UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**REAÇÕES ALDÓLICAS EM BIOCATÁLISE: O EMPREGO DE LIPASES COMO
CATALISADORES E A APLICAÇÃO DO MEIO REACIONAL DE MINIEMULSÃO**

Willian Garcia Birolli

São Carlos
2018

Willian Garcia Birolli

**REAÇÕES ALDÓLICAS EM BIOCATÁLISE: O EMPREGO DE LIPASES COMO
CATALISADORES E A APLICAÇÃO DO MEIO REACIONAL DE MINIEMULSÃO**

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

Área de concentração: Química
Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr André Luiz Meleiro Porto (IQSC-USP)

Co-orientador: Prof. Dr. Luis Joaquim Pina da Fonseca (IST-UL)

São Carlos

2017

A todos aqueles que me auxiliaram,
auxiliam e continuarão auxiliando neste
longo caminho chamado de “vida”.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Wilson e Angela, meu irmão Wellington, minha namorada Carolina e toda a minha família que me inspiraram e motivaram a encontrar o meu próprio caminho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto, pela orientação, companheirismo e confiança no meu trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Luis Joaquim Pina da Fonseca, pela orientação, amizade e oportunidade de realizar o doutorado parcial na Universidade de Lisboa.

A todos os meus amigos do laboratório de Química Orgânica e Biocatálise ao longo do mestrado e doutorado: Alex, Aline, Ana Maria, Beatriz, Bruna, Charlene, Darlisson, David, Eloá, Eugênio, Érika, Gisele, Iara, Irlon, Juliana B., Juliana G., Julieta, Katia, Laryssa, Lenilson, Lucas, Mariana, Matheus, Marylyn, Natália, Pâmela, Rafaely, Samuel, Sandra, Vanessa e Thayane pela ajuda nos momentos mais críticos, pelo companheirismo e por tornarem o laboratório um ambiente agradável e acolhedor com conversas produtivas e/ou improdutivas. Discussões que me ensinaram ciência, política, religião, sociologia, biologia, economia, história, geografia, todo e qualquer tipo de conhecimento presente na sociedade através de nossas longas argumentações.

Aos meus amigos e companheiros de viagens do Intitute for Bioengineering and Biosciences do Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa: Ana Catarina, Ana Pfluck (e Samuel), Angela, Flávio, Inês, Ivo e João.

A técnica Marília pelos ensinamentos e companheirismo ao longo destes seis anos.

Ao CNPq pelo apoio financeiro recebido através da bolsa de doutorado e doutorado parcial no exterior.

A todos os amigos e funcionários do IQSC que sempre me trataram com muita solicitude e, de forma direta ou indireta, contribuíram para a finalização deste trabalho.

Ao IQSC-USP pela formação acadêmica, profissional e pessoal que recebi durante estes 11 anos em que permaneci neste instituto até a finalização do bacharelado, mestrado e doutorado em química.

“Penso, logo existo”

René Descartes

RESUMO

As reações aldólicas vêm ganhando destaque com os recentes avanços na área de biocatálise. Uma alternativa para o uso de aldolases, que não atuam sobre uma grande variedade de substratos e possuem custos elevados, é o emprego de enzimas de outras classes que possam exercer como função promíscua a atividade aldolase. Neste trabalho lipases e celulasas foram capazes de catalisar a reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona. A lipase de *Rhizopus niveus* (RNL) catalisou a reação aldólica em solventes orgânicos na presença de água e também em tampões aquosos. As reações condicionais influenciaram o rendimento (0-99%) e a enantiosseletividade do produto aldólico *anti* (6-55% ee_{anti}). O produto aldólico com enantiosseletividade foi observado mesmo com a enzima inativa e em condições desnaturantes. Portanto, as reações aldólicas procederam por catálise proteica inespecífica com enantiosseletividades moderadas e não por atividade promíscua. Contudo, este estudo identificou um novo catalisador verde para reações aldólicas, pois foram obtidos produtos com bons rendimentos, ee e excesso diastereoisomérico (ed), demonstrando novas possibilidades para lipases, especialmente para a RNL que é pouco estudada na literatura. A partir destes resultados obtidos, uma nova abordagem baseada em sistemas reacionais de miniemulsão foi elaborada. Superando limitações para este sistema fluido não convencional como o emprego de reagente sólido (4-nitrobenzaldeído), substratos relativamente polares, solução tampão e o desenvolvimento de um procedimento de isolamento do produto. Desta maneira, foram descritos neste trabalho métodos de produção de sistemas reacionais de miniemulsão estáveis e aplicáveis, como relatado para reações aldólicas pela RNL. Empregando planejamento experimental minimizou-se a quantidade de catalisador (de 20 para 6 mg mL⁻¹) em comparação com as reações realizadas em mistura de solvente orgânico e água. Mesmo com menor quantidade de enzima, o rendimento aumentou de 25% para valores de até 65% para 48 h de reação e o ee_{anti} de 10% foi maximizado para valores acima de 30%, valor não considerado satisfatório, entretanto bem superior ao observado inicialmente. Com a interpretação estatística dos dados obtidos foi possível apresentar compreensões satisfatórias para as variações observadas de ee , ed , rendimento e tamanho médio de diâmetro das gotículas de miniemulsão, possibilitando uma compreensão mais completa deste sistema e permitindo uma melhor racionalização deste meio reacional que ainda não foi amplamente estudado e divulgado na literatura para promover reações biocatalíticas. Este estudo demonstrou a potencialidade deste método para diferentes tipos de reações orgânicas.

ABSTRACT

The aldol reactions have received attention with the recent advances in biocatalysis. In this sense, studies showed that an alternative for the use of aldolases, which do not act on a great variety of substrates and have high costs, is the use of enzymes of other classes that can present the promiscuous aldolase activity. In this work lipases and cellulases were able to catalyze the aldol reaction between 4-nitrobenzaldehyde and cyclohexanone. *Rhizopus niveus* lipase (RNL) catalyzed the aldol reaction in organic solvents with water or aqueous buffers. The reactional conditions affected the yield (0-99%) and the enantioselectivity of the *anti*-aldol product (6-55% ee_{anti}). The aldol product with enantioselectivity was observed even with the inactive enzyme and under denaturing conditions. Therefore, the aldol reaction proceeded by non-specific protein catalysis with moderate enantioselectivity and not by promiscuous activity. However, this study identified a new green catalyst for aldol reactions, since products with good yields, ee and diastereoisomeric excess (ed) were obtained, and new possibilities for lipases, especially for RNL that is understudied. From these results, a new approach based on the miniemulsion reactional system was developed. Overcoming limitations to this unconventional fluid system such as the use of a solid reagent (4-nitrobenzaldehyde), relatively polar substrates, buffer solutions and the development of a product isolation method. In this way, we have described in this work methods for the production of stable and applicable miniemulsion reaction systems for aldol reactions by RNL. Using experimental design, the amount of catalyst (from 20 to 6 mg mL⁻¹) was minimized in comparison with the reactions performed in organic solvent and water. Even with a lower amount of enzyme, the yield increased from 25% to 65% for 48 hours of reaction and the ee_{anti} of 10% was maximized to values above 30%, a value not considered satisfactory, however higher than the enantioselectivity initially observed. The statistics applied to the obtained data presented satisfactory interpretations for the observed ee , ed , yield and average diameter size of the miniemulsion droplets, allowing a more complete understanding of the miniemulsion system and allowing a better rationalization of this reactional medium that is understudied to promote biocatalytic reactions. This study demonstrated the potential of this methodology for different types of organic reactions.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismos de reação das duas diferentes classes de enzimas aldolases (Dean et al., 2007; Faber, 2011).....	3
Figura 2 - Figura da simulação de duas moléculas de hexanais (Hex1 e Hex2) ligados ao sítio ativo da CALB mutante Ser105Ala com a His 224 desprotonada. Adaptado de Branneby <i>et al.</i> , (2004).	7
Figura 3 - Mecanismo de adição aldólica entre duas moléculas de hexanal promovida pela CALB (Branneby et al., 2004).....	14
Figura 4 - Propagação do ultrassom no líquido e demonstração da formação e colapso da bolha de cavitação, fenômeno que provavelmente origina o sistema reacional de miniemulsão. Adaptado de Mason (1997)	17
Figura 5 - Ilustração para exemplificar a formação de miniemulsões. Adaptado de Zhou et al. (2014) e Juříková (2014).	18
Figura 6 - Ilustração do espalhamento de luz devido à presença de partículas ao longo do tempo. Adaptado de Jones (2010).	20
Figura 7 - Intensidade de espalhamento de luz em função do ângulo para diferentes tamanhos de partículas. Adaptado de Beckman Coulter Life Sciences (2014).	21
Figura 8 - Ilustração do gráfico obtido na medição do tamanho da gotícula de miniemulsão. Autoria própria.	22
Figura 9 - Cromatograma do produto aldólico ($\pm$)- <i>anti</i> -2-(hidroxi(4-nitrofenil)metil)ciclohexanona.	33
Figura 10 - Curva analítica obtida para o produto aldólico ($\pm$)- <i>anti</i> 2-(hidroxi(4-nitrofenil)metil)ciclohexanona para a determinação do rendimento da reação biocatalítica obtida por CLAE-UV.	33
Figura 11 - Cromatograma do produto aldólico ($\pm$)- <i>sin</i> -2-(hidroxi(4-nitrofenil)metil)ciclohexanona.	34
Figura 12 - Curva analítica obtida para o produto aldólico <i>sin</i> -2-(hidroxi(4-nitrofenil)metil)ciclohexanona para a determinação do rendimento da reação biocatalítica obtida por CLAE-UV.	34
Figura 13 - Curva analítica obtida para a determinação do valor da razão diastereosomérica do produto aldólico <i>sin</i> da reação entre a ciclohexanona e o 4-nitrobenzaldeído por CLAE-UV. .	36
Figura 14 - Cromatogramas de análise quiral obtidos para os produtos A) <i>sin</i> e B) <i>anti</i> racêmicos e para C) a reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a ciclohexanona (100 mg RNL, 4-nitrobenzaldeído (151 mg), ciclohexanona (415 μ L), 5,5 mL de DMSO e tampão imidazol 0,1 M, pH 7,0 (7:3), 30 °C, 48 h e agitação magnética.	38

Figura 15 - Ilustração do procedimento de preparo de miniemulsão e obtenção do rendimento do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona.	46
Figura 16 - Exemplo de resultado gráfico da análise de determinação do tamanho médio das gotículas de miniemulsão empregando o equipamento Zetasizer.	47
Figura 17 - Ilustração do procedimento para a análise por CLAE-UV da reação entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona em miniemulsão pela RNL.	48
Figura 18 - Ilustração do procedimento de desestabilização da miniemulsão e isolamento do produto aldólico entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona.	50
Figura 19 - Cromatogramas obtidos por CLAE para os produtos de reação aldólica por RNL durante 48 h a 30 °C em água e DMSO (3:7) para a determinação do (A) rendimento da reação aldólica e do (B) excesso enantiomérico do produto sin e anti.	58
Figura 20 - Reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona catalisada pela RNL em DMSO e solução tampão imidazol 0,1 M pH 7,0 (7:3) em diferentes tempos de reação ^{a-d}	63
Figura 21 - Reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona catalisada por RNL em DMSO e tampão aquoso imidazol 0,1M pH 7,0 (3:7) a A) 50 °C e B) 30 °C ^{a-c}	64
Figura 22 - Atividade enzimática relativa da RNL na hidrólise do PNPB após a exposição da enzima aos diferentes componentes da reação em tempos variados ^{a-c}	69
Figura 23 - Amostras do sistema reacional de miniemulsão (A) amostra 1 (separação de fases), (B) amostra 9 (presença de precipitado) e (C) amostra 13 (miniemulsão adequada). Autoria própria.	73
Figura 24 - Análise de tamanho médio de diâmetro das gotículas de miniemulsão para a amostra 2 do planejamento experimental 1 logo após o preparo da miniemulsão (A) e depois de 48 h (B).	81
Figura 25 - Gráfico de Pareto para a quantidade de hexadecano, cicloexanona e tempo de irradiação em função do tamanho médio das gotículas de miniemulsão de acordo com o primeiro planejamento experimental 2 ³	83
Figura 26 - Superfície de resposta mostrando o efeito do tempo de irradiação e da quantidade de hexadecano em função do tamanho médio das gotículas de miniemulsão de acordo com o primeiro planejamento fatorial 2 ³ em sistema de miniemulsão.	85
Figura 27 - Superfície de resposta mostrando o efeito do tempo de irradiação e da quantidade de cicloexanona em função do tamanho das gotículas de emulsão de acordo com o primeiro planejamento fatorial 2 ³ em sistema de miniemulsão.	85
Figura 28 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e de cicloexanona em função do tamanho médio das gotículas de miniemulsão de acordo com o primeiro planejamento fatorial 2 ³ em sistema de miniemulsão.	86

Figura 29 - Gráfico de Pareto para a quantidade de hexadecano, cicloexanona e tempo de irradiação em função do tamanho médio das gotículas de miniemulsão de acordo com o segundo planejamento experimental 2 ³	89
Figura 30 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e cicloexanona em função do tamanho médio das gotículas de miniemulsão de acordo com o segundo planejamento experimental 2 ³ em sistema de miniemulsão.....	90
Figura 31 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e do tempo de irradiação em função do tamanho médio das gotículas de miniemulsão de acordo com o segundo planejamento experimental 2 ³ em sistema de miniemulsão.....	91
Figura 32 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e cicloexanona em função do tamanho médio das gotículas de miniemulsão de acordo com o segundo planejamento experimental 2 ³ em sistema de miniemulsão.....	91
Figura 33 - Gráfico de Pareto para a quantidade de hexadecano, cicloexanona e 4-nitrobenzaldeído em função do tamanho médio das gotículas de miniemulsão de acordo com o terceiro planejamento experimental 2 ³	94
Figura 34 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e cicloexanona em função do tamanho médio das gotículas de miniemulsão para o terceiro planejamento experimental 2 ³ em sistema de miniemulsão.	95
Figura 35 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e 4-nitrobenzaldeído em função do tamanho médio das gotículas da miniemulsão para o terceiro planejamento experimental 2 ³ em sistema de miniemulsão.	96
Figura 36 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de cicloexanona e 4-nitrobenzaldeído em função do tamanho médio das gotículas de miniemulsão para o terceiro planejamento experimental 2 ³ em sistema de miniemulsão.	96
Figura 37 - Gráfico de Pareto para a quantidade de hexadecano, cicloexanona e tempo de irradiação em função do rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o primeiro planejamento experimental em sistema de miniemulsão.....	99
Figura 38 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e cicloexanona em função do rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o primeiro planejamento experimental 2 ³ em sistema de miniemulsão. ..	100
Figura 39 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e do tempo de irradiação em função do rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o primeiro planejamento experimental 2 ³ em sistema de miniemulsão. ..	100
Figura 40 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de cicloexanona e do tempo de irradiação em função do rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o primeiro planejamento experimental 2 ³ em sistema de miniemulsão.	101

Figura 41 - Gráfico de Pareto para a quantidade de hexadecano, cicloexanona e tempo de irradiação em função do rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o segundo planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão....	104
Figura 42 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e de cicloexanona em função do rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o segundo planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão....	105
Figura 43 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e tempo de irradiação em função do rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o segundo planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão....	106
Figura 44 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de cicloexanona e do tempo de irradiação em função do rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o segundo planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.	106
Figura 45 - Gráfico de Pareto para a quantidade de hexadecano, cicloexanona e 4-nitrobenzaldeído em função do rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o terceiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.....	109
Figura 46 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e de 4-nitrobenzaldeído em função do rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o terceiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.....	111
Figura 47 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de cicloexanona e de 4-nitrobenzaldeído em função do rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o terceiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.....	111
Figura 48 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de cicloexanona e de hexadecano em função do rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o terceiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.....	112
Figura 49 - Gráfico de Pareto para a quantidade de hexadecano, cicloexanona e tempo de irradiação em função do ed_{anti} do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o segundo planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão....	115
Figura 50 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de cicloexanona e de hexadecano em função do ed do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o primeiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão. ...	116
Figura 51 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e do tempo de irradiação em função do ed do produto de reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o primeiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão. ...	116
Figura 52 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de cicloexanona e do tempo de irradiação em função do ed do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o primeiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.	117

Figura 53 - Gráfico de Pareto para a quantidade de hexadecano, cicloexanona e tempo de irradiação em função do ed do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o segundo planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.... 119

Figura 54 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de cicloexanona e de hexadecano em função do ed do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o segundo planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.... 121

Figura 55 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e do tempo de irradiação em função do ed do produto de reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o segundo planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.... 121

Figura 56 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de cicloexanona e do tempo de irradiação em função do ed do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o segundo planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão. 122

Figura 57 - Gráfico de Pareto para a quantidade de hexadecano, cicloexanona e 4-nitrobenzaldeído em função do ed do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o terceiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.... 125

Figura 58 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de cicloexanona e de hexadecano em função do ed do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o terceiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.... 126

Figura 59 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de cicloexanona e de 4-nitrobenzaldeído em função do ed do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o terceiro planejamento experimental em sistema de miniemulsão. 126

Figura 60 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e de 4-nitrobenzaldeído em função do ed do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o terceiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.... 127

Figura 61 - Gráfico de Pareto para a quantidade de hexadecano, cicloexanona e tempo de irradiação em função do ee_{anti} do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o primeiro planejamento experimental 2^3 130

Figura 62 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de cicloexanona e do tempo de irradiação em função do ee_{anti} do produto de reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o primeiro planejamento experimental em sistema de miniemulsão. . 132

Figura 63 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e do tempo de irradiação em função do ee_{anti} do produto anti da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o primeiro planejamento experimental em sistema de miniemulsão. . 132

Figura 64 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e de cicloexanona em função do ee_{anti} do produto anti da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o primeiro planejamento experimental em sistema de miniemulsão. . 133

Figura 65 - Gráfico de Pareto para a quantidade de hexadecano, cicloexanona e tempo de irradiação em função do ee_{anti} do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o segundo planejamento experimental 2^3 .	136
Figura 66 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e de cicloexanona em função do ee_{anti} do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o segundo planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão....	137
Figura 67 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e do tempo de irradiação em função do ee_{anti} do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o segundo planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão....	138
Figura 68 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de cicloexanona e do tempo de irradiação em função do ee_{anti} do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o segundo planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.	138
Figura 69 - Gráfico de Pareto para a quantidade de hexadecano, cicloexanona e 4-nitrobenzaldeído em função do ee_{anti} do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o terceiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.	142
Figura 70 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de cicloexanona e de hexadecano em função do ee_{anti} do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o terceiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão....	143
Figura 71 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de cicloexanona e de 4-nitrobenzaldeído em função do ee_{anti} do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o terceiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.	143
Figura 72 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e 4-nitrobenzaldeído em função do ee_{anti} do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o terceiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.	144
Figura 73 - Imagem da amostra 5 do segundo planejamento experimental antes e depois do processo de desestabilização do sistema reacional de miniemulsão.	146

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação de aldolases de acordo com os seus substratos doadores (Dean <i>et al.</i> , 2007; Faber, 2011).....	5
Tabela 2 - Exemplos de reações aldólicas catalisadas por PPLII entre cetonas heterocíclicas e aldeídos aromáticos (Guan <i>et al.</i> , 2012).	8
Tabela 3 - Exemplos de reações aldólicas catalisadas por PPLII em CH ₃ CN e tampão fosfato (Zheng <i>et al.</i> , 2014).	8
Tabela 4 - Exemplos de reações aldólicas catalisadas por PPLII em CH ₃ CN e tampão fosfato (Li <i>et al.</i> , 2011; Xie <i>et al.</i> , 2012; Chen <i>et al.</i> , 2013; Fu <i>et al.</i> , 2013; Yuan <i>et al.</i> , 2013; Li <i>et al.</i> , 2015).	9
Tabela 5 - Uso de lipases para a catálise de reações aldólicas.	11
Tabela 6 - Métodos de emprego de enzimas isoladas em biocatálise, vantagens e desvantagens (De Barros <i>et al.</i> , 2011; Faber, 2011).	15
Tabela 7 - Matriz exemplo de planejamento experimental fatorial 2 ³ com ponto central em triplicata.	24
Tabela 8 - Exemplo de ANOVA empregada neste trabalho para o planejamento experimental 2 ³ com ponto central em triplicata.	24
Tabela 9 - Dados para a determinação do excesso enantiomérico por CLAE-UV e de razão diastereoisomérica por RMN de H ¹	39
Tabela 10 - Quantidades relativas dos componentes na formulação de miniemulsão.	45
Tabela 11 - Rendimento, ee _{anti} e rd para os produtos de adição aldólica utilizando diferentes enzimas que poderiam exercer atividade promíscua.	52
Tabela 12 - Reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e cicloexanona catalisada por RNL em diferentes razões de DMSO e H ₂ O.	56
Tabela 13 - Reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona catalisada por RNL em i-PrOH, MeCN, EtOH e MeOH utilizando H ₂ O como co-solvente.	59
Tabela 14 - Reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona catalisada pela RNL em diferentes razões de DMSO e tampão a pH 7,0.	61
Tabela 15 - Reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona catalisada por RNL em diferentes proporções de DMSO e solução de tampão imidazol 0.1 M, pH 7.0.	62
Tabela 16 - Reações aldólicas entre aldeídos aromáticos e cicloexanona catalisada por RNL.	66
Tabela 17 - Reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona catalisada pela RNL após diferentes pré-tratamentos.	71

Tabela 18 - Experimentos exploratórios visando a obtenção de um sistema reacional de miniemulsão estável durante 72 h para a aplicação em biocatálise.....	75
Tabela 19 - Experimentos exploratórios visando a obtenção de miniemulsão estável durante 72 h sem precipitação do reagente sólido 4-nitrobenzaldeído.....	78
Tabela 20 - Variáveis independentes do primeiro planejamento fatorial 2^3 com ponto central e resultados experimentais para o tamanho médio das gotículas de miniemulsão.....	82
Tabela 21 - Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e do tempo de irradiação de ultrassom de acordo com o primeiro planejamento fatorial 2^3 interpretado para o tamanho médio de diâmetro das gotículas de miniemulsão.	82
Tabela 22 - Variáveis independentes do segundo planejamento fatorial 2^3 com ponto central e resultados experimentais para o tamanho médio das gotículas de miniemulsão.....	88
Tabela 23 - Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e do tempo de irradiação de acordo com o segundo planejamento fatorial 2^3 interpretado para o tamanho médio das gotículas de miniemulsão.	88
Tabela 24 - Variáveis independentes do terceiro planejamento fatorial 2^3 com ponto central e resultados experimentais para o tamanho médio de diâmetro das gotículas de miniemulsão..	92
Tabela 25 - Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e do 4-nitrobenzaldeído de acordo com o terceiro planejamento experimental 2^3 interpretado para o tamanho médio das gotículas de miniemulsão.	93
Tabela 26 - Variáveis independentes do primeiro planejamento fatorial 2^3 com ponto central e resultados experimentais para o rendimento reacional da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona.....	97
Tabela 27 - Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e do tempo de irradiação frente ao rendimento da reação aldólica para o primeiro planejamento fatorial 2^3 em sistema de miniemulsão.	98
Tabela 28 - Variáveis independentes do planejamento fatorial 2^3 com ponto central e resultados experimentais para o rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona no segundo planejamento experimental em sistema de miniemulsão.	102
Tabela 29 - Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e do tempo de irradiação frente ao rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona de acordo com o segundo planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.....	103

Tabela 30 - Variáveis independentes do planejamento fatorial 2^3 com ponto central e resultados experimentais para o tamanho médio das gotículas da miniemulsão do terceiro planejamento experimental.	108
Tabela 31 - Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e do tempo de irradiação frente ao rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona de acordo com o terceiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.	109
Tabela 32 - Variáveis independentes do primeiro planejamento fatorial 2^3 com ponto central e resultados experimentais frente ao ed do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona.....	113
Tabela 33 - Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e do tempo de irradiação para a reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona de acordo com o segundo planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.	114
Tabela 34 - Variáveis independentes do planejamento fatorial 2^3 com ponto central e resultados experimentais para o ed _{anti} do produto aldólico.....	118
Tabela 35 - Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e do tempo de irradiação frente ao ed do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona de acordo com o segundo planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.....	119
Tabela 36 - Variáveis independentes do planejamento fatorial 2^3 com ponto central e resultados experimentais de ed do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona de acordo com o terceiro planejamento experimental 2^3	123
Tabela 37 - Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e 4-nitrobenzaldeído frente ao ed do produto aldólico entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o terceiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.	124
Tabela 38 - Variáveis independentes do primeiro planejamento fatorial 2^3 com ponto central e resultados experimentais frente ao excesso enantiomérico do produto anti da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona em sistema de miniemulsão.	128
Tabela 39 - Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e tempo de irradiação para o primeiro planejamento experimental 2^3 frente ao excesso enantiomérico do produto anti na reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona.	129
Tabela 40 - Variáveis independentes do planejamento fatorial 2^3 com ponto central e resultados experimentais para o ee da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona.....	134
Tabela 41 - Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e do tempo de irradiação frente ao ee _{anti} do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona. .	135

Tabela 42 - Variáveis independentes do planejamento fatorial 2^3 com ponto central e resultados experimentais para o ee_{anti} do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona do terceiro planejamento experimental 2^3	140
Tabela 43 - Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e 4-nitrobenzaldeído frente ao ee_{anti} do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o terceiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.	141
Tabela 44 - Variáveis independentes do planejamento fatorial 2^3 com ponto central do quarto planejamento experimental em sistema de miniemulsão.	145

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Exemplos dos diferentes tipos de promiscuidades enzimáticas da enzima CALB; (a) promiscuidade de condição (Rocha <i>et al.</i> , 2013), (b) promiscuidade de substrato (Khare <i>et al.</i> , 2009) e (c) promiscuidade de catálise (Branneby <i>et al.</i> , 2003).	6
Esquema 2 - Primeira reação aldólica assimétrica descrita na literatura (Li <i>et al.</i> , 2008).	8
Esquema 3 - Reação aldólica descarboxilativa por lipase de <i>Mucor miehei</i> seguida pela resolução enzimática por <i>Candida antarctica</i> A em reação do tipo “one-pot” (Xu <i>et al.</i> , 2016).	10
Esquema 4 - Reação aldólica catalisada pela enzima PPLII seguida por uma MCR em reação do tipo one-pot para a síntese do spiro-oxazino (Chen <i>et al.</i> , 2016).	10
Esquema 5 - Reação de esterificação catalisada por cutinase de <i>Fusarium solani</i> pisi em meio reacional de miniemulsão (De Barros <i>et al.</i> , 2011).	19
Esquema 6 - Reação de adição aldólica para a obtenção de produtos racêmicos.	30
Esquema 7 - Triagem enzimática para a catálise da reação aldólica entre a cicloexanona e o 4-nitrobenzaldeído.	31
Esquema 8 - Reação aldólica promíscua catalisada com a lipase de <i>Rhizopus niveus</i>	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍGLAS

ANC = Celulase de *Aspergillus niger*

ANL = Lipase de *Aspergillus niger*

ANH = Hemicelulase de *Aspergillus niger*

BCL = Amano lipase de *Burkholderia cepacia*

CCL = Lipase de *Candida cylindracea*

CLAE-UV = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Espectroscopia de Ultravioleta

CRL = Lipase de *Candida rugosa* tipo VII

Hex. = Hexano

IV = Espectroscopia no Infravermelho

Iso = Isopropanol

PFL = Amano lipase AK de *Pseudomonas fluorescens*

PMSF = Fluoreto de fenilmetilsulfonila

PPLII = Lipase de pâncreas suíno

Ppm = Partes por milhão

PNPB = *para*-nitrofenilbutirato

RMN de ^1H = Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s = singleto, d = dubleto, t = tripleto

RNL = Lipase de *Rhizopus niveus*

TLL = Lipase de *Thermomyces lanuginosus*

TMS = Tetrametilsilano

TVC = Celulase de *Trichoderma viride*

LISTA DE SÍMBOLOS

δ = deslocamento químico

R^2 = coeficiente de determinação

R^2_{aj} = coeficiente de determinação ajustado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aldolases	2
1.2. Promiscuidade enzimática	5
1.3. Condições de usos dos biocatalisadores	15
1.4. Uso de miniemulsões em biocatálise	16
1.5. Medição do tamanho médio das gotículas de miniemulsão	19
1.6. Planejamento experimental fatorial 2^3 com método de superfície de resposta	23
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo geral	27
2.2. Metas específicas	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. Reagentes e solventes	28
3.2. Enzimas	28
3.3. Métodos de análises, identificação e caracterização dos compostos	28
3.3.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^1H)	28
3.3.2. Espectroscopia na região de absorção no Infravermelho (IV)	29
3.3.3. Medidas de rotação ótica	29
3.3.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV)	29
3.3.5. Outros equipamentos utilizados	30
3.4. Síntese de padrões racêmicos dos produtos de reação de adição aldólica	30
3.5. Reação aldólica por enzima promíscua	31
3.5.1. Triagem enzimática	31
3.5.2. Reação aldólica catalisada pela lipase de <i>Rhizopus niveus</i> (RNL)	31
3.6. Determinação do rendimento, diastereosseletividade e enantiosseletividade	32
3.6.1. Rendimento	32

3.6.2. Diastereosseletividade	35
3.6.3. Enantioseletividade	37
3.7. Pré-tratamento da enzima para a análise de catálise proteica inespecífica.....	43
3.8. Determinação de atividade enzimática	43
3.9. Miniemulsão	45
3.9.1. Preparo da miniemulsão.....	45
3.9.2. Caracterização da miniemulsão	47
3.9.3. Reação enzimática em sistema de miniemulsão	48
3.9.4. Desestabilização do sistema de miniemulsão para a obtenção do produto isolado	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1. Síntese dos padrões racêmicos de adição aldólica para as análises cromatográficas	51
4.2. Reações aldólicas catalisadas por enzimas promíscuas.....	52
4.2.1. Seleção de enzimas para a reação de adição aldólica	52
4.2.2. Maximização de rendimento da reação aldólica entre a cicloexanona e o 4-nitrobenzaldeído por RNL	56
4.2.3. Emprego de diferentes substratos na reação aldólica utilizando RNL	64
4.2.4. Avaliação da atividade promíscua	67
4.3. Aplicação de miniemulsão em reações aldólicas	72
4.3.1. Experimentos exploratórios visando a obtenção de um sistema de miniemulsão estável para a aplicação em biocatálise	72
4.3.2. Experimentos exploratórios visando a obtenção de um sistema de miniemulsão entre 1 e 500 nm para aplicação em biocatálise	77
4.4. Planejamento experimental 2 ³ para as reações aldólicas.....	80
4.4.1. Tamanho médio das gotículas de miniemulsão	80
4.4.2. Rendimento	97

4.4.3. Excesso diastereoisomérico	113
4.4.4. Excesso enantiomérico	128
4.5. Metodologia para a extração do produto aldólico do sistema reacional de miniemulsão	146
5. CONCLUSÃO	147
REFERÊNCIAS	149
APÊNDICES	155

1. INTRODUÇÃO

As rotas sintéticas que incluem o uso de uma ou mais etapas biocatalíticas vêm avançando nos últimos anos, principalmente pela descoberta de novas enzimas, pela tecnologia do DNA recombinante e processos que permitem uma maior estabilidade das condições reacionais e produtividade (Bommarius e Bettine, 2004). Reações catalíticas vêm sendo amplamente empregados na indústria, de modo que aproximadamente 80% de todos os processos envolvendo catálise são realizados utilizando-se biocatalisadores. Atualmente, métodos biocatalíticos representam a principal estratégia da biotecnologia aplicada para a síntese de moléculas bioativas, gerando um valor de mercado de cerca de 400 bilhões de euros (Faber, 2011).

No início do século, um estudo sobre 134 biotransformações em escala industrial (superior a 100 kg) com o uso de células inteiras ou enzimas com precursores diferentes de fonte de carbono foi avaliado. Onde se observou que as hidrolases (44%) seguidas pelas óxido-redutases (30%) dominam as aplicações industriais biocatalíticas (Bommarius e Bettine, 2004).

Contudo, outros tipos de reações em biocatálise vêm chamando a atenção e entre elas se destaca a reação aldólica, uma das metodologias mais importantes na construção de ligações carbono-carbono (C-C) (Faber, 2011). Melhoramentos nestas reações, incluindo as realizadas por meio de biocatálise têm sido desenvolvidas, já que as reações aldólicas são muito interessantes para a preparação de compostos orgânicos biológicos como carboidratos e aminoácidos, os quais possuem vários grupos funcionais e centros estereogênicos (Brovetto *et al.*, 2011).

Abordagens sintéticas convencionais normalmente requerem o uso extensivo de grupos protetores e um rigoroso controle estereoquímico (Solomons e Fryhle, 2012), gerando a necessidade de novos biocatalisadores como os que podem ser identificados através do uso da atividade promíscua aldolase em diferentes enzimas (Branneby *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2008).

Uma vez que as enzimas aldolases que realizam estas reações apresentam grande especificidade, principalmente no que se refere às moléculas doadoras (fosfato de diidroxiacetona e piruvato) da reação aldólica, os quais são substratos considerados caros para aplicações industriais em biocatálise (Dean *et al.*, 2007; Lopez-Iglesias e Gotor-Fernandez, 2015).

Como alternativas para o uso de aldolases podem ser utilizadas enzimas de outras classes que também possam exercer como função promíscua a atividade aldolase. A

promiscuidade enzimática pode ser dividida em três classes: *promiscuidade de condição* (atividade enzimática em condições reacionais diferentes das que ocorrem naturalmente gerando deslocamento de equilíbrio), *promiscuidade de substrato* (enzimas capazes de catalisar a reação com diferentes substratos) e *promiscuidade catalítica* (capacidade de um sítio catalítico de catalisar mais de uma reação química diferente) (Hult e Berglund, 2007; Busto *et al.*, 2010).

Foi constatado que uma maior variedade de compostos pode ser utilizada como aceitadores e doadores (promiscuidade de substrato) nas reações de adições aldólicas por enzimas com *atividade promíscua* (Zheng *et al.*, 2014; Kapoor *et al.*, 2015). Assim, surge a possibilidade de redução de custos e do emprego destas enzimas em diferentes reações dando origem a processos mais sustentáveis através do uso da promiscuidade enzimática (Lopez-Iglesias e Gotor-Fernandez, 2015). Entretanto, é importante distinguir entre a *catálise enzimática* que ocorre no sítio catalítico em uma reação desejada (catálise específica) da *catálise proteica inespecífica*, na qual um ou mais resíduos de aminoácidos realizam a reação aldólica. Na literatura já foram descritas reações aldólicas sem enantiosseletividade promovidas por proteínas, como albumina de soro bovino, caracterizando uma catálise proteica inespecífica (Benedetti *et al.*, 2011; Lopez-Iglesias e Gotor-Fernandez, 2015).

Apesar dos recentes avanços no emprego de enzimas promíscuas, os resultados descritos na literatura deixam a desejar em relação à velocidade de reação e à enantiosseletividade dos produtos. Desta maneira, novas enzimas e metodologias como o uso de miniemulsões podem ser empregadas visando melhores resultados.

1.1. Aldolases

A família das enzimas aldolases é dividida em dois grupos baseados em seus mecanismos. A *Classe I* das aldolases, encontradas principalmente em plantas e animais superiores, ativam os substratos doadores pela formação de uma base de Schiff com uma lisina no sítio ativo. A enamina formada posteriormente ataca com alta seletividade a face apropriada do aceitador da ligação, por exemplo, um aldeído. Posteriormente a ligação imina é hidrolisada liberando o produto. Na *Classe II* das aldolases, geralmente encontrada em bactérias e fungos, um co-fator metálico está ligado ao sítio ativo da enzima por resíduos de histidina. Este íon metálico, geralmente Zn^{2+} , apesar de que Co^{2+} e Fe^{2+} também podem ser ativos, age como ácido de Lewis para ativar a ligação do substrato doador (Figura 1) (Bolt *et al.*, 2008; Faber, 2011).

Figura 1 - Mecanismos de reação das duas diferentes classes de enzimas aldolases (Dean *et al.*, 2007; Faber, 2011).

Mecanismo da Classe I

Mecanismo da Classe II

As aldolases ligam-se aos seus respectivos substratos doadores com grande especificidade e geralmente não aceitam outros compostos para exercerem a mesma função, mesmo com estruturas muito similares aos doadores naturais. Esta especificidade de doadores gerou uma classificação funcional dessas enzimas. Uma classe importante de aldolases utiliza *fosfato de diidroxiacetona* (DHAP) como substrato doador e catalisa reações com uma variedade relativamente grande de aldeídos aceptores (Dean *et al.*, 2007; Faber, 2011).

Membros bem conhecidos desta classe enzimática são a frutose 1,6-difosfato aldolase e a L-rhamnulose 1-fosfato aldolase. Entretanto, a necessidade do doador DHAP considerado caro para processos industriais é a maior desvantagem frente ao uso destas enzimas. Foram desenvolvidos e relatados vários métodos de geração de DHAP, mas os esforços recentes são direcionados para a substituição da necessidade do DHAP por evolução dirigida ou engenharia de reação e para a exploração de enzimas desconhecidas em triagens de microrganismos (Dean *et al.*, 2007; Faber, 2011).

A classe dependente de *piruvato/fosfoenolpiruvato* das aldolases é um grande grupo de enzimas que vem sendo usada na preparação de vários α -cetoácidos. Um membro desta classe é a ácido *N*-acetilneuramínico aldolase (ou ácido siálico aldolase) que tem sido estudada principalmente devido ao fato de que a estereoquímica do produto é definida pela estrutura do substrato empregado (Dean *et al.*, 2007; Faber, 2011). A estereosseletividade do produto é controlada e determinada termodinamicamente. De maneira que, por exemplo, o ataque ocorreria pela face *Re* caso o produto resultante seja mais estável que o obtido pelo ataque pela face *Si* (Lin *et al.*, 1992).

A família de aldolases dependentes de *acetaldeído* contém apenas um membro conhecido, a 2-desoxi-D-ribose-5-fosfato aldolase (DERA), a qual é capaz de adicionar duas moléculas de acetaldeído ao aldeído aceitador. Assim como outras aldolases, esta enzima é capaz de utilizar diferentes aceitadores aldeídicos não naturais (Dean *et al.*, 2007; Faber, 2011).

Uma outra família de aldolases são as dependentes de *glicina*. Estas enzimas catalisam a formação reversível dos aminoácidos hidroxilados treonina e serina. As aldolases dependentes de glicina não foram empregadas como catalisadores sintéticos, assim como as outras aldolases.

