E.; AMIJI, M. Enzyme immobilization in novel alginate–chitosan core-shell microcapsules. **Biomaterials**, v. 25, n. 10, p. 1937-1945, 2004.
- ⁵⁴ ADRIANO, W. S.; MENDONÇA, D. B.; RODRIGUES, D. S.; MAMMARELLA, E. J.; GIORDANO, R. L. C. Improving the properties of chitosan as support for the covalent multipoint immobilization of chymotrypsin. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 8, p. 2170-2179, 2008.
- ⁵⁵ MENDES, A. A.; DE CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. S.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. DE L. C. Preparation and application of epoxy–chitosan/alginate support in the immobilization of microbial lipases by covalent attachment. **Reactive and Functional Polymers**, v. 73, n. 1, p. 160-167, 2013.
- ⁵⁶ DO NASCIMENTO, L.; ANGELICA, R.S; DA COSTA, C.E.F.; ZAMIAN, J. R.; DA ROCHA, G. N. Conversion of waste produced by the deodorization of palm oil as feedstock for the production of biodiesel using a catalyst prepared from waste material. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 17, p. 8314-8317, 2011.
- ⁵⁷ JUSTI, K.; LARANJEIRA, M.C.M.; NEVES, A.; MANGRICH, A.S.; FAVERE, V. T. Chitosan functionalized with 2[-bis-(pyridylmethyl) aminomethyl]4-methyl-6-formyl-phenol: equilibrium and kinetics of copper(II) adsorption. **Polymer**, v. 45, n. 18, p. 6285-6290, 2004.
- ⁵⁸ ROCHA, L.; DE SOUZA, A. L.; RODRIGUES, U. P.; CAMPANA, S. P.; SETTE, L.D.; PORTO, ALM. Immobilization of marine fungi on silica gel, silica xerogel and chitosan for biocatalytic reduction of ketones. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 84, p. 160-165, 2012.
- ⁵⁹ SIODMIAK, T.; ZIEGLER-BOROWSKA, M.; MARSZALL, M. Lipase-immobilized magnetic chitosan nanoparticles for kinetic resolution of (*R,S*)-ibuprofen. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 94, p. 7-14, 2013.
- ⁶⁰ YANG, J.; XIE, Y.; HE, W. Research progress on chemical modification of alginate: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 33-39, 2011.
- ⁶¹ WANG, Q; ZHANG, N.; HU, X.; YANG, J.; DU, Y. Alginate/polyethylene glycol blend fibers and their properties for drug controlled release. **Journal of Biomedical Materials Research Part a**, v. 82, n. 1, p. 122-128, 2007.
- ⁶² ADAM, W.; LUKACS, Z.; KAHLE, C.; SAHA-MOLLER, C. R.; SCHREIER, P. Biocatalytic asymmetric hydroxylation of hydrocarbons by free and immobilized *Bacillus megaterium* cells. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 11, n. 4-6, p. 377-385, 2001.
- ⁶³ KOH, L.; CHENG, Y.; TENG, C. P.; KHIN, Y. W.; LOH, X. J.; TEE, S. Y.; LOW, M.; YE, E. Y.; YU, H. D.; ZHANG, Y. W.; HAN, M. Y. Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials. **Progress in Polymer Science**, v. 46, p. 86-110, 2015.

- ⁶⁴ KUNDU, S.; DASH, B. C.; DASH, R.; KAPLAN, D. L. Natural protective glue protein, sericin bioengineered by silkworms: Potential for biomedical and biotechnological applications. **Progress in Polymer Science**, v. 33, n. 10, p. 998-1012, 2008.
- ⁶⁵ KUNDU, S.; DASH, B. C.; DASH, R.; KAPLAN, D. L. Invited review nonmulberry silk biopolymers. **Biopolymers**, v. 97, n. 6, p. 455-467, 2012.
- ⁶⁶ YUKSELOGLU, S.; SOKMEN, N.; CANOGLU, S. Biomaterial applications of silk fibroin electrospun nanofibres. **Microelectronic Engineering**, v. 146, p. 43-47, 2015.
- ⁶⁷ MWANGI, T. K.; BOWLES, R. D.; TAINTER, D. M.; BELL, R. D.; KAPLAN, D. L.; SETTON, L. A. Synthesis and characterization of silk fibroin microparticles for intra-articular drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 485, n. 1-2, p. 7-14, 2015.
- ⁶⁸ ACARI, J. R. F. **Preparação de micropartículas da fibroína da seda calcificadas**. 2013. 57 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
- ⁶⁹ LU, S.; WANG, X. Q.; LU, Q.; HU, X.; UPPAL, N.; OMENETTO, F. G.; KAPLAN, D. L. Stabilization of enzymes in silk films. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 5, p. 1032-1042, 2009.
- ⁷⁰ WANG, M.; JIN, H. J.; KAPLAN, D. L.; RUTLEDGE, G.C. Mechanical properties of electrospun silk fibers. **Macromolecules**, v. 37, n. 18, p. 6856-6864, 2004.
- ⁷¹ KUZUHARA, A.; ASAKURA, T.; TOMODA, R.; MATSUNAGA, T. Use of silk fibroin for enzyme membrane. **Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 199-207, 1987.
- ⁷² TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed. 2012.
- ⁷³ MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p
- ⁷⁴ HIMARA, S. W. A.; KIM, S.-K. Marine microbiology: Bioactive compounds and biotechnological applications. **Marine Microbiology: Bioactive Compounds and Biotechnological Applications**. Weinheim: Wiley, 2013. 580 p.
- ⁷⁵ TRINCONE, A. Marine biocatalysts: Enzymatic features and applications. **Marine Drugs**, v. 9, n. 4, p. 478-499, 2011.
- ⁷⁶ TRINCONE, A.; PAGNOTTA, E.; TRAMICE, A. Enzymatic routes for the production of mono- and di-glucosylated derivatives of hydroxytyrosol. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 79-83, 2012.
- ⁷⁷ TRINCONE, A. Biocatalytic processes using marine biocatalysts: Ten cases in point. **Current Organic Chemistry**, v. 17, n. 10, p. 1058-1066, 2013.
- ⁷⁸ RATEB, M.; EBEL, R. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 2, p. 290-344, 2011.

- ⁷⁹ KOHLMAYER, J. Tropical and sub-tropical filamentous fungi of the western Atlantic ocean. **Botanica Marina**, v. 22, n. 6, p. 408-408,
- ⁸⁰ RAGHUKUMAR, C. Marine fungal biotechnology: an ecological perspective. **Fungal Diversity**, v. 31, p. 19-35, 2008.
- ⁸¹ BLOMBERG, A.; ADLER, L. Physiology of osmotolerance in fungi. **Advances in Microbial Physiology**, v. 33, p. 145-212, 1992.
- ⁸² DE OLIVEIRA, J.; MIZUNO, C. M.; SELEGHIM, M. H. R.; JAVAROTI, D.C.D.; REZENDE, M.O. O.; LANDGRAF, M. D.; SETTE, L. D.; PORTO, A. L. M. Biotransformation of phenylacetone nitrile to 2-hydroxyphenylacetic acid by marine fungi. **Marine Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 97-103, 2013.
- ⁸³ MARTINS, M.; OUAZZANI, J.; ARCILE, G.; JELLER, A. H.; DE LIMA, J. P. F.; SELEGHIM, M. H. R.; OLIVEIRA, A. L. L.; DEBONSI, H. M.; VENANCIO, T.; YOKOYA, N. S.; FUJII, M. T.; PORTO, A. L. M. Biohydroxylation of (-)-Ambrox A (R), (-)-Sclareol, and (+)-Sclareolide by whole cells of Brazilian marine-derived fungi. **Marine Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 211-218, 2015.
- ⁸⁴ MAHAPATRA, D.; ASATI, V.; BHARTI, S. Chalcones and their therapeutic targets for the management of diabetes: Structural and pharmacological perspectives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 92, p. 839-865, 2015.
- ⁸⁵ CHIARADIA, L. D.; MARTINS, P. G. A.; CORDEIRO, M. N. S.; GUIDO, R. V. C.; ECCO, G.; ANDRICOPULO, A. D.; YUNES, R. A.; VERNAL, J.; NUNES, R. J.; TERENCE, H. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of chalcone derivatives as potent inhibitors of mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatases (PtpA and PtpB). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 1, p. 390-402, 2012.
- ⁸⁶ SANGSHETTI, J.; KHAN, F. A. K.; KULKARNI, A. A.; AROTE, R.; PATIL, R. H. Antileishmanial drug discovery: comprehensive review of the last 10 years. **Rsc Advances**, v. 5, n. 41, p. 32376-32415, 2015.
- ⁸⁷ WU, J.; LI, J. L.; CAI, Y. P.; PAN, Y.; YE, F. Q.; ZHANG, Y. L.; ZHAO, Y. J.; YANG, S. L.; LI, X. K.; LIANG, G. Evaluation and discovery of novel synthetic chalcone derivatives as anti-inflammatory agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 23, p. 8110-8123, 2011.
- ⁸⁸ SINGH, P.; ANAND, A.; KUMAR, V. Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 85, p. 758-777, 2006.
- ⁸⁹ MAYUR, Y.; MAYUR, Y. C.; PETERS, G.J.; PRASAD, V. V. S. R.; LEMOS, C.; SATHISH, N. K. Design of new drug molecules to be used in reversing multidrug resistance in cancer cells. **Current Cancer Drug Targets**, v. 9, n. 3, p. 298-306, 2009.
- ⁹⁰ COSTA, P.; PILLI, R.; PINHEIRO, S.; VASCONCELLOS, M. **Substâncias carboniladas e derivados**. Porto Alegre: Bookman, 2003, p. 332.

