

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA  
BACHARELADO EM QUÍMICA

LILIAN FERNANDA MARTINS DO AMARAL

**RESOLUÇÃO DO (RS)-1-FENILETANOL CATALISADA POR  
DIFERENTES LIPASES IMOBILIZADAS EM NANOTUBOS DE  
CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CURITIBA

2015

LILIAN FERNANDA MARTINS DO AMARAL

**RESOLUÇÃO DO (RS)-1-FENILETANOL CATALISADA POR  
DIFERENTES LIPASES IMOBILIZADAS EM NANOTUBOS DE  
CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2, do Curso Superior de Bacharelado em Química do Departamento Acadêmico de Química e Biologia – DAQBi – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – *Campus* Curitiba, Sede Ecoville, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Pilissão

CURITIBA

2015



**LILIAN FERNANDA MARTINS DO AMARAL**

**RESOLUÇÃO DO (RS)-1-FENILETANOL CATALISADA POR  
DIFERENTES LIPASES IMOBILIZADAS EM NANOTUBOS DE  
CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS**

Trabalho de Conclusão de Curso **aprovado** como requisito parcial à obtenção do grau de BACHAREL EM QUÍMICA pelo Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI), do Câmpus Curitiba, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), pela seguinte banca examinadora:

**Membro 1 – Prof. Dr. Fernando Molin**

**Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)**

**Membro 2 – Prof. Dr. Paulo Roberto de Oliveira**

**Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)**

**Orientadora – Profa. Dra. Cristiane Pilissão**

**Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)**

**Coordenadora de Curso – Profa. Dra. Danielle Caroline Schnitzler**

Curitiba, 11 de dezembro de 2015.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, por te me colocado entre pessoas tão especiais que encontrei durante esses quatro anos como universitária. Pelas grandes amizades conquistadas e pelo conhecimento adquirido nesse tempo.

À minha família, que me espera todos os feriados de braços abertos para me acolher e em especial o meu irmão (Fernando), que me sempre me ajuda e está presente no meu dia-a-dia.

Quero agradecer de forma especial, a professora e Dra. Cristiane Pilissão, por não ser só uma orientadora paciente e prestativa, mas por ser uma grande amiga e companheira que adorei conhecer e fazer parte da sua vida (Cris, muito obrigado por ter me acolhido carinhosamente).

Agradeço à todos os colegas de laboratório: Michele Dias, Alysson Veloso, Rhaísa Betim, Lucas Karas, Patrick Batista; pelo companheirismo, amizade, risadas, cafés e por terem contribuído para minha formação.

Aos grandes amigos (Roberta dos Santos e Thais Gonçalves) que tiveram presença marcada nos bons momentos e também nos mais difíceis, vocês estarão sempre no meu coração.

## RESUMO

AMARAL, Lilian F. M. **Resolução do (RS)-1-feniletanol catalisada por diferentes lipases imobilizadas em nanotubos de carbono de paredes múltiplas**. 2015. 83f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) - Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2015

Atualmente, a catálise enzimática vem se apresentando como uma alternativa mais eficiente e segura nos quesitos ambientais e principalmente uma importante ferramenta na síntese de compostos enantiomericamente puros. A classe de enzimas mais utilizada na resolução de racematos são as lipases, por serem estereosseletivas e possuírem ampla faixa de trabalho, o que as torna versáteis. Esses biocatalisadores são capazes de catalisar reações de transesterificação de alcoóis secundários com diferentes doadores acila com o intuito de obter o composto opticamente ativo. Nos últimos anos, as pesquisas sobre nanomateriais, especialmente os nanotubos de carbono, têm atraído muita atenção devido as suas propriedades e possibilidades de serem utilizados como suporte na imobilização de enzimas. Essa técnica permite melhorar o rendimento, aumentar a estabilidade, melhorar a atividade catalítica e reutilizar o biocatalisador em um novo ciclo. A partir dessas considerações, neste trabalho, a lipase comercial *Burkholderia cepacia* (PS) e *Candida cylindracea* (AY-30) foram imobilizadas em MWCNTs em PVA e MWCNTs na ausência de PVA. Estes sistemas foram usados como catalisadores na transesterificação do (RS)-1-feniletanol com acetato de vinila, como doador acila. Foram avaliadas o efeito da imobilização das lipases em MWCNTs funcionalizados por diferentes métodos: em peróxido ( $H_2O_2$ ) e meio básico (KOH) e em meio ácido ( $HNO_3/H_2SO_4$ ). Ao utilizar os MWCNTs na presença de PVA, as reações catalisadas pela lipases PS, apresentaram conversões moderadas de 3,1-31% para o (R) acetato de 1-feniletila, com  $ee_p$  de 3,1-28%,  $ee_p > 99$  e razão enantiomérica ( $E > 200$ ). Ao utilizar a PS imobilizada em MWCNTs funcionalizados na ausência de PVA, todas as reações apresentaram excelente excesso enantiomérico dos produtos ( $ee_p > 99\%$ ) e excesso enantiomérico do reagente (93-99,7%) e razão enantiomérica ( $E > 200$ ), com taxas de conversões variando de 47-64%. Os resultados obtidos com a lipase AY-30 imobilizada em ambos os sistemas, apresentou taxas de conversão próximas de zero, em relação à obtenção do (R) acetato de 1-feniletila, evidenciando a influência da relação substrato-enzima-suporte.

**Palavras-chave:** Resolução Enzimática. Lipases. Imobilização. Nanotubos de carbono de paredes múltiplas.

## ABSTRACT

AMARAL, Lilian F. M. **Resolution of (RS)-1-phenylethanol catalyzed by different lipases immobilized in Multi-Walled Carbon Nanotubes**. 2015. 83f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) - Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2015

Nowadays, the enzymatic catalysis has been presented as a more efficient and safer alternative to environmental questions and especially an important tool for synthesis of enantiomerically pure compounds. The most commonly used class of enzymes in the resolution of racemates are lipases, due to its stereoselective and wide working range, what makes them versatile. These biocatalysts are able to catalyze secondary alcohols transesterification reactions with different acyl donors in order to obtain the optically active compound. In recent years, researches on nanomaterials, particularly carbon nanotubes, have attracted much attention due to its properties and possibilities of being used as carriers in enzymes immobilization. This technique improves the performance, increases stability, improves the catalytic activity and allows the reuse of the biocatalyst in a new cycle. From these considerations, in this work, the commercial lipase *Burkholderia cepacia* (PS) and *Candida cylindracea* (AY-30) were immobilized on MWCNTs in PVA and MWCNTs in the absence of PVA. These systems have been used as catalysts in the transesterification of (*RS*) -1-phenylethanol with vinyl acetate as acyl donor. We evaluated the effect of lipases immobilization in MWCNTs functionalized by different methods: peroxide ( $H_2O_2$ ) and basic medium (KOH) and in acid ( $HNO_3 / H_2SO_4$ ) were evaluated. By using MWCNTs in the presence of PVA, the reactions catalyzed by lipases PS showed moderate conversions from 3,1 to 31% for (*R*) 1-phenylethyl acetate  $ee_p$  from 3,1 to 28%,  $ee_s > 99$  and enantiomeric ratio ( $E > 200$ ). When using the immobilized PS in MWCNTs functionalized by the absence of PVA, all reactions showed excellent enantiomeric excess of the product ( $ee_p > 99\%$ ) and enantiomeric excess of the reagent (93 to 99.7%) and enantiomeric ratio ( $E > 200$ ), with conversion rates ranging from 47 to 64%. The results obtained with the immobilized lipase AY-30 in both systems were presented close to zero conversion rates in relation to obtaining the (*R*) 1-phenylethyl acetate, showing the influence of substrate-enzyme-supported interaction.

Keywords: Enzymatic resolution; lipases; immobilization; Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNT)



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação da estrutura de uma proteína (a) Estrutura primária, (b) Estrutura secundária, (c) Estrutura terciária e (d) Estrutura quaternária .....	18
<b>Figura 2:</b> Estrutura tridimensional da lipase LipK107 de <i>Proteus sp.</i> Consiste em 9 $\alpha$ -hélice e 6 $\beta$ -folhas. ....	24
<b>Figura 3:</b> Conformação ativa e inativa da lipase LipK107.....	25
<b>Figura 4:</b> Métodos de imobilização de enzimas.....	26
<b>Figura 5:</b> Diferentes abordagens para a obtenção de enzimas imobilizadas livre de suporte: (a) cristalização, (b) agregação; (c) secagem por atomização; (d) reticulação direta .....	29
<b>Figura 6:</b> Representação esquemática da estrutura de nanotubos de carbono: (a) nanotubo de parede simples, (b) nanotubo de parede múltipla.....	30
<b>Figura 7:</b> Adsorção física da enzima – CNTs .....	31
<b>Figura 8:</b> Oxidação do CNTs pelo método ácido.....	31
<b>Figura 9:</b> Modelos de ligação do sitio ativo da lipase de <i>Candida antarctica</i> B ao álcool secundário .....	34
<b>Figura 10:</b> Modelo de encaixe substrato-sítio ativo. (a) Enantiômero mais rápido e (b) Enantiômero mais lento no sítio ativo das lipases.....	34
<b>Figura 11:</b> Modelos de ligação enzima-substrato para ambos enantiômeros.....	35
<b>Figura 12:</b> Estruturas moleculares da $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ ciclodextrinas . ....	39
<b>Figura 13:</b> Representação esquemática da sequência de etapas que foram executadas nesse trabalho.....	45
<b>Figura 14:</b> Rotas para a funcionalização dos nanotubos de carbono: (A) ácido nítrico/ácido sulfúrico, (B) Hidróxido de Potássio e (C) Peróxido de hidrogênio.....	46
<b>Figura 15:</b> Etapas de preparação dos filmes de MWNTCs / PVA / lipases. ....	48
<b>Figura 16:</b> Preparação do álcool ( <i>RS</i> )-1-feniletanol a partir da acetofenona.....	49
<b>Figura 17:</b> Obtenção do ( <i>S</i> )-1-feniletanol via catálise enzimática.....	50
<b>Figura 18:</b> Reação de transesterificação do álcool ( <i>RS</i> )-1-feniletanol por via química. ....	51
<b>Figura 19:</b> Resolução do ( <i>RS</i> )-1-feniletanol com acetato de vinila catalisada por diferentes lipases. ....	52
<b>Figura 20:</b> Procedimento para a resolução do ( <i>RS</i> )-1-feniletanol com acetato de vinila via catálise enzimática. ....	53

<b>Figura 21:</b> Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier do (RS)-1-feniletanol em KBr. ....	55
<b>Figura 22:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H do (RS)-1-feniletanol. [200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ], usando o TMS como referência. ....	55
<b>Figura 23:</b> Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier do (RS)-acetato de-1-feniletila em KBr. ....	56
<b>Figura 24:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H do (RS) acetato do 1-feniletila. [200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ], em TMS. ....	57
<b>Figura 25:</b> Cromatograma da separação dos compostos racêmicos .....	58
<b>Figura 26:</b> Cromatograma do substrato (S)-1-feniletanol catalisado pela espécie <i>Daucus carota</i> .....	59
<b>Figura 27:</b> Espectro de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier do (S)-1-feniletanol em KBr. ....	59
<b>Figura 28:</b> Cromatograma do (S)-acetato de 1- feniletila via CG-FID com coluna quiral (β-ciclodex). ....	60
<b>Figura 29:</b> Espectros de FTIR para (a) MWCNTs, (b) MWCNTs – H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , (c) MWCNTs – HNO <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , (d) MWCNTs – OH Temperatura amb. e (e) MWCNTs – OH quente, em (KBr). ....	62
<b>Figura 30:</b> Imagem de microscopia eletrônica de varredura dos MWCNTs comerciais, MWCNTs-OH quente, MWCNTs-OH amb., MWCNTs-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MWCNTs-HNO <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . ....	64
<b>Figura 31:</b> Difratoograma dos MWCNTs comerciais (verde), e os MWCNTs funcionalizados em OH (vermelho), OH quente (amarelo), HNO <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (azul) e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (preto) .....	64
<b>Figura 32:</b> Esquema da resolução do (RS)-1-feniletanol com acetato de vinila catalisada por diferentes lipases. ....	65
<b>Figura 33:</b> Influência da procedência de diferentes lipases na resolução do (RS)-1-feniletanol em 24h .....	66
<b>Figura 34:</b> Cromatograma de uma alíquota de reação de transesterificação do (RS)-1-feniletanol com acetato de vinila catalisada pela lipase (a) PS e (b) AY-30 em 24h, por CGQ. ....	67
<b>Figura 35:</b> Efeito da imobilização da lipase PS em nanocompósitos MWCNTs/PVA– (funcionalizado e não funcionalizado) na presença ou ausência de <i>Tween 80</i> . ....	68

<b>Figura 36:</b> Reutilização da lipase PS com PVA/MWCNTs – (funcionalizado ou não funcionalizado) na presença/ausência de <i>Tween</i> 80 (T).....	69
<b>Figura 37:</b> Efeito da variação do pH na imobilização dos MWCNTs/PS usados na resolução do ( <i>RS</i> )-1-feniletanol, em 24h de reação.....	71
<b>Figura 38:</b> Espectro de FTIR do MWCNTs-PS, em KBr.....	72
<b>Figura 39:</b> Efeito da funcionalização dos MWCNTs na imobilização da PS em 24h de reação, em pH .....	73
<b>Figura 40:</b> Reutilização do sistema imobilizado (PS/WMCNTs) em 24h de reação.	74

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Classificação internacional das enzimas, segundo a UIBBM .....	20
Tabela 2: Tampão Fosfato .....	48

## LISTA DE SIGLAS

AGG	<i>Enzyme Aggregates</i> - Agregados de enzimas
CLEAs	<i>Cross-Linked Enzyme Aggregates</i> - Ligação cruzada de agregados de enzimas
CLEC	<i>Cross-Liked Enzymes Crystals</i> - Ligação cruzada de cristais de enzimas
CLEs	<i>Cross-Linking of Dissolved Enzymes</i> - Ligação cruzada de enzimas dissolvidas
CRY	<i>Enzymes Crystals</i> - Cristais de enzimas
CSDE	<i>Cross-Linked Spray-Dried Enzymes</i> - Ligação cruzada de enzimas atomizadas
DRX	Difração de Raio-X
FTIR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
MEV	Microscopia de Eletrônica de Varredura
MWCNTs	<i>Multi-Walled Carbon Nanotubes</i> - Nanotubos de carbono de paredes múltiplas
NTCs	Nanotubos de Carbono
PVA	Álcool Polivinílico
RCS-BPDB	<i>Research Collaboratory for Structural Bioinformatics - Protein Data Bank</i> - Pesquisa Colaborativa de estruturas Bioinformáticas - Banco de Dados de Proteínas
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
SDE	<i>Spray-Dried Enzymes</i> - Enzimas atomizadas
SWCNTs	<i>Single-Walled Carbon Nanotubes</i> - Nanotubos de carbono de parede simples
UIBBM	<i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i> - União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
CGQ	Cromatografia Gasosa com fase Quiral

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>17</b>
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>18</b>
3.1 ENZIMAS .....	18
3.2 NOMENCLATURA, CLASSIFICAÇÃO E PROPRIEDADE DAS ENZIMAS .....	20
3.3 LIPASES .....	22
3.4 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS .....	25
3.4.1 Técnicas de imobilização de enzimas por encapsulação .....	27
3.4.2 Técnicas de imobilização de enzimas por ligação.....	28
3.4.3 Nanotubos de carbono – Álcool polivinílico .....	30
3.5 RESOLUÇÃO ENZIMÁTICA .....	32
3.6 MÉTODOS ANÁLITICOS PARA DETERMINAÇÃO DA PUREZA ENANTIOMÉRICA .....	36
3.6.1 Método polarimétrico .....	37
3.6.2 Cromatografia gasosa quiral .....	38
3.7 ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO .....	40
3.8 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR .....	40
3.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	41
3.10 DIFRAÇÃO DE RAIOS X.....	41
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>43</b>
4.1 OBJETIVO GERAL .....	43
4.1 .2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	43
<b>5 METODOLOGIA</b> .....	<b>45</b>
5.1 FUNCIONALIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE CARBONO .....	46
5.2 IMOBILIZAÇÃO DAS LIPASES.....	47
5.2.2 Preparação dos MWCNTs/lipase .....	48
5.3 PREPARAÇÃO DO (RS)-1-FENILETANOL VIA QUÍMICA .....	49
5.3.1 Síntese do (RS)-1-feniletanol via química .....	49
5.4 REDUÇÃO DA ACETOFENONA VIA ENZIMÁTICA PARA OBTENÇÃO DO (S)-1-FENILETANOL.....	50
5.5 SÍNTESE DO (RS)-ACETATO DE 1-FENILETILA E DO (S)-ACETATO DE 1-FENILETILA VIA QUÍMICA .....	51
5.6 RESOLUÇÃO DO (RS)-1-FENILETANOL VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA.....	52
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>54</b>
6.1 SÍNTESE DO (RS)-1-FENILETANOL E DO (RS) ACETATO-1-FENILETILA .....	54
6.2 SÍNTESE DO (S)-1-FENILETANOL E (S)- ACETATO DE 1- FENILETILA.....	58
6.3 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE CARBONO .....	60
6.4 AVALIAÇÃO DE LIPASES DE DIFERENTES PROCEDÊNCIAS .....	65
6.5 INFLUÊNCIA DA IMOBILIZAÇÃO DAS LIPASES EM NANOCOMPÓSITOS....	68
6.6 EFEITO DO PH .....	70
6.7 INFLUÊNCIA DA IMOBILIZAÇÃO DAS LIPASES PS E AY-30 EM MWCNT .....	72
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>77</b>

<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>79</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>80</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o uso de sistemas biológicos (enzimas ou células íntegras) na transformação de compostos orgânicos vem sendo empregado em diversas áreas industriais, tais como, nas áreas da química fina e farmacêutica para obtenção de compostos opticamente ativos (GHANEM et al., 2010).

A aplicação das enzimas nos processos industriais, principalmente as lipases, tem ganhado destaque devido às suas propriedades quimiosseletivas, regioseletivas e estereosseletivas. Geralmente, essas enzimas atuam sob condições reacionais brandas, numa ampla faixa de temperatura e pressão (GOTOR-FERNÁNDEZ; BRIEVA; GOTOR, 2006). Porém, a sua utilização na forma livre em solventes orgânicos pode levar a desnaturação e inativação, diminuindo a sua atividade catalítica, além de impossibilitar a sua reutilização em um novo ciclo (GOTOR-FERNÁNDEZ; BRIEVA; GOTOR, 2006; IVANOV; SCHNEIDER, 1997).

Para resolver esses problemas, técnicas de imobilização de enzimas têm sido desenvolvidas (MENDES *et al.*, 2011). Entre os vários materiais nanoestruturados, os nanotubos de carbono têm se destacado nas pesquisas como suporte para a imobilização de enzimas, devido às suas propriedades adsorptivas, térmicas, eletrônicas e mecânicas (FENG e JI, 2011). Dentre essas características, a adsorção tem se mostrado essencial para desenvolvimento de novos métodos de imobilização, uma vez que o complexo enzima-nanotubo de carbono possui um grande potencial a ser explorado (FENG e JI, 2011; ZHAO *et al.*, 2015).

A partir destas considerações, destaca-se a importância de encontrar novas rotas para a obtenção de compostos enantiomericamente puros, aliando um processo ambientalmente correto com uso de matérias-primas de baixo custo. Portanto, o objetivo deste trabalho é aplicar a catálise enzimática utilizando lipases imobilizadas em nanotubos de carbono para a obtenção de álcoois quirais, através da resolução do (*RS*)-1-feniletanol.



## 2 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos a produção de compostos enantiomericamente puros via catálise enzimática tem atraído muita atenção de diversos setores industriais, principalmente na área farmacêutica e agroquímica, devido a estes compostos apresentarem diferentes atividades biológicas, bem como promover uma redução de custos, além de tornar o processo reacional mais limpo.

Vários estudos apontam que a atividade biológica dos fármacos depende em muitos casos da configuração absoluta. Normalmente, os isômeros (*R*) ou (*S*), um pode apresentar atividade biológica, enquanto o outro pode ser inativo ou até mesmo tóxico. Nesse sentido, os estudos para a obtenção de alcoóis opticamente ativos estão sendo realizados, pois esses alcoóis são produtos intermediários usados na preparação de diversos fármacos encontrados no mercado.

Nesse contexto, a utilização de lipases na separação de misturas racêmicas e obtenção de compostos opticamente ativos é um método eficiente por atuarem em condições brandas de temperatura e pressão, e por estes catalisadores serem seletivos e estarem incluídos dentro da química verde. Entretanto, dependendo do meio reacional, essas enzimas podem desnaturar-se, sendo necessário realizar sua imobilização. Para este fim, diversos suportes vêm sendo utilizados, dentre eles podemos destacar os nanotubos de carbono e os polímeros, que podem melhorar a atividade enzimática comparada à sua forma livre, bem como facilitar a separação dos produtos e reutilizá-las em novos ciclos reacionais, diminuindo assim o custo do processo.

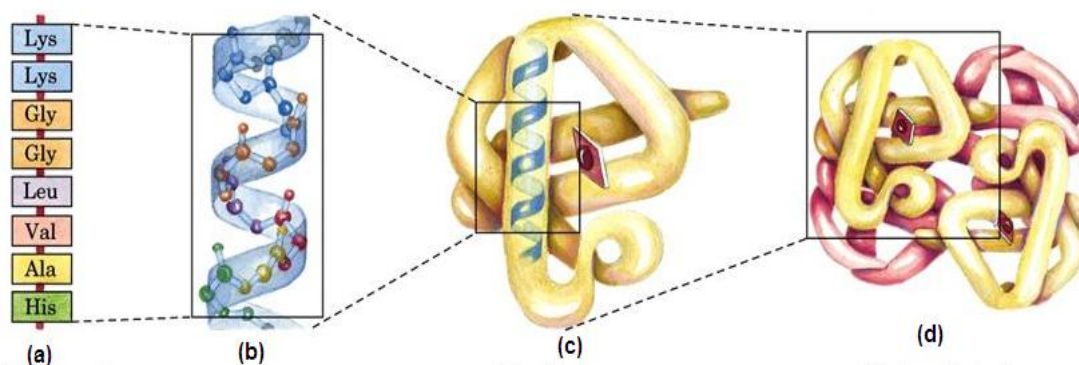
A partir destas considerações, destaca-se a importância de encontrar novas rotas para o desenvolvimento de compostos enantiomericamente puros, aliando um processo ambientalmente correto com uso de matérias-primas de baixo custo. Nesse trabalho será estudada a influência de diferentes lipases nativas e comerciais imobilizadas em nanotubos de carbono de paredes múltiplas, do inglês *Multiwalled Carbon Nanotubes* (MWCTNs) na sua forma livre, bem como, em nanocompósitos MWCNTs/ álcool polivinílico (PVA), na resolução do (*RS*)-1-feniletanol com acetato de vinila.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 ENZIMAS

Enzimas são em geral de natureza protéica que apresentam propriedades catalíticas capazes de acelerar as reações químicas (TORTORA, 2005). Essas enzimas são formadas por uma sequência de aminoácidos ligados covalentemente por ligações peptídicas, conforme **Figura 1** (LIMA *et al.*, 2001).

A sequência de aminoácidos de uma proteína refere-se à sua estrutura primária (**Figura 1a**), enquanto que o arranjo tridimensional da cadeia de poliamida confere a estrutura secundária (**Figura 1b**). A estrutura terciária (**Figura 1c**) inclui o arranjo de todos os átomos, e a estrutura quaternária (**Figura 1d**) descreve a agregação de várias moléculas de proteínas, formando as cadeias polipeptídicas (FABER, 2011).



**Figura 1:** Representação da estrutura de uma proteína (a) Estrutura primária, (b) Estrutura secundária, (c) Estrutura terciária e (d) Estrutura quaternária (LEHNINGER, NELSON e COX, 2002).

Os fatores que podem influenciar na estabilização da estrutura tridimensional de uma enzima incluem, pH, temperatura, concentração do substrato e inibidores (TORTORA, 2005)

#### ✓ pH

Grande parte das enzimas possui um pH ótimo, que confere sua atividade máxima, porém, com concentrações de  $H^+/OH^-$  fora desse intervalo pode causar a

desnaturação dessas proteínas, devido a competição com o hidrogênio e as ligações iônicas da enzima.

