

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Química

**Imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia*
em nanopartículas magnéticas e sua aplicação em
resolução cinética de alcoóis secundários quirais**

Lya Pantoja Rebelo

Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade

São Paulo – SP

Data do Depósito do Trabalho na SPG: 03/04/2009

(Três de abril de 2009)

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Lya Pantoja Rebelo

**Imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* em
nanopartículas magnéticas e sua aplicação em
resolução cinética de alcoóis secundários quirais**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de **Mestre** em
Química (Química Orgânica)*

Orientador: Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade

São Paulo – SP

2009

Lya Pantoja Rebelo

**Imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* em
nanopartículas magnéticas e sua aplicação em
resolução cinética de alcoóis secundários quirais**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Mestre em
Química (Química Orgânica)*

Aprovado em: _____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedicatória I

Dedico este trabalho, aos meus queridos e amados pais, Célia e Eudo. Dedico ao primo Jorge Ivan Rebelo Porto, a minha tia Eunice Rebelo Porto, tio Jairo *in memoriam*, minha prima Junia Carolina Rebelo Porto e meu primo Jadson Luís Rebelo Porto.

Dedicatória II

Dedico ainda este trabalho, ao companheiro,
amigo e namorado, Alexandre Monteiro Vilela.

Agradecimentos

Na vida são muitas as pessoas que cruzam o caminho e de alguma forma nos ajudam, incentivam, criticam e nos fazem evoluir. Desejo aqui reconhecer meu agradecimento as pessoas que são inesquecíveis e que me ajudaram sem perceber que o faziam.

Agradeço ao papai do céu, Deus, Jesus, todos estes que recorri nos momentos de sufoco e de alegria também! Eu os chamei por diversas vezes no decorrer deste trabalho. Senhor, muito obrigada!

Agradeço imensamente a 3 pessoas que fizeram este mestrado acontecer: Alexandre Monteiro Vilela, Giovana Cássia de Freitas e Viviane do Nascimento, sem a ajuda de vocês nada disso teria se tornado realidade! Vocês foram insuperáveis!

Aos meus maravilhosos pais, Célia e Eudo com apenas o segundo grau completo, fizeram o possível e o impossível pela minha educação. Muito obrigada pela confiança em mim depositada e por me ensinarem que o caminho do sucesso começa em uma boa educação. Minha gratidão será eterna! Agradeço ainda aos meus queridos irmãos: Yul, Lyu e Ceila.

Agradeço a familiares que foram essenciais para a realização deste projeto, agradeço imensamente a Jorge Ivan Rebelo Porto, Eunice Porto, Junia Carolina Rebelo Porto e Jadson Luís Rebelo Porto, pelo apoio emocional e financeiro durante toda a minha jornada no estado de São Paulo. Agradeço ainda ao meu lindo avô Moisés Rebelo e Sula *in memoriam*. E aos meu avós Davi e minha avó Maria *in memoriam*.

Agradeço aos meus amigos inesquecíveis da graduação em São Carlos, na UFSCar, especialmente Juliano Roldan Fonseca, Ana Eliza Zeraik, Paola Mariana Fernandes Forteza de Souza, Kenia Lourenço Vanzolini, Graziella Lelis Dias, Danieli Freitas, Maria Angélica do Nascimento, Pedro Aranha, Kátia Halter Nascimento, Taícia Fill e Maria Isabel Andrekowski

Fioravanti. Foram momentos divertidíssimos que passei com essas pessoas, alguns inacreditáveis!

Agradeço pelos valiosos conhecimentos transmitidos em Química Orgânica pelo meu querido professor de iniciação científica Timothy John Brocksom e pelos meus amigos do Laboratório de Química Bio-Orgânica da UFSCar: Fernanda Gadini Finelli, Ygor Vieira, Carolina Donatoni, Daniel Frederico, Viviane do Nascimento e a profa. Úrsula Brocksom.

Agradeço ao professor Leandro Helgueira de Andrade pela oportunidade, pela orientação e pelas críticas durante este mestrado. Agradeço ainda pelos conselhos de saúde e pelas reuniões quinzenais individuais e pelas reuniões semanais do grupo, com certeza isto foi essencial no desenvolvimento do projeto.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Química Fina e Biocatálise. Em especial: Leandro Piovan, Thiago Barcelos, Thaís Garcia, Mônica Pasquini e sua mãe Ana Rita, Alexandre Vieira, Camila Rodrigues, Edna, Felipe (Dylon) e Priscila Milani.

Agradeço a Caterina Gruenwaldt pela sua imensa ajuda e apoio no fabuloso mundo nano. Agradeço ainda aos conselhos e apoio do prof. Dr. Henrique Eisi Toma.

Agradeço aos colegas do laboratório de selênio e telúrio: Tico, Fabiano e Alexandre pela ajuda e conversas durante o mestrado.

Agradeço do fundo do meu coração, ao meu amado e idolatrado namorado Alexandre Monteiro Vilela. Agradeço pela paciência, respeito, pelos conhecimentos transmitidos sobre engenharia e computação. Durante o mestrado, ele foi motorista, cozinheiro, namorado, amigo, conselheiro, revisor de texto, despertador, passou o sermão da montanha. Além disso, lavou vidraria, admirou o CG com injetor automático, fez perguntas inimagináveis sobre a química do projeto. Foi essencial, insubstituível, insuperável! Alexandre Monteiro Vilela te admiro e amo muito! Minha gratidão não cabe neste papel!

Agradeço ao prof. Massuo e ao prof. Cassius por terem participado da banca de qualificação.

Agradeço aos amigos Carlos Eduardo Picolli (Thuds), Sebastian Kernbaun, Eidi Nishiwaki, Daniel Vilela e as amigas Isabel Vilela, Patrícia Vilela e Manú Vilela pelo ouvido atento as minhas necessidades.

Agradeço ao Emiliano, Milton e em especial ao paraense Marcelo da secretaria de pós-graduação.

Agradeço a CNPQ pela bolsa concedida e ao Instituto de Química.

Epígrafe

“Os seres humanos me assombram.”

A menina que roubava livros, Markus Zusak

Resumo

Rebelo, L.P. **Imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* em nanopartículas magnéticas e sua aplicação em resolução cinética de alcoóis secundários quirais**. 2009. 155 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Esta dissertação apresenta um estudo de diferentes metodologias de imobilização (fisissorção, quimissorção com carboxibenzaldeído e quimissorção com glutaraldeído) da lipase de *Burkholderia cepacia* em nanopartículas magnéticas e sua aplicação na resolução cinética de alcoóis secundários racêmicos. O método de imobilização por fisissorção resultou na imobilização de 0,21 mg de proteína em 20 mg de nanopartículas magnéticas. Para a mesma quantidade de nanopartículas magnéticas, o método de quimissorção com carboxibenzaldeído imobilizou 0,26 mg de proteína contra 0,28 mg de proteína pelo método de quimissorção com glutaraldeído, a melhor relação encontrada neste trabalho. A atividade enzimática foi avaliada na resolução cinética de alcoóis secundários racêmicos [(*RS*)-2-bromo-1-(fenil)etanol, (*RS*)-2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanol, (*RS*)-1-(4-nitrofenil)etanol e (*RS*)-1-(fenil)-1,2-etanodiol] via reação de transesterificação enantiosseletiva. O efeito de diferentes parâmetros reacionais para a resolução cinética foi estudado, como agente acilante, quantidade de substrato, solvente, quantidade de nanopartículas magnéticas (suporte), velocidade de agitação, tempo e temperatura reacionais. Os melhores parâmetros encontrados foram acetato de vinila como agente acilante, tolueno como solvente e sob agitação de 800 rpm. Observou-se que após 30 dias de estocagem da lipase imobilizada por fisissorção sua atividade foi mantida. Além disso, estudou-se a reciclagem da enzima imobilizada, durante a resolução cinética. A melhor temperatura e tempo reacional foram determinados para cada método de imobilização. A quimissorção com glutaraldeído foi o melhor método de imobilização para a reciclagem da enzima, pois durante 8 ciclos de resolução cinética a conversão (50 %) e a enantiosseletividade (>99 %) foram mantidas. Com base nesses resultados, pode-se concluir que o processo de imobilização permite um aumento da estabilidade da enzima quando comparada com a enzima livre, permitindo sua reutilização por vários ciclos reacionais.

Palavras-chave: Biocatálise, imobilização de lipases, nanopartículas magnéticas, resolução cinética enzimática.

Abstract

Rebelo, L.P. **Immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase on magnetic nanoparticles and its application in enzymatic kinetic resolution of chiral secondary alcohols.** 2009. 155 p. Dissertation (Masters degree). Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

This dissertation describes studies about different immobilization methodologies (physisorption, chemisorption with carboxibenzaldehyde and chemisorption with glutaraldehyde) of the *Burkholderia cepacia* lipase on magnetic nanoparticles and its application in the enzymatic kinetic resolution of chiral secondary alcohols. The physisorption method immobilized 0.21 mg of protein per 20 mg of magnetic nanoparticles. Using the same amount of magnetic nanoparticles, the chemisorption method with carboxibenzaldehyde immobilized 0.26 mg of protein against 0.28 mg for the chemisorption with glutaraldehyde, the best result found in this work. The enzymatic activity was determined in the enzymatic kinetic resolution of chiral secondary alcohols [(*RS*)-2-bromo-1-(phenyl)ethanol, (*RS*)-2-bromo-1-(4-nitrophenyl)ethanol, (*RS*)-1-(4-nitrophenyl)ethanol and (*RS*)-1-(phenyl)-1,2-ethanodiol] via enantioselective transesterification reaction. The effect of several reaction parameters for the kinetic resolution was studied, such as acetyl donor, substrate concentration, solvent, amount of magnetic nanoparticles (support), agitation speed, reaction time and temperature. The best results were obtained using vinyl acetate as acetyl donor, toluene as solvent, and 800 rpm as agitation speed. Regarding the physisorption method, after 30 days as storing time the enzymatic activity remained the same. Besides, the reusability of immobilized lipase was evaluated. The best temperature and reaction time in the kinetic resolution were determined for each immobilization method. The chemisorption with glutaraldehyde was the best immobilization method for the enzyme reusability, because even after 8 cycles of the kinetic reaction, the conversion (50 %) and enantioselectivity (>99 %) remained the same. Based on these results, it is possible to conclude that the immobilization process increased the enzyme stability when compared to the free enzyme, allowing its reusability for many reaction cycles.

Keywords: Biocatalysis, immobilization of lipases, magnetic nanoparticles, enzymatic kinetic resolution.

Lista de Abreviaturas e Siglas

IV: Infravermelho

UV-vis: Ultravioleta-visível

RMN ¹H: Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN ¹³C: Ressonância magnética nuclear de carbono 13

CG: Cromatografia gasosa

CG-EM: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CCD: Cromatografia em camada delgada

J: Constante de acoplamento (Hz)

δ : Deslocamento químico (ppm)

mult.: Multiplicidade

s: Singleto

d: Dubleto

dd: Duplo dubleto

m: Multiplete

TMS: Tetrametilsilano

THF: Tetrahidrofurano

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

$[\alpha]^D$: Rotação específica

°C: Temperatura em graus Celsius

c: Conversão

e.e.: Excesso enantiomérico

E: Razão enantiomérica é definida como a razão das constantes específicas (K_{cat} / K_m) dos enantiômeros

eV: Elétron –volt

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

AFM: Microscopia de força atômica

NapMg: Nanopartículas magnéticas

Rac: Racemato

RCE: Resolução cinética enzimática

Lista de Ilustrações

Figura 1: Comportamento catalítico de lipases e esterases.	4
Figura 2: Estrutura tridimensional da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	6
Figura 3: (a) estabilização de nanopartículas por carga, (b) estabilização de nanopartículas por impedimento estérico.....	18
Figura 4: Poliedro de Ferro na célula unitária de magnetita (azul é ocupado por Fe^{3+} , verde é ocupado por Fe^{2+} , Fe^{3+} e oxigênio em vermelho).....	19
Figura 5: (a) Microestrutura típica de amostra preparada pelo método de co-precipitação (magnetita nanoparticulada) Copiada de (Tartaj <i>et al.</i> , 2005).....	23
Figura 6: (b) Microestrutura típica de amostra preparada pelo método de decomposição térmica. Copiada de (Tartaj <i>et al.</i> , 2005).....	24
Figura 7: Microestrutura típica de amostra preparada pelo método de microemulsão. Copiada de (Tartaj <i>et al.</i> , 2005)	26
Figura 8: Influência do tamanho das partículas no comportamento do vetor campo magnético. Na partícula de 20 nm há apenas um único domínio magnético, enquanto na de 200nm existem vários domínios magnéticos.....	33
Figura 9: Poliedro de Ferro na célula unitária de magnetita (azul é ocupado por Fe^{3+} , verde é ocupado por Fe^{2+} , Fe^{3+} e oxigênio em vermelho).....	42
Figura 10: Espectro de infravermelho das nanopartículas de magnetita não silanizadas (preto) e silanizadas (vermelho).	43
Figura 11: Nanopartículas obtidas com diâmetro médio de 12 nm. Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	44
Figura 12: Interação entre a nanopartícula magnética funcionalizada com o grupo amino e a lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> por fisissorção.....	49

Figura 13: Cromatograma obtido para resolução cinética enzimática do (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol através da reação de transesterificação enantiosseletiva utilizando a enzima imobilizada por fisissorção.....	60
Figura 14: Microscopia de força atômica utilizando imagem de topografia do complexo nanopartícula-magnética funcionalizada com carboxibenzaldeído e enzima.....	72
Figura 15: Microscopia de força atômica utilizando imagem de contraste de fase do complexo nanopartícula-magnética funcionalizada com carboxibenzaldeído e enzima.....	73
Figura 16: Microscopia de força atômica utilizando ponta magnética do complexo nanopartícula-magnética funcionalizada com carboxibenzaldeído e enzima.....	74
Figura 17: Microscopia de força atômica e magnética para o complexo nanopartícula magnética funcionalizada com glutaraldeído e a enzima imobilizada.	80
Figura 18: Comparação entre o cromatograma obtido em CG da reação de transesterificação catalisada pela lipase de <i>B. cepacia</i> imobilizada em nanopartículas magnéticas e a enzima livre	89
Figura 19: Comparação entre o cromatograma obtido em CG da reação de transesterificação catalisada pela lipase de <i>B. cepacia</i> imobilizada em nanopartículas magnéticas e a enzima livre.....	90
Figura 20: Espectro de ¹ H RMN (200 MHz, CDCl ₃) referente a (3a)	156
Figura 21: Espectro de ¹³ C RMN (50 MHz, CDCl ₃) referente a (3a)	157
Figura 22: Espectro de CG/MS referente a (3a)	158
Figura 23: Espectro de IV referente a (3a)	158
Figura 24: Espectro de ¹ H RMN (200 MHz, CDCl ₃) referente a (4a)	159
Figura 25: Espectro de ¹ H RMN (200 MHz, CDCl ₃) referente a (5a)	160
Figura 26: Espectro de ¹³ C RMN (50 MHz, CDCl ₃) referente a (5a)	161
Figura 27: Espectro de CG/MS referente a (5a)	162

Figura 28: Espectro de IV referente a (5a)	162
Figura 29: Espectro de ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) referente a (6a)	163
Figura 30: Espectro de ^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3) referente a (6a)	164
Figura 31: Espectro de CG/MS referente a (6a)	165
Figura 32: Espectro de IV referente a (6a)	165
Figura 33: Espectro de ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) referente a (7a)	166
Figura 34: Espectro de ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) referente a (8a)	167
Figura 35: Espectro de ^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3) referente a (8a)	168
Figura 36: Espectro de CG/MS referente a (8a)	169
Figura 37: Espectro de IV referente a (8a)	169
Figura 38: Espectro de ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) referente a (2b)	170
Figura 39: Espectro de ^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3) referente a (2b)	171
Figura 40: Espectro de CG/MS referente a (2b)	172
Figura 41: Espectro de IV referente a (2b)	172
Figura 42: Espectro de ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) referente a (3b)	173
Figura 43: Espectro de ^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3) referente a (3b)	174
Figura 44: Espectro de CG/MS referente a (3b)	175
Figura 45: Espectro de IV referente a (3b)	176
Figura 46: Espectro de ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) referente a (4b)	177
Figura 47: Espectro de ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) referente a (5b)	178
Figura 48: Espectro de ^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3) referente a (5b)	179
Figura 49: Espectro de CG/MS referente a (5b)	180
Figura 50: Espectro de IV referente a (5b)	180
Figura 51: Espectro de ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) referente a (6b)	181
Figura 52: Espectro de ^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3) referente a (6b)	182

Figura 53: Espectro de CG/MS referente a (6b).....	183
Figura 54: Espectro de IV referente a (6b).....	184
Figura 55: Espectro de ¹ H RMN (200 MHz, CDCl ₃) referente a (7b).....	185
Figura 56: Espectro de ¹ H RMN (200 MHz, CDCl ₃) referente a (8b).....	186
Figura 57: Espectro de ¹³ C RMN (50 MHz, CDCl ₃) referente a (8b).....	187
Figura 58: Espectro de CG/MS referente a (8b).....	188
Figura 59: Espectro de IV referente a (8b).....	188

Lista de Tabelas

Tabela 1: Comparação resumida dos métodos sintéticos para obtenção de nanopartículas magnéticas	21
Tabela 2: Relação entre a quantidade de lavagens e a concentração de enzima imobilizada ..	54
Tabela 3: Resolução cinética do (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol mediada pela lipase de <i>B. cepacia</i> imobilizada por fisissorção em nanopartícula magnética em <i>Shaker</i> [®]	56
Tabela 4: Resolução cinética do (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol mediada pela lipase de <i>B. cepacia</i> imobilizada por fisissorção em nanopartícula magnética em um agitador de tubos (thermomixer [®]).....	57
Tabela 5: Resolução cinética do (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol mediada pela lipase de <i>B. cepacia</i> imobilizada por carboxibenzaldeído em nanopartícula magnética	75
Tabela 6: Resolução cinética do (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol mediada pela lipase de <i>B. cepacia</i> imobilizada por glutaraldeído em nanopartícula.....	82
Tabela 7: Resolução cinética do (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol mediada pela solução enzimática lipase de <i>B. cepacia</i> liofilizada.....	88
Tabela 8: Estudo do efeito de acilantes na resolução cinética do (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol mediada pela lipase de <i>B. cepacia</i> imobilizada por fisissorção.....	93
Tabela 9: Estudo do efeito de acilantes na resolução cinética do (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol mediada pela lipase de <i>B. cepacia</i> imobilizada por glutaraldeído em TBME e tolueno.....	94
Tabela 10: Estudo do efeito de acilantes na resolução cinética do (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol mediada pela lipase de <i>B. cepacia</i> imobilizada por carboxibenzaldeído em TBME e tolueno.	96

Tabela 11: Estudo do efeito da temperatura (32°C) na resolução cinética do (<i>RS</i>)-2-bromo-1-(fenil)etanol mediada pela lipase de <i>B. cepacia</i> imobilizada por fisissorção, glutaraldeído e carboxibenzaldeído.....	99
Tabela 12: Estudo do efeito da temperatura (42°C) na resolução cinética do (<i>RS</i>)-2-bromo-1-(fenil)etanol mediada pela lipase de <i>B. cepacia</i> imobilizada por fisissorção, glutaraldeído e carboxibenzaldeído.....	100
Tabela 13: Estudo do efeito da temperatura (52°C) na resolução cinética do (<i>RS</i>)-2-bromo-1-(fenil)etanol mediada pela lipase de <i>B. cepacia</i> imobilizada por fisissorção, glutaraldeído e carboxibenzaldeído.....	102
Tabela 14: Resolução cinética do (<i>RS</i>)-2-bromo-1-(fenil)etanol mediada pela lipase de <i>B. cepacia</i> estocada durante 30 dias.....	105
Tabela 15: Dados de RMN ^a de ¹ H e ¹³ C do produto (3a) em CDCl ₃	108
Tabela 16: Dados de RMN ^a de ¹ H e ¹³ C do produto (4a) em CDCl ₃	109
Tabela 17: Dados de RMN ^a de ¹ H e ¹³ C do produto (5a) em CDCl ₃	110
Tabela 18: Dados de RMN ^a de ¹ H e ¹³ C do produto (6a) em CDCl ₃	111
Tabela 19: Dados de RMN ^a de ¹ H e ¹³ C do produto (7a) em CDCl ₃	112
Tabela 20: Dados de RMN ^a de ¹ H e ¹³ C do produto (8a) em CDCl ₃	113
Tabela 21: Dados de RMN ^a de ¹ H e ¹³ C do produto (2b) em CDCl ₃	115
Tabela 22: Dados de RMN ^a de ¹ H e ¹³ C do produto (3b) em CDCl ₃	116
Tabela 23: Dados de RMN ^a de ¹ H e ¹³ C do produto (4b) em CDCl ₃	117
Tabela 24: Dados de RMN ^a de ¹ H e ¹³ C do produto (5b) em CDCl ₃	118
Tabela 25: Dados de RMN ^a de ¹ H e ¹³ C do produto (6b) em CDCl ₃	119
Tabela 26: Dados de RMN ^a de ¹ H e ¹³ C do produto (7b) em CDCl ₃	121
Tabela 27: Dados de RMN ^a de ¹ H e ¹³ C do produto (8b) em CDCl ₃	122

Lista de Esquemas

Esquema 1: Mecanismo de transesterificação enantiosseletiva catalisada por lipase	8
Esquema 2: Resolução cinética enzimática de alcoóis secundários, utilizando enzima imobilizada em nanopartículas magnéticas.	12
Esquema 3: Dois processos utilizados para a imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas.	28
Esquema 4: Análise retrossintética dos fármacos quirais selecionados	37
Esquema 5: Rota sintética para a síntese dos alcoóis racêmicos	38
Esquema 6: Síntese do (<i>RS</i>)-2-bromo-1-(fenil)etanol através da redução em banho de gelo, 1h, metanol e borohidreto de sódio.	39
Esquema 7: Síntese do (<i>RS</i>)-2-bromo-1-(fenil)etanol através da redução em temperatura ambiente, 17 minutos, borohidreto de sódio e sílica em água.	39
Esquema 8: Síntese do (<i>RS</i>)-2-bromo-1-(fenil)etanol através do estireno em água com NBS em 40 min.	40
Esquema 9: Obtenção da nanopartícula magnética silanizada	42
Esquema 10: Mecanismo da reação de resolução cinética enzimática para o (<i>RS</i>)-2-bromo-1-(fenil)etanol	61
Esquema 11: Cálculo de $[\alpha]_D$ e rendimento isolado para o acetato de (<i>RS</i>)-2-bromo-1-(fenil)etila.	63
Esquema 12: Resolução cinética enzimática do (<i>RS</i>)-2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanol utilizando a enzima imobilizada por fisissorção. Condições reacionais: tolueno, acetato de vinila, 24 h, 32 °C, 800 rpm em <i>themomixer</i> ®, 20 mg de nanopartículas magnéticas:0,21 mg de proteína.	64

Esquema 13: Resolução cinética enzimática do (RS)-1-(fenil)etanol utilizando a enzima imobilizada por fisissorção. Condições reacionais: tolueno, acetato de vinila, 24 h, 32 °C, 800 rpm em <i>themomixer</i> ®, 20 mg de nanopartículas magnéticas:0,21 mg de proteína.....	65
Esquema 14: Resolução cinética enzimática do (RS)-1-(4-nitrofenil)etanol utilizando a enzima imobilizada por fisissorção. Condições reacionais: tolueno, acetato de vinila, 24 h, 32 °C, 800 rpm em <i>themomixer</i> ®,20 mg de nanopartículas magnéticas:0,21 mg de proteína.....	67
Esquema 15: Funcionalização da nanopartícula magnética funcionalizada com o grupo amino para o grupo carboxílico e subsequente processo de imobilização da enzima por ativação com EDC.	71
Esquema 16: Resolução cinética enzimática do (RS)-2-bromo-1-(4-nitrofenil) etanol utilizando a enzima imobilizada por quimissorção com carboxibenzaldeído. Condições reacionais: tolueno, acetato de vinila, 24 h, 32 °C, 800 rpm em <i>themomixer</i> ®, 20 mg de nanopartículas magnéticas:0,26 mg de proteína.....	76
Esquema 17: Resolução cinética enzimática do (RS)-1-(fenil)etanol utilizando a enzima imobilizada por quimissorção com carboxibenzaldeído. Condições reacionais: tolueno, acetato de vinila, 24 h, 32 °C, 800 rpm em <i>themomixer</i> ®, 20 mg de nanopartículas magnéticas:0,26 mg de proteína.	77
Esquema 18: Resolução cinética enzimática do (RS)-1-(4-nitrofenil)etanol utilizando a enzima imobilizada por quimissorção com carboxibenzaldeído. Condições reacionais: tolueno, acetato de vinila, 24 h, 32 °C, 800 rpm em <i>themomixer</i> ®, 20 mg de nanopartículas magnéticas:0,26 mg de proteína.	78
Esquema 19: Modificação da nanopartícula magnética funcionalizada com o grupo amino utilizando glutaraldeído 25 % (v/v) e imobilização da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> por quimissorção.....	79

Esquema 20: Resolução cinética enzimática do (RS)-2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanol utilizando a enzima imobilizada por quimissorção com glutaraldeído. Condições reacionais: tolueno, acetato de vinila, 24 h, 32 °C, 800 rpm em *themomixer*®, 20 mg de nanopartículas magnéticas:0,28 mg de proteína. 83

Esquema 21: Resolução cinética enzimática do (RS)-1-(fenil)etanol utilizando a enzima imobilizada por quimissorção com glutaraldeído. Condições reacionais: tolueno, acetato de vinila, 24 h, 32 °C, 800 rpm em *themomixer*®, 20 mg de nanopartículas magnéticas:0,28 mg de proteína. 84

Esquema 22: Resolução cinética enzimática do (RS) -1-(4-nitrofenil)etanol utilizando a enzima imobilizada por quimissorção com glutaraldeído. Condições reacionais: tolueno, acetato de vinila, 24 h, 32 °C, 800 rpm em *themomixer*®, 20 mg de nanopartículas magnéticas:0,28 mg de proteína. 85

Esquema 23: Resolução cinética enzimática do (RS)-1-(fenil)-1,2-etanodiol utilizando a enzima imobilizada por quimissorção com glutaraldeído. Condições reacionais: tolueno, acetato de vinila, 24 h, 32 °C, 800 rpm em *themomixer*®, 20 mg de nanopartículas magnéticas:0,28 mg de proteína. 86

Lista de Gráficos

Gráfico 1: Energia livre de Gibbs para uma resolução cinética enzimática.....	16
Gráfico 2: Curva analítica da albumina de soro bovino	45
Gráfico 3: Curva de quantificação da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	47
Gráfico 4: Absorbância <i>versus</i> tempo de imobilização da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> em nanopartículas magnéticas.....	50
Gráfico 5: Porcentagem de enzima imobilizada <i>versus</i> a massa de nanopartículas magnéticas, variando-se a quantidade de solução enzimática da lipase.....	52
Gráfico 6: Resultados em conversão <i>versus</i> número de ciclos da reciclagem da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> utilizando os 3 tipos de imobilização: fisissorção, quimissorção com glutaraldeído e carboxibenzaldeído.	106

Sumário

Dedicatória I.....	i
Dedicatória II.....	ii
Agradecimentos.....	iii
Epígrafe.....	vi
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	ix
Lista de Ilustrações.....	xi
Lista de Tabelas.....	xv
Lista de Esquemas.....	xvii
Lista de Gráficos.....	xx
Sumário.....	xxi
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1 Lipases.....	3
2.1.1 Aspectos Gerais.....	3
2.1.2 Vantagens e desvantagens da biocatálise.....	9
2.1.3 Resolução cinética de alcoóis secundários catalisada por lipases.....	12
2.2 Nanopartículas magnéticas.....	17
2.2.1 Aspectos Gerais.....	17
2.2.2 Métodos de obtenção das nanopartículas magnéticas.....	20
2.2.2.1 Co-precipitação.....	21
2.2.2.2 Decomposição térmica.....	23

2.2.2.3	Microemulsão	25
2.3	Imobilização de lipases em nanopartículas magnéticas	26
2.3.1	Aspectos Gerais	26
2.3.2	Técnicas de imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas	27
2.3.3	Nanoestrutura e estabilidade da enzima	30
2.4	Aplicações de enzimas imobilizadas em nanopartículas magnéticas	33
3.	Objetivos.....	36
4.	Resultados e Discussão.....	38
4.1	Síntese dos álcoóis e ésteres racêmicos.....	38
4.2	Síntese das nanopartículas magnéticas funcionalizadas com o grupo amino.....	41
4.3	Preparação da solução enzimática da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	44
4.4	Imobilização por fisissorção	48
4.4.1	Tempo de imobilização	49
4.4.2	Estudo da relação entre as nanopartículas magnéticas e solução da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	51
4.4.3	Número de lavagens	53
4.4.4	Resolução cinética enzimática do (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol utilizando a enzima imobilizada por fisissorção	54
4.4.4.1	Determinação do $[\alpha]_D$ e rendimento isolado do (S)-2-bromo-1-(fenil)etanol... ..	62
4.4.5	Resolução cinética enzimática do (RS)-2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanol utilizando a enzima imobilizada por fisissorção	63
4.4.6	Resolução cinética enzimática do (RS)-1-(fenil)etanol utilizando a enzima imobilizada por fisissorção	65

4.4.6.1	Determinação do $[\alpha]_D$ e rendimento isolado para (<i>R</i>)-1-acetato de feniletila...	66
4.4.7	Resolução cinética enzimática do (<i>RS</i>)-1-(4-nitrofenil)etanol utilizando a enzima imobilizada por fisissorção	67
4.4.7.1	Determinação do $[\alpha]_D$ e rendimento isolado do (<i>R</i>)-1-(4-nitrofenil)acetato de etila	68
4.5	Imobilização por quimissorção	69
4.5.1	Funcionalização das nanopartículas magnéticas com grupo terminal amino com o carboxibenzaldeído e a imobilização da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	70
4.5.1.1	Resolução cinética enzimática do (<i>RS</i>)-2-bromo-1-(fenil)etanol utilizando a enzima imobilizada através do carboxibenzaldeído	75
4.5.1.2	Resolução cinética enzimática do (<i>RS</i>)-2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanol utilizando a enzima imobilizada através do carboxibenzaldeído	76
4.5.1.3	Resolução cinética enzimática do (<i>RS</i>)-1-(fenil)etanol utilizando a enzima imobilizada através do carboxibenzaldeído	77
4.5.1.4	Resolução cinética enzimática do (<i>RS</i>)-1-(4-nitrofenil)etanol utilizando a enzima imobilizada através do carboxibenzaldeído	78
4.5.2	Funcionalização com o glutaraldeído e imobilização da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> ativada por glutaraldeído	78
4.5.2.1	Resolução cinética enzimática do (<i>RS</i>)-2-bromo-1-(fenil)etanol utilizando a enzima imobilizada através do glutaraldeído	81
4.5.2.2	Resolução cinética enzimática do (<i>RS</i>)-2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanol utilizando a enzima imobilizada através do glutaraldeído	83
4.5.2.3	Resolução cinética enzimática do (<i>RS</i>)-1-(fenil)etanol utilizando a enzima imobilizada através do glutaraldeído	84

4.5.2.4	Resolução cinética enzimática do (RS)-1-(4-nitrofenil)etanol utilizando a enzima imobilizada através do glutaraldeído	84
4.5.2.5	Resolução cinética enzimática do (RS)-1-(fenil)-1,2-etanodiol utilizando a enzima imobilizada através do glutaraldeído	85
4.6	Comparação entre a enzima imobilizada e a enzima livre	87
4.7	Estudo da influência de diferentes acilantes, temperaturas e tempos reacionais para a resolução cinética do (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol	91
4.7.1	Estudo do efeito do agente acilante na resolução cinética do (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol utilizando a lipase de <i>B. cepacia</i> imobilizada em nanopartículas magnéticas.	92
4.7.2	Estudo do efeito da temperatura na resolução cinética do (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol utilizando a lipase de <i>B. cepacia</i> imobilizada em nanopartículas magnéticas.	97
4.8	Estocagem.....	104
4.9	Reciclagem da enzima	105
4.10	Determinação estrutural.....	107
4.10.1	Identificação do (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol (3a)	108
4.10.2	Identificação do Acetato de (RS) 2-bromo-1-(fenil)etila (4a)	109
4.10.3	Identificação do Acetato-2-(fenil)-2-oxo-etila (5a).....	110
4.10.4	Identificação do (RS)-1-(fenil)-1,2-etanodiol (6a).....	111
4.10.5	Identificação do Diacetato de (RS)-1-(fenil)-1,2-etano-di-ila (7a).....	112
4.10.6	Identificação do Acetato de (RS)-2-(fenil)etanol (8a).....	113
4.10.7	Identificação do 2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanona (2b).....	115
4.10.8	Identificação do (RS)-2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanol (3b).....	116
4.10.9	Identificação do Acetato de (RS) 2-bromo-1-(4-nitrofenil)etila (4b)	117

4.10.10	Identificação do Acetato de 2-(4-nitrofenil)-2-oxo-etila (5b)	118
4.10.11	Identificação do (RS)1-(4-nitrofenil)-1,2-etanodiol (6b).....	119
4.10.12	Identificação do Diacetato de (RS)-1-(4-nitrofenil)-1,2-etano-di-ila (7b)..	121
4.10.13	Identificação do Acetato de (RS)-2-(4-nitrofenil)-2-hidroxi-etila (8b)	122
5.	Conclusão	124
6.	Parte Experimental	127
6.1	Material e Métodos	127
6.1.1	Síntese do (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol	129
6.1.2	Síntese do Acetato de (RS)- 2-bromo-1-(fenil)etila.....	130
6.1.3	Síntese do 2-acetato de -1-(fenil)-2-oxo-etila.....	131
6.1.4	Síntese do (RS)-1-(fenil)-1,2-etanodiol	132
6.1.5	Síntese do Diacetato de (RS)-1-(fenil)-1,2-etano-di-ila.....	133
6.1.6	Síntese do Acetato de (RS)-2-(fenil)etanol.....	134
6.1.7	Síntese do 2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanona.....	135
6.1.8	Síntese do (RS)-2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanol	136
6.1.9	Síntese do Acetato de (RS) 2-bromo-1-(4-nitrofenil)etila	137
6.1.10	Síntese do Acetato de 2-(4-nitrofenil)-2-oxo-etila	138
6.1.11	Síntese do (RS)-1-(4-Nitrofenil)-1,2-etanodiol.....	139
6.1.12	Síntese do Diacetato de (RS)-1-(4-nitrofenil)-1,2-etano-di-ila.....	140
6.1.13	Síntese do Acetato de (RS)-2-(4-nitrofenil)-2-hidroxi-etila	141
6.1.14	Obtenção da magnetita nanoparticulada funcionalizada com o grupo amino	142
6.1.15	Montagem da curva de calibração para quantificação da proteína através do método de Bradford	144
6.1.16	Preparação da solução enzimática	144
6.1.17	Funcionalização das nanopartículas magnéticas com carboxibenzaldeído	144

6.1.18	Funcionalização das nanopartículas magnéticas com glutaraldeído	145
6.1.19	Imobilização por fisissorção e quimissorção.....	146
6.1.20	Resolução cinética enzimática.....	146
7.	Referências Bibliográficas.....	147
8.	Anexos.....	156
9.	Curriculum vitae.....	189

1. Introdução

O uso de enzimas, especialmente as lipases em síntese orgânica, está crescendo rapidamente porque essas enzimas apresentam alta quimio-, regio- e estereosseletividade em condições reacionais brandas e podem ser usadas para diferentes reações (Gotor-Fernandez *et al.*, 2006). Entretanto, a aplicação de enzimas na sua forma livre é frequentemente dificultada pela desnaturação e inativação do biocatalisador durante o processo reacional e, além disto, a dificuldade para sua recuperação e reciclagem (Ivanov e Schneider, 1997). Recentemente a imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas (Lei *et al.*, 2009) tem sido reconhecida como um dos mais atrativos métodos para resolver esses problemas. O uso de enzimas imobilizadas em nanopartículas magnéticas (Herdt *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2008) é possível devido à funcionalização de sua superfície. A aplicação de nanopartículas magnéticas para imobilização de enzimas (Pankhurst *et al.*, 2003) é de grande interesse, pois está baseada na fase heterogênea sólido-líquido do meio reacional. Dessa forma o sólido é retirado pela influência de um campo magnético externo, facilitando a separação e recuperação da enzima. Além disto, a utilização de nanopartículas magnéticas como suporte e sua flexibilidade de modificação da superfície com cadeias que possam facilitar e promover uma melhor e mais forte interação com a enzima leva ao aumento da estabilidade no processo de imobilização (Tartaj *et al.*, 2005). Devido às dimensões nanométricas das partículas magnéticas, cada catalisador tem uma melhor eficiência cinética quando comparado com catalisadores heterogêneos tradicionais (Kim *et al.*,

2006). Deste modo, decidiu-se imobilizar lipases em nanopartículas magnéticas e aplicá-las na resolução cinética enzimática de alcoóis secundários que são intermediários de fármacos quirais.