- ⁹¹ KOSAL, A.; ASHFELD, B. Titanocene-catalyzed conjugate reduction of alpha,beta-unsaturated carbonyl derivatives. **Organic Letters**, v. 12, n. 1, p. 44-47, 2010.
- ⁹² LI, X. F.; LI, L. C.; TANG, Y.F.; ZHONG, L.; CUN, L. F.; ZHU, J.; LIAO, J.; DENG, J. G. Chemoselective conjugate reduction of alpha,beta-unsaturated ketones catalyzed by rhodium amido complexes in aqueous media. **Journal of Organic Chemistry**, v. 75, n. 9, p. 2981-2988, 2010.
- ⁹³ RANU, B.; SAMANTA, S. Remarkably selective reduction of the alpha,beta-carbon-carbon double bond in highly activated alpha,beta,gamma,delta-unsaturated alkenes by the $\text{InCl}_3\text{-NaBH}_4$ reagent system. **Journal of Organic Chemistry**, v. 68, n. 18, p. 7130-7132, 2003.
- ⁹⁴ RUSSO, A.; AMEZCUA, K. L.; HUYNH, V. A.; ROUSSLANG, Z. M.; CORDES, D. B. A. simple borohydride-based method for selective 1,4-conjugate reduction of alpha,beta-unsaturated carbonyl compounds. **Tetrahedron Letters**, v. 52, n. 50, p. 6823-6826, 2011.
- ⁹⁵ LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F.; SILVEIRA, C. D. Green chemistry - The 12 principles of green chemistry and its insertion in the teach and research activities. **Quimica Nova**, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.
- ⁹⁶ FU, Y.; HOELSCH, K.; WEUSTER-BOTZ, D. A novel ene-reductase from *Synechococcus* sp PCC 7942 for the asymmetric reduction of alkenes. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 1988-1997, 2012.
- ⁹⁷ PAUL, C.; GARGIULO, S.; OPPERMAN, D. J.; LAVANDERA, I.; GOTOR-FERNANDEZ, V.; GOTOR, V.; TAGLIEBER, A.; ARENDS, I. W. C. E; HOLLMANN, F. Mimicking nature: Synthetic nicotinamide cofactors for C=C bioreduction using enoate reductases. **Organic Letters**, v. 15, n. 1, p. 180-183, 2013.
- ⁹⁸ WINKLER, C.; TASNADI, G.; CLAY, D.; HALL, M.; FABER, K. Asymmetric bioreduction of activated alkenes to industrially relevant optically active compounds. **Journal of Biotechnology**, v. 162, n. 4, p. 381-389, 2012.
- ⁹⁹ KARPLUS, P.; FOX, K.; MASSEY, V. Flavoprotein structure and mechanism: Structure-function relations for old yellow enzyme. **Faseb Journal**, v. 9, n. 15, p. 1518-1526, 1995.
- ¹⁰⁰ BLEHERT, D.; FOX, B.; CHAMBLISS, G. Cloning and sequence analysis of two *Pseudomonas* flavoprotein xenobiotic reductases. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 20, p. 6254-6263, 1999.
- ¹⁰¹ OPPERMAN, D.; PIATER, L.; VAN HEERDEN, E. A novel chromate reductase from *Thermus scotoductus* SA-01 related to old yellow enzyme. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 8, p. 3076-3082,
- ¹⁰² GORETTI, M.; PONZONI, C.; CASELLI, E.; MARCHEGIANI, E.; CRAMAROSSA, M. R.; TURCHETTI, B.; FORTI, L.; BUZZINI, P. Bioreduction of alpha,beta-unsaturated ketones and aldehydes by non-conventional yeast (NCY) whole-cells. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 5, p. 3993-3998, 2011.

- ¹⁰³ FU, Y.; CASTIGLIONE, K.; WEUSTER-BOTZ, D. Comparative characterization of novel ene-reductases from cyanobacteria. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 5, p. 1293-1301, 2013.
- ¹⁰⁴ DAWADI, P.; LUGTENBURG, J. Preparation of 5-cyano-4,6-dimethyl-2*H*-pyran-2-one and 3-cyano-5-methoxy-4-methyl-5*H*-furan-2-one via a one-pot, domino-knoevenagel process. **Synthetic Communications**, v. 40, n. 17, p. 2539-2546, 2010.
- ¹⁰⁵ GALL, M.; THOMSEN, M.; PETERS, C.; PAVLIDIS, I. V.; JONCZYK, P.; GRUNERT, P. P.; BEUTEL, S.; SCHEPER, T.; GROSS, E.; BACKES, M.; GEISSLER, T.; LEY, J. P.; HILMER, J. M.; KRAMMER, G.; PALM, G. J.; HINRICHS, W.; BORNSCHEUER, U. T. Enzymatic conversion of flavonoids using bacterial chalcone isomerase and enoate reductase. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 53, n. 5, p. 1439-1442, 2014.
- ¹⁰⁶ GORETTI, M.; PONZONI, C.; CASELLI, E.; MARCHIGIANI, E.; CRAMAROSSA, M. R.; TURCHETTI, B.; BUZZINI, P.; FORTI, L. Biotransformation of electron-poor alkenes by yeasts: Asymmetric reduction of (4*S*)-(+)-carvone by yeast enoate reductases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 6-7, p. 463-468, 2009.
- ¹⁰⁷ BRENNA, E.; GATTI, F. G.; MANFREDI, A.; MONTI, D.; PARMEGGIANI, F. Enoate reductase-mediated preparation of methyl (*S*)-2-bromobutanoate, a useful key intermediate for the synthesis of chiral active pharmaceutical ingredients. **Organic Process Research & Development**, v. 16, n. 2, p. 262-268, 2012.
- ¹⁰⁸ BRENNA, E.; GATTI, F. G.; MANFREDI, A.; MONTI, D.; PARMEGGIANI, F. Synthesis of robalzotan, ebalzotan, and rotigotine precursors via the stereoselective multienzymatic cascade reduction of α,β -unsaturated aldehydes. **Journal of Organic Chemistry**, v. 78, n. 10, p. 4811-4822, 2013.
- ¹⁰⁹ ROMAGNOLO, A.; SPINA, F.; CARUSETTA, D.; NERVA, L.; CRAMAROSSA, M. R.; PARMEGGIANI, F.; FORTI, L.; BRENNA, E.; VARESE, G. C.; PIERUCCI, S.; KLEMES, J. J. Fungal laccases and enoate reductases as biocatalysts of fine chemical transformations. **Icheap-11: 11th International Conference on Chemical and Process Engineering, Pts 1-4**, v. 32, p. 961-966, 2013.
- ¹¹⁰ MAJERIC, M.; AVDAGIC, A.; HAMERSAK, Z.; SUNJIC, V. Short chemoenzymatic synthesis of *S*-enantiomers of two systemic fungicides. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 11, p. 1189-1194, 1995.
- ¹¹¹ KORPAK, M.; PIETRUSZKA, J. Chemoenzymatic one-pot synthesis of gamma-butyrolactones. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 9, p. 1420-1424, 2011.
- ¹¹² ROCHA, L.; FERREIRA, H. V.; PIMENTA, E. F.; BERLINCK, R. G. S.; SELEGHIM, M. H. R.; JAVAROTI, D. C. D.; SETTE, L. D.; BONUGLI, R. C.; PORTO, A. L. M. Bioreduction of α -chloroacetophenone by whole cells of marine fungi. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 10, p. 1559-1563, 2009.