✓ **Concentração do substrato**

A velocidade máxima catalisada por enzimas numa reação ocorre quando todos os seus sítios ativos estão ocupados por moléculas de substrato (ponto de saturação). Caso contrário, uma concentração menor de substrato no meio reacional acarretará na diminuição da sua atividade catalítica.

✓ **Inibidores**

A inibição é um mecanismo usado para controlar o funcionamento das enzimas. Os inibidores são classificados como competitivos, que competem com os substratos pelo sítio ativo da enzima, e os não-competitivos, apenas interagem com outro espaço da enzima.

✓ **Temperatura**

Nas reações enzimáticas, a elevação da temperatura acima da temperatura ótima da enzima reduz a velocidade da reação de forma drástica. Esse evento ocorre devido à desnaturação da enzima, ocasionando a mudança em sua conformação estrutural (estrutura terciária) e perda da atividade catalítica.

A analogia entre a integridade da conformação da proteína e sua atividade catalítica está no fato dessas enzimas possuírem um sítio ativo, onde ocorre a catálise. Esse local compreende uma pequena porção de sua totalidade, próximo da superfície, onde as moléculas de substratos conseguem ter acesso. Nesse espaço catalítico contém alguns aminoácidos que facilitam a atividade enzimática, tornando-as altamente específicas ao substrato (LEHNINGER, NELSON e COX, 2002; FABER, 2011).

### 3.2 NOMENCLATURA, CLASSIFICAÇÃO E PROPRIEDADE DAS ENZIMAS

Com a grande variedade de enzimas catalogadas, a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM) adotou uma classificação dessas enzimas, de forma a evitar ambiguidades com os seus respectivos nomes. Nesse sistema, os nomes das enzimas são seguidos por sufixo –ase e agrupadas em 6 classes, conforme o tipo de reação que catalisam. Para cada classe, são estabelecidas as reações mais específicas, conforme **Tabela 1**. A cada enzima é conferido um número de quatro dígitos e um nome sistemático para sua identificação (LEHNINGER, NELSON e COX, 2002).

Para exemplificar, a enzima E.C.1.2.3.4, representam respectivamente:

1. classe;
2. subclasse;
3. grupos químicos específicos que participam da reação;
4. nome da enzima.

A *Quimotripsina*, EC 3.4.21.1, é um exemplo específico dessa classificação enzimática, na qual confere:

- classe (3): hidrolases;
- subclasse (4): Peptidase – atua sobre ligação peptídica;
- sub-subclasse (21): serino-endopeptidase – contém serina no sítio ativo;
- nome da enzima (1): *quimotripsina*.

**Tabela 1:** Classificação internacional das enzimas, segundo a UIBBM (LEHNINGER, NELSON e COX, 2002).

Classificação	Tipo de reação catalisada
1. Oxidorredutases	Transferência de elétrons, reações de oxidorredução
2. Transferases	Transferência de grupos funcionais (grupo amino, acetil ou fosfato)
3. Hidrolases	Reações de hidrólise (adição de água)
4. Liasas	Adição de grupos às duplas ligações ou eliminação de grupos para formação de duplas ligações
5. Isomerasas	Isomerização (rearranjo de átomos dentro de uma molécula)
6. Ligases	União de duas moléculas pelo acoplamento com hidrólise de ATP

As enzimas oferecem diversas propriedades que se diferem dos catalisadores convencionais. O interesse por esses biocatalisadores deve-se a (MATEO *et al.*, 2007; FABER, 2011):

**Alta velocidade de reação:** as reações catalisadas pelas enzimas giram em torno  $10^{20}$  mais rápidas que as reações sem enzimas. E, geralmente essa velocidade supera as reações com presença de catalisadores químicos.

**Condições reacionais brandas:** as reações ocorrem em temperaturas inferiores a  $100^{\circ}\text{C}$ , pressão atmosférica e pH próximo do neutro.

**Alta especificidade:** apresentam uma especificidade muito maior que os catalisadores químicos, o que corresponde à mínima produção de subprodutos.

**Alta seletividade:** as enzimas podem atuar de diversas formas, dependendo do grupo funcional.

**Quimiosseletivos:** atuam em apenas um tipo de grupo funcional, independente da presença de outros grupos reativos.

**Regio e Diastereosseletivos:** as enzimas podem distinguir entre grupos funcionais somente com a mudança do meio reacional.

**Enantiosseletivos:** atuam como catalisadores quirais, através da sua especificidade, separando as misturas racêmicas, sendo um dos motivos na exploração para sínteses seletivas e assimétricas.

**Operam em diferentes solventes:** corresponde a atuação de algumas enzimas em solventes orgânicos sem que ocorra a perda de sua atividade catalítica. A grande parte de proteínas são estáveis num ambiente aquoso, porém, quando em contato com solventes orgânicos, suas estruturas nativas podem se enfraquecer, diminuindo sua atividade. No entanto, algumas proteínas, como as lipases toleram facilmente a presença de solventes orgânicos (KUMAR, SINGH e KAUR, 2013).

Porém, existem algumas desvantagens no uso desses catalisadores, tais como:

**Parâmetro operacional restrito:** sensibilidade em relação às grandes variações de temperatura e pH, o que para determinadas reações torna-se difícil o ajuste nas condições reacionais.

**Auxílio de cofatores:** cofatores são moléculas orgânicas ou inorgânicas que podem ser necessárias para a função de enzima, uma vez que quando ausentes, a enzima pode se inativar.

Portanto, para contornar estas desvantagens, vários estudos vêm sendo realizados, como o desenvolvimento de estratégias eficazes para melhorar a estabilidade dessas enzimas frente às condições de processamento, bem como, estes biocatalisadores poderem ser reutilizados em diferentes ciclos reacionais, sem perda da sua atividade catalítica.

Entre os grupos de enzimas, as hidrolíticas são os biocatalisadores mais comumente usados em síntese orgânica. Nesta classe estão incluídas as amidases, proteases, nitrilases, fosfatases e epoxidases, demonstrando um grande interesse nas lipases. Uma aplicação que tem merecido destaque na utilização dessas enzimas decorre na obtenção de fármacos ou insumos farmacêuticos em suas formas enantiomericamente ativas e com elevada pureza ótica.

### 3.3 LIPASES

As lipases (triacil glicerol acilhidrolases, E.C.3.1.1.3) são enzimas da família das hidrolases que, em seu meio natural, hidrolisam triacilgliceróis aos correspondentes ácidos carboxílicos, acilgliceróis, monoacilgliceróis e gliceróis, encontradas em animais, plantas, fungos e bactérias (VERMELHO *et al.*, 2008).

Essas enzimas são muito requisitadas na biocatálise, pois apresentam grande especificidade e alta enantiosseletividade frente a diferentes substratos, tornando-as capazes de catalisar não apenas reações de hidrólise, mas também reações de

esterificação, transesterificação, aminólise e lactonização (PAQUES e MACEDO, 2006; GAO *et al.*, 2011). Sua versatilidade atende diversas áreas industriais, como a de detergentes, de alimentos, de papel e celulose, e oleoquímica (VERMELHO *et al.*, 2008), com um grande interesse para a indústria química e farmacêutica, decorrente do seu emprego em reações hidrolíticas e sintéticas (BHUSHAN *et al.*, 2008).

Por muito tempo, as lipases foram consideradas uma classe peculiar das esterases. Essas diferenças ainda são discutidas, porém foi estabelecido que as lipases hidrolisam triacilgliceróis de cadeia longa (mais de 10 átomos de carbono), ou seja, ligações com três ésteres; enquanto que as esterases hidrolisam cadeias menores, atuando sobre apenas uma ligação éster, liberando ácidos graxos de baixo peso molecular (MESSIAS *et al.*, 2011).

Os estudos sobre o mecanismo catalítico das lipases iniciaram com os pesquisadores Sarda e Desnuelle (1958), quando observaram que as enzimas pancreáticas eram mais eficientes na interface água-lipídeo, pois ocorria ali uma alteração conformacional da enzima (VERMELHO *et al.*, 2008). Assim, essas enzimas exibem maior seletividade em reações não aquosas, sendo uma ótima ferramenta para o ramo industrial. Em contrapartida, é necessária uma pequena quantidade de água em seu interior, pois esse componente promove a estabilidade da sua estrutura tridimensional (GAO *et al.*, 2011).

A determinação das primeiras estruturas de lipases foi feita no início de 1900, através da análise por cristalografia de raios-X, onde foi observada uma sequência de fitas  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -pregueada, conhecido como dobramento de  $\alpha$ ,  $\beta$ -hidrolase pregueada. Atualmente, no banco de dados de proteínas (*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics – Protein Data Bank*, RCSB - PDB) já existem 136 lipases caracterizadas.

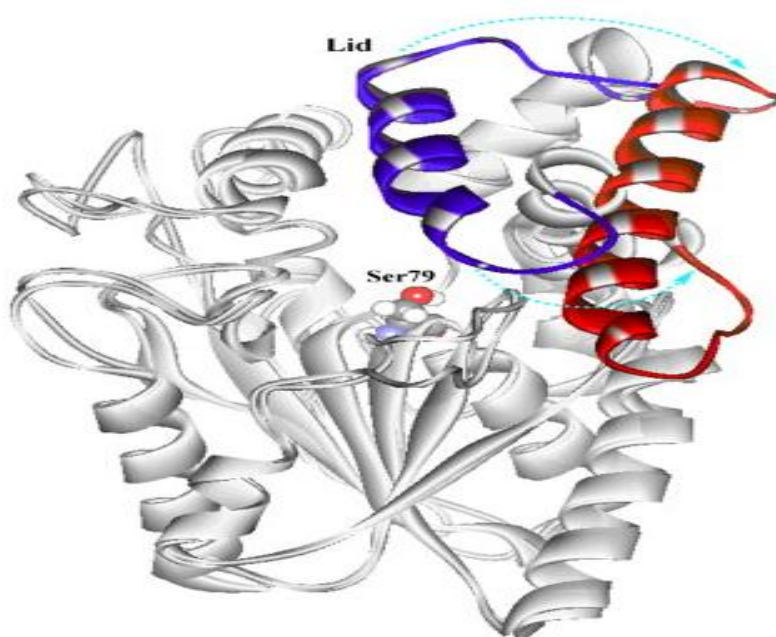
Em geral, as lipases possuem um sítio ativo composto pela tríade catalítica serina, histidina, aspartato ou glutamato, conforme a **Figura 2** (LEHNINGER, NELSON e COX, 2002).



**Figura 2:** Estrutura tridimensional da lipase LipK107 de *Proteus sp.* Consiste em 9  $\alpha$ -hélice e 6  $\beta$ -folhas. Os resíduos catalíticos são formados por Ser 79, Asp 232, e His 254 (GAO *et al.*, 2011).

A maior parte das lipases apresenta um modelo de tampa catalítica com  $\alpha$ -hélice encurtada voltada para o sítio catalítico, na qual esse espaço é composto por cadeias hidrofóbicas, conforme a **Figura 3**. Quando ausentes da interface água-óleo, essa tampa fica sobre o sítio catalítico ocasionando a inativação da enzima, caso contrário, essa tampa polipeptídica permanece aberta, tornando a enzima livre (KAMIYA *et al.*, 1999; XU *et al.*, 2010; GAO *et al.*, 2011).





**Figura 3:** Conformação ativa e inativa da lipase LipK107. A presença da Ser79 no sítio catalítico confere o domínio tampa da conformação inativa, tampa cor azul, e domínio tampa da conformação ativa de cor vermelha, e a seta tracejada indica a ação de abertura da tampa (XU *et al.*, 2010).

As lipases estão sujeitas à inativação não somente por esse motivo, mas também por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o seu uso. Para tornar a catálise eficiente em um determinado processo, há a necessidade de protegê-las frente a esses fatores.

Para minimizar esses problemas, têm sido desenvolvidas técnicas de imobilização que permitem um controle mais preciso das enzimas. Portanto, no próximo item serão apresentadas as principais técnicas de imobilização que podem aumentar a estabilidade das enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização, diminuindo assim, o custo do processo.

### 3.4 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

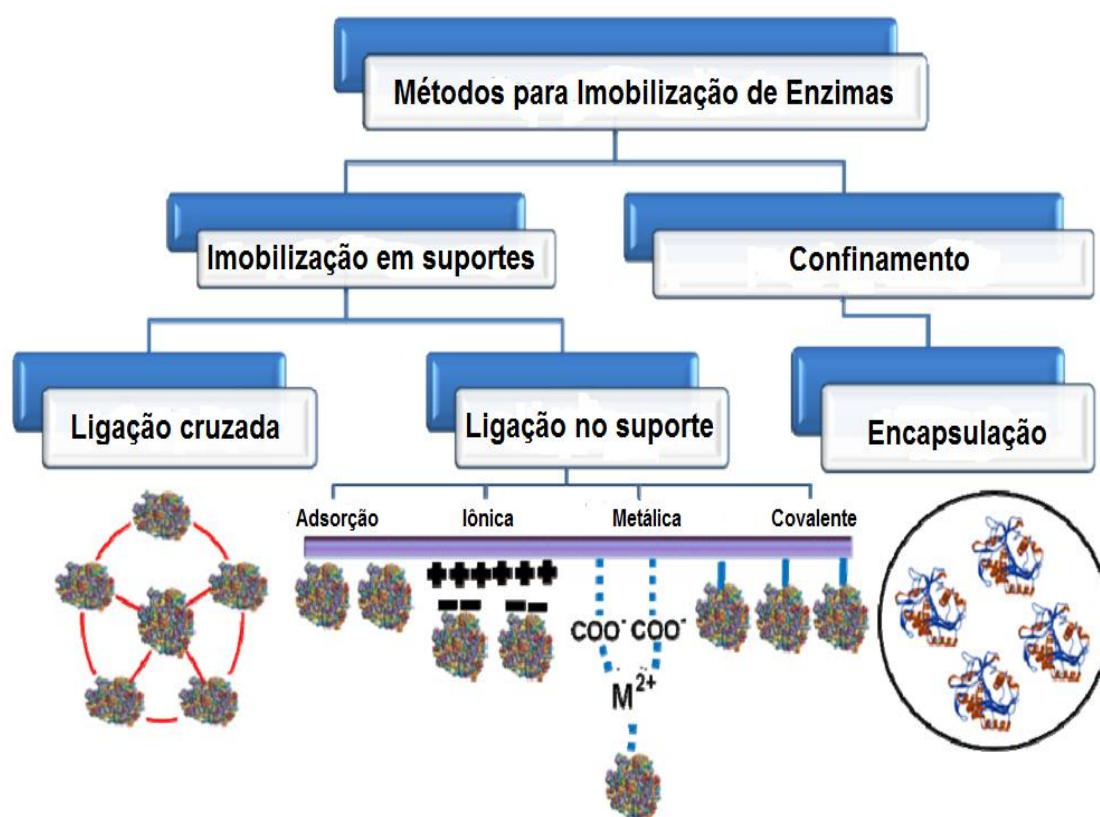
Nas últimas décadas tem aumentado o interesse no desenvolvimento de técnicas de imobilização de enzimas com o intuito de amenizar os efeitos que levam à inativação desses catalisadores em meio orgânico, bem como as variações de temperatura e pH, podendo manter sua atividade catalítica no processo e

posteriormente reutilizá-la em novos ciclos (SEBRÃO *et al.*, 2007; TRAN e BALKUS, 2011; STEPANKOVA *et al.*, 2013).

O interesse nessa técnica se dá na permanência da estabilidade e a atividade do biocatalisador, sem que haja interferência do suporte com a enzima. Essa imobilização pode ser feita por diferentes métodos, como separação por membranas, entrelaçamento em polímeros, adsorção e por formação de ligações covalentes (LIMA *et al.*, 2001; MATEO *et al.*, 2007; TRAN e BALKUS, 2011).

A escolha do método e o tipo do suporte vão depender das características e condições de uso da enzima, porém um bom suporte deve apresentar uma boa estabilidade química, mecânica e térmica, ter uma grande área superficial, boa permeabilidade, oferecer características hidrofílicas, ser resistente na presença de microorganismos e ser reutilizado em um novo processo (MATEO, 2007).

Na **Figura 4** é mostrada, esquematicamente, a classificação dos métodos utilizados na imobilização de enzimas (SINGH *et al.*, 2013).



**Figura 4:** Métodos de imobilização de enzimas (SINGH *et al.*, 2013).

### 3.4.1 Técnicas de imobilização de enzimas por encapsulação

Nesta técnica ocorre a formação de uma estrutura porosa envolvendo a estrutura tridimensional da enzima, de tal maneira que a sua mobilidade não seja alterada. Porém, apenas substratos com baixa massa molar podem ser utilizados nesta situação. Faz parte desse método a encapsulação em gel ou fibras e a microencapsulação (VIEIRA, 2009).

Por meio da microencapsulação, a enzima fica presa entre as membranas poliméricas, com grande área superficial. Esse sistema necessita de substratos pequenos, para que estes consigam atravessar a membrana e entrar em contato com a enzima. Nessa técnica a enzima não consegue interagir com o polímero, tornando o processo vantajoso, pois assim não há ocorrência de desnaturação. No entanto, pode acontecer da enzima se incorporar nas paredes das membranas (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004).

Na encapsulação em gel ocorre o envolvimento da enzima no fluido por meio da polimerização, neste caso a enzima fica retida no interior da matriz. E na imobilização utilizando fibras, procede a envoltura da enzima nas microcavidades da fibra, de forma a favorecer apenas substratos com baixa massa molar (VIEIRA, 2009).

A grande área superficial existente entre a enzima e o substrato é a vantagem desse método. Além disso, a alta concentração da enzima e o uso de substratos com baixa massa molar podem garantir a encapsulação. Porém, deve ser considerada como desvantagem a possibilidade de que durante o processo de imobilização ocorra à inativação da enzima e também a sua inibição no interior da matriz. (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004).

### 3.4.2 Técnicas de imobilização de enzimas por ligação

A imobilização da enzima a um suporte pode ser na forma de ligações iônicas, covalentes, metálicas ou por meio da adsorção física e por ligações cruzadas (VIEIRA, 2009).

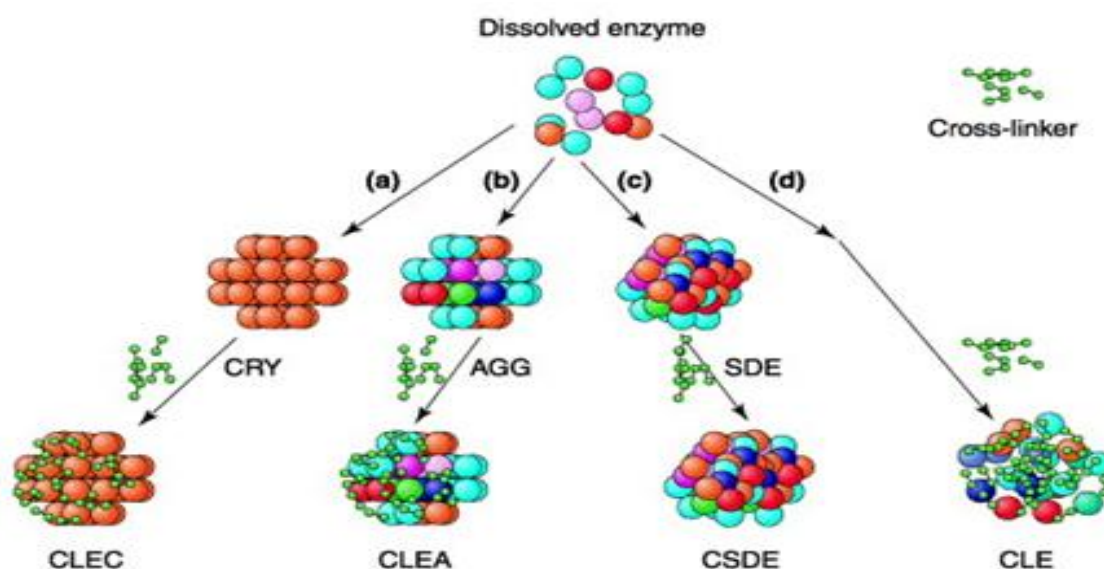
O método por adsorção é considerado o mais antigo na imobilização de enzimas. A sua aplicação se dá pela atração das enzimas pelo suporte, onde essas são adsorvidas sobre a superfície de uma matriz sólida através de interações fracas, como das forças de Van der Waals ou interações mais fortes através de ligações de hidrogênio e ligações iônicas. Às vezes, essa adsorção não é específica, podendo atrair outras substâncias à superfície que competirão com a enzima. De forma geral, essa imobilização é simplória e de fácil manuseio, podendo-se obter atividades similares a da enzima livre, pois esse método não apresenta a distorção do sítio ativo da enzima com o suporte (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, SANROMÁN e MOLDES, 2013).

A imobilização por ligação iônica baseia-se na atração da enzima pelo suporte sólido que contém resíduos para a troca iônica. Suas ligações são mais fortes comparadas ao método de adsorção por interações de van der Waals, acarretando pequena variação na conformação do sítio ativo da enzima (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004).

A ligação metálica utiliza um metal para ativar a superfície do suporte, facilitando o acoplamento da enzima. Esse método apresenta uma força de ligação intermediária, que contribui para atividade da enzima, no entanto, ao utilizar substratos com grande massa molar, essa atividade diminui (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004).

A técnica de ligação cruzada, também conhecida como reticulação, não utiliza suportes sólidos, e as enzimas ficam ligadas entre si ou ligadas a proteínas inativas, formando um sistema complexo. Esse método apresenta desvantagens, pois resulta em baixa atividade catalítica, bem como baixa retenção e instabilidade mecânica e grande dificuldade de manuseio, pois apresenta um aspecto gelatinoso (CARDOSO, MORAES e CASS, 2009). Nesse sentido, alternativas foram desenvolvidas para tornar esse método mais vantajoso frente aos processos industriais, como: ligação cruzada usando enzimas cristalinas (*Cross-Linked Enzymes Crystals*, CLEC),

formação de agregados físicos (*Cross-Linked Enzyme Aggregates*, CLEAs), enzimas atomizadas reticuladas (*Cross-Linked Spray-Dried Enzymes*, CSDE), enzimas solubilizadas reticuladas (*Cross-Linking of Dissolved Enzymes*, CLEs), conforme a **Figura 5**.



**Figura 5:** Diferentes abordagens para a obtenção de enzimas imobilizadas livre de suporte: (a) cristalização, (b) agregação; (c) secagem por atomização; (d) reticulação direta (CAO, LANGEN e SHELDON, 2003).

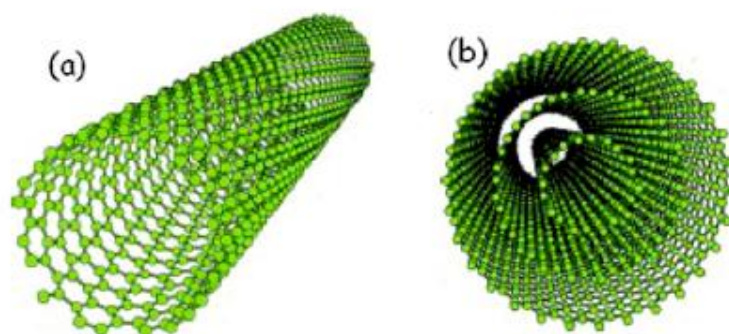
O método por meio da ligação covalente é o mais estudado recentemente, pois apresenta uma ligação forte entre a enzima e o suporte, acarretando uma grande rigidez na imobilização, proporcionando enfim, que a enzima não seja desnaturada perante as condições de calor, pH extremos e à solventes orgânicos. A imobilização por via covalente, geralmente é iniciada pela modificação da superfície do suporte, que será posteriormente utilizado como intermediário reativo para imobilizar as enzimas (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, SANROMÁN e MOLDES, 2013). Essa estabilização se deve à formação de ligações covalentes entre as amins primárias da enzima e os aldeídos presentes no suporte ou também através de outros grupos funcionais entre a enzima e o substrato (ERDEMIR e YILMAZ, 2009).