A Tabela 1 apresenta os quatro tipos de aldolases, destacando-se que atualmente mais de 30 aldolases são conhecidas (Dean *et al.*, 2007; Faber, 2011).

Tabela 1 - Classificação de aldolases de acordo com os seus substratos doadores (Dean *et al.*, 2007; Faber, 2011).

Doador	Aceitador	Produto	Aldolase
			Frutose 1,6-difosfato aldolase
			Rhamnulose 1-fosfato aldolase
			Ácido N-acetilneuramínico aldolase
			2-Desoxirribose-5-fosfato aldolase
			L-Treonina aldolase

1.2. Promiscuidade enzimática

A promiscuidade enzimática pode ser classificada em três tipos:

(a) *promiscuidade de condição*: quando uma enzima apresenta atividade catalítica em diversas condições de reações diferentes das quais ocorrem naturalmente, como em meio anidro, temperatura e pH extremo. Como exemplo pode ser citado a resolução cinética de álcoois (β -azidofeniletanois) por CALB que é realizada em hexano e acetato de vinila (Esquema 1a) (Rocha *et al.*, 2013).

b) *promiscuidade de substrato*: nos casos onde a enzima possui uma especificidade ampla de substratos, como por exemplo na formação de amidas graxas por CALB (Esquema 1b) (Khare *et al.*, 2009).

c) *promiscuidade de catálise*: enzimas que catalisam diferentes transformações químicas com mais de um estado de transição, como pode ser o caso da CALB na catálise da reação aldólica entre duas moléculas de hexanal (Esquema 1c) (Branneby *et al.*, 2003; Hult e Berglund, 2007).

Esquema 1 - Exemplos dos diferentes tipos de promiscuidades enzimáticas da enzima CALB; (a) promiscuidade de condição (Rocha *et al.*, 2013), (b) promiscuidade de substrato (Khare *et al.*, 2009) e (c) promiscuidade de catálise (Branneby *et al.*, 2003).

Enzimas são catalisadores específicos, mas usualmente possuem atividades secundárias chamadas de *atividades promíscuas*, as quais estão sobre efeitos da evolução e da seleção natural. A promiscuidade enzimática é comum, estando presente na maior parte das enzimas e é essencial para a evolução de novas funções enzimáticas. Apesar de serem irrelevantes fisiologicamente devido às velocidades extremamente baixas, essas atividades podem ser uma vantagem muito importante. Principalmente quando um organismo está sobre pressão seletiva, pois podem conferir benefícios fazendo com que a atividade promíscua se torne a principal função da enzima (Khersonsky e Tawfik, 2010).

No que se refere à biocatálise, a promiscuidade enzimática é de relevância por permitir a ampliação dos tipos de reações frente a substratos xenobióticos. Entretanto, é importante ressaltar que a maior parte das enzimas contemporâneas apresentam grande especificidade e eficiência resultantes da otimização evolutiva, apesar destes biocatalisadores terem evoluído a partir de enzimas ancestrais com funções promíscuas e/ou multifuncionais. Portanto, a realização de mais de uma reação por uma única enzima é uma característica presente em diversos biocatalisadores (Babtje *et al.*, 2010).

Neste contexto, Branneby *et al.* (2003) descreveram o primeiro exemplo de catálise de reações aldólicas por lipases. Neste estudo empregou-se CALB nativa e mutante (Ser105Ala) para catalisar a adição aldólica entre duas moléculas de hexanal (Esquema 1c). Como resultado

dos experimentos foi observado que ambas as enzimas (nativa e mutante) foram capazes de realizar a adição aldólica, com resultados melhores para a enzima mutante, entretanto ambas apresentaram baixas eficiências nos rendimentos, aproximadamente 4%. Posteriormente, foi demonstrado que os baixos rendimentos foram causados pela baixa frequência de formação de complexos próximos de ataque, ou seja, a reação não ocorre devido à grande distância entre a tríade catalítica e a molécula de aldeído no sítio catalítico, onde o N da His224 fundamental para a catálise permaneceu distante do hidrogênio α -ácido do aldeído doador (Figura 2) (Branneby *et al.*, 2004).

Figura 2 - Figura da simulação de duas moléculas de hexanais (Hex1 e Hex2) ligados ao sítio ativo da CALB mutante Ser105Ala com a His 224 desprotonada. Adaptado de Branneby *et al.*, (2004).

As reações aldólicas por lipases vêm sendo desenvolvidas e diversos trabalhos foram descritos. A primeira reação aldólica assimétrica catalisada por lipase foi descrita por Li *et al.* (2008) onde foi empregado a enzima PPL (lipase de pâncreas de porco) que catalisou a adição aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a acetona na presença de água (Esquema 2). Posteriormente, alguns trabalhos foram realizados visando o emprego da PPL com diferentes substratos e condições reacionais. Como no uso de cetonas heterocíclicas e 4-nitrobenzaldeído, onde foi comprovado a participação do sítio ativo e da estrutura terciária da enzima na catálise enzimática, pois o emprego de um inibidor de serina hidrolase e de condições desnaturantes inibiu a atividade aldolase (Tabela 2) (Guan *et al.*, 2012).

Em outro estudo foi observado que a PPLII catalisou a reação aldólica em condições otimizadas empregando-se tampão fosfato para um amplo grupo de substratos, como cetonas cíclicas, aldeídos aromáticos e heteroaromáticos. Neste estudo foram descritos os melhores

rendimentos para os produtos aldólicos (Tabela 3) (Zheng *et al.*, 2014), de modo que a enzima PPLII foi a mais estudada para a aplicação em reações aldólicas por atividade promíscua (Eremeev e Zaitsev, 2016).

A enzima PPL ainda foi utilizada na catálise de reações aldólicas entre aldeídos aromáticos e cetonas cíclicas em solventes eutéticos (*Deep Eutetic Solvents*) com rendimentos superiores a 90%, mostrando que meios não convencionais podem ser uma alternativa para reações aldólicas catalisadas por lipases (Gonzalez-Martinez *et al.*, 2016). Posteriormente, em outro estudo foi relatado o uso dessa enzima em acetonitrila e água juntamente com CoCl_2 como cofator e foi observado um modesto aumento na enantiosseletividade do produto aldólico *anti* (Yildiz *et al.*, 2017).

Esquema 2 - Primeira reação aldólica assimétrica descrita na literatura (Li *et al.*, 2008).

Tabela 2 - Exemplos de reações aldólicas catalisadas por PPLII entre cetonas heterocíclicas e aldeídos aromáticos (Guan *et al.*, 2012).

X	R	Rendimento (%)	rd	ee (%)
NBoc	3-Br	38	47:53	65
NBoc	4-NO ₂	49	62:38	62
NBoc	2-NO ₂	36	53:47	87
O	2-NO ₂	43	48:52	62
S	2-NO ₂	31	83:17	74

Tabela 3 - Exemplos de reações aldólicas catalisadas por PPLII em CH_3CN e tampão fosfato (Zheng *et al.*, 2014).

X	R	Rendimento (%)	rd	ee (%)
C	4-NO ₂	98	82:18	74
C	2-NO ₂	53	82:18	82
O	2-NO ₂	20	67:33	70
S	2-NO ₂	17	74:26	80

*Tampão fosfato 0,2 M, pH 5,41.

Posteriormente, foi reportada a reação aldólica assimétrica entre a acetona e o 4-nitrobenzaldeído por outras classes de enzimas, como a pepsina (protease) em água, fornecendo um excesso enantiomérico de 44% e rendimento de 69% para o produto aldólico 4-hidroxi-4-(4-nitrofenil)butan-2-ona (Li *et al.*, 2010).

Ainda no que se referem às hidrolases (lipases, proteases e esterases), a protease alcalina de *Bacillus licheniformis* (BLAP) foi empregada em reações aldólicas entre aldeídos aromáticos e cetonas cíclicas em meio orgânico na presença de água (Li *et al.*, 2011). Assim como a protease ácida de *Aspergillus usarii* (AUP) (Xie *et al.*, 2012), a chimopapaina (CHI) (He *et al.*, 2012), a tripsina (TRIP) (Chen *et al.*, 2013), a ficina (FIC) (Fu *et al.*, 2013), a proteinase de *Aspergillus melleus* (AMP) (Yuan *et al.*, 2013), a Nuclease P1 de *Penicillium citrinum* (NUC) (Li *et al.*, 2011), a esterase termofílica APE1547 em altas temperaturas (50-80 °C) (Haoran *et al.*, 2014) e a esterase de *Sulfolobus tokodaii* (STE) (Li *et al.*, 2015) (Tabela 4).

Tabela 4 - Exemplos de reações aldólicas catalisadas por PPLII em CH₃CN e tampão fosfato (Li *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013; Fu *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015).

Enzima	Tempo (h)	Rendimento	<i>rd</i>	<i>ee</i> (%)
BLAP	72	91	68:32	70
AUP	144	63	83:17	82
CHI	240	19	47:53	26
TRIP	144	60	73:27	60
FIC	120	36	41:59	60
AMP	143	87	83:17	84
NUC	165	55	70:30	79
STE	72	3	78:22	66

ee = excesso enantiomérico; *rd* = razão diastereoisomérica.

Uma abordagem interessante descrita na literatura foi o uso da lipase de *Mucor miehei* para a catálise de uma reação aldólica descarboxilativa seguida por uma reação de resolução enzimática por lipase A de *Candida antarctica* em um procedimento *one-pot* gerando derivados de (*S*)-β-hidroxicetonas e (*R*)-β-hidroxicetonas aciladas, reduzindo-se as etapas de purificação entre as duas reações (Esquema 3) (Xu *et al.*, 2016).

A promiscuidade enzimática também foi empregada em reações enzimáticas multicomponentes (MCR). Onde a reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona foi realizada pela enzima PPLII e em seguida foi realizada uma MCR que forneceu os derivados

de spiro-oxazino em reações do tipo *one-pot* construindo seis ligações C-C/N e dois anéis em uma única etapa, [Esquema 4 \(Chen *et al.*, 2016\)](#).

Esquema 3 - Reação aldólica descarboxilativa por lipase de *Mucor miehei* seguida pela resolução enzimática por *Candida antarctica* A em reação do tipo “one-pot” ([Xu *et al.*, 2016](#)).

Esquema 4 - Reação aldólica catalisada pela enzima PPLII seguida por uma MCR em reação do tipo *one-pot* para a síntese do spiro-oxazino ([Chen *et al.*, 2016](#)).

Também foram descritas as atividades aldolases em proteínas como a albumina humana e bovina entre aldeídos aromáticos e cetonas, entretanto houve a formação de produto aldólico sem excesso enantiomérico ([Benedetti *et al.*, 2011](#)). Segundo Lopez-Iglesias e Gotor-Fernández é importante a distinção entre a catálise no centro ativo enzimático (catálise específica) para a realização de uma reação desejada e a atuação de resíduos de aminoácidos fora do sítio ativo que também são capazes de catalisar a reação, chamada de *catálise proteica inespecífica* ([Lopez-Iglesias e Gotor-Fernandez, 2015](#)).

A [Tabela 5](#) resume exemplos de lipases para a catálise de reações aldólicas.

Tabela 5 - Uso de lipases para a catálise de reações aldólicas.

Enzima	Referência ^a	Substrato	Condição	Referência ^b
Lipase de pâncreas suíno	(Li et al., 2008)	Acetona e aldeídos aromáticos	Acetona com pouca quantidade de H ₂ O	-
	(Li et al., 2010)	Acetona e 4-nitrobenzaldeído	H ₂ O	-
	(Guan et al., 2012)	Cetonas heterocíclicas e aldeídos aromáticos com grupos retiradores de elétrons	H ₂ O e CH ₃ CN (1:10), outros solventes orgânicos	-
	(Xie et al., 2013)	Aldeídos aromáticos e cetonas cíclicas	Pouca quantidade de água em solventes orgânicos	-
	(Zheng et al., 2014)	Cetonas cíclicas e aldeídos aromáticos e heteroaromáticos	Diferentes solventes orgânicos, temperatura, quantidade de água e tampão fosfato	-
	(Yildiz et al., 2017)	Cetonas aromáticas, heteroaromáticas cíclicas, acíclicas com diferentes aldeídos	Diferentes temperaturas solventes e o uso de cofatores como CoCl ₂ .	-
	(Branneby et al., 2003)	Hexanal	Sem solvente	-
Lipase de <i>Candida antarctica</i>	(Li et al., 2010)	Acetona e 4-nitrobenzaldeído	H ₂ O	-
	(Kapoor et al., 2015)	2-ciclo-hexen-1-ona e 4-nitrobenzaldeído	H ₂ O e DMSO (3:7)	-
Lipase de <i>Mucor javanicus</i>	(Li et al., 2008)	Acetona e aldeídos aromáticos	Acetona com pouca quantidade de H ₂ O	-
	(Li et al., 2010)	Acetona e 4-nitrobenzaldeído	H ₂ O	-
	(Kapoor et al., 2015)	4-nitrobenzaldeído e 2-ciclo-hexen-1-ona	H ₂ O e DMSO (3:7)	-
Lipase A de <i>Aspergillus niger</i> (Amano)	(Guan et al., 2012)	Cetonas heterocíclicas e 4-nitrobenzaldeído	H ₂ O e CH ₃ CN (1:10)	-
	(Zheng et al., 2014)	Cicloexanona e 4-nitrobenzaldeído	H ₂ O e CH ₃ CN (1:10)	-
	(Yildiz et al., 2017)	Cetonas aromáticas, heteroaromáticas cíclicas, acíclicas e diferentes aldeídos	Diferentes temperaturas solventes e o uso de cofatores como CoCl ₂	-

Continuação				
Enzima	Referência ^a	Substrato	Condição	Referência ^b
Lipase de pâncreas bovino	(Xie <i>et al.</i> , 2013)	Cetonas cíclicas e aldeídos aromáticos	Tampão citrato-fosfato em diferentes pHs com CH ₃ CN	-
Lipase de gérmen de trigo	(Guan <i>et al.</i> , 2012)	Cetona heterocíclica e 4-nitrobenzaldeído	H ₂ O e CH ₃ CN (1:10)	-
Lipase PS de <i>Burkholderia cepacia</i> (Amano)	(Zheng <i>et al.</i> , 2014)	Cicloexanona e 4-nitrobenzaldeído	H ₂ O e CH ₃ CN (1:10)	-
	-	Acetona e 4-nitrobenzaldeído	H ₂ O	(Li <i>et al.</i> , 2010)
	(Kapoor <i>et al.</i> , 2015)	4-nitrobenzaldeído e 2-ciclo-hexen-1-ona	H ₂ O e DMSO (3:7)	-
Lipase AK de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (Amano)	(Zheng <i>et al.</i> , 2014)	Cicloexanona e 4-nitrobenzaldeído	H ₂ O e CH ₃ CN (1:10)	-
	(Li <i>et al.</i> , 2010)	Acetona e 4-nitrobenzaldeído	H ₂ O	
Lipase de <i>Mucor miehei</i>	(Li <i>et al.</i> , 2008)	Acetona e aldeídos aromáticos	Acetona com pouca quantidade de H ₂ O	-
	(Li <i>et al.</i> , 2010)	Acetona e 4-nitrobenzaldeído	H ₂ O	
	(Kapoor <i>et al.</i> , 2015)	4-Nitrobenzaldeído e 2-ciclo-hexen-1-ona	H ₂ O e DMSO (3:7)	-
Lipase de <i>Candida rugosa</i>	-	Acetona e aldeídos aromáticos	Acetona com pouca quantidade de H ₂ O	(Li <i>et al.</i> , 2008)
	-	Acetona e 4-nitrobenzaldeído	H ₂ O	(Li <i>et al.</i> , 2010)
	-	Cetonas heterocíclicas e 4-nitrobenzaldeído	H ₂ O e CH ₃ CN (1:10)	(Guan <i>et al.</i> , 2012)
	(Kapoor <i>et al.</i> , 2015)	4-nitrobenzaldeído e 2-ciclohexen-1-ona	H ₂ O e DMSO (3:7)	-
Lipase de <i>Candida cylindracea</i>	(Zheng <i>et al.</i> , 2014)	Cicloexanona e 4-nitrobenzaldeído	H ₂ O e CH ₃ CN (1:10)	-
	-	Acetona e 4-nitrobenzaldeído	H ₂ O	(Li <i>et al.</i> , 2010)
Lipase de <i>Rhizopus niveus</i>	-	Cetonas heterocíclicas e 4-nitrobenzaldeído	H ₂ O e CH ₃ CN (1:10)	(Guan <i>et al.</i> , 2012)
	-	Cicloexanona e 4-nitrobenzaldeído	H ₂ O e CH ₃ CN (1:10)	(Zheng <i>et al.</i> , 2014)
Lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>	(Li <i>et al.</i> , 2010)	Acetona e 4-nitrobenzaldeído	H ₂ O	-
Lipase de pâncreas suíno	(Li <i>et al.</i> , 2010)	Acetona e 4-nitrobenzaldeído	H ₂ O	-
Lipase de <i>Pseudomonas cepacea</i>	-	Acetona e aldeídos aromáticos	Solventes orgânicos com pouca quantidade de H ₂ O	(Li <i>et al.</i> , 2008)

Continuação				
Enzima	Referência ^a	Substrato	Condição	Referência ^b
Lipase de <i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	Acetona e aldeídos aromáticos	Solventes orgânicos com pouca quantidade de H ₂ O	(Li <i>et al.</i> , 2008)
Lipase de <i>Penicillium comemberti</i>	-	Acetona e 4-nitrobenzaldeído	H ₂ O	(Li <i>et al.</i> , 2010)
Albumina de soro bovino (BSA)	(Li <i>et al.</i> , 2008)	Acetona e aldeídos aromáticos	Solventes orgânicos com pouca quantidade de H ₂ O	-
	(Guan <i>et al.</i> , 2012)	Cetonas heterocíclicas e 4-nitrobenzaldeído	H ₂ O e CH ₃ CN (1:10)	-
	(Zheng <i>et al.</i> , 2014)	Ciclo-hexanona e 4-nitrobenzaldeído	H ₂ O e CH ₃ CN (1:10)	-

^a Trabalhos onde a catalise da reação aldólica foi observado para a enzima destacada.

^b Trabalhos em que não foi observado o produto da reação aldólica para a enzima destacada.

Um mecanismo de reação entre duas moléculas de hexanal pela CALB a partir de cálculos mecânico-quânticos foi proposto na literatura (Branneby *et al.*, 2004). A reação foi favorecida pelo aumento da acidez do hidrogênio alfa do aldeído devido à coordenação na cavidade do oxiânion da enzima, enquanto a histidina do sítio catalítico atua como uma base para a remoção deste hidrogênio α -ácido. Logo, o intermediário enolato estabilizado pela cavidade do oxiânion reage com uma segunda molécula de hexanal promovendo a formação da ligação carbono-carbono (Figura 3).

Figura 3 - Mecanismo de adição aldólica entre duas moléculas de hexanal promovida pela CALB (Branneby *et al.*, 2004).

1.3. Condições de usos dos biocatalisadores

Os biocatalisadores podem ser utilizados em diversas condições e formas para a realização de reações de biocatálise ou biotransformação, incluindo células, caldos ou extratos enzimáticos e enzimas livres ou imobilizadas. A decisão sobre o emprego de enzimas isoladas ou microrganismos inteiros de forma livre ou imobilizada depende de muitos fatores como o tipo de reação, se existem cofatores a serem utilizados e reciclados e a escala em que a reação biocatalítica pode ser realizada. As vantagens e desvantagens gerais do uso de enzimas isoladas são bem conhecidas e devem ser levados em conta antes de qualquer experimento, [Tabela 6](#) ([Faber, 2011](#)).

Tabela 6 - Métodos de emprego de enzimas isoladas em biocatálise, vantagens e desvantagens ([De Barros *et al.*, 2011](#); [Faber, 2011](#)).

Forma	Vantagens	Desvantagens
Todas	<ul style="list-style-type: none"> • Aparato e processamento simples • Melhor produtividade devido à maior tolerância às altas concentrações 	<ul style="list-style-type: none"> • Estabilidade limitada das enzimas • Reciclo de cofatores é necessário
Dissolvido em água	<ul style="list-style-type: none"> • Melhores atividades enzimáticas 	<ul style="list-style-type: none"> • Reações laterais são possíveis • Substratos lipofílicos são insolúveis • Processamento requer extração
Suspensa em solventes orgânicos	<ul style="list-style-type: none"> • Fácil realização e processamento • Solubilidade de compostos lipofílicos • Fácil recuperação das enzimas 	<ul style="list-style-type: none"> • Atividades enzimáticas reduzidas
Imobilizada	<ul style="list-style-type: none"> • Fácil recuperação das enzimas 	<ul style="list-style-type: none"> • Perda da atividade durante a imobilização
Miniemulsões	<ul style="list-style-type: none"> • Maior rendimento e emprego de água como meio reacional 	<ul style="list-style-type: none"> • Interferência na atividade enzimática e na purificação do produto

1.4. Uso de miniemulsões em biocatálise

Emulsões são caracterizadas pela formação de um sistema constituído de duas fases (aquosa/orgânica), onde a fase contínua (aquosa) suspende micelas formadas por surfactantes (moléculas anfifílicas como o tween 80) e co-surfactantes (compostos apolares como o hexadecano) (Carvalho e Cabral, 2000). Geralmente emulsões geradas a partir de agitação magnética convencional geram micelas de vários micrômetros. Logo, para a redução do diâmetro média das gotículas de emulsão e consequentemente a geração de uma maior área superficial através da formação de miniemulsões (as quais devem apresentar diâmetro médio inferior a 500 nm) é necessário o emprego de técnicas mais energéticas (De Barros *et al.*, 2011).

O ultrassom é definido como o som de frequência entre 20 kHz e 100 MHz, e diversos estudos vêm sendo realizados sobre a sonoquímica, principalmente em síntese orgânica, emulsificação de soluções, degradação de polímeros, polimerização, sonoluminescência (emissão de rápidos picos de luz por bolhas que implodem por estimulação sonora), sonólise (formação de radicais livres), formação de sonogéis e preparação de catalisadores. Destacando-se que o método mais empregado em laboratórios de pesquisa para a preparação de miniemulsões é a irradiação de ultrassom, devido à facilidade de emprego da técnica e rapidez. (Thompson e Doraiswamy, 1999; Sancheti e Gogate, 2017).

O ultrassom é propagado via uma série de ondas de compressão e rarefação através do meio líquido que provoca o fenômeno conhecido como cavitação. Durante a propagação das ondas acústicas o líquido é submetido alternadamente à compressão e rarefação, e se a energia aplicada for suficientemente elevada, durante a rarefação, ela pode superar as forças intermoleculares que mantêm a estrutura do líquido, formando bolhas cavitacionais. Estas bolhas aumentarão durante os ciclos seguintes, pela formação de vapor ou aquisição de gás do meio. De maneira que se a amplitude atingir um valor crítico, dependendo da frequência, ocorre um processo de expansão súbita até um tamanho instável e, consequentemente, um colapso violento, com liberação de grande quantidade de energia, Figura 4 (Mason, 1997).

Contudo devido ao emprego dessa grande quantidade de energia, é preciso observar se a reação em questão não é catalisada durante o processo de irradiação de ultrassom, uma vez que os reagentes empregados geralmente já estão presentes na amostra durante o processo de formação do sistema reacional de miniemulsão. Também é importante ressaltar que catalisadores, como enzimas, e reagentes instáveis devem ser adicionados ao meio reacional somente após este processo de irradiação de ultrassom.

Figura 4 - Propagação do ultrassom no líquido e demonstração da formação e colapso da bolha de cavitação, fenômeno que provavelmente origina o sistema reacional de miniemulsão. Adaptado de [Mason \(1997\)](#)

Miniemulsões são sistemas heterofásicos onde emulsões com grande estabilidade são criadas e homogeneizadas para a obtenção de gotículas de diâmetro médio entre 30 e 500 nm. De maneira que em uma miniemulsão de óleo em água, típica, como a empregada em reações de esterificação, a fase apolar é constituída dos substratos e um agente de estabilização das emulsões (hexadecano, co-surfactante), enquanto a fase polar é constituída de um emulsificante (tween 80, surfactante) e água ([Landfester, 2001](#); [Landfester, 2009](#); [De Barros *et al.*, 2010](#)).

As principais vantagens do emprego de miniemulsões são a grande área superficial para catálise, a estabilidade das gotículas na reação e a solubilização de compostos apolares ([Aschenbrenner *et al.*, 2009](#)). Além do emprego de água que constitui 80% (m/m) do meio reacional ([Landfester, 2006](#)), permitindo a redução de custos e é ambientalmente sustentável ([Wei *et al.*, 2005](#); [Moniruzzaman *et al.*, 2008](#)).

Ainda, o uso de água como meio reacional promove diversas vantagens, pois além de ser um solvente inócuo, não é inflamável, não-tóxico, de baixo custo e prontamente disponível. A maioria dos processos biológicos e reações enzimáticas são realizados em meio aquoso ([Weiss e Landfester, 2013](#)). Entretanto, uma grande parte dos compostos apolares é insolúvel em água, fato que limita o seu uso como solvente em reações químicas. Desta maneira uma alternativa é o emprego de miniemulsões, pois possibilita o uso de compostos apolares em meios contendo pelo menos 80% de água ([Landfester, 2009](#)).

A fase apolar do sistema é constituída pelos substratos, surfactante e co-surfactante. Na miniemulsão, os substratos se posicionam no interior da micela enquanto o surfactante fica na interface, uma vez que se trata de uma molécula anfifílica, permitindo a distribuição da fase apolar na fase aquosa. Simplificadamente, as micelas de miniemulsão podem ser consideradas nanorreatores individuais que disponibilizam uma área superficial muito grande, [Figura 5](#).

Figura 5 - Ilustração para exemplificar a formação de miniemulsões. Adaptado de [Zhou *et al.* \(2014\)](#) e [Juříková \(2014\)](#).

Recentemente o sistema de miniemulsões tem se mostrado promissor para reações enzimáticas catalisadas por lipases como a polimerização, preparação de compostos orgânicos opticamente ativos e esterificação, além do emprego de cutinases na síntese de ésteres alquílicos, [Esquema 5 \(De Barros *et al.*, 2011\)](#).

Para o nosso conhecimento ainda não foram relatadas na literatura aplicações industriais de sistemas reacionais de miniemulsão. Isto se deve ao fato do meio reacional não convencional de miniemulsão não ter sido amplamente estudado, apresentando limitações como a obtenção de miniemulsões estáveis na presença de tampões salinos para realização de reações em pH constante, um procedimento para desestabilização do sistema de miniemulsão para a purificação e isolamento do produto obtido e a compreensão sobre as interações entre a quantidade de surfactante, co-surfactante e reagentes empregados.

Esquema 5 - Reação de esterificação catalisada por cutinase de *Fusarium solani pisi* em meio reacional de miniemulsão (De Barros *et al.*, 2011).

1.5. Medição do tamanho médio das gotículas de miniemulsão

O Espalhamento de Luz Dinâmico (*Dynamic Light Scattering, DLS*), também conhecido como Espectroscopia de Correlação de Fótons (*Photon Correlation Spectroscopy, PCS*) ou ainda Difração de Laser (*Laser Diffraction, LD*) é atualmente a técnica mais empregada para a medida do tamanho de partículas (Mehnert e Mader, 2012). Esta técnica consiste na dependência do ângulo de difração no raio da partícula, onde partículas menores geram um maior espalhamento de luz do que partículas maiores. De maneira que empregando esta técnica pode-se cobrir um intervalo grande de tamanhos, que vão de nanômetros a poucos milímetros.

Partículas suspensas em meio líquido estão em constante movimento devido às colisões randômicas com as moléculas da fase líquida que está em contato com a partícula, efeito nomeado de movimento Browniano. Na técnica DLS um raio de laser é direcionado através da amostra e a flutuação da intensidade do espalhamento de luz causado pelo movimento das partículas é medido. Portanto, comparando a intensidade do sinal com o padrão de picos produzido ao longo de intervalos curtos é possível a observação de variações dos mesmos ao longo do tempo (Mehnert e Mader, 2012; Beckman Coulter Life Sciences, 2014).

Uma vez que partículas menores movimentam-se mais rapidamente que as maiores, logo, os padrões de picos de partículas maiores flutuam vagarosamente quando comparados com partículas menores (Figura 6). A relação entre o tamanho da partícula e a sua velocidade no movimento Browniano é definida pela equação de Stokes-Einstein (Equação 1) (Malvern Instruments, 2004).

Figura 6 - Ilustração do espalhamento de luz devido à presença de partículas ao longo do tempo. Adaptado de Jones (2010).

$$d(H) = \frac{\kappa T}{3\pi\eta R} \text{ (Equação 1)}$$

Onde:

$d(H)$ = diâmetro hidrodinâmico

κ = constante de Boltzmann

T = Temperatura absoluta

η = viscosidade do solvente

R = coeficiente de difusão translacional

Para um aumento da sensibilidade da DLS para partículas menores foi desenvolvida a tecnologia do Espalhamento Diferencial de Intensidade Polarizada (Polarization Intensity Differential Scattering, *PIDS*) (Mehnert e Mader, 2012). De maneira que quando a amostra é iluminada com uma luz de um comprimento de onda polarizado, ocorre uma oscilação do campo elétrico que promove a propagação de luz em todas as direções, a qual é detectada. Sendo assim, a amostra é primeiramente irradiada com luz polarizada verticalmente e depois com luz polarizada horizontalmente (Beckman Coulter Life Sciences, 2014).

A luz espalhada é medida em um intervalo de ângulos e a distribuição do tamanho da partícula pode ser determinado pela variação entre a luz espalhada verticalmente e horizontalmente. Posteriormente, a integração da intensidade pelo ângulo de espalhamento obtido fornece uma distribuição contínua de espalhamento de luz, baseando-se no espalhamento de luz em ângulos maiores para partículas menores (Figura 7) (Beckman Coulter Life Sciences, 2014).

Figura 7 - Intensidade de espalhamento de luz em função do ângulo para diferentes tamanhos de partículas. Adaptado de Beckman Coulter Life Sciences (2014).

O sistema ZetaSizer Nano usa a técnica DLS/PIDS para a medida do tamanho de partícula ou emulsão de poucos nanômetros até aproximadamente 3 µm. O programa usa algoritmos para gerar uma distribuição de tamanhos de diâmetro de gotículas (Malvern Instruments, 2004). Uma ilustração do resultado da análise e da distribuição de tamanho de diâmetros de gotículas de miniemulsão estão ilustrados na Figura 8.

Este método não mede diretamente o tamanho da partícula, de maneira que este parâmetro é calculado a partir de efeitos de espalhamento de luz detectados pelo instrumento. De modo que os erros analíticos podem se tornar expressivos para as amostras com diferentes tamanhos e de formatos não esféricos (Das e Chaudhury, 2011; Tamjidi *et al.*, 2013).

Figura 8 - Ilustração do gráfico obtido na medição do tamanho da gotícula de miniemulsão. Autoria própria.

No caso do sistema reacional de miniemulsão, o formato da gotícula é sempre esférico de modo que isto não se torna um problema analítico, entretanto é importante levar em consideração a amplitude de distribuição de tamanhos, relatado pelo Índice de Polidispersividade (*Polydispersity Index, PDI*) que fornece informação sobre a largura da distribuição do diâmetro das gotículas de miniemulsão e é obtido a partir da medida de DLS. Quanto menor o PDI determinado, menos disperso é o tamanho da gotícula de miniemulsão ([Malvern Instruments, 2004](#)).

De maneira geral, valores de PDI no intervalo de 0,1 a 0,25 correspondem a uma distribuição estreita e bem definida dos tamanhos das gotículas, enquanto que valores acima de 0,1 indicam distribuições muito amplas ([Malvern Instruments, 2004](#); [Das e Chaudhury, 2011](#); [Tamjidi et al., 2013](#)).

1.6. Planejamento experimental fatorial 2^3 com método de superfície de resposta

Um experimento fatorial com 3 fatores (por exemplo: quantidade de hexadecano, quantidade de cicloexanona e tempo de irradiação de ultrassom no preparo do sistema da miniemulsão) em que cada fator apresente 2 níveis é denominado de planejamento fatorial 2^3 . De modo que o emprego deste método consiste em realizar os experimentos para as diferentes combinações entre os fatores, para em seguida interpretar e determinar os principais efeitos e interações sobre a variável resposta de interesse, visando a obtenção de melhores condições experimentais para a obtenção de um produto de melhor qualidade (Duran *et al.*, 1951). O modelo estatístico do planejamento de experimentos fatorial 2^3 é dado pela Equação 2 (Montgomery, 1991).

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + \gamma_k + (\tau\beta_{ij}) + (\tau\gamma_{ik}) + (\beta\gamma_{jk}) + (\tau\beta\gamma_{ijk}) + \varepsilon_{ijk} \text{ (Equação 2)}$$

Onde:

μ = média dos resultados

τ_i = efeito principal do fator X_1

β_j = efeito principal do fator X_2

γ_k = efeito principal do fator X_3

$(\tau\beta_{ij})$ = efeito de interação entre os fatores X_1 e X_2

$(\tau\gamma_{ik})$ = efeito de interação entre os fatores X_1 e X_3

$(\beta\gamma_{jk})$ = efeito de interação entre os fatores X_2 e X_3

$(\tau\beta\gamma_{ijk})$ = efeito de interação entre os fatores X_1 , X_2 e X_3

Pode-se então ilustrar um planejamento com três fatores (X_1 , X_2 e X_3) com cada um destes fatores apresentando dois níveis (-1, +1). Adicionalmente também foi empregado o ponto central (0,0) que consiste na introdução do nível 0, o qual é um ponto intermediário entre os níveis -1 (valor mínimo empregado) e +1 (valor máximo empregado). Os pontos centrais em triplicatas são empregados para preservar a linearidade dos fatores avaliados e estimar os erros experimentais (Montgomery, 1991; Galdámez, 2002).

Uma matriz exemplo de planejamento experimental fatorial 2^3 é representada na Tabela 7, onde as características avaliadas estão apresentadas nas colunas X_1 , X_2 e X_3 (quantidade do co-surfactante hexadecano, quantidade do reagente cicloexanona e tempo de irradiação de ultrassom ou quantidade do reagente 4-nitrobenzaldeído) com as linhas representando as combinações entre os diferentes níveis codificados (-1, +1 e 0) e a variável resposta (rendimento, excesso enantiomérico, excesso diastereoisomérico ou tamanho médio das gotículas de miniemulsão) apresentada na coluna Y_i (Galdámez, 2002).

Tabela 7 - Matriz exemplo de planejamento experimental fatorial 2^3 com ponto central em triplicata.

N teste	Variáveis independentes			Variável Resposta (Yi) [Rendimento, <i>ee</i> , <i>ed</i> ou tamanho de gotícula]
	X ₁ [Quantidade do co-surfactante hexadecano]	X ₂ [Quantidade do reagente ciclohexanona]	X ₃ [Tempo de irradiação ou quantidade de 4-nitrobenzaldeído]	
1	-1	-1	-1	Y ₁
2	-1	1	-1	Y ₂
3	1	-1	-1	Y ₃
4	1	1	-1	Y ₄
5	-1	-1	1	Y ₅
6	-1	1	1	Y ₆
7	1	-1	1	Y ₇
8	1	1	1	Y ₈
9	0	0	0	Y ₉
10	0	0	0	Y ₁₀
11	0	0	0	Y ₁₁

ee = excesso enantiomérico; *ed* = excesso diastereoisomérico.

N teste = número do ensaio; X₁, X₂ e X₃ = variáveis independentes; Y_i = variável resposta.

A partir da realização de um planejamento experimental fatorial 2^3 pode-se realizar uma análise de variância (ANOVA). A ANOVA é utilizada para distinguir se as diferenças amostrais são reais (causadas por diferenças significativas nas amostras observadas) ou casuais (ocasionada pelo acaso), uma exemplo de ANOVA empregada neste trabalho foi apresentada na [Tabela 8](#) (Milone, 2009).

Tabela 8 - Exemplo de ANOVA empregada neste trabalho para o planejamento experimental 2^3 com ponto central em triplicata.

Fator	SQ	GL	MQ	F	Valor-p
X ₁	SQ _{X1}	GL _{X1}	MQ _{X1}	F _{X1}	Val-p _{X1}
X ₂	SQ _{X2}	GL _{X2}	MQ _{X2}	F _{X2}	Val-p _{X2}
X ₃	SQ _{X3}	GL _{X3}	MQ _{X3}	F _{X3}	Val-p _{X3}
X ₁ .X ₂	SQ _{X1.X2}	GL _{X1.X2}	MQ _{X1.X2}	F _{X1.X2}	Val-p _{X1.X2}
X ₂ .X ₃	SQ _{X2.X3}	GL _{X2.X3}	MQ _{X2.X3}	F _{X2.X3}	Val-p _{X2.X3}
X ₁ .X ₃	SQ _{X1.X3}	GL _{X1.X3}	MQ _{X1.X3}	F _{X1.X3}	Val-p _{X1.X3}
X ₁ .X ₂ .X ₃	SQ _{X1.X2.X3}	GL _{X1.X2.X3}	MQ _{X1.X2.X3}	F _{X1.X2.X3}	Val-p _{X1.X2.X3}
Falta de ajuste	SQ _{Falta de ajuste}	GL _{Falt.aj.}	MQ _{Falt.aj}	F _{Falt.aj}	Val-p _{Falt.aj}
Erro Puro	SQ _{Erro puro}	GL _{Er.p.}	MQ _{Falt.aj}		
SQ Total	SQ _{Total}	GL _{Total}			
R ²	Valor de R ²				
R ² _{aj}	Valor de R ² _{aj}				

*X₁, X₂ e X₃ = variáveis independentes; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; F = valor de F; valor-p = valor de p.

Em uma tabela de ANOVA são apresentadas diversas informações. Entre elas destaca-se o valor de F (determinado pela divisão da Média Quadrada do Grupo pela Média Quadrada dos Resíduos), o qual deve ser maior que o valor de F-tabelado (de acordo com o grau de liberdade) para a determinação da existência de diferença significativa entre os valores tratados para o nível de significância escolhido. Caso contrário, não rejeitamos a hipótese nula, ou seja, não existe diferença significativa devido aos fatores avaliados (Calado e Montgomery, 2003).

Outro valor que informa a significância do fator avaliado (X_1 , X_2 ou X_3) é o p-valor. De modo que se o p-valor é maior que a significância empregada (5% ou 0,05 neste trabalho), o fator avaliado não apresenta evidência significativa, ou seja, rejeitamos a hipótese nula (Milone, 2009).