- ¹¹³ BOECK, P.; FALCAO, C. A. B.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; CECHINEL, V.; TORRES-SANTOS, E. C.; ROSSI-BERGMANN, B. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 1538-1545, 2006.
- ¹¹⁴ MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. In: BLUCHER, E. (Ed.). **Manual de soluções, reagentes e solventes**. São Paulo: Edgard Blucher, 1995. p. 625.
- ¹¹⁵ STROBA, A.; SCHAEFFER, F.; HINDIE, V.; LOPEZ-GARCIA, L.; ADRIAN, I.; FROHNER, W.; HARTMANN, R.; BIONDI, R.; ENGEL, M. 3,5-Diphenylpent-2-enoic acids as allosteric activators of the protein kinase PDK1: Structure-activity relationships and thermodynamic characterization of binding as paradigms for PIF-binding pocket-targeting compounds. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 15, p. 4683-4693, 2009.
- ¹¹⁶ DAVEY, W.; GWILT, J. Chalcones and related compounds. Part.1. Preparation of nitro-chalcones, amino-chalcones, and halogeno-chalcones. **Journal of the Chemical Society**, p. 1008-1014, 1957.
- ¹¹⁷ MORIARTY, R.; PENMASTA, R.; PRAKASH, I.; AWASTHI, A. Metal-metal exchange of .alpha.-metallo ketones. Novel formation of .alpha.-acyl anion and .alpha.-keto carbonium ion equivalents from (aryl)phenacyl TL-III, PB-IV, and HG-II systems. **Journal of Organic Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1022-1025, 1988.
- ¹¹⁸ YI, W.; CAI, C. Aldol condensations of aldehydes and ketones catalyzed by rare earth(III) perfluorooctane sulfonates in fluorous solvents. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 126, n. 11-12, p. 1553-1558, 2005.
- ¹¹⁹ NAIK, N.; KUMAR, H.; SWETHA, S. 1,5-diphenylpenta-1,4 dien-3-ones: A novel class of free radical scavengers. **Bulgarian Chemical Communications**, v. 43, n. 3, p. 460-464, 2011.
- ¹²⁰ LIANG, G.; YANG, S.; JIANG, L.; ZHAO, Y.; SHAO, L.; XIAO, J.; YE, F.; LI, Y.; LI, X. Synthesis and anti-bacterial properties of mono-carbonyl analogues of curcumin. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, n. 2, p. 162-167, 2008.
- ¹²¹ SHIBATA, K.; KATSUYAMA, I.; MATSUI, M.; MURAMATSU, H. Synthesis of 3-yano-2-methylpyridines substituted with heteroaromatics. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 161-165, 1991.
- ¹²² YATHIRAJAN, H.; BINDYA, S.; MITHUN, A.; NARAYANA, B.; BOLTE, M. 5-Phenyl-1-(2-thienyl)penta-2,4-dien-1-one. **Acta Crystallographica Section E-Structure Reports Online**, v. 63, p. O61-O62, 2007.
- ¹²³ KUMAR, A.; SHARMA, S.; TRIPATHI, V.; SRIVASTAVA, S. Synthesis of chalcones and flavanones using Julia-Kocienski olefination. **Tetrahedron**, v. 66, n. 48, p. 9445-9449, 2010.
- ¹²⁴ FANG, F.; LI, Y.; TIAN, S. Stereoselective olefination of *N*-sulfonyl imines with stabilized phosphonium ylides for the synthesis of electron-deficient alkenes. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 6, p. 1084-1091, 2011.

- ¹²⁵ YU, Y.; LIEBESKIND, L. Copper-mediated, palladium-catalyzed coupling of thiol esters with aliphatic organoboron reagents. **Journal of Organic Chemistry**, v. 69, n. 10, p. 3554-3557, 2004.
- ¹²⁶ HAJIPOUR, A.; ZAREI, A.; KHAZDOOZ, L.; RUOHO, A. Simple and efficient procedure for the friedel-crafts acylation of aromatic compounds with carboxylic acids in the presence of P₂O₅/AL₂O₃ under heterogeneous conditions. **Synthetic Communications**, v. 39, n. 15, p. 2702-2722, 2009.
- ¹²⁷ CHO, B.; KANG, S.; KIM, M.; RYU, S.; AN, D. Solvent-free reduction of aldehydes and ketones using solid acid-activated sodium borohydride. **Tetrahedron**, v. 62, n. 34, p. 8164-8168, 2006.
- ¹²⁸ HESSE, G.; THIEME, P. Zur Kenntnis des Distyrylcarbinols. **Annalen Der Chemie-Justus Liebig**, v. 686, p. 64, 1965.
- ¹²⁹ KAISE, H.; SHIMOKAWA, J.; FUKUYAMA, T. TMSCN/DBU-Mediated facile redox transformation of α,β -unsaturated aldehydes to carboxylic acid derivatives. **Organic Letters**, v. 16, n. 3, p. 727-729, 2014.
- ¹³⁰ KATO, D.; MITSUDA, S.; OHTA, H. Microbial deracemization of alpha-substituted carboxylic acids: Substrate specificity and mechanistic investigation. **Journal of Organic Chemistry**, v. 68, n. 19, p. 7234-7242, 2003.
- ¹³¹ ROCHA, L. C. LUIZ, R. F.; ROSSET, I. G.; RAMINELLI, C.; SELEGHIM, M. H. R.; SETTE, L. D.; PORTO, A. L. M. Bioconversion of iodoacetophenones by marine fungi. **Mar Biotechnol.** v.14, p.396-401, 2012.
- ¹³² APONTE, J.; VERASTEGUI, M.; MALAGA, E.; ZIMIC, M.; QUILIANO, M.; VAISBERG, A.; GILMAN, R.; HAMMOND, G. Synthesis, cytotoxicity, and anti-trypanosoma cruzi activity of new chalcones. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 19, p. 6230-6234, 2008.
- ¹³³ GOMHA, S.; ABDEL-AZIZ, H. Synthesis and antitumor activity of 1,3,4-thiadiazole derivatives bearing coumarine ring. **Heterocycles**, v. 91, n. 3, p. 583-592, 2015.
- ¹³⁴ TOOGOOD, H.; FRYSZKOWSKA, A.; HARE, V.; FISHER, K.; ROUJEINIKOVA, A.; LEYS, D.; GARDINER, J.; STEPHENS, G.; SCRUTTON, N. Structure-based insight into the asymmetric bioreduction of the C=C double bond of alpha,beta-unsaturated nitroalkenes by pentaerythritol tetranitrate reductase. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 350, n. 17, p. 2789-2803, 2008.
- ¹³⁵ NOWAKOWSKA, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 125-37, 2007.

- ¹³⁶ BELLO, M.; CHIARADIA, L.; DIAS, L.; PACHECO, L.; STUMPF, T.; MASCARELLO, A.; STEINDEL, M.; YUNES, R.; CASTRO, H.; NUNES, R.; RODRIGUES, C. Trimethoxy-chalcone derivatives inhibit growth of *Leishmania braziliensis*: Synthesis, biological evaluation, molecular modeling and structure-activity relationship (SAR). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 16, p. 5046-5052, 2011.
- ¹³⁷ BAI, J.; YANG, J.; LIU, P.; YANG, Q.; SHARMA, K.; SENGUPTA, K.; CHAKRAPANI, H. Transformation pathway of 2,4,6-trinitrotoluene by *Escherichia coli* nitroreductases and improvement of activity using structure-based mutagenesis. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 5, p. 705-711, 2015.
- ¹³⁸ SHARMA, K.; SENGUPTA, K.; CHAKRAPANI, H. Nitroreductase-activated nitric oxide (NO) prodrugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 21, p. 5964-5967, 2013.
- ¹³⁹ DE OLIVEIRA, I.; **Nitrorreductase: Um estudo das possíveis funções na resposta ao estresse oxidativo**. 2013. 282 f. (Tese de doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- ¹⁴⁰ TOCHER, J. Reductive activation of nitroheterocyclic compounds. **General Pharmacology**, v. 28, n. 4, p. 485-487, 1997.
- ¹⁴¹ SEVES, A.; ROMANO, M.; MAIFRENI, T.; SORA, S.; CIFERRI, O. The microbial degradation of silk: a laboratory investigation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 42, n. 4, p. 203-211, 1998.
- ¹⁴² FERREIRA, I. M.; ROCHA, L. C.; YOSHIOKA, S. A.; NITSCHKE, M.; JELLER, A. H.; PIZZUTI, L.; SELEGHIM, M. H. R.; PORTO, A. L. M. Chemoselective reduction of chalcones by whole hyphae of marine fungus *Penicillium citrinum* CBMAI 1186, free and immobilized on biopolymers. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 358-364, 2014.
- ¹⁴³ SILVA, V.; STAMBUK, B.; NASCIMENTO, M. Efficient chemoselective biohydrogenation of 1,3-diaryl-2-propen-1-ones catalyzed by *Saccharomyces cerevisiae* yeasts in biphasic system. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 63, n. 3-4, p. 157-163, 2010.
- ¹⁴⁴ NI, Y.; XU, J. Biocatalytic ketone reduction: A green and efficient access to enantiopure alcohols. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1279-1288, 2012.
- ¹⁴⁵ TORRES, S.; BAIGORI, M.; CASTRO, G. Effect of hydroxylic solvents on cell growth, sporulation, and esterase production of *Bacillus licheniformis* S-86. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 7, p. 2333-2338, 2005.
- ¹⁴⁶ BURYANOVSKYY, L.; FU, Y.; BOYD, M.; MA, Y.; HSIEH, T.-C.; WU, J. M.; ZHANG, Z. Crystal structure of quinone reductase 2 in complex with resveratrol. **Biochemistry**, v. 43, n. 36, p. 11417-11426, 2004.