Neste trabalho, serão usados os MWCNTs como suportes, juntamente com um polímero sintético (PVA) formando um nanocompósito MWCNTs/PVA, bem como o MWCNTs na ausência de PVA para imobilização de diferentes lipases.

### 3.4.3 Nanotubos de carbono – Álcool polivinílico

Atualmente, a nanotecnologia vem ganhando um grande espaço nas pesquisas, devido ao enorme potencial de aplicação nos mais variados ramos industriais, bem como o impulso para o desenvolvimento econômico. Dentre os diversos materiais nanoestruturados disponíveis no mercado, os nanotubos de carbono se destacam pelas suas propriedades físico-químicas, tornando-o um material propício à diversas aplicações, principalmente na biocatálise (RONG e PASTORIN, 2009).

Os nanotubos de carbono (NTCs) consistem em estruturas tubulares em escalas nanométricas, formados por uma ou várias folhas de grafenos enroladas, conferindo a formação de parede simples (*Single-Walled Carbon Nanotubes*, SWCNTs) ou parede múltipla (*Multi-Walled Carbon Nanotubes*, MWCNTs), conforme demonstrado na **Figura 6**.

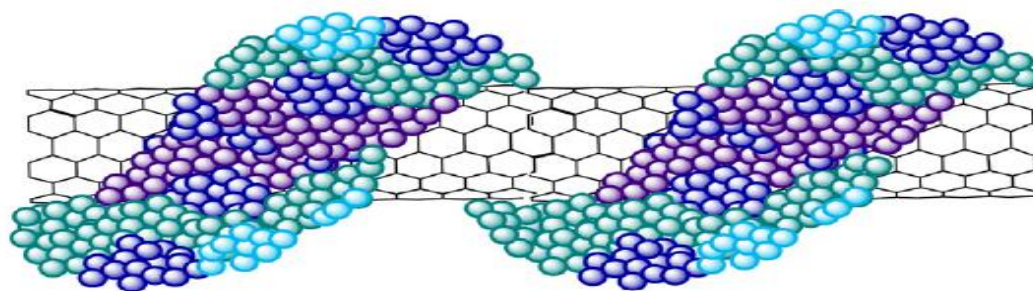


**Figura 6:** Representação esquemática da estrutura de nanotubos de carbono: (a) nanotubo de parede simples, (b) nanotubo de parede múltipla (ZARBIN, 2007).

Essas nanoestruturas são excelentes materiais de suporte para as enzimas, pois apresentam características desejáveis à atividade catalítica, como a resistência à transferência de massa e grande área superficial, bem como a manutenção da estrutura terciária das enzimas (MOHAMAD *et al.*, 2015), o que contribui para sua reutilização.

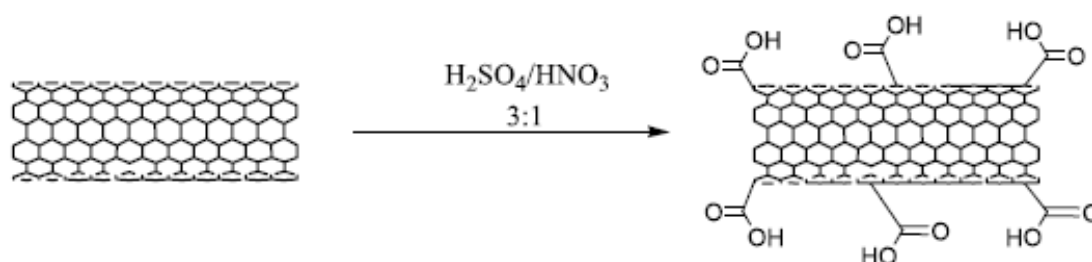
A ligação entre enzima – NTCs é realizado por adsorção física, representada na **Figura 7**. Nesse método a enzima é atraída pelo suporte e adsorvida sobre a

matriz. Esse processo é mais simples e barato em comparação aos outros métodos, pois a estrutura da enzima não é afetada (MOHAMAD *et al.*, 2015).



**Figura 7:** Adsorção física da enzima – CNTs (RONG e PASTORINI, 2009).

Porém, a utilização dos nanotubos para a imobilização é limitada pela sua baixa solubilidade em diversos solventes, o que necessita de métodos de funcionalização, como mostrado na **Figura 8**, para promover o surgimento de alguns grupos funcionais polares sobre a sua superfície (SHIRAZI *et al.*, 2011). Nesse procedimento são utilizados ácidos concentrados ou misturas de ácidos, que conseguem abrir as extremidades dos NTCs e eliminar o carbono amorfo e outras impurezas metálicas (KIM *et al.*, 2006). Assim, a incorporação desses grupos funcionais às suas extremidades dos NTCs cria um ambiente suscetível às interações com as enzimas.



**Figura 8:** Oxidação do CNTs pelo método ácido (RONG E PASTORINI, 2009).

Os polímeros são utilizados para a produção de compósitos, dentre os diversos materiais disponíveis, podemos destacar o álcool polivinílico. Esse polímero consiste em uma resina sintética, solúvel em água, sendo um composto produzido em grande escala industrial, devido sua excelente propriedade adesiva, resultando em alta resistência aos solventes, como óleos e graxas (ARANHA E LUCAS, 2001), sendo também utilizados como suportes para a imobilização de enzimas. Assim, a junção desses polímeros aos NTCs, origina um nanocompósito mais homogêneo

frente às necessidades desses biocatalisadores, uma vez que o hidrogênio do álcool polivinílico faz ligação com as hidroxilas e carbonilas dos nanotubos funcionalizados.

A imobilização traz diversas vantagens às enzimas, tais como a sua estabilidade estrutural, melhoria na atividade, especificidade e seletividade catalítica, redução da sua inibição por fatores externos. Além disso, torna possível a manutenção da estrutura terciária da enzima, o que possibilita sua reutilização em outros processos, uma vez que esses biocatalisadores apresentam um custo elevado e grandes volumes para suprir as necessidades industriais (MOHAMAD *et al.*, 2015).

Nesse sentido, a utilização desses biocatalisadores, especialmente as lipases imobilizadas em nanocompósitos de nanotubos de carbono em álcool polivinílico, bem como na ausência desse polímero, para a obtenção de compostos enantiomericamente puros seria fundamental para as indústrias farmacêuticas. Assim, um dos procedimentos utilizados para a obtenção desses compostos opticamente ativos está baseado na resolução enzimática e, portanto, será apresentado no próximo item.

### **3.5 RESOLUÇÃO ENZIMÁTICA**

As moléculas quirais são imagens idênticas uma da outra, porém, não sobreponíveis, e seus enantiômeros apresentam as mesmas propriedades físico-químicas, sendo o que as diferem é a luz no plano polarizado e métodos bioquímicos, quando composto por proteínas (MIRANDA, MIRANDA e SOUZA, 2015). Em geral, a maioria dos compostos bioativos, destacando os produtos farmacêuticos e agroquímicos são vendidos na sua forma racêmica, onde apenas um dos enantiômeros é o responsável pela atividade de interesse, e o outro pode ser prejudicial ou inativo no organismo (GHANEM *et al.*, 2010).

Para minimizar esses efeitos, tem sido intensificada a investigação em obter fármacos opticamente puros através da síntese seletiva de apenas um dos enantiômeros ou pela separação de misturas racêmicas (GHANEM *et al.*, 2010).

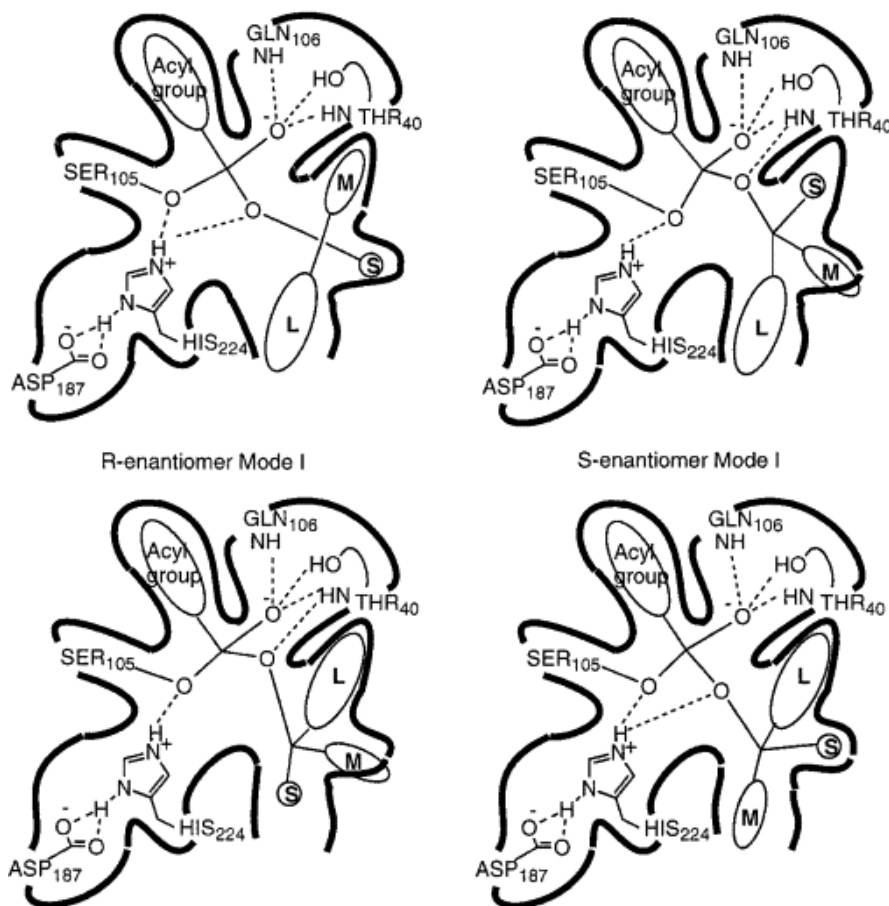


Nesse sentido, a utilização de enzimas na separação desses compostos tem demonstrado excelentes resultados (GHANEM, 2007; VERMELHO *et al.*, 2008).

A resolução enzimática é um processo onde a enzima consegue converter seletivamente uma mistura racêmica em outra mistura, sendo um dos enantiômeros o que não reagiu e um novo composto (SOLOMONS, 1996). Dentre essas enzimas, as lipases são extremamente estereosseletivas, especialmente na resolução de aminas, alcoóis secundários e terciários e ésteres racêmicos (VERMELHO *et al.*, 2008).

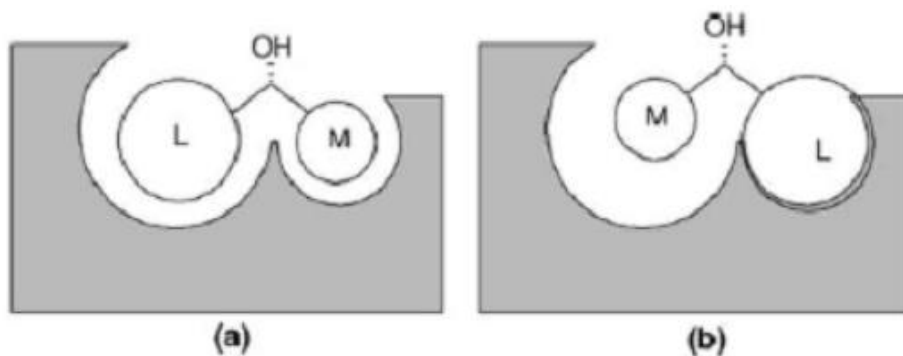
A preferência entre os enantiômeros ao usar lipases decorre da sua conformação com a enzima no estado de transição. A enantiosseletividade é causada pela diferença de energia livre entre os estados fundamentais dos enantiômeros e os correspondentes estados de transição. Neste sentido, a enantiosseletividade é determinada pela diferença da energia livre entre os dois estados de transição (HAEFFNER, NORIN e HULT, 1998).

O modelo do sítio ativo de uma lipase usada na resolução de alcoóis secundários durante a reação de transesterificação pode ser observada na **Figura 9**. Nessa representação, o R-enantiômero (I) e o S-enantiômero (II) estão ligados ao sítio ativo da enzima em posições diferentes, sendo possível a formação de produtos. Porém, o R-enantiômero tem um grupo (L) mais volumoso, fora do sítio ativo, sendo um reagente mais rápido que o S-enantiômero. Esse grupo volumoso tende a ficar fora do sítio ativo da enzima, o que aumenta a seletividade, pois ficando dentro do sítio ativo não há espaço para acomodá-lo. (HAEFFNER, NORIN e HULT, 1998).



**Figura 9:** Modelos de ligação do sítio ativo da lipase de *Candida antarctica B* ao álcool secundário. As ligações produtivas são mostradas no canto superior esquerdo e no canto inferior direito e as ligações não-produtivas na parte superior direita e inferior esquerda (HAEFFNER, NORIN E HULT, 1998).

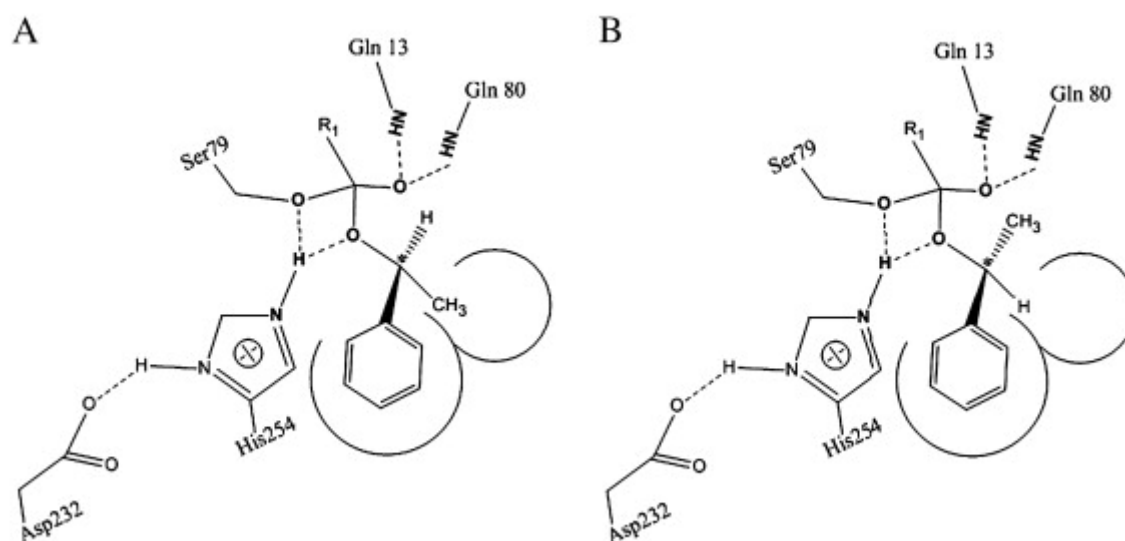
Kazlauskas e col. (1991) também estudaram a estereopreferência do enantiômero ao sítio ativo da lipase de *Candida antarctica B*, de acordo com a forma de suas moléculas e tamanho quando ligadas a alcoóis secundários. A **Figura 10** ilustra o modelo de encaixe substrato- sítio ativo dos dois enantiômeros.



**Figura 10:** Modelo de encaixe substrato-sítio ativo. (a) Enantiômero mais rápido e (b) Enantiômero mais lento no sítio ativo das lipases (GHANEM, 2007).

Na teoria de Kazlauskas e col. exemplificada na **Figura 10** mostra que quando o álcool secundário é submetido à resolução por lipase, a ligação do enantiômero-*R* ao sítio ativo da enzima ocorre com maior facilidade (**Figura 10a**), já o enantiômero-*S* (**Figura 10b**) fica obrigado a encaixar seu grupo de maior volume no menor espaço do sítio ativo. Dessa forma, quanto maior o substituinte em contato com a cavidade interna do sítio ativo da enzima, maior será o efeito estéreo na tríade catalítica, o que faz diminuir a velocidade de reação do enantiômero (GHANEM, 2007).

Alguns estudos recentes de alcoóis racêmicos catalisados por lipase *Candida B* (Xu *et al.*, 2010), demonstrou-se eficiente à regra de Kazlauskas, na qual foi observado a enantiopreferência pelo enantiômero-*R*, conforme mostra a **Figura 11**.



**Figura 11:** Modelos de ligação enzima-substrato para ambos enantiômeros. O sítio ativo da lipase inclui os resíduos de aminoácidos da Asp232, His254, Ser79, onde o álcool faz ligações de hidrogênio com a enzima. (A) Modo de ligação produtiva do S-enantiômero. (B) Modo de ligação produtiva do R-enantiômero (XU *et al.*, 2010).

Os substituintes volumosos (grupo fenila) para ambos os enantiômeros foram encaixados na cavidade maior do sítio catalíticos da LipK107, sendo diferenciada apenas a maneira como cada enantiômero encaixou seu grupo menos volumoso (grupo metila) ou o menor grupo (átomo de hidrogênio) à cavidade menor da enzima.

Para determinar a enantiosseletividade de uma reação catalisada por enzimas, alguns métodos foram propostos e, portanto será descrito subsequentemente.

### 3.6 MÉTODOS ANÁLITICOS PARA DETERMINAÇÃO DA PUREZA ENANTIOMÉRICA

Em 1982, Sih desenvolveu uma relação entre conversão, excesso enantiomérico do substrato e excesso enantiomérico do produto na resolução cinética enzimática. O parâmetro que indica a discriminação de uma enzima entre dois enantiômeros foi introduzido como razão enantiomérica ou enantiosseletividade (E), e pode ser calculado, conforme as **Equações (1), (2) e (3)**:

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \quad (1)$$

$$E = \frac{\ln[(1 - c)(1 - ee_s)]}{\ln[(1 - c)(1 + ee_s)]} \quad (2)$$

$$E = \frac{\ln[(1 - c)(1 + ee_p)]}{\ln[(1 - c)(1 - ee_p)]} \quad (3)$$

Valores das razões enantioméricas menores que 15 são considerados inaceitáveis, os valores moderados (15-30) são aceitos como bons resultados, e acima desse valor são excelentes. A razão enantiomérica acima de 200 não é tão precisa, onde qualquer alteração nos valores do  $ee_s$  e  $ee_p$  causa mudança significativa no seu valor (FABER, 2011).

Os métodos mais usados para a determinação desses valores são por meio de cromatografia gasosa com coluna quiral (CGQ), ressonância magnética nuclear (RMN<sup>1</sup>H), com uso de solventes quirais e o uso de polarímetro.

### 3.6.1 Método polarimétrico

O método polarimétrico é uma técnica clássica para determinar o excesso enantiomérico de uma amostra. A pureza é medida através da rotação óptica específica  $[\alpha]$  de cada composto opticamente ativo, segundo a **Equação 4**:

$$[\alpha]_D^T = \frac{\alpha}{l \cdot c} \quad (4)$$

Onde:

$\alpha$  = rotação óptica observada

$l$  = comprimento da cela (dm)

$D$  = comprimento da linha de emissão de sólidos (nm)

$c$  = concentração (g/cm<sup>3</sup>)

$T$  = temperatura (°C)

A análise da amostra é realizada com variáveis específicas (temperatura, solvente e concentração), e medida em um determinado comprimento de onda de incidência de luz num plano polarizado. Os valores são correlacionados com rotações já conhecidas, sob condições idênticas.

O giro da luz no plano polarizado deve ser igual aos dois enantiômeros, mas em sentidos contrários. Essa técnica é usada como critério para a identificação e avaliação da pureza óptica de vários compostos, sendo que diversos valores da rotação específica já existem na literatura.

O cálculo do excesso enantiomérico (*ee*) segue a **Equação 5**:

$$ee = \frac{\text{rotação específica observada}}{\text{rotação específica do enantiômero puro}} \times 100 \quad (5)$$

As medidas no polarímetro são sensíveis à temperatura e concentração, sujeitos à erros em  $\pm 4\%$ . Também apresentam algumas restrições como fazer análises somente em amostras homogêneas, sem traços de impurezas (SOLOMONS, 1996).

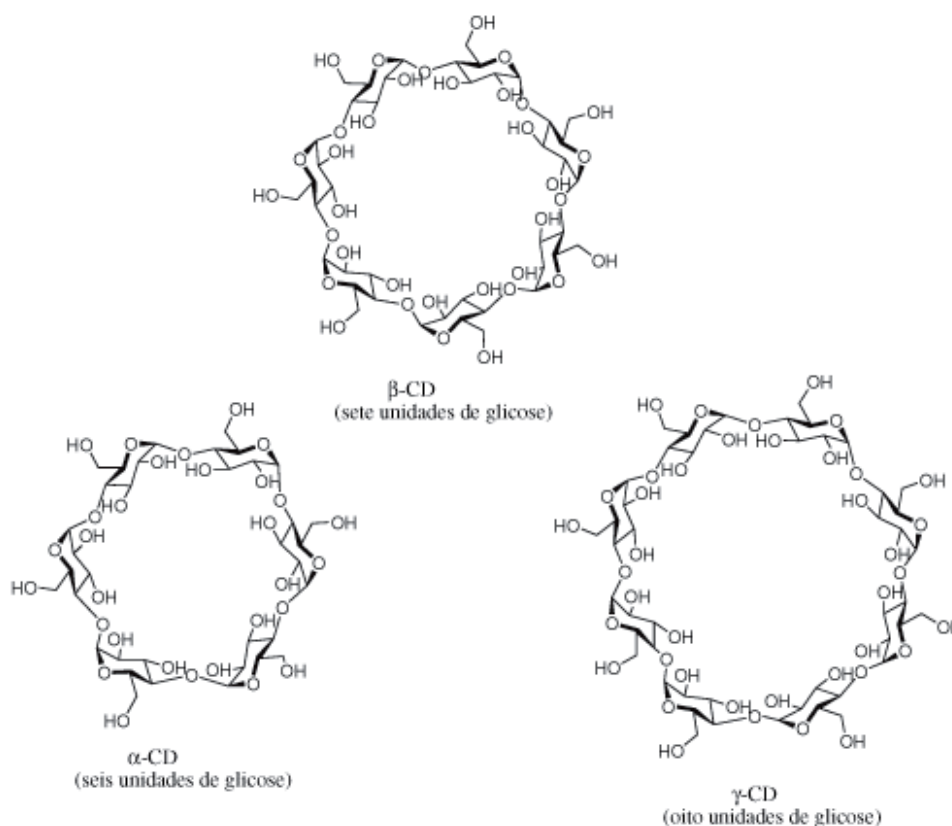
### 3.6.2 Cromatografia gasosa quiral

A técnica de cromatografia gasosa teve uma ampliação no início de 1952, com os pioneiros James e Martin, onde estudaram a separação de ácidos carboxílicos com 1 a 12 átomos de carbono, usando um filme líquido sobre um suporte sólido e um gás (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006), fazendo aumentar o interesse dos pesquisadores por essa metodologia. Esse método tem uma capacidade de resolução ótima e baixos limites de detecção (menos  $10^{-12}$ ), apresentando resultados quantitativos com pequenas quantidades de amostra (SKOOG, HOLLER e CROUCH, 2006).

A utilização de uma fase estacionária quiral nos métodos cromatográficos tem ganhado grande atenção nas pesquisas relacionadas à separação de compostos enantiomericamente puros. Sua aplicação facilita a síntese e caracterização de novos produtos opticamente puros, bem como resolução de precursores quirais e intermediários de compostos biologicamente ativos (SILVA, RAMOS e AQUINO NETO, 1996).

Entre as diversas fases quirais encontradas no mercado, as derivadas de ciclodextrina (oligossacarídeo cíclico com 6, 7, 8 e 9 unidades de glicose ou  $\alpha, \beta, \gamma$  e  $\delta$ , respectivamente) vêm se destacando pela sua enantiosseletividade às misturas racêmicas (PORTE, PORTE e OLIVEIRA, 2014), conforme exhibe a **Figura 12**. Esses seletores quirais possuem partes polares e apolares em suas extremidades, que quando presentes em uma reação geram um complexo de inclusão entre a

molécula quiral e sua parte hidrofóbica, além de uma interação com sua parte hidrofílica (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006).