O coeficiente de determinação, usualmente denotado como R^2 , é empregado para determinar o quanto a equação da regressão múltipla se ajusta aos dados experimentais. O valor de R^2 e R^2_{aj} é sempre definido entre 0 e 1, de maneira que quanto mais próximo de 1 melhor é a estimativa fornecida pela equação e a explicação da variável resposta pelas alterações nos fatores avaliados (Calado e Montgomery, 2003).

A principal diferença entre o R^2 e o R^2_{aj} é que o R^2 aumenta automaticamente à medida que são adicionadas novas variáveis independentes à equação de regressão, mesmo que estas variáveis adicionais não contribuam para uma melhora do modelo. Portanto, na análise de regressões múltiplas (mais de uma variável independente) é mais adequado o uso de R^2_{aj} , já que este fator aumenta somente quando variáveis independentes que aumentam a capacidade explicatória da equação de regressão aumentam (Anderson, 2013).

De maneira que o R^2_{aj} é uma medida mais útil do quanto a equação de regressão múltipla se ajusta aos dados experimentais. Por exemplo, é importante destacar que para um R^2_{aj} de 0,92, pode-se concluir por exemplo que o modelo (equação de regressão múltipla) explica 92% da variação obtida nos dados experimentais (Anderson, 2013).

Quando as variáveis respostas são influenciadas por muitas variáveis independentes e pretende-se otimizar a resposta avaliada, a metodologia de superfície de resposta pode ser empregada. Este método é um conjunto de ferramentas estatísticas e matemáticas eficientes para a otimização que explicam como a resposta de interesse é influenciada por diversas variáveis independentes de maneira mais rápida e econômica, quando comparada com a abordagem clássica de alterar uma variável por vez. Neste contexto, esta metodologia pode ser empregada para a avaliação de como respostas de interesse como rendimento e

estereosseletividade são influenciadas por diferentes parâmetros das condições reacionais (Myers *et al.*, 2009).

A primeira etapa neste método foi determinar uma relação matemática entre as variáveis independentes e a variável resposta. Neste trabalho foram empregadas equações matemáticas para a variável resposta de acordo com o formato apresentado na [Equação 3](#). De maneira que será possível estimar os valores da variável resposta, inclusive o ponto de máximo e mínimo de acordo com o modelo gerado.

$$Y = \tau.X_1 + \beta.X_2 + \gamma.X_3 + \delta.X_1.X_2 + v.X_1.X_3 + \phi.X_2.X_3 + \omega.X_1.X_2.X_3 + \xi \text{ (Equação 3)}$$

Y = valor da variável resposta

X₁, X₂, X₃ = variáveis independentes

τ = coeficiente da variável independente X₁

β = coeficiente da variável independente X₂

γ = coeficiente da variável independente X₃

δ = coeficiente da interação entre as variáveis independentes X₁ e X₂

v = coeficiente da interação entre as variáveis independentes X₁ e X₃

φ = coeficiente da interação entre as variáveis independentes X₂ e X₃

ω = coeficiente da interação entre as variáveis independentes X₁, X₂ e X₃

ξ = erro

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar a reação de adição aldólica catalisada por lipases e celulasas em meio reacional convencional de solventes orgânicos e não convencional de miniemulsão.

2.2. Metas específicas

- Identificar lipases e celulasas capazes de catalisar reações aldólicas;
- Maximização do rendimento da reação aldólica através de variáveis como solvente, concentração de água, quantidade de reagentes, tempo, temperatura e diversidade de substratos;
- Emprego das enzimas que se mostrarem promíscuas em diferentes substratos;
- Avaliação entre atividade promíscua aldolase e catálise proteica inespecífica;
- Obtenção de um sistema de miniemulsão estável na presença do reagente sólido e solução tampão;
- Obtenção de um procedimento para o preparo do sistema reacional de miniemulsão com tamanho médio de diâmetro de gotículas inferior a 500 nm;
- Determinação de rendimento, excesso diastereoisomérico e excesso enantiomérico do produto de adição aldólica obtido a partir do sistema reacional de miniemulsão;
- Maximização do rendimento, excesso diastereoisomérico e excesso enantiomérico da reação aldólica através de diferentes variáveis empregando planejamento experimental;
- Avaliação dos efeitos do uso de miniemulsão como meio reacional para reações aldólicas.
- Desenvolvimento de um método para o isolamento do produto aldólico obtido a partir do sistema reacional de miniemulsão.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes e solventes

4-Nitrobenzaldeído (98%), 3-nitrobenzaldeído (99%), 2-nitrobenzaldeído (98%), 4-cianobenzaldeído (95%), 4-clorobenzaldeído (97%), 2,4-diclorobenzaldeído (99%), benzaldeído (99%), 4-metoxibenzaldeído (98%), cicloexanona (99%), *p*-nitrofenil butirato (98%) e os reagentes para as soluções tampões (ácido cítrico mono-hidratado, fosfato de sódio bibásico, fosfato de sódio monobásico e imidazol) e o surfactante triton-X (peso molecular médio de 625 g) foram obtidos da Sigma-Aldrich.

Os solventes acetato de etila (AcOEt), dimetilsulfóxido (DMSO), metanol (MeOH), etanol (EtOH), acetonitrila grau CLAE (MeCN), hexano grau CLAE e isopropanol grau CLAE (*i*-PrOH) foram fornecidos pela Panreac. O ácido clorídrico e o surfactante tween 80 (grau farmacêutico) foram obtidos da empresa Synth.

3.2. Enzimas

As enzimas foram obtidas da Sigma-Aldrich e estão listadas abaixo:

- Lipases de pâncreas suíno tipo II (PPLII, 100-500 U mg⁻¹), *Rhizopus niveus* (RNL, 4,49 U mg⁻¹), *Aspergillus niger* (ANL, 0,184 U mg⁻¹), *Candida cylindracea* (CCL, 4,9 U mg⁻¹), *Candida rugosa* tipo VII (CRL, 1176 U mg⁻¹) e *Thermomyces lanuginosus* (TLL, ≥100 U mL⁻¹).
- Amano lipase de *Burkholderia cepacia* (BCL, ≥30 U mg⁻¹) e AK de *Pseudomonas fluorescens* (PFL, ≥20 U mg⁻¹).
- Celulases de *Aspergillus niger* (ANC, 1,08 U mg⁻¹) e *Trichoderma viride* (TVC, 5 U mg⁻¹).
- Hemicelulase de *Aspergillus niger* (ANH, 1,5 U mg⁻¹).

3.3. Métodos de análises, identificação e caracterização dos compostos

3.3.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ¹H)

Os espectros de RMN de ¹H foram obtidos em um espectrômetro da marca Agilent Technologies Modelo Premium Shielded de 400 MHz. O solvente deuterado utilizado foi o clorofórmio (CDCl₃) com os deslocamentos químicos (δ) expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados em relação ao sinal do padrão interno tetrametilsilano (TMS, δ_H 0,00) e ao

solvente deuterado utilizado (CDCl_3 , δ_{H} 7,26). As análises foram realizadas na Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC).

3.3.2. Espectroscopia na região de absorção no Infravermelho (IV)

As análises de espectroscopia no infravermelho foram obtidas utilizando um espectrômetro com transformada de Fourier com calibração interna da marca Shimadzu, modelo IRAffinity-1. As amostras líquidas foram preparadas na forma de filmes utilizando disco de Si e as amostras sólidas foram preparadas em pastilhas de KBr. As frequências de absorção foram expressas em cm^{-1} na faixa de 400-4000 cm^{-1} . As análises foram realizadas na Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC).

3.3.3. Medidas de rotação ótica

As medidas de rotação ótica foram realizadas em um polarímetro Jasco modelo p-2000 Polarimeter equipado com lâmpada espectral de sódio ($\lambda = 589 \text{ nm}$). As amostras foram diluídas em clorofórmio grau espectroscópico e as medições foram realizadas a 25 °C. As análises foram realizadas na Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC).

3.3.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV)

As Análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção de Ultravioleta (CLAE-UV) foram realizadas em um sistema cromatográfico Shimadzu composto pelos seguintes módulos: sistema de bombeamento LC-20AT, desgaseificador DGU-20A5, amostrador automático SIL-20AHT, detector UV-VIS SPD-M20A, forno de coluna CTO-20A e controlador de sistema CBM-20A. Para o registro dos cromatogramas e interpretação de dados foi utilizado o programa LCSolution da Shimadzu.

Para a determinação de rendimento foi empregada a coluna analítica Shim-pack CLC-ODS(M) C18, enquanto as separações quirais foram realizadas com as colunas Chiralpak AD-H, Chiralpak AS-H e Chiralcel OD-H, todas as colunas utilizadas possuem 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e partículas de 5 μm . As análises foram realizadas

na Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC).

3.3.5. Outros equipamentos utilizados

Outros equipamentos empregados foram: chapa de aquecimento e agitação magnética modelo Isotemp da marca Fischer Científica, balança analítica AY-220 da marca Shimadzu, pHmetro modelo 8010 da marca Qualxtron, rotoevaporadores Fisaton e Tecnal T-210 equipados com bomba a vácuo TE-058 e refrigeração modelo TE-2005, chapa de agitação magnética Cimarec Poly 15, autoclave vertical Phoenix e câmara de visualização de placa de cromatografia de camada delgada TE-540 da Tecnal (utilizando como revelador ácido fosfomolibdico).

3.4. Síntese de padrões racêmicos dos produtos de reação de adição aldólica

Para a obtenção dos padrões racêmicos dos produtos aldólicos que foram empregados neste estudo foi realizada a reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído, 3-nitrobenzaldeído, 2-nitrobenzaldeído, 4-cianobenzaldeído, 4-clorobenzaldeído, 2,4-diclorobenzaldeído, benzaldeído, 4-metoxibenzaldeído com a cicloexanona ([Esquema 6](#)).

Procedimento: Em um balão de fundo redondo de 25 mL adicionou-se 2 mmol de cicloexanona (210µL), 2 mmol de aldeído aromático e 3 mL de etanol. Em seguida adicionou-se 20 mg de NaHCO₃ (0,25 mmol) à reação. O sistema reacional permaneceu em agitação magnética por 72 h à temperatura ambiente. Posteriormente foram adicionados 60 mL de acetato de etila e 30 mL de solução saturada de NaCl. Realizou-se a extração líquido-líquido e adicionou-se à fase orgânica sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente em pressão reduzida. O produto aldólico obtido foi purificado utilizando-se coluna com sílica gel *flash* com hexano e acetato (7:3) como eluente. O rendimento foi determinado e o produto foi caracterizado por RMN e IV.

Esquema 6 - Reação de adição aldólica para a obtenção de produtos racêmicos.

3.5. Reação aldólica por enzima promíscua

3.5.1. Triagem enzimática

Uma triagem enzimática para a catálise da reação aldólica entre a cicloexanona e o 4-nitrobenzaldeído foi realizada empregando as enzimas PPLII, RNL, ANL, CCL, CRL, TLL, BCL, PFL, ANC, TVC e ANH visando a identificação de enzimas capazes de catalisar a reação aldólica com eficiência.

Procedimento: Em um balão de fundo redondo de 25 mL em agitação magnética a 30 ou 50 °C foram adicionados 5,5 mL de DMSO e H₂O (7:3) como solvente. Posteriormente, foram adicionados o 4-nitrobenzaldeído (1,0 mmol), a cicloexanona (4 mmol) e a enzima avaliada (100 mg) (Li *et al.*, 2010; Guan *et al.*, 2012). A reação foi mantida por 5 dias e posteriormente foram adicionados 60 mL de acetato de etila e 30 mL de solução saturada de NaCl. Realizou-se a extração líquido-líquido e em seguida foi adicionado sulfato de sódio anidro à fase orgânica, a qual foi filtrada e o solvente foi evaporado em pressão reduzida. O resíduo extraído foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL. Após esta etapa, evaporou-se 1 mL da solução em pressão reduzida e ressuspendeu-se o resíduo em 5 mL de isopropanol para as análises cromatográficas visando a determinação do rendimento e a enantiosseletividade dos produtos obtidos. Também evaporou-se 3 mL da solução de volume total de 25 mL em pressão reduzida e solubilizou-se o resíduo em 600 µL de CDCl₃ para a realização da análise de RMN de ¹H, onde foi determinada a diastereosseletividade dos produtos (Esquema 7).

Esquema 7 - Triagem enzimática para a catálise da reação aldólica entre a cicloexanona e o 4-nitrobenzaldeído.

3.5.2. Reação aldólica catalisada pela lipase de *Rhizopus niveus* (RNL)

A lipase de *Rhizopus niveus* foi avaliada na reação de adição aldólica modelo entre a cicloexanona e o 4-nitrobenzaldeído (Esquema 8) em diferentes condições visando a maximização da reação aldólica.

Procedimento: A reação foi realizada em um balão de fundo redondo de 25 mL sob agitação magnética a 30 ou 50 °C, ao qual foram adicionados 5,5 mL de uma mistura de solvente orgânico e solução aquosa. Posteriormente foram adicionados o 4-nitrobenzaldeído (1,0 mmol), a cicloexanona (4 mmol) e a RNL (100 mg). A reação foi mantida por 24, 48, 72, 96 ou 120 h e posteriormente a reação foi finalizada e o produto caracterizado como descrito na [Seção 3.5.1](#).

Esquema 8 - Reação aldólica promíscua catalisada com a lipase de *Rhizopus niveus*.

3.6. Determinação do rendimento, diastereosseletividade e enantioseletividade

3.6.1. Rendimento

O rendimento da reação de síntese entre a cicloexanona e o 4-nitrobenzaldeído foi analisado por CLAE-UV. Para a determinação do rendimento das reações biocatalíticas foram obtidas curvas analíticas a partir dos cromatogramas dos padrões do produto *anti* ([Figura 9](#)) e *sin* ([Figura 11](#)), os quais foram sintetizados quimicamente, identificados, caracterizados por RMN e IV e comparados com a literatura. É importante destacar que a razão diastereoisomérica dos padrões foi empregada como pureza para a determinação da concentração das soluções empregadas.

A análise foi realizada por CLAE-UV utilizando água (A) e acetonitrila (B) como fase móvel em modo isocrático 35%B em 1,0 mL min⁻¹ durante 20 min utilizando uma coluna Shim-Pack CLC-ODS(M) de 25 cm x 4,6 mm com partículas de 5 µm. O volume de injeção foi de 10 µL com forno a 40 °C. A detecção foi realizada em 276 nm para o produto aldólico *anti* e 279 nm para o produto aldólico *sin*. O tempo de retenção para o produto *anti* foi de 15,1 min e o do produto *sin* de 16,5 min.

Foram obtidas curvas analíticas dos produtos (±)-*anti* ([Figura 10](#)) e (±)-*sin* ([Figura 12](#)) do 2-(hidroxi(4-nitrofenil)metil)cicloexanona com concentrações de 0,1, 0,7, 1,3, 1,9, 2,4 mg mL⁻¹. Os rendimentos das reações biocatalíticas foram calculados utilizando a [Equação 4](#).

$$R = (A_{\text{sin}} - 877577) / 396660 + (A_{\text{anti}} - 347998) / 350420 \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

R=Rendimento (%)

A_{sin} =Área obtida para o produto *sin*.

A_{anti} =Área obtida para o produto *anti*.

Para a determinação do rendimento reacional, o produto de reação foi dissolvido em 25 mL de acetato de etila. Desta solução retirou-se uma alíquota de 1 mL que foi evaporada em pressão reduzida. O resíduo obtido foi ressuspensão em 5 mL de isopropanol e a solução foi adicionada em frascos cromatográficos para a determinação do rendimento do produto aldólico.

Figura 9 - Cromatograma do produto aldólico ($\pm$)-*anti*-2-(hidroxi(4-nitrofenil)metil)ciclohexanona.

Água (A) e acetonitrila (B) em modo isocrático 35%B em $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ durante 20 min utilizando uma coluna Shim-Pack CLC-ODS(M) de 25 cm x 4,6 mm com partículas de 5 μm . O volume de injeção foi de 10 μL com forno a 40 $^{\circ}\text{C}$. A detecção foi realizada em 276 nm e o tempo de retenção foi de 15,1 min.

Figura 10 - Curva analítica obtida para o produto aldólico ($\pm$)-*anti* 2-(hidroxi(4-nitrofenil)metil)ciclohexanona para a determinação do rendimento da reação biocatalítica obtida por CLAE-UV.

Figura 11 - Cromatograma do produto aldólico ($\pm$)-*sin*-2-(hidroxi(4-nitrofenil)metil)ciclohexanona.

Água (A) e acetonitrila (B) em modo isocrático 35%B em $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ durante 20 min utilizando uma coluna SHIM-PACK CLC-ODS(M) de 25 cm x 4,6 mm com partículas de 5 μm . O volume de injeção foi de 10 μL com forno a 40 $^{\circ}\text{C}$. A detecção foi realizada em 279 nm e o tempo de retenção foi de 16,5 min.

Figura 12 - Curva analítica obtida para o produto aldólico *sin*-2-(hidroxi(4-nitrofenil)metil)ciclo-hexanona para a determinação do rendimento da reação biocatalítica obtida por CLAE-UV.

Os demais produtos de reação aldólica entre a ciclohexanona e os derivados de benzaldeído foram purificados por cromatografia em coluna de sílica do tipo “flash” utilizando *n*-hexano e acetato de etila como solvente (7:3). As massas obtidas foram pesadas e os rendimentos foram determinados.

3.6.2. Diastereosseletividade

3.6.2.1. Medição por RMN

As diastereosseletividades dos produtos aldólicos *sin* e *anti* obtidos foram avaliadas por RMN de ^1H , onde 25 mg do extrato bruto da reação biocatalítica foram solubilizados em 600 μL de CDCl_3 . A razão *anti* e *sin* foi determinada para os produtos aldólicos entre a cicloexanona e o 4-nitrobenzaldeído, 3-nitrobenzaldeído, 2-nitrobenzaldeído, 4-cianobenzaldeído, 4-clorobenzaldeído, 2,4-diclorobenzaldeído, benzaldeído e 4-metoxibenzaldeído. Os dados dos produtos *anti* e *sin* estão descritos na [Tabela 9](#) e foram comparados com a literatura ([Chen et al., 2008](#); [Li et al., 2011](#); [Pedrosa et al., 2011](#); [Guan et al., 2012](#)).

3.6.2.2. Medição por CLAE-UV empregada para as amostras em sistema reacional de miniemulsão

Inicialmente no trabalho foi empregado a técnica de RMN de ^1H para a medição da diastereosseletividade da reação. Entretanto, para a análise do produto aldólico obtido por meio do sistema reacional de miniemulsão foram empregadas análises por CLAE-UV, pois a interferência devido aos componentes reacionais necessários para a obtenção de miniemulsões estáveis dificultaram a determinação da diastereosseletividade sem o isolamento do produto.

Sendo assim, uma curva analítica foi obtida para a determinação da diastereosseletividade do produto aldólico empregando padrões sintéticos com as razões diastereoisoméricas de 60,6:39,4, 56,4:43,6, 48,1:51,9, 41,6:58,4, 35,3:64,7 (*anti:sin*) ([Figura 13](#)). Onde o valor da razão diastereoisomérica do produto aldólico *sin* foi dado pela [Equação 5](#), o valor da razão diastereoisomérica do produto aldólico *anti* foi dado pela [Equação 6](#) e o excesso diastereoisomérico foi dado pela [Equação 7](#).

$$rd_{sin} = ((A_{sin} / (A_{sin} + A_{anti})) - 0,0709) / 0,008728 \quad (\text{Equação 5})$$

Onde:

rd_{sin} =razão diastereoisomérica do produto *sin* (%)

A_{sin} =Área obtida para o produto *sin*

A_{anti} =Área obtida para o produto *anti*

$$rd_{anti} = 100 - rd_{sin} \quad (\text{Equação 6})$$

Onde:

rd_{anti} = razão diastereoisomérica do produto *anti* (%)

rd_{sin} = razão diastereoisomérica do produto *sin* (%)

$$ed = rd_{anti} - rd_{sin} \quad (\text{Equação 7})$$

Onde:

rd_{sin} = razão diastereoisomérica do produto *sin* (%)

A_{sin} = Área obtida para o produto *sin*

A_{anti} = Área obtida para o produto *anti*

Figura 13 - Curva analítica obtida para a determinação do valor da razão diastereoisomérica do produto aldólico *sin* da reação entre a cicloexanona e o 4-nitrobenzaldeído por CLAE-UV.

3.6.3. Enantiosseletividade

As enantiosseletividades dos produtos aldólicos *anti* e *sin* obtidos entre a cicloexanona e os derivados de benzaldeído foram analisadas por CLAE-UV. Foi utilizado um fluxo de 0,5 ou 1,0 mL min⁻¹ de hexano e isopropanol em proporções específicas para cada produto. Para as análises foram empregadas as colunas OD-H, AD-H ou AS-H de 25 cm x 4,6 cm da Chiralcel Technologies.

Os dados estão descritos na [Tabela 9](#). Na [Figura 14](#) foram apresentados os cromatogramas obtidos para os produtos *sin* e *anti* da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona.

Figura 14 - Cromatogramas de análise quiral obtidos para os produtos A) *sin* e B) *anti* racêmicos e para C) a reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona (100 mg RNL, 4-nitrobenzaldeído (151 mg), cicloexanona (415 μ L), 5,5 mL de DMSO e tampão imidazol 0,1 M, pH 7,0 (7:3), 30 °C, 48 h e agitação magnética.

Hexano (A) e isopropanol (B) em modo isocrático 15%B em 1,0 mL min⁻¹ durante 20 min utilizando uma coluna Chiralcell OD-H de 25 cm x 4,6 mm com partículas de 5 μ m. O volume de injeção foi de 10 μ L com forno a 40 °C. A detecção foi realizada em 225 nm. Enantiômeros *sin* (racêmico) tr = 27,5 min e 29,3 min; enantiômero *anti* majoritário (*S,R*) tr = 31,2 min, enantiômero minoritário (*R,S*) tr = 39,2 min.

Tabela 9 - Dados para a determinação do excesso enantiomérico por CLAE-UV e de razão diastereoisomérica por RMN de ^1H .

Produto aldólico	Fluxo (mL min ⁻¹)	Coluna	Comprimento de onda (nm)	Razão Hex:Iso.	δ (ppm) <i>anti</i>	δ (ppm) <i>sin</i>
1,0	Chiralcell OD-H	225	97:03	4,90	5,46
1,0	Chiralpak AD-H	225	90:10	4,90	5,45
1,0	Chiralcell OD-H	225	95:05	5,45	5,95
0,5	Chiralpak AD-H	225	80:20	4,85	5,43
0,5	Chiralpak AD-H	225	90:10	4,75	5,35
0,5	Chiralcell AS-H	254	90:10	5,29	5,65
0,5	Chiralcell OD-H	254	90:10	4,80	5,39
1,0	Chiralpak AD-H	254	95:05	4,74	5,32

Hex = Hexano, Iso = Isopropanol, δ = deslocamento químico.

Dados espectroscópicos e de caracterização dos produtos aldólicos:

(*S*)-2-[(*R*)-Hidroxi(4-nitrofenil)metil]cicloexanona ([Guan et al., 2012](#)): Sólido branco, $pf = 135\text{ }^{\circ}\text{C}$, $[\alpha_D^{25}] = +10,0$ (c 1,5, CHCl_3), rd (*anti:sin*) = 58:42, 31% ee_{anti} . IV (pastilha de KBr) ν (cm^{-1}) = 3512, 2938, 1692, 1603, 1522, 1508, 1344, 1200, 1132, 1045, 856, 843, 800, 704, 546. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8,21 (2H, d, $J = 8,8$ Hz), 7,51 (2H, d, $J = 8,7$ Hz), 4,90 (1H, d, $J = 8,4$ Hz), 4,05 (1H, br), 2,66-2,56 (1H, m), 2,53-2,46 (1H, m), 2,42-2,32 (1H, m), 2,17-2,06 (1H, m), 1,87-1,80 (1H, m), 1,72-1,55 (3H, m), 1,45-1,31 (1H, m). Excesso enantiomérico determinado por CLAE-UV utilizando uma coluna Chiralcell OD-H (97:3 hexano e 2-isopropanol), $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 254 nm, 1,0 mL/min; enantiômeros *sin* (racêmico) $tr = 27,5$ min e 29,3 min; enantiômero *anti* majoritário (*S,R*) $tr = 31,2$ min, enantiômero minoritário (*R,S*) $tr = 39,2$ min.

(*S*)-2-[(*R*)-Hidroxi(3-nitrofenil)metil]cicloexanona ([Li, J. et al., 2011](#)): Sólido branco, $pf = 73\text{ }^{\circ}\text{C}$, $[\alpha_D^{25}] = +25,3$ (c 1,5, CHCl_3), rd (*anti:sin*) = 61:39, 37% ee_{anti} . IV (pastilha de KBr) ν (cm^{-1}) = 3509, 2963, 1692, 1526, 1477, 1449, 1352, 1204, 1132, 1042, 899, 820, 741, 691, 517. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8,25-8,08 (2H, m), 7,71-7,64 (1H, m), 7,5-7,49 (1H, m), 4,91 (1H, d, $J = 8,4$ Hz), 4,14 (1H, d, $J = 2,6$ Hz), 2,70-2,59 (1H, m), 2,54-2,32 (2H, m), 2,17-2,07 (1H, m), 1,90-1,78 (1H, m), 1,74-1,36 (4H, m). Excesso enantiomérico determinado por CLAE-UV utilizando uma coluna Chiralpak AD-H (9:1 hexano e isopropanol), $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 225 nm, 1,0 mL/min; enantiômeros *sin* (racêmico) $tr = 13,9$ min e 15,2 min; enantiômero *anti* majoritário (*S,R*) $tr = 16,7$ min, minoritário (*R,S*) $tr = 20,6$ min.

(*S*)-2-[(*R*)-Hidroxi(2-nitrofenil)metil]cicloexanona ([Deng et al., 2010](#)): Sólido amarelo, $pf = 110\text{ }^{\circ}\text{C}$, $[\alpha_D^{25}] = +5,3$ (c 1,5, CHCl_3), rd (*anti:sin*) = 79:21, 13% ee_{anti} . IV (pastilha de KBr) ν (cm^{-1}) = 3433, 2947, 1701, 1605, 1524, 1497, 1452, 1344, 1287, 1128, 1047, 856, 799, 743, 559. δ (ppm) 7,85 (1H, dd, $J = 8,2, 1,2$ Hz), 7,77 (1H, dd, $J = 7,9, 1,4$ Hz), 7,65-7,62 (1H, m), 7,45-7,41 (1H, m), 5,45 (1H, d, $J = 7,1$ Hz), 4,14-3,70 (1H, m), 2,78-2,73 (1H, m), 2,48-2,43 (1H, m), 2,37-2,30 (1H, m), 2,13-2,06 (1H, m), 1,8 0-1,50 (5H, m). Excesso enantiomérico determinado por CLAE-UV utilizando uma coluna Chiralcell OD-H (95:5 hexano e isopropanol), $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 225 nm, 1,0 mL/min; enantiômeros *sin* (racêmico) $tr = 10,6$ min e 12,3 min; enantiômero *anti* majoritário (*S,R*) $tr = 15,0$ min, minoritário (*R,S*) $tr = 17,1$ min.

(*S*)-2-[(*R*)-Hidroxi(4-cianofenil)metil]cicloexanona (Li, J. *et al.*, 2011): Sólido branco, $pf = 89\text{ }^{\circ}\text{C}$, $[\alpha_D^{25}] = +14,0$ (c 1,5, CHCl_3), rd (*anti:sin*) = 61:39, 27% ee_{anti} . IV (pastilha de KBr) $\nu(\text{cm}^{-1}) = 3520, 2943, 2228, 1690, 1611, 1504, 1454, 1387, 1317, 1298, 1130, 845, 571$. RMN de H^1 (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.68-7.61 (2H, m), 7.48-7.41 (2H, m), 4.84 (1H, d, $J = 8,3$ Hz), 4.06 (1H, s), 2.64-2.54 (1H, m), 2.52-2.44 (1H, m), 2.43-2.31 (1H, m), 2.16-2.06 (1H, m), 1.90-1.77 (1H, m), 1.72-1.52 (3H, m), 1.42-1.28 (1H, m). Excesso enantiomérico determinado por CLAE-UV utilizando uma coluna Chiralpak AD-H (80:20 hexano e isopropanol), $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 225 nm, 0,5 mL/min; enantiômeros *sin* (racêmico) $tr = 15,8$ min e 17,8 min; enantiômero *anti* minoritário (*R,S*) $tr = 19,5$ min, enantiômero majoritário (*S,R*) $tr = 23,9$ min.

(*S*)-2-[(*R*)-Hidroxi(4-clorofenil)metil]cicloexanona (Li, J. *et al.*, 2011): Sólido branco, $pf = 91\text{ }^{\circ}\text{C}$, $[\alpha_D^{25}] = +10,6$ (c 1,5, CHCl_3), rd (*anti:sin*) = 61:39, 47% ee_{anti} . IV (pastilha de KBr) $\nu(\text{cm}^{-1}) = 3420, 2936, 1697, 1593, 1578, 1485, 1447, 1414, 1294, 1126, 1090, 1042, 1013, 829, 804, 770, 721, 696, 555$. RMN de H^1 (400MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7,28 (4H, m), 4,76 (1H, dd, $J = 8,7$ hz), 4,00 (1H, d, $J = 3,0$ Hz), 2,60-2,40 (2H, m), 2,35 (1H, m), 2,15-2,05 (1H, m), 1,85-1,75 (1H, m), 1,70-1,50 (3H, m), 1,35-1,20 (1H, m).. Excesso enantiomérico determinado por CLAE-UV utilizando uma coluna Chiralpak AD-H (90:10 hexano e isopropanol), $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 254 nm, 0,5 mL/min; enantiômeros *sin* (racêmico) $tr = 15,8$ min e 18,4 min; enantiômero *anti* minoritário (*R,S*) $tr = 23,1$ min, enantiômero majoritário (*S,R*) $tr = 26,8$ min.

(*S*)-2-[(*R*)-Hidroxi(2,4-diclorofenil)metil]cicloexanona (Chen *et al.*, 2008): Sólido branco, $pf = 64\text{ }^{\circ}\text{C}$, $[\alpha_D^{25}] = +10,0$ (c 1,5, CHCl_3), rd (*anti:sin*) = 56:44, 37% ee_{anti} . IV (pastilha de KBr) $\nu(\text{cm}^{-1}) = 3466, 2947, 1684, 1587, 1472, 1188, 1132, 1097, 1038, 856, 827, 743$. RMN de H^1 (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7,50 (1H, d, $J = 8,4$ Hz), 7,35 (1H, d, 2,1 Hz), 7,31-7,27 (1H, m), 5,29 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), 4,04 (1H, br), 2,68-2,58 (1H, m), 2,50-2,43 (1H, m), 2,39-2,29 (1H, m), 2,14-2,06 (1H, m), 1,86-1,80 (1H, m), 1,70-1,55 (4H, m). Excesso enantiomérico determinado por CLAE-UV utilizando uma coluna Chiralcell AS-H column (90:10 hexano e isopropanol), $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 254 nm, 0,5 mL/min; enantiômeros *sin* (racêmico) $tr = 9,5$ min e 10,5 min; enantiômeros *anti* minoritário (*R,S*) $tr = 12,1$ min, enantiômero majoritário (*S,R*) $tr = 13,2$ min.

(*S*)-2-[(*R*)-Hidroxi(fenil)metil]cicloexanona (Pedrosa *et al.*, 2011): Líquido amarelado, $[\alpha_D^{25}] = +11,0$ (c 1,0, CHCl₃), *rd* (*anti:sin*) = 65:35, 43% *ee_{anti}*. IV (Placa de Si) $\nu(\text{cm}^{-1}) = 3520, 2943, 2228, 1690, 1611, 1504, 1454, 1387, 1317, 1298, 1130, 845, 571$. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7,38-7,26 (5H, m), 4,79 (1H, dd, *J* = 8,8, 2,2 Hz), 3,95 (1H, d, *J* = 2,7 Hz), 2,67-2,57 (1H, m), 2,52-2,45 (1H, m), 2,41-2,31 (1H, m), 2,13-2,03 (1H, m), 1,83-1,74 (1H, m), 1,62-1,46 (3H, m), 1,33-1,25 (1H, m). Excesso enantiomérico determinado por CLAE-UV utilizando uma coluna Chiralcell OD-H (90:10 hexano e isopropanol), 30 °C, 254 nm, 0,5 mL/min; enantiômeros *sin* (racêmico) *tr* = 12,7 min e 13,9 min; enantiômero *anti* majoritário (*S,R*) *tr* = 15,1 min, enantiômero minoritário (*R,S*) = 17,8 min.

(*R*)-2-[(*S*)-Hidroxi(4-metoxifenil)metil]cicloexanona (Chen *et al.*, 2008): Líquido amarelado, $[\alpha_D^{25}] = -10,0$ (c 1,0, CHCl₃), *rd* (*anti:sin*) = 74:26, 55% *ee_{anti}*. IV (placa de Si) $\nu(\text{cm}^{-1}) = 3514, 2934, 2860, 1699, 1612, 1585, 1514, 1449, 1302, 1250, 1175, 1128, 1034, 833, 559$. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7,25-7,22 (2H, m), 6,91-6,85 (2H, m), 4,74 (1H, dd, *J* = 8,9, 2,4 Hz), 3,91 (1H, d, *J* = 2,7 Hz), 3,80 (3H, s), 2,63-2,55 (1H, m), 2,52-2,44 (1H, m), 2,40-2,31 (1H, m), 2,13-2,05 (1H, m), 1,82-1,74 (1H, m), 1,70-1,45 (3H, m), 1,35-1,23 (1H, m). Excesso enantiomérico determinado por CLAE utilizando uma coluna Chiralpak AD-H (95:5 hexano e isopropanol), 30 °C, 254 nm, 1,0 mL/min; enantiômeros *sin* (racêmico) *tr* = 17,6 min e 20,8 min; enantiômero *anti* minoritário (*S,R*) *tr* = 29,8 min, enantiômero majoritário (*R,S*) *tr* = 31,5 min.

3.7. Pré-tratamento da enzima para a análise de catálise proteica inespecífica

Experimentos adicionais visando a comprovação da catálise proteica inespecífica foram realizados com o tratamento prévio da RNL em diversas condições;

- (A) Pré-tratamento a 100°C em 1 mL de H₂O por 48 h, evaporação em pressão reduzida e emprego para a reação aldólica;
- (B) Pré-tratamento em autoclave a 121 °C por 20 min em 1 mL de H₂O, seguido de evaporação em pressão reduzida;
- (C) Pré-tratamento a 100 °C em 1 mL de uma solução 0,83 M de uréia em solução aquosa por 48 h, seguido de evaporação em pressão reduzida;
- (D) Pré-tratamento a 30 °C em 1 mL de 0,83 M de uréia em solução aquosa por 48 h, seguido de evaporação em pressão reduzida;
- (E) Pré-tratamento com 100 mg de PMSF (fluoreto de metilfenilsulfonila) em 2 mL de THF a temperatura ambiente por 12 h. O THF foi evaporado em pressão reduzida e a reação realizada com a RNL pré-tratada;
- (F) Experimento controle sem enzima empregando solução 0,83 M de uréia;
- (G) Experimento controle sem enzima empregando 100 mg de PMSF;
- (H) Experimento controle com 100 mg da proteína BSA.

As condições reacionais empregadas para esses experimentos foram; 4-nitrobenzaldeído (151 mg), cicloexanona (415 µL), enzima (100 mg), 5,5 mL de DMSO e tampão imidazol 0,1 M, pH 7,0 (7:3), 30 °C, 48 h e agitação magnética;

3.8. Determinação de atividade enzimática

A medição da atividade hidrolítica da RNL foi realizada utilizando um método espectrofotométrico (Hitachi U-2000 Espectrofotômetro) baseado no monitoramento da hidrólise do *p*-nitrofenilbutirato (*p*-NFB) para *p*-nitrofenol (*p*-NF) em 400 nm ($\epsilon = 2710 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) durante 3 minutos. Desta maneira, 1450 µL de uma solução tampão 20 mM de Tris-HCl em pH 7,0, 15 µL de uma solução 70 mM de *p*-NFB em acetonitrila e 50 µL de 15 mg mL⁻¹ de enzima foram adicionados em uma cubeta de quartzo. A solução na cubeta foi agitada magneticamente durante o ensaio a 700 rpm (Agitador eletrônico modelo 300 Rank Brothers Ltd). O porta amostra foi mantido à temperatura de 30 °C empregando um banho termostático (Thermomix MM, B. Braun) (De Barros *et al.*, 2011).

Uma unidade de atividade hidrolítica da lipase foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para converter 1 μmol de *p*-NFB a *p*-NF por minuto a 30 °C. A atividade inicial da enzima RNL foi de 0,215 U mL^{-1} determinada em tampão fosfato 20 mM em pH 7,0. Também foram realizados experimentos controles para determinar a contribuição de cada composto empregado na catálise da hidrólise do PNPB. A hidrólise não enzimática foi subtraída da atividade determinada para cada caso.

Experimentos em diversas condições foram realizados a 30 °C para a determinação dos efeitos dos diversos componentes da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona sobre a atividade da RNL. As condições empregadas durante 0, 1, 3, 6, 12 e 24 h foram;

- (A) Tampão fosfato 20 mM e pH 7.0;
- (B) Tampão Tris-HCl 20 mM e pH 7.0;
- (C) Tampão Imidazol-HCl 100mM e pH 7.0;
- (D) DMSO;
- (E) DMSO e tampão Imidazol-HCl 100mM e pH 7.0 (7:3, v/v);
- (F) Tampão fosfato 20 mM e pH 7.0 saturado com 4-nitrobenzaldeído, uma vez que este composto é insolúvel em meio aquoso;
- (G) Tampão fosfato 20 mM e pH 7.0 com 65 mg mL^{-1} de cicloexanona;
- (H) Solução de DMSO e tampão Imidazol-HCl 100mM e pH 7.0 (7:3, v/v) com 25 mg mL^{-1} de 4-nitrobenzaldeído;
- (I) Solução de DMSO e tampão Imidazol-HCl 100mM e pH 7.0 (7:3, v/v) com 65 mg mL^{-1} de cicloexanona;
- (J) Solução de DMSO e tampão Imidazol-HCl 100mM e pH 7.0 (7:3, v/v) com 65 mg mL^{-1} de cicloexanona e 25 mg mL^{-1} de 4-nitrobenzaldeído. As medidas foram realizadas no Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa.

Estes experimentos e análises foram realizados no Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa.