Este trabalho teve como objetivo principal estudar parâmetros que influenciam a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* comercial, tanto por métodos físicos (fisissorção) quanto por métodos químicos (quimissorção), em nanopartículas magnéticas. Procurou-se aperfeiçoar os processos de imobilização, de modo a obter-se maior quantidade de enzima imobilizada e mais eficientemente quando comparado com dados da literatura (Liu *et al.*, 2004; Shaw *et al.*, 2006; Shu *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Yong *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). Além disso, a posterior utilização desta enzima imobilizada para a obtenção de intermediários de fármacos enantiomericamente puros (Corey e Reichard, 1989) justificou a realização deste trabalho que visou estudar diferentes modos de imobilização em nanopartículas magnéticas e sua reciclagem. Com isso espera-se reduzir custos de processos que envolvam lipases. Durante todo o trabalho houve uma relação de interação mútua, dentro de uma pesquisa dinâmica que exige constante ajustes em função de seu próprio andamento.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Lipases

2.1.1 Aspectos Gerais

As lipases (glicerol éster hidrolases, E.C.3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas em seu ambiente natural. Estas possuem a função de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis aos correspondentes ácidos graxos e glicerol (Zarevucka *et al.*, 1995). Elas representam um grupo de biocatalisadores acessíveis e de baixo preço, que em geral, são flexíveis quanto à sua especificidade. As enzimas são classificadas e codificadas pela NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) de acordo com a reação catalisada. A nomenclatura utiliza a abreviação E.C. (Enzyme Commission) seguida de até 4 dígitos referentes à classes e subclasses que pertence a enzima.

As lipases são as enzimas mais empregadas tanto em nível industrial (indústria alimentícia, de cosméticos e perfumes, biomédica, pesticidas, detergentes, entre outras) como acadêmico (Breuer *et al.*, 2004). As lipases são capazes de catalisar não apenas reações de hidrólise, mas também de síntese em meio aquo-restritos, como reação de esterificação, interesterificação, transesterificação, alcoólise e aminólise. Além disso, as lipases usualmente atuam sobre substratos não naturais (Jaeger e Eggert, 2002).

Por um longo tempo as lipases foram consideradas como uma categoria especial de esterases, as quais são altamente eficientes e capazes

de catalisar reações de hidrólise. O problema da diferenciação de lipases e esterases foi estudado por vários autores e ainda existem controvérsias. Sarda e Desnuelle definiram as lipases a partir de sua característica cinética, que é a propriedade de ativação na presença de substratos insolúveis em água e emulsionados, ou seja, na presença de uma interface lipídeo/água (Sarda e Desnuelle, 1958). As esterases apresentam comportamento cinético do tipo Michaelis-Menten, ou seja, a atividade aumenta com a concentração do substrato $[S]$ até um limite por saturação, enquanto que as lipases não apresentam atividade enquanto os substratos estão presentes na solução em estado monomérico. Contudo, quando a concentração do substrato está próxima ou ultrapassa o seu limite de solubilidade, ocorre um rápido aumento na atividade. A razão pela qual uma lipase não hidrolisa substratos que estejam abaixo de uma concentração mínima (chamada concentração micelar crítica, CMC) e somente em concentrações acima desta é chamada de ativação interfacial Figura 1.

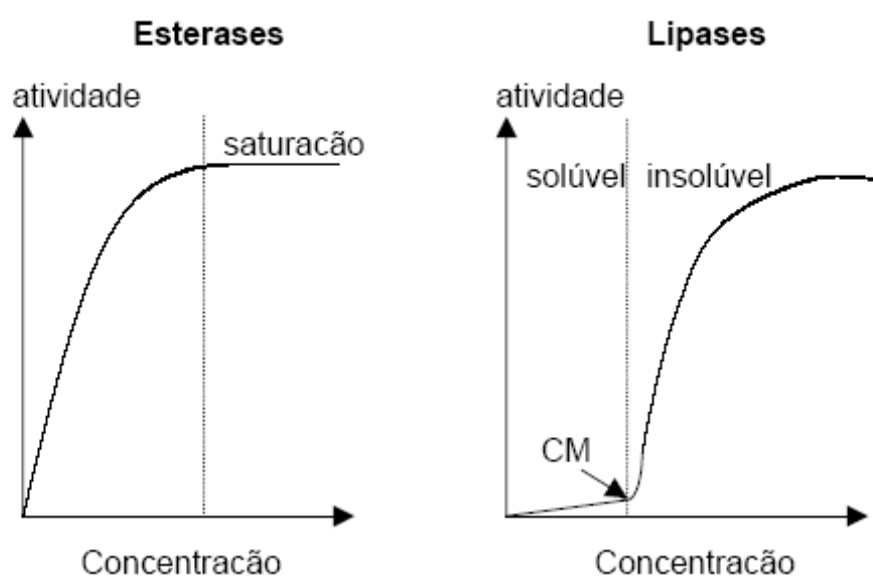


Figura 1: Comportamento catalítico de lipases e esterases.

O mecanismo de ativação interfacial está associado a mudanças conformacionais na enzima. Uma maior compreensão sobre os mecanismos de ação de lipases somente foi obtida a partir de 1990 (Brady *et al.*, 1990), quando as duas primeiras estruturas foram resolvidas por cristalografia de raios-X e propiciou uma explicação para o fenômeno da ativação interfacial. O sítio ativo destas enzimas apresentava-se recoberto por uma “tampa” hidrofóbica ou *lid*, que ao interagir com a interface lipídeo/água sofreria uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo. A presença da “tampa” na estrutura da enzima e a propriedade de ativação interfacial passaram a serem fatores determinantes para a caracterização de lipases. Até o momento foram caracterizadas as estruturas tridimensionais de mais de doze lipases (Kim *et al.*, 1997; Pleiss *et al.*, 1998; Schmid e Verger, 1998). Todas as lipases cujas estruturas foram elucidadas compartilham um padrão conformacional comum, denominado conformação α/β de hidrolase, onde está situada a tríade catalítica (Ser-His-Asp). Elas têm uma arquitetura comum composta de uma seqüência de α -hélice e β -pregueada. Na Figura 2 pode-se observar a representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de *Burkholderia cepacia* na ausência de um inibidor usando cristalografia de raios-X (Kim *et al.*, 1997). A estrutura mostra a lipase contendo uma alfa-hélice e uma folha-beta hidrolase e uma tríade catalítica compreendendo dos resíduos Ser87, His286 e Asp264.

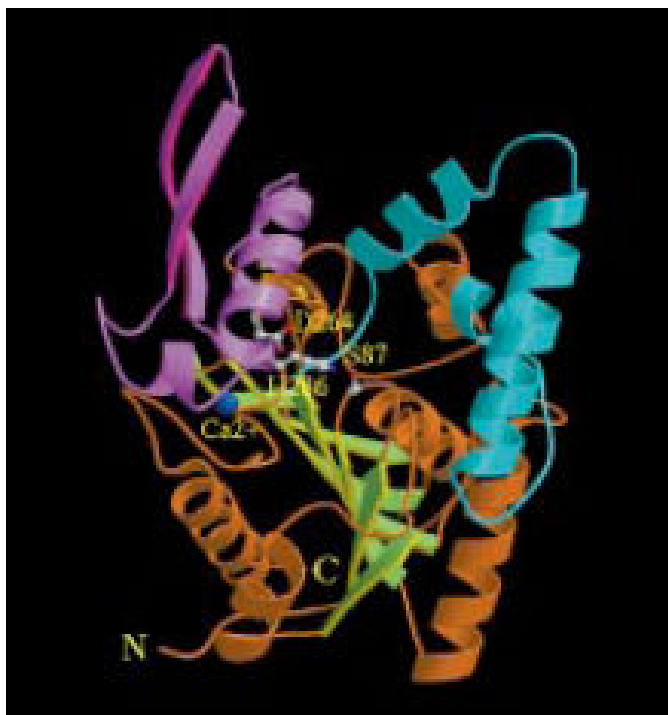


Figura 2: Estrutura tridimensional da lipase de *Burkholderia cepacia*.

Entretanto, mais recentemente foi observado que a presença da “tampa” não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial, tendo sido descritas lipases, como a de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica B*, que apresentam a tampa em suas estruturas, mas não sofrem ativação interfacial (Jaeger e Reetz, 1998). Por outro lado, as cutinases, enzimas consideradas lipases “verdadeiras”, não apresentam a tampa e não precisam de ativação interfacial para exercer sua atividade hidrolítica (Cygler e Schrag, 1997). Além disso, a ocorrência ou não da ativação interfacial pode ser influenciada pelas condições experimentais e pelos substratos utilizados (Ferrato *et al.*, 1997).

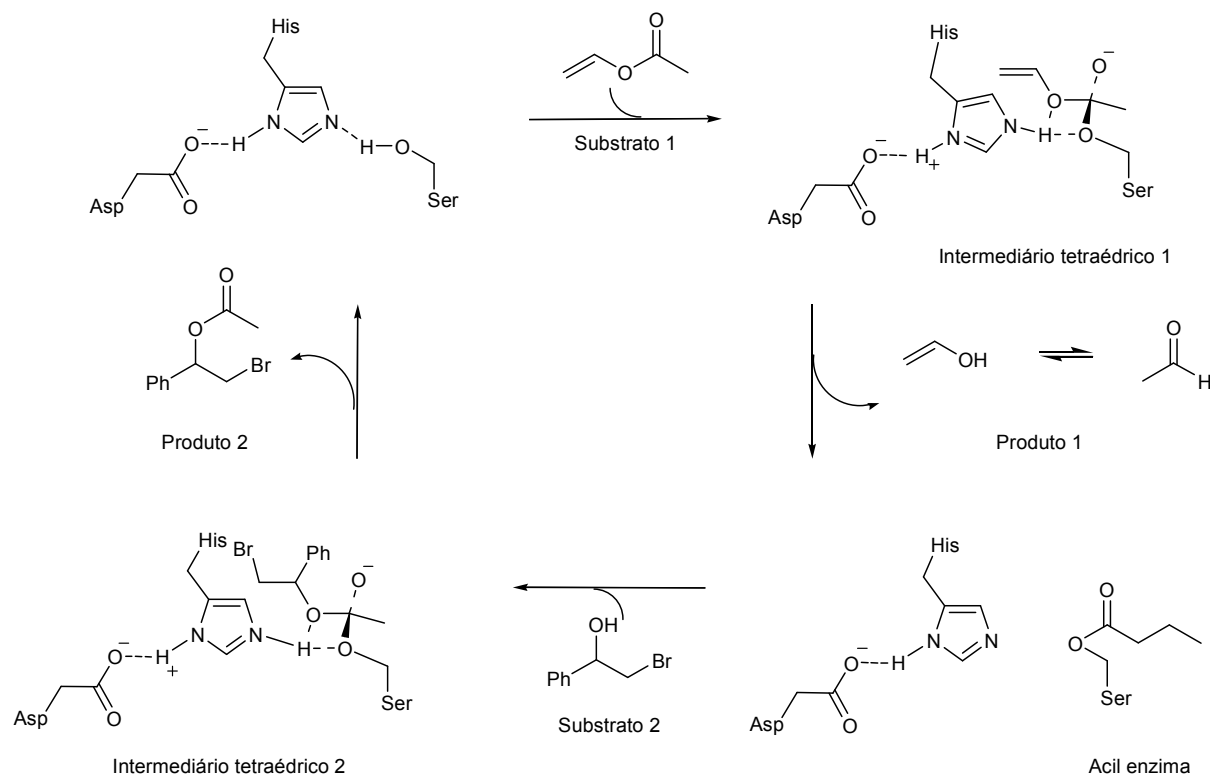
As lipases têm sido definidas em alguns trabalhos, como carboxilesterases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila com mais de 10 átomos de carbono. Enzimas que apresentam a capacidade de hidrolisar apenas acilgliceróis com menos de 10 átomos de

carbono, são ditas genericamente como esterases (Ferrato *et al.*, 1997; Jaeger e Reetz, 1998; Jaeger e Eggert, 2002).

A diferenciação entre lipases e esterases também tem sido feita pela diferença de especificidade preferencial das duas enzimas. Os substratos naturais para lipases são óleos e gorduras contendo triacilgliceróis constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, compostos contendo 3 funções éster, enquanto esterases atuam sobre compostos contendo uma função éster, liberando ácidos graxos de baixa massa molar (Bier *et al.*, 1955; Brockman e Borgstrom, 1984). Deve-se enfatizar, entretanto, que a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (Ericsson *et al.*, 2008).

O mecanismo da reação de transesterificação enantiosseletiva catalisada por lipase é mostrado no Esquema 1. A lipase de *Burkholderia cepacia* possui em seu sítio ativo a presença da tríade catalítica formada por resíduos de aminoácidos da serina, histidina e aspartato.

Dois intermediários tetraédricos diferentes estão envolvidos na formação das ligações que ocorrem durante o processo catalítico. O primeiro intermediário é gerado durante a transformação do complexo de Michaelis-Menten entre a enzima e o doador acila (éster vinílico) formando a espécie acil-enzima. O segundo intermediário ocorre quando a espécie acil-enzima é clivada pelo álcool, formando um éster como produto.



Esquema 1: Mecanismo de transesterificação enantiosseletiva catalisada por lipase

Normalmente são empregados ésteres vinílicos como doadores acila, neste caso o enol formado após acilação do resíduo da serina é rapidamente transformado em seu tautômero (acetaldeído), que é mais estável. Essa estratégia desloca o equilíbrio da reação na direção dos produtos por impedir uma possível competição nucleofílica entre o álcool formado nesta etapa (enol) e o substrato.

As lipases são extremamente estáveis em solventes orgânicos (Rotthaus *et al.*, 1997; Tsai *et al.*, 2000; Klivanov, 2001). A facilidade com que estas enzimas aceitam uma variedade de substratos não naturais e de tamanhos diversos sugere que a espinha dorsal da cadeia polipeptídica é flexível e pode adotar diferentes conformações. Outra característica é que as reações de esterificação catalisadas em solventes orgânicos são

freqüentemente mais enantiosseletivas que as correspondentes hidrolíticas em água (Chen e Sih, 1989; Carrea *et al.*, 1995; Klibanov, 2001).

2.1.2 Vantagens e desvantagens da biocatálise

As enzimas (biocatalisadores) ganharam um lugar de destaque para os químicos orgânicos (Wohlgemuth, 2007). A interface entre biocatálise e química orgânica foi reconhecida por Louis Pasteur em seu famoso experimento de resolução do ácido tartárico racêmico (Pasteur, 1858), ao estudar o ácido tartárico vínico, Pasteur verificou que os cristais monoclinicos do ácido tartárico eram diferentes entre si. Com auxílio de uma lupa, separou manualmente os dois tipos de cristais, levando a cabo a primeira separação enantiomérica alguma vez efetuada. Uma interface fundamental foi o solvente, no qual tradicionalmente tinha sido água para biocatálise e solventes orgânicos para síntese orgânica. Até existirem descobertas (Carrea *et al.*, 1995; Klibanov, 2001), como síntese orgânica livre de solventes orgânicos e biocatálise em solventes orgânicos.

Em contraste com os catalisadores inorgânicos como ácidos, bases, metais pesados e óxidos metálicos, as enzimas têm alta especificidade, isto é, formam produtos seletivamente. Esta característica é muito útil nos processos industriais, porque se formam quantidades mínimas de produtos secundários, o que representa benefícios econômicos e ambientais, com a eliminação da necessidade de separação de subprodutos e com redução qualitativa e quantitativa de efluentes industriais. As enzimas são ambientalmente benignas, diferentemente de catalisadores compostos de metais pesados e são completamente biodegradadas. As reações ocorrem em

condições suaves e as enzimas agem à pressão atmosférica, temperatura ambiente ou superiores e pH próximo ao neutro.

As reações enzimáticas minimizam os problemas como isomerização, racemização, epimerização e rearranjos que, muitas vezes, são fatores limitantes nos processos químicos. Além disto, enzimas são compatíveis entre si, pois atuam usualmente em condições similares. As diversas reações biocatalíticas podem ser realizadas em um mesmo meio reacional, proporcionando a possibilidade de conduzir reações seqüenciais usando sistemas multienzimáticos. Essa metodologia pode ser muito útil quando existe a possibilidade de formar um intermediário instável durante a síntese de um composto químico.

Outra grande vantagem é a larga tolerância a substratos não naturais e estáveis em solventes orgânicos, o que possibilita a realização de reações com substratos insolúveis em água. Além disto, quando utilizadas como catalisadores apresentam os principais tipos de seletividade:

Quimiosseletividade, uma vez que o propósito de uma enzima é atuar em um único tipo de grupo funcional, outras funcionalizações sensíveis são preservadas. Isto é de grande importância em síntese orgânica, pois evita etapas de proteção e desproteção em reações que apresentam alta quimiosseletividade.

Regiosseletividade e Diastereosseletividade, devido à sua estrutura tridimensional complexa, as enzimas conseguem distinguir entre grupos funcionais quimicamente iguais, situados em diferentes regiões da mesma molécula-substrato.

Enantiosseletividade, as enzimas são quase todas formadas por L-amino ácidos, sendo, portanto, catalisadores quirais. Como consequência, qualquer tipo de quiralidade ou pró-quiralidade presente no substrato é reconhecida durante a formação do complexo enzima-substrato. Desta forma, na presença de uma enzima, substratos pró-quirais podem ser transformados em produtos opticamente ativos, e ambos os enantiômeros de um substrato racêmico podem reagir com velocidades diferentes, possibilitando a resolução cinética.

Porém, existem também algumas desvantagens no uso de biocatalisadores. As principais desvantagens são que enzimas são fornecidas pela natureza somente em uma forma enantiomérica, desta forma torna-se praticamente impossível inverter a enantiopreferência de uma reação biocatalisada. Além disto, exigem parâmetros de operação específicos, a vantagem de operar sob condições suaves pode se tornar um obstáculo quando as reações biocatalisadas ocorrem apenas lentamente nas condições naturais de temperatura e pH.

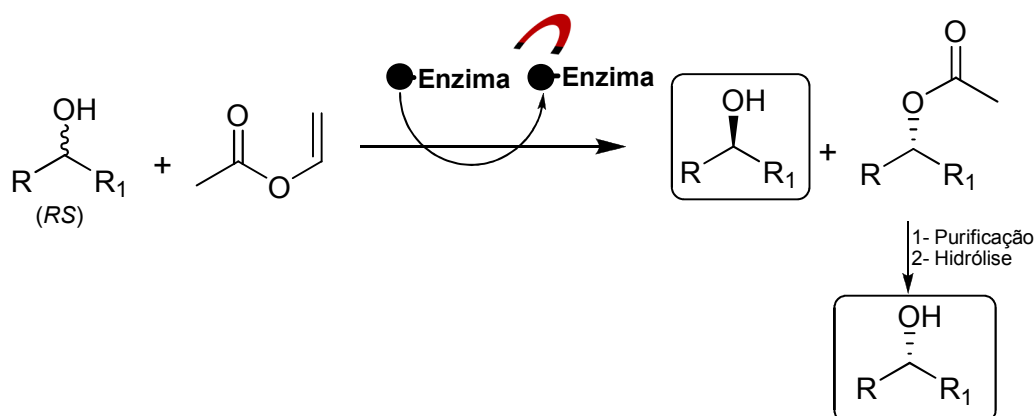
A maioria dos compostos orgânicos são pouco solúveis em água e a mudança para solventes orgânicos pode causar uma alteração na conformação da enzima, levando a uma possível perda de atividade. Outro fator negativo das enzimas e limitante de um processo é que enzimas são passíveis de sofrer inibição pelo substrato ou produto. Mas isto pode ser contornado mantendo-se a concentração do substrato em níveis aceitáveis e retirando-se gradualmente o produto formado.

Estas desvantagens foram bastante amenizadas nos últimos tempos pelo aperfeiçoamento e desenvolvimento de diversas técnicas para reações

biocatalisadas. Quando o processo não for satisfatoriamente seletivo, modificações simples nas condições experimentais podem influenciar a enantiosseletividade. Algumas modificações mais comuns são o uso de solventes orgânicos, adição de inibidores e técnicas de imobilização.

2.1.3 Resolução cinética de alcoóis secundários catalisada por lipases

A resolução cinética enzimática (RCE) de racematos consiste na diferença de reatividade dos enantiômeros com um reagente aquiral, na presença de uma enzima (quiral). O Esquema 2 representa uma RCE utilizando a enzima imobilizada em nanopartículas magnéticas.



Esquema 2: Resolução cinética enzimática de alcoóis secundários, utilizando enzima imobilizada em nanopartículas magnéticas.

No exemplo apresentado acima, a resolução cinética leva à formação de uma nova substância (éster) com propriedades físicas e químicas diferentes do composto a ser resolvido (álcool). Dessa forma, torna-se possível separar os enantiômeros por técnicas convencionas, tais como cromatografia ou destilação. De um modo geral, esse processo baseia-se em uma reação química enantiosseletiva, mediada por enzimas, para formar uma nova substância com propriedades químicas e físicas diferentes. Essa

técnica é largamente utilizada em síntese orgânica (Pamies e Backvall, 2002).

O rendimento químico máximo de uma resolução cinética enzimática é de 50% para cada enantiômero, isto é, quando apenas um dos enantiômeros reage completamente. A maior parte das resoluções enzimáticas de racematos não mostra uma situação ideal e a diferença na razão das velocidades de conversão dos enantiômeros não é infinita, mas que pode ser medida. O resultado do processo é descrito pelo excesso enantiomérico do produto (ee_p) e do substrato que não reagiu (ee_s), sendo o rendimento fornecido pelo grau de conversão da reação (c). A velocidade de transformação de cada enantiômero varia com o grau de conversão (c), logo, a razão dos dois enantiômeros não permanece constante durante a reação (Straathof e Jongejan, 1997).

Através da necessidade de um método mais adequado para o tratamento quantitativo de dados bioquímicos, que permitisse aos químicos sintéticos fazer previsões úteis em seus trabalhos. Foram descritas formulações sob a base teórica de Sharpless e K. Fajans (Straathof e Jongejan, 1997), da dependência de três parâmetros chaves: a extensão de conversão de substratos racêmicos (c), a pureza ótica ou grau de enantiosseletividade, expressa como excesso enantiomérico do produto (ee_p) ou do substrato (ee_s) que permanece sem reagir e a razão enantiomérica (E) (Chen *et al.*, 1982). O ee é definido como a proporção do maior enantiômero menos o menor, expressa como uma porcentagem.

A enantiosseletividade das enzimas na resolução cinética de substratos quirais é convenientemente expressa como a razão enantiomérica

(**E**), que é um parâmetro quantitativo e qualitativo do sistema. Embora a qualidade do produto da resolução de um racemato seja caracterizada pelo excesso enantiomérico, a razão enantiomérica (**E**) é um parâmetro muito importante, pois descreve a dependência entre o grau de conversão (**c**) e o **ee** do substrato e produto. Este parâmetro que descreve a seletividade de uma resolução foi introduzido como adimensional, o qual permanece constante durante a reação, e é somente determinado pelo ambiente do sistema reacional, ou seja, enquanto o excesso enantiomérico é uma propriedade do produto, a razão enantiomérica é característica do processo.

Em uma resolução cinética enzimática, **E** é expresso como a razão das constantes de especificidade, k_{cat}/K_m , para dois enantiômeros (constante de velocidade aparente de segunda ordem para a reação entre uma enzima e um substrato em uma concentração infinitamente pequena, onde k_{cat} é a constante catalítica e K_m é a constante de Michaelis-Menten, que é a concentração de substrato na qual a velocidade de reação é a metade da máxima). O valor calculado de **E**, expresso pela relação entre os termos cinéticos e termodinâmicos de uma resolução cinética é fornecido pela Equação 1.

$$E = \frac{(k_{cat} / K_m)_S}{(k_{cat} / K_m)_{S'}} = e^{\frac{\Delta\Delta G^*}{RT}}$$

Equação 1: Relação cinética e termodinâmica para razão enantiomérica (E).

Um valor elevado de **E** para um par de enzima-substrato é essencial para o sucesso de uma resolução cinética, já que isto assegura não apenas um excesso enantiomérico elevado, mas também um rendimento proporcionalmente alto. Para propósitos práticos, um valor de **E** abaixo de

10 para qualquer resolução cinética torna-o inviável como um processo enantiosseletivo. Por outro lado, este pode ser considerado bom se apresentar valores entre 10 e 30 e, acima disto, é considerado excelente. Os valores de $E > 200$ não podem ser atribuídos precisamente como consequência das incertezas intrínsecas aos métodos analíticos de determinação de excessos enantioméricos (por exemplo, HPLC, ou CG) (Chen *et al.*, 1982; Faber, 2000). Acima destes valores, uma pequena variação no excesso enantiomérico do produto ou substrato provoca um aumento significativo no valor numérico de E .

Analisando em termos físico-químicos, essa técnica de resolução de racematos comentada acima tem como fundamento a diferença entre a cinética de interação (seja ela por força de van der Waals, ligações de hidrogênio ou covalente) de cada enantiômero com o agente de resolução ou com o catalisador. A diferença entre a cinética da reação para cada enantiômero pode ser visualizada através do gráfico de energia livre Gibbs.

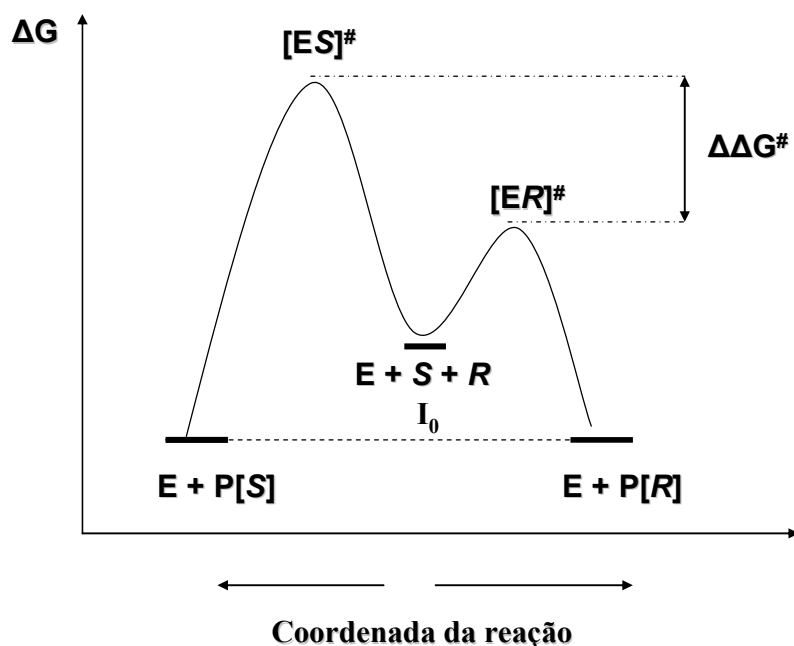


Gráfico 1: Energia livre de Gibbs para uma resolução cinética enzimática.

No exemplo mostrado acima (Gráfico 1), situadas no meio do gráfico (I_0) estão às condições iniciais da reação, que consiste em um racemato ($S + R$) com a enzima (E). Se o enantiômero R reagir, a coordenada da reação segue o sentido da direita e forma o produto $P[R]$. Se o enantiômero S reagir, a coordenada da reação segue o sentido da esquerda e forma o produto $P[S]$. A estabilidade relativa dos possíveis produtos $P[R]$ e $P[S]$ são as mesmas porque essas espécies são pares de enantiômeros ($P[R]$ e $P[S]$). No entanto, para levar à formação do produto $P[S]$ é preciso romper uma barreira de energia maior do que aquela necessária para se levar ao produto $P[R]$. A diferença entre as energias de ativação para levar à formação de cada um dos produtos ($P[R]$ e $P[S]$) é representada pelo parâmetro $\Delta\Delta G^\ddagger$. Essa diferença de energia pode ser explicada através da natureza diastereoisomérica dos complexos ativados formados ($[ER]^\ddagger$ e $[ES]^\ddagger$). Quanto maior o valor de $\Delta\Delta G^\ddagger$, maior será a velocidade de formação de um dos

enantiômeros e, conseqüentemente, maior será a enantiosseletividade do processo.

2.2 Nanopartículas magnéticas

2.2.1 Aspectos Gerais

Nanopartículas magnéticas são compostos formados por átomos ou moléculas que apresentam resposta a um campo magnético e possuem um tamanho bastante reduzido, entre 1 a 100 nm.

O estudo de nanopartículas magnéticas não é trivial, tanto do ponto de vista experimental quanto do teórico, pois o tamanho extremamente reduzido dificulta sua caracterização através das técnicas convencionais.

A obtenção de amostras nanoestruturadas próximas a um sistema modelo é extremamente difícil, assim sendo uma etapa fundamental no estudo de nanopartículas é a síntese desses materiais.

Nanopartículas apresentam alta área superficial e, portanto, alta energia superficial. Durante a síntese as nanopartículas tendem a se aglomerar e crescer para que, assim, ocorra diminuição na energia total do sistema. Para evitar o crescimento descontrolado das partículas e produzir nanopartículas não-aglomeradas, normalmente são utilizados dois mecanismos básicos de estabilização: **(i)** repulsão por cargas elétricas e **(ii)** adição de um material estabilizante. No primeiro caso, as partículas se repelem por apresentarem a superfície eletricamente carregada (a), e no segundo caso, as partículas não se agregam por possuírem, na sua superfície, um agente protetor conhecido como passivante (b). O passivante impede a aglomeração das partículas fazendo uso do efeito estérico. Dentre

os materiais usados como passivantes pode-se citar surfactantes, moléculas orgânicas com grupos polares e polímeros.

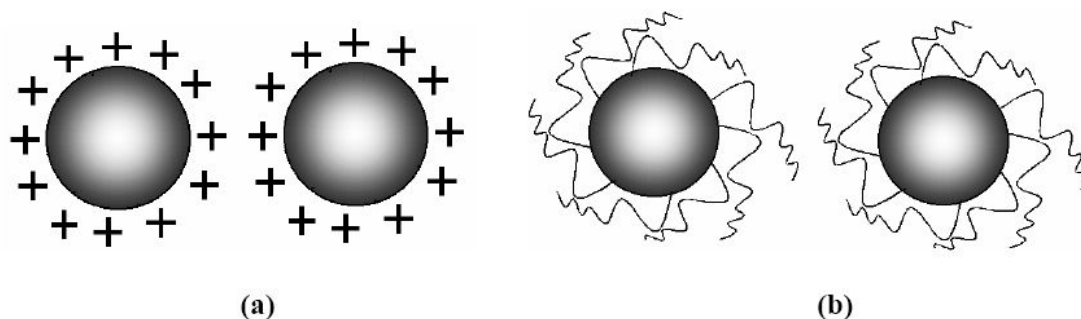


Figura 3: (a) estabilização de nanopartículas por carga, (b) estabilização de nanopartículas por impedimento estérico.

Os estudos das propriedades dependentes do tamanho de nanopartículas metálicas e as suas aplicações para usos no campo de materiais avançados requerem a síntese de nanopartículas com controle preciso de forma, tamanho, composição e estrutura. Isto pode ser alcançado através de rotas de síntese química.

As nanopartículas que apresentam à temperatura ambiente um único domínio magnético (único direcionamento quando recebem a influência de um campo magnético externo) são chamadas de superparamagnéticas e têm despertado crescente interesse na física, química, medicina, materiais e meio ambiente, em virtude de suas múltiplas aplicações (Pankhurst *et al.*, 2003).

Estas aplicações dependem da modificação prévia da superfície das nanopartículas com um composto que contenha grupos funcionais de interesse (Yamaura *et al.*, 2004), capazes de interagir com analitos, fármacos, toxinas ou poluentes. Entre as aplicações das nanopartículas superparamagnéticas descritas até o momento, pode-se destacar a produção de micro-sensores magnéticos, dispositivos ópto-magnéticos, diagnóstico

médico, transporte de drogas, purificação de DNA e RNA, catálise, bioprocessos, remediação ambiental e métodos analíticos (Li *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003; Mikhaylova *et al.*, 2004).

As grandes vantagens do uso de nanopartículas magnéticas como suporte para imobilização de enzimas são:

-Facilidade de extração do meio reacional, utilizando apenas um magneto.

-Fácil obtenção, dependendo do método utilizado para a síntese (Lu *et al.*, 2007).

-Possibilidade de funcionalização da superfície (Mateo *et al.*, 2007).

-Resistência a altas temperaturas (Liu *et al.*, 2004).

-Nanoestrutura dá estabilidade a enzima (Kim *et al.*, 2006).

-Reciclável (Sharma *et al.*, 2007)

Um das nanopartículas magnéticas mais utilizadas para a imobilização de enzimas é a magnetita (Fe_3O_4), no qual uma unidade cúbica está representada na Figura 4.

A estrutura cristalina da magnetita é formada por um spinel invertido, onde Fe^{3+} ocupam os espaços tetraédricos. Enquanto o Fe^{2+} e Fe^{3+} ocupam remanescente e randomicamente distribuídos nos espaços octaédricos.

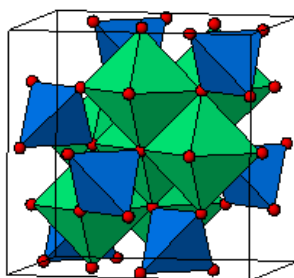


Figura 4: Poliedro de Ferro na célula unitária de magnetita (azul é ocupado por Fe^{3+} , verde é ocupado por Fe^{2+} , Fe^{3+} e oxigênio em vermelho)

Na literatura, encontram-se pesquisas relacionadas à funcionalização de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro com diferentes grupos funcionais (Kim *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2008b). Estas aplicações da modificação prévia da superfície das nanopartículas com um composto que contenha grupos funcionais de interesse, capazes de interagir com analitos, fármacos, toxinas ou poluentes é de grande importância, pois dependendo do grupo utilizado pode existir alteração nas interações das nanopartículas com as células em termos da eficiência de sua adesão e internalização. Além disso, visa melhorar a biocompatibilidade, resistir à adsorção de proteínas e aumentar o tempo de circulação das nanopartículas no organismo (Lin *et al.*, 2008).

2.2.2 Métodos de obtenção das nanopartículas magnéticas

A maior dificuldade na síntese de partículas ultrafinas é controlar o tamanho da partícula em sua escala nanométrica. Esta dificuldade surge como o resultado da alta energia superficial desses sistemas (Sugimoto, 1987).

A procura por rotas sintéticas fáceis e flexíveis capazes de produzir nanopartículas magnéticas com o tamanho desejado e distribuição do tamanho de forma organizada, sem agregação das nanopartículas é extremamente importante para o uso desses materiais em aplicações biotecnológicas (Tartaj *et al.*, 2005).

Neste tópico será feita uma breve discussão de algumas rotas sintéticas importantes mais frequentemente usadas para a obtenção de

nanopartículas magnéticas e como as nanopartículas produzidas por esses métodos tem sido recentemente usadas em biotecnologia (Lu *et al.*, 2007).

Métodos químicos em solução têm sido altamente utilizados para produzir materiais nanoestruturados porque não são tão complicados e produzem grandes quantidades de produto final.

A Tabela 1 apresenta os 3 principais métodos utilizados para a síntese de nanopartículas magnéticas de forma resumida e comparativa.