- ¹⁴⁷ RANU, B. C.; SAMANTA, S. Use of indium hydride (Cl_2InH) for chemoselective reduction of the carbon-carbon double bond in conjugated alkenes. **Tetrahedron Letters**, v. 43, n. 41, p. 7405-7407, 2002.
- ¹⁴⁸ XU, H.; LIU, Y.; YAO, F. Metal-free uncatalyzed reduction of α,β -unsaturated ketones mediated by Hantzsch 1,4-dihydropyridine. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 599-601, 2008.
- ¹⁴⁹ ITO, J.-I.; UJIIE, S.; NISHIYAMA, H. New Bis(oxazolinyl)phenyl-ruthenium(II) complexes and their catalytic activity for enantioselective hydrogenation and transfer hydrogenation of ketones. **Organometallics**, v. 28, n. 2, p. 630-638, 2009.
- ¹⁵⁰ SKROBISZEWSKI, A.; OGÓREK, R.; PŁASKOWSKA, E.; GŁADKOWSKI, W. *Pleurotus ostreatus* as a source of enoate reductase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 26-31, 2013.
- ¹⁵¹ SZOSTAK, M.; SPAIN, M.; PROCTER, D. J. Electron transfer reduction of unactivated esters using $\text{SmI}_2\text{-H}_2\text{O}$. **Chemical Communications**, v. 47, n. 37, p. 10254-10256, 2011.
- ¹⁵² KNAUS, T.; MUTTI, F. G.; HUMPHREYS, L. D.; TURNER, N. J.; SCRUTTON, N. S. Systematic methodology for the development of biocatalytic hydrogen-borrowing cascades: application to the synthesis of chiral α -substituted carboxylic acids from α -substituted α,β -unsaturated aldehydes. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 223-233, 2015.
- ¹⁵³ FRONZA, G.; FUGANTI, C.; SERRA, S. Stereochemical course of baker's yeast mediated reduction of the Tri- and tetrasubstituted double bonds of substituted cinnamaldehydes. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2009, n. 35, p. 6160-6171, 2009.
- ¹⁵⁴ UEBERBACHER, B. J.; GRIENGL, H.; WEBER, H. Chemo-enzymatic synthesis of new ferrocenyl-oxazolidinones and their application as chiral auxiliaries. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 19, n. 7, p. 838-846, 2008.
- ¹⁵⁵ ROCHA, L. C.; DE SOUZA, A. L.; RODRIGUES FILHO, U. P.; CAMPANA FILHO, S. P.; SETTE, L. D.; PORTO, A. L. M. Immobilization of marine fungi on silica gel, silica xerogel and chitosan for biocatalytic reduction of ketones. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 84, p. 160-165, 2012.
- ¹⁵⁶ GONZÁLEZ-SABÍN, J.; RÍOS-LOMBARDÍA, N.; GOTOR, V.; MORÍS, F. Enzymatic transesterification of pharmacologically interesting β -aminocycloalkanol precursors. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 24, n. 21-22, p. 1421-1425, 2013.
- ¹⁵⁷ IZAKE, E. Chiral discrimination and enantioselective analysis of drugs: An overview. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 7, p. 1659-1676, 2007.
- ¹⁵⁸ NEWMAN, D.; CRAGG, G. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

- ¹⁵⁹ RAUPP, D.; PINO, J. C. D. Estereoquímica no ensino superior: historicidade e contextualização em livros didáticos de química orgânica. **Acta Scientiae**, v.17, n.1, p. 146-148, 2015.
- ¹⁶⁰ McCLEAN, K. H. Biocatalysis identification and scale-up: Molecular biology for chemistry, In: WHITTALL, J.; SUTTON, P. W. (Eds). **Practical methods for biocatalysis and biotransformation**. New York: Wiley, 2009. p. 83-85
- ¹⁶¹ FABER, K.; GADLER, P. Kinetic resolution using biotransformation, In: WHITTALL, J.; SUTTON, P. W. (Eds). **Practical methods for biocatalysis and biotransformation**. New York: Wiley, 2009. p.117-119
- ¹⁶² GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. **Tetrahedron**, v. 63, n. 8, p. 1721-1754, 2007.
- ¹⁶³ CHEN, C. FUJIMOTO, Y.; GIRDAUKAS, G.; SIH, C. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, n. 25, p. 7294-7299, 1982.
- ¹⁶⁴ NISHIMURA, R.; TOLEDO, F.; LOPES, J.; CLOSOSKI, G. Efficient synthesis of chlorohydrins using ClCH_2MgCl center dot LiCl . **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 4, p. 287-290, 2013.
- ¹⁶⁵ AMERICAN SOCIETY FOR TESTING & MATERIALS. **ASTM D 3574-03**. Standard teste methods for flexible cellular materials - slab, bonded, and molded urethane foams. West Conshohocken, 2003. v. 08.02, p. 1-23.
- ¹⁶⁶ AMERICAN SOCIETY FOR TESTING & MATERIALS. **ASTM F726-12**. Standard teste methods for sorbent performance of absorbents. West Conshohocken, 2009. v. 11.08, p. 9-15.
- ¹⁶⁷ YE, P.; XU, Z.-K.; WANG, Z.-G.; WU, J.; DENG, H.-T.; SETA, P.; Comparison of hydrolytic activities in aqueous and organic media for lipases immobilized on poly(acrylonitrile-co-maleic acid) ultrafiltration hollow fiber membrane. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 32, n. 4, p. 115-121, 2005.
- ¹⁶⁸ MANGAS-SANCHEZ, J.; BUSTO, E.; GOTOR-FERNANDEZ, V.; MALPARTIDA, F.; GOTOR, V. Asymmetric chemoenzymatic synthesis of miconazole and econazole enantiomers. The importance of chirality in their biological evaluation. **Journal of Organic Chemistry**, v. 76, n. 7, p. 2115-2122, 2011.
- ¹⁶⁹ BASAVIAH, D.; DAS, U.; ROY, S. Towards chiral diamines as chiral catalytic precursors for the borane-mediated enantioselective reduction of prochiral ketones. **Journal of Chemical Sciences**, v. 121, n. 6, p. 1003-1010, 2009.
- ¹⁷⁰ ZHANG, J. WANG, J.; QIU, Z.; WANG, Y. Highly regio- and diastereoselective halohydroxylation of olefins: a facile synthesis of vicinal halohydrins. **Tetrahedron**, v. 67, n. 36, p. 6859-6867, 2011.

- ¹⁷¹ ROMAN, G.; VLAHAKIS, J. Z.; VUKOMANOVIC, D.; NAKATSU, K.; SZAREK, W. A. Heme oxygenase inhibition by 1-Aryl-2-(1*H*-imidazol-1-yl/1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)ethanones and their derivatives. **ChemMedChem**, v. 5, n. 9, p. 1541-1555, 2010.
- ¹⁷² RIBEIRO, S. S.; RAMINELLI, C.; PORTO, A. L. M. Enzymatic resolution by CALB of organofluorine compounds under conventional condition and microwave irradiation. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 154, p. 53-59, 2010.
- ¹⁷³ ROCHA, L. C.; ROSSET, I. G.; LUIZ, R.F.; RAMINELLI, C.; PORTO, A. L. M. Kinetic resolution of iodophenylethanols by *Candida antarctica* lipase and their application for the synthesis of chiral biphenyl compounds. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 21, n. 8, p. 926-929, 2010.
- ¹⁷⁴ WESKA, R.; VIEIRA, W.; NOGUEIRA, G.; BEPPU, M. Effect of freezing methods on the properties of lyophilized porous silk fibroin membranes. **Materials Research-Ibero-American Journal of Materials**, v. 12, n. 2, p. 233-237, 2009.
- ¹⁷⁵ XU, G.; YU, H.; ZHANG, X.; XU, J. Access to optically active aryl halohydrins using a substrate-tolerant carbonyl reductase discovered from *Kluyveromyces thermotolerans*. **Acs Catalysis**, v. 2, n. 12, p. 2566-2571, 2012.
- ¹⁷⁶ HUANG, K.; WANG, H.; STEPANENKO, V.; DE JESUS, M.; TORRUELLAS, C.; CORREA, W.; ORTIZ-MARCIALES, M. Chiral epoxides via borane reduction of 2-haloketones catalyzed by spiroborate ester: Application to the synthesis of optically pure 1,2-hydroxy ethers and 1,2-azido alcohols. **Journal of Organic Chemistry**, v. 76, n. 6, p. 1883-1886, 2011.
- ¹⁷⁷ ORTIZ-MARCIALES, M.; M.; HUANG, K.; WANG, H.; DE JESUS, M.; TORRUELLAS, C.; CORREA, W.; STEPANENKO, V. Spiroborate ester-mediated asymmetric synthesis of β -hydroxy ethers and its conversion to highly enantiopure β -amino ethers. **Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 11, p. 4195-4202, 2009.
- ¹⁷⁸ CHEVREUIL, F. LANDREAU, A.; SERAPHIN, D.; LARCHER, G.; BOUCHARA, J.; RICHOMME, P. Synthesis of new 1-[2-azido-2-(2,4-dichlorophenyl)ethyl]-1*H*-imidazoles and in vitro evaluation of their antifungal activity. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 5, p. 617-622, 2008.
- ¹⁷⁹ FRINGUELLI, R.; BISTONI, F.; PITZURRA, L.; VECCHIARELLI, A. Azole derivatives of 1,4-benzothiazine as antifungal agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 103-108, 1998.
- ¹⁸⁰ GALA, D.; DIBENEDETTO, D. J.; MERGELSBERG, I.; KUGELMAN, M.; RESEARCH, S.-P. Total chiral synthesis of azole antifungals via α -hydroxylation of ketones. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 45, p. 8117-8120, 1996.
- ¹⁸¹ PERICHERLA, K.; KHEDAR, P.; KHUNGAR, B.; KUMAR, A. Click chemistry inspired structural modification of azole antifungal agents to synthesize novel 'drug like' molecules. **Tetrahedron Letters**, v. 53, n. 50, p. 6761-6764, 2012.