**Figura 12:** Estruturas moleculares da α, β e γ ciclodextrinas (FERREIRA, ROCHA e SILVA, 2009).

A separação de enantiômeros em cromatografia gasosa está restrita a solutos relativamente voláteis, pois as limitações de estabilidade térmica das fases estacionárias quirais estão numa faixa de 200 a 270°C. Dessa forma, a enantiosseletividade das fases quirais diminui com o aumento da temperatura. Através da cromatografia gasosa a pureza óptica pode ser calculada através da **Equação 6**.

$$ee = \frac{(\text{área do isômero maior}) - (\text{área do isômero menor})}{(\text{área do isômero maior}) + (\text{área do isômero menor})} \quad (6)$$

### 3.7 Espectrometria no infravermelho

A região de maior interesse no infravermelho é a vibracional, com número de onda entre  $400\text{ cm}^{-1}$  e  $4000\text{ cm}^{-1}$ , na qual apresentam comprimentos de onda maiores que os da luz visível e menores que associado às microondas. Nessa técnica, as moléculas que conseguem absorver energia nesse comprimento, são excitadas para atingir um estado de maior energia, correspondendo a frequências vibracionais de estiramento e dobramento na maioria das moléculas covalentes (DONALD *et al.*, 2010).

Para as interpretações dos espectros é necessária uma resolução adequada e uma intensidade razoável, o composto a ser analisado precisa estar puro, bem como o espectrômetro estar calibrado, para que as bandas sejam bem observadas. Quando utilizado o método, a amostra precisa ser especificada, quanto ao tipo de solvente, a concentração e o passo óptico da célula (SILVERSTEIN, WEBSTER e DAVID, 2007).

As análises de infravermelho nesse trabalho são qualitativas, e serão realizadas para os compostos já separados e purificados (padrões).

### 3.8 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é um método de absorção, onde o registro gráfico das frequências dos picos confere um espectro. O solvente mais utilizado nessa técnica é o clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) e o composto referenciado é o tetrametil-silano (TMS), ele é um padrão inerte, simétrico, volátil e solúvel, produzindo um único sinal de absorção, na qual confere hidrogênios mais blindados comparado aos hidrogênios de outros compostos (SILVERSTEIN, WEBSTER e DAVID, 2007).

Nessa técnica não é possível identificar os enantiômeros, pois esse necessita de um meio quiral e apresentam deslocamentos químicos equimolares. Entretanto, os diastereoisômeros podem ser diferenciados, pois seus deslocamentos são



diferentes, sendo possível relacionar com a composição enantiomérica da mistura racêmica, e determinar a conversão aos produtos (PILISSÃO, 2006). Portanto esta técnica, bem como, a de espectrometria de infravermelho serão utilizadas para a caracterização dos compostos padrões que posteriormente serão utilizados na cromatografia gasosa.

### **3.9 Microscopia Eletrônica de Varredura**

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma ferramenta muito utilizada em diferentes áreas de pesquisas, pois permite a caracterização da morfologia de um determinado material, bem como a determinação da estrutura e composição química. O foco da sua utilidade se deve a alta resolução obtida quando as amostras são observadas, com valores em torno de 0,5 nm em instrumentos de pesquisa avançada.

A utilização do MEV admite análises diretas de diversas estruturas, como metais, cerâmicas, amostras biológicas e poliméricas, relatando aspectos tridimensionais, bem como a grande profundidade de campo de cada imagem. Sobretudo, para as maiores resoluções é necessário utilizar outros métodos, como um microscópio eletrônico de transmissão (DEDAVI, GOMES e MACHADO, 2007). Está técnica será utilizada para avaliar como a lipase está adsorvida no suporte nanotubos de carbono/PVA, bem como, avaliar a funcionalização dos MWCNTs.

### **3.10 DIFRAÇÃO DE RAIOS X**

Entre as diversas técnicas que caracterizam os materiais, a técnica de difração de raios-X é a mais conhecida e indicada para determinar as fases cristalinas em um determinado material. Na difração, faz-se um feixe de raios-X incidir sobre a amostra de interesse e se detectam então feixes que emergem do material. A interação da estrutura atômica da amostra com o feixe, faz com que o feixe seja difratado pelos seus átomos. Essas variações em que se emergem os raios-X,

trazem consigo diversas informações sobre a estrutura do material. Os comprimentos de onda dos raios-X são aproximadamente iguais às distâncias entre os planos cristalinos, quando um feixe de raio-X se choca com um sólido cristalino, onde são produzidos picos de diferentes intensidades (ALBERS, A., F. *et al*, 2010).

As vantagens em utilizar essa técnica é referente à sua simplicidade e rapidez e também pela confiabilidade dos resultados, uma vez que o perfil obtido de um composto é característico para cada fase cristalina.

A partir destas considerações, este trabalho, propõe estudar a reação de resolução do (*RS*)-1-feniletanol com acetato de vinila utilizando diferentes lipases comerciais e nativas imobilizadas em nanocompósitos de MWCNTs/PVA ou na ausência de PVA.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo imobilizar diferentes lipases em nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) na forma de nanocompósitos de MWCNTs/PVA e ou MWCNTs na ausência de PVA e utilizar estes sistemas como catalisadores na resolução do álcool (*RS*)-1-feniletanol com acetato de vinila.

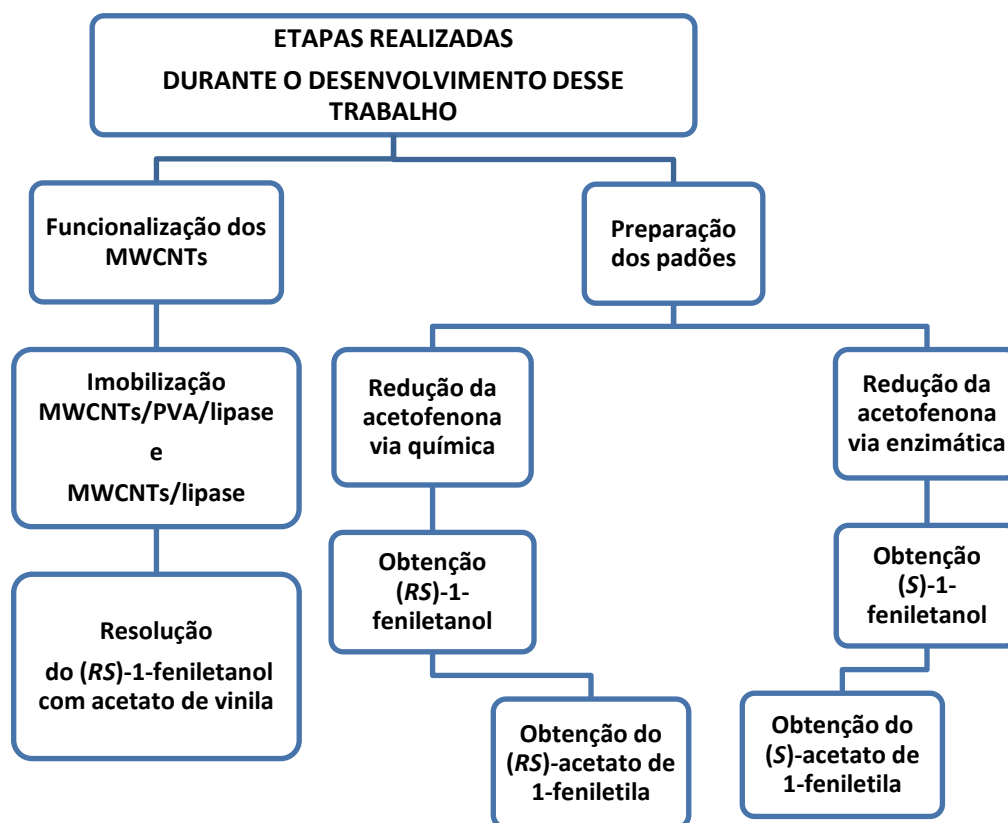
#### 4.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Funcionalizar os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) utilizando diferentes métodos ( $H_2O_2$ , KOH,  $HNO_3/H_2SO_4$ ) e caracterizá-los através das técnicas de FT-IR, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Difração de Raio X (DRX).
2. Estudar o comportamento das lipases livres *Burkholderia cepacia* (PS), *Pseudomonas fluorescens* (AK), *Candida cylindracea* (AY-30), *Aspergillus niger* e a *Rhizopus oligosporus* na resolução do (*RS*)-1-feniletanol.
3. Imobilizar as lipases *Burkholderia cepacia* (PS) e *Candida cylindracea* (AY-30) em nanocompósitos MWCNTs/PVA e MWCNTs na ausência do PVA.
4. Obter o (*RS*)-1-feniletanol a partir da acetofenona com borohidreto de sódio ( $NaBH_4$ ).
5. Obter o (*RS*)-acetato de 1-feniletila a partir da reação do (*RS*)-1-feniletanol com anidrido acético e ácido acético (como catalisador) via química

6. Obter o (S)-1-feniletanol via catálise enzimática a partir da acetofenona utilizando o microorganismo *Daucus carota* presente na cenoura.
7. Obter o padrão puro do (S)-acetato de 1-feniletila a partir do enantiômero puro (S)-1-feniletanol via química, que posteriormente serão usados como padrões em CGQ.
8. Caracterizar os compostos racêmicos (RS)-1-feniletanol, (RS)-acetato de 1-feniletila por técnicas espectroscópicas de FTIR, ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN<sup>1</sup>H) e (GCQ).
9. Caracterizar os compostos enantiomericamente puros, (S)-feniletanol e (S)-acetato de 1-feniletila por técnicas espectroscópicas de FTIR e CGQ.
10. Avaliar a eficiência quanto à enantiosseletividade das lipases imobilizadas em MWCNTs na forma de nanocompósitos MWCNTs/PVA ou os MWCNTs na ausência do PVA na resolução do (RS)-1-feniletanol com acetato de vinila.
11. Avaliar a eficiência da reutilização das lipases imobilizadas na resolução do (RS)-1-feniletanol com acetato de vinila.
12. Comparar os resultados obtidos com outros já reportados na literatura.

## 5 METODOLOGIA

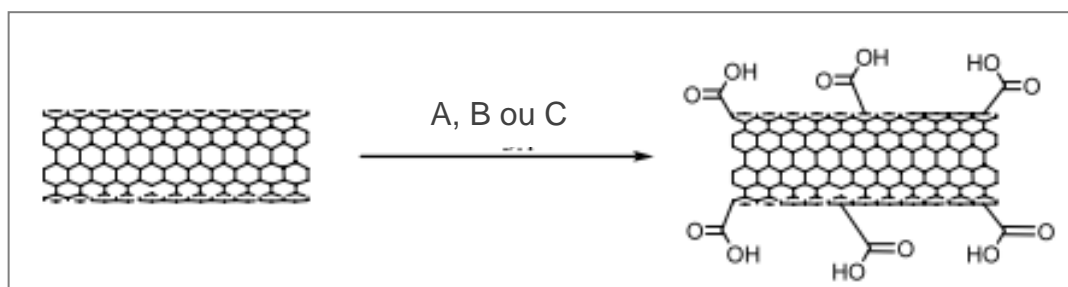
Para atingir os objetivos desse trabalho inicialmente realizou-se a funcionalização dos nanotubos de carbono através de três diferentes rotas. Posteriormente, preparou-se os filmes MWCNTs/PVA/lipase, bem como, os MWCNTs/lipases. Em paralelo à imobilização, foi realizada a redução da acetofenona para a obtenção do (*RS*)-1-feniletanol, para posteriormente realizar a resolução desse álcool através da catalise enzimática. A **Figura 13**, representa esquematicamente os passos seguidos durante o desenvolvimento desse trabalho.



**Figura 13:** Representação esquemática da sequência de etapas que foram executadas nesse trabalho.

## 5.1 FUNCIONALIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE CARBONO

Para a funcionalização dos nanotubos serão utilizados MWCNTs da marca Sigma- Aldrich ( $\geq 98\%$  de base de carbono O.D. x I.D. x L x 10 nm x 4,4 nm x 3,6  $\mu\text{m}$ ), empregando três rotas distintas (A, B, O), conforme descrito na **Figura 14**.



Rota A – refluxou 20 mg de MWCNTS em uma solução aquosa de 1 mol  $\text{HNO}_3$ : 1 mol  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (3 mol/L), durante 6 horas;

Rota B – refluxou 100 mg de MWCNTs em solução alcoólica de KOH (50 g/L), durante 8 horas;

Rota O – refluxou 20 mg de MWCNTs em uma solução aquosa de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%, durante 2 horas.

**Figura 14:** Rotas para a funcionalização dos nanotubos de carbono: (A) ácido nítrico/ácido sulfúrico, (B) Hidróxido de Potássio e (C) Peróxido de hidrogênio (RONG e PASTORIN, 2008).

Para executar a funcionalização dos MWCNTs seguiu o procedimento descrito a seguir.

Em um balão de fundo redondo (125 mL) foi preparado a rota A, B ou C e o sistema colocado sob refluxo em uma temperatura de aproximadamente 125 °C, de acordo com a **Figura 14**. Em seguida, foi realizado a separação dos nanotubos por centrifugação, lavando-os várias vezes com água destilada e etanol (1:1 v/v) até atingir um pH neutro. Após a lavagem, o sólido obtido foi seco em estufa à 40°C.

## 5.2 IMOBILIZAÇÃO DAS LIPASES

### 5.2.1 Preparação dos MWCNTs em filmes de PVA

Para a preparação dos filmes de MWCNTs em PVA foram solubilizados 500 mg de álcool polivinílico em 10 mL de água destilada, esta solução foi mantida sob agitação magnética e aquecimento (~60 °C) até a completa dissolução do PVA.

Em paralelo, foi realizada a dispersão dos MWCNTs funcionalizados na presença ou não de um surfactante. Foram dispersos 5 mg de MWCNTs em 10 mL de água destilada e 7,5 mg de *Tween 80*, mantida em banho de ultrassom por 2h. Em seguida, foi adicionada essa mistura ao PVA solubilizado, mantendo-os somente em agitação por 3h.

Após a solubilização completa da mistura (PVA e MWCNTs), foram adicionados 25 mg da lipase (*Burkholderia cepacia* (PS), *Pseudomonas fluorescens* (AK), *Candida cylindracea* (AY-30), *Aspergillus niger* e a *Rhizopus oligosporus*), e o sistema deixado sob agitação por mais 1h. Por fim, a solução obtida foi transferida para uma placa de Petri e aquecida em estufa a 35 °C para a evaporação da água e formação do filme.

Os filmes MWCNTs/PVA/lipase obtidos foram cortados em pequenos pedaços e transferidos para um erlenmeyer de 250 mL, para serem empregados nas reações biocatalisadas, de acordo com a **Figura 15**.

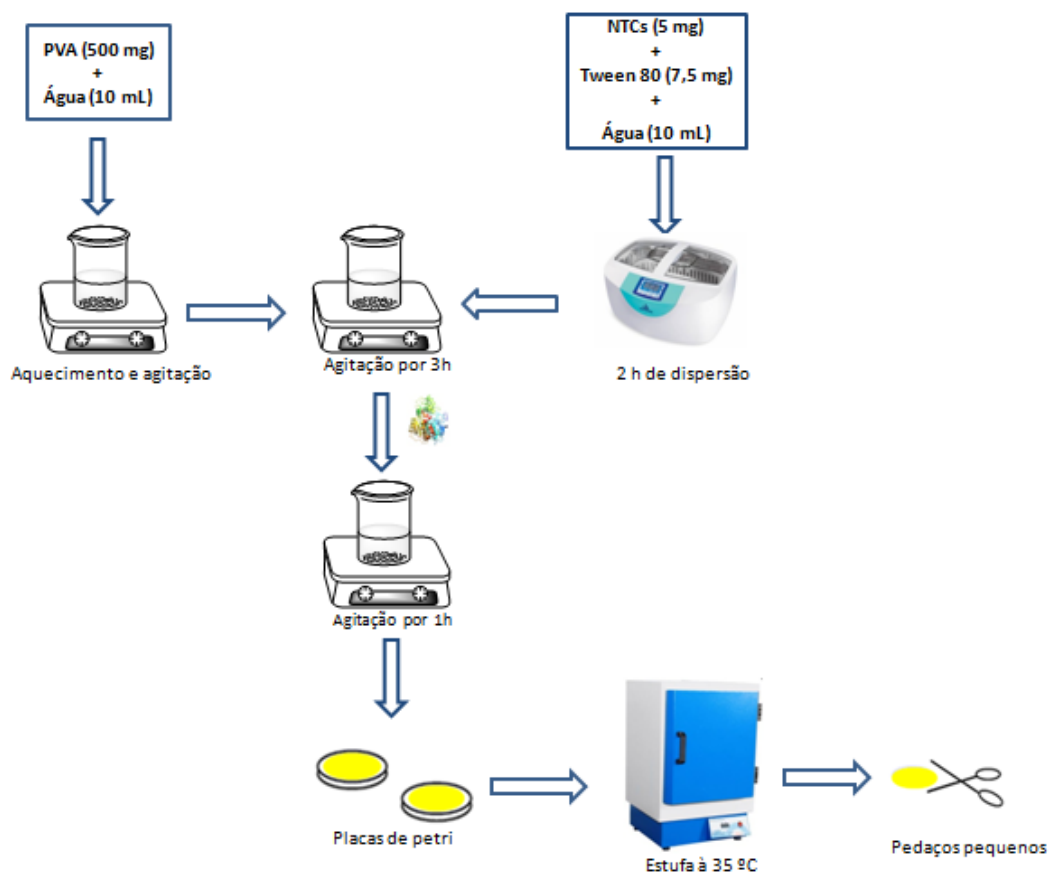


Figura 15: Etapas de preparação dos filmes de MWNTCs / PVA / lipases.

### 5.2.2 Preparação dos MWCNTs/lipase

Primeiramente foi preparada uma solução estoque de  $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$  do fosfato monobásico de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e do fosfato dibásico de potássio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), e em seguida, foi preparado uma solução tampão para diferentes pH, conforme a **Tabela 2**.

Tabela 2: Tampão Fosfato

pH	Fosfato monobásico de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) / mL	Fosfato dibásico de potássio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) / mL
6,0	9	1
6,5	7	3
6,8	5	5
7,0	4	6
7,2	3	7
7,5	2	8
8,0	0,5	9,5



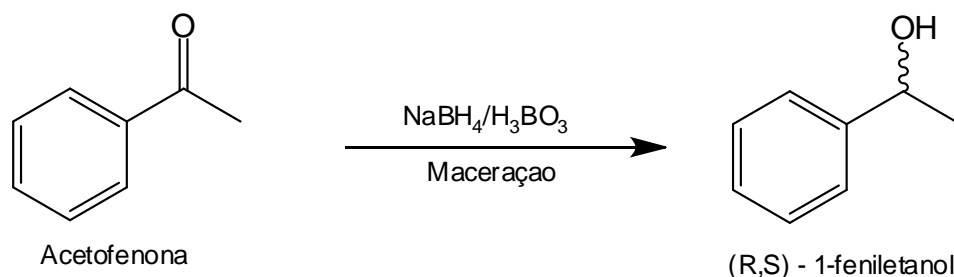
Para cada sistema de imobilização foi utilizado 5 mL do Tampão fosfato (variando o pH 6,0 – 8,0), 5 mg dos MWCNTs funcionalizados e 25 mg das lipases PS e AY-30. Esta solução foi mantida sob agitação magnética em temperatura ambiente por 24h. Em seguida, a solução contendo MWCNTs/lipase/Tampão foi colocada em tubos de centrífuga e centrifugada (3000 rpm.s<sup>-1</sup>). Após a centrifugação, o sobrenadante (Tampão fosfato) foi descartado e o MWCNTs/lipase foram colocados numa placa de Petri e levado a estufa à 35 °C para a completa evaporação da água.

Os grânulos dos MWCNTs/lipase obtidos foram raspados das placas e transferidos para um erlenmeyer de 250 mL, para serem empregados nas reações biocatalisadas.

### 5.3 PREPARAÇÃO DO (RS)-1-FENILETANOL VIA QUÍMICA

#### 5.3.1 Síntese do (RS)-1-feniletanol via química

Para a obtenção do (RS)-1-feniletanol foi realizado a redução da acetofenona com o agente redutor borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>), usando o método em fase sólida proposto na literatura por CHO *et al.* (2006), conforme a **Figura 16**.

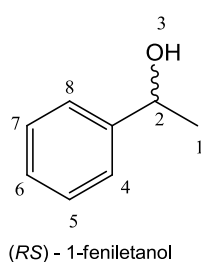


**Figura 16:** Preparação do álcool (RS)-1-fenietanol a partir da acetofenona.

Em um almofariz foram adicionados acetofenona (50 mmol; 5,8 mL), borohidreto de sódio (50 mmol; 1,85 g) e ácido bórico (50 mmol; 3,09 g). Posteriormente realizou-se a maceração desses compostos, com o auxílio de um pistilo, até a sua completa redução. Foi utilizado a cromatografia de camada delgada

(CCD), tendo como eluente hexano/acetato de etila (6:4), para analisar a formação do álcool racêmico.

Logo após, a mistura foi lavada com diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) para a precipitação total dos boranos e filtrada em um papel filtro. O filtrado foi adicionado em um funil de separação e lavado com a água (3 x 25 mL) e solução de bicarbonato de sódio (3 x 25 mL), para a purificação do álcool. Após a extração, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e posteriormente filtrado e rotaevaporado. Os produtos obtidos foram analisados por IV e RMN  $^1\text{H}$ .



**RMN  $^1\text{H}$**  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 7,26 (m, 5H); 4,72 (q, 1H); 1,36 (d, 3H) e 3,22 (s, 1H)

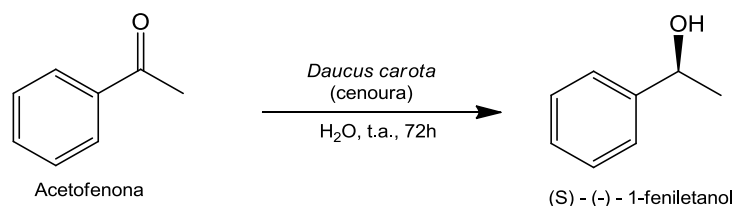
**IV** (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) – 3350 (OH); 3030 (C-H aromático); 2940 (C-H metila); 1960-1940 (harmônicas); 1448 (C=C); 1048 (C-O)

**Métodos de análise CG/FID** – ( $\text{H}_2$ , 120 kPa, split 1:100, coluna  $\beta$ -Ciclodex) – Temperatura do injetor = 230  $^\circ\text{C}$ ; Temperatura do detector = 230  $^\circ\text{C}$ ; Isoterma: 120  $^\circ\text{C}$ .  $T_R$  (min.): (enantiômero – R=19,41 min. ; enantiômero – S=20,90 min.

**Rendimento** – 89%

#### 5.4 REDUÇÃO DA ACETOFENONA VIA ENZIMÁTICA PARA OBTENÇÃO DO (S)-1-FENILETANOL

Para a redução enzimática da acetofenona, foi utilizada a espécie *Daucus carota*, seguindo a metodologia empregada por MACHADO (2006), conforme a **Figura 17**.

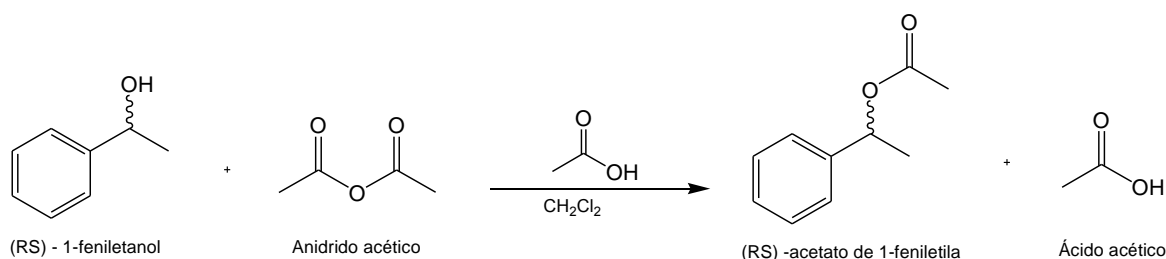


**Figura 17:** Obtenção do (S)-1-feniletanol via catálise enzimática

Inicialmente, lavou-se a cenoura (*Daucus carota*) com água destilada, e em seguida o vegetal foi cortado (com casca) em pequenos pedaços. Em um erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 50 g da cenoura, (20 mmol; 2,3 mL) de acetofenona e 100 mL de água destilada. Essa solução foi agitada em banho tipo Dubnoff (72h, 180 rpm, 35 °C). Ao término da reação, a amostra foi filtrada e extraída com clorofórmio (3 x 25 mL) e água destilada (3 x 25 mL). Em seguida, secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro e posteriormente foi concentrada em um rotaevaporador. O produto obtido foi analisado por CGQ e IV.