Existe uma faixa de tempo reacional e de temperatura para cada método sintético, como pode ser visto na Tabela 1. Isto se resulta pelo fato de diferentes metais que podem ser utilizados para a obtenção das nanopartículas. O ferro é o metal mais utilizado para a síntese de nanopartículas magnéticas. Tendo como a magnetita (Fe_3O_4), o suporte mais utilizado em aplicações biotecnológicas.

Tabela 1: Comparação resumida dos métodos sintéticos para obtenção de nanopartículas magnéticas

Método sintético	Síntese	Temperatura (°C)	Tempo reacional	Solvente	Agentes para capear a superfície	Tamanho	Controle da forma	Rendimento
Co-precipitação	muito simples condições ambiente	20-90	minutos	água	necessário, adicionado durante ou após a reação	Relativamente limitado	não é bom	alto/variável
Decomposição térmica	complicado, atmosfera inerte	100-320	horas-dias	composto orgânico	necessário, adicionado durante a reação	muito limitado	muito bom	alto/variável
Microemulsão	complicado, condições ambiente	20-50	horas	composto orgânico	necessário, adicionado durante a reação	Relativamente limitado	bom	baixo

2.2.2.1 Co-precipitação

Existem dois métodos principais para a obtenção da magnetita (Fe_3O_4) nanoparticulada. Primeiro, uma suspensão de hidróxido de ferro é parcialmente oxidada com diferentes agentes oxidantes (Sugimoto e Matijevic, 1980). Por exemplo, partículas esféricas de magnetita de

distribuição de tamanho estreito com diâmetros médios entre 30 e 100 nm podem ser obtidas a partir de sal contendo Fe(II), uma base e um oxidante brando (íons nitrato) (Sugimoto e Matijevic, 1980).

O outro método consiste do uso de uma mistura estequiométrica dos íons Fe(II) e Fe(III) em solução aquosa em meio básico, rendendo a magnetita ou maguemita (Fe_2O_3) de formato esférico e homogêneo. Tem sido mostrado que um ajuste de pH e força iônica no meio reacional é possível controlar o tamanho médio das partículas entre 2-15 nm (Yamaura *et al.*, 2004). Este método é um dos mais utilizados para a preparação de nanopartículas magnéticas para aplicação em biotecnologia (Taran *et al.*, 2002).

Nanopartículas magnéticas obtidas por este método apresentam a distribuição e tamanho como apresentados na imagem de microscopia de transmissão eletrônica da magnetita nanoparticulada Figura 5.

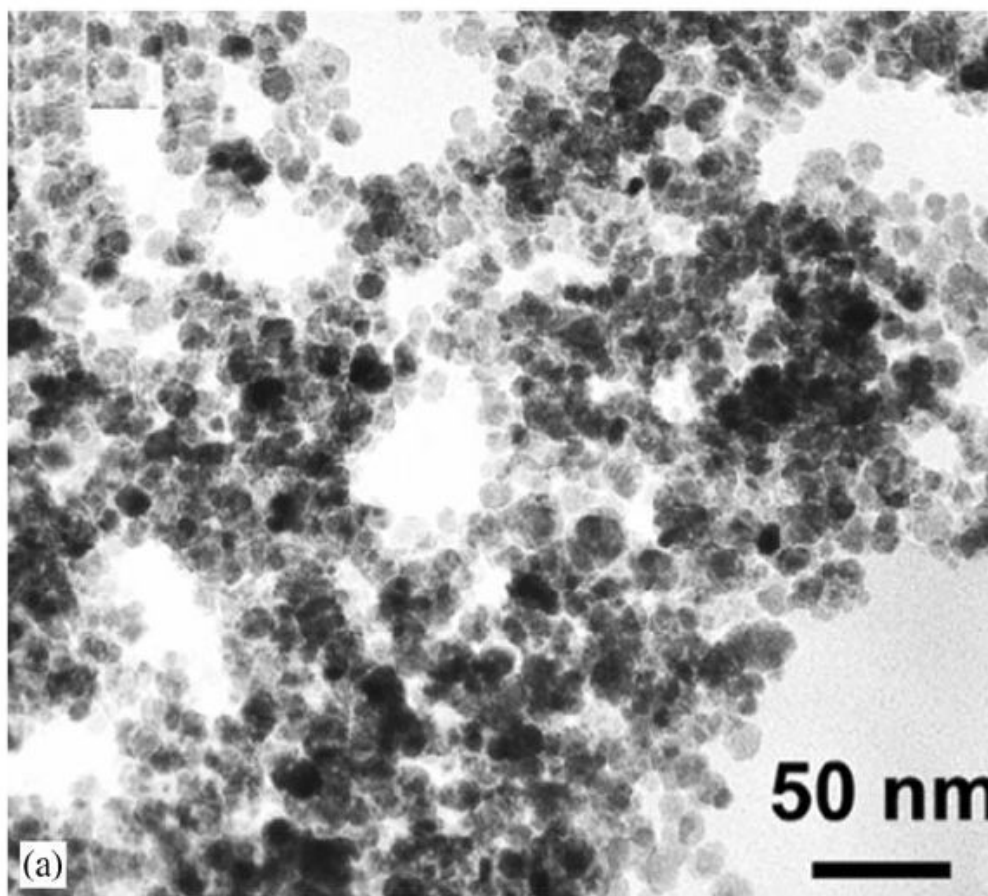


Figura 5: (a) Microestrutura típica de amostra preparada pelo método de co-precipitação (magnetita nanoparticulada) Copiada de (Tartaj *et al.*, 2005)

2.2.2.2 Decomposição térmica

O método de decomposição térmica consiste na rápida injeção de reagentes, frequentemente compostos organometálicos dentro de uma solução de surfactantes à quente. Este método rende um controle de tamanho bom, distribuição de tamanho estreita e boa cristalização, além de nanopartículas bem dispersas (evitando agregação e diminuição da nanoescala). Isto pode ser visto na imagem de microscopia de transmissão eletrônica Figura 6 para uma amostra resultante deste método.

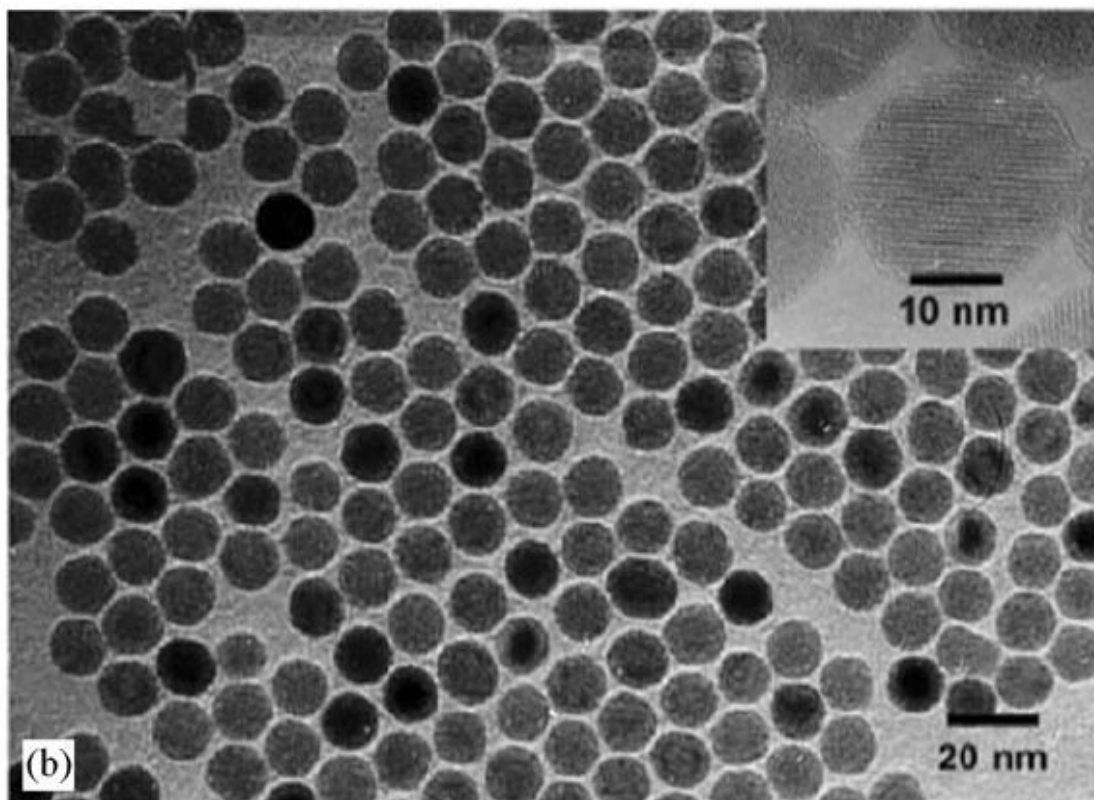


Figura 6: (b) Microestrutura típica de amostra preparada pelo método de decomposição térmica. Copiada de (Tartaj *et al.*, 2005)

Baseado neste método, Sun e colaboradores reportaram a preparação de nanomagnetos de ferrita por decomposição térmica do acetilacetonato de ferro, acetilacetonato de cobalto e acetilacetonato de manganês (Sun *et al.*, 2004). Os autores também sintetizaram nanopartículas monodispersas de Fe-Pt por redução simultânea do acetilacetonato de platina ($\text{Pt}(\text{acac})_2$) e a decomposição térmica do pentacarbonila de ferro ($\text{Fe}(\text{CO})_5$) na presença de ácido oléico e oleamina (Sun *et al.*, 2000)

2.2.2.3 Microemulsão

A microemulsão pode ser definida como uma dispersão isotrópica estável de dois líquidos imiscíveis, consistindo de domínios nanométricos de um ou ambos líquidos, estabilizados por um filme interfacial de moléculas ativas na superfície (Pillai *et al.*, 1995).

Microemulsões podem ser classificadas como água-em-óleo (w/o) ou óleo-em-água (o/w) dependendo da fase contínua e dispersa. As microcavidades do surfactante-estabilizado (tipicamente na média de 10 nm) providenciam um efeito de confinamento que limita a nucleação da partícula, crescimento e aglomeração (Pileni, 1993). Particularmente, microemulsões w/o tem sido altamente usada para a produção de nanopartículas.

Estudos recentes sobre o uso de microemulsões para a preparação de nanopartículas magnéticas para aplicação em biotecnologia têm sido focados na preparação de nanopartículas magnéticas recobertas por sílica. Por exemplo, nanocompósitos estabilizados por sílica melhoraram a imobilização da beta-lactamase via ligação química (Tartaj *et al.*, 2005).

Usando a técnica de microemulsão, nanopartículas podem ser preparadas como esferas, mas também como o formato de tubos. Embora vários tipos de nanopartículas magnéticas tenham sido sintetizados como controle da forma usando o método de microemulsão, o tamanho e o formato da nanopartícula geralmente pode ter variação ou sair da média esperada.

A síntese em microemulsão é limitada e o rendimento é baixo quando comparada a outros métodos, como decomposição térmica e co-precipitação.

Grandes volumes de solventes são necessários para sintetizar uma quantidade apreciável de material nanoparticulado. Microemulsão não é um processo muito eficiente e também existe uma grande dificuldade de obter o material em larga escala.

Nanopartículas magnéticas obtidas por este método apresentam a distribuição e tamanho como apresentados na imagem de microscopia de transmissão eletrônica da magnetita nanoparticulada, Figura 7.

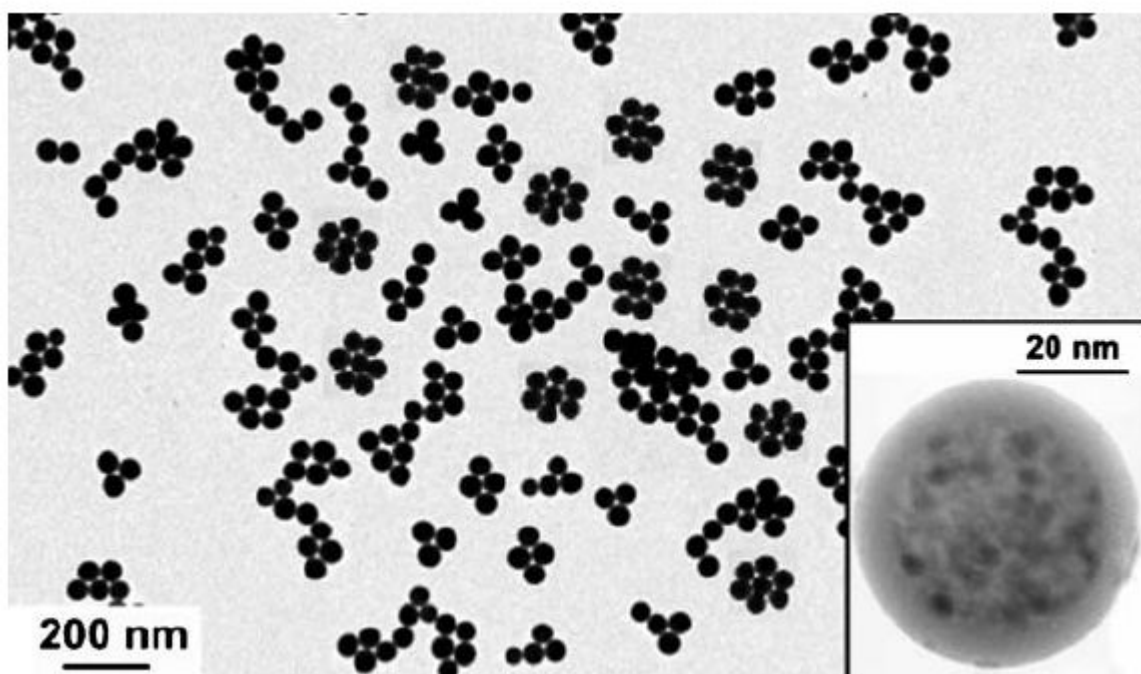


Figura 7: Microestrutura típica de amostra preparada pelo método de microemulsão. Copiada de (Tartaj *et al.*, 2005)

2.3 Imobilização de lipases em nanopartículas magnéticas

2.3.1 Aspectos Gerais

Enzima imobilizada foi definida como um composto formado de 2 componentes essenciais: um componente estrutural não catalítico (suporte) no qual é designado para separação, reuso do catalisador e facilitar o controle de processos, e um componente catalítico funcional (enzima), no

qual é designada para converter os substratos de interesse em produtos desejados (Cao *et al.*, 2003).

Materiais magnéticos têm sido amplamente utilizados na imobilização de células e enzimas (Arica *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000) e em outras aplicações biotecnológicas (Uhlen, 1989; Lauva *et al.*, 1990). Suportes magnéticos foram primeiramente (Robinson *et al.*, 1973) aplicados para imobilizar enzimas em 1973. Além dos méritos de outros suportes sólidos, enzimas imobilizadas em materiais magnéticos podem ser mais facilmente separadas de um sistema reacional pela aplicação de um campo magnético externo (Bahar e Celebi, 2000). O uso de partículas magnéticas pode também reduzir os custos operacionais por poderem ser reutilizadas em processos sem perder a eficiência magnética (Zheng *et al.*, 2003).

2.3.2 Técnicas de imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas

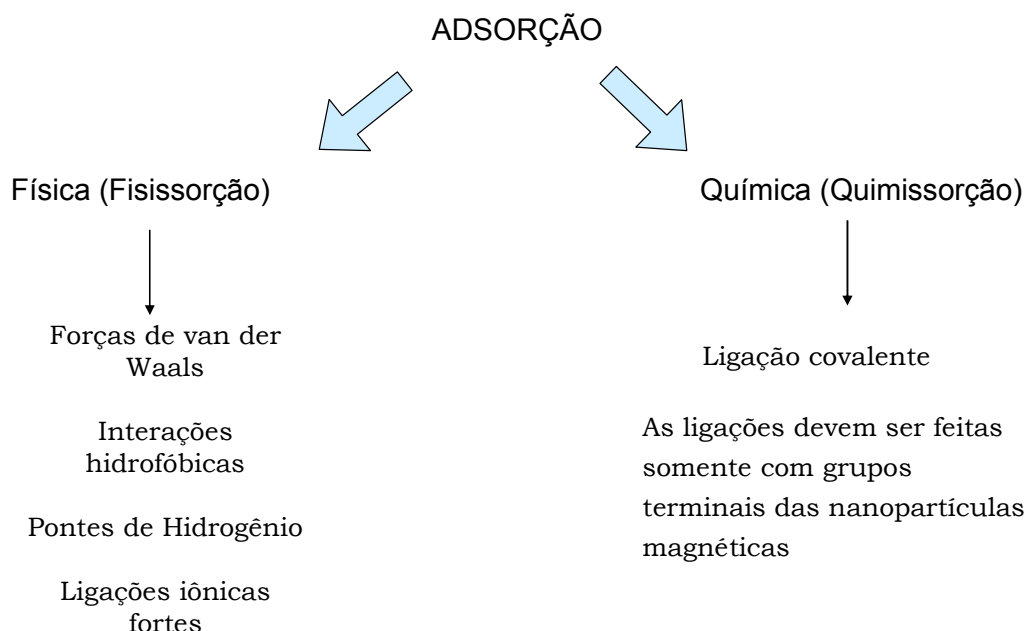
As técnicas de imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas são baseadas em um processo chave, conhecido por adsorção.

Existem dois tipos de processo de adsorção que precisam ser distinguidos. O primeiro é chamado de fisissorção (adsorção física) e neste processo estão envolvidas forças de van der Waals, interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e ligações iônicas fortes. Geralmente as moléculas são aderidas a superfície com energia de ligação menor que 10 Kcal/mol (McQuarrie e Simon, 1997).

O segundo processo de adsorção é chamado de quimissorção (adsorção química) e neste processo há a formação de ligação química

diretamente com a superfície, formação de ligação covalente. Geralmente as moléculas são aderidas a superfície com energia de ligação maior que 10 Kcal/mol (McQuarrie e Simon, 1997).

Adsorção é o processo de carregar ou ligar moléculas na superfície de um material e é um processo exotérmico, $\Delta H_{ads} < 0$. O esquema abaixo representa resumidamente quais são os dois métodos utilizados para imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas (Sing *et al.*, 1985).



Esquema 3: Dois processos utilizados para a imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas.

Embora as maiorias dos artigos encontrados em literatura relacionam adsorção a somente processos físicos, onde não há a formação de ligação covalente e dependendo de como é realizado o processo de imobilização quimicamente, chamam de imobilização por ligação covalente ou *cross-linking*. Mas vale ressaltar que adsorção é o processo que comanda todas as técnicas de imobilização utilizadas até o momento (Sing *et al.*, 1985).

O desenvolvimento de técnicas de imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas proporciona a possibilidade de melhoria na quantidade de enzima imobilizada devido sua alta área superficial. Muitas mudanças de técnicas descritas (Liao e Chen, 2001; Chen e Lin, 2003; Mikhaylova *et al.*, 2004; Shu *et al.*, 2006; Hong *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007; Gan *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2008; Srinivasan e Huang, 2008; Yong *et al.*, 2008) sobre imobilização de enzimas (na forma pura ou como um extrato) em nanopartículas magnéticas não se preocupam com o elevado grau de pureza da enzima, pois o interesse principal é a redução de custos do processo industrial. Deste modo, não existe a necessidade de gastos com purificação, sabendo que o processo levará praticamente ao mesmo resultado que sem a purificação.

Por exemplo, técnicas que utilizam quimissorção usando reagentes *crosslinking* podem resultar em ligações extremamente fortes que previnem a perda da enzima durante todo o processo reacional, inclusive a reciclagem. Porém, esses reagentes, por exemplo, o glutaraldeído que é um di-aldeído, pode potencialmente reagir com os aminoácidos necessários para atividade catalítica ou ainda causar uma polimerização não específica. A complexidade de imobilizar covalentemente também depende do ligante que está sendo usado e o número de etapas reacionais para a modificação química da nanopartícula magnética (Johnson *et al.*, 2008).

Além do glutaraldeído, outro reagente amplamente utilizado é o EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida). Esse reagente é aplicado para ativar grupos carboxila do suporte e promover a imobilização de enzimas no

suporte. O EDC reage com grupos carboxila formando O-acilisouréia que reage rapidamente com grupos amino da enzima (Hung *et al.*, 2003).

Já o processo que utiliza fisissorção é mais simples, pois não requer a adição de reagentes para o processo de imobilização. Este processo necessita apenas de uma prévia funcionalização da nanopartícula magnética geralmente com reagentes de silício que permitem funcionalizá-las com grupos aminos que podem interagir por ponte de hidrogênio com a enzima (Yamaura *et al.*, 2004) (Majewski e Thierry, 2007). A desvantagem deste processo é a perda de enzima (dessorção) durante o processo de lavagem após imobilização e também no processo de reciclagem.

2.3.3 Nanoestrutura e estabilidade da enzima

Este tópico não pretende explicar todos os detalhes de métodos de estabilização de enzimas, mas descrever recentes desenvolvimentos no campo da nanotecnologia para estabilização de enzimas (Kim *et al.*, 2006). Várias nanoestruturas, geralmente possuem uma alta área superficial para a imobilização de enzimas.

Imobilização de enzimas tem sido uma estratégia muito comum para muitas das aplicações em larga escala para conseguir facilidade no reuso do catalisador, operação contínua e purificação do produto. No entanto, uma baixa eficiência catalítica de enzimas imobilizadas frequentemente limita o desenvolvimento de bioprocessos em larga escala para competir com processos químicos tradicionais (Caruana, 1997; Demirjian *et al.*, 1999). A eficiência biocatalítica pode ser atingido manipulando-se as estruturas dos

suportes onde as enzimas são imobilizadas. Materiais nanoestruturados no qual as enzimas são ligadas em sua superfície apresentam uma maior quantidade de enzima por unidade de suporte. A redução do tamanho do material que carrega a enzima pode geralmente melhorar a eficiência de enzimas imobilizadas. No caso de imobilização apenas física (fisissorção), partículas pequenas podem providenciar uma alta área superficial para a imobilização de enzimas, levando a uma alta quantidade de enzimas carregadas por unidade de massa de partículas (Jia *et al.*, 2003).

Recentemente, tem sido crescente o interesse pelo uso de nanopartículas como suportes para imobilização de enzimas (Daubresse *et al.*, 1996; Martins *et al.*, 1996; Caruso e Schuler, 2000; Chen e Su, 2001; Liao e Chen, 2001; Jia *et al.*, 2003; Lei *et al.*, 2004). Nanopartículas providenciam uma série de parâmetros que aperfeiçoam o processo de imobilização: limitação difusional mínima, área superficial máxima por unidade de massa e alto carregamento de enzima.

Estudos teóricos e experimentais demonstraram que a mobilidade da partícula, no qual é governada pelo tamanho da partícula e viscosidade da solução, poderia causar um impacto positivo na atividade intrínseca de enzimas ligadas a partículas (Jia *et al.*, 2003). Outro importante comportamento de nanopartículas é a possibilidade de catálise heterogênea, pois isso facilita a remoção do catalisador do meio reacional, assim obtendo melhor controle do processo.

Muitos estudos com nanopartículas têm sido desenvolvidos para melhorar não só a estabilidade da enzima, como melhorar sua atividade e quantidade de enzima imobilizada por unidade de massa. Recentemente um

artigo de Dyal et.al reportou os resultados obtidos usando nanopartículas magnéticas para a imobilização de enzimas (Dyal *et al.*, 2003). A imobilização de uma lipase levou a uma alta estabilidade, sendo o complexo enzima-nanopartícula magnética estocada por um mês. Além disso, o sistema mostrou facilidade de separação do catalisador do meio reacional usando um campo magnético externo. Interessantemente, a atividade específica (representada pela atividade da enzima por unidade de massa) de lipase ligada covalentemente em nanopartículas magnéticas foi mais baixa do que para enzimas ligadas por fisissorção (sem ligação covalente). Foi sugerido pelos autores que a alta atividade no último caso existiu por uma atividade superestimada pela enzima desorvida na solução reacional, levando a um aumento aparente da atividade enzimática. Para prevenir este efeito na medida da atividade enzimática, foram realizadas lavagens excessivas depois da imobilização da enzima, assim diminuindo erros na medida da atividade enzimática da enzima imobilizada.

O uso de nanopartículas magnéticas como suporte para a imobilização de enzimas têm aumentado relevantemente (Herdt *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008b; Vijayalakshmi *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Chaubey *et al.*, 2009; Lei *et al.*, 2009). No próximo tópico serão discutidas as principais aplicações de enzimas imobilizadas em nanopartículas magnéticas.

2.4 Aplicações de enzimas imobilizadas em nanopartículas magnéticas

As importantes propriedades físicas das nanopartículas magnéticas têm permitido sua aplicação em vários campos como a biomedicina (Pankhurst *et al.*, 2003; Gupta e Gupta, 2005; Ito *et al.*, 2005; Tartaj *et al.*, 2005; Atanasijevic *et al.*, 2006), desenvolvimento de biosensores (Vijayalakshmi *et al.*, 2008), purificação de água (Savage e Diallo, 2005), remediação ambiental (Zhang, 2003; Liu, 2006; Tratnyek e Johnson, 2006).

Superparamagnetismo de nanopartículas magnéticas consiste na resposta ao campo magnético aplicado, neste caso existe apenas um domínio magnético, as partículas que apresentam à temperatura ambiente um único domínio magnético são chamadas de superparamagnéticas. O domínio magnético representa um agrupamento de átomos no qual todos os momentos magnéticos atômicos estão alinhados. Nos materiais, geralmente os vetores de magnetização dos domínios estão arrançados de tal forma que a soma vetorial acabe ficando próxima à zero, levando a uma redução da energia magnetoestática e à aproximação da condição de equilíbrio, correspondente ao mínimo de energia potencial armazenada. Esta propriedade é dependente do tamanho (Figura 8) e isto é extremamente utilizado para aplicações que utilizam um campo magnético.



Figura 8: Influência do tamanho das partículas no comportamento do vetor campo magnético. Na partícula de 20 nm há apenas um único domínio magnético, enquanto na de 200nm existem vários domínios magnéticos

Além disto, a alta área superficial das nanopartículas magnéticas possibilita aplicá-las como eficientes suportes para imobilização de biomoléculas. Devido a estas características, várias nanopartículas-biomoléculas híbridas foram desenvolvidas para tratamento de doenças e diagnósticos (Katz e Willner, 2004; Gupta e Gupta, 2005; Neuberger *et al.*, 2005).

Enzimas têm sido utilizadas na indústria como catalisadores para processos ou para produção de enantiômeros químicos específicos. Os sistemas de nanopartícula magnética e enzima são de grande interesse para aplicações biotecnológicas, onde alta especificidade catalítica, tempo reacional prolongado e, em alguns casos, a habilidade de reciclar um biocatalisador caro são necessários (Swanson, 1999; Alcalde *et al.*, 2006).

Pesquisadores estão melhorando tecnologias atuais, e desenvolvendo novas aplicações que utilizam enzimas imobilizadas em nanopartículas magnéticas. Várias enzimas atualmente usadas em biotecnologia, incluindo glucose oxidase e peroxidase, têm sido imobilizadas covalentemente em nanopartículas magnéticas usando diferentes ligantes (Rossi *et al.*, 2004). A glucose oxidase, uma enzima usada em sensores que medem a glicose no sangue, foi covalentemente imobilizada em nanopartículas magnéticas e altamente estável sobre uma alta variedade de condições de temperatura e pH, além disto manteve sua atividade por 3 meses (Rossi *et al.*, 2004).

A lipase de *Candida rugosa* foi covalentemente imobilizada em nanopartículas magnéticas através do glutaraldeído e apresentou atividade enzimática significativa após um mês de estocagem (Dyal *et al.*, 2003).

A α -quimitropisina foi imobilizada covalentemente em nanogels magnéticos amino-funcionalizados usando EDC(1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) e apresentou atividade enzimática significativa após um 36 dias de estocagem (Hong *et al.*, 2007).

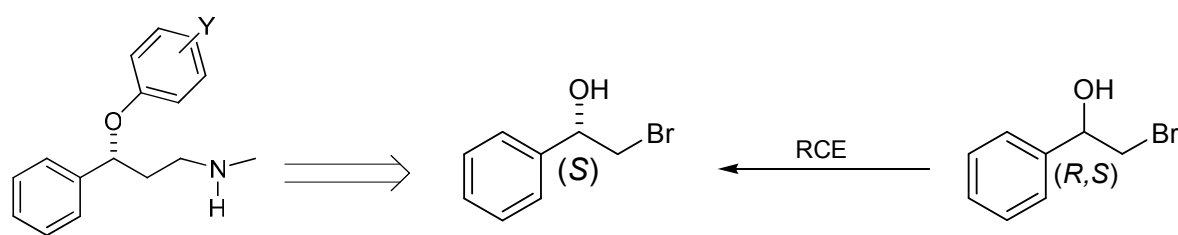
Estreptoquinase, utilizada como agente terapêutico tem sido covalentemente imobilizada em nanopartículas magnéticas através de ativação por carbodiimida (EDC) para uso em quebra localizada de coágulos de sangue *in vivo*. Propriedades magnéticas da partícula estreptoquinase permitem o foco no tratamento da localização exata do coágulo, reduzindo a porção de enzima necessária e reduzindo o risco de resposta imunológica (Koneracka *et al.*, 2002).

Outra grande utilização de enzimas imobilizadas em nanopartículas magnéticas é na resolução cinética de alcoóis para obtenção de intermediários de fármacos ou para obtenção de compostos enantiomericamente puros (Reetz *et al.*, 1998; Chen e Lin, 2003; Dyal *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Neuberger *et al.*, 2005; Stevens *et al.*, 2005; Chaubey *et al.*, 2006; Shaw *et al.*, 2006; Shu *et al.*, 2006; Bhushan *et al.*, 2007; Bhushan *et al.*, 2008; Srinivasan e Huang, 2008; Yong *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Chaubey *et al.*, 2009; Lei *et al.*, 2009)

3. Objetivos

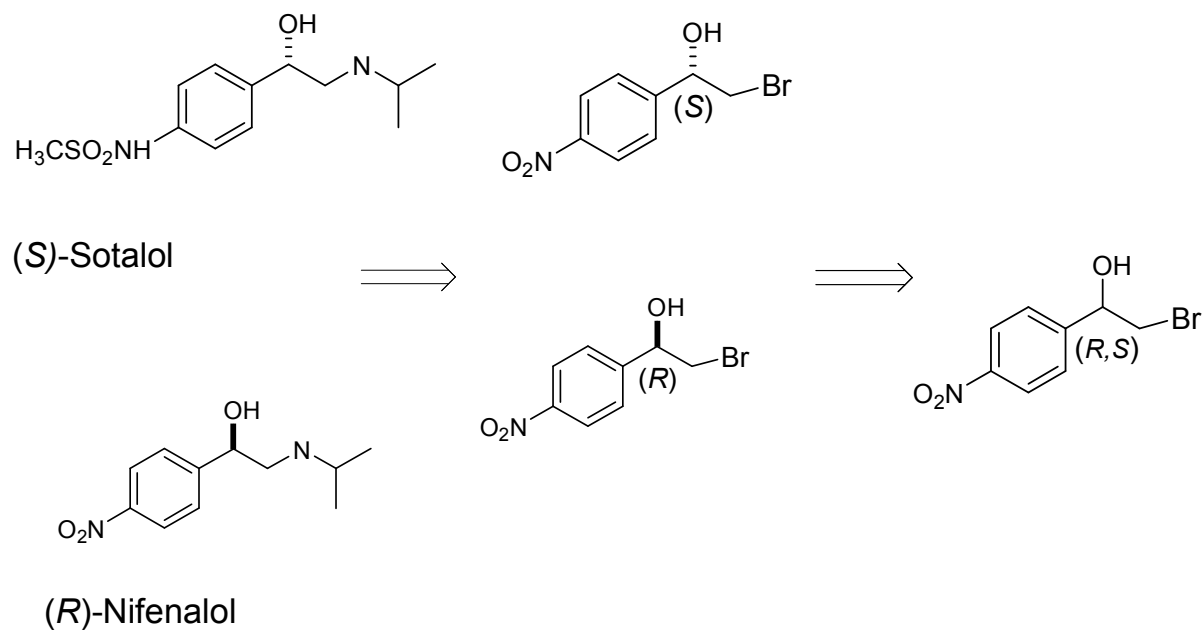
O principal objetivo deste trabalho foi à imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* em nanopartículas magnéticas, empregando diferentes metodologias de imobilização. A atividade enzimática da lipase imobilizada foi avaliada na reação de transesterificação enantiosseletiva aplicada à resolução cinética de alcoóis secundários. Neste trabalho, estudou-se a influência do solvente, a temperatura, o agente acilante e o tipo de imobilização na transesterificação enantiosseletiva de feniletanóis catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em nanopartículas magnéticas. Além disso, a reciclagem da enzima imobilizada e o tempo de estocagem dessa lipase foram avaliados.

Os α -bromo-feniletanóis selecionados para esse estudo são importantes intermediários quirais na síntese de diferentes fármacos (Solatol, Nifenalol, Fluoxetina, Tomoxetina e Nisoxetina) como mostrado no Esquema 4.



(R)-fluoxetina

Tomoxetina:	Y = 2 - CH ₃
Nisoxetina:	Y = 2 - OCH ₃
Fluoxetina:	Y = 4 - CF ₃



Esquema 4: Análise retrossintética dos fármacos quirais selecionados

No quadro 1, encontram-se os fármacos selecionados e sua atividade biológica.

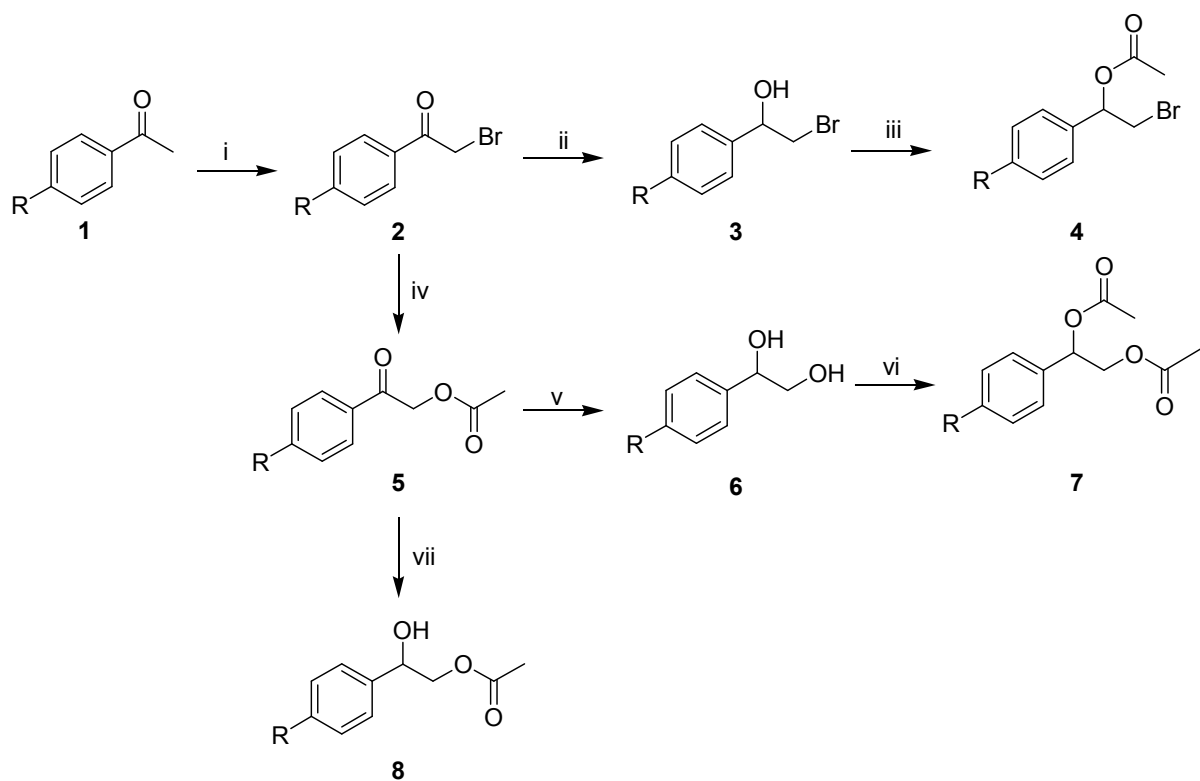
Composto	Atividade biológica
Sotalol (Brodfehrer <i>et al.</i> , 1997)	antiarrítmico
Nifenalol (Yang <i>et al.</i> , 2006)	antiarrítmico
Tomoxetina (Kumar <i>et al.</i> , 2004)	antidepressivo
Fluoxetina (Corey e Reichard, 1989)	antidepressivo
Nisoxetina (Wirth <i>et al.</i> , 2000)	antidepressivo

Quadro 1

4. Resultados e Discussão

4.1 Síntese dos álcoois e ésteres racêmicos

No caso dos fármacos Solatol, Nifenalol e Fluoxetina os intermediários quirais são os álcoois beta-substituídos **3a-b** e **6a-b**. Estes álcoois e seus respectivos ésteres foram sintetizados conforme mostrado no Esquema 5.