- ¹⁸² ROSTOM, S.; ASHOUR, H.; EL RAZIK, H.; ABD EL FATTAH, A.; EL-DIN, N. Azole antimicrobial pharmacophore-based tetrazoles: Synthesis and biological evaluation as potential antimicrobial and anticonvulsant agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 6, p. 2410-2422, 2009.
- ¹⁸³ LIN, H.; CHEN, Y.; XU, X.; XIAA, S.; WANG, L. Preparation of key intermediates of adrenergic receptor agonists: Highly enantioselective production of (*R*)-alpha-halohydrins with *Saccharomyces cerevisiae* CGMCC 2.396. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 57, n. 1-4, p. 1-5, 2009.
- ¹⁸⁴ YANG, W.; XU, J.; XIE, Y.; XU, Y.; ZHAO, G.; LIN, G. Asymmetric reduction of ketones by employing *Rhodotorula* sp. AS2.2241 and synthesis of the beta-blocker (*R*)-nifenalol. **Tetrahedron-Asymmetry**, v. 17, n. 12, p. 1769-1774, 2006.
- ¹⁸⁵ HIRATAKE, J.; INAGAKI, M.; NISHIOKA, T.; ODA, J. Irreversible and highly enantioselective acylation of 2-halo-1-arylethanol in organic solvents catalyzed by a lipase from *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 53, n. 26, p. 6130-6133, 1998.
- ¹⁸⁶ TRAFF, A.; BOGAR, K.; WARNER, M.; BACKVALL, J. Highly efficient route for enantioselective preparation of chlorohydrins via dynamic kinetic resolution. **Organic Letters**, v. 10, n. 21, p. 4807-4810, 2008.
- ¹⁸⁷ BASAVIAIAH, D.; REDDY, G.; CHANDRASHEKAR, V. A novel and effective chiral phosphoramidate catalyst for the borane-mediated asymmetric reduction of prochiral alpha-halo ketones. **Tetrahedron-Asymmetry**, v. 12, n. 4, p. 685-689, 2001.
- ¹⁸⁸ TODA, H.; IMAE, R.; ITOH, N. Efficient biocatalysis for the production of enantiopure (*S*)-epoxides using a styrene monooxygenase (SMO) and Leifsonia alcohol dehydrogenase (LSADH) system. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 23, n. 22-23, p. 1542-1549, 2012.
- ¹⁸⁹ LEE, K.; MOONEY, D. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 1, p. 106-126, 2012.
- ¹⁹⁰ SRIVASTAVA, M.; SINGH, J.; YASHPAL, M.; GUPTA, D.; MISHRA, R.; TRIPATHI, S.; OJHA, A. Synthesis of superparamagnetic bare Fe₃O₄ nanostructures and core/shell (Fe₃O₄/alginate) nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 3, p. 821-829, 2012.
- ¹⁹¹ TUMTURK, H. DEMIREL, G.; ALTINOK, H.; AKSOY, S.; HASIRCI, N. Immobilization of glucose isomerase in surface-modified alginate gel beads. **Journal of Food Biochemistry**, v. 32, n. 2, p. 234-246, 2008.
- ¹⁹² LEE, K.; KWEON, H.; YEO, J.; WOO, S.; LEE, Y.; CHO, C.; KIM, K.; PARK, Y. Effect of methyl alcohol on the morphology and conformational characteristics of silk sericin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 33, n. 1-3, p. 75-80, 2003.
- ¹⁹³ UM, I.; KWEON, H.; LEE, K.; PARK, Y. The role of formic acid in solution stability and crystallization of silk protein polymer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 33, n. 4-5, p. 203-213, 2003.

- ¹⁹⁴ KRIMM, S.; BANDEKAR, J. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. **Advances in Protein Chemistry**, v. 38, p. 181-364, 1986.
- ¹⁹⁵ BADGUJAR, K. C.; BHANAGE, B. M. Enhanced biocatalytic activity of lipase immobilized on biodegradable copolymer of chitosan and polyvinyl alcohol support for synthesis of propionate ester: Kinetic approach. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 49, p. 18806-18815, 2012.
- ¹⁹⁶ LIU, X.; CHEN, X.; LI, Y.; WANG, X.; PENG, X.; ZHU, W. Preparation of superparamagnetic Fe₃O₄-alginate/chitosan nanospheres for *Candida rugosa* lipase immobilization and utilization of layer-by-layer assembly to enhance the stability of immobilized lipase. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 4, n. 10, p. 5169-5178, 2012.
- ¹⁹⁷ OHKUMA, T.; TSUTSUMI, K.; UTSUMI, N.; ARAI, N.; NOYORI, R.; MURATA, K. Asymmetric Hydrogenation of α -chloro aromatic ketones catalyzed by η^6 -Arene/TsDPEN–uuthenium(II) complexes. **Organic Letters**, v. 9, n. 2, p. 255-257, 2007.
- ¹⁹⁸ ZHU, D.; MUKHERJEE, C.; HUA, L. ‘Green’ synthesis of important pharmaceutical building blocks: enzymatic access to enantiomerically pure α -chloroalcohols. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 16, n. 19, p. 3275-3278, 2005.
- ¹⁹⁹ POESSL, T. M.; KOSJEK, B.; ELLMER, U.; GRUBER, C. C.; EDEGGER, K.; FABER, K. Non-Racemic halohydrins via biocatalytic hydrogen-transfer reduction of halo-ketones and one-pot cascade reaction to enantiopure epoxides. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 347, n. 14, p. 1827-1834, 2005.
- ²⁰⁰ DONG, A.; PRESTRELSKI, S. J.; CARPENTER, J. F. Infrared Spectroscopic Studies of lyophilization and temperature induced protein aggregation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 84, p. 415-416, 1995.
- ²⁰¹ SERETI, V.; ZOUMPANIOTI, M.; PAPADIMITRIOU, V.; PISPAS, S.; XENAKIS, A. Biocolloids based on amphiphilic block copolymers as a medium for enzyme encapsulation. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 32, p. 9808-9816, 2014.
- ²⁰² MURESEANU, M.; GALARNEAU, A.; RENARD, G.; FAJULA, F. A new mesoporous micelle-templated silica route for enzyme encapsulation. **Langmuir**, v. 21, n. 10, p. 4648-4655, 2005.
- ²⁰³ ROBLES-MEDINA, A.; GONZÁLEZ-MORENO, P. A.; ESTEBAN-CERDÁN, L.; MOLINA-GRIMA, E. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 398-408, 2009.
- ²⁰⁴ TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 5, p. 628-634, 2010.
- ²⁰⁵ AL-ZUHAIR, S. Production of biodiesel: possibilities and challenges. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 1, n. 1, p. 57-66, 2007.