3.9. Miniemulsão

3.9.1. Preparo da miniemulsão

As reações realizadas em sistema reacional não convencional de miniemulsão foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Luis Pina da Fonseca durante o doutorado parcial no exterior (CNPq-PVE) entre fevereiro de 2016 a janeiro de 2017 no Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa.

Os sistemas reacionais de miniemulsão foram preparados a partir de formulações descritas na literatura para aplicações biocatalíticas, com aproximadamente 80% (m/v) de água e quantidades relativas de 4-nitrobenzaldeído, cicloexanona, co-surfactante e surfactante conforme mostrado na [Tabela 10](#) (De Barros *et al.*, 2011).

Tabela 10 - Quantidades relativas dos componentes na formulação de miniemulsão.

Componentes	% (m/m)
Água destilada (meio reacional)	81,2
Tween 80 (surfactante)	1,6
Hexadecano (co-surfactante)	0,7
Cicloexanona e 4-nitrobenzaldeído (substratos)	16,5

O meio reacional de miniemulsão foi preparado pela adição dos compostos em suas quantidades relativas em duas fases diferentes; uma fase aquosa contendo hexadecano, tween 80 e água, e a fase orgânica composta pelos reagentes cicloexanona e 4-nitrobenzaldeído. É importante destacar que o 4-nitrobenzaldeído é um reagente sólido, portanto foi preciso solubilizá-lo anteriormente na cicloexanona em banho de ultrassom (Ultracleaner 1450) durante 10 minutos para que esta solução fosse empregada no passo seguinte. Em sequência, as duas fases foram adicionadas a um frasco de 5 mL e agitadas vigorosamente a 1000 rpm em uma chapa de agitação magnética Cimarec Poly 15 durante 30 minutos.

Em seguida, o sistema bifásico foi irradiado por ultrassom usando uma sonda de 0,5 cm de diâmetro (MS72) com um equipamento Sonoplus (Bandelin, Alemanha) em banho de gelo. O ultrassom foi empregado em 50% de potência com pulsos de 5s a cada 10s. Na formulação do sistema reacional de miniemulsão diferentes parâmetros foram empregados, como;

a) tempo de irradiação de ultrassom (primeiro planejamento experimental: 2,0, 3,5 e 5 min; segundo planejamento experimental: 0,5, 1,0 e 1,5 min; terceiro planejamento experimental: 1,0 min);

b) quantidade de ciclohexanona (primeiro planejamento experimental: 500, 750 e 1000 μL ; segundo planejamento experimental: 350, 550 e 750 μL ; terceiro planejamento experimental: 250, 400 e 550 μL);

c) quantidade de hexadecano (primeiro e segundo planejamento experimental: 400, 800 e 1200 μL ; terceiro planejamento experimental: 200, 350 e 500 μL);

d) quantidade de 4-nitrobenzaldeído (primeiro e segundo planejamento experimental: 75 mg; terceiro planejamento experimental: 25, 50 e 75 mg). Uma ilustração dos procedimentos realizados foi apresentada na [Figura 15](#).

Figura 15 - Ilustração do procedimento de preparo de miniemulsão e obtenção do rendimento do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a ciclohexanona.

3.9.2. Caracterização da miniemulsão

Para a determinação do tamanho médio de diâmetro das gotículas de miniemulsão foi utilizado um medidor de potencial Zeta (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, UK). As medidas foram realizadas em cubetas de vidro a 25 °C por espalhamento dinâmico de luz com o ângulo de espalhamento de 173° em um comprimento de onda de 633 nm. O diâmetro hidrodinâmico efetivo (Z-médio) foi calculado a partir do coeficiente e pela equação de Stokes-Einstein. Também foi obtido o índice de polidispersividade de cada amostra analisada. Todas as medidas foram realizadas em triplicatas com 12 análises por medida (De Barros *et al.*, 2011). As análises foram realizadas no Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa.

O resultado da análise pode ser observado em um gráfico com o diâmetro da gotícula de miniemulsão em função da intensidade relativa, conforme exemplificado na Figura 16. Entretanto, para a apresentação numérica foi empregado uma média ponderada dos tamanhos de diâmetros obtidos para as miniemulsões acompanhada pelo valor de polidispersividade (PDI).

Figura 16 - Exemplo de resultado gráfico da análise de determinação do tamanho médio das gotículas de miniemulsão empregando o equipamento Zetasizer.

3.9.3. Reação enzimática em sistema de miniemulsão

Uma vez preparado o sistema reacional de miniemulsão, a enzima RNL foi adicionada na concentração de 6 mg mL^{-1} à reação, a qual foi realizada em agitação magnética constante de 400 rpm e em temperatura controlada de 30°C (Cimarec Poly 15, Thermo Scientific). Aliquotas de $20 \mu\text{L}$ da reação foram retiradas para 48 h e diluídas em isopropanol empregando um balão volumétrico de 1 mL. Posteriormente, a amostra foi transferida para um frasco de 1,5 mL para análises em CLAE-UV. Um fluxograma do procedimento está apresentado na [Figura 17](#).

Figura 17 - Ilustração do procedimento para a análise por CLAE-UV da reação entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona em miniemulsão pela RNL.

3.9.4. Desestabilização do sistema de miniemulsão para a obtenção do produto isolado

Para o isolamento do produto aldólico da reação entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona foi necessário a desestabilização do sistema reacional de miniemulsão para a obtenção de uma separação de fases que possibilitasse a extração do produto obtido. A amostra foi saturada com NaCl e para 5 mL de meio reacional adicionou-se 5 mL de acetato de etila. Posteriormente agitou-se magneticamente a mistura durante 5 minutos, estas etapas promoveram uma separação completa das fases e a obtenção de uma amostra transparente.

À amostra foram adicionados 30 mL de solução saturada de NaCl, 30 mL de acetato de etila e realizou-se uma extração líquido-líquido. À fase orgânica adicionou-se sulfato de sódio, filtrou-se e o solvente foi evaporado em pressão reduzida. Após a realização de uma purificação por cromatografia em coluna empregando sílica *flash* com hexano e acetato de etila (7:3) como eluentes, o produto isolado obtido foi pesado e o rendimento determinado. Este procedimento foi empregado somente para a amostra de maior excesso enantiomérico em sistema reacional de miniemulsão, ou seja, a amostra 5 do segundo planejamento experimental da reação entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona. Após a purificação, o *ed* e o *ee* da amostra foram determinados por CLAE-UV. Uma ilustração do procedimento está apresentado na [Figura 18](#).

Figura 18 - Ilustração do procedimento de desestabilização da miniemulsão e isolamento do produto aldólico entre o 4-nitrobenzaldeído e a ciclohexanona.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese dos padrões racêmicos de adição aldólica para as análises cromatográficas

Os diastereoisômeros racêmicos do produto aldólico *anti* e *sin* do 2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil]cicloexanona foram sintetizados utilizando-se bicarbonato de sódio e obteve-se 81% de rendimento. A razão diastereoisomérica foi de 60:40 (*anti:sin*) determinada por RMN de H^1 . Foi realizada uma purificação por coluna cromatográfica utilizando sílica gel *flash* que possibilitou o isolamento de 88,3 mg (44%) do produto *sin* e 36,8 mg (19%) do produto *anti*, os quais foram caracterizados por RMN de H^1 . Os dados espectrais estão de acordo com a literatura (Guan *et al.*, 2012). O rendimento inferior do produto *sin* foi devido à dificuldade de separação por cromatografia em coluna uma vez que algumas frações continham uma mistura com o diastereoisômero *anti*.

4.2. Reações aldólicas catalisadas por enzimas promíscuas

4.2.1. Seleção de enzimas para a reação de adição aldólica

Para a identificação das enzimas comerciais que poderiam apresentar a capacidade de catalisar reações aldólicas promíscuas foi realizada uma seleção enzimática visando a obtenção do produto de adição aldólica entre a cicloexanona e o 4-nitrobenzaldeído. Os resultados estão mostrados na [Tabela 11](#).

Tabela 11 - Rendimento, ee_{anti} e rd para os produtos de adição aldólica utilizando diferentes enzimas que poderiam exercer atividade promíscua^a.

Reaction scheme: Cyclohexanone + 4-nitrobenzaldehyde $\xrightarrow[\text{DMSO:H}_2\text{O (9:1), 30^\circ\text{C, 120 h}}]{\text{Lipases e celulases}}$ *anti* aldol + *sin* isomer

Entrada	Enzima	Rendimento (%) ^b	ee_{anti} (%)	rd (<i>anti:sin</i>)
1	PPLII	36	40	59:41
2	RNL	35	26	54:46
3	ANL	25	17	56:44
4	PFAL	15	0	55:45
5	CRL	9	29	55:45
6	TVC	20	30	56:44
7	CCL	13	22	55:45
8	BCL	Traço	Traço	Traço
9	TLL	Traço	Traço	Traço
10	ANH	Traço	Traço	Traço
11	ANC	Traço	Traço	Traço
12	Controle ^c	Traço	Traço	Traço
13	RNL ^d	44	13	52:48
14	PPLII ^d	31	25	52:48
15	Controle ^{c,d}	Traço	Traço	Traço

^a ee_{anti} = excesso enantiomérico do produto aldólico (*S,R*)-*anti*, rd = razão diastereoisomérica;

^aCondições reacionais: 4-nitrobenzaldeído (151 mg), cicloexanona (415 μL), enzima (100 mg), 5,5 mL de DMSO e H_2O (9:1), 30 °C, 120 h, agitação magnética;

^bRendimento determinado por CLAE-UV;

^cAs reações controles foram realizadas sem enzima;

^dAs reações foram realizadas a 50 °C por 48 h.

As lipases de pâncreas suíno (PPLII), *Rhizopus niveus* (RNL), *Aspergillus niger* (ANL), *Pseudomonas fluorescens* (PFAL), *Candida rugosa* (CRL), *Candida cylindracea* (CCL) e a celulase de *Trichoderma viride* (TVC) ([Entradas 1-7, Tabela 11](#)) catalisaram a reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona. Enquanto o produto aldólico não foi observado em quantidades significativas para os experimentos com as lipases de *Burkholderia cepacia*

(BCL), *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e celulase (ANC) e hemicelulase (ANH) de *Aspergillus niger* (Entradas 8-11, Tabela 11).

A enzima RNL não apresentou bons rendimentos para as reações aldólicas entre a cicloexanona e aldeídos aromáticos em estudos da literatura empregando acetonitrila e água como meio reacional (Guan *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2014). Entretanto, essa enzima foi capaz de catalisar a reação aldólica nestes experimentos provavelmente devido ao uso de DMSO e H₂O (9:1) como meio reacional, sendo observado 35% de rendimento, 26% de *ee_{anti}* e 54:46 de *rd* em favor do isômero *anti* (Entrada 2, Tabela 11).

O emprego de uma temperatura mais elevada (50 °C) promoveu a obtenção de rendimentos similares em menores tempos de reação (48 h) quando comparado com as reações em 120 h a 30 °C. Os rendimentos obtidos foram de 36% para a PPLII e 35% para a RNL a 30 °C e 120 h (Entradas 1-2, Tabela 11), enquanto que para 50 °C durante 48 h os rendimentos observados foram de 31 e 44%, respectivamente (Entradas 13-14, Tabela 11). Nenhuma das enzimas empregadas apresentou *ee* para o produto aldólico *sin* e não foi observado produto de reação aldólica para as reações controles a 30 °C, ou seja, sem a presença da enzima (Entrada 12, Tabela 11) e 50 °C (Entrada 15, Tabela 11).

Os resultados apresentados na Tabela 11 mostraram que as enzimas PPLII (36 %, Entrada 1, Tabela 11) e RNL (35 %, Entrada 2, Tabela 11) apresentaram os melhores rendimentos. A enzima PPLII já foi descrita na catálise de reações aldólicas provavelmente por ter sido a primeira hidrolase empregada em reações aldólicas assimétricas descritas como promíscuas (Li *et al.*, 2008), sendo utilizada para diversos aldeídos cíclicos e heterocíclicos em diferentes condições experimentais (Li *et al.*, 2010; Guan *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2014).

Na literatura a enzima PPLII foi empregada na reação entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona (100 mg de enzima, 2,5 mmol de cicloexanona, 0,5 mmol de 4-nitrobenzaldeído, 1 mL de MeCN e água (9:1), 25° C e 168 h) e foi observado um rendimento de 90% com *rd* de 67:33 (*anti:sin*) e *ee_{anti}* de 73% (Zheng *et al.*, 2014). Enquanto nas condições empregadas em nosso trabalho (100 mg de enzima, 4 mmol de cicloexanona, 1 mmol de 4-nitrobenzaldeído, 5,5 mL de DMSO e água (9:1), 30 °C, 120 h) foi obtido um rendimento de 36 % com *rd* de 59:41 (*anti:sin*) e *ee_{anti}* de 40% (Entrada 1, Tabela 11).

A enzima PPLII foi empregada na literatura em 30 e 50 °C (acetonitrila e água, 9:1) e foi observado uma redução no excesso enantiomérico de 60 para 40 %, na razão diastereoisomérica de 67:33 (*anti:sin*) para 51:49 e no rendimento de 94% para 77% devido ao

aumento de temperatura (Zheng *et al.*, 2014). Enquanto que no nosso trabalho a diminuição de ee_{anti} (de 40 para 25%) e rd (de 59:41 para 52:48) também foram observados, entretanto foi observado que o rendimento aumentou. Considerando que o tempo de reação foi reduzido de 144 h para 48 h e o rendimento obtido foi de 36 e 31%, respectivamente.

Na literatura foi descrito que a Amano lipase A de *Aspergillus niger* (Guan *et al.*, 2012) catalisou a reação aldólica entre a cicloexanona e o 4-nitrobenzaldeído (Rend.=26%, rd =60:40, ee_{anti} =13% em acetonitrila e água 9:1 a 25°C), em nosso estudo foi observado que a Amano lipase de *A. niger* também catalisou a reação com rendimento significativo (Rend.=25%, rd =56:44 e ee_{anti} =12%) em DMSO e água (9:1), com resultados semelhantes aos relatados na literatura (Entrada 3, Tabela 11).

A CRL já foi usada em reações aldólicas na literatura de modo que em acetona com pequena quantidade de água (Li *et al.*, 2008) e em mistura de acetonitrila e água (1:10) não foi observado uma quantidade apreciável de produto aldólico. Mas, quando esta enzima foi utilizada em uma mistura de DMSO e água (7:3), como na reação entre o 4-nitrobenzaldeído e a ciclo-hexen-2-ona (Kapoor *et al.*, 2015) ou DMSO e água (1:9) como a condição reacional empregada em nosso estudo, rendimentos significativos foram obtidos (Entrada 5, Tabela 11). Resultados semelhantes aos observados para a RNL, para a qual as condições reacionais influenciaram fortemente a capacidade de realização da reação aldólica.

Assim como para a CRL, a enzima CCL também não catalisou a reação aldólica em água na literatura (Li *et al.*, 2010), mas em meio reacional com solventes orgânicos como em acetonitrila e água (100 mg de enzima, 2,5 mmol de cicloexanona, 0,5 mmol de 4-nitrobenzaldeído, MeCN e água (9:1), 25 °C e 168 h) foi observado um rendimento de 10% com rd de 74:26 (*anti:sin*) e ee_{anti} de 40% (Zheng *et al.*, 2014). Enquanto nas condições empregadas no nosso estudo (100 mg de enzima, 4 mmol de cicloexanona, 1 mmol de 4-nitrobenzaldeído, 5,5 mL de água e DMSO (1:9), 30 °C, 120 h) foi observado um rendimento de 13% com rd de 55:45 (*anti:sin*) e ee_{anti} de 22% (Entrada 7, Tabela 11).

A BCL não promoveu a reação aldólica nas condições empregadas neste trabalho (DMSO e água, 9:1) (Entrada 8, Tabela 11) e nem em água (Li *et al.*, 2010), entretanto, na literatura foi descrito que essa enzima catalisou a reação aldólica em meio reacional com uma menor razão de DMSO em água (3:7) (Kapoor *et al.*, 2015) ou em acetonitrila e água (1:10) (Zheng *et al.*, 2014).

A TLL (Entrada 9, Tabela 11) também não catalisou a reação de adição aldólica nas condições empregadas, assim como a ANC e a ANH. Não foram encontrados na literatura

estudos empregando essas enzimas, mas é possível que em diferentes condições reacionais as mesmas passem a catalisar reações aldólicas que podem ocorrer devido a atividade promíscua.

A catálise de reações aldólicas por CTV já foi descrita na literatura (Lai *et al.*, 2013) e em nosso estudo foi observado que a enzima foi capaz de realizar a reação aldólica nas condições empregadas com 20% de rendimento, *rd* de 56:44 (*anti:sin*) e 30% *ee_{anti}* (Entrada 6, Tabela 11).

A RNL foi empregada em estudos anteriores em reações aldólicas, entretanto sem sucesso (Guan *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2014). Provavelmente o produto de reação aldólica não foi obtido em quantidades significativas devido às condições experimentais aplicadas, que utilizaram uma mistura de acetonitrila e água (9:1) como meio reacional, enquanto que no nosso estudo foi empregado DMSO e água (9:1) com rendimento de 35%, 46:54 *rd* (*sin:anti*) e 26% de *ee_{anti}* (Entrada 2, Tabela 11).

Observou-se que as condições reacionais empregadas influenciaram fortemente a catálise da reação aldólica, de maneira que as enzimas que anteriormente foram descritas como inaptas a catalisar a reação, passaram a catalisá-la devido às alterações do meio reacional. Logo, supõe-se que enzimas que não catalisaram a reação nas condições empregadas possam passar a exercê-la em outros meios reacionais, seja por atividade promíscua ou catálise proteica inespecífica.

Nenhuma das enzimas apresentou enantiosseletividade para o produto *sin*, mas a maioria dos biocatalisadores apresentou enantiosseletividade baixa ou moderada no produto *anti* e baixa diastereosseletividade que favoreceu a formação majoritária do produto *anti*. Foi observado que os resultados obtidos foram insatisfatórios em termos de rendimentos e estereosseletividades, apesar de várias enzimas apresentarem a capacidade de catalisar a reação aldólica. Logo, novos experimentos foram elaborados visando o aumento do rendimento da reação e posteriormente novos métodos foram empregados para o aumento da estereosseletividade.

Como a enzima RNL apresentou os melhores resultados a 50 °C e ainda não haviam estudos detalhados na literatura, esta foi selecionada para a realização de experimentos em diferentes condições reacionais frente a reação aldólica entre a cicloexanona e o 4-nitrobenzaldeído.

4.2.2. Maximização de rendimento da reação aldólica entre a cicloexanona e o 4-nitrobenzaldeído por RNL

A quantidade de água no meio reacional vem sendo estudada em trabalhos que relatam o emprego de enzimas promíscuas em reações aldólicas. Nestes estudos foi observado que o rendimento e a enantiosseletividade são fortemente influenciadas por este fator, uma vez que a presença de água pode alterar a estrutura proteica (Li *et al.*, 2010; He *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2012). Desta maneira, a quantidade de água no meio reacional foi avaliada visando o aumento do rendimento da reação e da enantiosseletividade (Tabela 12).

Tabela 12 - Reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e cicloexanona catalisada por RNL em diferentes razões de DMSO e H₂O^a.

Entrada	tempo (h)	T (°C)	Solvente (DMSO:H ₂ O)	Rend. ^b (%)	<i>ee</i> _{anti} (%)	<i>rd</i> (<i>anti:sin</i>)
1	48	50	9:1	44	13	52:48
2	48	50	7:3	96	16	52:48
3	48	50	5:5	97	11	51:49
4	48	50	3:7	96	10	53:47
5	48	50	1:9	51	16	55:45
6	24	50	7:3	68	17	53:47
7	24	50	5:5	83	12	51:49
8	24	30	7:3	31	28	55:45
9	48	30	7:3	52	27	56:44

^a*ee*_{anti} = excesso enantiomérico do produto aldólico (*S,R*)-*anti*, *rd* = razão diastereoisomérico

^aCondições reacionais: 4-nitrobenzaldeído (151 mg), cicloexanona (415 µL), enzima (100 mg), 5,5 mL de DMSO e H₂O, agitação magnética;

^bRendimento determinado por CLAE-UV;

T = Temperatura.

Foi observado que o aumento na quantidade de água promoveu um aumento do rendimento reacional de 44 para 97% (Entradas 1-4, Tabela 12). Uma exceção foi observada para a proporção (1:9) de DMSO e H₂O para a qual o rendimento de 51% foi obtido (Entrada 5, Tabela 12). Em 48 h foram obtidos 96 e 97% de rendimentos para as reações contendo de 30 a 70% de água em DMSO (Entradas 2-4, Tabela 12), mostrando a importância da quantidade de água para a maximização do rendimento. Nas reações em 24 h com 30 e 50% de água em DMSO, rendimentos menores de 68 e 83% foram obtidos, respectivamente (Entradas 6-7, Tabela 12) quando comparadas as reações em 48 h (Entradas 2-3, Tabela 12).

Em termos de enantiosseletividade, não foram observadas alterações significativas uma vez que a seletividade foi baixa. Entretanto, pode-se destacar que as reações a 30 °C (52% de rendimento, 48 h) (Entrada 9, Tabela 12) apresentaram rendimentos menores que a 50 °C (96%

de rendimento, 48 h) ([Entrada 2, Tabela 12](#)), mas com melhor enantiosseletividade (27% ee_{anti} a 30 °C enquanto que 16% ee_{anti} a 50 °C).

Os cromatogramas obtidos por CLAE-UV para o produto da reação aldólica por RNL durante 48 h a 30 °C em DMSO e água (7:3) estão apresentados na [Figura 19](#). Na [Figura 19a](#) está apresentado o cromatograma empregado para a determinação do rendimento da reação, onde podem ser observados dois picos referentes aos diastereoisômeros *anti* e *sin* do produto de adição aldólica. Enquanto que na [Figura 19b](#) é mostrado o cromatograma empregado para a determinação da razão enantiomérica do produto *sin* e *anti*, logo, foram obtidos 4 picos correspondentes aos dois pares de enantiômeros.

Como destacado anteriormente, os diferentes solventes utilizados influenciaram no rendimento da reação, de modo que algumas enzimas não forneceram rendimentos em determinadas condições. Logo, foi avaliado o uso de diferentes solventes miscíveis em água para o emprego na reação aldólica, incluindo isopropanol, acetonitrila, etanol e metanol ([Tabela 13](#)).

Foi observado que a reação não ocorreu em solventes orgânicos como isopropanol, acetonitrila e etanol ([Entradas 1, 5, 9, Tabela 13](#)). Mostrando que para estes casos a presença de água no meio reacional foi fundamental para a reação ocorrer, uma vez que rendimentos significativos foram observados nas reações em que foram empregados ao menos 10% de água (v/v) em mistura com estes solventes ([Tabela 13](#)). É importante destacar que foi obtido um rendimento de 32% para o experimento contendo somente metanol no meio reacional ([Entrada 13, Tabela 13](#)), mostrando que é possível a realização de reações aldólicas em solvente orgânico, diferentemente do que havia sido observado para o isopropanol, acetonitrila e etanol.

Quando se utilizou 10% de água em acetonitrila a 50 °C foi observado um rendimento de 16% com 52% de ee_{anti} ([Entrada 6, Tabela 13](#)). Enquanto que em 30% de água em DMSO (v/v) foi obtido 12% de ee_{anti} com 83% de rendimento por 24 h ([Entrada 7, Tabela 13](#)). Assim os resultados obtidos em meio aquoso com acetonitrila foram interessantes em termos de estereosseletividade. Contudo foi decidido que os experimentos posteriores seriam realizados em DMSO e água, já que os melhores rendimentos foram obtidos nessas condições.

Figura 19 - Cromatogramas obtidos por CLAE para os produtos de reação aldólica por RNL durante 48 h a 30 °C em água e DMSO (3:7) para a determinação do (A) rendimento da reação aldólica e do (B) excesso enantiomérico do produto *sin* e *anti*.

A)

Água (A) e acetonitrila (B) em modo isocrático 35%B em 1,0 mL min⁻¹ durante 20 min utilizando uma coluna Shim-Pack CLC-ODS(M) de 25 cm x 4,6 mm com partículas de 5 µm. O volume de injeção foi de 10 µL com forno a 40 °C. A detecção foi realizada em 276 nm e o tempo de retenção foi de 15,1 min.

B)

Hexano (A) e isopropanol (B) em modo isocrático 15%B em 1,0 mL min⁻¹ durante 20 min utilizando uma coluna Chiralcell OD-H de 25 cm x 4,6 mm com partículas de 5 µm. O volume de injeção foi de 10 µL com forno a 40 °C. A detecção foi realizada em 225 nm. Enantiômeros *sin* (racêmico) tr = 27,5 min e 29,3 min; enantiômero *anti* majoritário (*S,R*) tr = 31,2 min, enantiômero minoritário (*R,S*) tr = 39,2 min.

Rendimentos significantes foram obtidos no uso de solventes como isopropanol, etanol e metanol com maiores concentrações de água no meio reacional empregando RNL ([Entradas 1-4; 9-16, Tabela 13](#)). Reações contendo 50% de água em acetonitrila, isopropanol, etanol ou metanol forneceram rendimentos de 34, 47, 62 e 70% ([Entradas 4, 8, 12, 16, Tabela 13](#)), respectivamente, mas não foram superiores aos alcançados quando a reação foi realizada em 50% de água em DMSO, na qual foi obtido 83% de rendimento com uma seletividade similar, de aproximadamente 16% de *ee* para o produto aldólico *anti* em apenas 24 h com *rd* de 62:38 (*anti:sin*) ([Entrada 7, Tabela 13](#)).

A presença de quantidades elevadas de água no meio reacional com diferentes solventes promoveu o aumento do rendimento da reação, assim como nos experimentos em água e DMSO. Nas condições empregadas neste trabalho a 50 °C foi possível a obtenção de rendimentos significativos em meio reacional contendo acetonitrila e água, um fato que não havia sido observado nos estudos descritos na literatura em que esta enzima foi utilizada (Guan *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2014).

Tabela 13 - Reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona catalisada por RNL em *i*-PrOH, MeCN, EtOH e MeOH utilizando H₂O como co-solvente^a.

Entrada	Solvente	Rendimento ^b (%)	<i>ee_{anti}</i> (%)	<i>rd</i> (<i>anti:sin</i>)
1	<i>i</i> -PrOH	Traço	Traço	Traço
2	<i>i</i> -PrOH:H ₂ O (9:1)	14	24	60:40
3	<i>i</i> -PrOH:H ₂ O (7:3)	20	14	59:41
4	<i>i</i> -PrOH: H ₂ O (5:5)	47	11	57:43
5	MeCN	Traço	Traço	Traço
6	MeCN:H ₂ O (9:1)	16	52	61:39
7	MeCN:H ₂ O (7:3)	12	16	62:38
8	MeCN:H ₂ O (5:5)	34	15	60:40
9	EtOH	Traço	Traço	Traço
10	EtOH:H ₂ O (9:1)	34	16	58:42
11	EtOH:H ₂ O (7:3)	34	17	58:42
12	EtOH:H ₂ O (5:5)	62	12	59:41
13	MeOH	32	12	53:47
14	MeOH:H ₂ O (9:1)	31	10	57:43
15	MeOH:H ₂ O (7:3)	37	14	56:44
16	MeOH:H ₂ O (5:5)	70	11	54:46

^a*ee_{anti}* = excesso enantiomérico do produto aldólico (*S,R*)-*anti*, *rd* = razão diastereoisomérica;

^aCondições reacionais: 4-nitrobenzaldeído (151 mg), cicloexanona (415 µL), enzima (100 mg), 5,5 mL de solvente, 50 °C, 24 h, agitação magnética;

^bRendimento determinado por CLAE-UV;

As reações aldólicas são muito susceptíveis às variações de pH, pois tais alterações podem fazer com que a reação prossiga em uma velocidade considerável sem a presença do biocatalisador (Xie *et al.*, 2013). Desta maneira o uso de soluções tamponadas na fase aquosa pode ser importante para a obtenção de uma enantiosseletividade desejável. Sendo assim foram

realizados experimentos em pH 7 utilizando tampões citrato, fosfato e imidazol em DMSO e os resultados estão apresentados na [Tabela 14](#).

A reação enzimática em tampões fosfato e citrato (0.1 M, pH 7.0) apresentaram rendimentos significativamente maiores em comparação com as reações empregando água ([Entradas 1-2, Tabela 14](#)). Entretanto, experimentos controles (sem enzima) mostraram que as condições reacionais promoveram a reação aldólica mesmo sem enzima ([Entradas 4-5, Tabela 14](#)), assim como descrito na literatura para o tampão citrato-fosfato ([Xie *et al.*, 2013](#)). Esta observação reforçou os resultados, como o aumento de rendimento observado e a diminuição da seletividade nas reações realizadas na presença da enzima.

O melhor rendimento de produto aldólico (82% de rendimento com 4% de *ee_{anti}*) foi obtido empregando DMSO e solução aquosa de tampão citrato 0.1 M pH 7.0 (7:3) a 50 °C ([Entrada 1, Tabela 14](#)). Entretanto, o experimento controle mostrou que 20% do rendimento da reação nestas condições experimentais não foi devido à presença da enzima ([Entrada 4, Tabela 14](#)). Resultados similares foram obtidos para o emprego da solução tampão fosfato ([Entradas 2 e 5, Tabela 14](#)).

Para o tampão imidazol (0.1 M, pH 7.0), o rendimento de 60% com 25% de *ee_{anti}* foi obtido na presença da enzima RNL nas mesmas condições experimentais empregadas para os outros tampões ([Entrada 3, Tabela 14](#)). Mas, no experimento controle foi observado que este tampão não catalisou a reação aldólica a 50 °C na ausência de biocatalisador ([Entrada 6, Tabela 14](#)). Portanto, a solução tampão imidazol com DMSO se mostrou a melhor opção e foi usada nos experimentos subsequentes.

Experimentos a 30 °C foram realizados para os tampões citrato e fosfato visando a avaliação da contribuição da catálise na ausência da enzima ([Entradas 10-11, Tabela 14](#)). Constatou-se que a contribuição não enzimática a 30 °C para a reação foi inferior do que a 50 °C, de maneira que 2 e 4% de rendimento para o tampão citrato e fosfato (0.1 M, pH 7.0) foram obtidos, respectivamente.

A temperatura também afetou a reação nestas condições experimentais, portanto a reação em tampão imidazol (0,1 M, pH 7.0) com DMSO (v/v) apresentou o dobro de rendimento a 50 °C (60% de rendimento) quando comparado com a reação realizada a 30 °C (30% de rendimento) ([Entrada 9, Tabela 14](#)) sem mudança significativa na estereosseletividade do produto aldólico *anti*.

Tabela 14 - Reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona catalisada pela RNL em diferentes razões de DMSO e tampão a pH 7,0^a.

Entrada	Temperatura (°C)	Solvente	Rendimento ^b (%)	<i>ee</i> _{anti} (%)	<i>rd</i> (<i>anti:sin</i>)
1	50	DMSO e T. Citrato (7:3)	96	4	46:54
2	50	DMSO e T. Fosfato (7:3)	82	4	52:48
3	50	DMSO e T. Imidazol (7:3)	60	25	53:47
4	50	Controle DMSO e T. Citrato (7:3)	20	2	58:42
5	50	Controle DMSO e T. Fosfato (7:3)	23	0	58:42
6	50	Controle DMSO e T. Imidazol (7:3)	Traço	Traço	Traço
7	30	DMSO e T. Citrato (7:3)	59	8	49:51
8	30	DMSO e T. Fosfato (7:3)	53	8	50:50
9	30	DMSO e T. Imidazol (7:3)	30	32	58:42
10	30	Controle DMSO e T. Citrato (7:3)	2	0	60:40
11	30	Controle DMSO e T. Fosfato (7:3)	4	0	60:40
12	30	Controle DMSO e T. Imidazol (7:3)	Traço	Traço	Traço

^a*ee*_{anti} = excesso enantiomérico do produto aldólico (*S,R*)-*anti*, *rd* = razão diastereoisomérica;

^aCondições reacionais: 4-nitrobenzaldeído (151 mg), cicloexanona (415 µL), enzima (100 mg), 5,5 mL de DMSO e solução tampão aquosa, 24 h, agitação magnética;

^bRendimento determinado por CLAE-UV;

T. Citrato = Tampão citrato; T. Fosfato = Tampão fosfato; T. Imidazol = Tampão imidazol, 0.1 M, pH 7.0.

A partir dos resultados obtidos com o emprego de diversos tampões, observou-se que a escolha mais apropriada para a reação aldólica foi o tampão imidazol (0,1 M, pH 7.0) devido a ausência de reação espontânea nas condições reacionais. Sendo assim, a razão entre a quantidade de DMSO e de tampão imidazol foi avaliada (Tabela 15).

O emprego da solução tampão imidazol e DMSO (5:5) forneceu 76% de rendimento e 13% de ee_{anti} (Entrada 3, Tabela 15). Portanto, ocorreu uma diminuição significativa do rendimento reacional quando comparado com reações realizadas em água e DMSO (Entrada 7, Tabela 12), a qual apresentou 83% de rendimento e 12% de ee_{anti} para o produto aldólico *anti* após 24 h.

Como observado anteriormente, o aumento do conteúdo aquoso (tampão imidazol 0.1 M, pH 7.0) no meio reacional favoreceu o aumento de rendimento e a diminuição da estereosseletividade do produto aldólico *anti* (Entrada 7, Tabela 15). É importante notar que a reação também pode ser realizada em solução de tampão imidazol sem a presença de solventes orgânicos (61% de rendimento com 10% ee_{anti}) (Entrada 6, Tabela 15) e que a melhor enantioseletividade obtida foi de 24% ee_{anti} para o produto aldólico *anti* em 30% de tampão imidazol em DMSO (v/v) (Entrada 2, Tabela 15).

Tabela 15 - Reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona catalisada por RNL em diferentes proporções de DMSO e solução de tampão imidazol 0.1 M, pH 7.0 ^{a-b}.

Entrada	Solvente (DMSO e T. Imidazol) (%)	Rendimento ^b (%)	ee_{anti} (%)	<i>rd</i> (<i>anti:sin</i>)
1	9:1	27	20	51:49
2	7:3	60	24	53:47
3	5:5	76	13	50:50
4	3:7	94	6	52:48
5	1:9	96	5	55:45
6	10:0	61	10	51:49

* ee_{anti} = excesso enantiomérico do produto aldólico (*S,R*)-*anti*, *rd* = razão diastereoisomérica.

^aCondições reacionais: 4-nitrobenzaldeído (151 mg), cicloexanona (415 µL), enzima (100 mg), 5,5 mL de DMSO e tampão imidazol, 50 °C, 24 h e agitação magnética;

^bRendimento determinado por CLAE-UV.

T. Imidazol = Tampão imidazol 0,1 M, pH 7,0.

Experimentos conduzidos com DMSO e solução tampão de imidazol (7:3) como meio reacional foram realizados a 50 °C para a obtenção do rendimento máximo de reação, o qual foi de 81% após 72 h com 18% de ee_{anti} e *rd* de 53:47 (*anti:sin*) (Figura 20). Em condição mais branda (30 °C) foram obtidas melhores seletividades utilizando

a RNL, onde rendimentos de 78% após 120 h foram obtidos com 30% de ee_{anti} e rd de 58:42 ($anti:sin$) (Figura 20).

Figura 20 - Reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona catalisada pela RNL em DMSO e solução tampão imidazol 0,1 M pH 7,0 (7:3) em diferentes tempos de reação^{a-d}.

^aCondições reacionais: 4-nitrobenzaldeído (151 mg), cicloexanona (415 μ L), enzima (100 mg), 5,5 mL de DMSO e tampão imidazol 0,1 M, pH 7,0 (7:3), 30 °C ou 50 °C e agitação magnética;

^bRendimento determinado por CLAE-UV;

^c ee_{anti} = excesso enantiomérico do produto aldólico (*S,R*)-*anti*;

^dA razão diastereoisomérica a 30 °C foi de 58:42 (constante) e a 50 °C foi de 53:47 (constante).

Visando um aumento de rendimento a reação aldólica foi realizada em DMSO e tampão imidazol (3:7, quantidade reduzida de DMSO em relação à solução tampão) a 50 °C por 24, 48 e 72 h por RNL. O reagente 4-nitrobenzaldeído foi completamente convertido no produto aldólico, 99% de rendimento (96% de rendimento isolado) com 6% de ee_{anti} e rd de 53:47 ($anti:sin$) (Figura 21A). Enquanto que a 30 °C, 55% de rendimento com 22% de ee_{anti} e 57% de rd foi determinado (Figura 21B). Esses experimentos foram realizados para confirmar que os 80% de rendimento obtido nos experimentos anteriores não se tratavam do equilíbrio da reação.

Também foram estudadas outras condições experimentais que apresentaram altos rendimentos reacionais, como no emprego de DMSO e água (5:5) que apresentou 97% de rendimento e 11% de ee_{anti} (Entrada 3, Tabela 12) e DMSO e água (7:3) durante 48 h a 50 °C que apresentou 96% de rendimento e 16% de ee_{anti} (Entrada 2, Tabela 12).

Figura 21 - Reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona catalisada por RNL em DMSO e tampão aquoso imidazol 0,1M pH 7,0 (3:7) a A) 50 °C e B) 30 °C^{a-c}.

^aCondições reacionais: 4-nitrobenzaldeído (151 mg), cicloexanona (415 µL), enzima (100 mg), 5,5 mL de DMSO e tampão imidazol 0,1 M, pH 7,0 (3:7), 50 °C para A e 30 °C para B e agitação magnética;

^bRendimento determinado por CLAE-UV;

^cO rendimento máximo após 72 h foi determinado por CLAE-UV (99%) e em seguida determinado por massa isolada (96%) determinado cromatograficamente.

^d*ee_{anti}* = Excesso enantiomérico do produto aldólico (*S,R*)-*anti*;

^e*rd* = Razão diastereoisomérica *anti:sin*.

4.2.3. Emprego de diferentes substratos na reação aldólica utilizando RNL

Reações entre *o*-nitrobenzaldeído, *m*-nitrobenzaldeído, *p*-nitrobenzaldeído, *p*-cianobenzaldeído, *p*-clorobenzaldeído, *o,p*-diclorobenzaldeído, benzaldeído e *p*-metoxibenzaldeído com cicloexanona foram realizadas em condições otimizadas (100 mg de RNL, DMSO e solução tampão imidazol 0,1 M pH 7,0 (7:3) como solvente, 30 °C, 72 h e agitação magnética) da reação aldólica por RNL para avaliar o escopo da reação (Tabela 16).