R= H (a), NO₂ (b)

(i) Br₂/AcOH; (ii, v, vii) NaBH₄, metanol; (iii, vi) DMAP, anidrido acético, trietilamina, CH₂Cl₂;

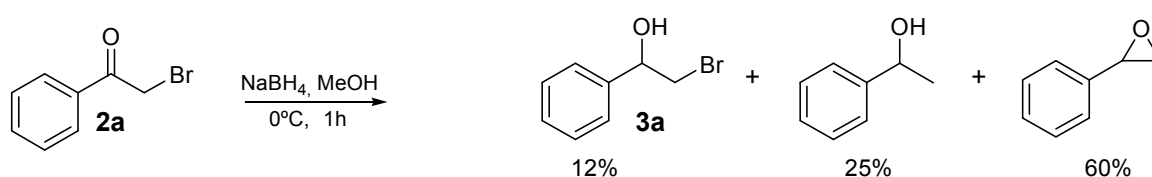
(iv) acetato de sódio, 18-crown-6, THF seco.

Esquema 5: Rota sintética para a síntese dos álcoois racêmicos

A etapa *i* consistiu na inserção de um bromo a molécula. Essa reação ocorreu em ácido acético glacial e bromo. O cuidado nesta reação é que não ocorra a entrada de 2 bromos na molécula, para isso trabalha-se em meio ácido com a proporção de 1 equivalente de bromo para um equivalente de

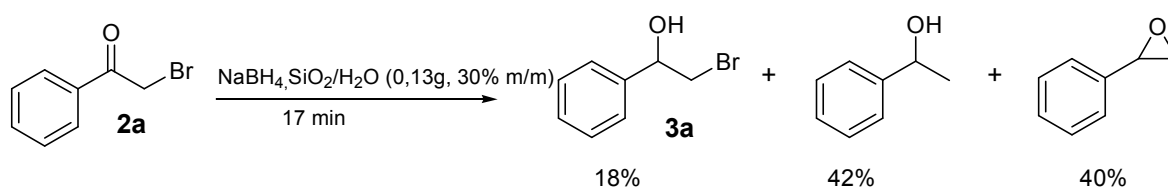
cetona (Clayden *et al.*, 2000). Este procedimento levou a formação do produto **2** com 81% de rendimento.

A etapa *ii* consistiu em uma redução da carbonila do composto **2a** com o agente redutor borohidreto de sódio. Esta reação foi realizada em banho de gelo para evitar a formação de subprodutos. Mas, percebeu-se através de análise espectroscópica que nesta reação estava ocorrendo a formação do epóxido e do feniletanol como subprodutos (Esquema 6).



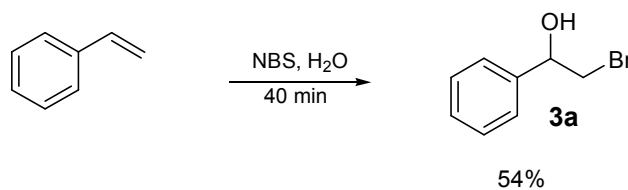
Esquema 6: Síntese do (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol através da redução em banho de gelo, 1h, metanol e borohidreto de sódio.

Para tentar solucionar este problema, encontrou-se um artigo na literatura (Zeynizadeh e Behyar, 2005) propondo a redução de carbonila utilizando borohidreto de sódio, sílica, água e sem solvente orgânico. Este procedimento foi aplicado levando a formação do álcool desejado com 18% de rendimento para **3a** (Esquema 7) e 12% para **3b**.



Esquema 7: Síntese do (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol através da redução em temperatura ambiente, 17 minutos, borohidreto de sódio e sílica em água.

Devido aos baixos rendimentos obtidos no processo de obtenção deste álcool racêmico **3a**. Buscou-se outra metodologia (Guss e Rosenthal, 1955) de síntese para **3a** utilizando estireno, água e NBS. O produto desejado **3a** foi obtido com 54 % de rendimento (Esquema 8).



Esquema 8: Síntese do (*RS*)-2-bromo-1-(fenil)etanol através do estireno em água com NBS em 40 min.

A etapa *iii* consistiu em uma acetilação dos alcoóis **3a-b** (Esquema 5) (Virsu *et al.*, 2001). O acetilante nesta reação foi o anidrido acético. A reação foi realizada utilizando DMAP como catalisador, Et₃N para restaurar o catalisador e diclorometano como solvente. O sistema reacional foi mantido a temperatura ambiente e após 24 horas levou a formação do composto acetilado **4a** com 63% de rendimento e 53 % para **4b**.

A etapa *iv* consistiu em uma acetoxilação dos compostos **2a-b** (Esquema 5), onde se utilizou o acetato de sódio. O 18-*crown*-6, um éter de coroa composto de 12 carbonos e 6 oxigênios, foi utilizado para complexar com o sódio do acetato de sódio, e deixar o oxigênio mais nucleofílico. O ataque nucleofílico ocorreu no carbono ligado ao bromo. O THF anidro foi utilizado como solvente nesta reação. Este procedimento levou ao produto **5a** com 91% de rendimento e 87% para **5b**.

A etapa *v* consistiu na redução de uma carbonila de cetona e uma carbonila de éster dos compostos **5a-b** (Esquema 5). O agente redutor utilizado foi o borohidreto de sódio. O sistema reacional foi mantido a temperatura ambiente durante 4 horas, para levar ao diol **6a** com 56% de rendimento e 51% para **6b**.

A etapa *vi* consistiu na diacetilação dos compostos **6a-b** (Esquema 5) (Virsu *et al.*, 2001). Esta reação foi realizada utilizando anidrido acético, DMAP como catalisador, Et₃N para restaurar o catalisador e diclorometano

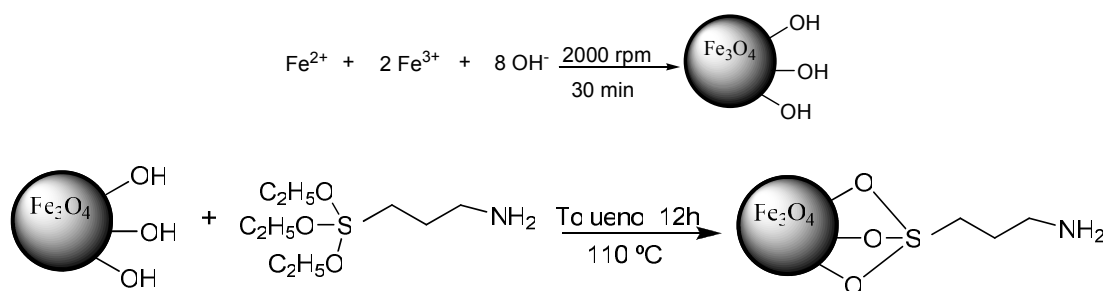
como solvente. O sistema reacional foi mantido a temperatura ambiente e após 24 horas o composto diacetilado foi isolado com 66% de rendimento para **7a** e 56% para **7b**.

A etapa *vii* consistiu em uma redução e neste caso somente a carbonila da cetona foi reduzida dos compostos **5a-b** (Esquema 5). O agente redutor escolhido foi o borohidreto de sódio e a reação se processou em banho de gelo para que não ocorresse o ataque nucleofílico na carbonila do éster. Após 1 hora de reação houve a formação do álcool **8a** com 57% de rendimento e 47% para **8b**.

4.2 Síntese das nanopartículas magnéticas funcionalizadas com o grupo amino

Essa parte do trabalho foi realizada em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Henrique Eisi Toma do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

A síntese das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (12 nm) foi realizada a partir do método de co-precipitação de Fe^{2+} e Fe^{3+} em NaOH, seguido da reação de silanização com APTES (amino-propil-trietóxisilano) como mostrado no Esquema 9.



Esquema 9: Obtenção da nanopartícula magnética silanizada

As nanopartículas magnéticas sem revestimento obtidas neste trabalho são conhecidas por magnetita e possuem fórmula de um spinel invertido (Fe_3O_4) onde a estrutura cristalina para uma célula unitária é mostrada na Figura 9.

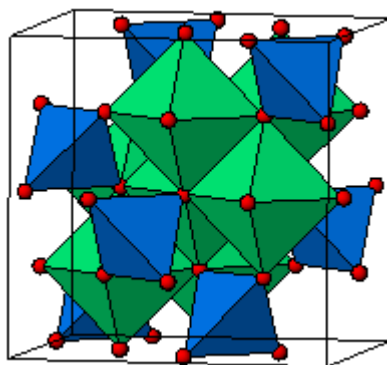


Figura 9: Poliedro de Ferro na célula unitária de magnetita (azul é ocupado por Fe^{3+} , verde é ocupado por Fe^{2+} , Fe^{3+} e oxigênio em vermelho)

A magnetita nanoparticulada sem revestimento é facilmente oxidada ao ar, levando a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), mas sem perda de magnetização. Para evitar que isto ocorra logo após a síntese da magnetita nanoparticulada foi realizada a sua funcionalização química com APTES, como mostrado acima. Em nanotecnologia, muitas das aplicações dependem de uma modificação prévia da superfície das nanopartículas com um composto que contenha grupos funcionais de interesse, capazes de interagir com analitos, fármacos, toxinas ou poluentes. Neste trabalho, as nanopartículas magnéticas

funcionalizadas foram aplicadas em processo biocatalíticos, onde o grupo terminal da nanopartícula magnética funcionalizada interage com a enzima de interesse.

Através da espectroscopia de infravermelho, fez-se a caracterização das nanopartículas magnéticas silanizadas para comparação com a magnetita nanoparticulada sem revestimento.

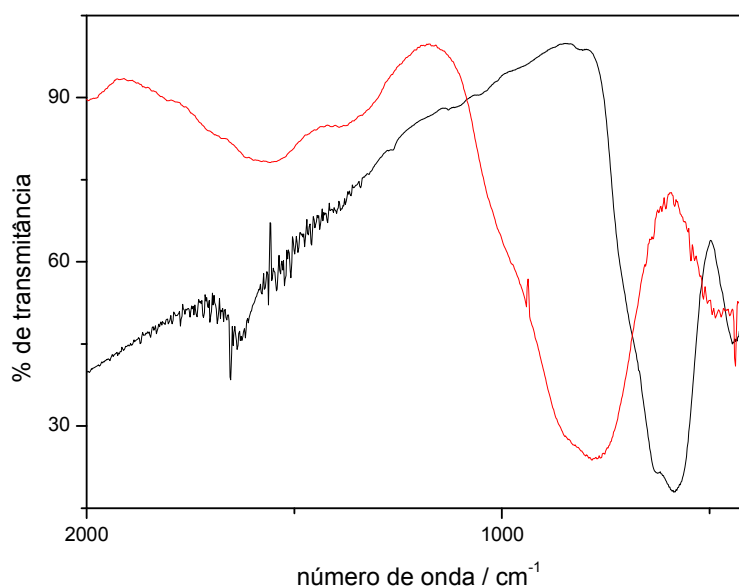


Figura 10: Espectro de infravermelho das nanopartículas de magnetita não silanizadas (preto) e silanizadas (vermelho).

Pode-se notar na Figura 10, comparação entre o espectro de infravermelho das nanopartículas não silanizadas e silanizadas, que no espectro de infravermelho das nanopartículas não silanizadas existem duas bandas características das nanopartículas de magnetita em 586 cm^{-1} e 629 cm^{-1} , correspondentes à ligação Fe-O.

Já no espectro das nanopartículas silanizadas, as bandas características das nanopartículas de magnetita não silanizadas estão deslocadas, sendo encontradas em 484 cm^{-1} , 783 cm^{-1} e 845 cm^{-1} devido à interação silano – magnetita. Observam-se ainda as bandas adicionais em

1392 cm^{-1} , 1562 cm^{-1} e 1676 cm^{-1} características de estiramento C-N e das vibrações angulares simétricas N-H de amina secundária e N-H de amina primária, respectivamente.

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram obtidas no laboratório do Prof. Dr. Pedro Kiyohara do Instituto de Física-USP. A partir dessa análise, observou-se a formação das nanopartículas funcionalizadas com um diâmetro médio de 12 nm (Figura 11).

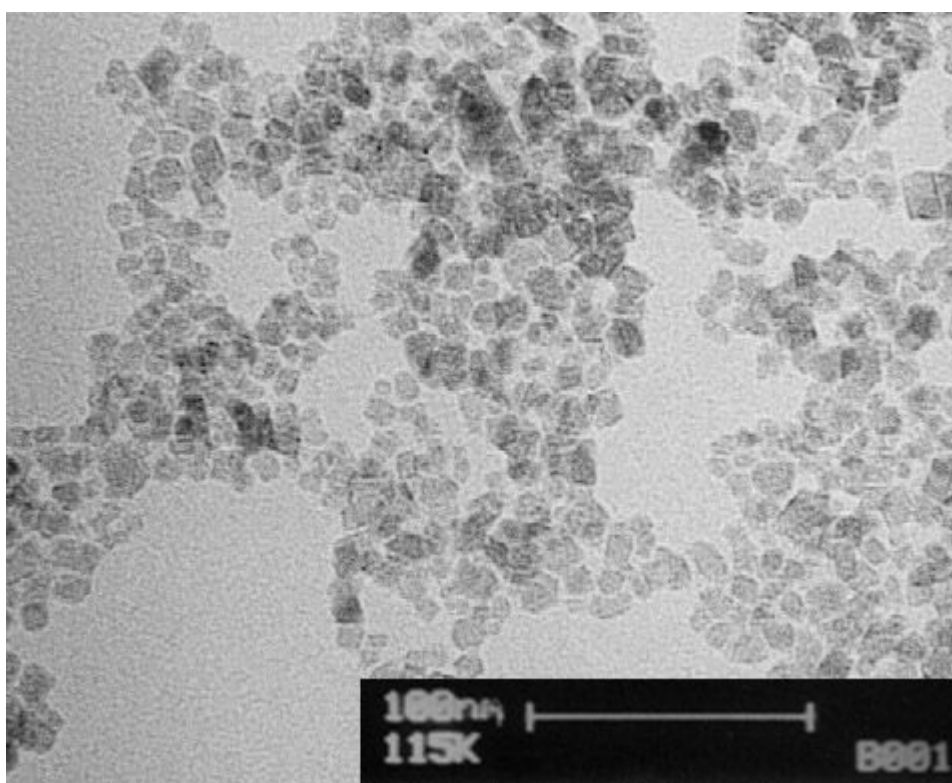


Figura 11: Nanopartículas obtidas com diâmetro médio de 12 nm. Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

4.3 Preparação da solução enzimática da lipase de *Burkholderia cepacia*

Antes de iniciar os estudos de imobilização da lipase em nanopartículas magnéticas e sua aplicação na resolução cinética de alcoóis, foi realizada a quantificação de proteína presente na solução da lipase de *Burkholderia cepacia*.

O primeiro passo foi a montagem de uma curva de calibração, utilizando como padrão uma solução da albumina de soro bovino com concentração conhecida de 1,4 mg/mL. Utilizou-se o método de Bradford (Bradford, 1976) para fazer a quantificação. Este método é baseado na interação entre o corante Coomassie G-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH da reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante Coomassie G-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm.

As medições de absorbância foram feitas 5 minutos após a adição de 3 mL do reagente de Bradford para cada 100 μ L de solução da albumina de soro bovino de concentração conhecida. Com esses dados, plotou-se o Gráfico 2 com absorbância a 595 nm *versus* concentração de proteína em mg/mL.

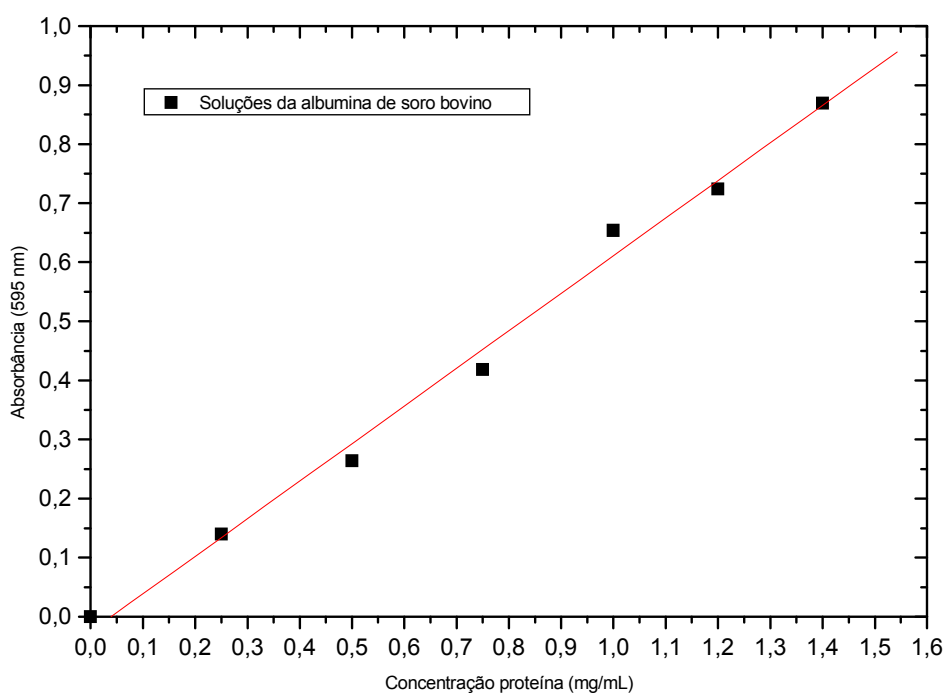


Gráfico 2: Curva analítica da albumina de soro bovino

Regressão linear

$$Y = A + B * X$$

Parâmetro	Valor	Erro
A	0,03896	0,03242
B	1,57291	0,06109
R	Desvio padrão	
0,99625	0,04832	

Inicialmente, avaliou-se a concentração de proteínas em diferentes soluções contendo a lipase de *Burkholderia cepacia* em solução tampão. Pesou-se 100, 50 e 10 mg desta lipase e adicionou-se 1 mL de solução tampão fosfato 100 mM (pH = 7). Após essa diluição, centrifugou-se a 6000 rpm durante 3 minutos. Recolheu-se 100 µL do sobrenadante, adicionou-se 3 mL de Reagente de Bradford, aguardou-se 5 minutos e mediu-se a absorbância em 595 nm.

O melhor resultado foi para 100 mg de lipase em 1 mL de solução tampão fosfato 100 mM (pH = 7), considerando o fato do valor de absorbância estar numa faixa de leitura confiável (0,3 A), e por ter sido encontrado uma maior concentração de proteínas nesta solução. Este resultado foi plotado no Gráfico 3, dando uma concentração de aproximadamente 0,55 mg/mL.

No Gráfico 3 foram plotados os dados utilizando menores concentrações de proteína, isso foi realizado porque a faixa da concentração

de proteína presente na lipase de *Burkholderia cepacia* estava entre 0,1-0,6 mg/mL.

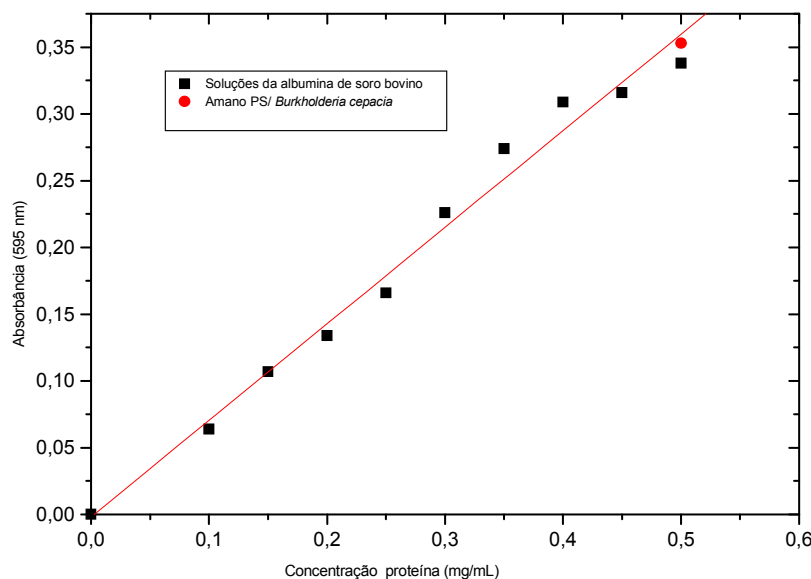


Gráfico 3: Curva de quantificação da lipase de *Burkholderia cepacia*

Regressão linear
 $Y = A + B * X$

Parâmetro	Valor	Erro
A	-0,00188	0,00999
B	0,72325	0,03225

R	Desvio padrão	
0,99214	0,0155	

Nesta etapa do trabalho foi avaliado também se a nanopartícula magnética possuía algum tipo de variação no pH de diferentes concentrações de solução tampão fosfato que pudesse atrapalhar as medidas de quantificação de proteína. Para isso, pesou-se 10, 20 e 30 mg de nanopartículas magnéticas funcionalizadas e adicionou-se 1 mL de solução tampão fosfato de 25 mM (pH = 7) e 100 mM (pH = 7). Deixou-se em 800 rpm de agitação e após 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas mediu-se o pH do meio. Utilizando a solução tampão fosfato 25 mM com as nanopartículas

magnéticas houve uma grande variação de pH, a partir de 1 hora o pH da reação estava entre 7 e 8. Após a segunda hora até a sexta hora, o pH foi alterado para 10. Entretanto, utilizando a solução tampão fosfato 100 mM com as nanopartículas magnéticas o pH durante as 6 horas manteve-se entre 7 e 8. Como as nanopartículas magnéticas possuem grupo amino que podem interagir com o reagente de Bradford, o branco utilizado na medida e cálculos de quantidade de proteína foi as nanopartículas magnéticas em solução tampão fosfato 100 mM (pH = 7).

4.4 Imobilização por fisissorção

Após ter-se estabelecido qual a melhor solução tampão a ser utilizada no trabalho, a solução da lipase de *Burkholderia cepacia* de concentração conhecida, iniciaram-se os estudos para a imobilização da lipase. Estudaram-se os seguintes parâmetros para o processo de imobilização: tempo de imobilização, melhor relação entre quantidade de nanopartículas magnéticas e a solução de lipase de *Burkholderia cepacia*, além disto, qual o melhor número de lavagens para ser utilizado após o processo de imobilização. O método de imobilização por fisissorção é baseado nas interações de Van der Waals, forças eletrostáticas, ligações iônicas fortes e interações hidrofóbicas. A interação entre a enzima e a nanopartícula magnética (Figura 12) se dá apenas fisicamente, sem a formação de ligação covalente.

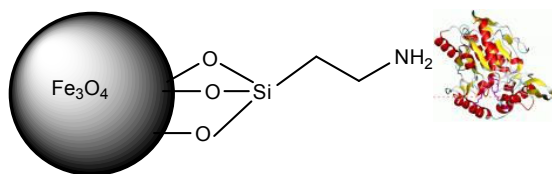


Figura 12: Interação entre a nanopartícula magnética funcionalizada com o grupo amina e a lipase de *Burkholderia cepacia* por fisissorção.

4.4.1 Tempo de imobilização

O primeiro parâmetro a ser estudado foi qual o tempo necessário para que se pudesse imobilizar a maior quantidade de proteínas em inicialmente 30 mg de nanopartículas magnéticas.

Baseado em estudos anteriores (Dyal *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2008) de tempo de imobilização de lipases em nanopartículas magnéticas. Iniciaram-se os testes na temperatura de 32 °C, 800 rpm em *thermomixer*®, 1 hora de reação e 30 mg de nanopartículas magnéticas para 1 mL de solução enzimática de concentração de 0,55 mg/mL. As alíquotas do sobrenadante que continham a enzima não imobilizada foram recolhidas em intervalos de tempo de 10 em 10 minutos. Os resultados dessas medidas foram plotados no Gráfico 4.

Pode-se observar através do Gráfico 4 que à medida que aumenta o tempo há uma diminuição da absorbância no sobrenadante. Através do método de Bradford pode-se quantificar a proteína não imobilizada presente no sobrenadante.

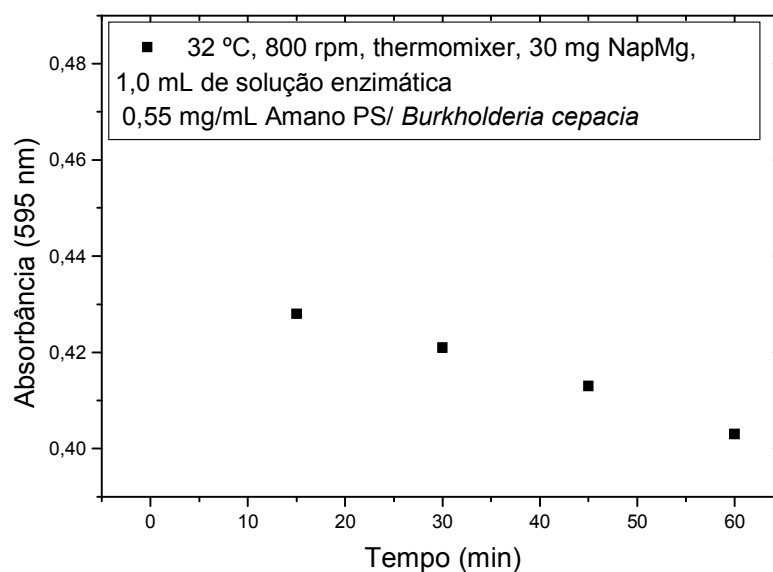


Gráfico 4: Absorbância versus tempo de imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* em nanopartículas magnéticas.

Essa quantificação foi realizada através da alíquota retirada do sobrenadante da reação. Sabe-se que em 1 mL de solução enzimática (antes de entrar em contato com as nanopartículas magnéticas) possuem 0,55 mg/mL. A cada 10 minutos foram recolhidas alíquotas e medidas as absorbâncias que em seguida foram analisadas na curva de calibração com a albumina do soro bovino, resultando em uma quantidade de proteína em mg/mL. Sabe-se que a absorbância é proporcional a quantidade de proteína livre no processo de imobilização. Assim, após o tempo de imobilização de 1 hora, observou-se que no sobrenadante continha menor concentração de proteína livre, conseqüentemente uma maior concentração de proteína imobilizada.

No intuito de aumentar a concentração de enzima imobilizada em nanopartículas magnéticas, aumentou-se o tempo de imobilização para 2 horas, mas ao invés de imobilizar mais enzima ocorreu um processo de dessorção, resultando em 30 mg de NapMg:0,17 mg de proteína para

fisissorção. Enquanto para 1 hora de imobilização foram imobilizadas 0,21 mg de proteína por 30 mg de nanopartículas magnéticas.

4.4.2 Estudo da relação entre as nanopartículas magnéticas e solução da lipase de *Burkholderia cepacia*

Diante dos resultados obtidos no estudo do tempo de imobilização, utilizando 30 mg de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com o grupo amino, 1 mL de solução da lipase de *Burkholderia cepacia* de concentração de 0,55 mg/mL, 32 °C, 800 rpm e estabelecido o tempo de imobilização de 1 hora, partiu-se para o estudo de qual era a melhor relação entre a quantidade de nanopartículas magnéticas e a quantidade de solução da lipase de *Burkholderia cepacia* para que obtivéssemos a maior quantidade de enzima imobilizada. Para isso variou-se a massa das nanopartículas magnéticas em 10, 20 e 30 mg e variou-se a quantidade de solução enzimática em 0,5 e 1,0 mL com concentração de 0,55 mg/mL. Neste estudo mantiveram-se as condições reacionais de 32 °C, 800 rpm e 1 hora de tempo de imobilização.

Os resultados encontrados foram plotados no Gráfico 5, onde pode-se observar que a melhor relação encontrada foi de 30 mg de nanopartículas magnéticas para 1 mL de solução enzimática de concentração de 0,55 mg/mL, levando a aproximadamente 60 % de enzima imobilizada. Quando foi utilizados 0,5 mL de solução enzimática de mesma concentração e com 30 mg de nanopartículas magnéticas, a porcentagem de enzima imobilizada diminuiu para a aproximadamente 30 %. Houve uma diminuição de 50 % da

quantidade de enzima imobilizada, essa relação se manteve quando se variou a solução da lipase de 0,5 mL para 1,0 mL.

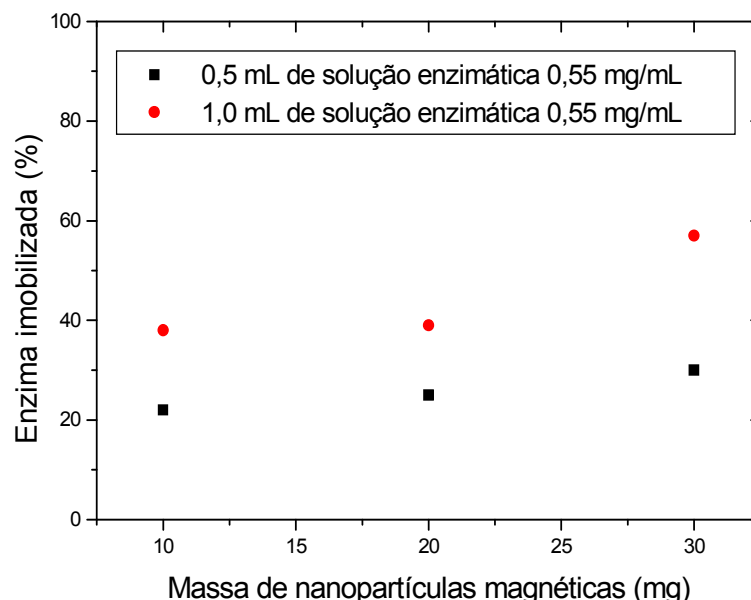


Gráfico 5: Porcentagem de enzima imobilizada versus a massa de nanopartículas magnéticas, variando-se a quantidade de solução enzimática da lipase.

Neste estudo percebeu-se que utilizando a solução da lipase com maior concentração de enzima leva a uma maior quantidade de enzima imobilizada, e pode-se concluir ainda que existe um limite que a nanopartícula magnética suporta de enzima. Observa-se que a quantidade de enzima imobilizada varia conforme o aumento da quantidade de nanopartículas magnéticas.

Para este estudo, as medidas da quantidade de enzima imobilizada foram realizadas através da quantificação da enzima não imobilizada presente no sobrenadante logo após 1 hora. O complexo enzima-nanopartícula magnética não passou por nenhum processo de lavagem. Mas sabe-se que para garantir que não haja enzima livre dispersa no meio faz-se

necessário à lavagem do complexo enzima-nanopartícula magnética para tirar qualquer excesso ou enzima não imobilizada.

4.4.3 Número de lavagens

Utilizando as mesmas relações entre nanopartículas magnéticas e solução da lipase feitas no estudo acima, iniciou-se um novo estudo para descobrir qual o melhor número de lavagens após o processo de imobilização e qual dessas relações leva a uma maior concentração de enzima imobilizada.

A Tabela 2 resume os resultados obtidos desse estudo, onde pode-se concluir que a relação 30 mg de nanopartículas magnéticas para 1 mL de solução enzimática continua sendo a melhor relação. Pode-se perceber que nesta relação existe maior quantidade de enzima imobilizada 0,28 mg/mL após 3 lavagens com 100 μ L de solução tampão fosfato 100 mM, pH = 7. Podemos perceber que mudando a quantidade para 20 mg de nanopartículas magnéticas para 1 mL de solução enzimática têm-se 0,24 mg/L de concentração de enzima imobilizada. Comparando esses dois resultados a diferença de 0,28 para 0,24 mg/mL é muito pequena. Assim, a melhor relação escolhida foi de 20 mg de nanopartículas magnéticas para 1 mL de solução enzimática, utilizando 3 lavagens após o processo de imobilização.

As amostras do sobrenadante contendo a enzima não imobilizada após as lavagens foram recolhidas após 1 hora de imobilização. A quantidade de enzima presente no sobrenadante foi subtraída da quantidade inicial de

enzima presente na solução de lipase de *Burkholderia cepacia* com concentração de 0,55 mg/mL.

Tabela 2: Relação entre a quantidade de lavagens e a concentração de enzima imobilizada

Nanopartículas mag., solução enzimática ^a	Concentração de enzima imobilizada (mg/mL)
10 mg, 0,5 mL	0,15 ^b , 0,10 ^c
20 mg, 0,5 mL	0,17 ^b , 0,12 ^c
30 mg, 0,5 mL	0,19 ^b , 0,14 ^c
10 mg, 1,0 mL	0,22 ^b , 0,19 ^c
20 mg, 1,0 mL	0,24 ^b , 0,17 ^c
30 mg, 1,0 mL	0,28 ^b , 0,15 ^c

^a 0,55 mg/mL, ^b 3 lavagens, ^c 6 lavagens

Pode-se concluir ainda que quanto maior o número de lavagens, maior o processo de dessorção da lipase de *Burkholderia cepacia*. As lavagens foram padronizadas, cada lavagem foi realizada com 100 µL de solução tampão fosfato 100 mM (pH = 7) e a quantidade de enzima imobilizada foi calculada através do método de Bradford.

4.4.4 Resolução cinética enzimática do (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol utilizando a enzima imobilizada por fisissorção

Através dos resultados obtidos nos estudos anteriores, ficou estabelecido a melhor relação de 20 mg de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com o grupo amino para 1 mL de solução da lipase de *Burkholderia cepacia* de concentração 0,55 mg/mL, o melhor número de lavagens (3 x 100 µL) com solução tampão fosfato 100 mM (pH = 7) e o melhor tempo de imobilização (1 hora) para o processo de imobilização por

fisissorção. Além disto, foi possível calcular através do método de Bradford que foram imobilizadas 0,21 mg de proteína para 20 mg de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com o grupo amino.

Iniciaram-se os estudos de resolução cinética enzimática através da reação de transesterificação enantiosseletiva, utilizando o (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol com o objetivo de obter este álcool na sua forma enantiomericamente pura, sendo este álcool um importante intermediário na síntese da fluoxetina.

As condições reacionais utilizadas inicialmente foram baseadas em literatura (Pamies e Backvall, 2002), utilizando como acilante acetato de vinila e variando os solventes em TBME e tolueno. Este primeiro estudo foi para encontrar qual a melhor quantidade de substrato a ser utilizada e também qual o melhor frasco reacional e aparelho de agitação a ser utilizado. Na Tabela 3 e na Tabela 4 encontram-se os resultados obtidos para esse estudo. A relação substrato com catalisador foi avaliada mantendo-se a mesma quantidade proteína imobilizada, variando as quantidades de substrato em 0,01; 0,05 e 0,1 mmol.

Pode-se observar que utilizando o *shaker* com rotação de 160 rpm, os resultados obtidos apresentam baixa conversão, mas pode-se concluir que a enzima é enantiosseletiva obtendo um E superior a 200. Entretanto quando se utilizou acetato de vinila como solvente e acilante na reação de transesterificação enantiosseletiva, houve um aumento de conversão, chegando a 31% (linha 1, Tabela 3), mas com perda de enantiosseletividade.