### 5.5 SÍNTESE DO (RS)-ACETATO DE 1-FENILETILA E DO (S)-ACETATO DE 1-FENILETILA VIA QUÍMICA

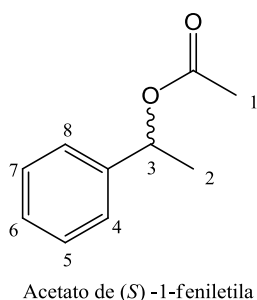
Em um balão de 250 mL foram adicionados o álcool racêmico (5 mmol; 0,6 mL) obtido anteriormente, anidrido acético (25 mmol, 2,3 mL), 30 mL de diclorometano e 3 gotas de ácido acético (**Figura 18**).



**Figura 18:** Reação de transesterificação do álcool (RS)-1-feniletanol por via química.

Esse sistema foi colocado em refluxo, e a reação foi acompanhada por CCD, utilizando como eluente hexano/acetato de etila (6:4). Ao término da reação, a solução foi transferida para um funil de separação e lavada com água (3 x 25 mL) e solução de bicarbonato de sódio (3 x 25 mL) até a remoção do ácido acético. Em seguida, secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), que posteriormente foi filtrado e rotaevaporado. Os produtos obtidos foram analisados por IV e RMN <sup>1</sup>H e CGQ.

Para a obtenção do padrão puro do (S)-acetato de 1-feniletila seguiu-se o mesmo procedimento.



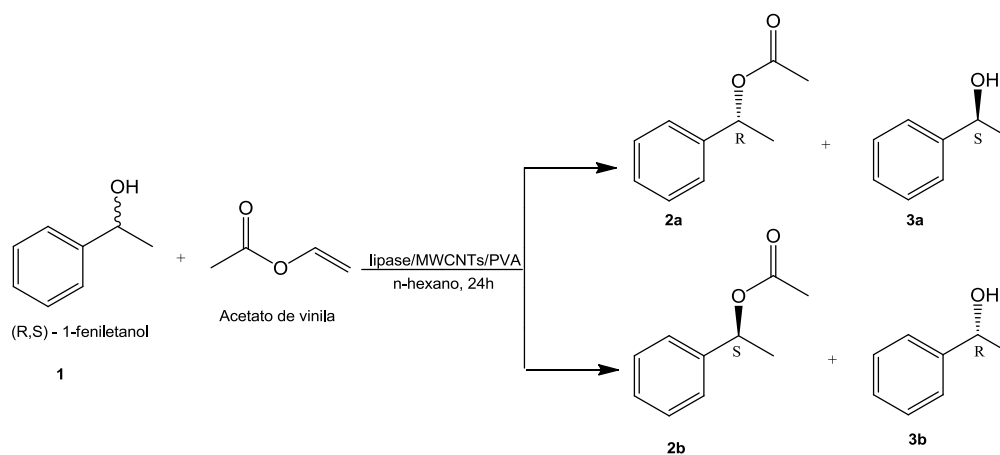
**RMN  $^1\text{H}$**  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 7,31 (m, 5H); 5,88 (q, 1H); 1,53 (d, 3H) e 2,05 (s, 1H)

**IV** (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) – 2976 (C-H metila); 1730 (C=O); 1235 (C-O); 764 (anel aromático monossubstituído)

**Métodos de análise CG/FID** – ( $\text{H}_2$ , 120 kPa, split 1:100, coluna  $\beta$ -Ciclodex) – Temperatura do injetor = 230  $^\circ\text{C}$ ; Temperatura do detector = 230  $^\circ\text{C}$ ; Isoterma: 120  $^\circ\text{C}$ .  $T_R$  (min.): enantiômero – R=19,23 min. ; enantiômero – S=17,65 min.

## 5.6 Resolução do (RS)-1-feniletanol via catálise enzimática

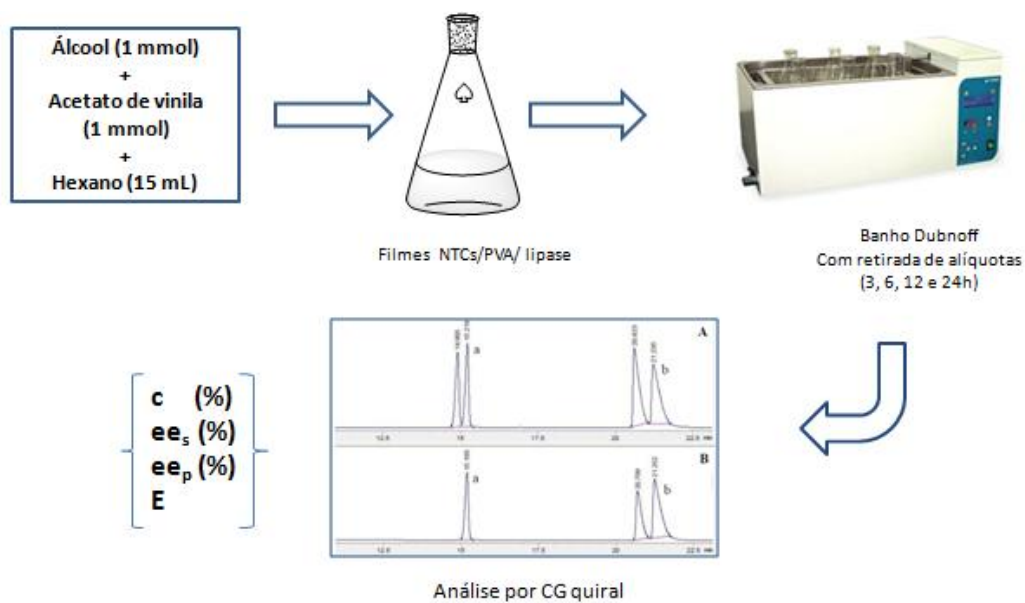
A resolução do (RS)-1-feniletanol catalisada por diferentes lipases imobilizadas em nanotubos de carbono MWCNTs na forma livre ou em nanocompositos MWCNTs/PVA está representada na **Figura 19**.



**Figura 19:** Resolução do (RS)-1-feniletanol com acetato de vinila catalisada por diferentes lipases.

Em um erlenmeyer de 250 mL foram adicionados o álcool racêmico (1 mmol; 0,120 mL), acetato de vinila (1 mmol; 0,92 mL), 15 mL do solvente hexano e o filme contendo a lipase imobilizada em MWCNTs ou MWCNTs/PVA. Em seguida, a solução foi agitada em banho tipo Dubnoff à 35  $^\circ\text{C}$ , conforme **Figura 20**. Foram

retiradas alíquotas da reação em 24 horas e posteriormente essas amostras foram analisadas por cromatografia gasosa com fase quiral ( $\beta$  – ciclodextrina).



**Figura 20:** Procedimento para a resolução do (*RS*)-1-feniletanol com acetato de vinila via catálise enzimática.

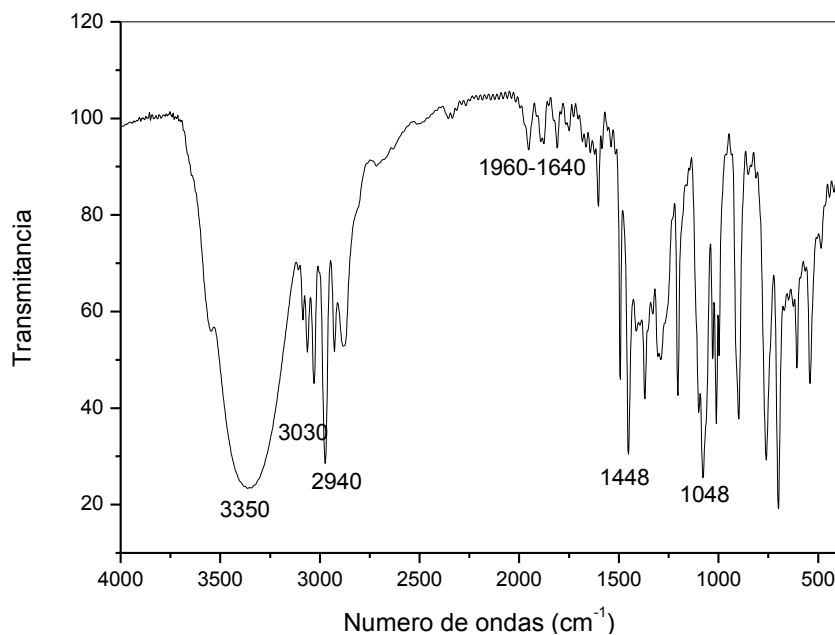
## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Síntese do (*RS*)-1-feniletanol e do (*RS*) acetato-1-feniletila

Inicialmente foi preparado o álcool (*RS*)-1-feniletanol, obtido a partir da redução da acetofenona comercial, e posteriormente foi usado na reação de transesterificação do (*RS*) acetato de 1-feniletila. Esses padrões foram sintetizados por métodos químicos e caracterizados por IV, RMN  $^1\text{H}$  e CGQ, para determinar os tempos de retenção ( $t_R$ ) e a estereoquímica do acetato de 1-feniletila nas reações catalisadas por lipases.

As **Figura 21** e **22** mostram os espectros de IV, RMN  $^1\text{H}$  do (*RS*)-1-feniletanol. Através das bandas no espectro de infravermelhos e das áreas dos picos e regiões características dos hidrogênios, esse composto foi totalmente caracterizado.

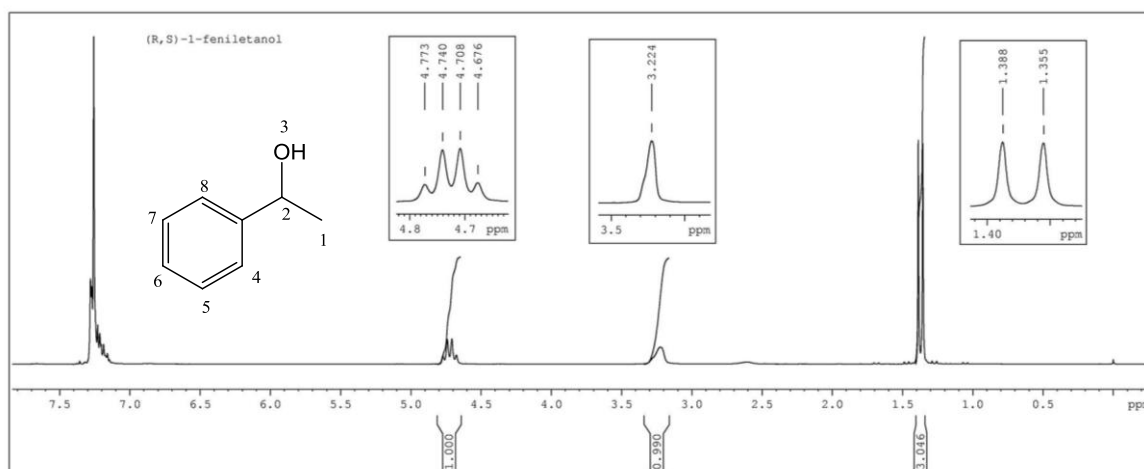
Analisando a **Figura 21**, foi possível confirmar a formação do álcool de interesse, tendo conhecimento que o reagente de partida foi a acetofenona. No espectro da Figura 21, pode-se observar uma banda larga em  $3350\text{ cm}^{-1}$  característica do grupo O-H de alcoóis e a ausência da banda carbonila em ( $\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ ) presente em todas as acetofenonas. Também foram observadas bandas de deformação axial de C-H de aromáticos em  $3030\text{ cm}^{-1}$  e de alifáticos em  $2940\text{ cm}^{-1}$ , bandas harmônicas em  $1960\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ , bandas de deformação axial de C-O em  $1448\text{ cm}^{-1}$  e bandas relacionadas a ligação C=C do anel aromático em  $1048\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 21:** Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier do (RS)-1-feniletanol em KBr.

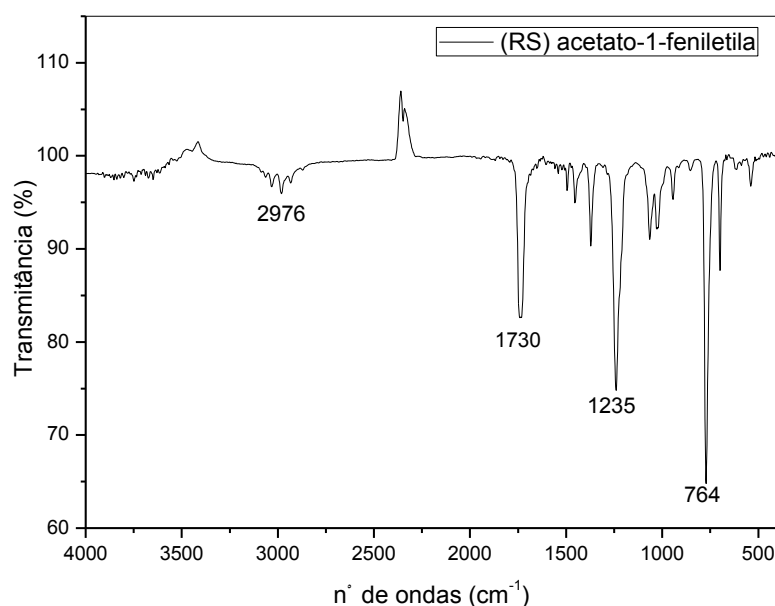
Uma caracterização mais detalhada do álcool (RS)-1-feniletanol foi obtida através do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , conforme a **Figura 22**.

Os multipletos na região entre 7,26 ppm (5H) são referentes aos hidrogênios do anel aromático. O quarteto entre 4,72 ppm (H-2) é referente ao hidrogênio ligado ao carbono C-H vizinho a hidroxila. Se a acetofenona não houvesse sido convertida à álcool, este pico estaria ausente. Observa-se também um dubleto em 1,36 ppm (H-1), referente aos hidrogênios da metila e também um singleto em 3,22 ppm (H-3), referente ao hidrogênio da hidroxila.



**Figura 22:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do (RS)-1-feniletanol. [200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ], com TMS como referência.

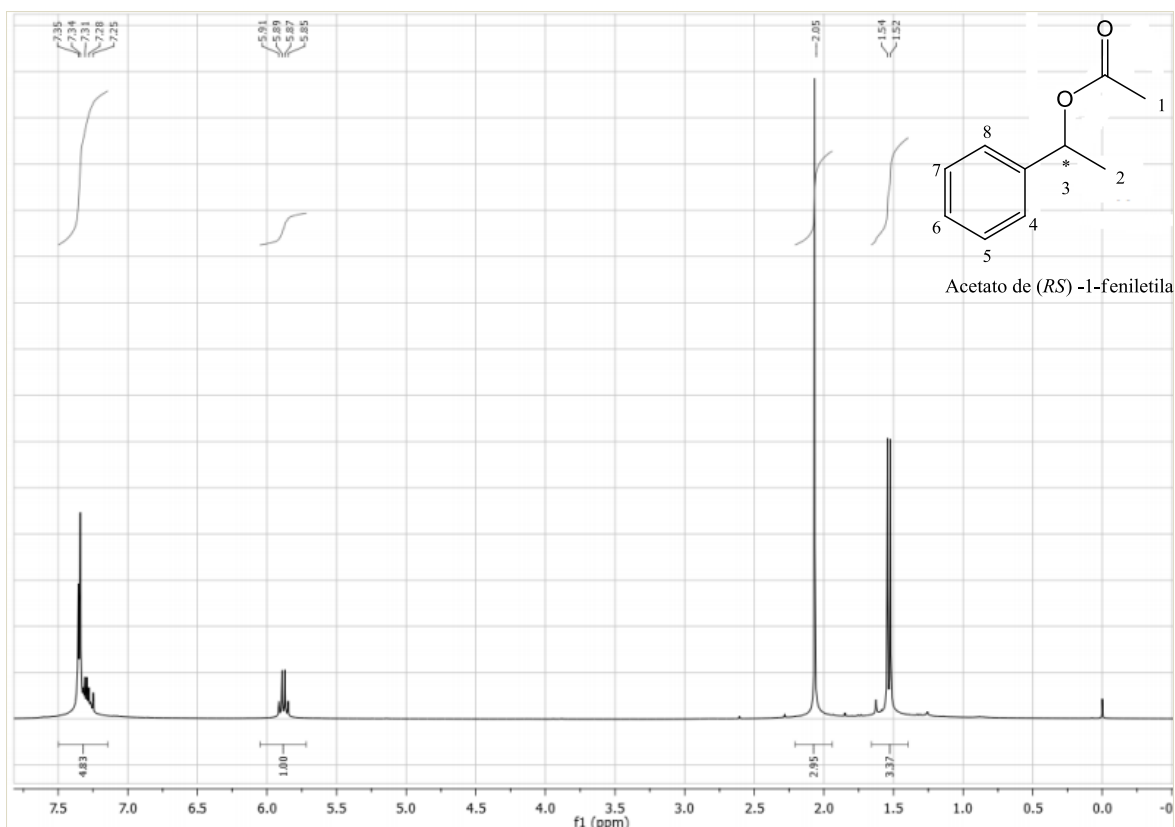
A **Figura 23** mostra o espectro de infravermelho do (*RS*)-acetato de 1-feniletila, onde apresentam bandas características para este composto. A banda em  $1730\text{ cm}^{-1}$  refere-se a carbonila do éster. A ausência de uma banda larga na região de  $3360\text{ cm}^{-1}$  também confirma a formação do éster, pois mostra que não há mais o grupo O-H na molécula. Notam-se também bandas próximas a  $2976\text{ cm}^{-1}$ , referentes às vibrações de estiramento das ligações C-H e também uma banda em  $1235\text{ cm}^{-1}$  referente ao C-O, e uma banda em  $764\text{ cm}^{-1}$  referente à deformação angular de 5H do anel aromático (anel aromático monossustituído).



**Figura 23:** Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier do (*RS*)-acetato de-1-feniletila em KBr.

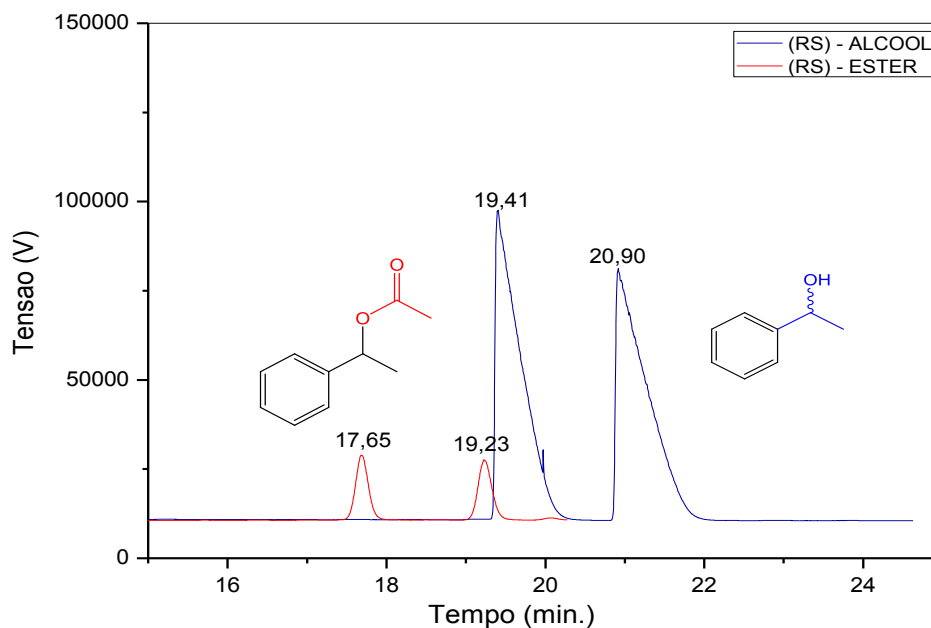
No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do (*RS*)-acetato de 1-feniletila todos os picos foram analisados e estão em concordância com a estrutura proposta, conforme **Figura 24**. Em 7,31 ppm aparece um multiplete referente aos hidrogênios do anel aromático (5H). O quarteto em 5,88 ppm foi atribuído ao (H-3) da molécula. Observa-se também um singlete em 2,05 ppm, que é referente aos hidrogênios da metila vizinha a carbonila (H-1) e um dubleto em 1,53 ppm, que corresponde aos hidrogênios do outro grupo metila (H-2).





**Figura 24:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do (RS) acetato do 1-feniletila. [200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ], em TMS.

Uma análise em Cromatografia Gasosa com fase estacionária quiral foi realizada para determinar o tempo de retenção do (RS)-1-feniletanol e (RS)-acetato de 1-feniletila. A **Figura 25** mostra o cromatograma da sobreposição do padrão racêmico do (RS)-1-fenietanol (azul) com o (RS)-acetato de 1-fenietila (vermelho). A partir dessa figura observa-se que o tempo de retenção entre 17,65 – 19,23 minutos são referentes ao sinal do éster racêmico e o tempo de retenção entre 19,41 – 20,90 minutos são referentes ao álcool racêmico.

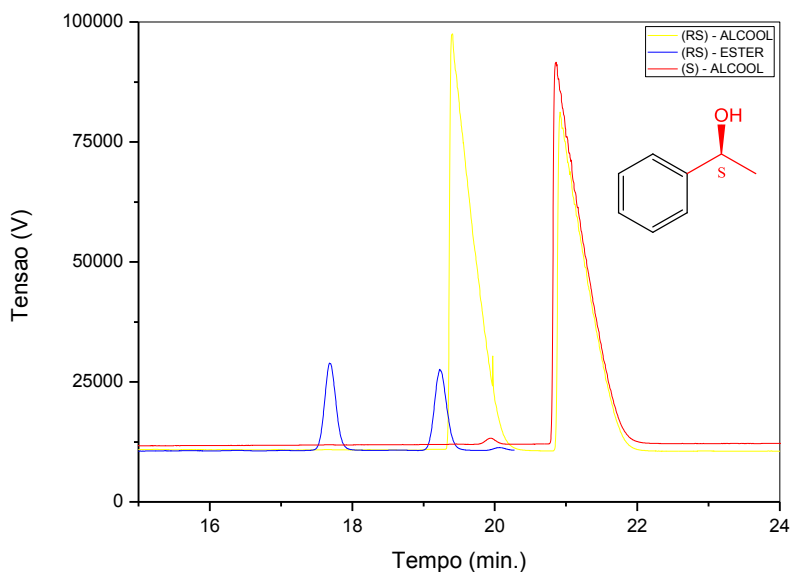


**Figura 25:** Cromatograma da separação dos compostos racêmicos – (RS)-1-feniletanol (azul) – (RS)-acetato de 1- feniletila (vermelho) via CG utilizando uma coluna com fase estacionária quiral ( $\beta$  - Ciclodex). Condições de análises: Injeção = 230 °C, Detector = 230 °C. Programação: isoterma de 100 °C, split 1:100, pressão do H<sub>2</sub> = 120 kPa.

## 6.2 Síntese do (S)-1-feniletanol e (S)- acetato de 1- feniletila

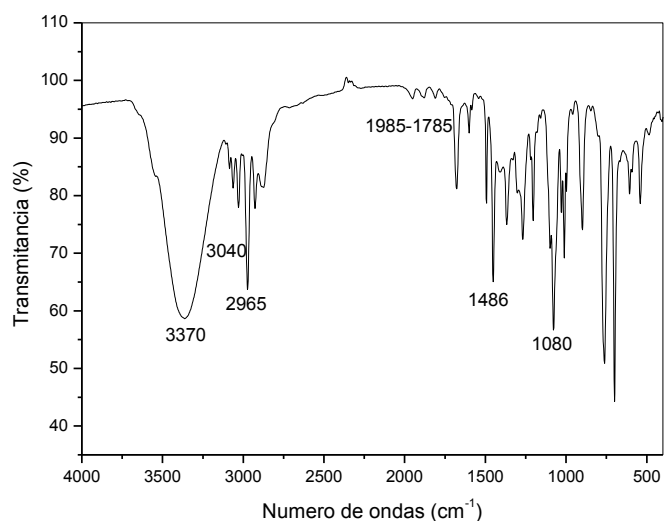
Para a obtenção do (S)-1-feniletanol opticamente ativo foi realizado o procedimento descrito no item (5.4), que posteriormente foi usado como padrão na resolução enzimática do (RS)-1-feniletanol.