- ²⁰⁶ DA SILVA CÉSAR, A.; OTÁVIO BATALHA, M. Biodiesel production from castor oil in Brazil: A difficult reality. **Energy Policy**, v. 38, n. 8, p. 4031-4039, 2010.
- ²⁰⁷ GERALDES CASTANHEIRA, É.; GRISOLI, R.; FREIRE, F.; PECORA, V.; COELHO, S. T. Environmental sustainability of biodiesel in Brazil. **Energy Policy**, v. 65, p. 680-691, 2014.
- ²⁰⁸ CÉSAR, A. D. S.; BATALHA, M. O. Brazilian biodiesel: The case of the palm's social projects. **Energy Policy**, v. 56, p. 165-174, 2013.
- ²⁰⁹ D'AGOSTO, M. D. A.; VIEIRA DA SILVA, M. A.; DE OLIVEIRA, C. M.; FRANCA, L. S.; DA COSTA MARQUES, L. G.; SOARES MURTA, A. L.; DE FREITAS, M. A. V. Evaluating the potential of the use of biodiesel for power generation in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 43, p. 807-817, 2015.
- ²¹⁰ BERGMANN, J. C.; TUPINAMBÁ, D. D.; COSTA, O. Y. A.; ALMEIDA, J. R. M.; BARRETO, C. C.; QUIRINO, B. F. Biodiesel production in Brazil and alternative biomass feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 21, p. 411-420, 2013.
- ²¹¹ PINTO, A.; GUARIEIRO, L.; REZENDE, M.; RIBEIRO, N.; TORRES, E.; LOPES, W.; PEREIRA, P.; DE ANDRADE, J. Biodiesel: An overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1313-1330, 2005.
- ²¹² LUQUE, R.; HERRERO-DAVILA, L.; CAMPELO, J. M.; CLARK, J. H.; HIDALGO, J. M.; LUNA, D.; MARINAS, J. M.; ROMERO, A. A. BIOFUELS: A TECHNOLOGICAL PERSPECTIVE. **Energy & Environmental Science**, v. 1, n. 5, p. 542-564, 2008.
- ²¹³ DUPONT, J.; SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, M. R.; MENEGHETTI, S. M. P. Catalytic production of biodiesel and diesel-like hydrocarbons from triglycerides. **Energy & Environmental Science**, v. 2, n. 12, p. 1258-1265, 2009.
- ²¹⁴ ABDULLA, R.; RAVINDRA, P. Immobilized *Burkholderia cepacia* lipase for biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. oil. **Biomass & Bioenergy**, v. 56, p. 8-13, 2013.
- ²¹⁵ ROSSET, I. G.; TAVARES, M.; ASSAF, E.; PORTO, A. L. M. Catalytic ethanolysis of soybean oil with immobilized lipase from *Candida antarctica* and H^1 NMR and GC quantification of the ethyl esters (biodiesel) produced. **Applied Catalysis a-General**, v. 392, n. 1-2, p. 136-142, 2011.
- ²¹⁶ ROSSET, I. G.; TAVARES, M.; ASSAF, E.; PORTO, A. L. M. Enzymatic Esterification of oleic acid with aliphatic alcohols for the biodiesel production by *Candida antarctica* Lipase. **Catalysis Letters**, v. 143, n. 9, p. 863-872, 2013.
- ²¹⁷ AKOH, C. C.; CHANG, S.-W.; LEE, G.-C.; SHAW, J.-F. Enzymatic approach to biodiesel production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 22, p. 8995-9005, 2007.
- ²¹⁸ AL-ZUHAIR, S.; LING, F. W.; JUN, L. S. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. 951-960, 2007.

- ²¹⁹ DU, W.; LI, W.; SUN, T.; CHEN, X.; LIU, D. Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 3, p. 331-337, 2008.
- ²²⁰ PARK, E. Y.; SATO, M.; KOJIMA, S. Fatty acid methyl ester production using lipase-immobilizing silica particles with different particle sizes and different specific surface areas. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 889-896, 2006.
- ²²¹ ZHAO, X.; QI, F.; YUAN, C.; DU, W.; LIU, D. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 182-197, 2015.
- ²²² SHAH, S.; GUPTA, M. N. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 409-414, 2007.
- ²²³ ALLOUE, W. DESTAIN, J.; EL MEDJOUB, T.; GHALFI, H.; KABRAN, P.; THONART, P. Comparison of *Yarrowia lipolytica* lipase immobilization yield of entrapment, adsorption, and covalent bond techniques. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 150, n. 1, p. 51-63, 2008.
- ²²⁴ NARANJO, J. C.; CORDOBA, A.; GIRALDO, L.; GARCÍA, V. S.; MORENO-PIRAJÁN, J. C. Lipase supported on granular activated carbon and activated carbon cloth as a catalyst in the synthesis of biodiesel fuel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1-2, p. 166-171, 2010.
- ²²⁵ SAKAI, S.; LIU, Y.; YAMAGUCHI, T.; WATANABE, R.; KAWABE, M.; KAWAKAMI, K. Production of butyl-biodiesel using lipase physically-adsorbed onto electrospun polyacrylonitrile fibers. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7344-7349, 2010.
- ²²⁶ SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 54, n. 1-2, p. 19-26, 2008.
- ²²⁷ TRAN, D.-T.; CHEN, C.-L.; CHANG, J.-S. Effect of solvents and oil content on direct transesterification of wet oil-bearing microalgal biomass of *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biodiesel synthesis using immobilized lipase as the biocatalyst. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 213-221, 2014.
- ²²⁸ ALHASSAN, Y.; KUMAR, N.; BUGAJE, I. M.; PALI, H. S.; KATHKAR, P. Co-solvents transesterification of cotton seed oil into biodiesel: Effects of reaction conditions on quality of fatty acids methyl esters. **Energy Conversion and Management**, v. 84, n. 8, p. 640-648, 2014.
- ²²⁹ DONG, F.; JIAN, C.; FEI, Z.; KAI, G.; LIU, Z. Synthesis of chalcones via Claisen-Schmidt condensation reaction catalyzed by acyclic acidic ionic liquids. **Catalysis Communications**, v. 9, n. 9, p. 1924-1927, 2008.

- ²³⁰ PIEMONTE, V.; DI PAOLA, L.; IAQUANIELLO, G.; PRISCIANDARO, M. Biodiesel production from microalgae: ionic liquid process simulation. **Journal of Cleaner Production**, v. 111, Part A, p. 62-68, 2016.
- ²³¹ ZHOU, S.; LIU, L.; WANG, B.; XU, F.; SUN, R. C. Biodiesel preparation from transesterification of glycerol trioleate catalyzed by basic ionic liquids. **Chinese Chemical Letters**, v. 23, n. 4, p. 379-382, 2012.
- ²³² YAO, P.; YU, X.; HUANG, X. Effect of the physicochemical properties of binary ionic liquids on lipase activity and stability. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 243-249, 2015.
- ²³³ LIU, Y.; CHEN, D.; YAN, Y.; PENG, C.; XU, L. Biodiesel synthesis and conformation of lipase from *Burkholderia cepacia* in room temperature ionic liquids and organic solvents. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10414-10418, 2011.
- ²³⁴ SUNITHA, S.; KANJILAL, S.; REDDY, P.; PRASAD, R. Ionic liquids as a reaction medium for lipase-catalyzed methanolysis of sunflower oil. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 12, p. 1881-1885, 2007.
- ²³⁵ GAGNON, M.; VASUDEVAN, P. Effects of solvent and enzyme source on transesterification activity. **Energy & Fuels**, v. 25, n. 10, p. 4669-4674, 2011.
- ²³⁶ YUCEL, Y.; DEMIR, C.; DIZGE, N.; KESKINLER, B. Lipase immobilization and production of fatty acid methyl esters from canola oil using immobilized lipase. **Biomass & Bioenergy**, v. 35, n. 4, p. 1496-1501, 2011.
- ²³⁷ ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 16, n. 1, p. 53-58, 2001.
- ²³⁸ LIU, C.-H.; HUANG, C.-C.; WANG, Y.-W.; LEE, D.-J.; CHANG, J.-S. Biodiesel production by enzymatic transesterification catalyzed by *Burkholderia* lipase immobilized on hydrophobic magnetic particles. **Applied Energy**, v. 100, p. 41-46, 2012.
- ²³⁹ AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; FREIRE, D. M. G. Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. **Fuel**, v. 159, p. 52-67, 2015.
- ²⁴⁰ KAIEDA, M. ; SAMUKAWA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, n. 1, p. 12-15, 2001.
- ²⁴¹ CHRISTOPHER, L. P.; HEMANATHAN, K.; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, p. 497-520, 2014.

Capítulo 6

ANEXOS

ESPECTROS DE SUBSTÂNCIAS OBTIDAS NO CAPÍTULO 2

Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do (*E*)-3-(4-fluorofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (**3a**)

Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do (*E*)-3-(4-fluorofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (**3a**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do (*E*)-3-(4-fluofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (**3a**)

Espectro de absorção no infravermelho do (*E*)-3-(4-fluofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (**3a**)

Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do (*E*)-3-(4-bromofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (**3b**)

Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do (*E*)-3-(4-bromofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (**3b**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do (*E*)-3-(4-bromofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (**3b**)

Espectro de absorção no infravermelho do (*E*)-3-(4-bromofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (**3b**)

Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do (*E*)-3-(4-metoxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (**3c**)

Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do (*E*)-3-(4-metoxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (**3c**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do (*E*)-3-(4-metoxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (**3c**)

Espectro de absorção no infravermelho do (*E*)-3-(4-metoxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (**3c**)

Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do (*E*)-1-(4-metoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona (**3d**)

Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do (*E*)-1-(4-metoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona (**3d**)

Espectro de CG/EM do (*E*)-1-(4-metoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona (**3d**)

Espectro de absorção no infravermelho do (*E*)-1-(4-metoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona (**3d**)

Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do (*E*)-3-(3-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (**3e**)

Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do (*E*)-3-(3-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (**3e**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do (*E*)-3-(3-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (**3e**)

Espectro de absorção no infravermelho do (*E*)-3-(3-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (**3e**)

Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do (1*E*,4*E*)-1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona (**3f**)

Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do (1*E*,4*E*)-1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona (**3f**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do (1*E*,4*E*)-1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona (**3f**)