Tabela 3: Resolução cinética do (*RS*)-2-bromo-1-(fenil)etanol mediada pela lipase de *B. cepacia* imobilizada por fisissorção em nanopartícula magnética em *Shaker*[®]

Solvente (mL)	<i>rac</i> -3a (mmol)	e.e. ^a (%)		Conv. ^b (%)	<i>E</i> ^c
		3a	4a		
1 Acetato de vinila	0,01	19	41	31	135
2 TBME	0,1	2	99	2	>200
3 TBME	0,05	1	99	1	>200
4 TBME	0,01	2	99	2	>200
5 Tolueno	0,1	5	99	5	>200
6 Tolueno	0,05	1	99	1	>200
7 Tolueno	0,01	<1	99	<1	>200

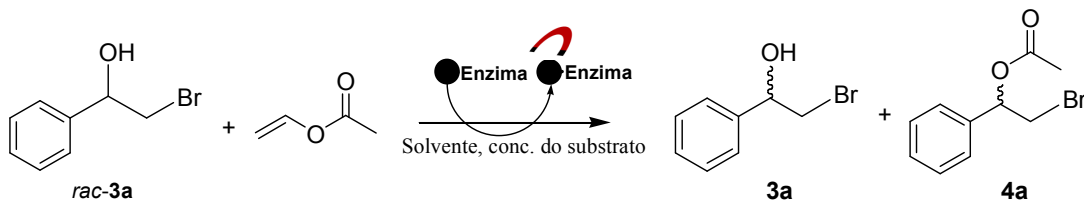
Condições reacionais: 32°C; 24 h; 30 μ L de acetato de vinila; 20 mg de NapMg:0,21 mg de proteína; 160 rpm, *shaker*, 1 mL de solvente. ^ae.e. determinado por CG; ^bC = e.e.S/(e.e.S + e.e.P), ^cE = ln{[e.e.P(1-e.e.S)]/(e.e.P+e.e.S)}/ln{[e.e.P(1+e.e.S)]/(e.e.P+e.e.S)}

Pode-se concluir que as melhores conversões utilizando uma agitação de 160 rpm, foram obtidas com o uso de tolueno como solvente e concentração de substrato de 0,1 mmol. As mesmas condições reacionais utilizando *Shaker* (160 rpm) foram aplicadas na resolução cinética enzimática do *rac*-3a usando *thermomixer*[®] (800 rpm).

Em *thermomixer*[®] um agitador de microtubos no qual a reação é realizada utilizando um microtubo de 2 mL (*ependorff*[®]), houve uma melhor interação entre as nanopartículas magnéticas, solvente e o acilante e uma maior agitação (800 rpm) que proporcionou um aumento considerável na conversão da reação de resolução cinética enzimática. A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos desse estudo, quando se observa as conversões obtidas em *thermomixer*[®] na faixa de 10-19 % enquanto que em *Shaker* (Tabela 3) a

faixa de conversão varia entre 1-5%. As comparações estão sendo realizadas apenas nas reações em que não utilizou acetato de vinila em excesso.

Tabela 4: Resolução cinética do (*RS*)-2-bromo-1-(fenil)etanol mediada pela lipase de *B. cepacia* imobilizada por fisissorção em nanopartícula magnética em um agitador de tubos (thermomixer®).



	Solvente (mL)	<i>rac</i> -3a (mmol)	e.e. ^a (%)		Conv. ^b (%)	<i>E</i> ^c
			3a	4a		
1	Acetato de vinila	0,01	29	61	30	115
2	TBME	0,1	11	99	10	>200
3	TBME	0,05	12	99	11	>200
4	TBME	0,01	15	99	13	>200
5	Tolueno	0,1	16	99	14	>200
6	Tolueno	0,05	24	99	19	>200
7	Tolueno	0,01	51	99	17	>200

Condições reacionais: 32°C; 24 h; 30 µL de acetato de vinila; 20 mg de NapMg:0,21 mg de proteína; 800 rpm, *thermomixer*®, 1 mL de solvente. ^ae.e. determinado por CG; ^bC=e.e.S/(e.e.S+e.e.P), ^cE=ln{[e.e.P(1-e.e.S)]/(e.e.P+e.e.S)}/ln{[e.e.P(1+e.e.S)]/(e.e.P+e.e.S)}

Pode-se observar na Tabela 3 e na Tabela 4 que utilizando tolueno como solvente, foram obtidos os melhores resultados em conversão. A variação da conversão foi pequena quando utilizado diferentes concentrações de substrato. Ao utilizar-se 0,1 mmol conseguiu-se uma conversão de 14 % (linha 5, Tabela 4) e ao utilizar-se 0,01 mmol a conversão foi aumentada para 17% (linha 7, Tabela 4). Como o resultado de conversão utilizando 0,05 mmol foi de 19%, uma variação muito pequena quando comparada com 0,01 mmol, decidiu-se adotar para os próximos estudos a quantidade de 0,01 mmol de substrato.

Avaliando os resultados obtidos quando se utilizou o TBME como solvente observou-se alta enantiosseletividade da enzima e conversão

variando entre 10 e 13% (linhas 2, 3 e 4 da Tabela 4). A maior conversão do álcool **3a** (13 %) foi utilizando uma concentração de substrato de 0,01 mmol, obtendo o éster **4a** com 99 % de excesso enantiomérico.

O log P, definido como logarítmo do coeficiente de partição do solvente no sistema octanol/água, é o parâmetro mais freqüentemente utilizado para descrever quantitativamente o efeito do solvente em reações catalisadas por enzimas. Os solventes que possuem $\log P < 2$ são hidrofílicos, não sendo adequados para biocatálise porque alteram fortemente a interação água/biocatalisador, tornando-o inativo ou ocasionando a desnaturação. Os solventes com log P entre 2 e 4 são também hidrofílicos, mas perturbam menos a interação água/biocatalisador. Os solventes com log P acima de 4 são hidrofóbicos, não alteram estas interações e deixam o biocatalisador no seu estado ativo. Sabe-se que o log P para o tolueno é de 2,50 enquanto para o TBME é de 1,43. A baixa conversão em éster no solvente mais polar (TBME) deve-se provavelmente ao fato deste retirar a camada de água essencial ao redor da enzima, causando distorção na conformação nativa e, portanto, alterando a atividade catalítica do biocatalisador.

A agitação orbitalar e uso de frasco de penicilina influenciaram nos resultados da reação de transesterificação enantiosseletiva, pelo fato de existir menor superfície de contato entre a nanopartícula magnética que neste caso fica depositada no fundo do frasco de penicilina, dificultando a interação com o solvente e acilante. Sabe-se que o formato do frasco reacional e o tipo de agitação influenciam nos resultados. Um excesso de acilante causou uma perda de enantiosseletividade da enzima quando se

utilizou *shaker* ou *thermomixer*[®] (agitador de microtubos) a uma rotação de 800 rpm.

Na Figura 13 segue um exemplo de cromatograma obtido para a resolução cinética enzimática (RCE) utilizando a enzima imobilizada por fisissorção. Tem-se em preto o resultado obtido para a RCE, utilizando tolueno como solvente e 0,01 mmol de substrato adotando uma agitação de 800 rpm, durante 24 horas a 32 °C. Percebe-se através do cromatograma a alta enantiosseletividade da enzima. Em vermelho está o cromatograma do éster racêmico para que se possa fazer uma comparação com o éster obtido (produto da reação de transesterificação enantiosseletiva). Nota-se que a enzima tem preferência por apenas um dos enantiômeros do éster e que há uma baixa conversão nesta reação, isto pode ser observado comparando-se o cromatograma do álcool racêmico com o cromatograma da RCE, observa-se os picos dos dois enantiômeros, com o consumo preferencial de um dos enantiômeros.

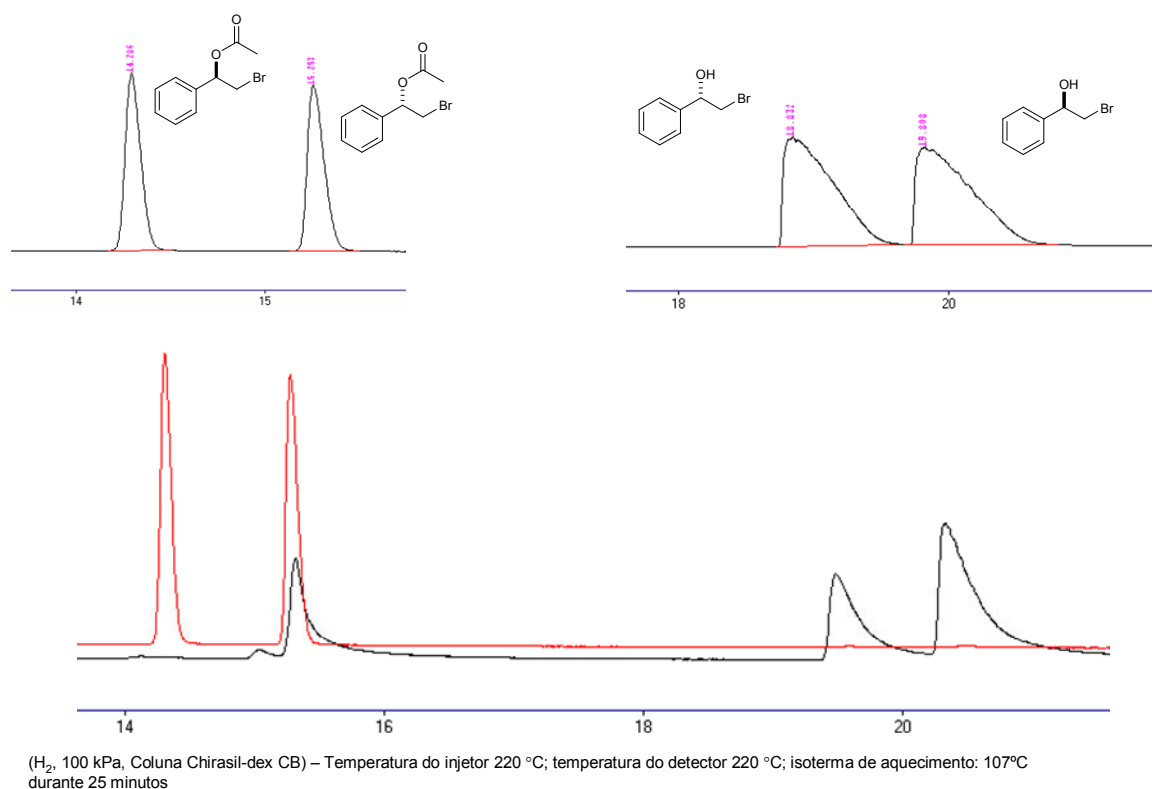
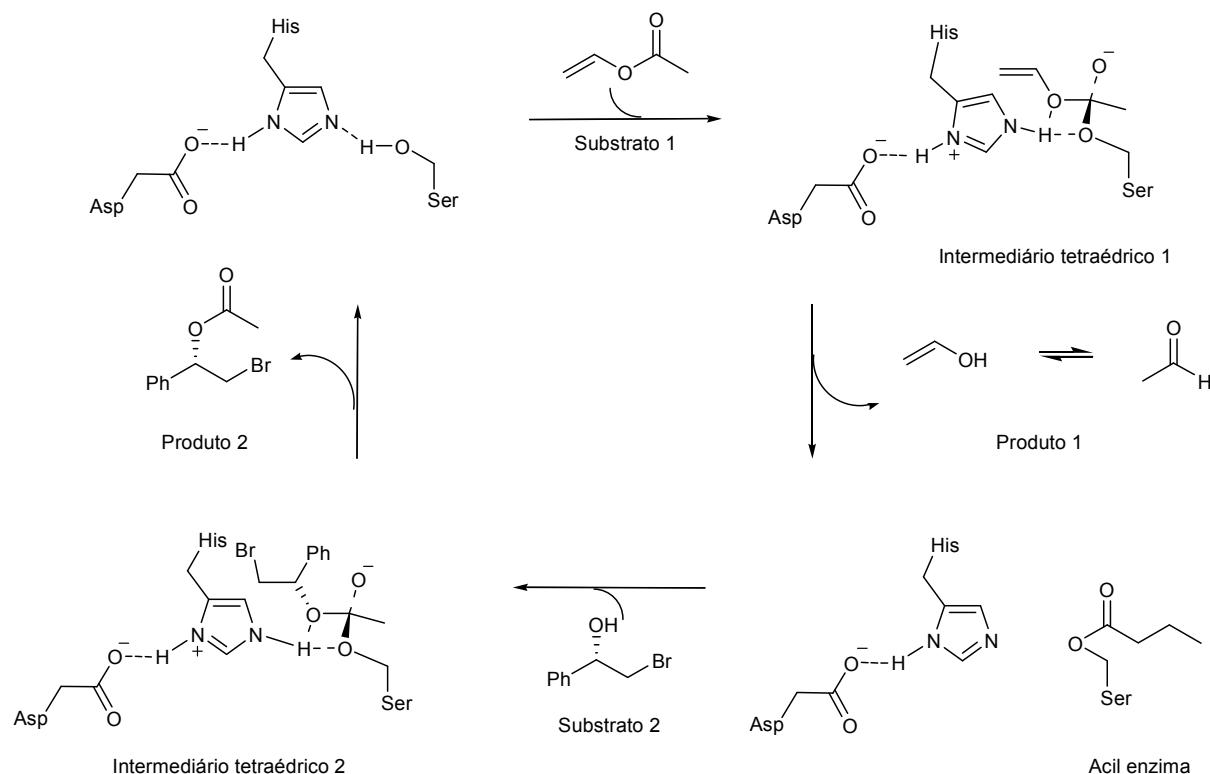


Figura 13: Cromatograma obtido para resolução cinética enzimática do (*RS*)-2-bromo-1-(fenil)etanol através da reação de transesterificação enantiosseletiva utilizando a enzima imobilizada por fisissorção.

O mecanismo da reação de transesterificação enantiosseletiva catalisada por lipase é mostrado no Esquema 10. A lipase de *Burkholderia cepacia* possui em seu sítio ativo a presença da tríade catalítica formada por resíduos de aminoácidos da serina, histidina e aspartato.



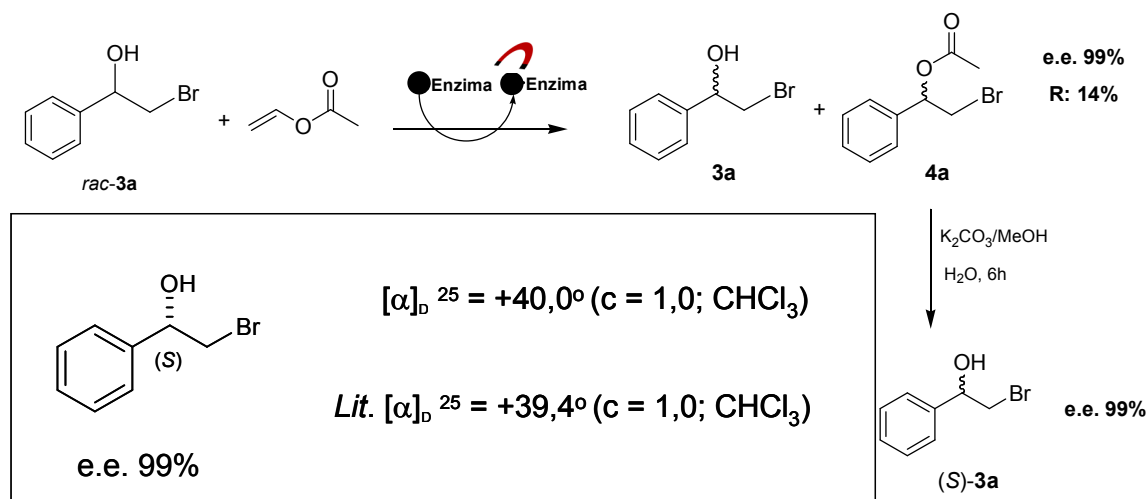
Esquema 10: Mecanismo da reação de resolução cinética enzimática para o (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol

Dois intermediários tetraédricos diferentes estão envolvidos na formação das ligações que ocorrem durante o processo catalítico. O primeiro intermediário é gerado durante a transformação do complexo de Michaelis-Menten entre a enzima e o doador acila (éster vinílico) e uma espécie intermediária denominada acil-enzima. Normalmente são empregados ésteres vinílicos como doadores acila, neste caso o enol formado após acilação do resíduo da serina é rapidamente transformado em seu tautômero (acetaldeído), que é mais estável. Essa estratégia desloca o equilíbrio da reação na direção dos produtos por impedir uma possível competição nucleofílica entre o álcool formado nesta etapa e o substrato.

O segundo intermediário ocorre quando a espécie intermediária acil-enzima é clivada pelo álcool, formando um éster como produto.

4.4.4.1 Determinação do $[\alpha]_D$ e rendimento isolado do (S)-2-bromo-1-(fenil)etanol

Para o cálculo de $[\alpha]_D$ e rendimento isolado da reação de transesterificação enantiosseletiva catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em nanopartículas magnéticas por fisissorção, foram feitas 10 reações nas condições de 0,01 mmol de (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol, tolueno, acetato de vinila durante 24 horas a 32 °C, utilizando *thermomixer*® a 800 rpm. Como não foram encontrados na literatura os dados de $[\alpha]_D$ para o éster formado, foi feita uma separação por coluna cromatográfica do éster formado e o álcool que não reagiu (Esquema 11). A partir do éster puro com rendimento de 14 % fez-se uma hidrólise utilizando carbonato de potássio, metanol em água durante 6 horas. O $[\alpha]_D$ foi medido de uma solução contendo 10 mg do álcool enantiomericamente puro em 1mL de clorofórmio a 25 °C obtendo-se +40,0° de rotação específica. Comparando-se o resultado obtido com o da literatura (Goswami e Goswami, 2005) pode-se concluir que o álcool de configuração absoluta S é o que reage mais rápido na reação de transesterificação enantiosseletiva catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada por fisissorção.

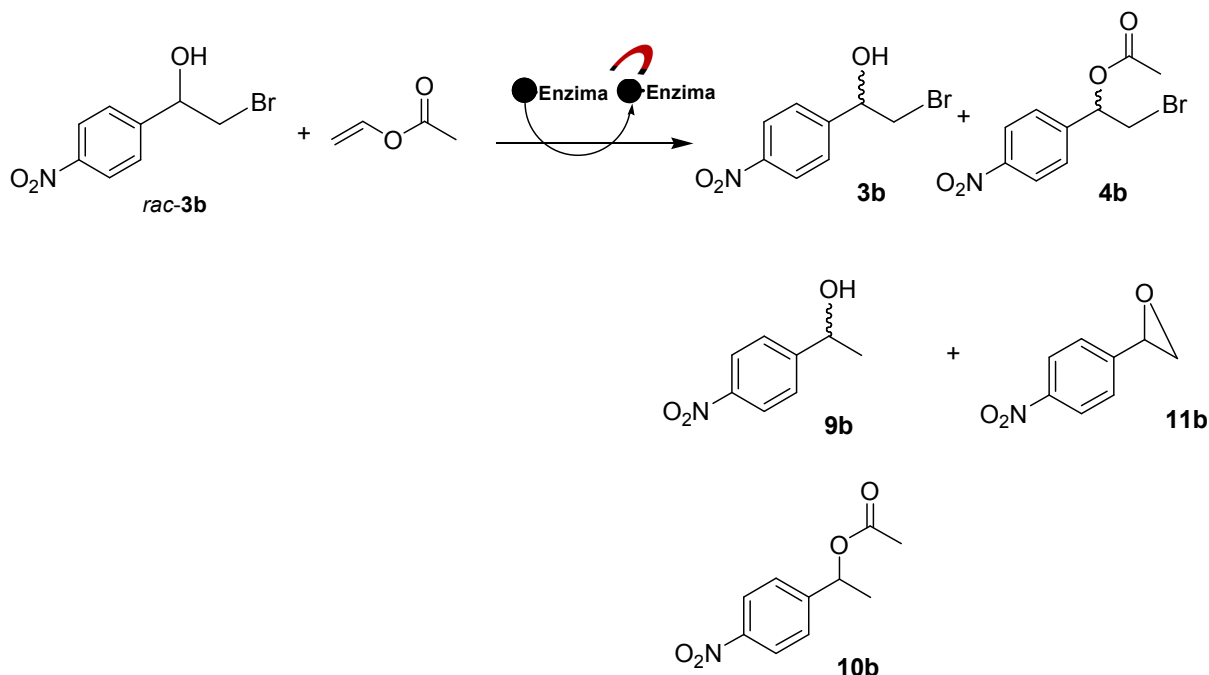


Esquema 11: Cálculo de $[\alpha]_D$ e rendimento isolado para o acetato de (*RS*)-2-bromo-1-(fenil)etila.

4.4.5 Resolução cinética enzimática do (*RS*)-2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanol utilizando a enzima imobilizada por fisissorção

Iniciaram-se os estudos de resolução cinética enzimática através da reação de transesterificação enantiosseletiva, utilizando o (*RS*)-2-bromo-1-(4-nitrofenil) etanol com o objetivo de obter este álcool na sua forma enantiomericamente pura. Este álcool é um importante intermediário na síntese do sotalol que é vendido comercialmente como antiarrítmico.

As mesmas condições reacionais utilizadas para o (*RS*)-2-bromo-1-(fenil)etanol foram aplicadas para o (*RS*)-2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanol conforme mostrado no Esquema 12.



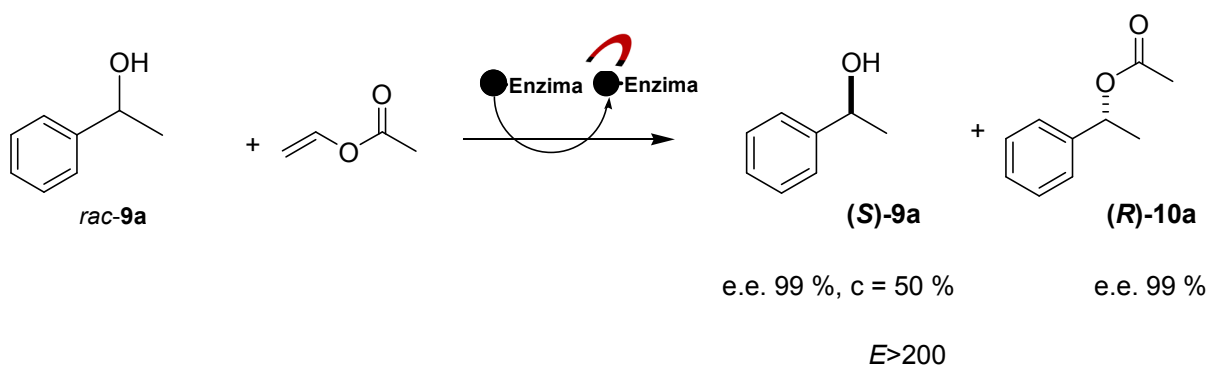
Esquema 12: Resolução cinética enzimática do (*RS*)-2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanol utilizando a enzima imobilizada por fisissorção. Condições reacionais: tolueno, acetato de vinila, 24 h, 32 °C, 800 rpm em *themomixer*®, 20 mg de nanopartículas magnéticas:0,21 mg de proteína.

Para esta reação houve a formação do (*RS*)-1-(4-nitrofenil)etanol e seu respectivo éster que diminuíram o rendimento do produto desejado, além disto, houve a formação do epóxido. Essa reação apresentou uma conversão de 8 % do álcool **1** (Esquema 12) e o éster desejado **2** com excesso enantiomérico de 99%. Essa reação foi realizada em triplicata, apresentando conversões variando de 6-8 %.

Pode-se concluir a partir destes resultados, que a enzima é altamente enantiosseletiva, mas para este substrato devido à formação de subprodutos, a conversão se manteve muito baixa. Para avaliar a influência tanto do substituinte nitro quanto do substituinte bromo, partiu-se para o estudo de outros alcoóis secundários.

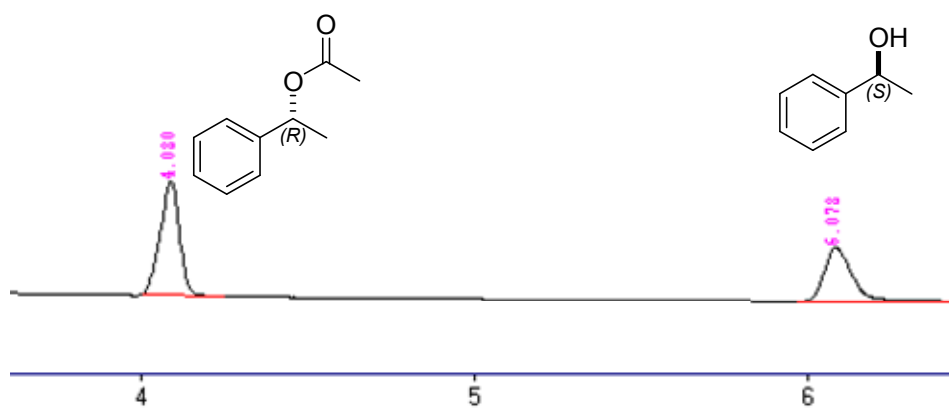
4.4.6 Resolução cinética enzimática do (*RS*)-1-(fenil)etanol utilizando a enzima imobilizada por fisissorção

O substrato (*RS*)-1-(fenil)etanol foi escolhido para este estudo, para avaliarmos a influência do substituinte nitro no anel aromático e do substituinte bromo em posição alfa, aplicou-se as mesmas condições reacionais utilizadas para o (*RS*)-2-bromo-1-(fenil)etanol e (*RS*)-2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanol, conforme mostrado no Esquema 13.



Esquema 13: Resolução cinética enzimática do (*RS*)-1-(fenil)etanol utilizando a enzima imobilizada por fisissorção. Condições reacionais: tolueno, acetato de vinila, 24 h, 32 °C, 800 rpm em *themomixer*®, 20 mg de nanopartículas magnéticas:0,21 mg de proteína.

Pode-se observar através do cromatograma da reação de transesterificação enantiosseletiva do feniletanol catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada por fisissorção em nanopartículas magnéticas, um total consumo do álcool *R* (conversão de 50 %) e formação do éster *R* com 99 % de excesso enantiomérico.



Pode-se concluir através deste estudo que a enzima é altamente enantiosseletiva ($E > 200$) e que a mesma quantidade de enzima imobilizada utilizada nos estudos anteriores, leva a uma conversão de 50 % do álcool neste estudo. Este resultado confirma que a presença de um átomo de bromo ligado ao carbono alfa a hidroxila, diminui a velocidade de acetilação. Além disto, 0,21 mg de proteína imobilizada são suficientes para o reação de transesterificação enantiosseletiva catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* durante 24 horas de reação.

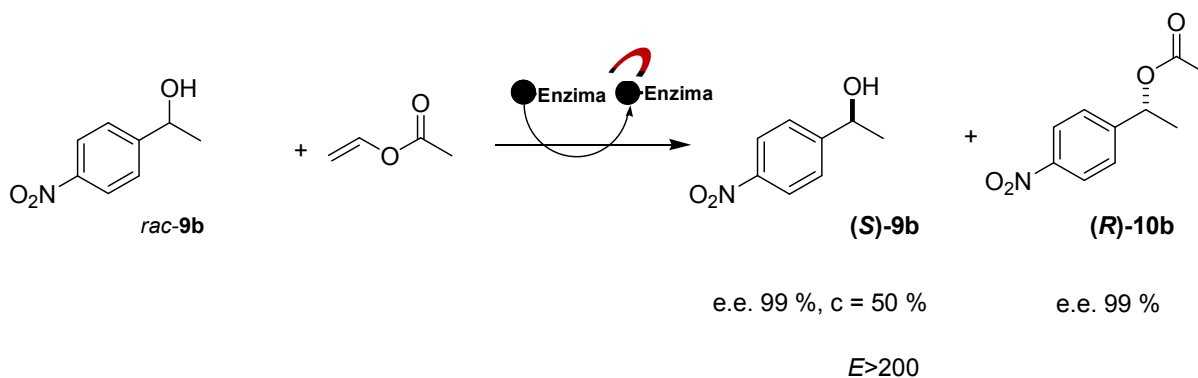
4.4.6.1 Determinação do $[\alpha]_D$ e rendimento isolado para (R)-1-acetato de feniletila

Para o cálculo de $[\alpha]_D$ e rendimento isolado da reação de transesterificação enantiosseletiva catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em nanopartículas magnéticas por fisissorção, foram feitas 10 reações nas condições de 0,01 mmol de (RS)-1-(fenil)etanol, tolueno, acetato de vinila durante 24 horas a 32 °C, utilizando *thermomixer*® a 800 rpm. Foi feita uma separação por coluna cromatográfica do éster formado e o álcool que não reagiu (Esquema 11). A partir do éster puro com rendimento de 47 % o $[\alpha]_D$ foi medido de uma solução contendo 10 mg desse éster enantiomericamente puro em 1 mL de clorofórmio a 25 °C obtendo-se

+59,0° de rotação específica. Comparando-se o resultado obtido com o da literatura (Ivanov e Schneider, 1997) pode-se concluir que o álcool de configuração absoluta *R* é o que reage mais rápido na reação de transesterificação enantiosseletiva catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada por fisissorção.

4.4.7 Resolução cinética enzimática do (*RS*)-1-(4-nitrofenil)etanol utilizando a enzima imobilizada por fisissorção

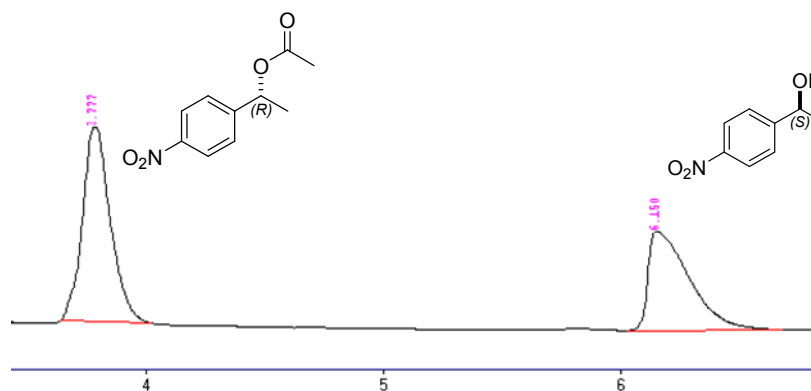
O substrato (*RS*)-1-(4-nitrofenil)etanol foi escolhido para este estudo, para avaliarmos a influência do substituinte nitro no anel aromático, aplicou-se as mesmas condições reacionais utilizadas para o (*RS*)-2-bromo-1-(fenil)etanol e (*RS*)-2-bromo-1-(4-nitrofenil) etanol, conforme mostrado no Esquema 14.



Esquema 14: Resolução cinética enzimática do (*RS*)-1-(4-nitrofenil)etanol utilizando a enzima imobilizada por fisissorção. Condições reacionais: tolueno, acetato de vinila, 24 h, 32 °C, 800 rpm em *themomixer*®, 20 mg de nanopartículas magnéticas: 0,21 mg de proteína.

Pode-se observar através do cromatograma da reação de transesterificação enantiosseletiva do *rac-9b* catalisada por lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizadas por fisissorção em nanopartículas

magnéticas um total consumo do álcool *R* e formação do éster *R* com 99 % de excesso enantiomérico.



4.4.7.1 Determinação do $[\alpha]_D$ e rendimento isolado do (*R*)- 1-(4-nitrofenil)acetato de etila

Para o cálculo de $[\alpha]_D$ e rendimento isolado da reação de transesterificação enantiosseletiva catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em nanopartículas magnéticas por fisissorção, foram feitas 10 reações nas condições de 0,01 mmol de *p*-nitrofeniletanol, tolueno, acetato de vinila durante 24 horas a 32 °C, utilizando *thermomixer*® a 800 rpm. Foi feita uma separação por coluna cromatográfica do éster formado e o álcool que não reagiu (Esquema 14). A partir do éster puro com rendimento de 47 % o $[\alpha]_D$ foi medido de uma solução contendo 10 mg do éster enantiomericamente puro em 1 mL de clorofórmio a 25 °C obtendo-se +30,5° de rotação específica. Comparando-se o resultado obtido com o da literatura (Zhang *et al.*, 2008) pode-se concluir que o álcool de configuração absoluta *R* é o que reage mais rápido na reação de transesterificação enantiosseletiva catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada por fisissorção.

4.5 Imobilização por quimissorção

A imobilização por quimissorção é baseada na formação de ligação covalente entre o grupo terminal da nanopartícula magnética e a enzima. Esse processo pode ser realizado utilizando diferentes grupos funcionais (Ivanov e Schneider, 1997; Zheng *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Mikhaylova *et al.*, 2004; Bhushan *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2007). Neste trabalho foram aplicadas 2 metodologias. Uma metodologia utilizou-se o carboxibenzaldeído para funcionalização da nanopartícula magnética e para o processo de imobilização utilizou-se EDC para proporcionar a formação da ligação covalente entre a enzima e o grupo terminal da nanopartícula magnética. Outra metodologia utilizada foi com o glutaraldeído para o processo de funcionalização das nanopartículas magnéticas, assim como no processo de imobilização.

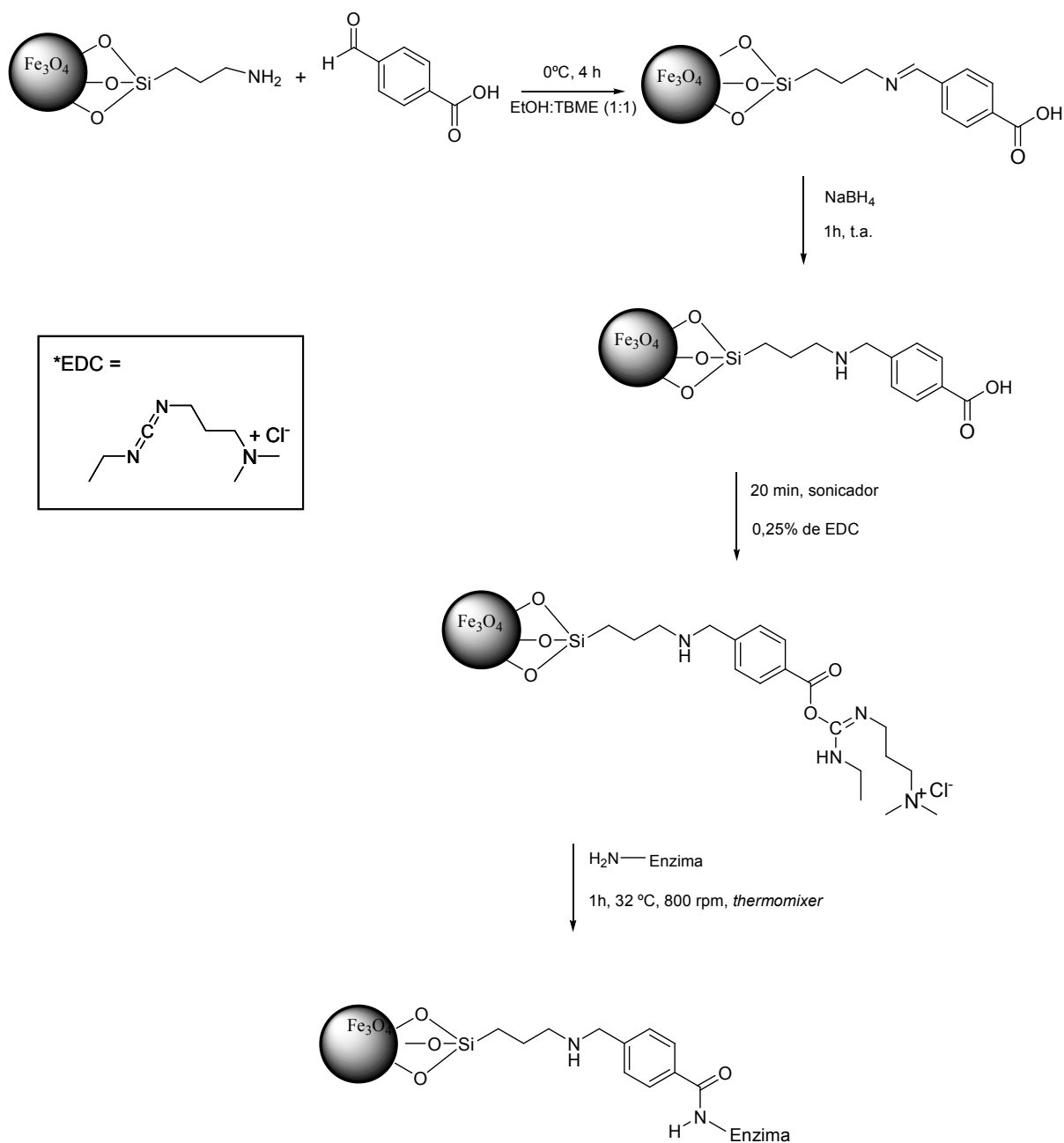
Os objetivos deste estudo foram imobilizar a enzima através da formação de uma ligação covalente, obter uma maior quantidade de enzima imobilizada e maior estabilidade da lipase imobilizada durante a reciclagem.