Os rendimentos para os grupamentos *o*-NO₂, *m*-NO₂ e *p*-NO₂ foram de 19%, 41% e 81%, respectivamente (Entradas 1-3, Tabela 16). A diferença dos rendimentos provavelmente ocorreu devido aos efeitos estéricos do *o*-NO₂ (rendimento mais baixo) e um aumento do efeito retirador de elétrons para o caso do *p*-NO₂ (rendimento mais elevado) (Entradas 1-3, Tabela 16). Em termos de enantiosseletividade para o produto aldólico *anti*, 13%, 37% e 31% de *ee_{anti}* foram observados para os grupos *o*-NO₂, *m*-NO₂, *p*-NO₂ respectivamente, mostrando que a presença de um grupo na posição *orto* não foi uma abordagem eficiente para a obtenção de uma melhor enantiosseletividade.

Uma diastereosseletividade moderada para a formação do produto *anti* foi observada para alguns substratos empregados, i.e., 79:21, 61:39 e 74:26 (*anti:sin*) para os grupamentos *o*-NO₂, *p*-CN e *p*-OCH₃, respectivamente (Entradas 1, 4 e 8, Tabela 16). Enquanto alguns substratos mostraram razões diastereoisoméricas baixas para o produto aldólico *anti*, como o

p-NO₂ e o *o,p*-Cl que apresentaram a *rd* de 58:42 e 56:44 (*anti:sin*), respectivamente ([Entradas 3-6, Tabela 16](#)).

No geral, o rendimento da reação aumentou de acordo com o aumento do caráter retirador de elétrons do grupo substituinte presente no anel aromático do aldeído (*p*-nitrobenzaldeído, *p*-clorobenzaldeído, *p*-metoxibenzaldeído), i.e., 81%, 23% e 2% de rendimento do produto aldólico para os grupos *p*-NO₂, *p*-Cl e *p*-OCH₃, respectivamente ([Entradas 3, 6 e 8, Tabela 16](#)). Enantiosseletividades moderadas (31-55% *ee_{anti}*, [Entradas 3-8, Tabela 16](#)) para os produtos aldólicos *anti* com grupamentos na posição *para* do anel aromático foram observados, mostrando que a reação catalisada por RNL foi estereosseletiva.

O grupo doador de elétrons *p*-OCH₃ ([Entrada 8, Tabela 16](#)) promoveu a formação do produto aldólico majoritário (*R,S*)-*anti*, enquanto que o produto (*S,R*)-*anti* foi observado para os outros substratos empregados. Possivelmente devido a interações intermoleculares com algum resíduo de aminoácido da enzima durante a catálise. No geral, a enzima RNL catalisou a reação de adição aldólica com diferentes substratos e com estereosseletividades moderadas. Provavelmente, não foram obtidas estereosseletividades elevadas devido ao fato da reação ocorrer por catálise proteica inespecífica, conforme mostrado na [Seção 0](#).

Tabela 16 - Reações aldólicas entre aldeídos aromáticos e cicloexanona catalisada por RNL.

Entrada	Produto	Rendimento ^b (%)	<i>ee_{anti}</i> (%)	<i>rd</i> (<i>anti:sin</i>)
1		19	13	79:21
2		41	37	61:39
3		81	31	58:42
4		39	27	61:39
5		23	47	61:39
6		25	37	56:44
7		3	43	65:35
8		2	55	74:26

^aCondições reacionais: aldeído aromático (1 mmol), cicloexanona (415 μ L, 4 mmol), enzima (100 mg), 5,5 mL de DMSO e tampão imidazol 0,1 M, pH 7,0 (7:3), 30 °C, 48 h e agitação magnética;

^bRendimento determinado por CLAE-UV;

ee_{anti} = Excesso enantiomérico do produto aldólico *anti*;

rd = Razão diastereoisomérica *anti:sin*.

4.2.4. Avaliação da atividade promíscua

Experimentos para determinar a ocorrência da catálise proteica inespecífica e a atividade promíscua na reação catalisada por RNL foram realizados. Esta enzima possui um sítio catalítico análogo a lipases neutras encoberta por uma tampa de α -hélice, a qual muda de conformação expondo o sítio ativo em interfaces de água e óleo (Kohno *et al.*, 1996).

A RNL é uma enzima comercialmente disponível, mas poucos estudos foram desenvolvidos visando o seu emprego, incluindo a síntese de ésteres aromáticos de ácidos graxos de acetoína (Xiao *et al.*, 2015), resolução de γ -lactonas racêmicas insaturadas (Fajkowska *et al.*, 2007) e a preparação de *S*-propanolol (Avila-Gonzalez *et al.*, 2005). Desta maneira, a atividade da enzima RNL foi medida pela hidrólise de PNPB em meio aquoso, de modo que a atividade inicial nas concentrações e condições reacionais empregadas foi de 0,215 U mL⁻¹.

A atividade enzimática foi medida após a submissão da enzima em diferentes tempos para cada componente presente na reação para a avaliação da contribuição de cada um na desativação ou não da enzima. É importante destacar que foram realizados experimentos controle (experimento branco) sem a presença de enzima RNL durante o teste de atividade, visando observar se algum componente do meio reacional foi capaz de acelerar a hidrólise do PNPB, promovendo a determinação de uma hidrólise maior do que a real. Quando alguma hidrólise significativa foi observada, esta foi subtraída do valor determinado para cada componente específico, uma vez que se trata de um experimento controle.

A RNL apresentou 61 e 44% da atividade inicial após 24 h em tampão aquoso fosfato e Tris-HCl (pH 7,0), respectivamente, mostrando que esta enzima é instável nestas soluções tampão (Figura 22, A-B). Em tampão Imidazol-HCl (0,1 M, pH 7,0) a enzima apresentou 23% da atividade inicial após 12 h e nenhuma atividade foi observada após 24 h, mostrando que a estabilidade desta enzima no tampão imidazol foi relativamente baixa (Figura 22, C). Resultado similar foi observado para a presença de DMSO (Figura 22, D) e no caso da presença de DMSO e solução tampão Imidazol-HCl (7:3), onde foi observado aproximadamente 12 e 20% da atividade inicial após 24 h, respectivamente (Figura 22, E).

Para o 4-nitrobenzaldeído em tampão fosfato, a atividade enzimática foi muito similar à obtida para o emprego de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0), provavelmente devido à insolubilidade deste composto em soluções aquosas que dificulta a interação deste composto com a enzima (Figura 22, F) e consequentemente fez com que a enzima não fosse desativada.

No caso da cicloexanona em tampão fosfato (Figura 22, G), DMSO e solução tampão Imidazol-HCl (7:3) com 4-nitrobenzaldeído (Figura 22, H) ou cicloexanona (Figura 22, I), ou ambos (Figura 22, J) nenhuma atividade enzimática foi observada após 1 h, mostrando que as condições reacionais empregadas desativaram completamente a enzima.

Portanto, pode-se concluir que a reação procede por catálise proteica inespecífica nestas condições experimentais. Uma vez que diversos componentes da reação causaram a completa inativação da enzima em menos de 1 h, como por exemplo os próprios reagentes cicloexanona e 4-nitrobenzaldeído, enquanto que para observarmos um rendimento significativo foi necessário ao menos 24 h de reação.

Figura 22 - Atividade enzimática relativa da RNL na hidrólise do PNPB após a exposição da enzima aos diferentes componentes da reação em tempos variados ^{a-c}.

^aExperimentos controles foram realizados, a atividade enzimática da RNL foi determinada para cada componente da reação em relação à atividade determinada para 0 h em tampão fosfato 20 mM pH 7,0, portanto, 100% correspondia a 0,215 U mL⁻¹.

^bExperimentos sem enzima foram realizados para determinar a contribuição de cada composto com base na hidrólise do PNPB, como por exemplo o imidazol. A hidrólise não enzimática foi subtraída (quando significante) da atividade determinada.

^cExperimentos foram realizados a 30 °C em:

- (A) Tampão fosfato 20 mM pH 7,0.
- (B) Tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,0.
- (C) Tampão Imidazol-HCl 100mM pH 7,0.
- (D) DMSO.
- (E) DMSO e tampão Imidazol-HCl 100mM pH 7,0 (7:3, v/v).
- (F) Tampão fosfato 20 mM pH 7,0 saturado com 4-nitrobenzaldeído, uma vez que este composto é insolúvel em meio aquoso.
- (G) Tampão fosfato 20 mM pH 7,0 com 65 mg mL⁻¹ de cicloexanona.
- (H) Solução de DMSO e tampão Imidazol-HCl 100mM pH 7,0 (7:3, v/v) com 25 mg mL⁻¹ de 4-nitrobenzaldeído.
- (I) Solução de DMSO e tampão Imidazol-HCl 100mM pH 7,0 (7:3, v/v) com 65 mg mL⁻¹ de cicloexanona.
- (J) Solução de DMSO e tampão Imidazol-HCl 100mM pH 7,0 (7:3, v/v) com 65 mg mL⁻¹ de cicloexanona e 25 mg mL⁻¹ de 4-nitrobenzaldeído.

Para a obtenção de maiores evidências de que a reação de adição aldólica ocorreu preferencialmente devido à catálise proteica inespecífica, a enzima foi submetida a condições extremas para a avaliação da importância da estrutura enzimática para a obtenção dos produtos com os rendimentos e os ee_{anti} observados nos experimentos. A presença do produto aldólico foi observado mesmo após a submissão da enzima a condições desnaturantes ([Entradas 1-4, Tabela 17](#)) e na presença do inibidor irreversível de hidrolases PMSF (*phenylmethylsulfonylfluoride*, fluoreto de metilfenilsulfonila) ([Entrada 5, Tabela 17](#)) ([Guan *et al.*, 2012](#)).

Adicionalmente, a presença de uréia ([Entrada 6, Tabela 17](#)) e do inibidor PMSF ([Entrada 7, Tabela 17](#)) não catalisaram a reação aldólica na ausência de enzima. Portanto, foi constatado que a reação aldólica catalisada pela RNL nestas condições experimentais foi um exemplo de catálise proteica inespecífica, mesmo com enantiosseletividade baixas ou moderadas. Fato que pode justificar as estereosseletividades insatisfatórias observadas nos experimentos.

O emprego do inibidor PMSF promoveu a diminuição do rendimento da reação ([Entrada 5, Tabela 17](#)), provavelmente porque a catálise ácido-base da reação aldólica também pode ser realizada pelos resíduos de serina, histidina ou ácido aspártico da tríade catalítica. Entretanto, podemos constatar que o sítio catalítico da enzima não foi o responsável pela enantiosseletividade observada, uma vez que o bloqueio do sítio ativo pelo PMSF aumentou o ee_{anti} do produto *anti* para 46%, mostrando que a enantiosseletividade catalítica ocorreu devido à ação de outra porção da enzima. Por meio da assistência assimétrica de resíduos de aminoácidos.

Um controle experimental empregando albumina de soro bovino (BSA) nas mesmas condições experimentais empregadas para a RNL também foi realizado. O rendimento reacional obtido foi de 49% com 1% de ee_{anti} e rd de 43:57 (*anti:sin*) para o produto *anti*, mostrando que essa proteína também pode catalisar a reação aldólica, mas sem enantiosseletividade ([Entrada 8, Tabela 17](#)).

Tabela 17 - Reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona catalisada pela RNL após diferentes pré-tratamentos^a.

Entrada	Experimento	Rend. ^b (%)	<i>ee_{anti}</i> (%)	<i>rd</i> (<i>anti:sin</i>)
1	RNL pré-tratada a 100 °C em H ₂ O ^c	61	23	42:58
2	RNL pré-tratada em autoclave ^d	58	21	36:64
3	RNL pré-tratada a 100 °C em 1 mL de 0,83 M Uréia in H ₂ O ^e	95	11	51:49
4	RNL pré-tratada a 30 °C em 1 mL de 0,83 M Uréia in H ₂ O ^f	64	29	36:64
5	RNL inibida com PMSF ^g	30	46	53:47
6	Uréia ^h	Traço	Traço	Traço
7	100 mg PMSF ⁱ	Traço	Traço	Traço
8	BSA ^j	49	1	43:57

*Rend. = rendimento; *ee_{anti}* = Excesso enantiomérico do produto aldólico (*S,R*)-*anti*; *rd* = Razão diastereoisomérica *anti:sin*.

^aCondições reacionais: 4-nitrobenzaldeído (151 mg), cicloexanona (415 µL), enzima (100 mg), 5,5 mL de DMSO e tampão imidazol 0,1 M, pH 7,0 (7:3), 30 °C, 48 h e agitação magnética;

^bRendimento determinado por CLAE-UV;

^cA RNL foi pré-tratada a 100°C em 1 mL de H₂O por 48 h, a qual foi evaporada em pressão reduzida e a enzima empregada para a reação aldólica;

^dA RNL foi pré-tratada em autoclave a 121 °C por 20 min em 1 mL de H₂O, a qual foi evaporada em pressão reduzida e a enzima empregada na reação aldólica;

^eA RNL foi pré-tratada a 100 °C em 1 mL de 0,83 M de uréia em solução aquosa por 48 h, a qual foi evaporada em pressão reduzida e a enzima empregada na reação aldólica;

^fA RNL foi pré-tratada a 30 °C em 1 mL de 0,83 M de uréia em solução aquosa por 48 h, a qual foi evaporada em pressão reduzida e a enzima empregada na reação aldólica;

^gA RNL foi pré-tratada com 100 mg de PMSF em 2 mL de THF à temperatura ambiente por 12 h. O THF foi evaporado em pressão reduzida e a reação realizada com a RNL pré-tratada;

^hA reação foi realizada com 0,83M de uréia, sem enzima;

ⁱA reação foi realizada com 100 mg de PMSF, sem enzima.

^jA reação foi realizada com 100 mg da proteína BSA.

4.3. Aplicação de miniemulsão em reações aldólicas

4.3.1. Experimentos exploratórios visando a obtenção de um sistema de miniemulsão estável para a aplicação em biocatálise

Geralmente um sistema reacional constituído de miniemulsão é composto de uma fase polar aquosa composta de surfactante (Ex: tween 80) e um co-surfactante (Ex: hexadecano); e uma fase apolar formada pelos reagentes (4-nitrobenzaldeído e cicloexanona). Entretanto, é importante destacar que o meio reacional em geral é constituído de reagentes líquidos que passam a compor um sistema fluído.

Neste trabalho foi empregado o reagente 4-nitrobenzaldeído que é um composto sólido, fato que dificulta a produção de um sistema reacional de miniemulsão estável. Logo, foi realizado uma sequência de experimentos exploratórios visando a obtenção de um meio reacional que permaneça minimamente estável durante 3 dias sem separação de fase ou aparecimento de precipitado. Uma vez que a preparação de miniemulsão a partir de um reagente sólido é um desafio no emprego desse método. Esta análise preliminar foi realizada visualmente após a mistura permanecer em repouso por 3 dias à temperatura ambiente, imagens estão apresentadas na [Figura 23](#).

Figura 23 - Amostras do sistema reacional de miniemulsão (A) amostra 1 (separação de fases), (B) amostra 9 (presença de precipitado) e (C) amostra 13 (miniemulsão adequada). Autoria própria.

Inicialmente foram empregadas as condições descritas na literatura, na qual foram adicionados água (81,2% M/M), tween 80 (1,6%), hexadecano (0,7%), 4-nitrobenzaldeído e cicloexanona (16,5%) ([Entrada 1, Tabela 18](#)) ([Landfester, 2006](#); [De Barros *et al.*, 2011](#)). Nessa mistura foi observada uma separação de fases após 24 h, um período relativamente curto que inviabilizaria a realização da reação nestas condições.

A partir destas observações foi preparada uma nova solução com uma menor quantidade de 4-nitrobenzaldeído (material sólido, redução de 138 mg para 75 mg), cuja precipitação poderia estar favorecendo a separação de fases. Para isso, as quantidades dos componentes apolares líquidos na reação foram aumentadas visando um aumento da fase apolar, de 378 para 415 μL de cicloexanona e de 27 para 35 μL de hexadecano, proporcionando uma melhor dispersão do reagente sólido 4-nitrobenzaldeído ([Entrada 2, Tabela 18](#)).

Tais alterações produziram uma amostra de miniemulsão estável durante 72 h, entretanto a posterior precipitação do 4-nitrobenzaldeído tornou a amostra inadequada para a aplicação nas reações aldólicas. Posteriormente foi realizado um experimento exploratório empregando Triton-X, mas esse surfactante formou uma miniemulsão instável com separação de fase 1 hora após a preparação da amostra ([Entrada 3, Tabela 18](#)).

Portanto os experimentos seguintes foram realizados empregando tween 80, pois utilizando-se esse surfactante foram produzidos sistemas de miniemulsão relativamente estáveis. Além de ser um polisorbato com concentração crítica micelar baixa que geralmente não apresenta efeitos sobre a atividade enzimática e é empregado como agente estabilizante de proteínas. Enquanto o triton-X pode ser tóxico para aplicações enzimáticas e é frequentemente empregado para a lise de células e tecidos ([Johnson, 2013](#)).

Posteriormente, um novo experimento foi realizado com o emprego de uma menor quantidade de 4-nitrobenzaldeído (75 para 15 mg) e cicloexanona (415 para 166 μL) em relação ao volume de amostra e de surfactante, mas a miniemulsão obtida também se tornou instável em menos de 1 h ([Entrada 4, Tabela 18](#)). A partir dessas observações, utilizou-se uma maior quantidade de hexadecano (35 para 742 μL) e obteve-se uma emulsão estável durante 72 h com pouco precipitado constituído de 4-nitrobenzaldeído ([Entrada 5, Tabela 18](#)). Assim o aumento da concentração de co-surfactante foi fundamental para a estabilidade da emulsão e redução do precipitado.

Como o hexadecano é um adjuvante no sistema de miniemulsão, experimentos foram realizados empregando-se cicloexanona em maior quantidade (166 para 908 μL) com o objetivo de substituir a presença do hexadecano, evitando o emprego deste composto que não está

diretamente envolvido na reação, mas que posteriormente se tornará resíduo (fato que não está de acordo com os princípios da química verde). Desta maneira, foi obtida uma emulsão estável por até 48 h sem a formação de precipitado, entretanto após 72 h foi observado a separação de fases e precipitação do 4-nitrobenzaldeído ([Entrada 6, Tabela 18](#)). Logo, o emprego de excesso do reagente líquido apolar cicloexanona pode ser uma alternativa interessante para um aumento de rendimento e a eliminação do uso de componentes não reativos no meio reacional (hexadecano).

Tabela 18 - Experimentos exploratórios visando a obtenção de um sistema reacional de miniemulsão estável durante 72 h para a aplicação em biocatálise.

Ent.	4-Nitrobenzaldeído. (mg)	Cicloexanona (μ L)	Hexadecano (μ L)	Observação
1	138	378	27	Separação de fases após 24 h e ocorrência de precipitado.
2	75	415	35	Ocorrência de precipitado.
3	75	415	35	Separação de fases e ocorrência de precipitado após 1 h. (Triton-X empregado como surfactante)
4	15	166	35	Separação de fases e ocorrência de precipitado após 0,5 h
5	15	166	742	Não foi observado separação de fases após 72 h e pouco precipitado foi observado.
6	15	908	0	Separação de fases e precipitação após 48h.
7	45	908	0	Separação de fases e precipitação após 48h.
8	75	908	0	Miniemulsão adequada
9	151	908	0	Presença de precipitado
10	151	908	35	Miniemulsão adequada
11	151	908	105	Miniemulsão adequada
12	151	908	175	Miniemulsão adequada
13	151	908	350	Miniemulsão adequada

*Volume da amostra final de 5 mL, Ent. = Entrada.

Uma vez que a emulsão formada foi estável até 48 h na presença de 4-nitrobenzaldeído e cicloexanona, novos experimentos com maior quantidade de 4-nitrobenzaldeído foram realizados visando a obtenção de uma maior concentração dos reagentes, fato que poderia fazer com que o sistema reacional de miniemulsão permanecesse estável por mais tempo. O experimento contendo 45 mg de 4-nitrobenzaldeído apresentou separação de fases e precipitação após 48 h, mostrando-se não adequado para a formação das miniemulsões ([Entrada 7, Tabela 18](#)).

No experimento contendo 75 mg foi obtido uma miniemulsão estável durante 72 h sem a formação de precipitado, logo foi observado um sistema de miniemulsão adequado para a

realização da reação aldólica ([Entrada 8, Tabela 18](#)). No emprego de 151 mg de 4-nitrobenzaldeído, a amostra apresentou a formação de precipitado, fato que demonstrou que a emulsão não foi eficiente para solubilizar adequadamente o reagente no seu interior ([Entrada 9, Tabela 18](#)).

Também foram produzidas amostras com o emprego de hexadecano juntamente com uma maior quantidade de cicloexanona (908 μL). De maneira que para todas as quantidades de hexadecano empregadas: 35 ([Entrada 10, Tabela 18](#)), 105 ([Entrada 11, Tabela 18](#)), 175 ([Entrada 12, Tabela 18](#)) e 350 μL ([Entrada 13, Tabela 18](#)) foram obtidos sistemas reacionais de miniemulsão estáveis, adequados e sem precipitado que permitiram o andamento do trabalho.

4.3.2. Experimentos exploratórios visando a obtenção de um sistema de miniemulsão entre 1 e 500 nm para aplicação em biocatálise

Uma vez que foram determinadas as condições experimentais para a preparação e a formação de emulsões estáveis empregando-se os reagentes necessários para a reação aldólica, foram realizados novos experimentos para a medida do tamanho médio das gotículas de emulsão, visando comprovar a obtenção de um sistema estável de miniemulsão para a realização das reações aldólicas pela enzima RNL. Uma vez que miniemulsões são definidas como tendo dimensões de gotículas entre 1 e 500 nm.

Foi realizada a medida do tamanho médio das gotículas de miniemulsão em amostras sem hexadecano e observou-se que logo após a irradiação de ultrassom o tamanho médio da miniemulsão foi de 758 ± 9 nm. Entretanto, após 72 h o tamanho médio das gotículas determinado foi de 3950 ± 208 nm, bem acima de 500 nm ([Entrada 1, Tabela 19](#)). Provavelmente a ausência do co-surfactante hexadecano fez com que as gotículas de miniemulsão se tornassem instáveis, de maneira que o tamanho médio das mesmas foi aumentando progressivamente ao longo do tempo.

O uso de uma pequena quantidade de hexadecano (35 μ L) promoveu uma diminuição no tamanho da miniemulsão, de modo que foi observado 590 ± 9 nm logo após a preparação e 3260 ± 90 nm após 72 h ([Entrada 2, Tabela 19](#)). Logo, foi observado que a adição do co-surfactante promoveu um menor aumento do tamanho médio das gotículas ao longo do tempo, quando comparado com a amostra sem hexadecano ([Entrada 1, Tabela 19](#)).

O uso de solução tampão é importante nas reações aldólicas, pois estas podem sofrer catálise ácida ou básica ([Carey e Sundberg, 2007](#)), sendo assim, sistemas reacionais de miniemulsão empregando-se solução tampão imidazol (0,1 M, pH 7,0) foram produzidos. Entretanto observou-se a separação de fases em apenas 1 h ([Entrada 3, Tabela 19](#)), mesmo com o emprego de 35 μ L de hexadecano ([Entrada 4, Tabela 19](#)). Desta forma, o emprego de solução tampão pode ser um desafio no sistema reacional de miniemulsão, uma vez que sais desestabilizam emulsões ([Jo et al., 2015](#)).

Com estas observações decidiu-se empregar uma maior quantidade de co-surfactante (hexadecano) para promover uma melhor estabilização da miniemulsão na presença de sal (solução tampão). Com o emprego de 175 μ L de hexadecano foi observado o tamanho médio das gotículas de 180 ± 2 nm logo após a preparação e 708 ± 7 nm após 72 h ([Entrada 5, Tabela 19](#)).

No caso do uso de 350 μL de hexadecano foi observado o tamanho médio das gotículas de miniemulsão de 192 ± 2 nm logo após o preparo do experimento e de 406 ± 3 nm após 72 h (Entrada 6, Tabela 19). Portanto, nessas condições foi possível a obtenção de um sistema de miniemulsão com gotículas de tamanho médio inferior a 500 nm e estáveis durante 72 h, mesmo com o uso de solução tampão (solução tampão imidazol 0,1 M, pH 7,0) e de um reagente sólido (4-nitrobenzaldeído).

Também foram realizados experimentos com o emprego de solução tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0), onde se observou que para 175 μL de hexadecano, a miniemulsão apresentou o tamanho médio de gotículas de 212 ± 3 nm logo após o preparo e 834 ± 6 nm após 72 h (Entrada 7, Tabela 19). Provavelmente o tampão fosfato presente no sistema de miniemulsão tornou as gotículas mais instáveis, fazendo com que o tamanho médio das mesmas aumentasse progressivamente ao longo do tempo devido à presença do tampão salino.

Com o emprego de 350 μL de hexadecano foram obtidas miniemulsões de 232 ± 4 nm logo após a irradiação e de 413 ± 4 nm após 72 h (Entrada 8, Tabela 19). Portanto, observou-se que o emprego de uma quantidade relativamente grande de hexadecano (Ex. 350 μL , 7% V/V da reação) foi essencial para a obtenção de um sistema de miniemulsão estável nas condições empregadas. O aumento do tamanho médio das gotículas ao longo do tempo ocorre devido à instabilidade do sistema reacional de miniemulsão especificamente para cada formulação empregada

Tabela 19 - Experimentos exploratórios visando a obtenção de miniemulsão estável durante 72 h sem precipitação do reagente sólido 4-nitrobenzaldeído.

Ent.	4-Nitrobenzaldeído (mg)	Ciclohexanona (uL)	Hexadecano (uL)	Solução Aquosa	Tamanho de gotículas (nm)	Tamanho após 72 h (nm)
1	75	908	0	Água	758 ± 9	3950 ± 208
2	75	908	35	Água	590 ± 9	3260 ± 90
3	75	908	0	Tamp. Imidazol	671 ± 8	Separação de fase após 1h
4	75	908	35	Tamp. Imidazol	671 ± 8	Separação de fase após 1h
5	75	908	175	Tamp. Imidazol	180 ± 2	708 ± 7
6	75	908	350	Tamp. Imidazol	192 ± 2	406 ± 3
7	75	908	175	Tamp. Fosfato	212 ± 3	834 ± 6
8	75	908	350	Tamp. Fosfato	232 ± 4	413 ± 4

*Volume da amostra final de 5 mL, Ent. = Entrada, Tamp. = Solução tampão.

A partir destes experimentos iniciais foi possível comprovar a formação de um sistema de miniemulsão estável a partir de um reagente sólido e com o emprego de tampão salino. Condições fundamentais para uma possível aplicação de miniemulsões em reações biocatalíticas como nas reações de adição aldólica por RNL.

4.4. Planejamento experimental 2³ para as reações aldólicas

Utilizando as condições estabelecidas a partir dos experimentos exploratórios no preparo de sistemas reacionais de miniemulsão, experimentos foram conduzidos empregando planejamento experimental 2³ para a obtenção do produto aldólico com melhores estereosseletividades. Inclusive, os mesmos experimentos possibilitaram a interpretação de outras variáveis respostas obtidas por meio de planejamento experimental, tais como; tamanho médio das gotículas de miniemulsão, rendimento, excesso diastereoisomérico e excesso enantiomérico.

4.4.1. Tamanho médio das gotículas de miniemulsão

Visando avaliar os efeitos das variáveis selecionadas foram desenvolvidos 3 planejamentos experimentais, os quais foram avaliados em função do tamanho médio de diâmetro das gotículas de miniemulsão para a obtenção de valores inferiores a 500 nm.

4.4.1.1. Primeiro planejamento experimental 2³ interpretado em função do tamanho médio das gotículas de miniemulsão

Inicialmente foi desenvolvido um planejamento experimental utilizando variações da quantidade de hexadecano, cicloexanona e do tempo de irradiação de ultrassom. Foram empregados volumes de 400, 800 e 1200 µL de hexadecano; 500, 750 e 1000 µL de cicloexanona e 2, 3,5 e 5,0 min de irradiação no preparo da miniemulsão. O ponto central empregado foi 800 µL de hexadecano, 750 µL de cicloexanona e 3,5 min de irradiação, o qual foi proposta a partir dos experimentos exploratórios descritos nas [Seções 4.3.1 e 4.3.2](#).

Testes foram realizados para a observação da variação do tamanho médio das gotículas de miniemulsão ao longo do tempo e foi constatado que para amostras que apresentaram diâmetros menores do que 500 nm não houve variação significativa do tamanho até 48 h. Na [Figura 24](#) estão apresentadas as medidas de determinação de diâmetro médio das gotículas de miniemulsão para a amostra 2 do planejamento experimental 1 logo após o preparo (332±5 nm de diâmetro médio) e após 48 h (335±5 nm de diâmetro médio).

Os resultados obtidos conforme os ensaios estabelecidos pelo delineamento experimental para o tamanho da miniemulsão foram apresentados na [Tabela 20](#), é importante destacar que o índice de polidispersividade se manteve entre 0,211 e 0,277 que foram

considerados adequados para estes experimentos. Foram utilizados a análise de variância (ANOVA), falta de ajuste e coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}) para avaliar a qualidade do modelo. Os resultados da ANOVA na [Tabela 21](#) evidenciaram que o modelo apresentou um excelente R^2 de 0,97 e um R^2_{aj} de 0,88.

Figura 24 - Análise de tamanho médio de diâmetro das gotículas de miniemulsão para a amostra 2 do planejamento experimental 1 logo após o preparo da miniemulsão (A) e depois de 48 h (B).

A)

B)

Tabela 20 - Variáveis independentes do primeiro planejamento fatorial 2^3 com ponto central e resultados experimentais para o tamanho médio das gotículas de miniemulsão.

Variáveis codificadas				Variáveis descodificadas			Variável Dependente	Índice de polidispersividade
Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	Hex (μL)	Cic (μL)	Tempo de Irrad (min)	Tam (nm)	
1	-1	-1	-1	400	500	2,0	281±4	0,212±0,009
2	-1	1	-1	1200	500	2,0	332±5	0,247±0,002
3	1	-1	-1	400	1000	2,0	282±1	0,220±0,011
4	1	1	-1	1200	1000	2,0	383±3	0,221±0,011
5	-1	-1	1	400	500	5,0	1181±36	0,271±0,046
6	-1	1	1	1200	500	5,0	485±5	0,253±0,007
7	1	-1	1	400	1000	5,0	563±7	0,277±0,035
8	1	1	1	1200	1000	5,0	735±10	0,261±0,011
9	0	0	0	800	750	3,5	412±4	0,211±0,009
10	0	0	0	800	750	3,5	460±5	0,224±0,014
11	0	0	0	800	750	3,5	418±5	0,233±0,014

*Irrad: irradiação; Hex: hexadecano; Cic: cicloexanona; Tam.: tamanho médio das gotículas de miniemulsão

Tabela 21 - Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e do tempo de irradiação de ultrassom de acordo com o primeiro planejamento fatorial 2^3 interpretado para o tamanho médio de diâmetro das gotículas de miniemulsão.

Fator	SQ	GL	MQ	F	Valor-p
X ₁ (Hexadecano)	17335,2	1	17335,2	24,9050	0,037885
X ₂ ^{ns} (Cicloexanona)	12529,4 ^{ns}	1 ^{ns}	12529,4 ^{ns}	18,0007 ^{ns}	0,051315 ^{ns}
X ₃ (Tempo de irradiação)	354818,9	1	354818,9	509,7582	0,001956
X ₁ .X ₂	105386,4	1	105386,4	151,4056	0,006540
X ₂ .X ₃	57122,0	1	57122,0	82,0656	0,011967
X ₁ .X ₃	22071,0	1	22071,0	31,7088	0,030119
X ₁ .X ₂ .X ₃	83681,4	1	83681,4	120,2227	0,008216
Falta de ajuste	22022,3	1	22022,3	31,6388	0,030183
Erro Puro	1392,1	2	696,1		
SQ Total	676358,8	10			
R ²	0,96538				
R ² _{aj}	0,88461				

*X₁ = hexadecano; X₂ = cicloexanona (°C); X₃ = tempo de irradiação; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; ns = não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

O modelo apresentou significância de 95% para todos os fatores avaliados exceto para a quantidade de cicloexanona (X₂). Pelo gráfico de Pareto ([Figura 25](#)), pode-se observar que o tempo de irradiação de ultrassom (X₃) foi a principal variável para o tamanho médio das gotículas de miniemulsão, seguida pela combinação da quantidade de hexadecano e cicloexanona (X₁.X₂). Logo, para promover menores tamanhos médios das gotículas de

miniemulsão foi necessário o emprego de menores tempos de irradiação de ultrassom e quantidades de hexadecano e cicloexanona.

O aumento da miniemulsão com o aumento do tempo de irradiação de ultrassom inicialmente pareceu contraditório, uma vez que a irradiação de ultrassom é justamente quem promove o processo de redução do tamanho das gotículas da emulsão até a geração de miniemulsões (tamanho inferior a 500 nm) (Sancheti e Gogate, 2017). Entretanto, foi possível observar experimentalmente que o tempo de irradiação promoveu o aumento da temperatura do sistema reacional, fato que promoveu o efeito inverso, ou seja, houve um aumento do tamanho médio das gotículas de miniemulsão, pois tornou o sistema mais instável através do aumento do movimento das moléculas no sistema de miniemulsão; 282 ± 1 nm para o ensaio 3 e 563 ± 7 para o ensaio 7, onde foram empregados 2,0 e 5,0 min de irradiação, respectivamente, com a mesma quantidade de hexadecano, 400 μ L, e de cicloexanona, 1000 μ L.

Figura 25 - Gráfico de Pareto para a quantidade de hexadecano, cicloexanona e tempo de irradiação em função do tamanho médio das gotículas de miniemulsão de acordo com o primeiro planejamento experimental 2³.

A equação que descreve a variação do tamanho médio das gotículas de miniemulsão em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e do tempo de irradiação está apresentada na (Equação 8).

(Equação 8)

$$Y_{\text{Tamanho médio das gotículas de miniemulsão}} = 1,31.X_1 + 1,32.X_2 + 767.X_3 - 0,00124.X_1.X_2 - 0,652.X_1.X_3 - 0,685.X_2.X_3 + 0,000682.X_1.X_2.X_3 - 1282$$

Onde:

Y = valor da variável resposta, tamanho médio das gotículas de miniemulsão

X₁, X₂, X₃ = variáveis independentes, onde X₁ é a quantidade de hexadecano, X₂ é a quantidade de cicloexanona e X₃ é o tempo de irradiação

Portanto, menores tempos de irradiação de ultrassom foram empregados nos próximos experimentos, ou seja, de 3,5 min no primeiro planejamento como ponto central para 1,0 min de irradiação no segundo planejamento experimental. O aumento do tamanho das gotículas da miniemulsão com o tempo de irradiação pode ser observado graficamente nas Figuras 26 e 27.

A partir do conceito de miniemulsão, a fase apolar constituída pelos reagentes apolares e o co-surfactante (cicloexanona, 4-nitrobenzaldeído e hexadecano) constituem o “interior” da miniemulsão, logo, a relação de aumento da quantidade de hexadecano e cicloexanona com o aumento do tamanho médio de diâmetro das gotículas de miniemulsão torna-se evidente, pois ocasionou o aumento do volume da miniemulsão com o aumento da fase apolar no interior do sistema. O aumento do tamanho da miniemulsão concomitante ao aumento da quantidade de hexadecano e cicloexanona podem ser visualizados graficamente na Figura 28.

Figura 26 - Superfície de resposta mostrando o efeito do tempo de irradiação e da quantidade de hexadecano em função do tamanho médio das gotículas de miniemulsão de acordo com o primeiro planejamento fatorial 2^3 em sistema de miniemulsão.

Figura 27 - Superfície de resposta mostrando o efeito do tempo de irradiação e da quantidade de ciclohexanona em função do tamanho das gotículas de emulsão de acordo com o primeiro planejamento fatorial 2^3 em sistema de miniemulsão.

Figura 28 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e de cicloexanona em função do tamanho médio das gotículas de miniemulsão de acordo com o primeiro planejamento fatorial 2^3 em sistema de miniemulsão.

4.4.1.2. Segundo planejamento experimental 2^3 interpretado em função do tamanho médio das gotículas de miniemulsão

A partir dos resultados experimentais obtidos pelo primeiro planejamento experimental 2^3 foi desenvolvido um segundo planejamento experimental. Empregando-se volumes de 400, 800 e 1200 μL de hexadecano; 350, 550 e 750 μL de cicloexanona e 0,5, 1,0 e 1,5 min de irradiação de ultrassom no preparo dos sistemas reacionais de miniemulsão. O ponto central empregado foi de 800 μL de hexadecano, 550 μL de cicloexanona e 1,0 min de irradiação, e os experimentos foram descritos na [Tabela 22](#). Portanto, menores quantidades de cicloexanona e menores tempos de irradiação foram empregados no planejamento experimental 2 em relação ao planejamento experimental 1. É importante destacar que o índice de polidispersividade se manteve entre 0,226 e 0,340 que foram valores considerados adequados para estes experimentos.

Para avaliar a qualidade do modelo gerado foram empregados a análise de variância (ANOVA), falta de ajuste e coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}). Os resultados da ANOVA na [Tabela 23](#) mostraram que o modelo apresentou um excelente R^2 de 0,93 e um R^2_{aj} de 0,81. O modelo apresentou significância de 95% para a quantidade de hexadecano (X_1), cicloexanona (X_2) e para a combinação dos dois fatores ($X_1.X_2$).

Tabela 22 - Variáveis independentes do segundo planejamento fatorial 2^3 com ponto central e resultados experimentais para o tamanho médio das gotículas de miniemulsão.

Variáveis codificadas				Variáveis descodificadas			Variável Dependente	Índice de polidispersividade
Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	Hex (μL)	Cic (μL)	Tempo de Irrad (min)	Tam. (nm)	
1	-1	-1	-1	400	350	0,5	320±3	0,246±0,009
2	-1	1	-1	1200	350	0,5	456±6	0,302±0,009
3	1	-1	-1	400	750	0,5	285±1	0,236±0,009
4	1	1	-1	1200	750	0,5	617±12	0,315±0,042
5	-1	-1	1	400	350	1,5	303±3	0,228±0,006
6	-1	1	1	1200	350	1,5	384±6	0,288±0,026
7	1	-1	1	400	750	1,5	337±4	0,232±0,002
8	1	1	1	1200	750	1,5	627±11	0,340±0,043
9	0	0	0	800	550	1,0	374±5	0,242±0,008
10	0	0	0	800	550	1,0	361±2	0,226±0,014
11	0	0	0	800	550	1,0	321±5	0,254±0,015

*Irrad: irradiação; Hex: hexadecano; Cic: cicloexanona; Tam.: tamanho médio das gotículas de miniemulsão.