A síntese do S-1-feniletanol foi realizada através da redução da acetofenona, utilizando o microorganismo *Daucus carota* como catalisador, sendo um procedimento já relatado na literatura (MACHADO, 2006). Essa espécie leva a produção de álcoois de configuração S com ótimos valores de conversão (73%) e excesso enantiomérico ( $\geq 99\%$ ), demonstrando um resultado próximo aos relatados por Yadav (2002). Como pode ser observado no cromatograma da **Figura 26**, a reação com a espécie *Daucus carota* levou ao enriquecimento da configuração (S)-1-feniletanol.



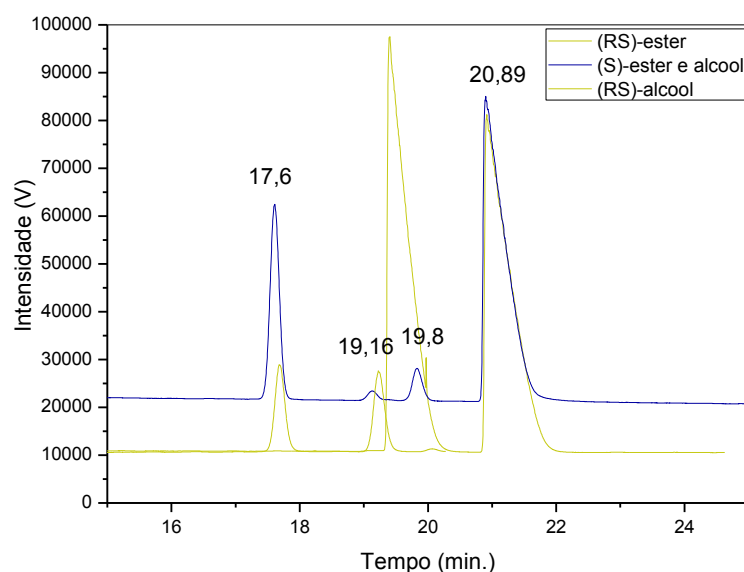
**Figura 26:** Cromatograma do substrato (S)-1-feniletanol catalisado pela espécie *Daucus carota* (vermelho) após 72 horas de reação em comparação aos respectivos padrões racêmicos. Condições de análises: Injeção = 230 °C, Detector = 230 °C. Programação: isoterma de 100 °C, split 1:100, pressão do H<sub>2</sub> = 120 kPa.

Para a confirmação da formação do (S)-1-feniletanol foram realizadas análises de IV, onde mostram bandas características de O-H em 3370 cm<sup>-1</sup>, bandas de deformação axial de C-H de aromáticos próximo à 3040 cm<sup>-1</sup> e bandas de deformação axial de metila em 2965 cm<sup>-1</sup>. Observou-se também bandas harmônicas em 1985-1785 cm<sup>-1</sup> e uma banda em 1486 cm<sup>-1</sup> relacionado a deformação axial de C-O, e uma bandas próximo de 1080 cm<sup>-1</sup> de C=C do anel aromático, conforme apresentado na **Figura 27**.



**Figura 27:** Espectro de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier do (S)-1-feniletanol em KBr.

A **Figura 28** mostra o cromatograma do composto (S)-acetato de 1-feniletila, no qual apresenta um pico em 17,6 minutos referente ao (S)-éster formado, e também um pico em 20,89 minutos com maior intensidade (84000 V) relacionada ao (S)-álcool, mostrando dessa forma que o composto não foi totalmente purificado ou a reação não foi finalizada, apresentando uma mistura dos compostos, com (R)-álcool em 19,8 minutos e do (R)-éster em 19,16 minutos.



**Figura 28:** Cromatograma do (S)-acetato de 1- feniletila via CG-FID com coluna quiral ( $\beta$ -ciclodex). Condições de análises: Injeção = 230 °C, Detector = 230 °C. Programação: isoterma de 100 °C, split 1:100, pressão do H<sub>2</sub> = 120 kPa.

Com esses dados foi possível confirmar a formação do (S)-1-feniletanol e do (S)-acetato de 1-feniletila catalisado pela espécie *Daucus carota*, a qual foram utilizados como padrão quiral nesse trabalho.

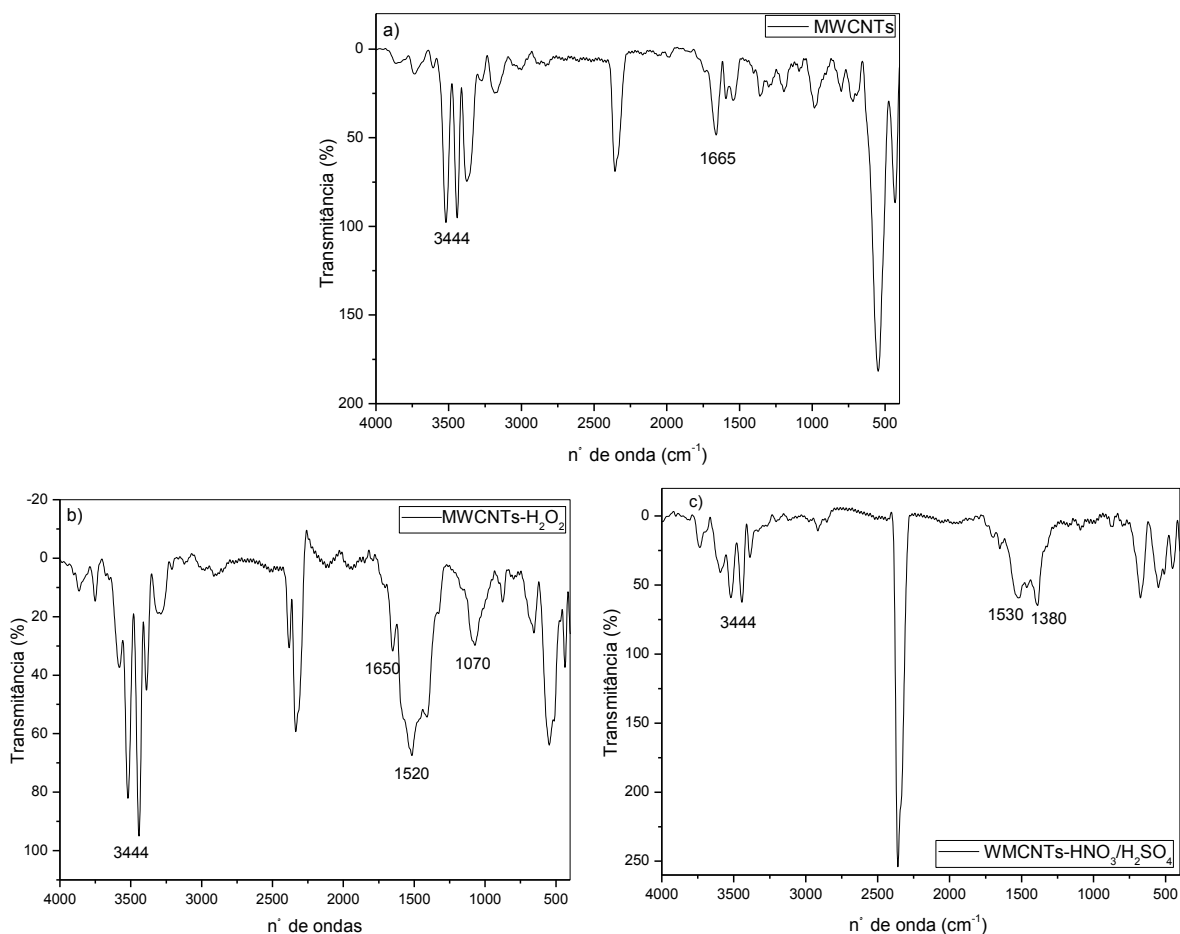
### 6.3 Caracterização dos nanotubos de carbono

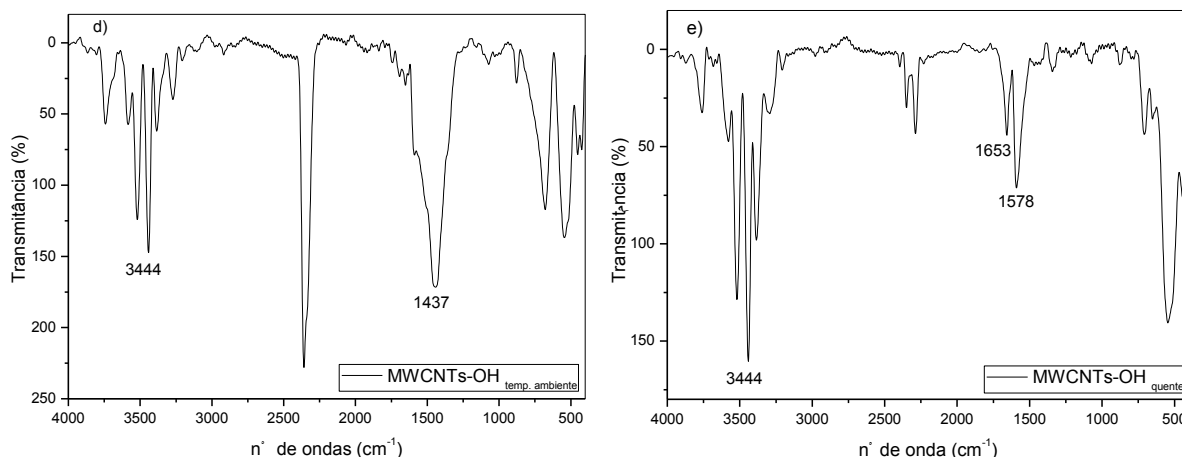
Neste trabalho estudaram-se algumas formas de funcionalização dos MWCNTs comerciais. Para isso, foram realizados três tratamentos químicos nesses materiais, na qual o primeiro foi realizado com uma mistura de soluções de ácidos

( $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ ), o segundo com base (KOH em etanol) e o terceiro com uma solução de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

Esses tratamentos foram realizados com o intuito de aumentar a solubilidade dos MWCNTs, por meio da inserção desses grupos funcionais em suas paredes, resultando numa maior interação com diversos compostos orgânicos, inorgânicos e biológicos. E para avaliar a funcionalização nas paredes dos MWCNTs utilizaram-se três técnicas: FT-IR, MEV e DRX.

Primeiramente, verificou a eficiência dos tratamentos realizados com os MWCNTs através da técnica de FT-IR. Os espectros obtidos para os MWCNTs funcionalizados estão apresentados na **Figura 29**.





**Figura 29:** Espectros de FTIR para (a) MWCNTs, (b) MWCNTs – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (c) MWCNTs – HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (d) MWCNTs – OH Temperatura amb. e (e) MWCNTs – OH quente, em (KBr)

Na **Figura 30**, temos os espectros de FTIR para os MWCTNs comerciais e os MWCTNs funcionalizados em três formas distintas. Em todos os espectros (**Figura 30 a-e**) pode-se observar uma banda próxima a  $3444\text{ cm}^{-1}$ , essas bandas estão relacionadas a vibrações de grupos OH isolados, em grupos carboxílicos ou água adsorvida.

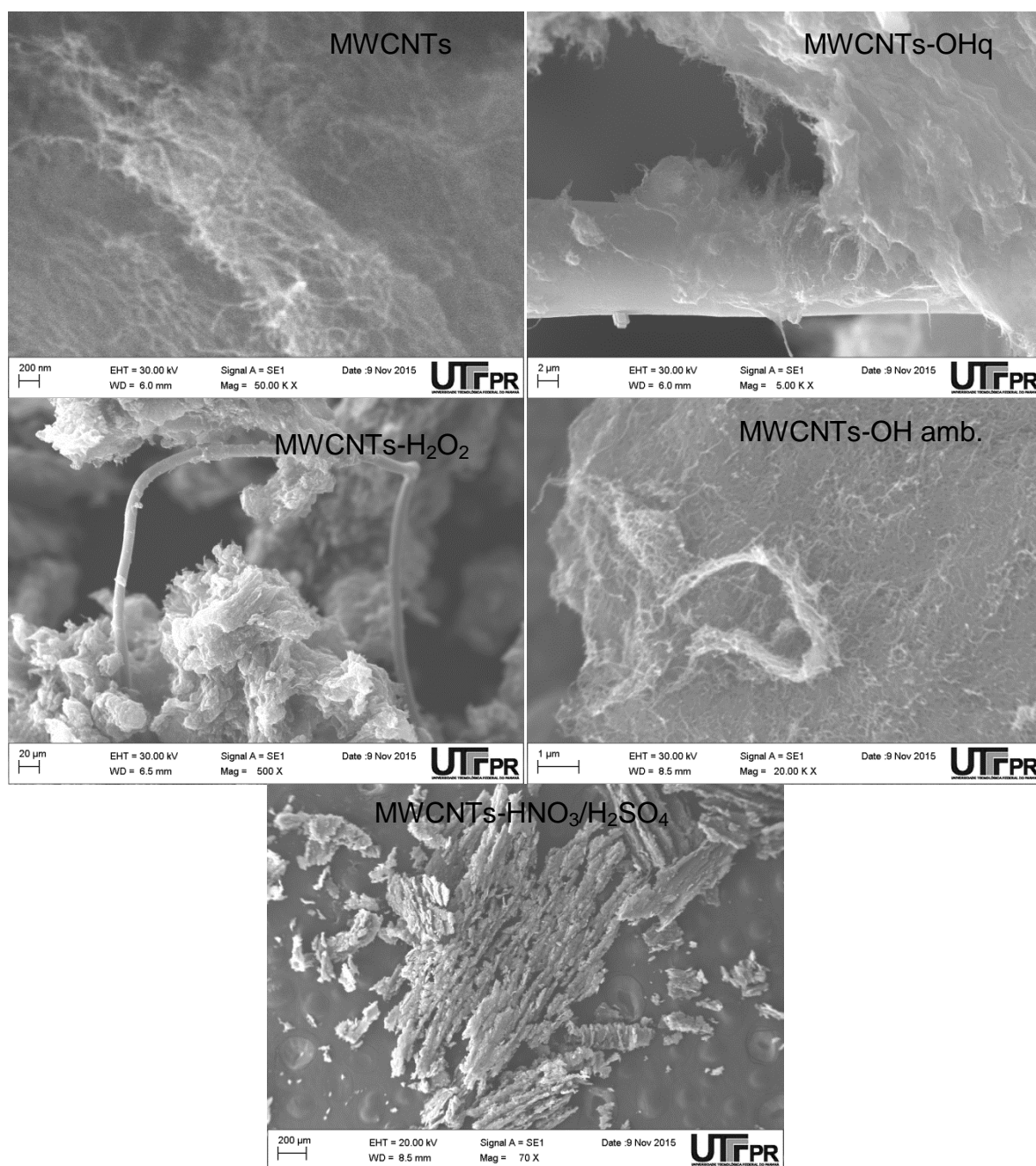
Ao observar o espectro da amostra MWCNTs comercial (**Fig. 30a**) e compará-lo com os demais MWCNTs funcionalizados é possível perceber que há uma variação na intensidade da banda próxima da região em  $3444\text{ cm}^{-1}$  para algumas amostras, o que demonstra mudanças nas paredes dos MWCNTs comercial após os tratamentos. Pode-se notar um aumento dessa banda na amostra tratada com KOH realizado à temperatura ambiente (**Fig. 30d**), KOH à quente (**Fig. 30e**), devido à inserção de grupos hidroxilados. Esse fato também foi relatado por Yu (2015) em um de seus estudos com nanotubos de carbono, onde evidenciou que os grupos hidroxilados estavam em maior quantidades sob a superfície dos nanotubos.

Outras bandas que se destaca em todos os espectros, são as bandas entre  $1750\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$  relacionados às vibrações de grupos C=O de grupos carboxílicos, cetonas e quinonas, e também ligações C=C de anéis aromáticos.

STOBINSKI e col. (2010) utilizaram a técnica de funcionalização dos nanotubos de carbono através de um tratamento oxidativo com ácido nítrico, observando bandas mais intensas nas regiões entre  $1700\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$  e também

bandas entre  $1250$  e  $950\text{ cm}^{-1}$  que relaciona a um aumento de grupamentos oxigenados na superfície do material. Esse fato confirma que as amostras tratadas com  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$  (**Fig. 30 b,c**), demonstram uma efetiva oxidação dos nanotubos.

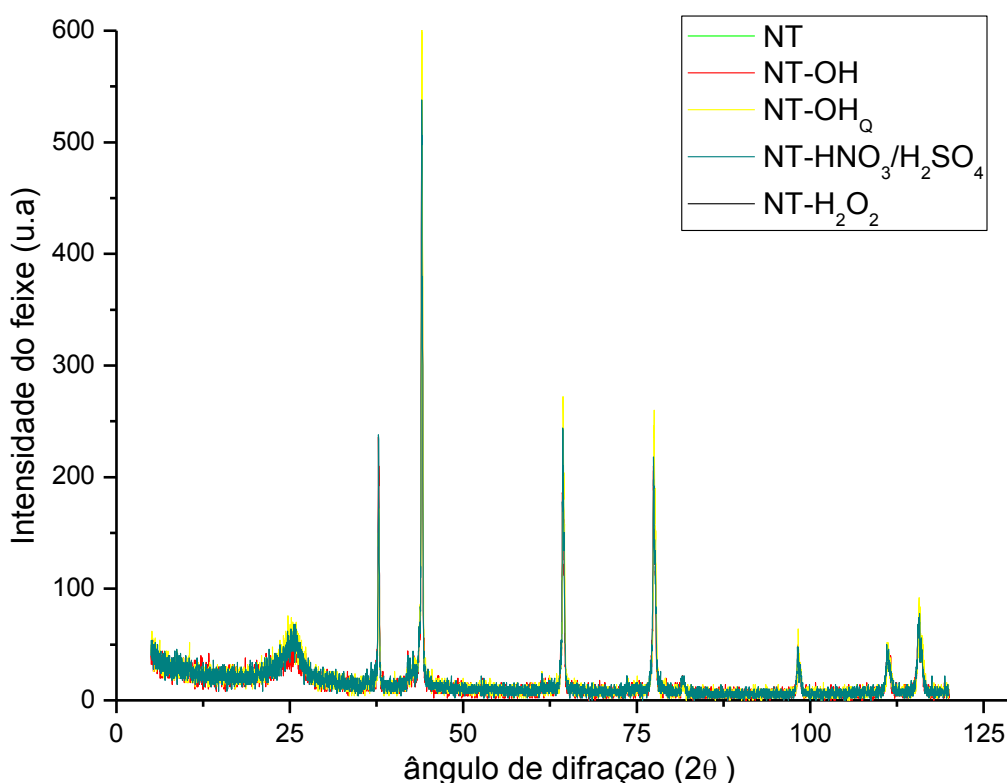
A segunda técnica utilizada nesse trabalho foi a Microscopia Eletrônica de varredura, usada para avaliar as características morfológicas dos MWCNTs comercial e MWCNTs funcionalizados. As imagens obtidas estão representados na **Figura 31**.



**Figura 30:** Imagem de microscopia eletrônica de varredura dos MWCNTs comerciais, MWCNTs-OH quente, MWCNTs-OH amb., MWCNTs-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MWCNTs-HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

A **Figura 31** apresenta imagens das amostras dos MWCNTs comercial e funcionalizados, obtidos através da técnica de microscopia eletrônica de varredura. Observou-se que os MWCNTs comercial estão em um formato entrelaçado, que ocorre devido às forças de atração entre os mesmos. Esses materiais quando funcionalizados apresentam características morfológicas diferentes comparados aos nanotubos de carbono comercial, visualmente mostram alteração nas paredes dos MWCNTs e um aumento no tamanho da partícula. Dessa forma afirma-se que ocorreu uma modificação na estrutura dos MWCNTs e a funcionalização foi eficiente.

A terceira técnica usada para caracterizar os nanotubos de carbono foi a Difração de Raio X (DRX). Essa técnica buscar explorar a intensidade de penetração do feixe luz para cada amostra, representada pela **Figura 32**.



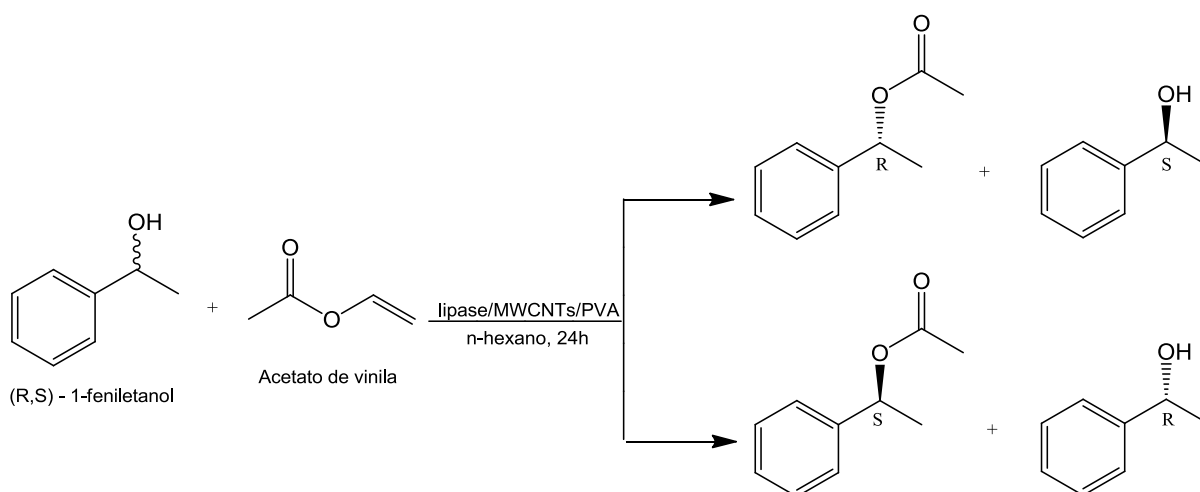
**Figura 31:** Difratograma dos MWCNTs comerciais (verde), e os MWCNTs funcionalizados em OH (vermelho), OH quente (amarelo), HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (azul) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (preto)



Na **Figura 32** estão representados os difratogramas sobrepostos dos MWCNTs funcionalizados utilizados neste trabalho. Nota-se, em todos os difratogramas, picos em aproximadamente  $2\theta = 25,5^\circ$ ;  $37,5^\circ$ ;  $44^\circ$ ;  $64^\circ$ ;  $77^\circ$ ;  $98^\circ$ ;  $111^\circ$  e  $115^\circ$  relativos aos MWCNTs, análogo à reflexão dos planos do grafite (CAO, 2001). Após o tratamento diferenciado para os MWCNTs observa-se que a intensidade dos picos relativos são maiores para o tratamento com hidróxido de potássio, seguido do tratamento com ácidos ( $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ ), indicando assim uma maior funcionalização nas paredes dos nanotubos de carbono.