As mesmas condições reacionais utilizadas para a reação de transesterificação enantiosseletiva catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* através da imobilização por fisissorção foram aplicadas para este estudo utilizando a enzima imobilizada por quimissorção nos 2 métodos.

4.5.1 Funcionalização das nanopartículas magnéticas com grupo terminal amino com o carboxibenzaldeído e a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia*

A primeira etapa a ser desenvolvida para imobilizar a enzima covalentemente foi à modificação da superfície da nanopartícula magnética. Esta etapa consistiu no uso do carboxibenzaldeído para ligar o grupo amino terminal ao grupo carbonila do aldeído e deixar o grupo carboxila livre para a sequencia reacional. A literatura (Hong *et al.*, 2007) (Johnson *et al.*, 2008) apresenta diferentes moléculas para realizar este processo, a molécula escolhida para este trabalho foi o carboxibenzaldeído disponível comercialmente.

A reação de modificação da superfície da nanopartícula magnética foi realizada conforme o Esquema 15. O carboxibenzaldeído possui de um lado um ácido carboxílico e de outro um aldeído, a formação do grupo imina se dá entre o grupo aldeído com o grupo amino terminal da nanopartícula magnética. Essa etapa é realizada a 0 °C utilizando TBME e etanol na proporção de 1:1 como solvente da reação. Após obtermos esse produto é feita a redução da dupla ligação da imina para evitar sua hidrólise em solução tampão. A redução foi feita com ácido benzóico e borohidreto de sódio que foram macerados durante 1 hora. Para a reação final de ligação do grupo amino da lipase com a nanopartícula magnética modificada, fez-se necessária a presença de um agente ativante, o EDC.



Esquema 15: Funcionalização da nanopartícula magnética funcionalizada com o grupo amino para o grupo carboxílico e subsequente processo de imobilização da enzima por ativação com EDC.

Após preparação do complexo nanopartícula magnética funcionalizada com carboxibenzaldeído e a enzima fez-se a quantificação através do método de Bradford da enzima imobilizada. Para 20 mg de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com o carboxibenzaldeído tem-se 0,26 mg de proteína imobilizada.

Além disto, este complexo foi analisado por microscopia de força atômica suportadas em mica. Estes experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Henrique Eisi Toma do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Analisando a imagem de topografia (Figura 14) nota-se que tudo que aparece mais claro (bege) está na altura entre 220-230 nm é referente às nanopartículas magnéticas e enzima pelo fato de estarem agregadas. O que está mais escuro (marrom) é a mica que foi o suporte utilizado para fazer a imagem. Há ainda uma terceira coloração intermediária (marrom claro) que é provavelmente a enzima imobilizada.

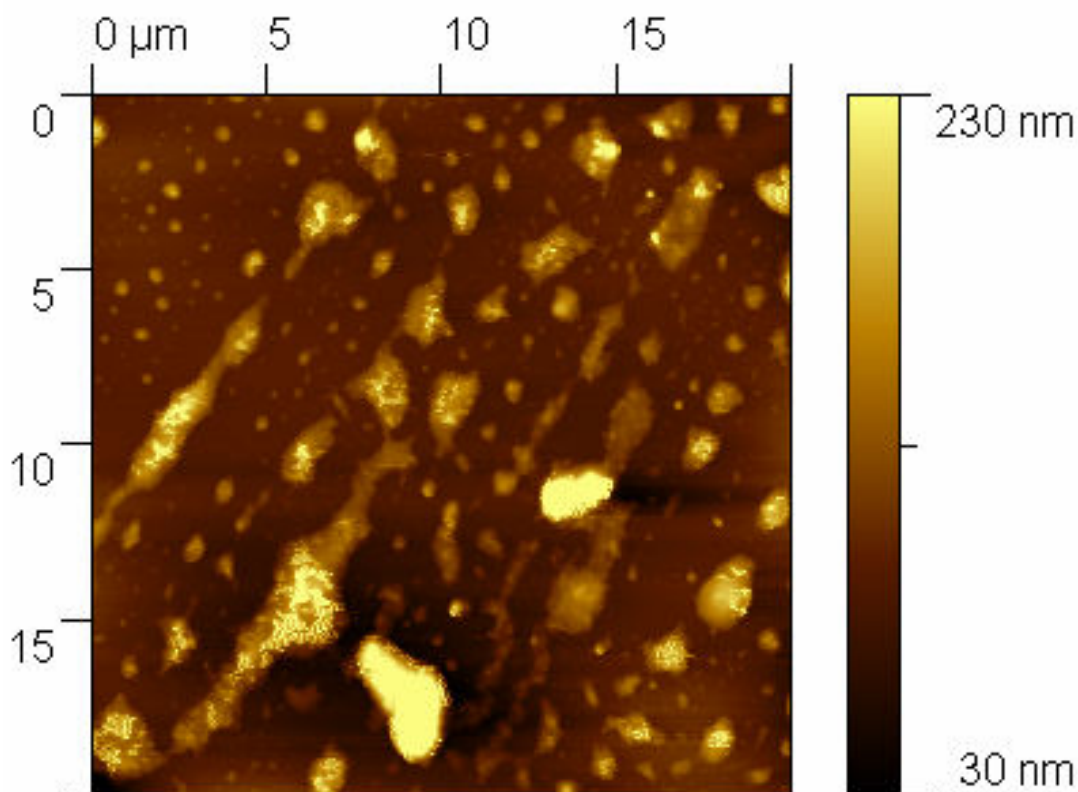


Figura 14: Microscopia de força atômica utilizando imagem de topografia do complexo nanopartícula-magnética funcionalizada com carboxibenzaldeído e enzima.

Visando analisar as diferentes colorações, foi feita uma imagem de contraste de fase, onde mostra quantas fases diferentes existem na mica.

Pode-se observar na Figura 15, 3 diferentes colorações. Uma referente a mica (~ 4 V), outra referente a enzima imobilizada (~ 4,5 V) e a mais clara e mais alta (~ 3,3 V) referente as nanopartículas magnéticas.

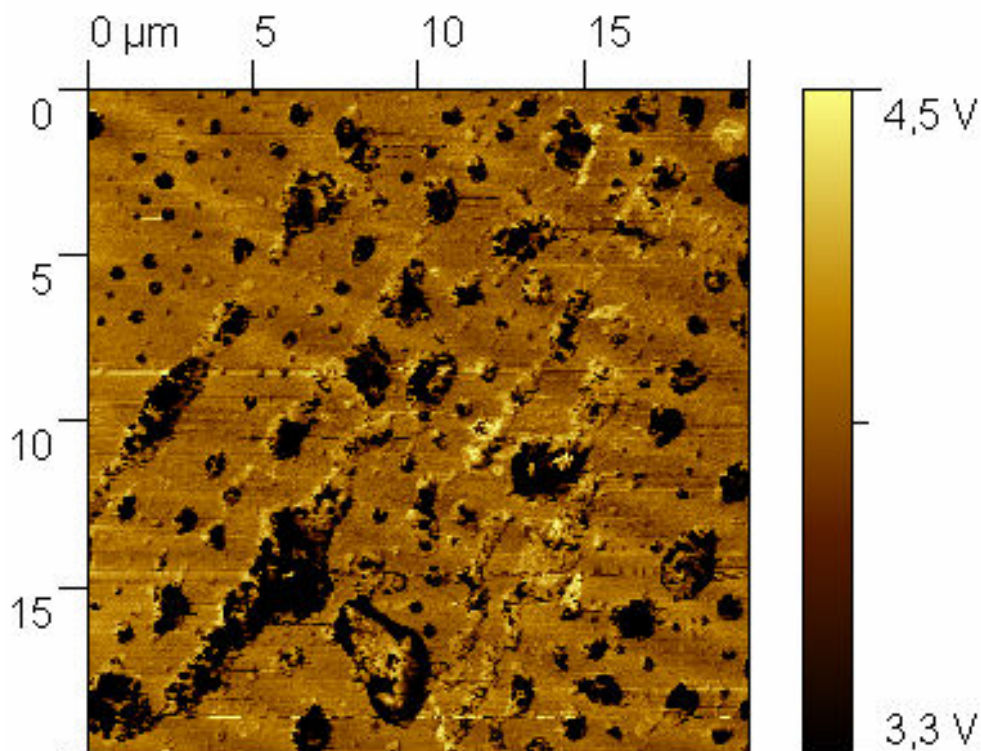


Figura 15: Microscopia de força atômica utilizando imagem de contraste de fase do complexo nanopartícula-magnética funcionalizada com carboxibenzaldeído e enzima.

Pode-se concluir ainda, que as nanopartículas magnéticas estão agregadas pelo fato de estarem atraídas umas as outras, mesmo assim elas mantêm sua escala em nanômetros.

Utilizando a mesma amostra das imagens acima, fez-se uma imagem de microscopia de força magnética, este tipo de microscopia mostra tudo que está magnético na mica. Observa-se através da Figura 16, a coloração em preto é magnética, assim comparando essa imagem com as outras imagens pode-se concluir que a enzima está imobilizada nas nanopartículas magnéticas.

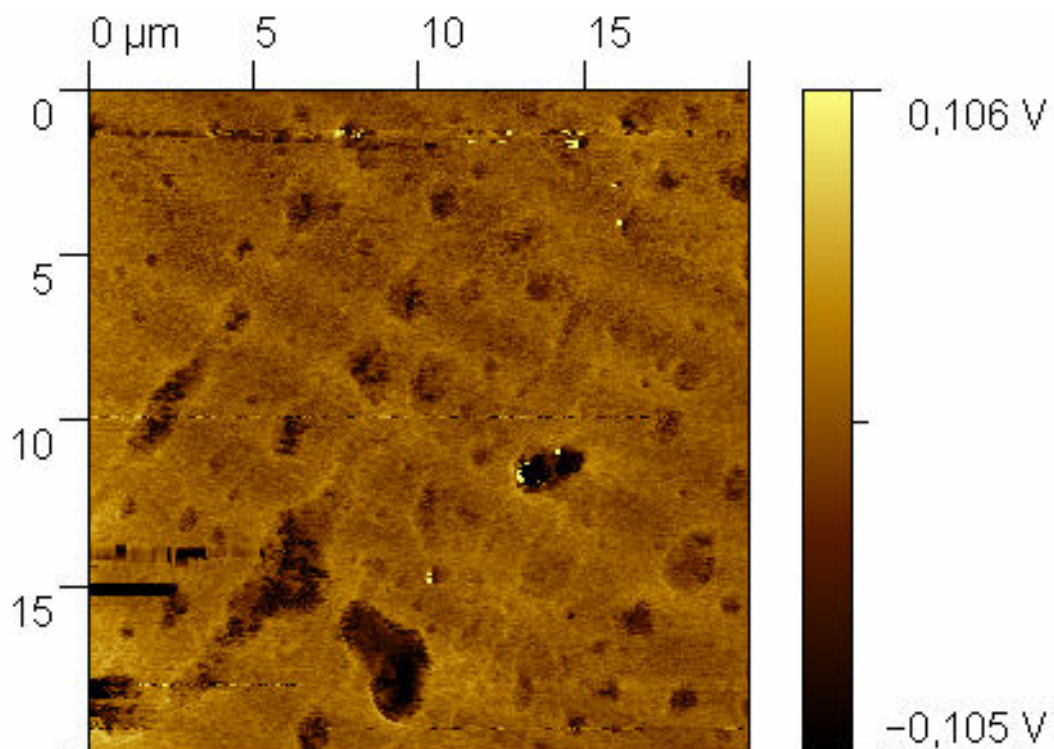


Figura 16: Microscopia de força atômica utilizando ponta magnética do complexo nanopartícula-magnética funcionalizada com carboxibenzaldeído e enzima.

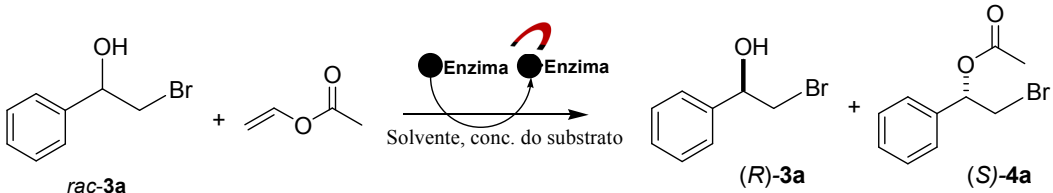
A análise conjunta dessas 3 imagens foi uma importante ferramenta para o método de imobilização por quimissorção, para avaliarmos o comportamento tanto da enzima quanto da nanopartícula magnética funcionalizada.

4.5.1.1 Resolução cinética enzimática do (*RS*)-2-bromo-1-(fenil)etanol utilizando a enzima imobilizada através do carboxibenzaldeído

Diante dos resultados obtidos no estudo de imobilização por fisissorção e tendo estabelecido um processo eficiente de imobilização da enzima covalentemente com a nanopartícula magnética funcionalizada com carboxibenzaldeído, iniciaram-se os estudos aplicando a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada covalentemente na reação de transesterificação enantiosseletiva do (*RS*)-2-bromo-1-(fenil)etanol.

As condições reacionais utilizadas foram de 0,01 mmol do substrato, diferentes solventes (TBME e tolueno) e tempo reacional (5 e 24 horas). A reação foi conduzida em *thermomixer*® a 800 rpm e 32 °C. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5: Resolução cinética do (*RS*)-2-bromo-1-(fenil)etanol mediada pela lipase de *B. cepacia* imobilizada por carboxibenzaldeído em nanopartícula magnética



	Solvente (mL)	t (h)	rac-3a (mmol)	e.e. ^a (%)		Conv. ^b (%)	E ^c
				(<i>R</i>)-3a	(<i>S</i>)-4a		
1	TBME	5	0,01	8	99	8	>200
2	TBME	24	0,01	10	99	10	>200
3	Tolueno	5	0,01	11	99	10	>200
4	Tolueno	24	0,01	15	99	13	>200

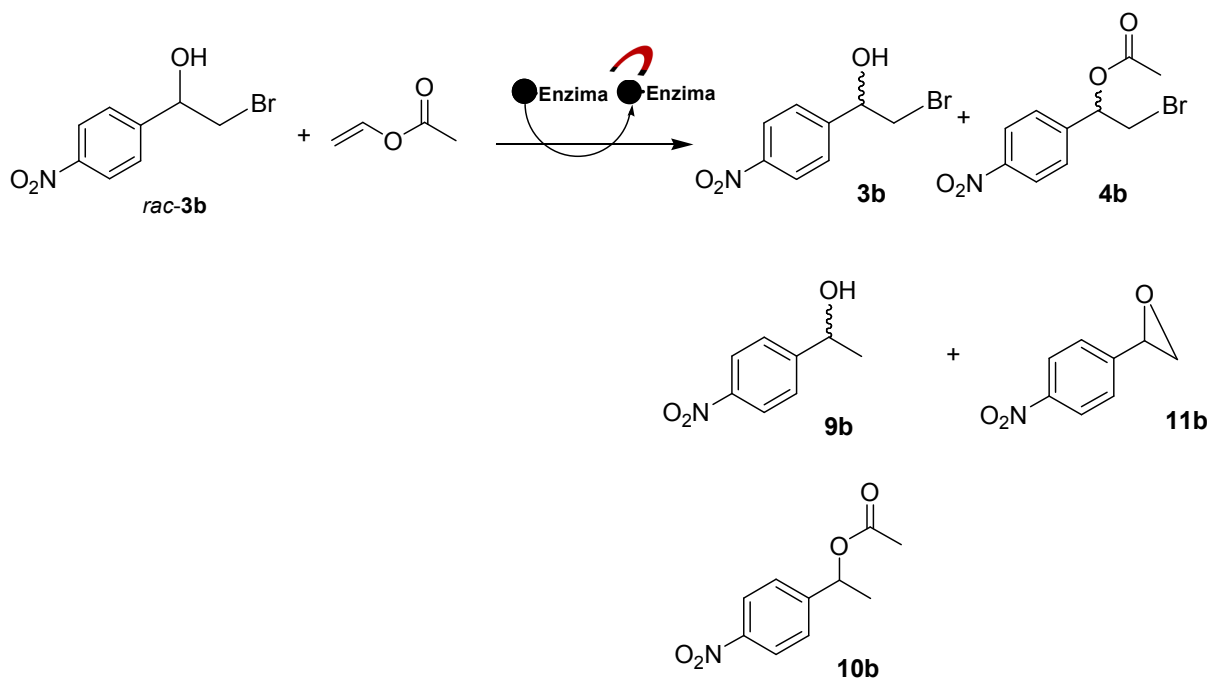
Condições reacionais: 32°C; 30 µL de acetato de vinila; 20 mg de NapMg; 0,26 mg de proteína; 800 rpm, *thermomixer*, 1 mL de solvente. ^ae.e. determinado por CG; ^bC=e.e.S/(e.e.S+e.e.P), ^cE=ln{[e.e.P(1-e.e.S)]/(e.e.P+e.e.S)}/ln{[e.e.P(1+e.e.S)]/(e.e.P+e.e.S)}

Nesse estudo, a conversão do álcool *rac-3a* variou entre 8-13 %. O melhor solvente foi o tolueno, apresentando conversões entre 10-13 %, enquanto que o TBME apresentou uma variação entre 8-10%. A melhor

condição reacional que levou a uma maior conversão (13 %) foi com 24 horas de reação em tolueno (linha 4, Tabela 5).

4.5.1.2 Resolução cinética enzimática do (*RS*)-2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanol utilizando a enzima imobilizada através do carboxibenaldeído

As mesmas condições reacionais utilizadas para o (*RS*)-2-bromo-1-feniletanol foram aplicadas para o (*RS*)-2-bromo-1-(4-nitrofenil) etanol conforme mostrado no Esquema 16.



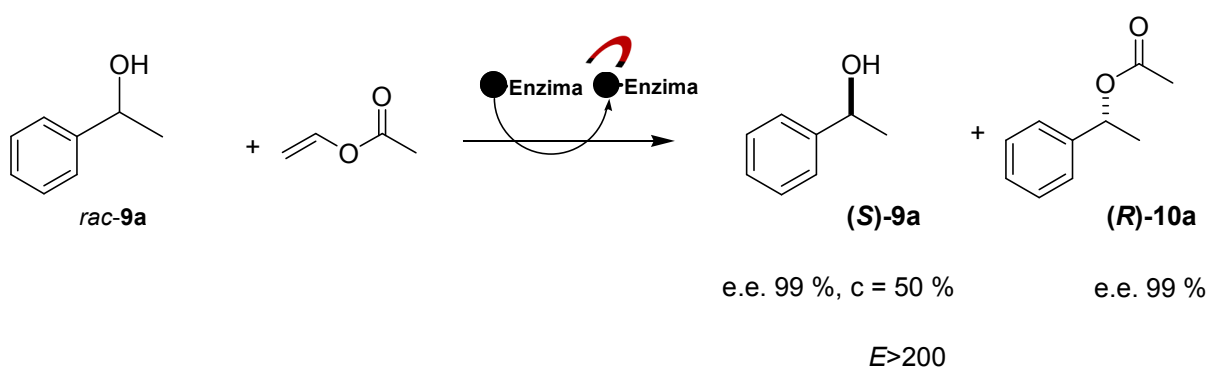
Esquema 16: Resolução cinética enzimática do (*RS*)-2-bromo-1-(4-nitrofenil) etanol utilizando a enzima imobilizada por quimissorção com carboxibenaldeído. Condições reacionais: tolueno, acetato de vinila, 24 h, 32 °C, 800 rpm em *themomixer*®, 20 mg de nanopartículas magnéticas:0,26 mg de proteína.

Os resultados obtidos para este estudo mantiveram o mesmo perfil encontrado na imobilização por fisissorção. Houve um pequeno aumento de conversão de 8 % para 11 %. Isso se deve pelo fato de ter-se mais enzima imobilizada pelo método por quimissorção. Maior quantidade de enzima leva

a um aumento da conversão na reação de transesterificação enantiosseletiva catalisada por lipase.

4.5.1.3 Resolução cinética enzimática do (*RS*)-1-(fenil)etanol utilizando a enzima imobilizada através do carboxibenaldeído

Neste estudo, os resultados obtidos foram idênticos aos resultados obtidos com a enzima imobilizada por fisissorção.

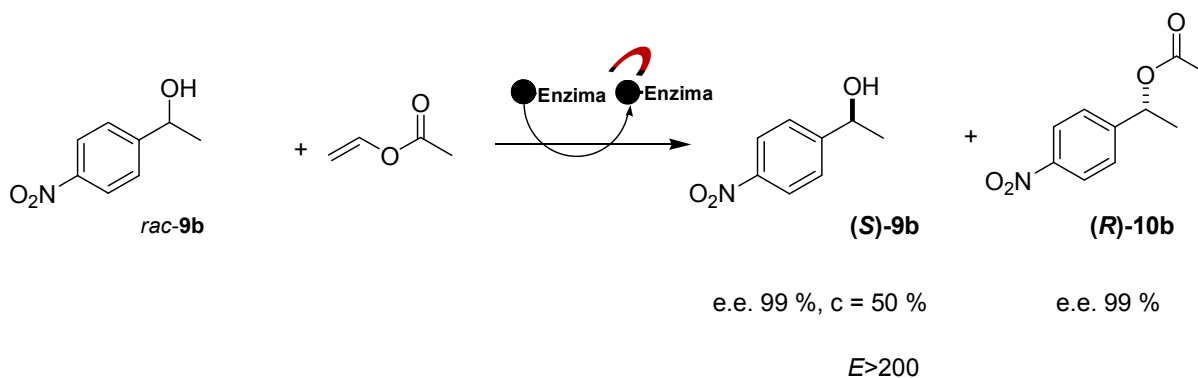


Esquema 17: Resolução cinética enzimática do (*RS*)-1-(fenil)etanol utilizando a enzima imobilizada por quimissorção com carboxibenaldeído. Condições reacionais: tolueno, acetato de vinila, 24 h, 32 °C, 800 rpm em *themomixer*®, 20 mg de nanopartículas magnéticas:0,26 mg de proteína.

Os resultados tanto para o processo utilizando a enzima imobilizada por fisissorção e quimissorção, são excelentes, pois se obteve conversão de 50 % do álcool *rac*-**9a** e formação do éster (*R*)-**10a** com 99 % de excesso enantiomérico. Pode-se concluir que a faixa de 0,21-0,26 mg de enzima imobilizada são suficientes para que ocorra a conversão completa do álcool (*R*)-**9a** em seu éster (*R*)-**10a** para ambos processos de imobilização. O *E* > 200 indica alta enantiosseletividade da enzima no processo.

4.5.1.4 Resolução cinética enzimática do (*RS*)-1-(4-nitrofenil)etanol utilizando a enzima imobilizada através do carboxibenaldeído

Neste estudo, os resultados obtidos foram idênticos aos resultados obtidos com a enzima imobilizada por fisissorção.



Esquema 18: Resolução cinética enzimática do (*RS*)-1-(4-nitrofenil)etanol utilizando a enzima imobilizada por quimissorção com carboxibenaldeído. Condições reacionais: tolueno, acetato de vinila, 24 h, 32 °C, 800 rpm em *thermomixer*®, 20 mg de nanopartículas magnéticas:0,26 mg de proteína.

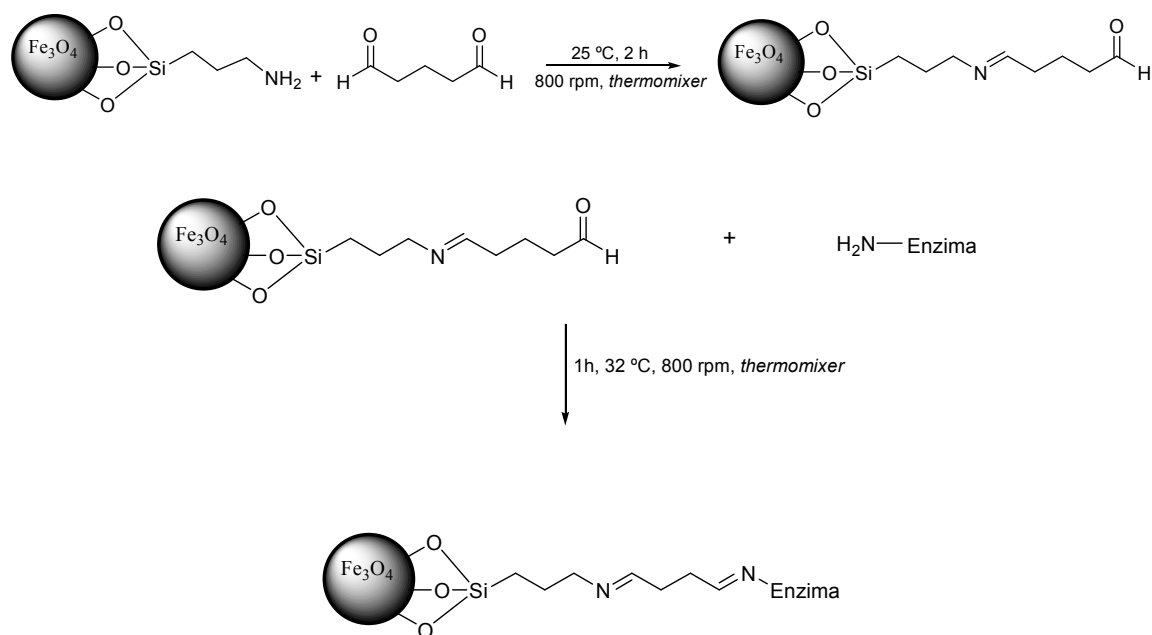
Os resultados obtidos vêm corroborar que a enzima imobilizada em nanopartículas magnéticas é altamente enantiosseletiva (*E* > 200) e apresenta excelentes resultados na transesterificação do álcool *rac-9b*.

4.5.2 Funcionalização com o glutaraldeído e imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* ativada por glutaraldeído

Outra metodologia de imobilização escolhida e utilizada neste trabalho foi através do glutaraldeído, devido suas propriedades bifuncionais e pelos bons resultados reportados na literatura (Hung *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Fernandez-Lorente *et al.*, 2006; Palomo *et al.*, 2007; Hara *et al.*, 2008).

Inicialmente 20 mg de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com amino foram colocadas em contato com 25 µL de glutaraldeído 25 % (v/v) em água durante 2 horas, 25°C e 800 rpm em *thermomixer*®. Existem

vários procedimentos experimentais relatados em literatura (Bayramoglu e Arica, 2008; Bayramoglu *et al.*, 2008) com diferentes concentrações de glutaraldeído, tempo reacional e temperatura. A metodologia adotada neste trabalho utilizou de temperatura ambiente e sem adição de solvente orgânico e a obtenção da nanopartícula magnética funcionalizada com aldeído foi possível com apenas 2 horas de reação (Esquema 19).



Esquema 19: Modificação da nanopartícula magnética funcionalizada com o grupo amino utilizando glutaraldeído 25 % (v/v) e imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* por quimissorção.

Logo após a reação do grupo amino terminal da nanopartícula magnética com glutaraldeído levando a uma imina e um aldeído, foi realizado o processo de imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* (Esquema 19). Após a preparação do complexo nanopartícula magnética funcionalizada com glutaraldeído e a enzima imobilizada foi feita a quantificação através do método de Bradford da enzima imobilizada, tendo como resultado 0,28 mg de proteína imobilizada em 20 mg de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com o glutaraldeído.

Além disto, este complexo foi analisado por microscopia de força atômica suportada em mica. Estes experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Henrique Eisi Toma do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Os resultados obtidos encontram-se nas imagens abaixo e se aplica às mesmas explicações e mesmos resultados para o complexo nanopartícula magnética funcionalizada com carboxibenzaldeído e a enzima imobilizada.

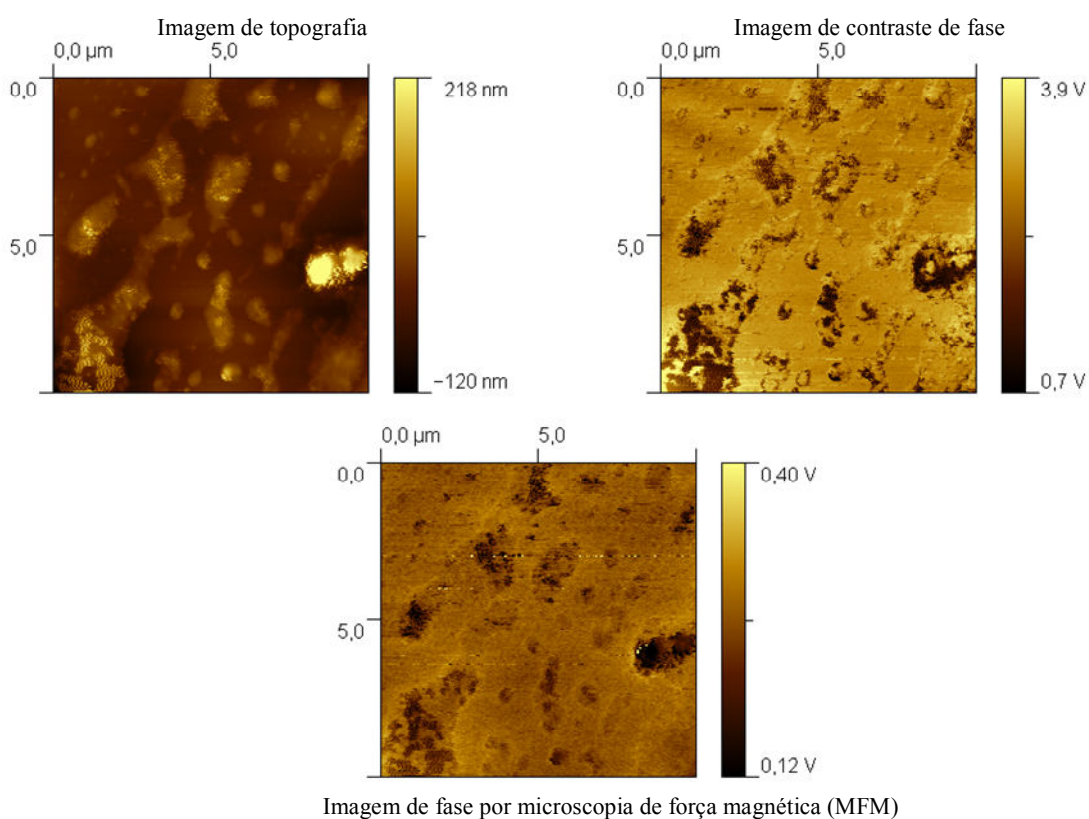


Figura 17: Microscopia de força atômica e magnética para o complexo nanopartícula magnética funcionalizada com glutaraldeído e a enzima imobilizada.

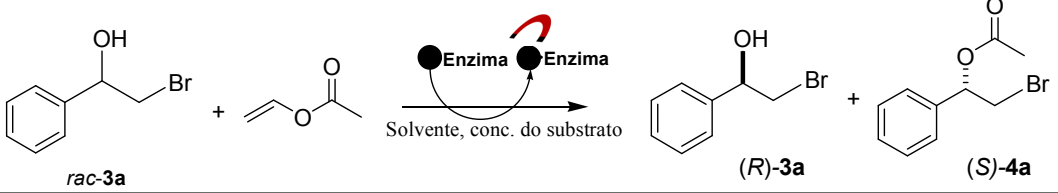
A análise conjunta dessas 3 imagens foi uma importante ferramenta para o método de imobilização por quimissorção, para avaliar-se o comportamento e tamanho do complexo enzima e nanopartícula magnética funcionalizada.

4.5.2.1 Resolução cinética enzimática do (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol utilizando a enzima imobilizada através do glutaraldeído

Diante dos resultados obtidos no estudo de imobilização por fisissorção, quimissorção através do carboxibenzaldeído e tendo estabelecido um processo eficiente de imobilização da enzima covalentemente com a nanopartícula magnética funcionalizada com glutaraldeído, iniciaram-se os estudos aplicando a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada covalentemente na reação de transesterificação enantiosseletiva do (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol.

As condições reacionais utilizadas foram de 0,01 mmol do substrato, diferentes solventes (TBME e tolueno) e tempo reacional (5 e 24 horas). A reação foi conduzida em *thermomixer*® a 800 rpm e 32 °C. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6: Resolução cinética do (*RS*)-2-bromo-1-(fenil)etanol mediada pela lipase de *B. cepacia* imobilizada por glutaraldeído em nanopartícula



Solvente (mL)	t (h)	rac-3a (mmol)	e.e. ^a (%)		Conv. ^b (%)	E ^c
			(R)-3a	(S)-4a		
1 TBME	5	0,01	9	99	8	>200
2 TBME	24	0,01	29	99	22	>200
3 Tolueno	5	0,01	7	99	8	>200
4 Tolueno	24	0,01	25	99	20	>200

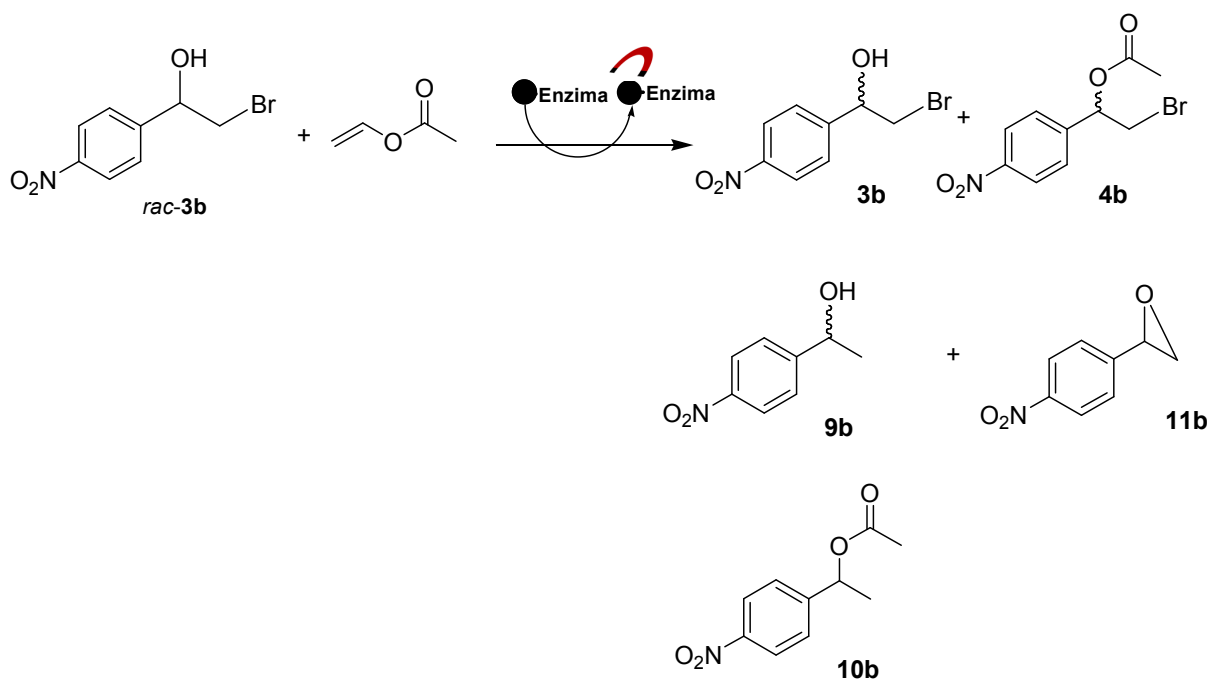
Condições reacionais: 32°C; 30 μ L de acetato de vinila; 20 mg de NapMg; 0,28 mg de proteína; 800 rpm, *thermomixer*, 1 mL de solvente. ^ae.e. determinado por CG; ^bC=e.e.S/(e.e.S+e.e.P), ^cE=ln{[e.e.P(1-e.e.S)]/(e.e.P+e.e.S)}/ln{[e.e.P(1+e.e.S)]/(e.e.P+e.e.S)}

Nesse estudo, a conversão do álcool *rac-3a* variou entre 8-22 %. O melhor solvente foi o TBME (linhas 1 e 2, Tabela 6), apresentando conversões entre 8-22 %, enquanto que o tolueno (linhas 3 e 4, Tabela 6) apresentou uma variação muito pequena quando comparada aos resultados obtidos com TBME ficando entre 8-20%. A melhor condição reacional levou a uma conversão de 22 % em 24 horas de reação em TBME (linha 2, Tabela 6). E 20 % de conversão quando utilizado tolueno como solvente (linha 4, Tabela 6).