Tabela 23 - Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e do tempo de irradiação de acordo com o segundo planejamento fatorial 2^3 interpretado para o tamanho médio das gotículas de miniemulsão.

Fator	SQ	GL	MQ	F	Valor-p
X ₁ (Hexadecano)	87780,5	1	87780,50	111,0803	0,008883
X ₂ ^{ns} (Cicloexanona)	20341,4	1	20341,44	25,7407	0,036722
X ₃ (Tempo de irradiação)	87,1 ^{ns}	1 ^{ns}	87,12 ^{ns}	0,1102 ^{ns}	0,771434 ^{ns}
X ₁ .X ₂	20442,4	1	20442,42	25,8685	0,036551
X ₂ .X ₃	1166,4 ^{ns}	1 ^{ns}	1166,44 ^{ns}	1,4761 ^{ns}	0,348359 ^{ns}
X ₁ .X ₃	2857,7 ^{ns}	1 ^{ns}	2857,68 ^{ns}	3,6162 ^{ns}	0,197574 ^{ns}
Falta de ajuste	9032,8	2	4516,41	5,7152	0,148916
Erro Puro	1580,5	2	790,24		
SQ Total	143288,9	10			
R ²	0,92593				
R ² _{aj}	0,81483				

*X₁ = hexadecano; X₂ = cicloexanona (°C); X₃ = tempo de irradiação; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; ns = não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Pelo gráfico de Pareto ([Figura 29](#)), pode-se observar que a quantidade de hexadecano (X₁) foi o fator mais significativo frente ao tamanho médio de diâmetro das gotículas de miniemulsão, seguido pela combinação da quantidade de hexadecano e de cicloexanona (X₁.X₂) e pela quantidade de cicloexanona (X₂).

Portanto, para a obtenção de menores tamanhos médios das gotículas de miniemulsão foi necessário o emprego de menores quantidades de hexadecano e de cicloexanona, uma vez

que ambos os fatores apresentaram uma contribuição positiva para o tamanho médio das gotículas; 320 ± 3 nm foram observados para 400 μ L de hexadecano e 350 μ L de cicloexanona enquanto 617 ± 12 nm foram determinados para 1200 μ L de hexadecano e 750 μ L de cicloexanona ([Ensaio 1 e 4, Tabela 22](#)).

Figura 29 - Gráfico de Pareto para a quantidade de hexadecano, cicloexanona e tempo de irradiação em função do tamanho médio das gotículas de miniemulsão de acordo com o segundo planejamento experimental 2^3 .

A equação que descreve a variação do tamanho médio das gotículas de miniemulsão em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e do tempo de irradiação esta apresentada na [Equação 9](#).

(Equação 9)

$$Y_{\text{Tamanho médio das gotículas de miniemulsão}} = -0,0253.X_1 - 0,442.X_2 - 62,3X_3 + 0,000632.X_1.X_2 - 0,0604.X_1.X_3 + 0,189.X_2.X_3 + 399$$

Onde:

Y = valor da variável resposta, tamanho médio de diâmetro das gotículas de miniemulsão

X₁, X₂, X₃ = variáveis independentes, onde X₁ é a quantidade de hexadecano, X₂ é a quantidade de cicloexanona e X₃ é o tempo de irradiação

A diminuição do tamanho médio das gotículas de miniemulsão com o aumento destes dois fatores podem ser visualizados graficamente na [Figura 30](#), onde foi observado que os menores tamanhos médios das gotículas de miniemulsão foram obtidos para as menores quantidades de hexadecano e de ciclohexanona. Como estas substâncias constituem a parte apolar do sistema que passa a integrar o interior da miniemulsão, pode-se concluir que o aumento da quantidade das mesmas promoveu uma “expansão” da gotícula, aumentando o tamanho médio das mesmas.

Diferentemente destes fatores avaliados, o tempo de irradiação não se mostrou uma variável significativa (95% de significância) no intervalo avaliado, assim como a combinação deste fator com a quantidade de hexadecano ou ciclohexanona. O tempo de irradiação pode ser observado graficamente nas [Figuras 31 e 32](#), onde foi observado que não houve alterações no tamanho médio das gotículas de miniemulsão em função deste fator.

Figura 30 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e ciclohexanona em função do tamanho médio das gotículas de miniemulsão de acordo com o segundo planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.

Figura 31 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e do tempo de irradiação em função do tamanho médio das gotículas de miniemulsão de acordo com o segundo planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.

Figura 32 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e cicloexanona em função do tamanho médio das gotículas de miniemulsão de acordo com o segundo planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.

4.4.1.3. Terceiro planejamento experimental 2³ interpretado em função do tamanho médio das gotículas de miniemulsão

A partir dos resultados obtidos foi desenvolvido um terceiro planejamento experimental. Entretanto, neste terceiro planejamento não foi empregado variações no tempo de irradiação, uma vez que este não foi significativo no intervalo empregado no segundo planejamento experimental 2³. Nestes experimentos foram abordadas a quantidade de hexadecano, cicloexanona e de 4-nitrobenzaldeído. Foram empregados 200, 350 e 500 µL de hexadecano, 250, 400 e 550 µL de cicloexanona e 25, 50 e 75 mg de 4-nitrobenzaldeído. Os experimentos estão descritos na [Tabela 24](#). É importante destacar que o índice de polidispersividade se manteve entre os valores de 0,168 e 0,288 que foram considerados adequados para estes experimentos.

Para avaliar a qualidade do modelo gerado foram empregadas a análise de variância (ANOVA), falta de ajuste e coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}). Os resultados da ANOVA apresentados na [Tabela 25](#) mostraram que o modelo apresentou um excelente R^2 de 0,95 e um R^2_{aj} de 0,88. O modelo apresentou significância de 95% para a quantidade de hexadecano (X_1), cicloexanona (X_2) e 4-nitrobenzaldeído (X_3) e para a combinação da quantidade de cicloexanona com o 4-nitrobenzaldeído ($X_2.X_3$).

Tabela 24 - Variáveis independentes do terceiro planejamento fatorial 2³ com ponto central e resultados experimentais para o tamanho médio de diâmetro das gotículas de miniemulsão.

Variáveis codificadas				Variáveis descodificadas			Variável Dependente	Índice de polidispersividade
Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	Hex (µL)	Cic (µL)	4-NO ₂ (mg)	Tam (nm)	
1	-1	-1	-1	200	250	25	210±1	0,252±0,023
2	-1	1	-1	500	250	25	266±3	0,230±0,016
3	1	-1	-1	200	550	25	266±1	0,168±0,015
4	1	1	-1	500	550	25	338±2	0,228±0,035
5	-1	-1	1	200	250	75	254±1	0,217±0,012
6	-1	1	1	500	250	75	359±10	0,288±0,040
7	1	-1	1	200	550	75	278±2	0,189±0,013
8	1	1	1	500	550	75	335±3	0,227±0,009
9	0	0	0	350	400	50	280±3	0,217±0,016
10	0	0	0	350	400	50	287±3	0,192±0,008
11	0	0	0	350	400	50	270±5	0,227±0,013

*Hex: hexadecano; Cic: cicloexanona; 4-NO₂: 4-nitrobenzaldeído; Tam.: tamanho médio das gotículas de miniemulsão.

Tabela 25 - Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e do 4-nitrobenzaldeído de acordo com o terceiro planejamento experimental 2³ interpretado para o tamanho médio das gotículas de miniemulsão.

Fator	SQ	GL	MQ	F	Valor-p
X ₁ (Hexadecano)	10512,50	1	10512,50	144,3760	0,006855
X ₂ ^{ns} (Cicloexanona)	2048,00	1	2048,00	28,1267	0,033763
X ₃ (Nitrobenzaldeído)	2671,80	1	2671,80	36,6939	0,026187
X ₁ .X ₂	117,05 ^{ns}	1 ^{ns}	117,05 ^{ns}	1,6075 ^{ns}	0,332471 ^{ns}
X ₁ .X ₃	144,50 ^{ns}	1 ^{ns}	144,50 ^{ns}	1,9845 ^{ns}	0,294268 ^{ns}
X ₂ .X ₃	1997,12	1	1997,12	27,4279	0,034579
Falta de ajuste	718,21	2	359,10	4,9318	0,168581
Erro Puro	145,63	2	72,81		
SQ Total	18354,81	10			
R ²	0,95294				
R ² _{aj}	0,88234				

*X₁ = hexadecano; X₂ = cicloexanona (°C); X₃ = 4-nitrobenzaldeído; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; ns = não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Pelo gráfico de Pareto ([Figura 33](#)), pode-se observar que a quantidade de hexadecano (X₁) foi o fator mais significativo para o tamanho médio de diâmetro das gotículas de miniemulsão, seguido pela quantidade de 4-nitrobenzaldeído (X₂) e de cicloexanona (X₃). É importante ressaltar que a combinação da quantidade de cicloexanona com 4-nitrobenzaldeído (X₂.X₃) também foi significativa, entretanto negativamente, ou seja, quanto maior for este fator, menor será o tamanho médios das gotículas de miniemulsão.

Figura 33 - Gráfico de Pareto para a quantidade de hexadecano, cicloexanona e 4-nitrobenzaldeído em função do tamanho médio das gotículas de miniemulsão de acordo com o terceiro planejamento experimental 2³.

A equação que descreve a variação do tamanho médio das gotículas de miniemulsão em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e do 4-nitrobenzaldeído esta apresentada na (Equação 10).

(Equação 10)

$$Y_{\text{Tamanho médio das gotículas de miniemulsão}} = 0,253.X_1 + 0,377.X_2 + 2,02.X_3 - 0,000170.X_1.X_2 + 0,00113.X_1.X_3 - 0,00421.X_2.X_3 + 34$$

Onde:

Y = valor da variável resposta, tamanho médio de diâmetro das gotículas de miniemulsão

X₁, X₂, X₃ = variáveis independentes, onde X₁ é a quantidade de hexadecano, X₂ é a quantidade de cicloexanona e X₃ é a quantidade de 4-nitrobenzaldeído

Na Figura 34 pode ser observado graficamente que o aumento na quantidade de hexadecano e de cicloexanona promoveu um aumento do tamanho médio das gotículas de miniemulsão; 210±1 nm para 200 µL de hexadecano e 250 µL de cicloexanona e 338±2 nm para 500 µL de hexadecano e 550 µL de cicloexanona, ambos com 25 mg de 4-nitrobenzaldeído (Ensaio 1 e 4, Tabela 28). Isto foi verificado, pois os aumentos destas substâncias promoveram um aumento da fase apolar no sistema, a qual se acumulou no interior das gotículas de miniemulsão causando o aumento no seu tamanho.

No caso da quantidade de 4-nitrobenzaldeído, pode-se observar que o aumento da quantidade deste reagente juntamente com a quantidade de hexadecano ocasionou um aumento significativo do tamanho médio das gotículas de miniemulsão devido ao aumento de fase apolar do sistema (Figura 35); 266 ± 1 nm para 200 μL de hexadecano e 25 mg de 4-nitrobenzaldeído e 335 ± 3 nm para 500 μL de hexadecano e 75 mg de 4-nitrobenzaldeído, ambos com 550 μL de cicloexanona (Ensaio 3 e 8, Tabela 28). Em relação à variação na quantidade do 4-nitrobenzaldeído juntamente com a quantidade de cicloexanona, pode-se observar que para a obtenção de gotículas de miniemulsão com tamanho médio na ordem de 200 nm foi necessário o uso de menores quantidades desses reagentes (Figura 36). Entretanto, foi constatado que o uso de menores quantidades da cicloexanona tornou a miniemulsão instável e/ou ocasionou precipitação do 4-nitrobenzaldeído.

Figura 34 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e cicloexanona em função do tamanho médio das gotículas de miniemulsão para o terceiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.

Figura 35 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e 4-nitrobenzaldeído em função do tamanho médio das gotículas da miniemulsão para o terceiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.

Figura 36 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de cicloexanona e 4-nitrobenzaldeído em função do tamanho médio das gotículas de miniemulsão para o terceiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.

Assim, observou-se que para a obtenção de menores tamanhos de gotículas de miniemulsão, foi importante o uso de menores quantidades do co-surfactante (hexadecano) e dos reagentes cicloexanona e 4-nitrobenzaldeído. Concomitantemente, menores tempos de irradiação (como observados no primeiro e segundo planejamento experimental) devem ser empregados para a obtenção gotículas com tamanho médio de diâmetro no intervalo de 200-400 nm, consideradas excelentes para sistemas reacionais de miniemulsão.

4.4.2. Rendimento

4.4.2.1. Primeiro planejamento experimental 2^3 interpretado em função do rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona em sistema de miniemulsão

O primeiro planejamento experimental 2^3 também foi interpretado em função de outra variável resposta, o rendimento da reação após 48 h. Desta maneira, o primeiro planejamento empregando volumes de 400, 800 e 1200 μL de hexadecano; 500, 750 e 1000 μL de cicloexanona e 2, 3,5 e 5,0 min de irradiação de ultrassom no preparo do sistema reacional de miniemulsão foi interpretado e os resultados foram apresentados na [Tabela 26](#).

Tabela 26 - Variáveis independentes do primeiro planejamento fatorial 2^3 com ponto central e resultados experimentais para o rendimento reacional da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona.

Variáveis codificadas				Variáveis descodificadas		Variável Dependente	
Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	Hex (μL)	Cic (μL)	Tempo de Irrad (min)	Rendimento (%)
1	-1	-1	-1	400	500	2,0	33,0
2	-1	1	-1	1200	500	2,0	20,8
3	1	-1	-1	400	1000	2,0	28,1
4	1	1	-1	1200	1000	2,0	27,1
5	-1	-1	1	400	500	5,0	29,0
6	-1	1	1	1200	500	5,0	26,5
7	1	-1	1	400	1000	5,0	35,0
8	1	1	1	1200	1000	5,0	22,8
9	0	0	0	800	750	3,5	35,1
10	0	0	0	800	750	3,5	33,0
11	0	0	0	800	750	3,5	31,0
Controle sem enzima	0	0	0	800	750	3,5	1,8
Controle BSA	0	0	0	800	750	3,5	37,9

*Hex: hexadecano; Cic: cicloexanona; Irrad: irradiação.

Para avaliar a qualidade do modelo gerado foram empregadas a análise de variância (ANOVA), a falta de ajuste e o coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}). Os resultados da ANOVA na [Tabela 27](#) mostraram que o modelo apresentou um baixo R^2 de 0,45 e um R^2_{aj} de 0,21. Pelo gráfico de Pareto ([Figura 37](#)) observou-se que o modelo apresentou significância de 95% apenas para a quantidade de hexadecano (X_1), de maneira que o aumento da quantidade de hexadecano promoveu um decréscimo no rendimento. Por exemplo, para 400 μL de hexadecano foi obtido 33,0% de rendimento, enquanto que para 1200 μL de hexadecano o rendimento foi de 20,8% para a mesma quantidade de cicloexanona (500 μL) e o mesmo tempo de irradiação (2,0 min) ([Ensaios 1 e 2, Tabela 26](#)).

Tabela 27 - Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e do tempo de irradiação frente ao rendimento da reação aldólica para o primeiro planejamento fatorial 2^3 em sistema de miniemulsão.

Fator ^a	SQ ^b	GL ^c	MQ ^d	F	Valor-p
X_1 (Hexadecano)	97,3013	1	97,30125	23,14859	0,040587
X_2^{ns} (Cicloexanona)	1,7113 ^{ns}	1 ^{ns}	1,71125 ^{ns}	0,40712 ^{ns}	0,588745 ^{ns}
X_3^{ns} (Tempo de irradiação)	2,3112 ^{ns}	1 ^{ns}	2,31125 ^{ns}	0,54986 ^{ns}	0,535626 ^{ns}
Falta de ajuste	115,3059 ^{ns}	5 ^{ns}	23,06119 ^{ns}	5,48641 ^{ns}	0,161324 ^{ns}
Erro Puro	8,4067 ^{ns}	2 ^{ns}	4,20333 ^{ns}		
SQ Total	225,0364 ^{ns}	10 ^{ns}			
R^2	0,45026				
R^2_{aj}	0,21465				

^a X_1 = hexadecano; X_2 = cicloexanona ($^{\circ}\text{C}$); X_3 = tempo de irradiação; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; ns = não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 37 - Gráfico de Pareto para a quantidade de hexadecano, cicloexanona e tempo de irradiação em função do rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o primeiro planejamento experimental em sistema de miniemulsão.

A equação que descreve a variação do rendimento em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e do tempo de irradiação está apresentada na [Equação 11](#).

(Equação 11)

$$Y_{\text{Rendimento}} = -0,00872.X_1 + 0,00185.X_2 + 0,358.X_3 + 33,5$$

Onde:

Y = valor da variável resposta, rendimento

X₁, X₂, X₃ = variáveis independentes, onde X₁ é a quantidade de hexadecano, X₂ é a quantidade de cicloexanona e X₃ é o tempo de irradiação

O aumento da quantidade de hexadecano (X₁) promoveu o aumento do tamanho das gotículas de miniemulsão, logo, diminuindo a área superficial onde atua a enzima e, consequentemente, reduzindo o rendimento da reação. Este efeito pode ser observado nas [Figuras 38 e 39](#), onde se observou que a quantidade de hexadecano foi a única variável que promoveu alterações no rendimento reacional, enquanto que o tempo de irradiação (X₂) e a quantidade de cicloexanona (X₃) pouco interferiram como observado graficamente na [Figura 40](#).

Figura 38 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e cicloexanona em função do rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o primeiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.

Figura 39 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e do tempo de irradiação em função do rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o primeiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.

Figura 40 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de ciclohexanona e do tempo de irradiação em função do rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a ciclohexanona para o primeiro planejamento experimental 2³ em sistema de miniemulsão.

Também foram realizados experimentos controles, onde observou-se que na ausência da enzima ocorre a reação não biocatalítica em 1,8% de rendimento do produto aldólico. Para o controle empregando a proteína BSA observou-se um rendimento de 37,9%, valor maior que o observado para a RNL ([Tabela 28](#)), entretanto o composto obtido não apresentou excesso enantiomérico para o produto *anti* conforme descrito na [Seção 4.4.4](#).

4.4.2.2. Segundo planejamento experimental 2^3 interpretado em função do rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona em sistema de miniemulsão

O segundo planejamento experimental foi interpretado em função do rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona após 48 h. No planejamento foram empregados volumes de 400, 800 e 1200 μL de hexadecano; 500, 750 e 1000 μL de cicloexanona e 2, 3,5 e 5,0 minutos de irradiação de ultrassom no preparo do sistema reacional de miniemulsão. Os resultados foram apresentados na [Tabela 28](#).

Tabela 28 - Variáveis independentes do planejamento fatorial 2^3 com ponto central e resultados experimentais para o rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona no segundo planejamento experimental em sistema de miniemulsão.

Variáveis codificadas				Variáveis decodificadas			Variável Dependente
Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	Hex (μL)	Cic (μL)	Tempo de Irrad (min)	Rendimento (%)
1	-1	-1	-1	400	350	0,5	5,2
2	-1	1	-1	1200	350	0,5	21,5
3	1	-1	-1	400	750	0,5	24,0
4	1	1	-1	1200	750	0,5	25,0
5	-1	-1	1	400	350	1,5	4,8
6	-1	1	1	1200	350	1,5	18,2
7	1	-1	1	400	750	1,5	25,6
8	1	1	1	1200	750	1,5	25,0
9	0	0	0	800	550	1,0	23,0
10	0	0	0	800	550	1,0	22,4
11	0	0	0	800	550	1,0	27,1
Controle sem enzima	0	0	0	800	550	1,0	2,0
Controle BSA	0	0	0	800	550	1,0	12,5

*Hex: hexadecano; Cic: cicloexanona; Irrad: irradiação.

Para avaliar a qualidade do modelo gerado foram empregadas a análise de variância (ANOVA), a falta de ajuste e o coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}). Os resultados apresentados na [Tabela 29](#) mostram que o modelo apresentou um valor satisfatório de R^2 de 0,87 e de R^2_{aj} de 0,68.

Tabela 29 - Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e do tempo de irradiação frente ao rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona de acordo com o segundo planejamento experimental 2³ em sistema de miniemulsão.

Fator	SQ	GL	MQ	F	Valor-p
X ₁ ^{ns} (Hexadecano)	114,1561 ^{ns}	1 ^{ns}	114,1561 ^{ns}	16,98616 ^{ns}	0,054135 ^{ns}
X ₂ (Cicloexanona)	310,5032	1	310,5032	46,20217	0,020966
X ₃ ^{ns} (Tempo de irradiação)	0,6161 ^{ns}	1 ^{ns}	0,6161 ^{ns}	0,09167 ^{ns}	0,790656 ^{ns}
X ₁ .X ₂ ^{ns}	106,7261 ^{ns}	1 ^{ns}	106,7261 ^{ns}	15,88059 ^{ns}	0,057585 ^{ns}
X ₁ .X ₃ ^{ns}	2,5992 ^{ns}	1 ^{ns}	2,5992 ^{ns}	0,38676 ^{ns}	0,597455 ^{ns}
X ₂ .X ₃ ^{ns}	3,7265 ^{ns}	1 ^{ns}	3,7265 ^{ns}	0,55449 ^{ns}	0,534099 ^{ns}
Falta de ajuste	65,8604	2	32,9302	4,89994	0,169493
Erro Puro	13,4411	2	6,7205		
SQ Total	617,6285	10			
R ²	0,8716				
R ² _{aj}	0,6790				

*X₁ = hexadecano; X₂ = cicloexanona (°C); X₃ = tempo de irradiação; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; ns = não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

O modelo apresentou significância de 95% apenas para a quantidade de cicloexanona (X₂) no sistema reacional conforme observado no gráfico de Pareto apresentado na [Figura 41](#), de maneira que o aumento na quantidade de cicloexanona promoveu um aumento no rendimento reacional. Por exemplo, para 350 µL de cicloexanona foi obtido 5,2% de rendimento, enquanto que para 750 µL de cicloexanona o rendimento foi de 24,0% para a mesma quantidade de hexadecano (400 µL) e o mesmo tempo de irradiação (0,5 min) ([Ensaio 1 e 3, Tabela 28](#)).

Figura 41 - Gráfico de Pareto para a quantidade de hexadecano, cicloexanona e tempo de irradiação em função do rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o segundo planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.

A equação que descreve a variação do rendimento em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e do tempo de irradiação está apresentada na [Equação 12](#).

(Equação 12)

$$Y_{\text{Rendimento}} = 0,0374.X_1 + 0,0608.X_2 - 2,03.X_3 - 0,0000457.X_1.X_2 - 0,00285.X_1.X_3 + 0,00683.X_2.X_3 - 22,6$$

Onde:

Y = valor da variável resposta, rendimento

X₁, X₂, X₃ = variáveis independentes, onde X₁ é a quantidade de hexadecano, X₂ é a quantidade de cicloexanona e X₃ é o tempo de irradiação

O aumento do rendimento reacional com o aumento da quantidade de cicloexanona (X₂) pode ser observado graficamente na [Figura 42](#). Através da [Figura 43](#) observou-se que apesar de não apresentar significância para 95% de confiança ([Figura 41](#)), a quantidade de hexadecano (X₁) promoveu o aumento do rendimento da reação. Por exemplo, para 400 µL de hexadecano foi obtido 24,0% de rendimento, enquanto que para 1200 µL de hexadecano o rendimento foi de 25,0% para a mesma quantidade de cicloexanona (750 µL) e o mesmo tempo de irradiação (0,5 min) ([Ensaio 1 e 3, Tabela 28](#)).

Provavelmente porque o aumento da quantidade de hexadecano gerou uma diminuição do tamanho médio das gotículas da miniemulsão e consequentemente o aumento da área superficial, onde a enzima atua na catálise da reação. Nas Figuras 43 e 44 visualiza-se que o tempo de irradiação não interferiu significativamente no rendimento da reação neste intervalo avaliado, possivelmente porque este fator interferiu pouco no tamanho da miniemulsão.

Figura 42 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e de cicloexanona em função do rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o segundo planejamento experimental 2³ em sistema de miniemulsão.

Figura 43 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e tempo de irradiação em função do rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o segundo planejamento experimental 2³ em sistema de miniemulsão.

Figura 44 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de cicloexanona e do tempo de irradiação em função do rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o segundo planejamento experimental 2³ em sistema de miniemulsão.

Também foram realizados experimentos controles, onde observou-se que na ausência da enzima ocorreu a reação não biocatalítica com 2,1% de rendimento, valor similar ao observado para o primeiro planejamento experimental de 1,8% (Tabela 26). Para o controle empregando a proteína BSA observou-se um rendimento de 12,5%, valor menor que o observado para a enzima RNL nas mesmas condições (Tabela 29) e bem inferior ao valor de 37,5% observado para a própria BSA no primeiro planejamento experimental (Tabela 28), mostrando que a catálise proteica por esta enzima também está sujeito a alterações devido aos fatores empregados nos planejamentos experimentais.

4.4.2.3. Terceiro planejamento experimental 2^3 interpretado em função do rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona em sistema de miniemulsão

O terceiro planejamento experimental, no qual foram empregados 200, 350 e 500 μL de hexadecano, 250, 400 e 550 μL de cicloexanona e 25, 50 e 75 mg de 4-nitrobenzaldeído, também foi interpretado em função do rendimento reacional após 48 h. Os resultados estão descritos na [Tabela 30](#).

Tabela 30 - Variáveis independentes do planejamento fatorial 2^3 com ponto central e resultados experimentais para o tamanho médio das gotículas da miniemulsão do terceiro planejamento experimental.

Variáveis codificadas				Variáveis descodificadas			Variável Dependente
Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	Hex (μL)	Cic (μL)	4-NO ₂ (mg)	Rendimento (%)
1	-1	-1	-1	200	250	25	63,8
2	-1	1	-1	500	250	25	58,1
3	1	-1	-1	200	550	25	53,1
4	1	1	-1	500	550	25	41,7
5	-1	-1	1	200	250	75	31,6
6	-1	1	1	500	250	75	21,8
7	1	-1	1	200	550	75	34,0
8	1	1	1	500	550	75	32,6
9	0	0	0	350	400	50	40,4
10	0	0	0	350	400	50	35,3
11	0	0	0	350	400	50	36,4
Controle sem enzima	0	0	0	800	550	1,0	2,7
Controle BSA	0	0	0	800	550	1,0	14,7

*Hex: hexadecano; Cic: cicloexanona; 4-NO₂: 4-nitrobenzaldeído

Para avaliar a qualidade do modelo gerado foram empregados a análise de variância (ANOVA), a falta de ajuste e o coeficiente de determinação ajustado ($R^2_{aj.}$). Os resultados apresentados na [Tabela 31](#) mostraram que o modelo apresentou um excelente R^2 de 0,94 e um $R^2_{aj.}$ de 0,86. O modelo apresentou significância de 95% apenas para a quantidade de 4-nitrobenzaldeído (X_3) e a combinação da quantidade de cicloexanona e 4-nitrobenzaldeído ($X_2.X_3$), conforme observado no gráfico de Pareto apresentado na [Figura 45](#).

Tabela 31 - Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e do tempo de irradiação frente ao rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona de acordo com o terceiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.

Fator	SQ	GL	MQ	F	Valor-p
X_1^{ns} (Hexadecano)	99,970 ^{ns}	1 ^{ns}	99,970 ^{ns}	13,9015 ^{ns}	0,065000 ^{ns}
X_2^{ns} (Cicloexanona)	24,290 ^{ns}	1 ^{ns}	24,290 ^{ns}	3,3778 ^{ns}	0,207474 ^{ns}
X_3 (Nitrobenzaldeído)	1167,894	1	1167,894	162,4038	0,006101
$X_1.X_2^{ns}$	0,925 ^{ns}	1 ^{ns}	0,925 ^{ns}	0,1286 ^{ns}	0,754205 ^{ns}
$X_1.X_3^{ns}$	4,322 ^{ns}	1 ^{ns}	4,322 ^{ns}	0,6010 ^{ns}	0,519315 ^{ns}
$X_2.X_3$	202,608	1	202,608	28,1741	0,033709
Falta de ajuste	73,722	2	36,861	5,1258	0,163244
Erro Puro	14,383	2	7,191		
SQ Total	1588,114	10			
R^2	0,94452				
R^2_{aj}	0,86131				

* X_1 = hexadecano; X_2 = cicloexanona ($^{\circ}\text{C}$); X_3 = nitrobenzaldeído; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; ns = não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 45 - Gráfico de Pareto para a quantidade de hexadecano, cicloexanona e 4-nitrobenzaldeído em função do rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o terceiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.

A equação que descreve a variação do rendimento em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e de 4-nitrobenzaldeído está apresentada na [Equação 13](#).

(Equação 13)

$$Y_{\text{Rendimento}} = -0,0394.X_1 - 0,0840.X_2 - 1,089.X_3 + 0,0000151.X_1.X_2 + 0,000196.X_1.X_3 + 0,00134.X_2.X_3 + 110,2$$

Onde:

Y = valor da variável resposta, rendimento

X₁, X₂, X₃ = variáveis independentes, onde X₁ é a quantidade de hexadecano, X₂ é a quantidade de cicloexanona e X₃ é a quantidade de 4-nitrobenzaldeído

Em testes de atividade hidrolítica do PNFB realizados anteriormente observou-se que o 4-nitrobenzaldeído promoveu uma rápida perda de atividade enzimática, visto que moléculas que contêm grupamentos aldeídicos tendem a reagir com os resíduos de aminoácidos da enzima alterando sua estrutura tridimensional. Logo, verificou-se que a diminuição do rendimento pode ser devido ao aumento da quantidade de 4-nitrobenzaldeído (X₃), como pode ser verificado nas [Figuras 46 e 47](#). Podemos destacar que para 25 mg de 4-nitrobenzaldeído foi obtido 63,8% de rendimento, enquanto que para 75 mg o rendimento foi de 31,6% para a mesma quantidade de hexadecano (200 µL) e cicloexanona (250 µL) ([Ensaios 1 e 5, Tabela 30](#)).

Também foi observado pelo gráfico de Pareto (Figura 45) que a combinação da quantidade de cicloexanona e de 4-nitrobenzaldeído (X₂.X₃) foi significativa. De modo que o aumento concomitante da quantidade destas duas substâncias promoveu o aumento do rendimento da reação, provavelmente devido ao deslocamento da reação em direção ao produto aldólico devido ao aumento da concentração dos reagentes no meio reacional. Este aumento de rendimento pode ser observado graficamente na [Figura 48](#).

Figura 46 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e de 4-nitrobenzaldeído em função do rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o terceiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.

Figura 47 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de cicloexanona e de 4-nitrobenzaldeído em função do rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o terceiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.

Figura 48 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de cicloexanona e de hexadecano em função do rendimento da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o terceiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.

Nos experimentos controles observou-se que na ausência da enzima ocorreu a reação não biocatalítica com 2,7% de rendimento, valor similar ao observado para o primeiro e o segundo planejamento experimental. Para o controle empregando a proteína BSA observou-se um rendimento de 14,7%, valor menor que o observado para a RNL nas mesmas condições (Tabela 29) e bem inferior ao valor de 37,5% observado para a própria BSA no primeiro planejamento experimental (Tabela 26), mas próximo do valor de 12,5% observado no segundo planejamento experimental (Tabela 28), mostrando que a catálise proteica por esta enzima também está sujeita a alterações devido aos fatores empregados nos planejamentos experimentais para o intervalo avaliado.

4.4.3. Excesso diastereoisomérico

Os valores de excesso diastereoisomérico obtidos foram interpretados de acordo com o planejamento experimental 2³. É importante destacar que o *ed* de maior interesse para o objetivo do trabalho é representado por valores positivos, pois representa o valor para o produto *anti*, o qual apresentou excesso enantiomérico na reação aldólica catalisada pela RNL.

4.4.3.1. Primeiro planejamento experimental 2³ interpretado em função do excesso diastereoisomérico para o produto aldólico *anti* da reação entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona

O primeiro planejamento experimental 2³ foi interpretado em função do *ed* da reação. Nos experimentos foram empregados volumes de 400, 800 e 1200 µL de hexadecano; 500, 750 e 1000 µL de cicloexanona e 2, 3,5 e 5,0 min de irradiação de ultrassom no preparo da miniemulsão. As condições do ponto central empregado foram 800 µL de hexadecano, 750 µL de cicloexanona e 3,5 min de irradiação. Os resultados foram apresentados na [Tabela 32](#).

Tabela 32 - Variáveis independentes do primeiro planejamento fatorial 2³ com ponto central e resultados experimentais frente ao *ed* do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona.

Variáveis codificadas				Variáveis descodificadas		Variável Dependente	
Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	Hex (µL)	Cic (µL)	Tempo de Irrad (min)	<i>ed_{anti}</i> (%)
1	-1	-1	-1	400	500	2,0	-2,7
2	-1	1	-1	1200	500	2,0	-8,5
3	1	-1	-1	400	1000	2,0	-2,9
4	1	1	-1	1200	1000	2,0	1,1
5	-1	-1	1	400	500	5,0	-3,2
6	-1	1	1	1200	500	5,0	-13,3
7	1	-1	1	400	1000	5,0	-5,5
8	1	1	1	1200	1000	5,0	-6,4
9	0	0	0	800	750	3,5	-2,2
10	0	0	0	800	750	3,5	-4,3
11	0	0	0	800	750	3,5	-5,8
Controle sem enzima	0	0	0	800	750	3,5	-10,0
Controle BSA	0	0	0	800	750	3,5	18,1

*Hex: hexadecano; Cic: cicloexanona; irrad: Irradiação. *ed_{anti}*: excesso diastereoisomérico para o produto aldólico *anti*.

A qualidade do modelo gerado foi avaliada por meio da análise de variância (ANOVA) empregando-se a falta de ajuste e o coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}). Os resultados apresentados na Tabela 33 mostram que o modelo apresentou um excelente R^2 de 0,94 com R^2_{aj} de 0,84. Entretanto o modelo não apresentou significância de 95% para nenhum dos fatores avaliados, conforme observado no gráfico de Pareto apresentado na Figura 49, mostrando que o *ed* não foi susceptível às variações dos fatores nos intervalos empregados. Observou-se na ANOVA que o erro puro determinado para o modelo foi alto quando comparado às variações de *ed* obtidas nesse primeiro planejamento experimental.

Tabela 33 - Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e do tempo de irradiação para a reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona de acordo com o segundo planejamento experimental ²³ em sistema de miniemulsão.

Fator	SQ	GL	MQ	F	Valor-p
X_1^{ns} (Hexadecano)	20,4800 ^{ns}	1 ^{ns}	20,48000 ^{ns}	6,26300 ^{ns}	0,129393 ^{ns}
X_2^{ns} (Cicloexanona)	24,5000 ^{ns}	1 ^{ns}	24,50000 ^{ns}	7,49235 ^{ns}	0,111572 ^{ns}
X_3^{ns} (Tempo de irradiação)	29,6450 ^{ns}	1 ^{ns}	29,64500 ^{ns}	9,06575 ^{ns}	0,094869 ^{ns}
$X_1.X_2^{ns}$	45,1250 ^{ns}	1 ^{ns}	45,12500 ^{ns}	13,79969 ^{ns}	0,065433 ^{ns}
$X_1.X_3^{ns}$	10,5800 ^{ns}	1 ^{ns}	10,58000 ^{ns}	3,23547 ^{ns}	0,213876 ^{ns}
$X_2.X_3^{ns}$	2,8800 ^{ns}	1 ^{ns}	2,88000 ^{ns}	0,88073 ^{ns}	0,447069 ^{ns}
Falta de ajuste	2,5664	2	1,28318	0,39241	0,718179
Erro Puro	6,5400	2	3,27000		
SQ Total	142,3164	10			
R^2	0,93601				
R^2_{aj}	0,84001				

* X_1 = hexadecano; X_2 = cicloexanona (°C); X_3 = tempo de irradiação; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; ns = não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 49 - Gráfico de Pareto para a quantidade de hexadecano, cicloexanona e tempo de irradiação em função do ed_{anti} do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o segundo planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.

A equação que descreve a variação do ed em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e do tempo de irradiação de ultrassom está apresentada na [Equação 14](#).

(Equação 14)

$$Y_{ed} = -0,0151.X_1 - 0,00640.X_2 + 1,45.X_3 + 0,000024.X_1.X_2 - 0,001917.X_1.X_3 - 0,00160.X_2.X_3 + 2,2$$

Onde:

Y = valor da variável resposta, ed_{anti}

X_1, X_2, X_3 = variáveis independentes, onde X_1 é a quantidade de hexadecano, X_2 é a quantidade de cicloexanona e X_3 é o tempo de irradiação

A variação do ed em função da quantidade de cicloexanona e de hexadecano pode ser observada graficamente na [Figura 50](#), onde observou-se uma tendência na diminuição do ed com o decréscimo da quantidade de hexadecano e de cicloexanona. Nas [Figuras 51 e 52](#) pode-se observar que a diminuição do tempo de irradiação também tendeu a diminuir o ed . Entretanto não foi possível fazer constatações sobre os fatores deste primeiro planejamento experimental devido à falta de significância dos mesmos.

Figura 50 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de ciclohexanona e de hexadecano em função do *ed* do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a ciclohexanona para o primeiro planejamento experimental 2³ em sistema de miniemulsão.

Figura 51 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e do tempo de irradiação em função do *ed* do produto de reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a ciclohexanona para o primeiro planejamento experimental 2³ em sistema de miniemulsão.

Figura 52 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de cicloexanona e do tempo de irradiação em função do *ed* do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o primeiro planejamento experimental 2³ em sistema de miniemulsão.

Nos experimentos controles foi observado que o produto da reação aldólica não biocatalítica apresentou um *ed* de -10,0%. Enquanto o produto da catálise proteica por BSA apresentou 18,1% de *ed*, demonstrando que esta proteína também promoveu diastereosseletividade no produto da reação aldólica em sistema reacional de miniemulsão [Tabela 32](#).

4.4.3.2. Segundo planejamento experimental 2³ interpretado em função do excesso diastereoisomérico para o produto *anti* da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona

O segundo planejamento experimental 2³ também foi interpretado em função do *ed* da reação. O planejamento empregando volumes de 400, 800 e 1200 µL de hexadecano; 350, 550 e 750 µL de cicloexanona e 0,5, 1,0 e 1,5 minutos de irradiação de ultrassom no preparo da miniemulsão foi analisado e os resultados foram apresentados na [Tabela 34](#).