#### 6.4 Avaliação de lipases de diferentes procedências

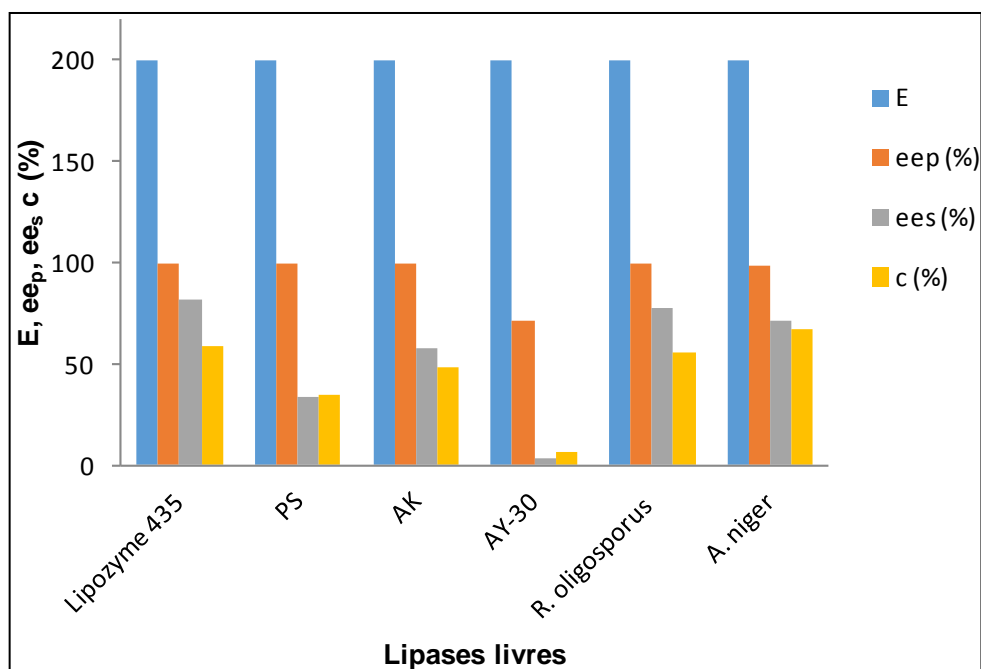
Inicialmente, foi estudado o comportamento de lipases de diferentes procedências na resolução enantiosseletiva do (*RS*)-1-feniletanol com acetato de vinila em n-hexano, conforme apresentado na **Figura 33**.



**Figura 32:** Esquema da resolução do (*RS*)-1-feniletanol com acetato de vinila catalisada por diferentes lipases.

Para este estudo foram selecionadas as lipases comerciais (*Burkholderia cepacia* (PS), *Pseudomonas fluorescens* (AK), *Candida cylindracea* (AY-30), *Aspergillus niger* (A.niger), *Rhizopus oligosporus* (R. Oligosporus) e Lipozyme 435 em sua forma livre.

Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 34**. Essa reação foi analisada em CGQ com retiradas de alíquotas em 24 horas e comparadas com o padrão quiral (S)-acetato de 1-feniletila, preparada conforme o item 5.5, pág.44.

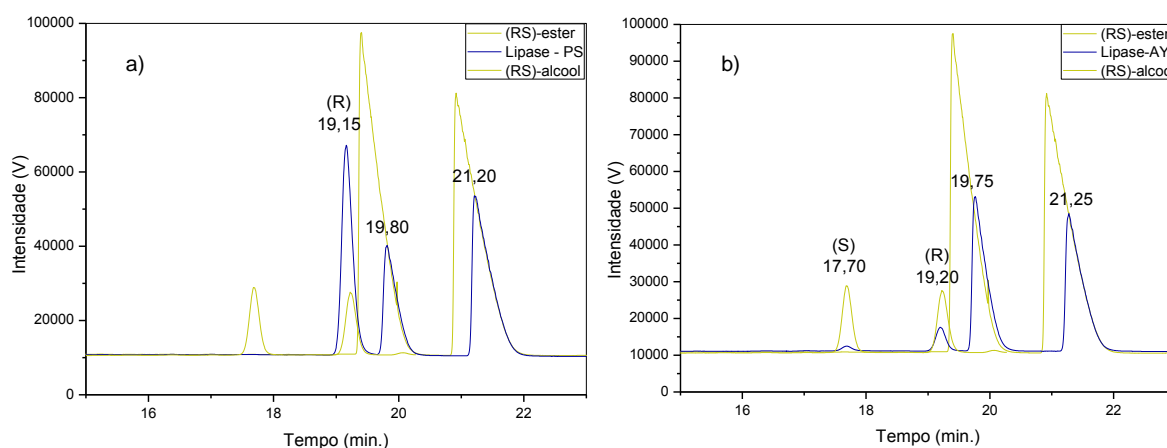


**Figura 33:** Influência da procedência de diferentes lipases na resolução do (*RS*)-1-feniletanol em 24h. A quantificação foi através do GC-FID e o cálculo da Enantiosseletividade realizado pelo programa disponível em [www.orgc.tugraz.at](http://www.orgc.tugraz.at). Condições de análises: Injeção = 230 °C, Detector = 230 °C. Programação: isoterma de 100 °C, split 1:100, pressão do H<sub>2</sub> = 120 kPa.

Na **Figura 34**, pode-se observar que no geral maioria das lípases comerciais livres apresentaram uma ótima seletividade a reação de transesterificação do (*RS*)-1-feniletanol, com taxa de conversão variando de 6-59%, com ee<sub>p</sub> de 71-99% e ee<sub>s</sub> de 3-82%. A lipase que apresentou maior seletividade ao produto (*R*) acetato de 1-feniletila foi a Lipozyme, com 59% de conversão, ee<sub>s</sub>=82%, ee<sub>p</sub>>99% e enantiosseletividade (E>200).

As lipases comerciais que apresentaram menor taxa de conversão em (*R*) acetato de 1-feniletila foi a PS e AY-30, sendo essas de 35 e 6%, respectivamente. Essas enzimas apresentaram valores de ee<sub>p</sub> maiores que 99%, indicando alta seletividade, porém, os valores de excesso enantiomérico do substrato foram de 33% para a PS e 3% para AY-30.

Na **Figura 35** observa-se a formação e separação dos produtos de uma alíquota da reação de transesterificação do (*RS*)-1-feniletanol com acetato de vinila catalisada pela lipase PS e AY-30 em 24 horas de reação. O resultado obtido foi comparado com o padrão do composto enantiomericamente puro, sendo notadamente que o produto formado pela lipase foi preferencialmente o (*R*)-acetato de 1-feniletila, enquanto que ao utilizar a lipase AY-30 formou os dois enantiômeros, mas com uma tendência maior na formação do enantiômero-(*R*).



**Figura 34:** Cromatograma de uma alíquota de reação de transesterificação do (*RS*)-1-feniletanol com acetato de vinila catalisada pela lipase (a) PS e (b) AY-30 em 24h, por CGQ. Condições de análises: Injeção = 230 °C, Detector = 230 °C. Programação: isoterma de 100 °C, split 1:100, pressão do H<sub>2</sub> = 120 kPa.

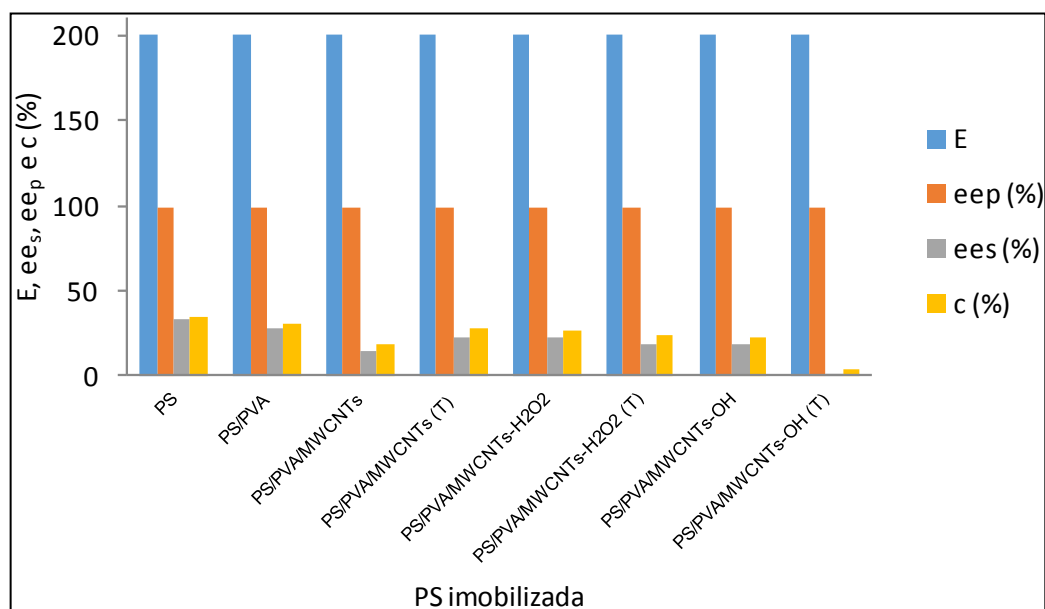
Nesse sentido, essas duas enzimas comparadas com as demais enzimas utilizadas nesse trabalho foram escolhidas para dar continuidade aos estudos na resolução enantiosseletiva do (*RS*)-1-feniletanol, uma vez que serão estudadas diferentes formas de imobiliza-las, com o intuito de melhorar seus resultados.

Portanto, nesse trabalho foi estudada a influência da imobilização das lipases PS e AY-30 em nanocompósitos de MWCNTs na presença PVA. Posteriormente, estudou-se o efeito do pH e a imobilização dessas lipases em MWCNTs na ausência de PVA.

## 6.5 Influência da Imobilização das lipases em nanocompósitos

Nesse trabalho avaliou-se o efeito da utilização da mistura de dois diferentes materiais (MWCNTs e PVA), com proporções estabelecidas. Estes materiais foram usados como suporte na imobilização (procedimento descrito no item 5.2) das lipases PS e AY-30, e posteriormente, aplicado na resolução do (*RS*)-1-feniletanol.

Os resultados de conversão (%) e ee (%) obtidos para a reação de transesterificação do (*RS*)-1-feniletanol com acetato de vinila utilizando a PS imobilizadas em nanocompositos MWCNTs/PVA estão apresentados na **Figura 36**.



**Figura 35:** Efeito da imobilização da lipase PS em nanocompósitos MWCNTs/PVA– (funcionalizado e não funcionalizado) na presença ou ausência de *Tween* 80. A taxa de conversão e ee foram calculadas por GC-FID, enquanto o E foi obtido através do Programa de seletividade disponível em [www.orgc.tugraz.at](http://www.orgc.tugraz.at). Condições de análises: Injeção = 230 °C, Detector = 230 °C. Programação: isoterma de 100 °C, split 1:100, pressão do H<sub>2</sub> = 120 kPa.

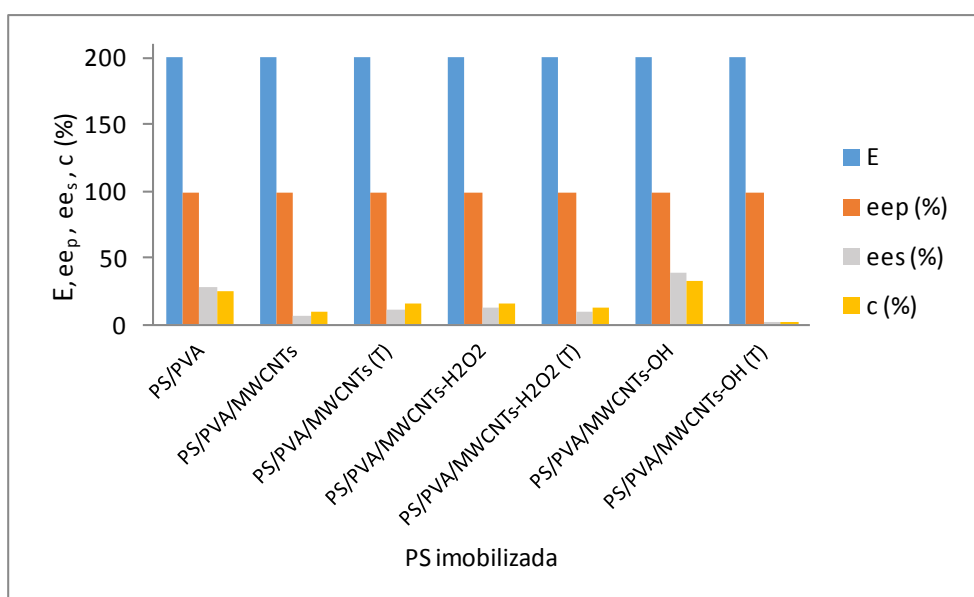
Analisando os dados da **Figura 36**, nota-se a influência da utilização de diferentes métodos de funcionalização para a imobilização da lipase PS, na obtenção do produto (*R*)-acetato de 1-feniletila, sendo que as conversões obtidas variaram de 3 a 31%. Esta variação na conversão não alterou a enantioseletividade da enzima, e todas as reações estudadas apresentaram valores de ee<sub>p</sub> >99% e valores de E >200, no entanto os valores de ee<sub>s</sub> foram baixos, sendo de 3,1-28%. As

maiores conversões observadas foram ao utilizar o sistema PS/PVA e PS/MWCNTs-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PVA, sendo que as conversões foram de 31% e 27%, respectivamente. A presença do surfactante *Tween 80* melhorou a porcentagem de conversão ao utilizar o sistema PS/PVA/MWCNTs-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sendo que as conversões aumentaram de 18 para 28%. Quando o sistema PS/PVA/MWCNTs-OH foi utilizado na presença do Tween80 as conversões ao respectivo éster diminuíram de 22% para 3%.

O sistema de imobilização para a lipase AY-30 não apresentaram resultados satisfatórios, uma vez que as taxas de conversão tenderam a zero. Isso pode estar relacionado com a não afinidade da enzima pelos materiais usados como suportes, impedindo-a de catalisar a reação de transesterificação.

Sharif e Cheong (2012) estudaram onze lipases de diferentes procedências na resolução do 2-fenilpropanol com propionato de vinila em MTBE (Éter t-metil butílico) e nesse estudo eles obtiveram altos valores de conversão, chegando a 62%, com moderados valores de ee<sub>p</sub> sendo de 59% em 48h de reação usando a lipase *Burkholderia cepacia*.

Outro estudo realizado neste trabalho foi a reutilização desses nanocompósitos/PS em um novo ciclo reacional. A **Figura 37** mostra a porcentagem de conversão em (*R*)-acetato de 1-feniletila em função do sistema PS/MWCNT/PVA.



**Figura 36:** Reutilização da lipase PS com PVA/MWCNTs – (funcionalizado ou não funcionalizado) na presença/ausência de *Tween 80* (T). A taxa de conversão e ee foram calculadas por GC-FID, enquanto que os valores de E foram obtidos através do Programa de seletividade disponível em

www.orgc.tugraz.at. Condições de análises: Injeção = 230 °C, Detector = 230 °C. Programação: isoterma de 100 °C, split 1:100, pressão do H<sub>2</sub> = 120 kPa.

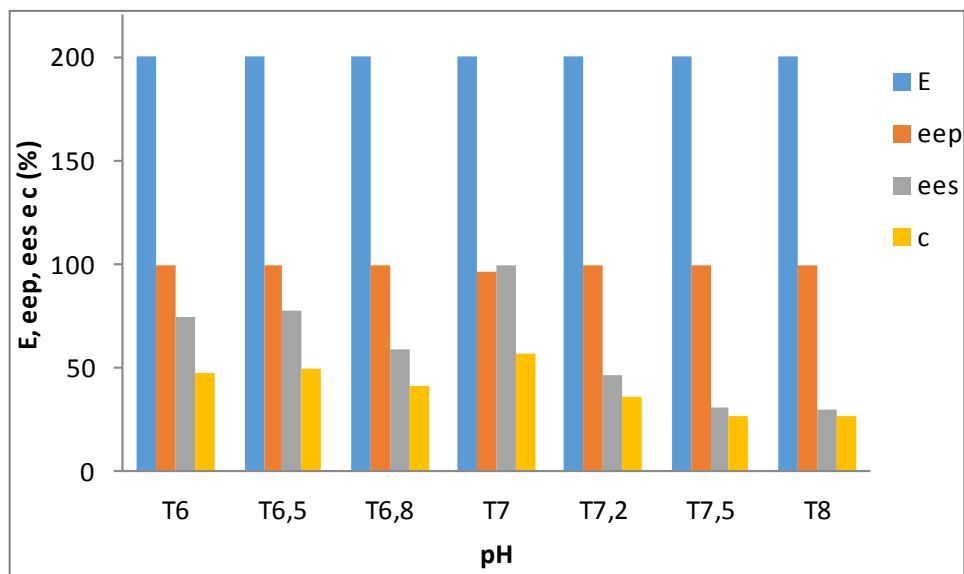
O estudo da reutilização da PS/MWCNT/PVA em 24 horas de reação mostrou que os valores de  $ee_p$ ,  $ee_s$  e  $E$  mantiveram-se constantes, sendo de  $ee_p > 99\%$ ,  $ee_s$  variando de 2-39% e  $E > 200$ , respectivamente, indicando alta seletividade do suporte/PS. As conversões em (*R*)-acetato de 1-feniletila variaram de 2 a 32%, sendo que a menor conversão foi de 2% para o nanocompósito PVA/MWCNTs-OH, referente à presença do surfactante *Tween 80*, que já não havia apresentado um bom resultado no primeiro ciclo reacional. No entanto, as conversões e a seletividade à (*R*)- acetato de 1-feniletila para os demais nanocompósitos testados apresentaram valores similares aos obtidos no primeiro ciclo, evidenciando que este sistema PS/MWCNTS/PVA pode ser utilizado em mais de um ciclo sem perda da atividade catalítica da enzima.

A partir desses resultados, buscou-se uma nova alternativa para facilitar a ação da lipase AY-30 no estudo da resolução do (*RS*)-1-feniletanol, bem como, tentar melhorar as conversões obtidas com a lipase PS e os valores de  $ee_s$ .

Inicialmente, estudou-se a influência do pH em ambas as lipases PS e AY-30, no sistema MWCNTs/lipase, posteriormente, avaliou a influência da funcionalização dos MWCNT/lipase na reação resolução do (*RS*)-feniletanol.

## 6.6 Efeito do pH

Nesse trabalho avaliou a influência do pH com o sistema MWCNT/ PS na resolução do (*RS*)-feniletanol, os resultados obtidos estão mostrados na **Figura 38**.



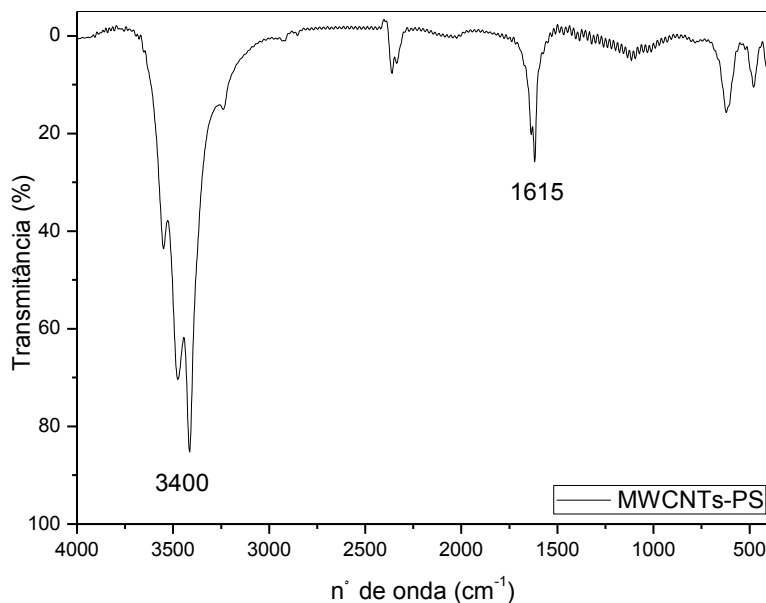
**Figura 37:** Efeito da variação do pH na imobilização dos MWCNTs/PS usados na resolução do (*R*)-1-feniletanol, em 24h de reação. A taxa de conversão e ee foram calculadas por GC-FID enquanto E foi obtido através do Programa de seletividade disponível em [www.orgc.tugraz.at](http://www.orgc.tugraz.at).

A partir da análise da **Figura 38**, observou-se que a variação do pH utilizado no processo de imobilização da PS/MWCNTs influenciou drasticamente na taxa de conversão do produto à (*R*) acetato de 1-feniletila. Quando utilizado o Tampão fosfato com pH entre 6-7, obteve-se as melhores conversões de 41,3-57%, com ee<sub>p</sub> variando de 95,8-99% e ee<sub>s</sub> de 59-99%. Logo acima do pH neutro, obteve-se menores taxas de conversão (26,4-35,4%), com ee<sub>p</sub>>99% e ee<sub>s</sub> de 29,6-45,9%.

Ao utilizar o tampão fosfato (pH=7), melhores resultados foram obtidos, sendo que o (*R*)-acetato de 1-feniletila foi obtido com conversões de 57%, ee<sub>p</sub> de 96%, ee<sub>s</sub> de >99%, resultando em valores de E > 200, em 24 horas de reação. Portanto, o tampão fosfato com pH 7 foi escolhido para avaliar a influência da imobilização da PS em MWCNTs funcionalizados.

Esse mesmo sistema de teste de pH foi realizado para lipase AY-30, na qual ela apresentou uma pequena taxa de conversão 3,9% em 24 horas de reação, com ee<sub>p</sub>>99 e E>200, demonstrando alta seletividade, porém o seu excesso enantiomérico do substrato resultou em ee<sub>s</sub>=1,96%.

Para visualizar a interação entre a lipase e os nanotubos de carbono, foi realizada uma análise da imobilização da PS em MWCNTs através da técnica de FT-IR, conforme mostra a **Figura 39**.



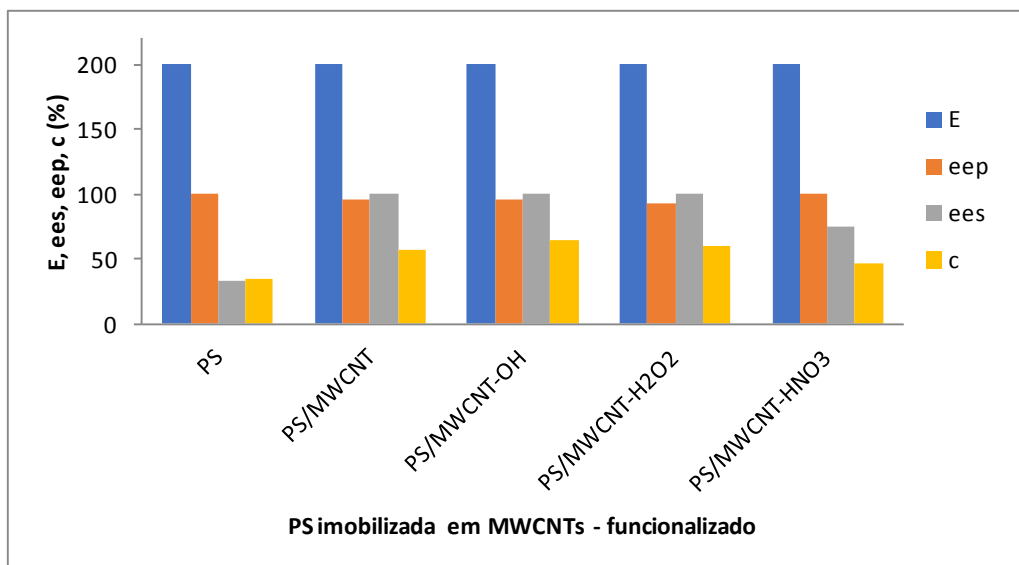
**Figura 38:** Espectro de FTIR do MWCNTs-PS, em KBr.

A **Figura 39** mostra os MWCNTs sem funcionalização ligada à PS. Nesse espectro observa-se banda com maior intensidade em  $3400\text{ cm}^{-1}$  referente às hidroxilas do MWCNTs e também a banda de N-H presente em proteínas. Observa-se também um aumento expressivo e deslocamento da banda em  $1665\text{ cm}^{-1}$  presente no MWCNT (**Fig. 30a**) para uma banda em  $1615\text{ cm}^{-1}$ , podendo indicar uma possível relação entre suporte-lipase.

### 6.7 Influência da Imobilização das lipases PS e Ay-30 em MWCNT

Os resultados obtidos com o sistema MWCNT funcionalizado/PS na resolução do (RS)-1-feniletanol com acetato de vinila em tampão fosfato pH 7 está apresentado na **Figura 40**.