Comparando com os outros estudos realizados neste trabalho, a reação de transesterificação enantiosseletiva catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em nanopartícula magnética através do glutaraldeído foi o melhor resultado obtido nas condições reacionais aplicadas. Pode-se concluir que um pequeno aumento na quantidade de enzima imobilizada levou a um aumento de conversão para este substrato.

4.5.2.2 Resolução cinética enzimática do (*RS*)-2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanol utilizando a enzima imobilizada através do glutaraldeído

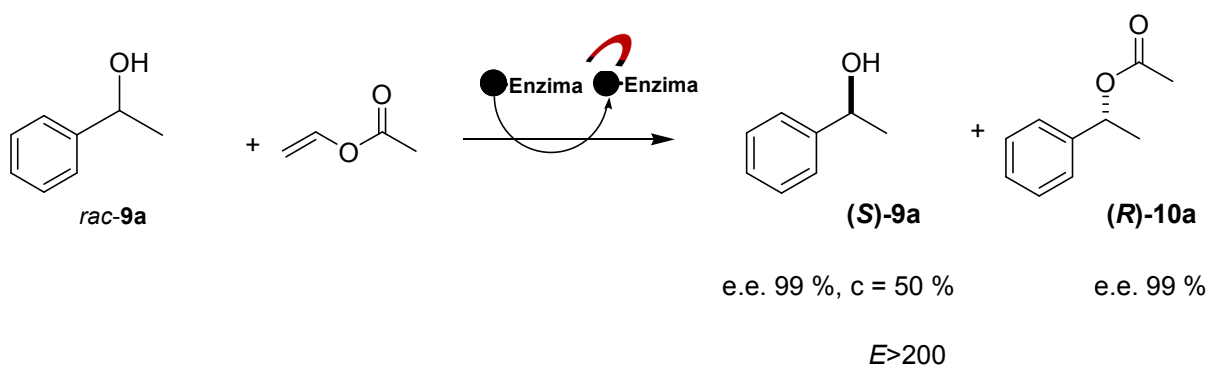
Neste estudo, os resultados obtidos foram idênticos aos resultados obtidos com a enzima imobilizada por fisissorção e quimissorção utilizando carboxibenaldeído.



Esquema 20: Resolução cinética enzimática do (*RS*)-2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanol utilizando a enzima imobilizada por quimissorção com glutaraldeído. Condições reacionais: tolueno, acetato de vinila, 24 h, 32 °C, 800 rpm em *themixer*®, 20 mg de nanopartículas magnéticas:0,28 mg de proteína.

4.5.2.3 Resolução cinética enzimática do (*RS*)-1-(fenil)etanol utilizando a enzima imobilizada através do glutaraldeído

Neste estudo, os resultados obtidos foram idênticos aos resultados obtidos com a enzima imobilizada por fisissorção e quimissorção utilizando carboxibenzaldeído.

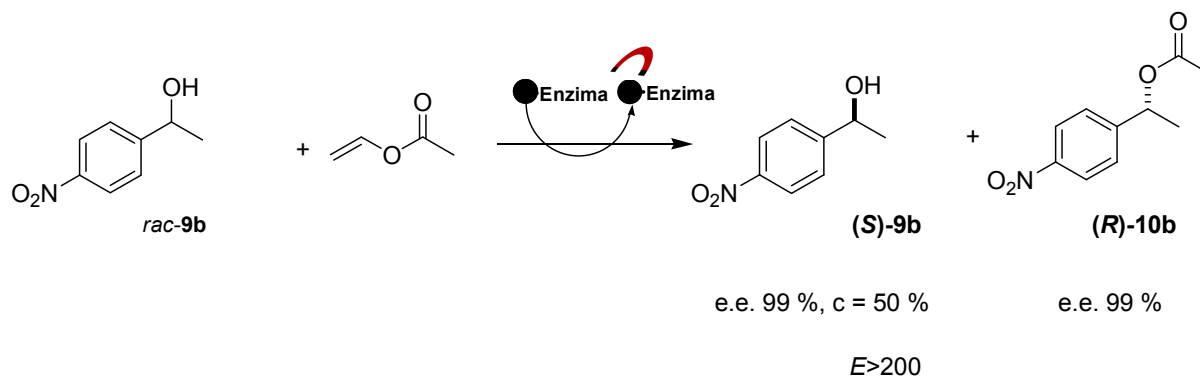


Esquema 21: Resolução cinética enzimática do (*RS*)-1-(fenil)etanol utilizando a enzima imobilizada por quimissorção com glutaraldeído. Condições reacionais: tolueno, acetato de vinila, 24 h, 32 °C, 800 rpm em *themomixer*®, 20 mg de nanopartículas magnéticas:0,28 mg de proteína.

Pode-se concluir que houve um total consumo o álcool de configuração absoluta *R* (conversão 50 %), sendo este o que reage mais rápido na reação de transesterificação enantiosseletiva catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada através do glutaraldeído e formação do éster *R* com 99 % de excesso enantiomérico.

4.5.2.4 Resolução cinética enzimática do (*RS*)-1-(4-nitrofenil)etanol utilizando a enzima imobilizada através do glutaraldeído

Neste estudo, os resultados obtidos foram idênticos aos resultados obtidos com a enzima imobilizada por fisissorção e quimissorção utilizando carboxibenzaldeído.



Esquema 22: Resolução cinética enzimática do (RS) -1-(4-nitrofenil)etanol utilizando a enzima imobilizada por quimissorção com glutaraldeído. Condições reacionais: tolueno, acetato de vinila, 24 h, 32 °C, 800 rpm em *themomixer*®, 20 mg de nanopartículas magnéticas:0,28 mg de proteína.

Pode-se concluir que houve um total consumo o álcool de configuração absoluta *R* (conversão 50 %) e formação do éster *R* com 99 % de excesso enantiomérico.

4.5.2.5 Resolução cinética enzimática do (RS)-1-(fenil)-1,2-etanodiol utilizando a enzima imobilizada através do glutaraldeído

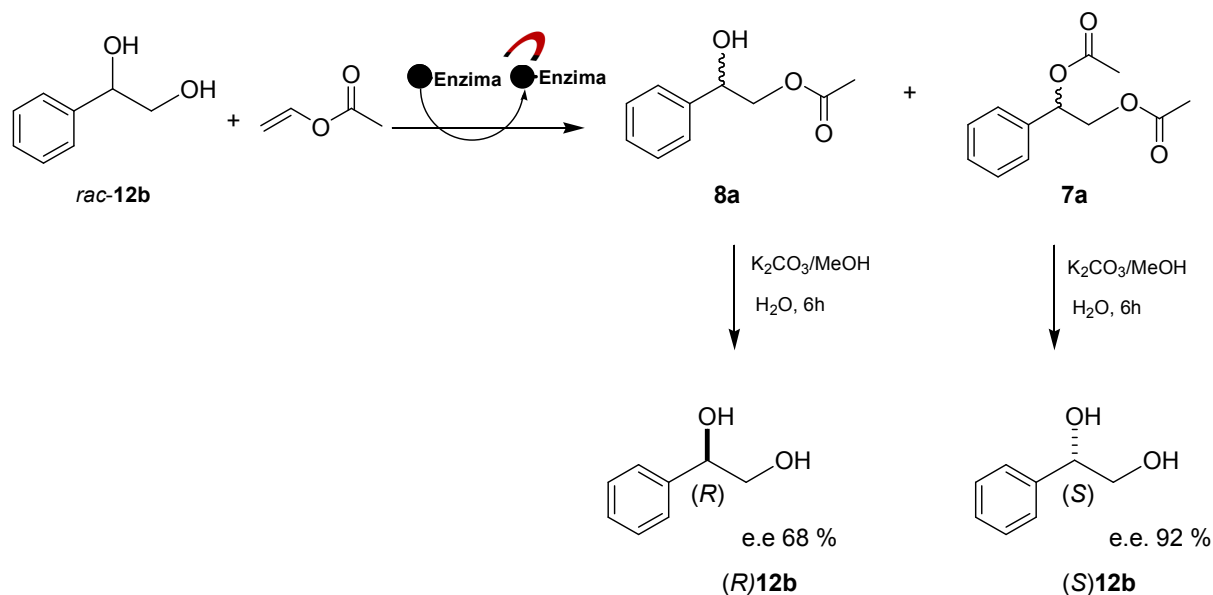
1,2-Dióis são importantes precursores e intermediários para uma variedade de aplicações sintéticas (Kamal e Chouhan, 2004) e esta funcionalidade é encontrada em um grande número de intermediários de fármacos, como a fluoxetina, aegalina e tembamida. O desenvolvimento de metodologias para a preparação de 1,2-dióis enantiomericamente puros é de interesse considerável.

Diante dos resultados obtidos no estudo de imobilização por fisissorção, quimissorção através do carboxibenzaldeído e tendo estabelecido um processo eficiente de imobilização da enzima covalentemente com a nanopartícula magnética funcionalizada com glutaraldeído, iniciaram-se os estudos de aplicação da lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada

covalentemente por glutaraldeído na reação de transesterificação enantiosseletiva do (*RS*)-1-(fenil)-1,2-etanodiol.

Utilizando as melhores condições encontradas até o momento utilizou-se 0,01 mmol do substrato em tolueno. A reação foi conduzida em *thermomixer*® a 800 rpm, 32 °C, durante 24 horas e pode ser demonstrada conforme Esquema 23.

A literatura (Lemke *et al.*, 1996; Kamal e Chouhan, (2004) reporta que usando a lipase de *Burkholderia cepacia* não imobilizada geralmente a reação leva de 30-140 horas em uma variedade de solventes orgânicos. É interessante observar que esta lipase imobilizada em nanopartículas magnéticas possui alta enantiosseletividade e tempo de reação significativamente menor.



Esquema 23: Resolução cinética enzimática do (*RS*)-1-(fenil)-1,2-etanodiol utilizando a enzima imobilizada por quimissorção com glutaraldeído. Condições reacionais: tolueno, acetato de vinila, 24 h, 32 °C, 800 rpm em *thermomixer*®, 20 mg de nanopartículas magnéticas:0,28 mg de proteína.

A reação de monoacetilação ocorre rapidamente no grupo hidroxila primário para levar ao monoacetato **8a** (Esquema 23). Mais tarde, a formação do diacetato **7a** enantiosseletivamente foi observado, ainda como

produto majoritário. Após separação de **8a** e **7a** por coluna cromatográfica, fez a hidrólise dos acetatos **8a** e **7a**, utilizando carbonato de potássio, metanol em água durante 6 horas para levar aos dióis (*R*)-**12b** e (*S*)-**12b** enantiomericamente puros. A configuração absoluta foi resolvida para os dióis, utilizando a comparação dos dados obtidos por CLAE do diol racêmico com os dados da literatura (Lemke *et al.*, 1996). Tendo como resultado 68 % de excesso enantiomérico do (*R*)-diol e 92 % de excesso enantiomérico para o (*S*)-diol. Pode-se concluir que o diol de configuração absoluta *S* é o que reage mais rapidamente na reação de transesterificação enantiosseletiva catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada por quimissorção.

4.6 Comparação entre a enzima imobilizada e a enzima livre

Nos estudos realizados até o momento, pode-se concluir que a quantidade de enzima imobilizada variou entre 0,21-0,28 mg. E que nesta faixa nos diferentes tipos de imobilização, esta quantidade de proteína foi o suficiente para levar a total conversão dos alcoóis (*RS*)-1-(fenil)etanol e (*RS*)-1-(4-nitrofenil)etanol em seus respectivos ésteres. No caso do (*RS*)-2-bromo-1-(fenil)etanol observou-se como melhor conversão 22 % quando se utilizou imobilização química através do glutaraldeído. Com base nestes resultados, foi estudada a reação de transesterificação enantiosseletiva para esses alcoóis, utilizando a lipase de *Burkholderia cepacia* não imobilizada. Para isto, preparou-se a solução da lipase de *Burkholderia cepacia* de concentração de 0,55 mg/mL originada de 100 mg da lipase comercial em 1 mL de solução tampão fosfato 100 mM (pH = 7). Recolheu-se o sobrenadante, congelou-se a -80°C e liofilizou-se por 24 horas. Como

resultado foram obtidos 16 mg da lipase de *Burkholderia cepacia* que foram colocadas para a reação de transesterificação enantiosseletiva nas mesmas condições reacionais dos estudos realizados com a enzima imobilizada. Os resultados obtidos para o (*RS*)-2-bromo-1-(fenil)etanol encontram-se resumidos na Tabela 7.

Tabela 7: Resolução cinética do (*RS*)-2-bromo-1-(fenil)etanol mediada pela solução enzimática lipase de *B. cepacia* liofilizada

Solvente (mL)	t (h)	rac-3a (mmol)	e.e. ^a (%)		Conv. ^b (%)	E ^c
			3a	4a		
1 TBME	5	0,01	2	30	2	<200
2 TBME	24	0,01	3	45	6	<200
3 Tolueno	5	0,01	10	70	9	<200
4 Tolueno	24	0,01	20	78	25	<200

Condições reacionais: 32°C; 30 µL de acetato de vinila; 800 rpm, *thermomixer*, 1 mL de solvente. ^ae.e. determinado por CG; ^bC=e.e.S/(e.e.S+e.e.P), E^c=(ln[e.e.P(1-e.e.S)]/(e.e.P+e.e.S))/ {ln[e.e.P(1+e.e.S)]/(e.e.P+e.e.S)}.

Pode-se observar na linha 4 uma conversão de 25 %, mas com perda de enantiosseletividade. O éster foi obtido com 78 % de excesso enantiomérico quando utilizado tolueno como solvente em 24 horas de reação. A reação de transesterificação enantiosseletiva com a enzima livre utilizando TBME ocorreu conversões variando entre 2-25 % e excesso enantiomérico do éster **4a** variando entre 30-45 % (linhas 1 e 2, Tabela 7).

A imobilização proporciona uma maior rigidez à enzima, deste modo não há variações conformacionais com diferentes solventes orgânicos. Sabe-se que uma alteração na conformação da enzima pode diminuir sua atividade, levando a baixas conversões e perda de enantiosseletividade.

Para o (*RS*)-1-(fenil)etanol repetiu-se o mesmo processo utilizado para o (*RS*)-2-bromo-1-(fenil)etanol. A partir de 0,01 mmol do substrato, 1 mL de tolueno, 24 horas, 32 °C, 800 rpm em *thermomixer*® utilizando 16 mg de enzima liofilizada.

Os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos utilizando a enzima imobilizada. Na Figura 18 há a comparação dos cromatogramas obtidos nas reações de transesterificação enantiosseletiva com a lipase imobilizada para o (*RS*)-1-(fenil)etanol e com a lipase livre. O primeiro cromatograma obtido da reação com a enzima imobilizada pelos 3 métodos, apresenta uma total conversão do álcool (50 %) em seu éster correspondente com 99 % de excesso enantiomérico. O segundo cromatograma apresenta uma diminuição da conversão (45 %), mas para este substrato o éster se mantém com 99 % de excesso enantiomérico.

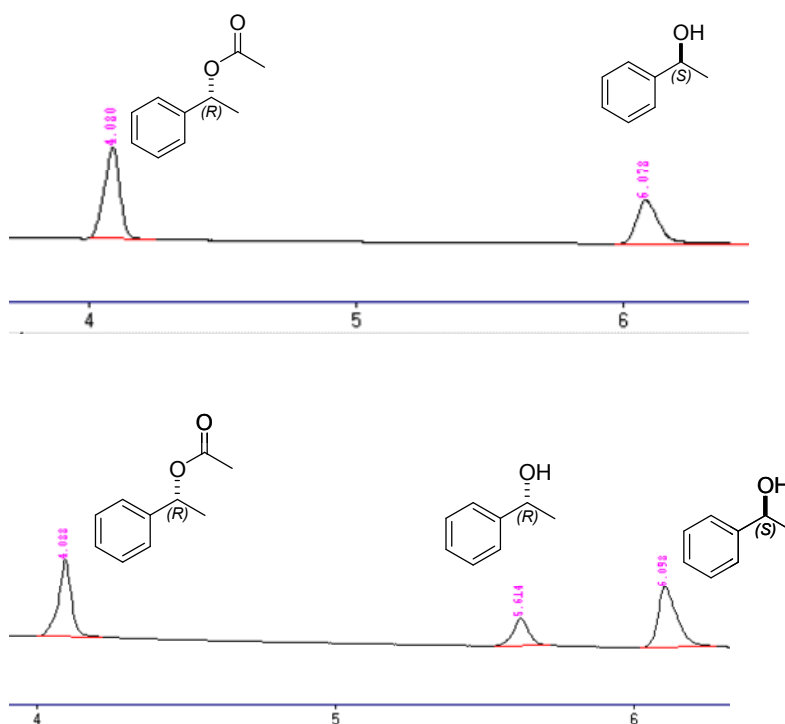


Figura 18: Comparação entre o cromatograma obtido em CG da reação de transesterificação catalisada pela lipase de *B.cepacia* imobilizada em nanopartículas magnéticas e a enzima livre

Na Figura 19 há a comparação dos cromatogramas obtidos nas reações de transesterificação enantiosseletiva com a lipase imobilizada para o (*RS*)-1-(4-nitrofenil)etanol e com a lipase livre. O primeiro cromatograma obtido da reação com a enzima imobilizada pelos 3 métodos, apresenta uma total conversão do (*R*)-álcool (50 %) em seu (*R*)-éster correspondente com 99 % de excesso enantiomérico. O segundo cromatograma (enzima livre) apresenta uma diminuição da conversão (42 %), mas para este substrato o éster se mantém com 99 % de excesso enantiomérico.

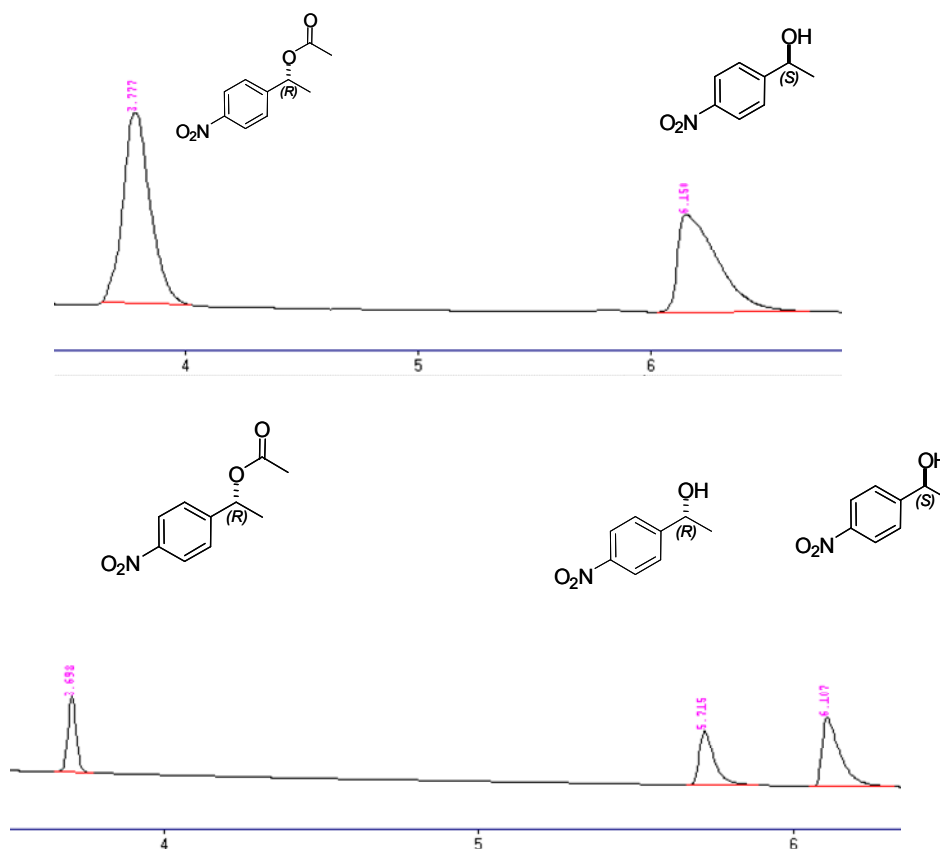


Figura 19: Comparação entre o cromatograma obtido em CG da reação de transesterificação catalisada pela lipase de *B. cepacia* imobilizada em nanopartículas magnéticas e a enzima livre

4.7 Estudo da influência de diferentes acilantes, temperaturas e tempos reacionais para a resolução cinética do (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol

Visando a melhoria nos resultados de conversão para a reação de transesterificação enantiosseletiva do (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol, avaliou-se diferentes parâmetros que influenciam na resolução cinética enzimática. Os parâmetros estudados foram o agente acetilante, a temperatura, o tempo reacional, utilizando TBME e tolueno como solventes. A quantidade de biocatalisador e sua proporção com o suporte (nanopartículas magnéticas), assim como a quantidade de substrato a ser utilizada foram estabelecidos para cada tipo de imobilização, conforme estudos anteriores mostrados neste trabalho. Sabe-se que a velocidade de reação é afetada com a variação das concentrações dos reagentes. Em contraste com as esterases, que apresentam atividades de Michaelis-Menten normal, ou seja, a atividade da enzima aumenta conforme a concentração do substrato aumenta, chegando até um limite de saturação; as lipases não apresentam atividades enquanto seus substratos estão em uma concentração abaixo da ideal. Contudo, quando a concentração do substrato está próxima ou ultrapassa o seu limite de solubilidade, ocorre um rápido aumento na atividade. A razão pela qual uma lipase não hidrolisa substratos que estejam abaixo de uma concentração mínima (chamada concentração micelar crítica, CMC) e somente em concentrações acima desta é chamada de ativação interfacial (Ferrato *et al.*, 1997). Dessa maneira, a concentração do substrato afeta a cinética de reações enzimáticas e, conseqüentemente, pode modificar a enantiosseletividade e a conversão do processo (Sarda e Desnuelle, 1958).

Portanto, investigou-se a melhoria da reação de resolução cinética enzimática para o (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol utilizando 0,01 mmol deste álcool e 20 mg de nanopartículas magnéticas funcionalizadas usando os 3 tipos de imobilização com quantidade de biocatalisador de 0,21 mg para fisissorção, 0,23 mg para quimissorção através do carboxibenzaldeído e 0,26 mg para quimissorção através do glutaraldeído. Os resultados para esses estudos estão explicados detalhadamente nos itens abaixo.

4.7.1 Estudo do efeito do agente acilante na resolução cinética do (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol utilizando a lipase de *B. cepacia* imobilizada em nanopartículas magnéticas

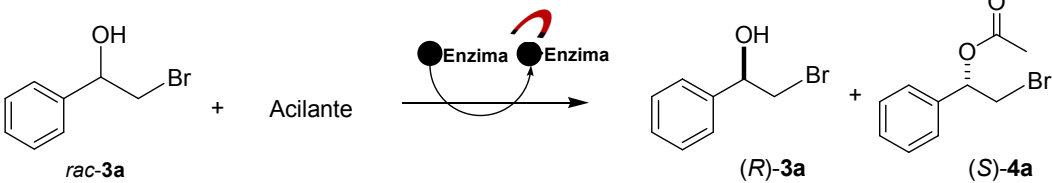
A natureza do acilante exerce uma grande influência na conversão e enantiosseletividade do processo de RCE (Zarevucka *et al.*, 1995). Normalmente são empregados ésteres vinílicos como doadores de acetila para reações de resolução cinética enzimática de alcoóis. Neste caso o enol formado após acilação do resíduo da serina é rapidamente transformado em seu tautômero (acetaldeído), que é mais estável. Essa estratégia desloca o equilíbrio da reação na direção dos produtos, pois impede que uma possível competição nucleofílica do álcool formado (enol-acetaldeído) nesta etapa e o substrato com o intermediário acil-enzima. Quando se utiliza o acetato de isoprenila, o enol formado é rapidamente transformado em acetona e quando se utiliza o acetato de etila, o enol formado é transformado em etanol.

Neste trabalho, todos os agentes acilantes utilizados são doadores de acetila (acetato de vinila, acetato de isoprenila e acetato de etila). Essa escolha se deve a relatos da literatura (Ivanov e Schneider, 1997; Zheng *et*

al., 2003; Hara *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008) que mostram uma melhor conversão na reação de transesterificação enantiosseletiva quando estes agentes acilantes são utilizados.

Pode-se observar na Tabela 8 (linha 3) quando utilizado acetato de etila em TBME, não há conversão, enquanto na linha 1, obteve-se uma conversão de 10 % quando utilizado acetato de vinila como doador de acetila. Na linha 2, percebe-se uma pequena conversão de apenas 4 % quando utilizado acetato de isoprenila.

Tabela 8: Estudo do efeito de acilantes na resolução cinética do (*RS*)-2-bromo-1-(fenil)etanol mediada pela lipase de *B. cepacia* imobilizada por fisissorção



Acilante	Solvente (mL)	Tipo de imobilização	e.e. ^a (%)		Conv. ^b (%)	E ^c
			(<i>R</i>)-3a	(<i>S</i>)-4a		
1 Acetato de vinila	TBME	Fisissorção	11	99	10	>200
2 Acetato de isoprenila	TBME	Fisissorção	3	99	4	>200
3 Acetato de etila	TBME	Fisissorção	-	-	-	-
4 Acetato de vinila	Tolueno	Fisissorção	15	99	13	>200
5 Acetato de isoprenila	Tolueno	Fisissorção	6	99	5	>200
6 Acetato de etila	Tolueno	Fisissorção		-	-	-

Condições reacionais: 32°C; 24h, 0,3 mmol de acilante; 800 rpm, *thermomixer*, 20 mg de NapMg:0,21 mg de proteína, 1 mL de solvente.
^ae.e. determinado por CG; ^bC=e.e.S/(e.e.S+e.e.P), E^c={ln[e.e.P(1-e.e.S)]/(e.e.P+e.e.S)}/{ln[e.e.P(1+e.e.S)]/(e.e.P+e.e.S)}.

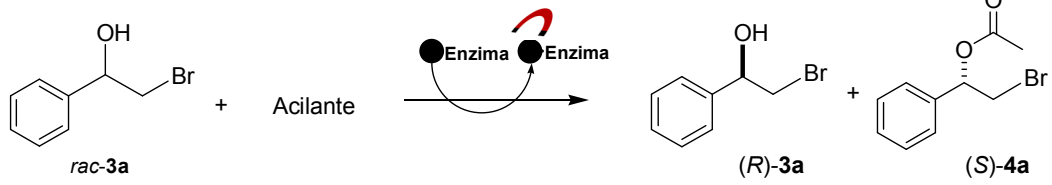
Os resultados são referentes ao mesmo tipo de imobilização por fisissorção, tendo 0,21 mg de proteína imobilizada em 20 mg de nanopartículas magnéticas. O estudo do solvente pode ser observado quando

se utilizou tolueno. Quando se utilizou TBME e acetato de vinila (Tabela 8, linha 1) obteve-se uma conversão de 10 %, já para o tolueno (Tabela 8, linha 4) obteve-se uma conversão de 13 %.

Pode-se concluir que para a lipase imobilizada por fisissorção, o tolueno como solvente e acetato de vinila como acilante da resolução cinética levou a um melhor resultado de conversão.

Estudos de resolução cinética enzimática do substrato (*rac*-**3a**), utilizando a enzima imobilizada por quimissorção através do glutaraldeído, foram realizados e encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9: Estudo do efeito de acilantes na resolução cinética do (*RS*)-2-bromo-1-(fenil)etanol mediada pela lipase de *B. cepacia* imobilizada por glutaraldeído em TBME e tolueno.



Acilante	Solvente (mL)	Tipo de imobilização	e.e. ^a (%)		Conv. ^b (%)	E ^c
			(R)-3a	(S)-4a		
1 Acetato de vinila	TBME	Glutaraldeído	20	99	17	>200
2 Acetato de isoprenila	TBME	Glutaraldeído	23	99	18	>200
3 Acetato de etila	TBME	Glutaraldeído	-	-	-	-
4 Acetato de vinila	Tolueno	Glutaraldeído	23	99	18	>200
5 Acetato de isoprenila	Tolueno	Glutaraldeído	10	99	9	>200
6 Acetato de etila	Tolueno	Glutaraldeído	-	-	-	-

Condições reacionais: 32°C; 24h, 0,3 mmol de acilante; 800 rpm, *thermomixer*, 20 mg de NapMg:0,26 mg de proteína, 1 mL de solvente.
^ae.e. determinado por CG; ^bC=e.e.S/(e.e.S+e.e.P), E^c={ln[e.e.P(1-e.e.S)]/(e.e.P+e.e.S)} / {ln[e.e.P(1+e.e.S)]/(e.e.P+e.e.S)}.

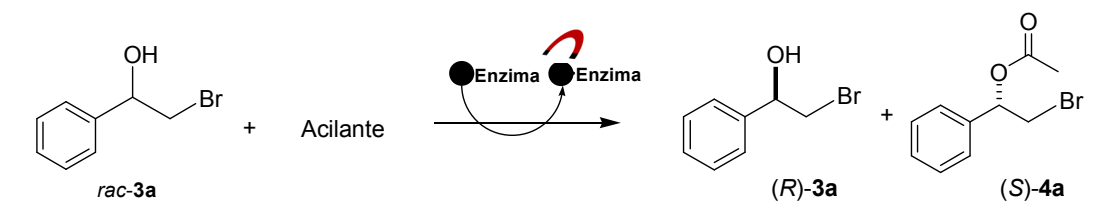
Ao compararem-se os resultados obtidos quando se utiliza a enzima imobilizada por quimissorção através do glutaraldeído (Tabela 9) com os

resultados obtidos através da enzima imobilizada por fisissorção (Tabela 8), nota-se que as maiores conversões foram obtidas quando se utilizou glutaraldeído, isto se deve pelo fato de ter-se obtido 0,26 mg de enzima imobilizada, enquanto que para a fisissorção obteve-se 0,23 mg. Sabe-se que quanto maior a quantidade de biocatalisador, maior a conversão obtida.

Na linha 1 da Tabela 9 observa-se uma conversão de 17 % para acetato de vinila em TBME, enquanto que para o tolueno (linha 4) uma conversão de 18 %. Quando se utilizou acetato de isoprenila em TBME (linha 5) obteve-se uma conversão de 18 % enquanto para o tolueno obteve-se uma conversão de 9 %, ou uma diminuição de 50 %, este resultado é bem diferente do esperado.

Pode-se concluir que tolueno como solvente e acetato de vinila como acilante apresentaram os melhores resultados na reação de transesterificação enantiosseletiva do (*RS*)-2-bromo-1-(fenil)etanol, tanto com a enzima imobilizada por fisissorção quanto com a enzima imobilizada por quimissorção através do glutaraldeído.

Por último, realizou-se a resolução cinética enzimática do substrato *rac-3a*, utilizando a enzima imobilizada por quimissorção através do carboxibenzaldeído. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10: Estudo do efeito de acilantes na resolução cinética do (*RS*)-2-bromo-1-(fenil)etanol mediada pela lipase de *B. cepacia* imobilizada por carboxibenzaldeído em TBME e tolueno.

Acilante	Solvente (mL)	Tipo de imobilização	e.e. ^a (%)		Conv. ^b (%)	E ^c
			(<i>R</i>)-3a	(<i>S</i>)-4a		
1 Acetato de vinila	TBME	Carboxibenzaldeído	15	99	16	>200
2 Acetato de isoprenila	TBME	Carboxibenzaldeído	34	99	12	>200
3 Acetato de etila	TBME	Carboxibenzaldeído	-	-	-	-
4 Acetato de vinila	Tolueno	Carboxibenzaldeído	11	99	10	>200
5 Acetato de isoprenila	Tolueno	Carboxibenzaldeído	7	99	6	>200
6 Acetato de etila	Tolueno	Carboxibenzaldeído	-	-	-	-

Condições reacionais: 32°C; 24h, 0,3 mmol de acilante; 800 rpm, *thermomixer*, 20 mg de NapMg:0,23 mg de proteína, 1 mL de solvente.

^ae.e. determinado por CG; ^bC=e.e.S/(e.e.S+e.e.P), E^c=(ln[e.e.P(1-e.e.S)]/(e.e.P+e.e.S))/ln[e.e.P(1+e.e.S)]/(e.e.P+e.e.S).

Utilizando o método de imobilização através do carboxibenzaldeído obteve-se 0,23 mg de proteína imobilizada. Os resultados encontram-se na faixa de conversão entre 12 e 16 % quando utilizou TBME como solvente. E na faixa de 6-10 % quando se utilizou tolueno como solvente.

Na Tabela 10 o acetato de vinila apresentou os melhores resultados de conversão. Quanto ao solvente, para este caso, TBME foi o melhor solvente da reação.

Uma análise conjunta destes resultados leva a concluir que o melhor agente acilante para a reação de resolução cinética catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* em nanopartículas magnéticas nos 3 tipos de imobilização foi o acetato de vinila. E o melhor solvente, ambos, tolueno e TBME deram resultados satisfatórios. Levando em conta que um parâmetro

reacional a ser estudado é o aumento da temperatura, decidiu-se escolher o tolueno como solvente na RCE utilizando a lipase imobilizada através dos 3 métodos.

4.7.2 Estudo do efeito da temperatura na resolução cinética do (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol utilizando a lipase de *B. cepacia* imobilizada em nanopartículas magnéticas

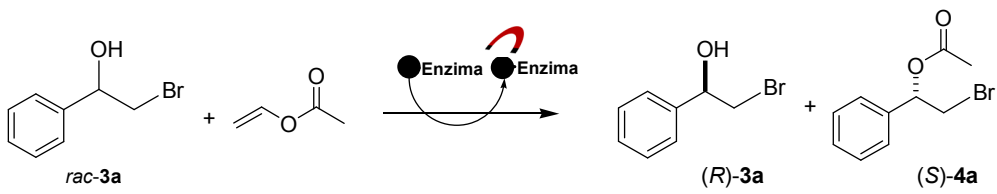
A conformação adquirida por uma enzima será resultante das interações existentes entre seus grupos funcionais e da sua interação com o meio reacional. A variação na temperatura pode afetar energeticamente essas interações de modo a termos uma variação na conformação da cadeia polipeptídica e, conseqüentemente, uma variação no sítio ativo da enzima. Uma vez que o sítio ativo da enzima sofre variação, a enantiosseletividade da reação pode ser variada. Vários estudos de RCE avaliaram a influência da temperatura na reação, de modo a racionalizar mecanisticamente esse efeito (Schmid e Verger, 1998). Dessa maneira, é possível evidenciar a mudança conformacional da enzima através da comparação da atividade enzimática com parâmetros físicos-químicos. Entretanto, no presente trabalho não se buscou dados mecanísticos, e sim a otimização do processo de RCE.

Em geral, uma elevação de 10°C na temperatura de um sistema duplica a velocidade das reações. Este enunciado é conhecido como regra de Van't Hoff (Krug *et al.*, 1976). Esta regra é uma aproximação, não podendo ser amplamente aplicada ao comportamento dos diversos tipos de reação existentes.

Sabe-se ainda que o tempo reacional é de extrema importância ao analisar-se uma resolução cinética. Baseado nestas teorias e considerações investigou-se a influência da variação de temperatura e da variação do tempo reacional na reação de transesterificação enantiosseletiva do (*RS*)-2-bromo-1-(fenil)etanol, utilizando a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em nanopartículas magnéticas. As condições reacionais para esse estudo foram determinadas nos estudos anteriores.

A Tabela 11 mostra os resultados obtidos na temperatura de 32 °C, variando o tempo reacional em 24, 48 e 72 horas nos 3 diferentes tipos de imobilização.