Tabela 34 - Variáveis independentes do planejamento fatorial 2³ com ponto central e resultados experimentais para o *ed_{anti}* do produto aldólico.

Variáveis codificadas				Variáveis descodificadas		Variável Dependente	
Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	Hex (µL)	Cic (µL)	Tempo de sonic (min)	<i>ed_{anti}</i> (%)
1	-1	-1	-1	400	350	0,5	-37,4
2	-1	1	-1	1200	350	0,5	29,8
3	1	-1	-1	400	750	0,5	5,7
4	1	1	-1	1200	750	0,5	6,8
5	-1	-1	1	400	350	1,5	-42,8
6	-1	1	1	1200	350	1,5	9,0
7	1	-1	1	400	750	1,5	6,4
8	1	1	1	1200	750	1,5	7,4
9	0	0	0	800	550	1,0	4,2
10	0	0	0	800	550	1,0	5,0
11	0	0	0	800	550	1,0	5,3
Controle sem enzima	0	0	0	800	550	1,0	-10,3
Controle BSA	0	0	0	800	550	1,0	18,0

*Hex: hexadecano; Cic: cicloexanona; 4-NO₂: 4-nitrobenzaldeído; *ed_{anti}*: excesso diastereoisomérico para o produto aldólico *anti*

Para avaliar a qualidade do modelo gerado foram empregados a análise de variância (ANOVA), a falta de ajuste e o coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}). Os resultados apresentados na [Tabela 35](#) mostram que o modelo apresentou um excelente R^2 de 0,97 com R^2_{aj} de 0,93. O modelo apresentou significância de 95% para todos os fatores avaliados, conforme observado no gráfico de Pareto apresentado na [Figura 53](#), mostrando que o *ed* foi uma variável resposta muito susceptível às variações dos fatores avaliados nos intervalos empregados.

Tabela 35 - Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e do tempo de irradiação frente ao *ed* do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona de acordo com o segundo planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.

Fator	SQ	GL	MQ	F	Valor-p
X ₁ (Hexadecano)	1833,151	1	1833,151	5669,540	0,000176
X ₂ (Cicloexanona)	572,911	1	572,911	1771,890	0,000564
X ₃ (Tempo de irradiação)	77,501	1	77,501	239,695	0,004146
X ₁ .X ₂	1708,201	1	1708,201	5283,097	0,000189
X ₁ .X ₃	30,031	1	30,031	92,880	0,010596
X ₂ .X ₃	94,531	1	94,531	292,365	0,003403
Falta de ajuste	127,813	2	63,907	197,649	0,005034
Erro Puro	0,647	2	0,323		
SQ Total	4444,787	10			
R ²	0,9711				
R ² _{aj}	0,9277				

*X₁ = hexadecano; X₂ = cicloexanona (°C); X₃ = tempo de irradiação; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; ns = não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 53 - Gráfico de Pareto para a quantidade de hexadecano, cicloexanona e tempo de irradiação em função do *ed* do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o segundo planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.

A equação que descreve a variação do *ed* em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e do tempo de irradiação está apresentada na [Equação 15](#).

(Equação 15)

$$Y_{ed} = 0,148.X_1 + 0,154.X_2 - 17,4.X_3 - 0,000183.X_1.X_2 - 0,00969.X_1.X_3 + 0,0344.X_2.X_3 - 116,6$$

Onde:

Y = valor da variável resposta, *ed*

X₁, X₂, X₃ = variáveis independentes, onde X₁ é a quantidade de hexadecano, X₂ é a quantidade de cicloexanona e X₃ é o tempo de irradiação

O fator mais significativo foi a quantidade de hexadecano (X₁) e em terceiro a contribuição da quantidade de cicloexanona (X₃) apresentando acréscimo no *ed* à medida que as quantidades destas substâncias aumentaram no meio reacional. Pode-se destacar que para 400 µL de hexadecano foi obtido -37,4% de *ed*, enquanto que para 1200 µL o *ed* foi de 29,8% para a mesma quantidade de cicloexanona (350 µL) e o mesmo tempo de irradiação (0,5 min) ([Ensaio 1 e 2, Tabela 34](#)).

Entretanto, a combinação do aumento da quantidade hexadecano e de cicloexanona (X₁.X₃) gerou um decréscimo no *ed*, provavelmente porque diferenças de polaridade na interface da emulsão promoveram diferentes interações que podem ter alterado o curso da reação aldólica.

Na [Figura 54](#) observou-se uma diminuição acentuada do *ed* com a redução concomitante da quantidade de hexadecano (X₁) e de cicloexanona (X₂) para valores inferiores a 500 µL de cada um destes componentes no meio reacional. Em relação ao tempo de irradiação, pode-se observar nas [Figuras 55 e 56](#) que este fator interferiu pouco no *ed*, mas em geral menores tempos de reação (aproximadamente 0,5 min) foram adequados para a obtenção dos maiores *eds* obtidos nesse planejamento.

Figura 54 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de ciclohexanona e de hexadecano em função do *ed* do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a ciclohexanona para o segundo planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.

Figura 55 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e do tempo de irradiação em função do *ed* do produto de reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a ciclohexanona para o segundo planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.

Figura 56 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de ciclohexanona e do tempo de irradiação em função do *ed* do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a ciclohexanona para o segundo planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.

Nos experimentos controles do segundo planejamento experimental foi observado que o produto da reação aldólica não biocatalítico apresentou um *ed* de -10,3% (Tabela 36), semelhantemente ao valor de -10,0% observado para o primeiro planejamento experimental (Tabela 32). Da mesma maneira, o produto da catálise proteica por BSA apresentou 18,0% de *ed* para o segundo planejamento experimental (Tabela 36), valor semelhante ao de 18,0% determinado no primeiro planejamento experimental (Tabela 32).

4.4.3.3. Terceiro planejamento experimental 2^3 interpretado em função do excesso diastereoisomérico para o produto *anti* da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona em sistema de miniemulsão

No terceiro planejamento experimental foram empregados 200, 350 e 500 μL de hexadecano, 250, 400 e 550 μL de cicloexanona e 25, 50 e 75 mg de 4-nitrobenzaldeído. Os experimentos também foram interpretados em função do *ed* para o produto aldólico *anti*. Os resultados estão descritos na [Tabela 36](#).

Tabela 36 - Variáveis independentes do planejamento fatorial 2^3 com ponto central e resultados experimentais de *ed* do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona de acordo com o terceiro planejamento experimental 2^3 .

Variáveis codificadas				Variáveis descodificadas			Variável Dependente
Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	Hex (μL)	Cic (μL)	4-NO ₂ (mg)	<i>ed</i> _{anti} (%)
1	-1	-1	-1	200	250	25	19,4
2	-1	1	-1	500	250	25	19,8
3	1	-1	-1	200	550	25	4,4
4	1	1	-1	500	550	25	4,6
5	-1	-1	1	200	250	75	24,8
6	-1	1	1	500	250	75	47,2
7	1	-1	1	200	550	75	5,8
8	1	1	1	500	550	75	6,4
9	0	0	0	350	400	50	21,4
10	0	0	0	350	400	50	13,0
11	0	0	0	350	400	50	17,0
Controle sem enzima	0	0	0	350	400	50	-10,1
Controle BSA	0	0	0	350	400	50	-24,7

*Hex: hexadecano; Cic: cicloexanona; 4-NO₂: 4-nitrobenzaldeído; *ed*_{anti}: excesso diastereoisomérico para o produto aldólico *anti*

Para avaliar a qualidade do modelo gerado foram empregadas a análise de variância (ANOVA), a falta de ajuste e o coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}). Os resultados apresentados na [Tabela 37](#) mostraram que o modelo apresentou um ótimo R^2 de 0,94 com R^2_{aj} de 0,85. O modelo apresentou significância de 95% apenas para a quantidade de cicloexanona (X₂).

Tabela 37 - Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e 4-nitrobenzaldeído frente ao *ed* do produto aldólico entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o terceiro planejamento experimental 2³ em sistema de miniemulsão.

Fator ^a	SQ	GL	MQ	F	Valor-p
X ₁ ^{ns} (Hexadecano)	69,620 ^{ns}	1 ^{ns}	69,620 ^{ns}	3,94373 ^{ns}	0,185438 ^{ns}
X ₂ (Cicloexanona)	1012,500	1	1012,500	57,35461	0,016992
X ₃ (Nitrobenzaldeído)	162,000 ^{ns}	1 ^{ns}	162,000 ^{ns}	9,17674 ^{ns}	0,093878 ^{ns}
X ₁ .X ₂	60,500 ^{ns}	1 ^{ns}	60,500 ^{ns}	3,42711 ^{ns}	0,205343 ^{ns}
X ₁ .X ₃	62,720 ^{ns}	1 ^{ns}	62,720 ^{ns}	3,55287 ^{ns}	0,200109 ^{ns}
X ₂ .X ₃	109,520 ^{ns}	1 ^{ns}	109,520 ^{ns}	6,20393 ^{ns}	0,130394 ^{ns}
Falta de ajuste	59,062	2	29,531	1,67284	0,374134
Erro Puro	35,307	2	17,653		
SQ Total	1571,229	10			
R ²	0,93994				
R ² _{aj}	0,84985				

^aX₁ = hexadecano; X₂ = cicloexanona (°C); X₃ = tempo de irradiação; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; ns = não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Conforme observado no gráfico de Pareto apresentado na [Figura 57](#), a quantidade de cicloexanona (X₂) apresentou uma contribuição negativa para o *ed*, logo, para aumentar o *ed* foi necessário o uso de menores quantidades de cicloexanona. Podemos destacar que para 250 µL de cicloexanona foi obtido 19,4% de *ed*, enquanto que para 550 µL o *ed* foi de 4,4% para a mesma quantidade de hexadecano (200 µL) e a mesma quantidade de 4-nitrobenzaldeído (0,5 min) ([Ensaio 1 e 3, Tabela 36](#)).

Conforme pode ser observado graficamente nas [Figuras 58 e 59](#). A quantidade de hexadecano (X₁) e de 4-nitrobenzaldeído (X₂) não foram significativos para 95% de confiança, portanto, na [Figura 60](#) pode-se observar que o *ed* variou pouco com estes fatores.

Figura 57 - Gráfico de Pareto para a quantidade de hexadecano, cicloexanona e 4-nitrobenzaldeído em função do *ed* do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o terceiro planejamento experimental 2³ em sistema de miniemulsão.

A equação que descreve a variação do *ed* em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e de 4-nitrobenzaldeído está apresentada na [Equação 16](#).

(Equação 16)

$$Y_{ed} = 0,0312.X_1 + 0,0171.X_2 + 0,313.X_3 - 0,000122.X_1.X_2 + 0,000747.X_1.X_3 - 0,000987.X_2.X_3 + 7,0$$

Onde:

Y = valor da variável resposta, *ed*, excesso diastereoisômerico para o produto *anti*

X₁, X₂, X₃ = variáveis independentes, onde X₁ é a quantidade de hexadecano, X₂ é a quantidade de cicloexanona e X₃ é a quantidade de 4-nitrobenzaldeído

Figura 58 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de ciclohexanona e de hexadecano em função do *ed* do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a ciclohexanona para o terceiro planejamento experimental 2³ em sistema de miniemulsão.

Figura 59 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de ciclohexanona e de 4-nitrobenzaldeído em função do *ed* do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a ciclohexanona para o terceiro planejamento experimental em sistema de miniemulsão.

Figura 60 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e de 4-nitrobenzaldeído em função do *ed* do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o terceiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.

Nos experimentos controles do terceiro planejamento experimental foi observado que o produto da reação aldólica não biocatalítico apresentou um *ed* de -10,1% (Tabela 38), semelhantemente ao valor de -10,0 e 10,3% determinados para o primeiro (Tabela 32) e o segundo (Tabela 36) planejamento experimental. O produto da catálise proteica por BSA para o terceiro planejamento experimental (Tabela 38) apresentou -24,7 % de *ed*, valor diferente dos 18,0% de *ed* obtidos para o primeiro (Tabela 32) e segundo planejamento experimental (Tabela 36). Demonstrando que o *ed* da catálise proteica por BSA também é susceptível a alterações da composição do meio reacional de miniemulsão.

4.4.4. Excesso enantiomérico

Os planejamentos experimentais desenvolvidos também foram interpretados em função do excesso enantiomérico, uma vez que a obtenção de produtos enantiomericamente puros ou com altas enantiosseletividades é fundamental para muitas aplicações em síntese orgânica.

4.4.4.1. Primeiro planejamento experimental 2³ interpretado em função do excesso enantiomérico do produto *anti* da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona em sistema de miniemulsão

O primeiro planejamento experimental também foi interpretado em função do *ee_{anti}* do produto aldólica *anti* da reação entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona. Desta maneira, o planejamento experimental empregando volumes de 400, 800 e 1200 µL de hexadecano; 500, 750 e 1000 µL de cicloexanona e 2, 3,5 e 5,0 minutos de irradiação de ultrassom no preparo da miniemulsão foi interpretado e os resultados foram apresentados na [Tabela 38](#).

Tabela 38 - Variáveis independentes do primeiro planejamento fatorial 2³ com ponto central e resultados experimentais frente ao excesso enantiomérico do produto *anti* da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona em sistema de miniemulsão.

Variáveis codificadas				Variáveis decodificadas			Variável Dependente
Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	Hex (µL)	Cic (µL)	Tempo de irrad (min)	<i>ee_{anti}</i> (%)
1	-1	-1	-1	400	500	2,0	9,8
2	-1	1	-1	1200	500	2,0	13,7
3	1	-1	-1	400	1000	2,0	12,2
4	1	1	-1	1200	1000	2,0	12,2
5	-1	-1	1	400	500	5,0	9,2
6	-1	1	1	1200	500	5,0	9,6
7	1	-1	1	400	1000	5,0	11,7
8	1	1	1	1200	1000	5,0	11,5
9	0	0	0	800	750	3,5	11,1
10	0	0	0	800	750	3,5	10,9
11	0	0	0	800	750	3,5	11,0
Controle sem enzima	0	0	0	800	750	3,5	0,7
Controle BSA	0	0	0	800	750	3,5	5,4

*Hex: hexadecano; Cic: cicloexanona; Irrad: irradiação; *ee_{anti}*: excesso enantiomérico do produto aldólico *anti* para o produto (*S,R*).

Para avaliar a qualidade do modelo gerado foram empregados a análise de variância (ANOVA), a falta de ajuste e o coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}). Os resultados da ANOVA na [Tabela 39](#) mostraram que o modelo apresentou um excelente R^2 de 0,99 com R^2_{aj} de 0,97. O modelo apresentou significância de 95% para todas as variáveis avaliadas, mostrando que o ee_{anti} está relacionado a todos estes parâmetros nos intervalos empregados.

Tabela 39 - Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e tempo de irradiação para o primeiro planejamento experimental 2³ frente ao excesso enantiomérico do produto *anti* na reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona.

Fator ^a	SQ	GL	MQ	F	Valor-p
X ₁ (Hexadecano)	2,10125	1	2,101250	210,1250	0,004725
X ₂ (Cicloexanona)	3,51125	1	3,511250	351,1250	0,002836
X ₃ (Tempo de irradiação)	4,35125	1	4,351250	435,1250	0,002290
X ₁ .X ₂	2,53125	1	2,531250	253,1250	0,003927
X ₁ .X ₃	1,71125	1	1,711250	171,1250	0,005793
X ₂ .X ₃	1,53125	1	1,531250	153,1250	0,006467
X ₁ .X ₂ .X ₃	1,36125	1	1,361250	136,1250	0,007266
Falta de ajuste	0,12307	1	0,123068	12,3068	0,072527
Erro Puro	0,02000	2	0,010000		
SQ Total	17,24182	10			
R ²	0,9917				
R ² _{aj}	0,97234				

X₁ = hexadecano; X₂ = cicloexanona (°C); X₃ = tempo de irradiação; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; ns = não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Observando-se a contribuição de cada variável por meio do gráfico de Pareto ([Figura 61](#)), verificou-se que o aumento do tempo de irradiação (X₃) promoveu uma diminuição acentuada do ee_{anti} , uma vez que este foi o fator que mais influenciou na variável resposta, apresentando um valor negativo. Pode-se destacar que para 2 minutos de irradiação de ultrassom foi obtido 13,7% de ee_{anti} , enquanto que para 5 minutos o ee_{anti} foi de 9,6% para a mesma quantidade de hexadecano (1200 µL) e a mesma quantidade de cicloexanona (500 µL) ([Ensaio 2 e 6, Tabela 38](#)).

Outro fator que apresentou forte influência foi a quantidade de cicloexanona (X₂), a qual apresentou uma variação positiva. Portanto, quanto maior a quantidade de cicloexanona no intervalo avaliado, maior foi o ee_{anti} do produto da reação. Por exemplo, para 500 µL de

cicloexanona foi obtido 9,8% de ee_{anti} , enquanto que para 1000 μL o ee_{anti} foi de 12,2% para a mesma quantidade de hexadecano (400 μL) e o mesmo tempo de irradiação (2 min) (Ensaio 1 e 3, Tabela 38).

Entretanto, a combinação da quantidade de hexadecano com a de cicloexanona ($X_1.X_2$) apresentou uma contribuição negativa para o ee_{anti} e, portanto, o aumento concomitante na quantidade destes reagentes na miniemulsão promoveu uma diminuição do ee_{anti} para o produto aldólico *anti*.

Figura 61 - Gráfico de Pareto para a quantidade de hexadecano, cicloexanona e tempo de irradiação em função do ee_{anti} do produto da reação de aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o primeiro planejamento experimental 2³.

A equação que descreve a variação do ee_{anti} em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e do tempo de irradiação está apresentada na [Equação 17](#).

(Equação 17)

$$Y_{ee} = 0,0154.X_1 + 0,0108.X_2 + 0,900.X_3 - 0,0000153.X_1.X_2 - 0,00283.X_1.X_3 - 0,00103.X_2.X_3 + 0,00000275.X_1.X_2.X_3 + 1,6$$

Onde:

Y = valor da variável resposta, ee ; excesso enantiomérico do produto *anti*;

X_1 , X_2 , X_3 = variáveis independentes, onde X_1 é a quantidade de hexadecano, X_2 é a quantidade de cicloexanona e X_3 é a quantidade de 4-nitrobenzaldeído.

Nas [Figuras 62 e 63](#) pode-se visualizar que o aumento do tempo de irradiação (X_3) promoveu uma diminuição do ee_{anti} . Concomitantemente, também se verificou na [Figura 62](#) que o aumento da quantidade de cicloexanona (X_2) promoveu um aumento do ee_{anti} . Assim como na [Figura 63](#) foi observado que o aumento da quantidade de hexadecano (X_1) promoveu o aumento do ee_{anti} . Ainda, pelo gráfico de Pareto ([Figura 61](#)) concluiu-se que o aumento concomitante da quantidade de cicloexanona e de hexadecano promoveu uma diminuição do ee_{anti} . Logo, o aumento destes dois fatores dependendo do intervalo avaliado pode não promover o aumento do ee_{anti} conforme sugerido nos dados obtidos.

A partir destas observações foi desenvolvido um segundo planejamento fatorial 2^3 com o ponto central de 800 μL de hexadecano, 550 μL de cicloexanona e 1,0 min de tempo de irradiação. Enquanto que o primeiro planejamento experimental 2^3 teve como ponto central 800 μL de hexadecano, 750 μL de cicloexanona e 3,5 minutos de tempo de irradiação de ultrassom. Portanto, empregou-se menores tempos de irradiação, pois os dados do primeiro planejamento experimental 2^3 sugeriram que seria obtido um maior ee_{anti} . Esta diminuição do tempo de irradiação poderia gerar um menor tamanho médio das gotículas de miniemulsão, favorecendo uma maior estabilidade do sistema reacional de miniemulsão, conforme observado na interpretação dos planejamentos experimentais em função do tamanho médio das gotículas de miniemulsão.

Figura 62 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de cicloexanona e do tempo de irradiação em função do ee_{anti} do produto de reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o primeiro planejamento experimental em sistema de miniemulsão.

Figura 63 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e do tempo de irradiação em função do ee_{anti} do produto *anti* da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o primeiro planejamento experimental em sistema de miniemulsão.

Figura 64 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e de cicloexanona em função do ee_{anti} do produto *anti* da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o primeiro planejamento experimental em sistema de miniemulsão.

Nos experimentos controles foi observado que a reação não biocatalítica apresentou um ee_{anti} de 0,7%, que pode ser considerado não significativo. Enquanto que no experimento com catálise proteica por BSA foi observado um ee_{anti} de 5,4%, demonstrando que em sistema reacional de miniemulsão esta proteína também catalisou a reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona com baixa enantiosseletividade (Tabela 38).

4.4.4.2. Segundo planejamento experimental 2³ interpretado em função do excesso enantiomérico do produto *anti* da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona em sistema de miniemulsão

O segundo planejamento experimental 2³ também foi interpretado em função do *ee_{anti}* da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona. O planejamento experimental foi realizado empregando volumes de 400, 800 e 1200 µL de hexadecano; 350, 550 e 750 µL de cicloexanona e 0,5, 1,0 e 1,5 minutos de irradiação de ultrassom no preparo da miniemulsão. Os resultados obtidos foram apresentados na [Tabela 40](#).

Tabela 40 - Variáveis independentes do planejamento fatorial 2³ com ponto central e resultados experimentais para o *ee* da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona.

Variáveis codificadas				Variáveis descodificadas			Variável Dependente
Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	Hex (µL)	Cic (µL)	Irrad (min)	<i>ee_{anti}</i> (%)
1	-1	-1	-1	400	350	0,5	27,3
2	-1	1	-1	1200	350	0,5	9,6
3	1	-1	-1	400	750	0,5	11,7
4	1	1	-1	1200	750	0,5	12,9
5	-1	-1	1	400	350	1,5	30,0
6	-1	1	1	1200	350	1,5	11,3
7	1	-1	1	400	750	1,5	12,4
8	1	1	1	1200	750	1,5	12,7
9	0	0	0	800	550	1,0	11,4
10	0	0	0	800	550	1,0	12,0
11	0	0	0	800	550	1,0	11,5
Controle sem enzima	0	0	0	800	550	1,0	0,1
Controle BSA	0	0	0	800	550	1,0	10,1

*Hex: hexadecano; Cic: cicloexanona; Irrad: irradiação; *ee_{anti}*: excesso enantiomérico para o produto aldólico *anti*.

Para avaliar a qualidade do modelo gerado foram empregados a análise de variância (ANOVA), a falta de ajuste e o coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}). Os resultados apresentados na [Tabela 41](#) mostraram que o modelo apresentou um excelente R^2 de 0,91 com R^2_{aj} de 0,78. O modelo apresentou significância de 95% para a combinação da quantidade de hexadecano com a de cicloexanona ($X_1.X_2$), a quantidade de hexadecano (X_1), de cicloexanona (X_2), o tempo de irradiação (X_3) e a combinação da quantidade de cicloexanona com o tempo de irradiação ($X_2.X_3$).

Tabela 41 - Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e do tempo de irradiação frente ao ee_{anti} do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona.

Fator ^a	SQ	GL	MQ	F	Valor-p
X ₁ (Hexadecano)	153,7381	1	153,7381	1766,428	0,000566
X ₂ (Cicloexanona)	101,7451	1	101,7451	1169,036	0,000854
X ₃ ^{ns} (Tempo de irradiação)	2,9161	1	2,9161	33,506	0,028573
X ₁ .X ₂	178,8886	1	178,8886	2055,403	0,000486
X ₁ .X ₃ ^{ns}	0,4465 ^{ns}	1 ^{ns}	0,4465 ^{ns}	5,130 ^{ns}	0,151761 ^{ns}
X ₂ .X ₃ ^{ns}	1,8336	1	1,8336	21,068	0,044333
Falta de ajuste	41,6273	2	20,8136	239,145	0,004164
Erro Puro	0,1741	2	0,0870		
SQ Total	481,3694	10			
R ²	0,91316				
R ² _{aj}	0,7829				

X₁ = hexadecano; X₂ = cicloexanona (°C); X₃ = tempo de irradiação; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; ns = não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

No gráfico de Pareto ([Figura 65](#)) observou-se que o fator mais significativo foi a combinação da quantidade de hexadecano e de cicloexanona (X₁.X₂), o qual apresentou uma variação positiva e, portanto, promoveu o aumento do ee_{anti} com o aumento da combinação destas duas variáveis (X₁ e X₂). Entretanto, o aumento individual de cada um destes fatores promoveu um decréscimo no ee_{anti} , fazendo com que no geral a estereosseletividade diminuiu com o aumento das concentrações destes compostos no meio reacional. Por exemplo, para 400 µL de hexadecano e 350 µL de cicloexanona foi obtido 27,3% de ee_{anti} , enquanto que para 1200 µL de hexadecano e 750 µL de cicloexanona o ee_{anti} foi de 12,9% para o mesmo tempo de irradiação (0,5 min) ([Ensaio 1 e 4, Tabela 40](#)).

Figura 65 - Gráfico de Pareto para a quantidade de hexadecano, cicloexanona e tempo de irradiação em função do ee_{anti} do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o segundo planejamento experimental 2³.

A equação que descreve a variação do ee_{anti} em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e do tempo de irradiação está apresentada na [Equação 18](#).

(Equação 18)

$$Y_{ee} = -0,0423.X_1 - 0,0603.X_2 + 4,79.X_3 + 0,0000591.X_1.X_2 - 0,00118.X_1.X_3 - 0,00479.X_2.X_3 + 54,6$$

Onde:

Y = valor da variável resposta, ee_{anti} ; excesso enantiomérico do produto *anti*

X_1, X_2, X_3 = variáveis independentes, onde X_1 é a quantidade de hexadecano, X_2 é a quantidade de cicloexanona e X_3 é o tempo de irradiação

Desta maneira, pode-se observar que os melhores valores de ee (aproximadamente 30%) foram obtidos para quantidades menores de hexadecano e cicloexanona (aproximadamente 400 μ L) ([Figura 66](#)). Nas [Figuras 67 e 68](#) observou-se que o tempo de irradiação de ultrassom não apresentou significância para o ee_{anti} .

Provavelmente o aumento da quantidade de hexadecano (X_1) e de cicloexanona (X_2), que são reagentes desnaturantes, pode provocar uma desestruturação da proteína afetando a estereosseletividade e consequentemente o ee_{anti} . O tempo de irradiação não interferiu no ee_{anti} porque a miniemulsão foi formada antes da adição da enzima e, portanto, só haveria diferenças significativas caso tamanhos médios significativamente diferentes das gotículas de miniemulsão tivessem sido obtidos.

A partir destas observações um novo planejamento fatorial 2^3 foi elaborado, mas visto que o tempo de irradiação de ultrassom foi um fator não significativo, esta variável foi substituída pela quantidade do reagente 4-nitrobenzaldeído para estes novos experimentos.

Figura 66 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e de cicloexanona em função do ee_{anti} do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o segundo planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.

Figura 67 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e do tempo de irradiação em função do ee_{anti} do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o segundo planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.

Figura 68 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de cicloexanona e do tempo de irradiação em função do ee_{anti} do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o segundo planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.

Nos experimentos controles foi observado que a reação não biocatalítica apresentou um ee_{anti} de 0,1% (Tabela 40) que pode ser considerado não significativo, assim como o 0,7% de ee_{anti} observado para o primeiro planejamento experimental (Tabela 38). Enquanto que no experimento com catálise proteica por BSA foi observado um ee_{anti} de 10,1% para o segundo planejamento experimental (Tabela 40), enquanto para o primeiro planejamento experimental foi observado um ee_{anti} de 5,4% (Tabela 38). Demonstrando que a enantiosseletividade na catálise proteica por BSA também foi alterada quando os fatores do sistema reacional de miniemulsão são alterados.

4.4.4.3. Terceiro planejamento experimental 2³ interpretado em função do excesso enantiomérico do produto *anti* da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona em sistema de miniemulsão

O terceiro planejamento experimental em que foi empregado 200, 350 e 500 µL de hexadecano, 250, 400 e 550 µL de cicloexanona e 25, 50 e 75 mg de 4-nitrobenzaldeído também foi avaliado em função do ee_{anti} do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona. Os resultados estão descritos na [Tabela 42](#).

Tabela 42 - Variáveis independentes do planejamento fatorial 2³ com ponto central e resultados experimentais para o ee_{anti} do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona do terceiro planejamento experimental 2³.

Variáveis codificadas				Variáveis descodificadas			Variável Dependente
Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	Hex (µL)	Cic (µL)	4-NO ₂ (mg)	ee_{anti} (%)
1	-1	-1	-1	200	250	25	8,6
2	-1	1	-1	500	250	25	9,5
3	1	-1	-1	200	550	25	11,6
4	1	1	-1	500	550	25	12,6
5	-1	-1	1	200	250	75	7,8
6	-1	1	1	500	250	75	6,5
7	1	-1	1	200	550	75	8,4
8	1	1	1	500	550	75	8,7
9	0	0	0	350	400	50	9,0
10	0	0	0	350	400	50	9,7
11	0	0	0	350	400	50	9,4
Controle sem enzima	0	0	0	350	400	50	-0,1
Controle BSA	0	0	0	350	400	50	7,3

*Hex: hexadecano; Cic: cicloexanona; 4-NO₂: 4-nitrobenzaldeído; ee_{anti} : excesso enantiomérico para o produto aldólico *anti*.

Para avaliar a qualidade do modelo gerado foram empregadas a análise de variância (ANOVA), a falta de ajuste e o coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}). Os resultados apresentados na [Tabela 37](#) sugeriram que o modelo apresentou um ótimo R^2 de 0,88 com R^2_{aj} de 0,83. O modelo apresentou significância de 95% para a quantidade de cicloexanona (X₂) e de 4-nitrobenzaldeído (X₃).

Tabela 43 - Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e 4-nitrobenzaldeído frente ao ee_{anti} do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o terceiro planejamento experimental 2³ em sistema de miniemulsão.

Fator	SQ	GL	MQ	F	Valor-p
X ₁ ^{ns} (Hexadecano)	0,10580 ^{ns}	1 ^{ns}	0,10580 ^{ns}	0,9997 ^{ns}	0,422710 ^{ns}
X ₂ (Cicloexanona)	9,94580	1	9,94580	93,9761	0,010474
X ₃ (Nitrobenzaldeído)	14,90580	1	14,90580	140,8422	0,007025
Falta de ajuste	3,14902	5	0,62980	5,9509	0,150099
Erro Puro	0,21167	2	0,10583		
SQ Total	28,31809	10			
R ²	0,88132				
R ² _{aj}	0,83046				

X₁ = hexadecano; X₂ = cicloexanona (°C); X₃ = tempo de irradiação; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; ns = não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Conforme observado no gráfico de Pareto apresentado na Figura 69, a quantidade de 4-nitrobenzaldeído (X₃) foi o fator que mais influenciou o ee_{anti} , de modo que menores quantidades deste reagente promoveram um maior ee_{anti} . Isto pode ter ocorrido devido às interações do 4-nitrobenzaldeído com os resíduos de aminoácidos da enzima que podem afetar a estrutura proteica da enzima. Por exemplo, para 25 mg de 4-nitrobenzaldeído foi obtido 8,6% de ee_{anti} , enquanto que para 75 mg o ee_{anti} foi de 11,6% para a mesma quantidade de hexadecano (200 µL) e de 4-nitrobenzaldeído (25 mg) ([Ensaio 1 e 5, Tabela 42](#)).

Figura 69 - Gráfico de Pareto para a quantidade de hexadecano, cicloexanona e 4-nitrobenzaldeído em função do ee_{anti} do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o terceiro planejamento experimental 2³ em sistema de miniemulsão.

A equação que descreve a variação do ee_{anti} em função da quantidade de hexadecano, cicloexanona e de 4-nitrobenzaldeído está apresentada na [Equação 19](#).

(Equação 19)

$$Y_{ee} = 0,000767.X_1 + 0,00743.X_2 - 0,0546.X_3 + 8,7$$

Onde:

Y = valor da variável resposta, ee_{anti} ; excesso enantiomérico do produto *anti*

X₁, X₂, X₃ = variáveis independentes, onde X₁ é a quantidade de hexadecano, X₂ é a quantidade de cicloexanona e X₃ é a quantidade de 4-nitrobenzaldeído

Outro fator que influenciou fortemente o ee_{anti} foi a quantidade de cicloexanona (X₂), conforme mostrado nas [Figuras 70 e 71](#). Para o intervalo avaliado observou-se que o aumento da quantidade de cicloexanona (X₂) promoveu a diminuição do ee_{anti} do produto da reação aldólica, diferentemente do que ocorreu no segundo planejamento experimental. Este fato ocorreu provavelmente pela diminuição da estabilidade das miniemulsões, expondo a enzima aos reagentes desnaturantes. Pode-se destacar que para 250 µL de cicloexanona foi obtido 8,6% de ee_{anti} , enquanto que para 550 µL o ee_{anti} foi de 7,8% para a mesma quantidade de hexadecano (200 µL) e de cicloexanona (250 µL) ([Ensaio 1 e 3, Tabela 42](#)).

Figura 70 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de cicloexanona e de hexadecano em função do ee_{anti} do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o terceiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.

Figura 71 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de cicloexanona e de 4-nitrobenzaldeído em função do ee_{anti} do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o terceiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.

Figura 72 - Superfície de resposta mostrando o efeito da quantidade de hexadecano e 4-nitrobenzaldeído em função do ee_{anti} do produto da reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona para o terceiro planejamento experimental 2^3 em sistema de miniemulsão.

Nos experimentos controles foi observado que a reação não biocatalítica apresentou um ee_{anti} de -0,1% (Tabela 42) que pode ser considerado não significativo, assim como para os demais planejamentos experimentais. Enquanto que no experimento com catálise proteica por BSA foi observado um ee_{anti} de 7,3% (Tabela 42), valor abaixo do 10,1% de ee_{anti} para o segundo planejamento experimental (Tabela 40), enquanto para o primeiro planejamento experimental foi observado um ee_{anti} de 5,4% (Tabela 38).

4.4.5. Quarto planejamento experimental

Foi elaborado um quarto planejamento experimental (Tabela 44) com ponto central de 400 μL de hexadecano, 350 μL de cicloexanona e 50 mg de 4-nitrobenzaldeído a partir dos resultados obtidos no terceiro planejamento experimental: ponto central de 350 μL de hexadecano, 400 μL de cicloexanona e 50 mg de 4-nitrobenzaldeído. Entretanto, neste quarto planejamento experimental vários ensaios (Ensaio 5-8, Tabela 44) apresentaram instabilidade da miniemulsão e formação de precipitado após 12 h, inviabilizando a realização das reações nestas condições.

Desta maneira, verificou-se que no emprego do sistema reacional de miniemulsão na reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona, havia sido determinado um dos limites de concentrações de reagentes e adjuvantes que permitiam a obtenção de um sistema minimamente estável. Logo, os valores de tamanho médio das gotículas de miniemulsão, rendimento, ed e ee_{anti} não foram determinados para estes experimentos.

Tabela 44 - Variáveis independentes do planejamento fatorial 2^3 com ponto central do quarto planejamento experimental em sistema de miniemulsão.

Ensaio	Variáveis codificadas			Variáveis descodificadas		
	X_1	X_2	X_3	Hex (μL)	Cic (μL)	4-NO ₂ (mg)
1	-1	-1	-1	250	200	25
2	-1	1	-1	550	200	25
3	1	-1	-1	250	500	25
4	1	1	-1	550	500	25
5	-1	-1	1	250	200	75
6	-1	1	1	550	200	75
7	1	-1	1	250	500	75
8	1	1	1	550	500	75
9	0	0	0	400	350	50
10	0	0	0	400	350	50
11	0	0	0	400	350	50

*Hex: hexadecano; Cic: cicloexanona; 4-NO₂: 4-nitrobenzaldeído.

Portanto, empregando-se uma abordagem estatística de planejamento experimental foram identificadas diversas formulações que possibilitaram a obtenção de miniemulsões com tamanho médio de gotículas menores do que 500 nm. As quais são responsáveis pela grande área superficial de interface polar-apolar que permite a obtenção de um maior rendimento, mesmo com o emprego de uma quantidade menor de enzima (6 mg mL⁻¹) do que os experimentos relatados na literatura (aproximadamente 50 mg mL⁻¹). Fator importante para

qualquer aplicação industrial, pois o catalisador sempre apresenta um custo expressivo em um sistema de produção de larga escala.

4.5. Metodologia para a extração do produto aldólico do sistema reacional de miniemulsão

Um dos principais desafios para o emprego de miniemulsões é a extração do material a partir de um sistema reacional de miniemulsão estável. Empregando-se o método de saturação com NaCl seguido pela adição de acetato de etila e posterior extração líquido-líquido desenvolvido neste trabalho foi possível obter as amostras com separação total de fases (Figura 73) e a obtenção do rendimento isolado para a reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona. Observou-se que para a amostra 5 do segundo planejamento experimental foi obtido o rendimento de 5%, muito semelhante ao rendimento de 4,8 % determinado por CLAE-UV com 30% de ee_{anti} para o produto aldólico *anti*. Logo, conclui-se que a metodologia promove a extração de aproximadamente 100% do produto obtido.

Figura 73 - Imagem da amostra 5 do segundo planejamento experimental antes e depois do processo de desestabilização do sistema reacional de miniemulsão.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível a identificação de várias enzimas capazes de realizar a reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona nas condições empregadas, incluindo lipases e celulasas. Foi possível empregar a RNL em diversas condições reacionais incluindo solventes orgânicos na presença de água, em solventes orgânicos com tampões aquosos e somente em solução de tampões aquosos (uma abordagem mais sustentável). Foi observado que os empregos de diferentes condições reacionais influenciaram fortemente o rendimento (rend. = 0-99%) e a enantiosseletividade do produto *anti* (ee_{anti} = 6-55%), possibilitando o uso de condições maximizadas que promoveram a obtenção de melhores rendimentos e estereosseletividades na reação aldólica.

O produto aldólico foi observado na reação mesmo com o emprego de enzima inativa em condições desnaturantes. Portanto, mesmo com a formação do produto aldólico com ee_{anti} significativo, a reação procedeu por catálise proteica inespecífica nas condições reacionais empregadas. Este estudo enzimático oferece novas possibilidades para o emprego de lipases, especialmente para a enzima RNL, a qual tem sido pouco relatada na literatura em comparação com outras lipases. Experimentos com cicloexanona e diferentes aldeídos aromáticos foram realizados mostrando que esta enzima foi capaz de realizar a reação aldólica em todos os casos com rendimentos variados (rend. = 2-81%) e modestas seletividades (ee_{anti} = 13-55%).