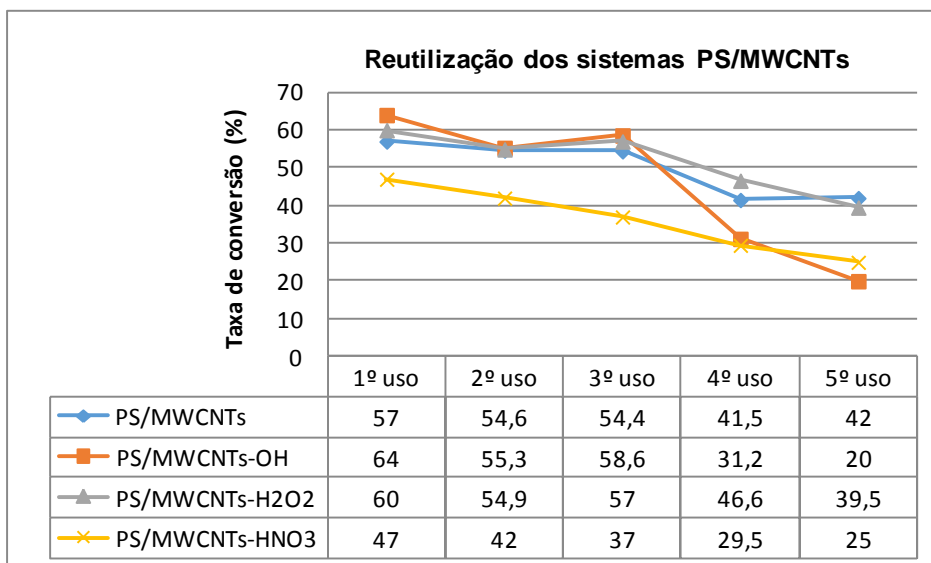
**Figura 39:** Efeito da funcionalização dos MWCNTs na imobilização da PS em 24h de reação, em pH 7. A taxa de conversão e ee foram calculadas por GC-FID, enquanto E foi obtido através do Programa de seletividade disponível em [www.orgc.tugraz.at](http://www.orgc.tugraz.at).

A utilização dos nanotubos de carbono funcionalizados na imobilização da PS na ausência do PVA, como mostrado na **Figura 40**, apresentaram maiores conversões quando comparado ao uso da lipase em sua forma livre e ou da sua forma imobilizada em nanocompósitos conforme discutido anteriormente.

Observa-se a partir da Figura 40 que ao utilizar a PS imobilizada em MWCNT as conversões ao R-éster foram de 47-64%, resultando em valores de  $ee_p$  entre 93 a 99,7% e  $ee_s$  entre 97 a 99%, gerando valores de  $E > 200$ , indicando que esta reação foi altamente seletiva ao utilizar a lipase PS imobilizada nesse suporte (MWCNT).

A partir da **Figura 40** observou-se que entre os suportes testados na imobilização da lipase PS, os MWCNTs e os MWCNTs-OH funcionalizado com hidróxido de potássio foram os que apresentaram melhores resultados, sendo que as conversões obtidas foram de 57 e 64%,  $ee_s > 99\%$ ,  $ee_p$  de 96% para ambos, respectivamente, gerando valores  $E > 200$ .

Após este estudo, os MWCNTs/PS foram filtrados e lavados em n-hexano e estocados a baixas temperaturas ( $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), para serem reutilizados em um novo ciclo reacional, conforme resultados apresentados na **Figura 41**.



**Figura 40:** Reutilização do sistema imobilizado (PS/WMCNTs) em 24h de reação.

A partir da **Figura 41**, observa-se que no primeiro ciclo catalítico ao utilizar os sistemas imobilizados (PS/MWCNTs), as conversões ao respectivo *R*-éster foram de 47-57%, sendo que a reação apresentou valores de  $ee_p$  de (93-99,7%),  $ee_s$  (74,6-99%) e  $E > 200$ . Após o segundo uso desses sistema observou-se uma pequena diminuição nas porcentagens de conversões quando comparados ao primeiro ciclo reacional, sendo observada conversões entre 42-54,6%, valores de  $ee_p > 99\%$  em todos os sistemas e  $ee_s$  variando de 70- 99% , resultando em valores de  $E > 200$ .

Após a terceira reutilização, as conversões foram diminuindo, porém, ainda apresentavam ótimas taxas de conversões, sendo na escala de 37 a 54%, com valores de  $ee_p > 99\%$  e  $ee_s$  de 61-95% e  $E > 200$ .

A partir da quarta reutilização o sistema MWCNTs/PS apresentou uma diminuição na porcentagem de conversão, sendo que os valores obtidos foram de 29,5 a 41,5%,  $ee_s$  de 33-70% e  $ee_p > 99\%$ , gerando valores de  $E > 200$ .

Na quinta reutilização a diminuição nas porcentagens de conversão, bem como, nos valores de  $ee_s$  foram mais pronunciadas, sendo que os valores de conversão foram de 25-42%. Entretanto, mesmo apresentando valores moderados na taxa de conversão ao (*R*)-acetato de 1-feniletila, o sistema apresentou valores de  $ee_s$  de 30-59,6% e  $ee_p > 99\%$ , com Enantiosseletividade maiores que 200, demonstrando que ainda é um processo catalítico eficiente e seletivo, e que este sistema PS/MWCNT pode ser utilizada em até cinco ciclos reacionais.

Dentre os sistemas utilizados, a PS/MWCNTs sem funcionalização foi o sistema que apresentou os melhores resultados, sendo que as taxas de conversão ao respectivo produto foram de 47 a 57%, e após quatro ciclos de reação, a taxa de conversão variou de 42-54,6%, com  $ee_p > 99\%$  e  $ee_s$  de 30-59,6%.

Os menores resultados foram observados ao utilizar o sistema MWCNTs funcionalizado com ácidos ( $HNO_3/H_2SO_4$ ), sendo que as conversões obtidas foram de 25-42%, com  $ee_s$  de 30-59,6% e  $ee_p > 99\%$ . Isso pode ser compreendido pelo fato que a funcionalização com ácidos seja um método mais rigoroso em comparação com os demais. Essa ação pode ter destruído a superfície dos MWCNTs (**Fig. 31**), e conseqüentemente ter diminuído a interação entre suporte-enzima.

Segundo Shirazi (2011), observou nos seus estudos, que o tratamento ácido na funcionalização dos MWCNTs pode destruir a estrutura das matrizes existente nesses mesmos, tornando suas matrizes menores após o tratamento e conseqüentemente, mais quebradiços. O autor cita que a condutividade térmica depende do seu comprimento, e devido a quebra que ocorre com a presença do ácido forte ( $H_2SO_4$ ), esse comprimento é reduzido. Como resultado, o tratamento com ácido faz com que os MWCNTs sejam encurtados, modificando assim a sua estrutura, afetando significativamente as suas propriedades.

Observa-se que na reutilização com o sistema PS/MWCNTs funcionalizado em peróxido de hidrogênio e hidróxido de potássio as conversões ao produto (*R*)-acetato de 1-feniletila foram maiores no 3º ciclo em comparação ao 2º ciclo. Este resultado imprevisto, pode ser explicado pela forma de lavagem inadequada dos sistemas, o que leva a existência de produtos ou reagentes das reações anteriores, que não foram totalmente removidos.

Dessa forma, os resultados obtidos são coerentes e satisfatórios, sendo possível reutilizar o sistema de imobilização PS/MWCNTs em vários ciclos de reação. Entretanto, para a lipase AY-30 não foi observada conversões significativas ao respectivo éster através dos métodos descritos acima. Esse fato pode estar relacionado a não seletividade dessa enzima para esse tipo de reação.

Ledra (2012), estudou diversas lipases livres na reação de transesterificação do (*RS*)-3-nitro-feniletanol e dentre essas lipases foi utilizado a *C. cylindracea* (LAY) que apresentou menores valores de conversão. E quando o autor submeteu à enzima em suportes de blendas de amido/PEO as conversões foram muito baixas e não detectada.

De forma geral, observou-se que a procedência da lipase, bem como o suporte utilizado, influenciaram na conversão ao (*R*)-acetato de 1-feniletila. A lipase PS estudada nesse trabalho, apresentou uma relação direta da sua atividade catalítica ao substrato, porém, com a lipase AY-30 não foi possível detectar essa relação enzima-substrato.

As variações na taxa de conversão entre diferentes lipases pode estar diretamente relacionado ao formato da cavidade que cada uma pode possuir, o que permite um encaixe melhor ou não de um substrato no seu sítio ativo (PLEISS, 1998)

## CONCLUSÃO

- A síntese do (RS)-1-feniletanol e do (RS) acetato de 1-feniletila via química foram utilizados como padrões para determinar o tempo de retenção, bem como, o (S)-1-feniletanol, obtido via catálise enzimática, na qual utilizou um microorganismo presente na cenoura (*Daucus carota*) e (S)-acetato de 1-feniletila, estes padrões foram utilizados para acompanhar e quantificar as reações catalisadas pelas lipases.
- Os tratamentos realizados com os MWCNTs comercial apresentaram uma maior interação com enzima, uma vez que foram inseridos grupos funcionais em suas paredes ( $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ , KOH em etanol,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Porém, a funcionalização com ácidos obteve-se valores menores na conversão quando comparado com os demais métodos, isso se deve à possível destruição das paredes do MWCNTs perante a ação ácida do  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ .
- O estudo com as diferentes lipases livres *Burkholderia cepacia* (PS), *Pseudomonas fluorescens* (AK), *Candida cylindracea* (AY-30), *Aspergillus niger* (*A.niger*), *Rhizopus oligosporus* (*R. Oligosporus*) e *Lipozyme 435*) foi necessário para saber o comportamento de cada lipase na resolução do (RS)-1-feniletanol. A partir desses resultados, foram selecionadas as lipases PS e AY-30 para dar continuidade ao trabalho, uma vez que apresentaram menores conversões ao respectivo R-éster, sendo de 35 e 6%, respectivamente.
- Na imobilização da lipases PS e AY-30 em filmes de PVA/MWCNTs com a presença ou não do surfactante Tween80, as maiores conversões ao produto foram obtidas em 24h de reação. Quando utilizando como suporte somente o PVA, a conversão foi de 31%, com  $ee_p > 99\%$  e  $ees = 28\%$  e para o sistema PVA com MWCNTs funcionalizado em  $\text{H}_2\text{O}_2$  (27%), ambos apresentaram  $ee_p > 99$  e  $E > 200$ . Porém, para a AY-30 não houve melhora nas conversões mesmo utilizando os nanocompósitos como suportes.

- Na reutilização dos dos nanocompósitos (PS/PVA/MWCNTs) após 24 horas de reação apresentaram valores de  $E > 200$  e  $ee_p > 99\%$ , indicando alta seletividade do suporte/PS reutilizada, com conversões que variaram de (2 a 32%).
- Ao estudar-se a influência do pH na imobilização da lipase PS em MWCNTs, observou-se que lipase aumenta sua atividade catalítica em solução tampão fosfato com pH entre 7, com conversões de 57%,  $ee_p = 96\%$  e  $ee_s > 99\%$ , o qual representa uma valor de  $E > 200$  em 24 horas de reação.
- O s sistemas PS/MWCNTs e PS/MWCNTs-OH foram os que apresentaram melhores resultados com relação ao excesso  $eee_p = 96\%$  e  $ee_s > 99$ , sendo os valores obtidos de conversão foi de 57-64%, respectivamente, com  $E > 200$ .
- Após cinco ciclos reacionais com os mesmos suportes, notou-se que a PS/MWCNTs sem funcionalização foi o sistema que apresentou os melhores resultados, com conversão de 42%, com  $ee_p > 99\%$  e  $ee_s$  de 30%, sendo  $E > 200$ . O menor resultado foi atribuído ao sistema MWCNTs-HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, com conversão de 25%, com  $ee_s = 30\%$  e  $ee_p > 99\%$ .

## PERSPECTIVAS

- Caracterizar os MWCNTs comercial e funcionalizados nesse trabalho, utilizando técnicas de microscopia de transmissão eletrônica (MET).
- Avaliar a influência de solventes orgânicos puros (n-heptano, clorofórmio, tolueno) ou em misturas com líquidos iônicos na resolução do (RS)-1-feniletanol.
- Avaliar o efeito da temperatura, massa da lipase e concentração do doador acila na resolução do (RS)-1-feniletanol, bem como, testar outros doadores acila.
- Funcionalizar os MWCNTs em diferentes métodos, como por exemplo APTES, EDC-NHS e utilizar esse sistemas para imobilização de diferentes lipases comerciais e nativas.
- Realizar a resolução de outros álcoois aromáticos, bem como, incluir grupos doadores e retirados de elétrons no feniletanol.
- Quantificar o quanto de lipase se aderiu ao suporte.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERS, A. P. F., MELCHIADES, R., MACHADO, J. B., BISCHI, A. O. Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raio x. **Cerâmicas**, v. 48, n. 305, p. 34-37, 2002.

ARANHA, Isabele B.; LUCAS, Elizabete F. Poli (Álcool Vinílico) Modificado com Cadeias Hidrocarbônicas: Avaliação do Balanço Hidrófilo/Lipófilo. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 4, p. 174-181, 2001.

BHUSHAN, Indu; PARSHAD, Rajinder; QAZI, Gulam N.; INGAVLE, Ganesh; RAJAN, C. R.; PONRATHNAM, Surendera; GUPTA, Vijay K. Lipase enzyme immobilization on synthetic beaded macroporous copolymers for kinetic resolution of chiral drugs intermediates. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. 321-330, 2008.

CAO, Anyuan; XU, Cailu; LIANG, Ji; WU, Dehai; WEI, Beigqing. X-ray doffraction characterization on the alignment degree of carbon nanotubes. **Chemical Physics Letters**. v. 344, p. 13-17, 2001.

CAO, Lingiu; LANGEN, Luuk v.; SHELDON, Roger A. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 387-394, 2003.

CARDOSO, Carmen L.; MORAES, Marcela C.; CASS, Quezia B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**, v. 32, p. 175-187, 2009.

CHO, Byung T.; KANG, Sang K.; KIM, Min S.; RYU, Soo R.; AN, Duk K. Solvent-free reduction of aldehydes and ketones using solid acid-activated sodium borohydride. **Tetrahedron**, v. 62, n. 34, p. 8164-8168, 2006.

COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Unicamp, 2006.

DALLA-VECCHIA, Roberto; NASCIMENTO, Maria d. G.; SOLDI, Valdir. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.



DEDAVID, Berenice A.; GOMES, Carmem I.; MACHADO, Giovanna. **Microscopia eletrônica de varredura: Aplicações e preparação de amostras**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

DONALD, P. L. **Introdução à Espectroscopia**. 4 ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

ERDEMIR, Serkan; YILMAZ, Mustafa. Synthesis of calix[n]arene-based silica polymers for lipase immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 58, n. 1–4, p. 29-35, 2009.

FABER, Kurt. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 3th. New York: Springer, 2011.

FENG, Wei; Ji, Peijun. Enzymes immobilized on carbon nanotubes. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 889-895, 2011.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, Maria; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, Diego. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1808-1825, 2013.

FERREIRA, Vitor F.; ROCHA, David R. d.; SILVA, Fernando d. C. d. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, v. 32, p. 623-638, 2009.

GAO, Bei; XU, Tao; LIN, Jinping; ZHANG, Luija; SU, Erzhen; JIANG, Zhengbing; WEI, Dongzhi. Improving the catalytic activity of lipase LipK107 from *Proteus sp.* by site-directed mutagenesis in the lid domain based on computer simulation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 3–4, p. 286-291, 2011.

GHANEM, Ashraf. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. **Tetrahedron**, v. 63, n. 8, p. 1721-1754, 2007.

GHANEM, Ashraf; ABOUL-ENEIN, Mohammed N.; EI-AZZOUNY, Aida; EI-BEHAIR Mohammed F. Lipase-mediated enantioselective kinetic resolution of racemic acidic drugs in non-standard organic solvents: Direct chiral liquid chromatography monitoring and accurate determination of the enantiomeric excesses. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 7, p. 1063-1074, 2010.

GOTOR-FERNÁNDEZ, Vicente; BRIEVA, Rosario; GOTOR, Vicente. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, n. 3–4, p. 111-120, 2006.

HAEFFNER, Fredrik.; Norin, Torbjom; Hult, Karl. Molecular Modeling of the Enantioselectivity in Lipase-Catalyzed Transesterification Reactions. **Biophysical Journal**, v. 74, n. 3, p. 1251-1262, 1998.

IUBMB.

**Enzyme**

**Nomenclature**. <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/1/1/3.html>>

.Acesso. 18.jun.2015.

IVANOV, Alexander E.; SCHNEIDER, Manfred P. Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 3, n. 6, p. 303-309, 1997.

KAMIYA, N; KASAGI, H; INOUE, M; KUSUNOKI, K; GOTO, M. Enantioselective recognition mechanism of secondary alcohol by surfactant-coated lipases in nonaqueous media. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 65, n. 2, p. 227-232, 1999.

KAZLAUSKAS Romas J.; WEBER, Hedda K. Improving hidrolases for organic synthesis. **Current opinion in chemical biology**, v. 2, n. 1, p. 121-126, 1998.

KIM, Young-S.; CHO, Joong-H.; ANSARI, S. G.; KIM, Hyung-II.; DAR, M.A.; SEO, Hyung- K.; KIM, Gil-S.; LEE, Dai-S.; KHANG, Gilson; SHIN, Hyung-S. Immobilization of avidin on the functionalized carbon nanotubes. **Synthetic Metals**, v. 156, n. 14–15, p. 938-943, 2006.

KUMAR, R.; SINGH, R.; KAUR, J. Characterization and molecular modelling of an engineered organic solvent tolerant, thermostable lipase with enhanced enzyme activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 97, n. 0, p. 243-251, 2013.

LEDRA, Carlos G. A. **Resolução de derivados do 1-feniletanol com lipases imobilizadas em materiais poliméricos**. 2012. 137 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LIMA, Urgel de A.; BORZANI, Walter; AQUARONE, Eugênio; SCHMIDELL, Willibaldo. **Biotecnologia Industrial**. v. 1. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

MATEO, Cesar; PALOMO, Jose M.; FERNANDEZ-LORENTE, Gloria; GUIBAN, Jose M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.

MEHL, Hiany. **Nanocompósitos formados por Nanotubos de Carbono, Nanopartículas de Prata e Polianilina: Síntese e Caracterização**. 2011. 123 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia – Pipe) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

MENDES, Adriano A.; OLIVEIRA, Pedro C. de; CASTRO, Heizir F. de; GIORDANO, Raquel de L. Aplicação de quitosana como suporte para imobilização de enzima de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011..

MESSIAS, Josana M.; COSTA, Bruna Z. da; LIMA, Valéria M. G. de; GIESE, Ellen C.; DEKKER, Robert F. H.; BARBOSA, Aneli de M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.

MIRANDA, Amanda S.; MIRANDA, Leandro S. M.; SOUZA, Rodrigo O. M. A. Lipases: Valuable catalysts for dynamic kinetic resolutions. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 372-393, 2015.

MOHAMAD, Nur R.; BUANG, Nor A.; MAHAL, Naji A.; LOK, Yen Y.; HUVOP, Fahrul; ABOUL-ENEIN, Hassan Y.; WAHAB, Roswanira A. A facile enzymatic synthesis of geranyl propionate by physically adsorbed *Candida rugosa* lipase onto multi-walled carbon nanotubes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 72, n. 0, p. 49-55, 2015.

PAQUES, Fernanda W.; Macedo, Gabriela A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PILISSÃO, C. **Aminólise enantiosseletiva do (R,S)-mandelato de metila e síntese do acetato de geranoíla mediada por lipases**. 2006. 88f. Dissertação (mestrado em química)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PLEISS, J.; FISCHER, M.; SCHMID, R. D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, p. 67-80, 1998.

PORTE, Alexandre; PORTE, Luciana H. M.; OLIVEIRA, Luciana d. M. Cromatografia gasosa quiral na resolução de enantiômeros envolvidos em flavours de frutas. **Química Nova**, v. 37, p. 1670-1679, 2014.

RCSB-PDB. **Enzyme Classification Tree Search for 3.1.1.3: Triacylglycerol lipase.** Disponível em <<http://www.rcsb.org/pdb/results/results.do?qrid=A4606AB1&tabtoshow=Current>>. Acesso. 18 de jun.2015.

RONG, J. T; PASTORIN, G. The influence of carbon nanotubes on enzyme activity and structure: investigation of different immobilization procedures through enzyme kinetics and circular dichroism studies. **Nanotechnology**, v. 20, n. 25, p. 255102, 2009.

SARDA, L.; DESNUELLE, P. Action de lipase pancreatique sur les esters em emulsion. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 30, n. 3, p. 513-521, 1958.

SEBRÃO, Damianni; SILVA, Vanessa D.; NASCIMENTO, Maria da G.; MOREIRA, Marcelo A. Imobilização de lipases em filme de caseinato de sódio/glicerol: aplicação na síntese de ésteres. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1182, 2007.

SHARIF A. M. S; CHEONG, C. S. Lipase catalyzed kinetic resolution of rac-2-phenylpropan-1-ol derivatives as building block for phenolic sesquiterpenes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 74, p. 199-203, 2012.

SHIRAZI, Yaser; TOFIGHY, Maryam A.; MOHAMMADI, Torai; PAK, Afshin. Effects of different carbon precursors on synthesis of multiwall carbon nanotubes: Purification and Functionalization. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 16, p. 7359-7367, 2011.

SIH, C. J.; Wu, S.-H. Resolution of Enantiomers via Biocatalysis. In: (Ed.). **Topics in Stereochemistry**: John Wiley & Sons, p.63-125, 1989.

SILVA, Edson F.; RAMOS, Maria da C. K. V.; AQUINO NETO, Francisco R. Utilização de derivados de ciclodextrinas como fase estacionária quiral em cromatografia gasosa de alta resolução. **Quim. Nova**, v. 19, p. 473-479, 1996.

SILVERSTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X.; KIEMLE, David J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

SINGH, Raushan K.; TIWARI, Manish K.; SINGH, Ranjitha; LEE, Jung-K. From protein engineering to immobilization: promising strategies for the upgrade of industrial enzymes. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 1, p. 1232-1277, 2013.

SKOOG, A. D.; HOLLER, F. J.; CROUCH, R. S. **Fundamentos de química analítica**. Tradução da 8 ed. norte americana. Thonsom Learning, 2006.

SOLOMONS, T. W. G. **Química Orgânica**. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 1996.

STEPANKOVA, Verinika; BIDMANOVA, Sarka; KOUDELAKOVA, Tana; PROKOP, Zbynek; DAMBORSKY, Jiri. Strategies for Stabilization of Enzymes in Organic Solvents. **ACS Catalysis**, v. 3, n. 12, p. 2823-2836, 2013.

STOBINSKI, L.; LESIAK, B.; KOVER, L.; TOTH, J.; BINIAK, S.; TRYKOWSKI, G. Multiwall carbon nanotubes purification and oxidation by nitric acid studied by the FTIR and electron spectroscopy methods. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 501, n. 1, p. 77-84, 2010.

TORTORA, G. R. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TRAN, Daniel N.; BALKUS, Kenneth. J. Perspective of Recent Progress in Immobilization of Enzymes. **ACS Catalysis**, v. 1, n. 8, p. 956-968, 2011.

VERMELHO, A. B. et al. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência Ltda, 2008. **Enzimas em biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência Ltda, 2008. Cap. 5, p. 95-122. Cap. 6, p. 123-151. Cap. 16, p. 369-385 )

VIEIRA, Danielle C. **Imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação**. 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

XU, Tao; GAO, Bei; ZHANG, Lujia; LIN, Jingpin; WANG, Xuedong; WEI, Dongzhi. Template-based modeling of a psychrophilic lipase: Conformational changes, novel structural features and its application in predicting the enantioselectivity of lipase catalyzed transesterification of secondary alcohols. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 12, p. 2183-2190, 2010.

ZARBIN, Aldo J. G. QUÍMICA DE (NANO)MATERIAIS. **Química nova**, v. 30, n. 6, p. 1469-1479, 2007.

ZHAO, Xuebing; QI, Feng; YUAN, Chongli; DU, Wei; LIU, Dehua. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 182-197, 2015.

YADAV, J. S.; REDDY, B. V. S.; SREELAKSHMI, C.; RAO, A. B. Efficientenantioselective reduction of ketones with Daucus carota root. **Journal of Organic Chemistry**, v. 67, p. 3900-3903, 2002.

YU, G., WU, W., ZHAO, Q., WEI, X.; LU, Q. Efficient immobilization of acetylcholinesterase onto amino functionalized carbon nanotubes for the fabrication of high sensitive organophosphorus pesticides biosensors. **Biosens Bioelectron**, v. 68, p. 288-294, 2015.