Espectro de absorção no infravermelho do (1*E*,4*E*)-1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona (**3f**)

Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do (1*E*,3*E*,6*E*,8*E*)-1,9-difenilnona-1,3,6,8-tetraen-5-ona (**3g**)

Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do (1*E*,3*E*,6*E*,8*E*)-1,9-difenilnona-1,3,6,8-tetraen-5-ona (**3g**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do (1*E*,3*E*,6*E*,8*E*)-1,9-difenilnona-1,3,6,8-tetraen-5-ona (**3g**)

Espectro de absorção no infravermelho do (1*E*,3*E*,6*E*,8*E*)-1,9-difenilnona-1,3,6,8-tetraen-5-ona (**3g**)

Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do (*E*)-3-fenil-1-(tiofen-3-il)prop-2-en-1-ona (**3h**)

Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do (*E*)-3-fenil-1-(tiofen-3-il)prop-2-en-1-ona (**3h**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do (*E*)-3-fenil-1-(tiofen-3-il)prop-2-en-1-ona (**3h**)

Espectro de absorção no infravermelho do (*E*)-3-fenil-1-(tiofen-3-il)prop-2-en-1-ona (**3h**)

Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do (2*E*,4*E*)-5-fenil-1-(tiofen-2-il)penta-2,4-dien-1-ona (**3i**)

Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do (2*E*,4*E*)-5-fenil-1-(tiofen-2-il)penta-2,4-dien-1-ona (**3i**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do (2*E*,4*E*)-5-fenil-1-(tiofen-2-il)penta-2,4-dien-1-ona (**3i**)

Espectro de absorção no infravermelho do (2*E*,4*E*)-5-fenil-1-(tiofen-2-il)penta-2,4-dien-1-ona (**3i**)

Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do (2*E*,4*E*)-1,5-difenilpenta-2,4-dien-1-ona (**3j**)

Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (2*E*,4*E*)-1,5-difenilpenta-2,4-dien-1-ona (**3j**)

Espectro de CG/EM do (2*E*,4*E*)-1,5-difenilpenta-2,4-dien-1-ona (**3j**)

Espectro de absorção no infravermelho do (2*E*,4*E*)-1,5-difenilpenta-2,4-dien-1-ona (**3j**)

Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do (3*E*,5*E*)-6-fenilhexa-3,5-dien-2-ona (**3k**)

Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do (3*E*,5*E*)-6-fenilhexa-3,5-dien-2-ona (**3k**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do (2*E*,4*E*)-1,5-difenilpenta-2,4-dien-1-ona (**3k**)

Espectro de absorção no infravermelho do (2*E*,4*E*)-1,5-difenilpenta-2,4-dien-1-ona (**3k**)

Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do (3-(4-fluorofenil)-1-fenilpropan-1-ona (**4a**)

Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do (3-(4-fluorofenil)-1-fenilpropan-1-ona (**4a**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do (3-(4-fluorofenil)-1-fenilpropan-1-ona (**4a**)

Espectro de absorção no infravermelho do (3-(4-fluorofenil)-1-fenilpropan-1-ona (**4a**)

Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 3-(4-bromofenil)-1-fenilpropan-1-ona (**4b**)

Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do 3-(4-bromofenil)-1-fenilpropan-1-ona (**4b**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do 3-(4-bromofenil)-1-fenilpropan-1-ona (**4b**)

Espectro de absorção no infravermelho do 3-(4-bromofenil)-1-fenilpropan-1-ona (**4b**)

Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 3-(4-metoxifenil-1-fenilropan-1-ona (**4c**)

Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do 3-(4-metoxifenil-1-fenilropan-1-ona (**4c**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do 3-(4-metoxifenil-1-fenilropan-1-ona (**4c**)

Espectro de absorção no infravermelho do 3-(4-metoxifenil-1-fenilropan-1-ona (**4c**)

Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 1-(4-metoxifenil)-3-fenilpropan-1-one (**4d**)

Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do 1-(4-metoxifenil)-3-fenilpropan-1-one (**4d**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do 1-(4-metoxifenil)-3-fenilpropan-1-one (**4d**)

Espectro de absorção no infravermelho do 1-(4-metoxifenil)-3-fenilpropan-1-one (**4d**)

Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 3-(3-aminofenil)-1-fenilpropan-1-ona (**4e**)

Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do 3-(3-aminofenil)-1-fenilpropan-1-ona (**4e**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do 3-(3-aminofenil)-1-fenilpropan-1-ona (**4e**)

Espectro de absorção no infravermelho do 3-(3-aminofenil)-1-fenilpropan-1-ona (**4e**)

Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 1,5-difenilpentan-3-ona (**4f**)

Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do 1,5-difenilpentan-3-ona (**4f**)

Espectro de CG/EM do 1,5-difenilpentan-3-ona (**4f**)

Espectro de absorção no infravermelho do 1,5-difenilpentan-3-ona (**4f**)

Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 3-fenil-1-(tiofen-3-il)propan-1-ona (**4h**)

Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do 3-fenil-1-(tiofen-3-il)propan-1-ona (**4h**)

Espectro de CG/EM do 3-fenil-1-(tiofen-3-il)propan-1-ona (**4h**)

Espectro de absorção no infravermelho 3-fenil-1-(tiofen-3-il)propan-1-ona (**4h**)

Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do (*E*)-5-fenil-1-(tiofen-2-il)pent-4-en-1-ona (**4i**)

Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do (*E*)-5-fenil-1-(tiofen-2-il)pent-4-en-1-ona (**4i**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do (*E*)-5-fenil-1-(tiofen-2-il)pent-4-en-1-ona (**4i**)

Espectro de absorção no infravermelho do (*E*)-5-fenil-1-(tiofen-2-il)pent-4-en-1-ona (**4i**)

Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do (*E*)-1,5-difenilpent-4-en-1-ona (**4j**)

Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do (*E*)-1,5-difenilpent-4-en-1-ona (**4j**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do (*E*)-1,5-difenilpent-4-en-1-ona (**4j**)

Espectro de absorção no infravermelho do (*E*)-1,5-difenilpent-4-en-1-ona (**4j**)

Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do (*E*)-6-fenil-hex-5-en-2-ona (**4k**)

Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do (*E*)-6-fenil-hex-5-en-2-ona (**4k**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do (*E*)-6-fenilex-5-en-2-ona (**4k**)

Espectro de absorção no infravermelho do (*E*)-6-fenilex-5-en-2-ona (**4k**)

Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 4-fenilbutan-2-ona (**4I**)

Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do 4-fenilbutan-2-ona (**4I**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do 4-fenilbutan-2-ona (**41**)

Espectro de absorção no infravermelho do 4-fenilbutan-2-ona (**41**)

Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 4-fenilbutan-2-ol (**5**)

Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do 4-fenilbutan-2-ol (**5**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do 4-fenilbutan-2-ol (**5**)

Espectro de absorção no infravermelho do 4-fenilbutan-2-ol (**5**)

Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do (2*E*,4*E*)-1,5-difenilpenta-2,4-dien-1-ol (**7**)

Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do (2*E*,4*E*)-1,5-difenilpenta-2,4-dien-1-ol

Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do (*E*)-2-metil-3-fenilprop-2-en-1-ol (**3'**)

Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do (*E*)-2-metil-3-fenilprop-2-en-1-ol (**3'**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do (*E*)-2-metil-3-fenilprop-2-en-1-ol (**3'**)

Espectro de absorção no infravermelho do (*E*)-2-metil-3-fenilprop-2-en-1-ol (**3'**)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 2-metil-3-fenilpropan-1-ol (**9**)

Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do 2-metil-3-fenilpropan-1-ol (**9**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do 2-metil-3-fenilpropan-1-ol (**9**)

Espectro de absorção no infravermelho do 2-metil-3-fenilpropan-1-ol (**9**)

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do ácido 2-metil-3-fenilpropanoico (**10**)

Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do ácido 2-metil-3-fenilpropanoico (**10**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do ácido 2-metil-3-fenilpropanoico (**10**)

ESPECTROS DE SUBSTÂNCIAS OBTIDAS NO CAPÍTULO 3

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do (*R*)-2-cloro-1-feniletanol (**2a**)

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do (*R*)-2-cloro-1-feniletanol (**2a**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do (*R*)-2-cloro-1-feniletanol (**2a**)

Espectro de absorção no infravermelho do (*R*)-2-cloro-1-feniletanol (**2a**)

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do (*R*)-2-bromo-1-pheniletanol (**2b**)

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do (*R*)-2-bromo-1-pheniletanol (**2b**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do (*R*)-2-bromo-1-feniletanol (**2b**)

Espectro de absorção no infravermelho do (*R*)-2-bromo-1-feniletanol (**2b**)

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do (*R*)-2-bromo-1-(4-bromofenil)etanol (**2c**)

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do (*R*)-2-bromo-1-(4-bromofenil)etanol (**2c**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do (*R*)-2-bromo-1-(4-bromofenil)etanol (**2c**)

Espectro de absorção no infravermelho do (*R*)-2-bromo-1-(4-bromofenil)etanol (**2c**)