A partir destes resultados obtidos, uma nova abordagem baseada em sistemas reacionais de miniemulsão foi elaborada. Onde foi possível a obtenção de miniemulsões estáveis mesmo empregando substratos relativamente polares quando comparado aos substratos comumente empregados na literatura.

O emprego de reagentes no estado sólido (uma vez que miniemulsão é um sistema fluido) e soluções tampões em meios reacionais de miniemulsão é tido como um desafio para o emprego deste método em reações de síntese orgânica. Desta maneira, foram descritos neste trabalho métodos de produção de sistemas reacionais de miniemulsão estáveis e aplicáveis em que algumas limitações foram superadas utilizando-se aproximadamente 8% de hexadecano, 7% de cicloexanona, 1,5% de 4-nitrobenzaldeído e 1,6% de tween 80 no meio reacional aquoso de miniemulsão com 1,5 min de irradiação de ultrassom.

Durante o trabalho foi possível minimizar a quantidade de catalisador empregado na reação (de 20 para 6 mg mL⁻¹) em comparação com reações realizadas previamente em mistura de solvente orgânico e água. Foi possível maximizar o rendimento de aproximadamente 25%

para valores de até 65% para 48 h de reação, mesmo com a redução da quantidade de enzima. A partir do primeiro experimento obtido, o *ee* de aproximadamente 10% foi maximizado para valores acima de 30%.

O isolamento do produto obtido, outro desafio no emprego de miniemulsões, também foi superado. No qual um método simples possibilitou a desestabilização do sistema de miniemulsão e criação de uma separação de fases, que possibilitou a extração e isolamento do produto obtido através da adição de NaCl e de acetato de etila. Destacando-se que o rendimento isolado apresentado (5,0%) foi semelhante ao obtido por análise de CLAE-UV (4,8%), indicando que aproximadamente 100% do produto obtido durante a reação foi isolado.

Com a interpretação estatística dos dados obtidos foi possível apresentar compreensões satisfatórias para as variações observadas de *ee*, *ed*, rendimento e tamanho médio de gotículas de miniemulsão em nível molecular, através do modelo mais aceito para reações em miniemulsão. Tais observações possibilitam uma compreensão mais completa do sistema de miniemulsão e permitiram uma melhor racionalização deste meio reacional que ainda não foi amplamente estudado na literatura para promover reações biocatalíticas. Comprovando a potencialidade deste método para diferentes tipos de reações orgânicas.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, A. **Business statistics for dummies**. New Jersey: Wiley, 2013. 408 p.
- ASCHENBRENNER, E. M.; WEISS, C. K.; LANDFESTER, K. Enzymatic esterification in aqueous miniemulsions. **Chemistry: a European Journal**, v. 15, p. 2434-2444, 2009.
- AVILA-GONZALEZ, R.; PEREZ-GILABERT, M.; GARCIA-CARMONA, F. Lipase-catalyzed preparation of S-propranolol in presence of hydroxypropyl beta-cyclodextrins. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, p. 423-428, 2005.
- BABTIE, A.; TOKURIKI, N.; HOLLFELDER, F. What makes an enzyme promiscuous? **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, p. 200-207, 2010.
- BECKMAN COULTER LIFE SCIENCES. **Using Polarization Intensity Differential Scattering (PIDS) for the Sizing of Non-Spherical Sub-Micron Particles**. A-1995A, 2014. Disponível em: < <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/bibliography?docname=A-1995A.pdf> >. Acesso em: 17 dez. 2017.
- BENEDETTI, F.; BERTI, F.; BIDOGLIA, S. Aldolase activity of serum albumins. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 9, p. 4417-4420, 2011.
- BOLT, A.; BERRY, A.; NELSON, A. Directed evolution of aldolases for exploitation in synthetic organic chemistry. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 474, p. 318-330, 2008.
- BOMMARIUS, A.; BETTINE, R. **Biocatalysis: fundamentals and applications**. Weinheim, Germany: Wiley, 2004. 634 p.
- BRANNEY, C.; CARLQVIST, P.; HULT, K.; BRINCK, T.; BERGLUND, P. Aldol additions with mutant lipase: analysis by experiments and theoretical calculations. **Journal of molecular catalysis B: enzymatic**, v. 31, p. 123-128, 2004.
- BRANNEY, C.; CARLQVIST, P.; HULT, K.; MAGNUSSON, A.; BRINCK, T.; BERGLUND, P. Carbon-carbon bonds by hydrolytic enzymes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, p. 874-875, 2003.
- BROVETTO, M.; GAMENARA, D.; MÉNDEZ, P. S., SEOANE, G. A. C-C bond-forming lyases in organic synthesis. **Chemical Reviews**, v. 111, p. 4346-4403, 2011.
- BUSTO, E.; GOTOR-FERNANDEZ, V.; GOTOR, V. Hydrolases: catalytically promiscuous enzymes for non-conventional reactions in organic synthesis. **Chemical Society Reviews**, v. 39, p. 4504-4523, 2010.
- CALADO, V.; MONTGOMERY, D. **Planejamento de experimentos usando o statistica**. Rio de Janeiro: E-papers, 2003. 260 p.

- CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. Polar addition and elimination reactions. In: CAREY, F. A. (Ed.). **Advanced organic chemistry**. New York: Springer Science+Business Media, 2007. Cap. 5, p.473-577. v. A.
- CARVALHO, C. M. L.; CABRAL, J. M. S. Reverse micelles as reaction media for lipases. **Biochimie**, v. 82, p. 1063-1085, 2000.
- CHEN, F.; HUANG, S.; ZHANG, H.; FENGYING, L.; YUNGUI, P. Proline-based dipeptides with two amide units as organocatalyst for the asymmetric aldol reaction of cyclohexanone with aldehydes. **Tetrahedron**, v. 64, p. 9585-9591, 2008.
- CHEN, X. Y.; WANG, J. L.; LIN, X. F., WU, Q. Lipase-initiated one-pot synthesis of spirooxazino derivatives: redesign of multicomponent reactions to expand substrates scope and application potential. **Tetrahedron**, v. 72, p. 3318-3323, 2016.
- CHEN, Y. L.; LI, W.; LIU, Y.; GUAN, Z.; HE, Y. H. Trypsin-catalyzed direct asymmetric aldol reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic**, v. 87, p. 83-87, 2013.
- DAS, S.; CHAUDHURY, A. Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. **Aaps Pharmscitech**, v. 12, p. 62-76, 2011.
- DE BARROS, D. P. C.; FERNANDES, P.; CABRAL, J. M. S.; FONSECA, L. P. Synthetic application and activity of cutinase in an aqueous, miniemulsion model system: hexyl octanoate synthesis. **Catalysis Today**, v. 173, p. 95-102, 2011.
- DE BARROS, D. P. C.; FONSECA, L. P.; CABRAL, J. M. S.; ASCHENBRENNER, E. M.; WEISS, C.K., LANDFESTER, K. Miniemulsion as efficient system for enzymatic synthesis of acid alkyl esters. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 106, p. 507-515, 2010.
- DEAN, S. M.; GREENBERG, W. A.; WONG, C. H. Recent advances in aldolase-catalyzed asymmetric synthesis. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, p. 1308-1320, 2007.
- DENG, D. S. LIU, P.; JI, B.; FU, W.; LI, LONG. Acyclic amino acids catalyzed direct asymmetric aldol reactions in aqueous media assisted by 2,4-dinitrophenol. **Catalysis Letters**, v. 137, p. 163-170, 2010.
- DURAN, J. M.; GRYNA JR, F. M.; BINGHAM JR, R. S. **Quality control handbook**. New York: McGraw-Hill, 1951. 800p.
- EREMEEV, N. L.; ZAITSEV, S. Y. Porcine pancreatic lipase as a catalyst in organic synthesis. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 13, p. 78-85, 2016.
- FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 2011. 423 p.
- FAJKOWSKA, M.; OBARA, R.; WAWRZENCZYK, C. Enzymatic resolution of racemic gamma-lactones. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 25, p. 79-83, 2007.

FU, J. P.; GAO, N.; YANG, Y.; GUAN, Z.; HE, Y. H. Ficin-catalyzed asymmetric aldol reactions of heterocyclic ketones with aldehydes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 97, p. 1-4, 2013.

GALDÁMEZ, Edwin Vladimir Cardoza. **Aplicação das técnicas de planejamento e análise de experimentos na melhoria da qualidade de um processo de fabricação de produtos plásticos**. 121 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

GONZALEZ-MARTINEZ, D.; GOTOR, V.; GOTOR-FERNANDEZ, V. Application of deep eutectic solvents in promiscuous lipase-catalysed aldol reactions. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 8, p. 1513-1519, 2016.

GUAN, Z.; FU, J. P.; HE, Y. H. Biocatalytic promiscuity: lipase-catalyzed asymmetric aldol reaction of heterocyclic ketones with aldehydes. **Tetrahedron Letters**, v. 53, p. 4959-4961, 2012.

HAORAN, W.; ZHI, W.; HONG, Z.; GE, C.; HONG, Y.; LEI, W. Enzyme catalytic promiscuity: asymmetric aldol addition reaction catalyzed by a novel thermophilic esterase in organic solvent. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 7, p. 145-149, 2014.

HE, Y. H.; LI, H. H.; CHEN, Y. L.; XUE, Y.; YUAN, Y.; GUAN, Z. Chymopapain-catalyzed direct asymmetric aldol reaction. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 354, p. 712-719, 2012.

HULT, K.; BERGLUND, P. Enzyme promiscuity: mechanism and applications. **Trends in Biotechnology**, v. 25, p. 231-238, 2007.

JO, Y. J.; KWON, Y. J. MIN, S. G.; CHOI, M. J. Effect of NaCl concentration on the emulsifying properties of myofibrilla protein in the soybean oil and fish oil emulsion. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 35, p. 315-321, 2015.

JOHNSON, M. Detergents: Triton X-100, tween-20, and more. **Materials and methods**, v. 3, 163, 2013.

JONES, M. **An example of dynamic light scattering**. 2010. Disponível em: < <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/43/DLS.svg> >. Acesso em: 17 out. 2017.

JUŘÍKOVÁ, Ing Mgr Jana. **Tuky ve výživě (Gorduras na nutrição)**. 57 f. Monografia (Bacharelado em fisiologia) - Faculdade de Estudo de Desportos, Univeridade de Masaryk, Masaryk, 2014

KAPOOR, M.; MAJUMDER, A. B.; GUPTA, M. N. Promiscuous lipase-catalyzed C-C bond formation reactions between 4-nitrobenzaldehyde and 2-cyclohexen-1-one in biphasic medium: aldol and morita-baylis-hillman adduct formations. **Catalysis Letters**, v. 145, p. 527-532, 2015.

- KHARE, S. K.; KUMAR, A.; KUO, T. M. Lipase-catalyzed production of a bioactive fatty amide derivative of 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1482-1485, 2009.
- KHERSONSKY, O.; TAWFIK, D. S. Enzyme promiscuity: a mechanistic and evolutionary perspective. **Annual Review of Biochemistry**, v. 79, p. 471-505, 2010.
- KOHNO, M.; FUNATSU, J.; MIKAMI, B.; KUGIMIYA, W.; MATSUO, T.; MORITA, Y. The crystal structure of lipase II from *Rhizopus niveus* at 2.2 angstrom resolution. **Journal of Biochemistry**, v. 120, p. 505-510, 1996.
- LAI, Y. F.; GE, X.; ZUO, N. Z.; XIANG, X. G.; XU, Y. M.; ZHANG, P. F.; ZHOU, J. C.; FENG, L.; CHEN, X. Z. Promiscuous cellulase-catalysed Aldol reaction. **Gao Xiao Hua Xue Gong Cheng Xue Bao/Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities**, v. 27, p. 825-829, 2013.
- LANDFESTER, K. Polyreactions in miniemulsions. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 22, p. 896-936, 2001.
- LANDFESTER, K. Synthesis of colloidal particles in miniemulsions. **Annual Review of Materials Research**, v. 36, p. 231-279, 2006.
- LANDFESTER, K. Miniemulsion polymerization and the structure of polymer and hybrid nanoparticles. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 48, p. 4488-4507, 2009 2009.
- LI, C.; FENG, X. W.; WANG, N.; ZHOU, Y. J.; Yu, X. Q. Biocatalytic promiscuity: the first lipase-catalysed asymmetric aldol reaction. **Green Chemistry**, v. 10, p. 616-618, 2008.
- LI, C.; ZHOU, Y. J.; WANG, N.; FENG, X. W.; LI, K.; YU, X. Q. Promiscuous protease-catalyzed aldol reactions: a facile biocatalytic protocol for carbon-carbon bond formation in aqueous media. **Journal of Biotechnology**, v. 150, p. 539-545, 2010.
- LI, H. H.; HE, Y. H.; GUAN, Z. Protease-catalyzed direct aldol reaction. **Catalysis Communications**, v. 12, p. 580-582, 2011.
- LI, H. H.; He, Y. H.; YUAN, Y.; GUAN, Z. Nuclease p1: a new biocatalyst for direct asymmetric aldol reaction under solvent-free conditions. **Green Chemistry**, v. 13, p. 185-189, 2011.
- LI, J.; YANG, G.; QIN, Y.; YANG, X.; CHUI, Y. Recyclable Merrifield resin-supported thiourea organocatalysts derived from L-proline for direct asymmetric aldol reaction. **Tetrahedron-Asymmetry**, v. 22, p. 613-618, 2011.
- LI, R.; PEREZ, B.; JIAN, H.; GAO, R.; DONG, M.; GUO, Z. Acyl-peptide releasing enzyme from *Sulfolobus tokodaii* (ST0779) as a novel promiscuous biocatalyst for aldol addition. **Catalysis Communications**, v. 66, p. 111-115, 2015.

- LIN, C. H.; SUGAI, T.; HALCOMB R. L.; ICHIKAWA, Y.; WONG, C. H. Unusual stereoselectivity in sialic-acid aldolase-catalyzed aldol condensations - synthesis of both enantiomers of high-carbon monosaccharides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, p. 10138-10145, 1992.
- LOPEZ-IGLESIAS, M.; GOTOR-FERNANDEZ, V. Recent advances in biocatalytic promiscuity: hydrolase-catalyzed reactions for nonconventional transformations. **Chemical Record**, v. 15, p. 743-759, 2015.
- MALVERN INSTRUMENTS. **Zetasizer Nano Series User Manual**. Worcestershire. 2004. 270 p.
- MASON, T. J. Ultrasound in synthetic organic chemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 26, p. 443-451, 1997.
- MEHNERT, W.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 83-101, 2012.
- MILONE, G. **Estatística geral e aplicada**. São Paulo: Centage Learning, 2009. 498 p.
- MONIRUZZAMAN, M.; KAMIYA, N.; NAKASHIMAA, K.; GOTO, M. Water-in-ionic liquid microemulsions as a new medium for enzymatic reactions. **Green Chemistry**, v. 10, p. 497-500, 2008.
- MONTGOMERY, D. C. **Diseño y análisis de experimentos**. México: Iberoamérica 1991. 589 p.
- MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C.; ANDERSON-COOK, C. M. **Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments**. 3. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2009. 704 p.
- PEDROSA, R.; ANDRÉS J. M., MANZANO, R.; ROMÁN, R.; TÉLLEZ, S. Highly diastereo- and enantioselective direct Barbas-List aldol reactions promoted by novel benzamidoethyl and benzamidopropyl prolinamides in water. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 9, p. 935-940, 2011.
- ROCHA, L. C.; ROSSET, I. G.; MELGAR, G. Z.; RAMINELLI, C.; PORTO, A. L. M.; JELLER, A. H. Chemoenzymatic Resolution of beta-azidophenylethanols by *Candida antarctica* and their application for the synthesis of chiral benzotriazoles. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, p. 1427-1432, 2013.
- SANCHETI, S. V.; GOGATE, P. R. A review of engineering aspects of intensification of chemical synthesis using ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 36, p. 527-543, 2017.
- TAMJIDI, F.; SHAHEDI, M.; VARSHOSAZ, J.; NASIRPOUR, A. Nanostructured lipid carriers (NLC): a potential delivery system for bioactive food molecules. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 19, p. 29-43, 2013.

- THOMPSON, L. H.; DORAISWAMY, L. K. Sonochemistry: science and engineering. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 38, p. 1215-1249, 1999.
- WEI, W.; KEH, C. C. K.; LI, C. J.; VARMA, R. S. Water as a reaction medium for clean chemical processes. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 7, p. 62-69, 2005.
- WEISS, C. K.; LANDFESTER, K. Enzymatic catalysis at interfaces-heterophase systems as substrates for enzymatic action. **Catalysts**, v. 3, p. 401-417, 2013.
- XIAO, Z.; HOU, X.; LYU, X.; ZHAO, J. Y.; XI, L.; LI, J.; LU, J.R. Enzymatic synthesis of aroma acetoin fatty acid esters by immobilized *Candida antarctica* lipase B. **Biotechnology Letters**, v. 37, p. 1671-1677, 2015.
- XIE, B. H.; LI, W.; LIU, Y.; LI, H. H.; GUAN, Z.; HE, Y. H. The enzymatic asymmetric aldol reaction using acidic protease from *Aspergillus usamii*. **Tetrahedron**, v. 68, n. 15, p. 3160-3164, 2012.
- XIE, Z. B.; WANG, N.; JIANG, G. F.; YU, X. Q. Biocatalytic asymmetric aldol reaction in buffer solution. **Tetrahedron Letters**, v. 54, p. 945-948, 2013.
- XIE, Z. B.; WANG, N.; ZHOU, L. H.; WAN, F.; HE, T.; LE, Z. G.; YU, X. Q. Lipase-catalyzed stereoselective cross-aldol reaction promoted by water. **Chemcatchem**, v. 5, p. 1935-1940, 2013.
- XU, F.; XU, J.; HU, Y.; LINA, X.; Wu, Q. One-pot bienzymatic cascade combining decarboxylative aldol reaction and kinetic resolution to synthesize chiral beta-hydroxy ketone derivatives. **RSC Advances**, v. 6, 2016.
- YILDIZ, T. YAŞA, H.; HASDEMİR, B.; YUSUFOĞLU, A. S. Different bio/Lewis acid-catalyzed stereoselective aldol reactions in various mediums. **Monatshefte Fur Chemie**, v. 148, p. 1445-1452, 2017.
- YUAN, Y.; GUAN, Z.; HE, Y. Biocatalytic direct asymmetric aldol reaction using proteinase from *Aspergillus melleus*. **Science China-Chemistry**, v. 56, p. 939-944, 2013.
- ZHENG, J., XIE, B.H., CHEN, Y.L., CAO, J.F., YANG, Y., GUAN, Z., HE, Y. H. Direct asymmetric aldol reactions catalyzed by lipase from porcine pancreas. **Zeitschrift Fur Naturforschung Section C-A Journal of Biosciences**, v. 69, p. 170-180, 2014.
- ZHOU, X. J.; BELCHER, W.; DASTOOR, P. Solar paint: from synthesis to printing. **Polymers**, v. 6, p. 2832-2844, 2014.

APÊNDICES

Análises obtidas para os diferentes compostos.

• (S)-2-[(R)-Hidroxi(4-nitrofenil)metil]ciclohexanona

Espectro de RMN de ^1H (400 Hz, CDCl_3) obtido para o composto *anti*-2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil]ciclohexanona.

RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8,21 (2H, d, $J = 8,8$ Hz), 7,51 (2H, d, $J = 8,7$ Hz), 4,90 (1H, d, $J = 8,4$ Hz), 4,05 (1H, br), 2,66-2,56 (1H, m), 2,53-2,46 (1H, m), 2,42-2,32 (1H, m), 2,17-2,06 (1H, m), 1,87-1,80 (1H, m), 1,72-1,55 (3H, m), 1,45-1,31 (1H, m).

Espectro de RMN de ^1H (400 Hz, CDCl_3) obtido para o composto *sin*-2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil]cicloexanona.

RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8,20 (2H, d, $J = 8,9$ Hz), 7,49 (2H, d, $J = 8,3$ Hz), 5,49 (1H, d, $J = 2,1$ Hz), 3,16 (1H, br), 2,67-2,60 (1H, m), 2,54-2,34 (1H, m), 2,42-2,32 (1H, m), 2,17-2,07 (1H, m), 1,87-1,80 (1H, m), 1,78-1,5 (4H, m).

Espectro no infravermelho obtido para o composto *anti*-2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil]cicloexanona.

IV (pastilha de KBr) ν (cm^{-1}) = 3512, 2938, 1692, 1603, 1522, 1508, 1344, 1200, 1132, 1045, 856, 843, 800, 704, 546.

Cromatograma de análise quiral obtido por CLAE-UV para o composto ($\pm$)-*sin*-2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil]cicloexanona.

Cromatograma de análise quiral obtido por CLAE-UV para o composto ($\pm$)-*anti*-2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil]cicloexanona.

Cromatograma de análise quiral obtido por CLAE-UV para o composto 2-[hidroxi(3-nitrofenil)metil]cicloexanona produzido pela enzima RNL.

Hexano (A) e isopropanol (B) em modo isocrático 15%B em $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ durante 20 min utilizando uma coluna Chiralcell OD-H de 25 cm x 4,6 mm com partículas de 5 μm . O volume de injeção foi de 10 μL com forno a 40 $^{\circ}\text{C}$. A detecção foi realizada em 225 nm. Enantiômeros *sin* (racêmico) $t_r = 27,5 \text{ min}$ e $29,3 \text{ min}$; enantiômero *anti* majoritário (*S,R*) $t_r = 31,2 \text{ min}$, enantiômero minoritário (*R,S*) $t_r = 39,2 \text{ min}$.

• (*S*)-2-[(*R*)-Hidroxi(3-nitrofenil)metil]cicloexanona

Espectro de RMN de ^1H (400 Hz, CDCl_3) obtido para o composto 2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil]cicloexanona.

RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8,25-8,08 (2H, m), 7,71-7,64 (1H, m), 7,5-7,49 (1H, m), 4,91 (1H, d, $J = 8,4$ Hz), 4,14 (1H, d, $J = 2,6$ Hz), 2,70-2,59 (1H, m), 2,54-2,32 (2H, m), 2,17-2,07 (1H, m), 1,90-1,78 (1H, m), 1,74-1,36 (4H, m).

Espectro no infravermelho obtido para o composto *anti*-2-[hidroxi(3-nitrofenil)metil]cicloexanona.

IV (pastilha de KBr) ν (cm $^{-1}$) = 3509, 2963, 1692, 1526, 1477, 1449, 1352, 1204, 1132, 1042, 899, 820, 741, 691, 517.

Cromatograma de análise quiral obtido por CLAE-UV para o composto ($\pm$)-2-[hidroxi(3-nitrofenil)metil]cicloexanona.

Cromatograma de análise quiral obtido por CLAE-UV para o composto 2-[hidroxi(3-nitrofenil)metil]cicloexanona produzido pela enzima RNL.

Hexano (A) e isopropanol (B) em modo isocrático 10%B em $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ durante 20 min utilizando uma coluna Chiralpak AD-H de 25 cm x 4,6 mm com partículas de 5 μm . O volume de injeção foi de 10 μL com forno a 40 $^{\circ}\text{C}$. A detecção foi realizada em 225 nm. Enantiômeros *sin* (racêmico) $t_r = 13,9 \text{ min}$ e $15,2 \text{ min}$; enantiômero *anti* majoritário (*S,R*) $t_r = 16,7 \text{ min}$, minoritário (*R,S*) $t_r = 20,6 \text{ min}$.

• (*S*)-2-[(*R*)-Hidroxi(2-nitrofenil)metil]cicloexanona

Espectro de RMN de ^1H (400 Hz, CDCl_3) obtido para o composto 2-[hidroxi(2-nitrofenil)metil]cicloexanona.

RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7,85 (1H, dd, $J = 8,2, 1,2$ Hz), 7,77 (1H, dd, $J = 7,9, 1,4$ Hz), 7,65-7,62 (1H, m), 7,45-7,41 (1H, m), 5,45 (1H, d, $J = 7,1$ Hz), 4,14-3,70 (1H, m), 2,78-2,73 (1H, m), 2,48-2,43 (1H, m), 2,37-2,30 (1H, m), 2,13-2,06 (1H, m), 1,8 0-1,50 (5H, m).

Espectro no infravermelho obtido para o composto *anti*-2-[hidroxi(2-nitrofenil)metil]cicloexanona.

IV (pastilha de KBr) ν (cm $^{-1}$) = 3433, 2947, 1701, 1605, 1524, 1497, 1452, 1344, 1287, 1128, 1047, 856, 799, 743, 559.

Cromatograma de análise quiral obtido por CLAE-UV para o composto ($\pm$)-*sin*-2-[hidroxi(2-nitrofenil)metil]cicloexanona.

Cromatograma de análise quiral obtido por CLAE-UV para o composto *sin*-2-[hidroxi(2-nitrofenil)metil]cicloexanona produzido pela enzima RNL.

Hexano (A) e isopropanol (B) em modo isocrático 5%B em $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ durante 20 min utilizando uma coluna Chiralcell OD-H de 25 cm x 4,6 mm com partículas de $5 \mu\text{m}$. O volume de injeção foi de $10 \mu\text{L}$ com forno a 40°C . A detecção foi realizada em 225 nm. Enantiômeros *sin* (racêmico) $t_r = 10,6 \text{ min}$ e $12,3 \text{ min}$; enantiômero *anti* majoritário (*S,R*) $t_r = 15,0 \text{ min}$, minoritário (*R,S*) $t_r = 17,1 \text{ min}$.

Cromatograma de análise quiral obtido por CLAE-UV para o composto ($\pm$)-*anti*-2-[hidroxi(2-nitrofenil)metil]cicloexanona.

Cromatograma de análise quiral obtido por CLAE-UV para o composto *anti*-2-[hidroxi(2-nitrofenil)metil]cicloexanona produzido pela enzima RNL.

Hexano (A) e isopropanol (B) em modo isocrático 5%B em $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ durante 20 min utilizando uma coluna Chiralcell OD-H de 25 cm x 4,6 mm com partículas de 5 μm . O volume de injeção foi de 10 μL com forno a 40 °C. A detecção foi realizada em 225 nm. Enantiômeros *sin* (racêmico) $t_r = 10,6 \text{ min}$ e $12,3 \text{ min}$; enantiômero *anti* majoritário (*S,R*) $t_r = 15,0 \text{ min}$, minoritário (*R,S*) $t_r = 17,1 \text{ min}$.

• (*S*)-2-[(*R*)-Hidroxi(4-cianofenil)metil]cicloexanona

Espectro de RMN de ^1H (400 Hz, CDCl_3) obtido para o composto 2-[hidroxi(4-cianofenil)metil]cicloexanona.

RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.68-7.61 (2H, m), 7.48-7.41 (2H, m), 4.84 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 4.06 (1H, s), 2.64-2.54 (1H, m), 2.52-2.44 (1H, m), 2.43-2.31 (1H, m), 2.16-2.06 (1H, m), 1.90-1.77 (1H, m), 1.72-1.52 (3H, m), 1.42-1.28 (1H, m).

Espectro no infravermelho obtido para o composto *anti*-2-[Hidroxi(4-cianofenil)metil]cicloexanona.

IV (pastilha de KBr) ν (cm $^{-1}$) = 3520, 2943, 2228, 1690, 1611, 1504, 1454, 1387, 1317, 1298, 1130, 845, 571.

Cromatograma de análise quiral obtido por CLAE-UV para o composto ($\pm$)-*sin*-2-[hidroxi(4-cianofenil)metil]ciclohexanona.

Cromatograma de análise quiral obtido por CLAE-UV para o composto *sin*-2-[hidroxi(4-cianofenil)metil]ciclohexanona produzido pela enzima RNL.

Hexano (A) e isopropanol (B) em modo isocrático 20%B em $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ durante 20 min utilizando uma coluna Chiralpak AD-H de 25 cm x 4,6 mm com partículas de 5 μm . O volume de injeção foi de 10 μL com forno a 40 $^{\circ}\text{C}$. A detecção foi realizada em 225 nm. Enantiômeros *sin* (racêmico) $t_r = 15,8 \text{ min}$ e $17,8 \text{ min}$; enantiômero *anti* minoritário (*R,S*) $t_r = 19,5 \text{ min}$, enantiômero majoritário (*S,R*) $t_r = 23,9 \text{ min}$.

Cromatograma de análise quiral obtido por CLAE-UV para o composto ($\pm$)-*anti*-2-[hidroxi(4-cianofenil)metil]ciclohexanona.

Cromatograma de análise quiral obtido por CLAE-UV para o composto *anti*-2-[Hidroxi(4-cianofenil)metil]ciclohexanona produzido pela enzima RNL.

Hexano (A) e isopropanol (B) em modo isocrático 20%B em $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ durante 20 min utilizando uma coluna Chiralpak AD-H de 25 cm x 4,6 mm com partículas de 5 μm . O volume de injeção foi de 10 μL com forno a 40 $^{\circ}\text{C}$. A detecção foi realizada em 225 nm. Enantiômeros *sin* (racêmico) $t_r = 15,8$ min e 17,8 min; enantiômero *anti* minoritário (*R,S*) $t_r = 19,5$ min, enantiômero majoritário (*S,R*) $t_r = 23,9$ min.

• (*S*)-2-[(*R*)-Hidroxi(4-clorofenil)metil]cicloexanona

Espectro de RMN de ^1H (400 Hz, CDCl_3) para o composto 2-[hidroxi(4-clorofenil)metil]cicloexanona.

RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7,28 (4H, m), 4,76 (1H, d, $J = 8,7$ hz), 4,00 (1H, d, $J = 3,0$ Hz), 2,60-2,40 (2H, m), 2,35 (1H, m), 2,15-2,05 (1H, m), 1,85-1,75 (1H, m), 1,70-1,50 (3H, m), 1,35-1,20 (1H, m).

Espectro no infravermelho obtido para o composto *anti*-2-[Hidroxi(4-clorofenil)metil]cicloexanona.

IV (pastilha de KBr) ν (cm^{-1}) = 3420, 2936, 1697, 1593, 1578, 1485, 1447, 1414, 1294, 1126, 1090, 1042, 1013, 829, 804, 770, 721, 696, 555.

Cromatograma de análise quiral obtido por CLAE-UV para o composto ($\pm$)-*sin*-2-[hidroxi(4-clorofenil)metil]cicloexanona.

Cromatograma de análise quiral obtido por CLAE-UV para o composto *sin*-2-[hidroxi(4-clorofenil)metil]cicloexanona produzido pela enzima RNL.

Hexano (A) e isopropanol (B) em modo isocrático 10%B em $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ durante 20 min utilizando uma coluna Chiralpak AD-H de $25 \text{ cm} \times 4,6 \text{ mm}$ com partículas de $5 \mu\text{m}$. O volume de injeção foi de $10 \mu\text{L}$ com forno a 40°C . A detecção foi realizada em 225 nm. Enantiômeros *sin* (racêmico) $t_r = 15,8 \text{ min}$ e $18,4 \text{ min}$; enantiômero *anti* minoritário (*R,S*) $t_r = 23,1 \text{ min}$, enantiômero majoritário (*S,R*) $t_r = 26,8 \text{ min}$.

Cromatograma de análise quiral obtido por CLAE-UV para o composto ($\pm$)-*anti*-2-[hidroxi(4-clorofenil)metil]cicloexanona.

Cromatograma de análise quiral obtido por CLAE-UV para o composto *anti*-2-[hidroxi(4-clorofenil)metil]cicloexanona produzido pela enzima RNL.

Hexano (A) e isopropanol (B) em modo isocrático 10%B em $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ durante 20 min utilizando uma coluna Chiralpak AD-H de $25 \text{ cm} \times 4,6 \text{ mm}$ com partículas de $5 \mu\text{m}$. O volume de injeção foi de $10 \mu\text{L}$ com forno a 40°C . A detecção foi realizada em 225 nm. Enantiômeros *sin* (racêmico) $t_r = 15,8 \text{ min}$ e $18,4 \text{ min}$; enantiômero *anti* minoritário (*R,S*) $t_r = 23,1 \text{ min}$, enantiômero majoritário (*S,R*) $t_r = 26,8 \text{ min}$.

• (S)-2-[(R)-Hidroxi(2,4-diclorofenil)metil]cicloexanona

Espectro de RMN de ^1H (400 Hz, CDCl_3) obtido para o composto 2-[hidroxi(2,4-diclorofenil)metil]cicloexanona.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7,50 (1H, d, $J = 8,4$ Hz), 7,35 (1H, d, 2,1 Hz), 7,31-7,27 (1H, m), 5,29 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), 4,04 (1H, br), 2,68-2,58 (1H, m), 2,50-2,43 (1H, m), 2,39-2,29 (1H, m), 2,14-2,06 (1H, m), 1,86-1,80 (1H, m), 1,70-1,55 (4H, m).

Espectro no infravermelho obtido para o composto *anti*-2-[hidroxi(2,4-diclorofenil)metil]cicloexanona.

IV (pastilha de KBr) ν (cm^{-1}) = 3464, 2947, 1682, 1643, 1587, 1472, 1385, 1300, 1097, 1040, 858, 829, 743, 575.

Cromatograma de análise quiral obtido por CLAE-UV para o composto *sin*-2-[hidroxi(2,4-diclorofenil)metil]cicloexanona produzido pela enzima RNL.

Cromatograma de análise quiral obtido por CLAE-UV para o composto *anti*-2-[hidroxi(2,4-diclorofenil)metil]cicloexanona produzido pela enzima RNL.

Hexano (A) e isopropanol (B) em modo isocrático 10%B em $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ durante 20 min utilizando uma coluna Chiralpak AS-H de 25 cm x 4,6 mm com partículas de 5 μm . O volume de injeção foi de 10 μL com forno a 40 $^{\circ}\text{C}$. A detecção foi realizada em 254 nm. enantiômeros *sin* (racêmico) $t_r = 9,5 \text{ min}$ e $10,5 \text{ min}$; enantiômeros *anti* minoritário (*R,S*) $t_r = 12,1 \text{ min}$, enantiômero majoritário (*S,R*) $t_r = 13,2 \text{ min}$.

- (S)-2-[(R)-Hidroxi(fenil)metil]cicloexanona

Espectro de RMN de ^1H (400 Hz, CDCl_3) obtido para o composto 2-[hidroxi(4-cianofenil)metil]ciclohexanona.

RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7,38-7,26 (5H, m), 4,79 (1H, dd, $J = 8,8, 2,2$ Hz), 3,95 (1H, d, 2,7 Hz), 2,67-2,57 (1H, m), 2,52-2,45 (1H, m), 2,41-2,31 (1H, m), 2,13-2,03 (1H, m), 1,83-1,74 (1H, m), 1,62-1,46 (3H, m), 1,33-1,25 (1H, m).

Espectro no infravermelho obtido para o composto *anti*-2-[hidroxi(fenil)metil]cicloexanona.

IV (pastilha de KBr) ν (cm⁻¹) = 3520, 2943, 2228, 1690, 1611, 1504, 1454, 1387, 1317, 1298, 1130, 845, 571.

Cromatograma de análise quiral obtido por CLAE-UV para o composto *sin*-2-[hidroxi(fenil)metil]cicloexanona produzido pela enzima RNL.

Cromatograma de análise quiral obtido por CLAE-UV para o composto *anti*-2-[hidroxi(fenil)metil]cicloexanona produzido pela enzima RNL.

Hexano (A) e isopropanol (B) em modo isocrático 10%B em 0,5 mL min⁻¹ durante 20 min utilizando uma coluna Chiralcell OD-H de 25 cm x 4,6 mm com partículas de 5 µm. O volume de injeção foi de 10 µL com forno a 40 °C. A detecção foi realizada em 254 nm. Enantiômeros *sin* (racêmico) tr = 12,7 min e 13,9 min; enantiômero *anti* majoritário (*S,R*) tr = 15,1 min, enantiômero minoritário (*R,S*) = 17,8 min.

• (*S*)-2-[(*R*)-Hidroxi(4-metóxfenil)metil]cicloexanona

Espectro de RMN de ^1H (400 Hz, CDCl_3) obtido para o composto 2-[hidroxi(4-metóxfenil)metil]cicloexanona.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7,25-7,22 (2H, m), 6,91-6,85 (2H, m), 4,74 (1H, dd, $J = 8,9, 2,4$ Hz), 3,91 (1H, d, $J = 2,7$ Hz), 3,80 (3H, s), 2,63-2,55 (1H, m), 2,52-2,44 (1H, m), 2,40-2,31 (1H, m), 2,13-2,05 (1H, m), 1,82-1,74 (1H, m), 1,70-1,45 (3H, m), 1,35-1,23 (1H, m).

Espectro no infravermelho obtido para o composto *anti*-2-[hidroxi(metóxfenil)metil]cicloexanona.

IV (pastilha de KBr) ν (cm^{-1}) = 3514, 2934, 2860, 1699, 1612, 1585, 1514, 1449, 1302, 1250, 1175, 1128, 1034, 833, 559.

Cromatograma de análise quiral obtido por CLAE-UV para o composto ($\pm$)-*sin*-2-[hidroxi(metóxfenil)metil]cicloexanona.

Cromatograma de análise quiral obtido por CLAE-UV para o composto *sin*-2-[hidroxi(metóxfenil)metil]cicloexanona produzido pela enzima RNL.

Hexano (A) e isopropanol (B) em modo isocrático 5%B em 1,0 mL min⁻¹ durante 20 min utilizando uma coluna Chiralpak AD-H de 25 cm x 4,6 mm com partículas de 5 μ m. O volume de injeção foi de 10 μ L com forno a 40 °C. A detecção foi realizada em 254 nm. Enantiômeros *sin* (racêmico) tr = 17,6 min e 20,8 min; enantiômero *anti* minoritário (*S,R*) tr = 29,8 min, enantiômero majoritário (*R,S*) tr = 31,5 min.

Cromatograma de análise quiral obtido por CLAE-UV para o composto ($\pm$)-*anti*-2-[hidroxi(fenil)metil]cicloexanona.

Cromatograma de análise quiral obtido por CLAE-UV para o composto *anti*-2-[hidroxi(fenil)metil]cicloexanona produzido pela enzima RNL.

Hexano (A) e isopropanol (B) em modo isocrático 5%B em $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ durante 20 min utilizando uma coluna Chiralpak AD-H de 25 cm x 4,6 mm com partículas de 5 μm . O volume de injeção foi de 10 μL com forno a 40 $^{\circ}\text{C}$. A detecção foi realizada em 254 nm. Enantiômeros *sin* (racêmico) $t_r = 17,6 \text{ min}$ e $20,8 \text{ min}$; enantiômero *anti* minoritário (*S,R*) $t_r = 29,8 \text{ min}$, enantiômero majoritário (*R,S*) $t_r = 31,5 \text{ min}$.