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do (*R*)-2-bromo-1-(4-clorofenil)etanol (**2d**)

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do (*R*)-2-bromo-1-(4-clorofenil)etanol (**2d**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do (*R*)-2-bromo-1-(4-clorofenil)etanol (**2d**)

Espectro de absorção no infravermelho do (*R*)-2-bromo-1-(4-clorofenil)etanol (**2d**)

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do (*S*)-acetato de 2-cloro-1-(fenil)etila (**3a**)

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do (*S*)-acetato de 2-cloro-1-(fenil)etila (**3a**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do (*S*)-acetato de 2-cloro-1-(fenil)etila (**3a**)

Espectro de absorção no infravermelho do (*S*)-acetato de 2-cloro-1-(fenil)etila (**3a**)

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do (*S*)-acetato de 2-bromo-1-(fenil)etila (**3b**)

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do (*S*)-acetato de 2-bromo-1-(fenil)etila (**3b**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do (*S*)-acetato de 2-bromo-1-(fenil)etila (**3b**)

Espectro de absorção no infravermelho do (*S*)-acetato de 2-bromo-1-(fenil)etila (**3b**)

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do (*S*)-acetato de 2-bromo-1-(4-bromofenil)etila (**3c**)

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do (*S*)-acetato de 2-bromo-1-(4-bromofenil)etila (**3c**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do (*S*)-acetato de 2-bromo-1-(4-bromofenil)etila (**3c**)

Espectro de absorção no infravermelho do (*S*)-acetato de 2-bromo-1-(4-bromofenil)etila (**3c**)

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do (*S*)-acetato de 2-bromo-1-(4-clorofenil)etila (**3d**)

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do (*S*)-acetato de 2-bromo-1-(4-clorofenil)etila (**3d**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do (*S*)-acetato de 2-bromo-1-(4-clorofenil)etila (**3d**)

Espectro de absorção no infravermelho do (*S*)-acetato de 2-bromo-1-(4-clorofenil)etila (**3d**)

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do (S)-acetato de 2-cloro-1-(4-fluorofenil)etila (**3f**)

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do (S)-acetato de 2-cloro-1-(4-fluorofenil)etila (**3f**)

Espectro de CG/EM (70 EV) do (*S*)-acetato de 2-cloro-1-(4-fluorofenil)etila (**3f**)

Espectro de absorção no infravermelho do (*S*)-acetato de 2-cloro-1-(4-fluorofenil)etila (**3f**)

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do (*S*)-acetato de 2-cloro-1-*p*-toluiletila (**3g**)

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do (*S*)-acetato de 2-cloro-1-*p*-toluiletila (**3g**)

Espectro de CG/EM (70 EV) do (*S*)-acetato de 2-cloro-1-*p*-toluiletila (**3g**)

Espectro de absorção no infravermelho do (*S*)-acetato de 2-cloro-1-*p*-toluiletila (**3g**)

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do (*S,E*)- acetato de 1-cloro-4-fenilbut-3-en-2-ila (**3i**)

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do (*S,E*)- acetato de 1-cloro-4-fenilbut-3-en-2-ila (**3i**)

*Impureza

Espectro de CG/EM (70 eV) do (*S,E*)- acetato de 1-cloro-4-fenilbut-3-en-2-ila (**3i**)

Espectro de absorção no infravermelho do (*S,E*)- acetato de 1-cloro-4-fenilbut-3-en-2-ila (**3i**)

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do (*S*)-acetato de 2-cloro-1-(4-nitrofenil)etila (**3j**)

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do (*S*)-acetato de 2-cloro-1-(4-nitrofenil)etila (**3j**)

*Impureza

Espectro de CG/EM (70 eV) do (S)-acetato de 2-cloro-1-(4-nitrofenil)etila (**3j**)

Espectro de absorção no infravermelho do (S)-acetato de 2-cloro-1-(4-nitrofenil)etila (**3j**)

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do (*S*)-acetato de 1-cloro-octan-2-ila (**3k**)

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do (*S*)-acetato de 1-cloro-octan-2-ila (**3k**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do (*S*)-acetato de 1-cloro-octan-2-ila (**3k**)

Espectro de absorção no infravermelho do (*S*)-acetato de 1-cloro-octan-2-ila (**3k**)

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do (*S*)-acetato de 2-cloro-1-(3,4-dimetoxifenil)etila (**31**)

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do (*S*)-acetato de 2-cloro-1-(3,4-dimetoxifenil)etila (**31**)

*Impureza

Espectro de CG/EM (70 eV) do (*S*)-acetato de 2-cloro-1-(3,4-dimetoxifenil)etila (**31**)

Espectro de absorção no infravermelho do (*S*)-acetato de 2-cloro-1-(3,4-dimetoxifenil)etila (**31**)

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do (*S*)-2-feniloxirano (**4a**)

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do (*S*)-2-feniloxirano (**4a**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do (*S*)-2-feniloxirano (**4a**)

Espectro de absorção no infravermelho do (*S*)-2-feniloxirano (**4a**)

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do (*S*)-2-(4-bromofenil)oxirano (**4b**)

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do (*S*)-2-(4-bromofenil)oxirano (**4b**)

Espectro de CG/EM (70 EV) do (S)-2-(4-bromofenil)oxirano (**4b**)

Espectro de absorção no infravermelho do (S)-2-(4-bromofenil)oxirano (**4b**)

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do (*S*)-2-(4-clorofenil)oxirano (**4c**)

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do (*S*)-2-(4-clorofenil)oxirano (**4c**)

Espectro de CG/EM (70 eV) do (*S*)-2-(4-clorofenil)oxirano (**4c**)

Espectro de absorção no infravermelho do (*S*)-2-(4-clorofenil)oxirano (**4c**)

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) do (*S*)-1-(4-clorofenil)-2-(1*H*-imidazol-1-il)etan-1-ol (**5**)

RMN ^{13}C (500 MHz, CD_3OD) do (*S*)-1-(4-clorofenil)-2-(1*H*-imidazol-1-il)etan-1-ol (**5**)

Espectro de CG/EM (70 EV) do (S)-1-(4-clorofenil)-2-(1H-imidazol-1-il)etan-1-ol (**5**)

Espectro de absorção no infravermelho do (S)-1-(4-clorofenil)-2-(1H-imidazol-1-il)etan-1-ol (**5**)

ESPECTROS DE SUBSTÂNCIAS OBTIDAS NO CAPÍTULO 4

Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do (A) óleo de soja e (B) biodiesel etílico

Capítulo 7

PUBLICAÇÕES

PUBLICAÇÕES

FERREIRA, IRLON M.; MEIRA, ELOÁ B.; ROSSET, ISAC G.; PORTO, ANDRÉ L.M. Chemoselective biohydrogenation of α,β - and $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -unsaturated ketones by the marine-derived fungus *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 in a biphasic system. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic** v. 115, p. 59-65, 2015.

FERREIRA, IRLON M.; DE VASCONCELLOS, SUZAN P.; DA CRUZ, JOÃO B.; COMASSETO, JOÃO V.; PORTO, ANDRÉ L.M.; ROCHA, LENILSON C. Hydrogenation of bis- α,β -unsaturated enones mediated by filamentous fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 144-149, 2015.

ANDRADE, L. H.; FERREIRA, I. M.; SOUSA, B. A.; PORTO, ANDRÉ L. M. Contributions on Kinetic Resolution by Lipases on the Development of Organic Synthesis in Brazil. **Current Organic Synthesis**, v. 12, p. 696-713, 2015.

FERREIRA, I. M.; Luisa de S. Ganseli; Yoshioka, Sergio A. ; PORTO, A. L. M. . Imobilização da lipase de *Pseudomonas Fluorescens* em esferas de fibroína-alginato para produção de biodiesel. In: Kuri, Nidia Pavan; Passarini, Luis Carlos. (Org.). **Iniciação científica e tecnológica: O jovem pesquisador em ação**. IV ed. São Carlos: Centro de Tecnologia Educacional para Engenharia, v. 1, p. 419-438, 2015.

FERREIRA, I. M.; NISHIMURA, R. H. V.; SOUZA, A. B. A.; Yoshioka, Sergio A.; CLOSOSKI, G. C.; PORTO, A. L. M.. Highly enantioselective acylation of chlorohydrins using a Amano AK lipase from *P. fluorescens* immobilized in silk fibroin-alginate spheres. **Tetrahedron Letters**, v. 55, p. 5062-5065, 2014.

MACIEL FERREIRA, IRLON; COUTINHO ROCHA, LENILSON; AKINOBO YOSHIOKA, SÉRGIO; NITSCHKE, MÁRCIA ; HAROLDO JELLER, ALEX ; PIZZUTI, LUCAS ; SELEGHIM, MIRNA HELENA REGALI ; PORTO, ANDRÉ LUIZ MELEIRO . Chemoselective reduction of chalcones by whole hyphae of marine fungus *Penicillium citrinum* CBMAI 1186, free and immobilized on biopolymers. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 358-364, 2014.