Tabela 11: Estudo do efeito da temperatura (32°C) na resolução cinética do (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol mediada pela lipase de *B. cepacia* imobilizada por fisissorção, glutaraldeído e carboxibenzaldeído



	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Tipo de imobilização	e.e. ^a (%)		Conv. ^b (%)	E ^c
				(R)-3a	(S)-4a		
1	32	24	Fisissorção	16	99	14	>200
2	32	48	Fisissorção	23	99	19	>200
3	32	72	Fisissorção	21	99	17	>200
4	32	24	Glutaraldeído	21	99	18	>200
5	32	48	Glutaraldeído	33	99	25	>200
6	32	72	Glutaraldeído	40	99	29	>200
7	32	24	Carboxibenzaldeído	15	99	13	>200
8	32	48	Carboxibenzaldeído	17	99	15	>200
9	32	72	Carboxibenzaldeído	16	99	14	>200

Condições reacionais: 30 μ L de acetato de vinila; 20 mg de NapMg:0,21 mg de proteína para fisissorção, 20 mg de NapMg:0,26 mg de proteína para carboxibenzaldeído, 20 mg de NapMg:0,28 mg de proteína para glutaraldeído 800 rpm, *thermomixer*, 1 mL de tolueno. ^ae.e. determinado por CG; ^bC=e.e.S/(e.e.S+e.e.P), ^cE=ln{[e.e.P(1-e.e.S)]/(e.e.P+e.e.S)}/ln{[e.e.P(1+e.e.S)]/(e.e.P+e.e.S)}

A melhor conversão (29 %) alcançada encontra-se na linha 6 (Tabela 11) após 72 horas de reação. Neste caso a enzima está imobilizada quimicamente através do glutaraldeído. Comparando esse resultado com o de 48 horas, onde se obteve uma conversão de 25 %, pode-se inferir que com o aumento do tempo reacional, aumenta-se a conversão, os resultados obtidos foram como esperado. Isto pode ser observado nas linhas 1 e 2 da Tabela 11, utilizando fisissorção, tem-se uma conversão de 14 % em 24

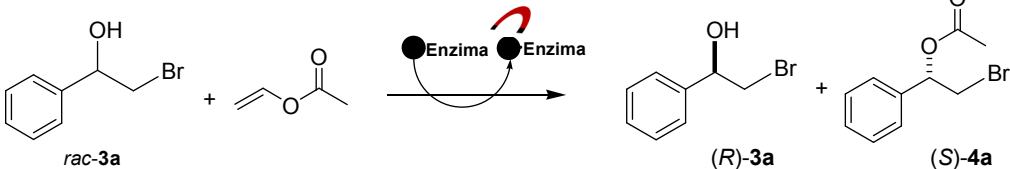
horas e de 19 % em 48 horas. Entretanto, após 72 horas houve uma diminuição de conversão (17 %).

Analisando as linhas 7 a 9 da Tabela 11, percebe-se que não há uma grande variação de conversão (13-15 %) quando se utiliza a enzima imobilizada por quimissorção através do carboxibenaldeído.

Com esse estudo conclui-se que o tempo reacional de 72 horas pode ser excluído, deste modo os estudos avançaram na análise do aumento de temperatura, variando o tempo reacional em 24 e 48 horas.

A Tabela 12 mostra os resultados obtidos na temperatura de 42 °C, variando o tempo reacional em 24, 48 horas nos 3 diferentes tipos de imobilização.

Tabela 12: Estudo do efeito da temperatura (42°C) na resolução cinética do (*RS*)-2-bromo-1-(fenil)etanol mediada pela lipase de *B. cepacia* imobilizada por fisissorção, glutaraldeído e carboxibenaldeído



	Temperatura (°C)	t (h)	Tipo de imobilização	e.e. ^a (%)		Conv. ^b (%)	E ^c
				(<i>R</i>)-3a	(<i>S</i>)-4a		
1	42	24	Fisissorção	51	99	34	>200
2	42	48	Fisissorção	16	99	14	>200
3	42	24	Glutaraldeído	22	99	18	>200
4	42	48	Glutaraldeído	38	99	26	>200
5	42	24	Carboxibenaldeído	21	99	18	>200
6	42	48	Carboxibenaldeído	36	99	24	>200

Condições reacionais: 30 µL de acetato de vinila; 20 mg de NapMg; 0,21 mg de proteína para fisissorção, 20 mg de NapMg; 0,26 mg de proteína para carboxibenaldeído, 20 mg de NapMg; 0,28 mg de proteína para glutaraldeído 800 rpm, *thermomixer*, 1 mL de tolueno. ^ae.e. determinado por CG; ^bC=e.e.*S*/(e.e.*S*+e.e.*P*), ^cE=ln{[e.e.*P*(1-e.e.*S*)]/(e.e.*P*+e.e.*S*)} / ln{[e.e.*P*(1+e.e.*S*)]/(e.e.*P*+e.e.*S*)}

A melhor conversão (26 %) alcançada encontra-se na linha 4 (Tabela 12) em 48 horas de reação. Nesse caso a enzima está imobilizada quimicamente através do glutaraldeído. Comparando o resultado de 24 horas, encontra-se uma conversão de 18 % (linha 3, Tabela 12), neste caso o aumento de temperatura de 32°C (linha 4, Tabela 11) para 42 °C não influenciou na conversão. Isto pode ser observado nas linhas 4 e 5 da Tabela 11, utilizando glutaraldeído a 32 °C tem-se uma conversão de 18 % em 24 horas e de 25 % em 48 horas. Um aumento de temperatura não influenciou em um aumento significativo da conversão.

Analisando as linhas 5 e 6 da Tabela 12, percebe-se que o aumento em 10°C na temperatura influenciou a conversão, quando se utilizou a enzima imobilizada por quimissorção através do carboxibenzaldeído. Em 24 horas, a conversão foi obtida em 18 % e 24 % para 48 horas. Comparando esses dados com a Tabela 11 a 32 °C, obteve-se uma variação de 13-15 % de conversão em 24 e 48 horas respectivamente.

Agora para a enzima imobilizada por fisissorção, um aumento de 10 °C na temperatura aumentou significativamente a conversão, obtendo-se 34 % de conversão em 24 horas de reação a 42 °C (linha 1, Tabela 12). Sendo que neste mesmo tempo, a 32 °C (linha 1, Tabela 11) foram obtidos 14 % de conversão. Mas em 48 horas de reação houve uma redução da conversão, passando para 14 %. Um aumento no tempo reacional a 42 °C, utilizando a enzima imobilizada somente por método físico, leva a uma dessorção da enzima imobilizada, levando a perda da atividade enzimática nesta temperatura.

Através destes estudos da influência de temperatura, pode-se concluir que um aumento de temperatura não leva a um aumento significativo de conversão para glutaraldeído a 42 °C. Pode-se ainda concluir que um aumento do tempo reacional é o parâmetro que mais tem influenciado no aumento da conversão para fisissorção e carboxibenaldeído.

Investigando melhor o efeito da temperatura e tempo reacional, realizou-se um aumento de temperatura para 52 °C em 24 e 48 horas.

A Tabela 13 mostra os resultados obtidos na temperatura de 52 °C, variando o tempo reacional em 24, 48 horas nos 3 diferentes tipos de imobilização.

Tabela 13: Estudo do efeito da temperatura (52°C) na resolução cinética do (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol mediada pela lipase de *B. cepacia* imobilizada por fisissorção, glutaraldeído e carboxibenaldeído

	Temperatura (°C)	t (h)	Tipo de imobilização	e.e. ^a (%)		Conv. ^b (%)	E ^c
				(R)-3a	(S)-4a		
1	52	24	Fisissorção	14	99	12	>200
2	52	48	Fisissorção	23	99	19	>200
3	52	24	Glutaraldeído	31	99	24	>200
4	52	48	Glutaraldeído	50	99	34	>200
5	52	24	Carboxibenaldeído	20	99	17	>200
6	52	48	Carboxibenaldeído	26	99	21	>200

Condições reacionais: 30 µL de acetato de vinila; 20 mg de NapMg:0,21 mg de proteína para fisissorção, 20 mg de NapMg:0,26 mg de proteína para carboxibenaldeído, 20 mg de NapMg:0,28 mg de proteína para glutaraldeído 800 rpm, *thermomixer*, 1 mL de tolueno. ^ae.e. determinado por CG; ^bC=e.e.S/(e.e.S+e.e.P), ^cE=ln{[e.e.P(1-e.e.S)]/(e.e.P+e.e.S)}/ln{[e.e.P(1+e.e.S)]/(e.e.P+e.e.S)}

A melhor conversão (34 %) alcançada encontra-se na linha 4 em 48 horas de reação quando a enzima está imobilizada quimicamente através do

glutaraldeído. Comparando o resultado de 24 horas, encontra-se uma conversão de 24 % (linha 3, Tabela 13), neste caso o aumento de temperatura de 32°C (linha 4, Tabela 11) para 52 °C influenciou nos dados de conversão. Passando de 18 % para 24 % de conversão. Neste estudo, pode-se concluir que um aumento de temperatura de 20 °C aumentou a conversão.

Analisando as linhas 5 e 6 da Tabela 13, percebe-se que o aumento de temperatura não influenciou na diminuição da conversão, quando se utilizou a enzima imobilizada por quimissorção através do carboxibenzaldeído. Em 24 horas, a conversão foi obtida em 17 % e 21 % para 48 horas. Comparando esses dados com a Tabela 12 a 42 °C, obteve-se uma variação de 18-24 % de conversão em 24 e 48 horas respectivamente. Ou seja, um aumento de temperatura no mesmo tempo reacional manteve os dados de conversão.

Utilizando fisissorção a 52 °C, tem-se uma conversão de 12 % em 24 horas e de 19 % em 48 horas. Um aumento de temperatura não resultou em um aumento significativo da conversão e sim uma significativa diminuição da conversão. Sendo que neste mesmo tempo, a 42 °C (linha 1, Tabela 12) foram obtidos 34 % de conversão. Mas em 48 horas de reação houve uma redução da conversão, passando para 14 %. Um aumento da temperatura reacional para 52 °C, utilizando a enzima imobilizada somente por método físico, leva a uma dessorção da enzima imobilizada, levando a perda da atividade enzimática nesta temperatura.

Uma análise conjunta as tabelas, leva a concluir que a enzima imobilizada por quimissorção através do glutaraldeído suporta melhor o

aumento de temperatura, isto é comprovado pelos resultados de conversão a 52 °C. Para o método de fisissorção, a temperatura de 42 °C no tempo de 24 horas leva a uma melhor conversão, mas esta é o limite, pois aumentando o tempo reacional ou um aumento de temperatura leva a uma queda de conversão.

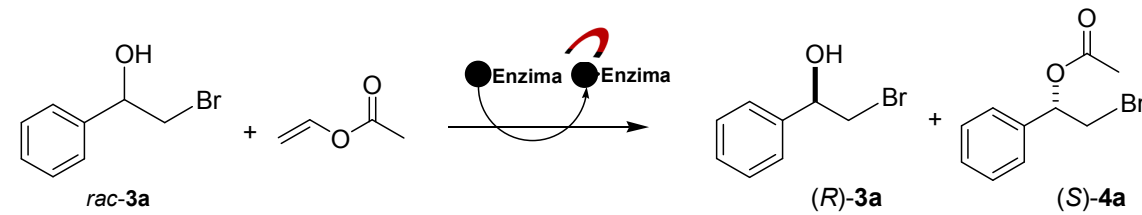
Já para a enzima imobilizada quimicamente através do carboxibenzaldeído em 42 e 52 °C um aumento de temperatura e aumento da temperatura reacional, não levam a uma variação significativa de conversão.

4.8 Estocagem

Outro parâmetro avaliado foi à influência do tempo de estocagem sob baixa temperatura na manutenção das propriedades catalíticas da lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em nanopartículas magnéticas através do método de fisissorção, este parâmetro avaliou a estabilidade do sistema enzima-nanopartícula magnética. Este sistema foi armazenado em freezer durante 30 dias a -18°C e em seguida foi medida sua atividade enzimática através da reação de transesterificação enantiosseletiva do (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol.

A estocagem de catalisadores imobilizados é um parâmetro importante e que, em geral, determina a viabilidade econômica de processos biocatalisados (Mateo *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008a).

Os resultados obtidos encontram-se resumidos na Tabela 14.

Tabela 14: Resolução cinética do (*RS*)-2-bromo-1-(fenil)etanol mediada pela lipase de *B. cepacia* estocada durante 30 dias


	Solvente (mL)	<i>rac</i> -1 (mmol)	e.e. ^a (%)		Conv. ^b (%)	<i>E</i> ^c
			(<i>R</i>)-3a	(<i>S</i>)-4a		
1	TBME	0,01	10	99	11	>200
2	TBME	0,01	9	99	10	>200
3	Tolueno	0,01	18	99	14	>200
4	Tolueno	0,01	15	99	12	>200

Condições reacionais: 32°C; 24 h; 30 µL de acetato de vinila; 20 mg de NapMg; 0,21 mg de proteína; 800 rpm, *thermomixer*, 1 mL de solvente. ^ae.e. determinado por CG; ^bC=e.e.*S*/(e.e.*S*+e.e.*P*), ^cE=ln{[e.e.*P*(1-e.e.*S*)]/(e.e.*P*+e.e.*S*)} / ln{[e.e.*P*(1+e.e.*S*)]/(e.e.*P*+e.e.*S*)}

As reações foram realizadas em duplicata e pode-se concluir que o processo de estocagem não causa perda de enantiosseletividade da enzima imobilizada por fisissorção e nem uma significativa variação nos dados de conversão e enantiosseletividade.

Ao compararem-se esses resultados com a Tabela 8, utilizando TBME e tolueno como solventes, percebe-se que a conversão não sofreu variação significativa.

Pode-se concluir que este método de imobilização e estocagem mantém a atividade da enzima após o período de 30 dias de estocagem.

4.9 Reciclagem da enzima

Assim como a estocagem, a reciclagem de biocatalisadores imobilizados é outro parâmetro importante que determina a viabilidade econômica de imobilizar enzimas. Outra vantagem é sua aplicação em

indústrias, visto que o maior interesse é a redução de custos, possibilitada através de enzimas imobilizadas em nanopartículas magnéticas.

O Gráfico 6 apresenta resumidamente os dados obtidos para o processo de reciclagem da lipase, utilizando os 3 tipos de imobilização na reação de transesterificação enantiosseletiva do (*RS*)-1-(fenil)etanol. Este substrato foi escolhido, pelo fato de apresentar uma conversão de 50 % e excesso enantiomérico do éster de 99 %, já que em uma resolução cinética enzimática, a conversão máxima é de 50 %. Com isso, pode-se avaliar a reciclagem da lipase imobilizada, medindo sua atividade através da resolução cinética enzimática, após cada ciclo reacional.

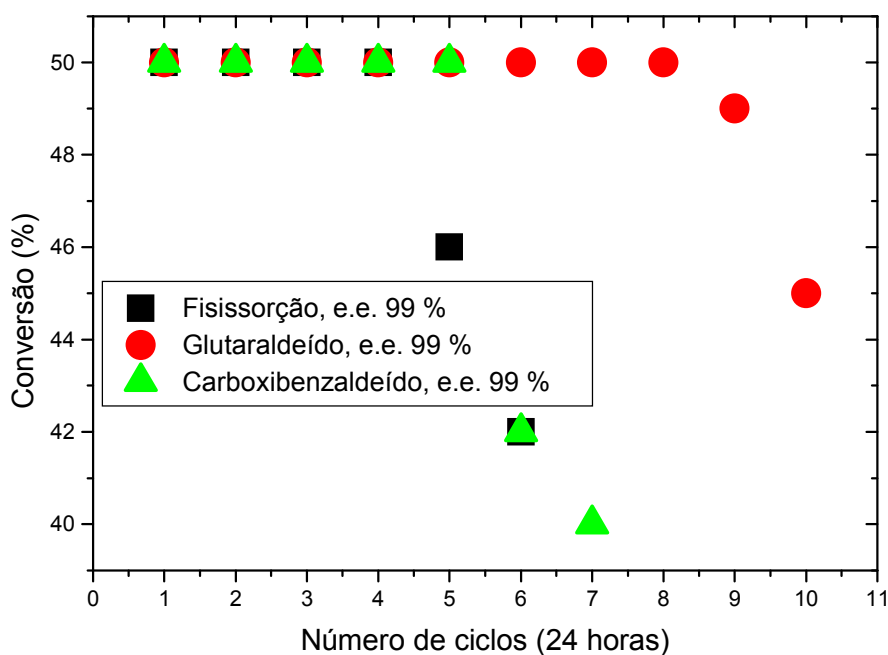


Gráfico 6: Resultados em conversão *versus* número de ciclos da reciclagem da lipase de *Burkholderia cepacia* utilizando os 3 tipos de imobilização: fisissorção, quimissorção com glutaraldeído e carboxibenzaldeído.

Para o processo de fisissorção representado pelo ponto preto, obteve-se 50 % de conversão durante 4 ciclos, para a enzima imobilizada quimicamente através do glutaraldeído obteve-se 50 % de conversão em 8 ciclos, enquanto para o carboxibenzaldeído obteve-se 50 % de conversão em

5 ciclos. Para todos os ciclos, o excesso enantiomérico do éster manteve-se em 99 %.

O processo no qual a enzima é imobilizada através do carboxibenzaldeído, levou a 5 reciclos mantendo a conversão de 50 %, mas logo em seguida houve uma queda brusca da conversão.

Para os métodos de imobilização no qual a enzima é imobilizada covalentemente, houve um maior número de ciclos quando comparado com o método de imobilização por fisissorção. E a imobilização por quimissorção através do glutaraldeído é o melhor tipo de imobilização para ser utilizado no processo de reciclagem, durante 8 ciclos, a conversão se manteve em 50 %. Além disto, a imobilização através do glutaraldeído apresentou os melhores resultados em conversão para outros substratos testados neste trabalho.

Quando a lipase está imobilizada apenas por métodos físicos pode ocorrer a dessorção desta lipase durante a reação e repetição do ciclo, assim diminuindo a quantidade de biocatalisador disponível para reação.

4.10 Determinação estrutural

A identificação estrutural dos compostos químicos **2b**, **3a-b**, **4a-b**, **5a-b**, **6a-b**, **7a-b** e **8a-b** foram realizadas utilizando a análise dos dados de diferentes técnicas espectroscópicas (RMN de ^1H e ^{13}C , IV, CG-EM).

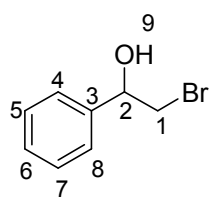
Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C encontram-se nas tabelas 1 a 13 e os respectivos espectros encontram-se nos anexos juntamente com os espectros de IV e CG-EM.

De maneira geral, a análise espectroscópica foi realizada comparando-se os espectros do material de partida com o produto da reação,

considerando-se apenas as mudanças significativas no espectro, assim não é explicado detalhadamente a atribuição de cada deslocamento químico.

4.10.1 Identificação do (*RS*)-2-bromo-1-(fenil)etanol (**3a**)

Tabela 15: Dados de RMN ^a de ¹H e ¹³C do produto (**3a**) em CDCl₃



Posição	δ ¹ H (ppm), mult., <i>J</i> (Hz)	δ ¹³ C (ppm)
1	3,67-3,48 (m, 2H)	39,9
2	4.89 (dd, 1H, <i>J</i> = 3,4Hz, 9Hz)	73,7
3		140,3
4, 5, 6, 7 e 8	7,36-7,33 (m, 5H)	128,5; 128,3; 125,9
9	2,46 (s, 1H)	–

^a 200 MHz para ¹H e 50 MHz para ¹³C

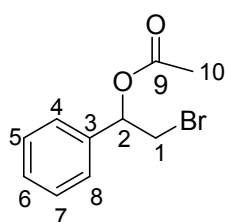
Os deslocamentos químicos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e suas multiplicidades indicam a formação de **3a**. O singlete (δ = 2,46 ppm) com integral para 1 hidrogênio é referente ao hidrogênio (H-9) ligado diretamente ao oxigênio. O dubleto (δ = 4,89 ppm) com integral para 1 hidrogênio é referente ao hidrogênio ligado ao carbono assimétrico. O sinal dos hidrogênios diastereotópicos (H-1) aparece junto e absorvem como multipletto (δ = 3,67-3,48 ppm) com integral para 2 hidrogênios.

A análise do espectro de ressonância magnética nuclear de carbono mostra claramente que não há sinal na região das carbonilas entre δ = 160-180 ppm.

Na espectroscopia do infravermelho destaca-se uma banda de deformação axial em 3395 cm^{-1} referente à ligação O-H do álcool.

4.10.2 Identificação do Acetato de (*RS*) 2-bromo-1-(fenil)etila (**4a**)

Tabela 16: Dados de RMN ^a de ¹H e ¹³C do produto (**4a**) em CDCl₃



Posição	δ ¹ H (ppm), mult.	δ ¹³ C (ppm)
1	3,65-3,59 (m, 2H)	36,6
2	6,01-5,94 (m, 1H)	73,6
3	–	137,6
4, 5, 6, 7 e 8	7,37-7,34 (m, 5H)	128,2; 129,3; 125,9
9	–	171,8
10	2,13 (s, 3H)	21,0

^a 200 MHz para ¹H e 50 MHz para ¹³C

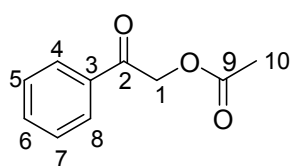
Os deslocamentos químicos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e suas multiplicidades indicam a formação de **4a**. O singlete (δ = 2,13 ppm) com integral para 3 hidrogênios é referente a metila ligada diretamente a carbonila (C-9). O hidrogênio (H-2) ligado ao carbono assimétrico absorve entre δ = 6,01-5,94 ppm como um multipeto com integral para 1 hidrogênio. O sinal dos hidrogênios diastereotópicos (H-1) aparecem juntos e absorvem como multipeto (δ = 3,65-3,59 ppm) com integral para 2 hidrogênios.

Através da análise do espectro de ressonância magnética nuclear de carbono foi observado o sinal (δ = 21,0 ppm) referente a uma metila (C-10)

desblindada pela carbonila (C-9), assim este sinal aparece em campo magnético alto no espectro.

4.10.3 Identificação do Acetato-2-(fenil)-2-oxo-etila (5a)

Tabela 17: Dados de RMN ^a de ¹H e ¹³C do produto (5a) em CDCl₃



Posição	δ ¹ H (ppm), mult., <i>J</i> (Hz)	δ ¹³ C (ppm)
1	5,34 (s, 2H)	65,9
2	-	192,1
3	-	133,8;
4 e 8	7,92-7,89 (m, 2H)	124,0
5, 6 e 7	7,64-7,44 (m, 3H)	128,7; 127,6
9	-	170,3
10	2,22 (s, 3H)	20,5

^a 200 MHz para ¹H e 50 MHz para ¹³C

Os deslocamentos químicos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e suas multiplicidades indicam a formação de **5a**. O singlete ($\delta = 5,34$ ppm) com integral para 2 hidrogênios é referente ao hidrogênio ligado ao carbono (C-2) vizinho à carbonila e ao oxigênio do éster. Os hidrogênios (H-10) referentes a metila ligada diretamente a carbonila (C-9) do grupo acetoxila absorvem ($\delta = 2,22$ ppm) como um singlete com integral para 3 hidrogênios.

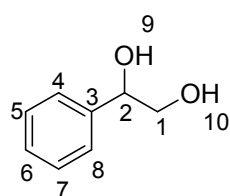
Através da análise do espectro de ressonância magnética nuclear de carbono foi observado o sinal ($\delta = 192,1$ ppm) referentes a carbonila da

cetona (C-2) e o sinal ($\delta = 170,3$ ppm) referente a carbonila (C-9) do grupo acetoxila.

Na espectroscopia do infravermelho destacam-se duas bandas de deformação axial das carbonilas, uma da ligação C=O de cetona (C-2) em 1703 cm^{-1} e outra da ligação C-O de éster (C-9) em 1748 cm^{-1} .

4.10.4 Identificação do (RS)-1-(fenil)-1,2-etanodiol (6a)

Tabela 18: Dados de RMN ^a de ¹H e ¹³C do produto (6a) em CDCl₃



Posição	δ ¹ H (ppm), mult.	δ ¹³ C (ppm)
1	3,67-3,63 (m, 2H)	68,0
2	4,80-4,78 (m, 1H)	74,6
3	–	137,7
4, 5, 6, 7 e 8	7,21-7,33 (m, 5H)	128,5; 127,9; 126,0
9 ^b	3,19 (s, 1H)	–
10 ^b	2,78 (s, 1H)	–

^a 200 MHz para ¹H e 50 MHz para ¹³C; ^b valores permutáveis

Os deslocamentos químicos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e suas multiplicidades indicam a formação de **6a**. Os sinais referentes aos hidrogênios ligados diretamente ao oxigênio absorvem como um singlete com integral para 1 hidrogênio, um em $\delta = 3,19$ ppm (H-9) e o outro em $\delta = 2,78$ ppm (H-10). Estes sinais, provavelmente são das duas hidroxilas do diol. O hidrogênio (H-2) ligado ao carbono assimétrico absorve entre $\delta = 4,80-4,78$ ppm como um multiplete com integral para 1 hidrogênio.

O sinal dos hidrogênios diastereotópicos (H-1) aparecem juntos e absorvem como multipletto ($\delta = 3,67-3,63$ ppm) com integral para 2 hidrogênios.

A análise do espectro de ressonância magnética nuclear de carbono mostra claramente o desaparecimento dos sinais ($\delta = 192,1$ ppm e $\delta = 170,3$ ppm) correspondentes as duas carbonilas do material de partida **5a**.

Na espectroscopia do infravermelho destacam-se duas bandas de deformação axial de O-H uma em 3191 cm^{-1} e outra em 3059 cm^{-1} referente as hidroxilas do diol e duas bandas de deformação axial de C-O de álcool, uma em 1096 cm^{-1} e outra em 1054 cm^{-1} .

4.10.5 Identificação do Diacetato de (*RS*)-1-(fenil)-1,2-etano-di-ila (**7a**)

Tabela 19: Dados de RMN ^a de ¹H e ¹³C do produto (**7a**) em CDCl₃

	Posição	δ ¹ H (ppm), mult.	δ ¹³ C (ppm)
	1	4,33-4,28 (m, 2H)	66,0
	2	6,04-5,98 (m, 1H)	73,2
	3	–	136,4
	4, 5, 6, 7 e 8	7,37-7,33 (m, 5H)	128,6; 126,7
	9^b	–	169,7
	10^c	2,11 (s, 3H)	20,5
	11^b	–	170,0
	12^c	2,05 (s, 3H)	20,8

^a 200 MHz para ¹H e 50 MHz para ¹³C; ^{b,c} valores permutáveis

Os deslocamentos químicos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e suas multiplicidades indicam a formação de **7a**. Os sinais

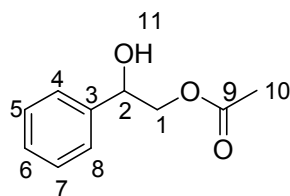
referentes as metilas ligadas diretamente as carbonilas, absorvem como um singlete com integral para 3 hidrogênios, um em $\delta = 2,05$ ppm (H-12) e o outro em $\delta = 2,11$ ppm (H-10). O hidrogênio (H-2) ligado ao carbono assimétrico absorve entre $\delta = 6,04-5,98$ ppm como um multiplete com integral para 1 hidrogênio. Os sinais dos hidrogênios diastereotópicos aparecem juntos e absorvem como multiplete ($\delta = 4,33-4,28$ ppm) com integral para 2 hidrogênios.

A análise do espectro de ressonância magnética nuclear de carbono mostra claramente o aparecimento dos sinais ($\delta = 169,7$ ppm e $\delta 170,0$ ppm) referentes as duas carbonilas (C-9 e C-11).

4.10.6 Identificação do Acetato de (*RS*)-2-(fenil)etanol (8a)

Tabela 20: Dados de RMN ^a de ¹H e ¹³C do produto (8a) em CDCl₃

	Posição	δ ¹ H (ppm), mult.	δ ¹³ C (ppm)
	1	4,25-4,23 (m, 1H) 4,13-4,10 (m, 1H)	69,3
	2	4,92-4,89 (m, 1H)	72,3
	3	–	139,8
	4, 5, 6, 7 e 8	7,39-7,33 (m, 5H)	128,5; 128,2; 126,1
	9	–	171,2
	10	2,08 (s, 3H)	20,8
	11	2,62 (s, 1H)	–



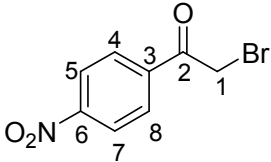
^a 200 MHz para ¹H e 50 MHz para ¹³C

Os deslocamentos químicos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e suas multiplicidades indicam a formação de **8a**. O hidrogênio (H-2) ligado ao carbono assimétrico absorve entre $\delta = 4,92-4,89$ ppm como um multiplete com integral para 1 hidrogênio. O sinal dos hidrogênios diastereotópicos por serem vizinhos a um carbono assimétrico e estes hidrogênios não possuem equivalência magnética, aparecem desdobrados um entre $\delta = 4,25-4,23$ ppm e o outro entre $\delta = 4,13-4,10$ ppm. O singlete ($\delta = 2,62$ ppm) com integral para 1 hidrogênio, provavelmente é referente ao hidrogênio da hidroxila do álcool (H-11). O singlete ($\delta = 2,08$ ppm) com integral para 3 hidrogênios é referente aos hidrogênios (H-10) da metila ligada diretamente a carbonila.

A análise do espectro de ressonância magnética nuclear de carbono 13 mostra claramente o desaparecimento do sinal ($\delta = 192,1$ ppm) correspondente a carbonila (C-2) do material de partida **5a**.

Na espectroscopia do infravermelho destaca-se uma banda de deformação axial em 3443 cm^{-1} , referente a ligação O-H do álcool, e uma banda de deformação axial em 1740 cm^{-1} referente a ligação C=O da carbonila e o estiramento C-O de éster em 1036 cm^{-1} .

4.10.7 Identificação do 2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanona (**2b**)Tabela 21: Dados de RMN ^a de ¹H e ¹³C do produto (**2b**) em CDCl₃

	Posição	δ ¹ H (ppm), mult.	δ ¹³ C (ppm)
	1	4,46 (s, 2H)	30,3
	2	–	189,9
	3	–	138,4
	4 e 8	8,19-8,16 (m, 2H)	130,1
	5 e 7	8,38-8,33 (m, 2H)	124,1
	6	–	150,7

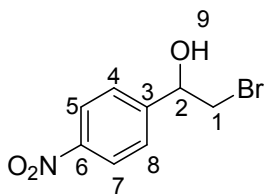
^a 200 MHz para ¹H e 50 MHz para ¹³C

Os deslocamentos químicos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e suas multiplicidades indicam a estrutura de **2b**. Os 2 hidrogênios ligados ao carbono que contém o bromo absorvem como um singlete em $\delta = 4,46$ ppm.

A análise do espectro de ressonância magnética nuclear de carbono 13 mostra um sinal ($\delta = 30,3$ ppm) referente ao carbono (C-13) que está ligado diretamente ao bromo. Este sinal aparece deslocado para campo magnético mais alto, devido à alta eletronegatividade do bromo que desblinda o carbono.

4.10.8 Identificação do (*RS*)-2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanol (**3b**)Tabela 22: Dados de RMN ^a de ¹H e ¹³C do produto (**3b**) em CDCl₃

	Posição	δ ¹ H (ppm), mult.	δ ¹³ C (ppm)
	1	3,68-3,65 (m, 1H) e 3,54-3,57 (m, 1H)	39,2
	2	5,06-5,00 (m, 1H)	72,6
	3	–	147,3
	4 e 8	7,61-7,57 (m, 2H)	126,9
	5 e 7	8,25-8,21 (m, 2H)	123,8
	6	–	153,0
	9	2,44 (s, 1H)	–



^a 200 MHz para ¹H e 50 MHz para ¹³C

Os deslocamentos químicos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e suas multiplicidades indicam a formação de **3b**. O singlete ($\delta = 2,44$ ppm) com integral para 1 hidrogênio é referente ao hidrogênio ligado ao oxigênio (H-9). O hidrogênio (H-2) ligado ao carbono assimétrico absorve entre $\delta = 5,06-5,00$ ppm como um multiplete com integral para 1 hidrogênio. O sinal dos hidrogênios diastereotópicos por serem vizinhos a um carbono assimétrico e estes hidrogênios não possuírem equivalência magnética, aparecem desdobrados um entre $\delta = 3,68-3,65$ ppm e o outro entre $\delta = 3,54-3,57$ ppm.

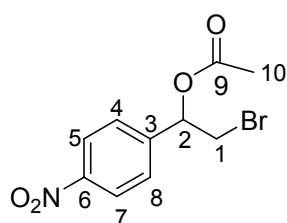
A partir da análise do espectro de ressonância magnética nuclear de carbono 13 foi observado o desaparecimento do sinal ($\delta = 189,0$ ppm)

referente ao carbono da carbonila (C-2 em **2b**) e o surgimento do sinal em $\delta = 72,6$ ppm (C-2 em **3b**) referente ao carbono ligado diretamente ao álcool.

A espectroscopia no infravermelho mostra o desaparecimento de uma banda de deformação axial de C=O em 1702 cm^{-1} , referente a carbonila de **2b**, e o surgimento de uma banda alargada de deformação axial de O-H em 3546 cm^{-1} , referente a banda de hidroxila, e uma banda de deformação axial de C-O de álcool em 1196 cm^{-1} .

4.10.9 Identificação do Acetato de (RS) 2-bromo-1-(4-nitrofenil)etila (**4b**)

Tabela 23: Dados de RMN ^a de ¹H e ¹³C do produto (**4b**) em CDCl₃



Posição	δ ¹ H (ppm), mult.	δ ¹³ C (ppm)
1	3,88-3,85 (m, 1H), 3,82-3,80 (m, 1H)	36,08
2	5,90-5,81 (m, 1H)	73,65
3	–	144,4
4 e 8	7,58-7,51 (m, 2H)	126,2
5 e 7	8,38-8,31 (m, 2H)	125,9
6	–	148,0
9	–	171,8
10	2,08 (s, 3H)	21,02

^a 200 MHz para ¹H e 50 MHz para ¹³C

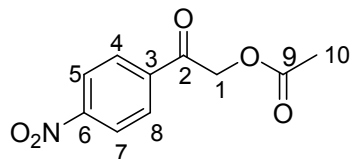
Os deslocamentos químicos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e suas multiplicidades indicam a formação de **4b**. O singlete ($\delta = 2,08$ ppm) com integral para 3 hidrogênios é referente a metila ligada diretamente a carbonila (C-9). O hidrogênio (H-2) ligado ao carbono

assimétrico absorve entre $\delta = 5,90-5,81$ ppm como um multiplete com integral para 1 hidrogênio. O sinal dos hidrogênios diastereotópicos por serem vizinhos a um carbono assimétrico e estes hidrogênios não possuem equivalência magnética, aparecem desdobrados um entre $\delta = 3,88-3,85$ ppm e o outro entre $\delta = 3,82-3,80$ ppm.

Através da análise do espectro de ressonância magnética nuclear de carbono 13 foi observado o sinal ($\delta = 21,2$ ppm) referente a uma metila (C-10) desblindada pela carbonila retiradora de elétrons (C-9), assim este sinal aparece em campo magnético alto no espectro.

4.10.10 Identificação do Acetato de 2-(4-nitrofenil)-2-oxo-etila (5b)

Tabela 24: Dados de RMN ^a de ¹H e ¹³C do produto (5b) em CDCl₃

	Posição	δ ¹ H (ppm), mult.	δ ¹³ C (ppm)
	1	5,35 (s, 2H)	66,0
	2	–	191,1
	3	–	138,5
	4 e 8	8,11-8,07 (m, 2H)	128,8
	5 e 7	8,37-8,32 (m, 2H)	124,0
	6	–	150,0
	9	–	170,2
	10	2,24 (s, 3H)	20,3

^a 200 MHz para ¹H e 50 MHz para ¹³C

Os deslocamentos químicos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e suas multiplicidades indicam a formação de **5b**. O singlete ($\delta = 5,35$ ppm) com integral para 2 hidrogênios é referente ao hidrogênio ligado

ao carbono (C-2) vizinho à carbonila e ao oxigênio do éster. Os hidrogênios (H-10) referentes a metila ligada diretamente a carbonila (C-9) do grupo acetoxila absorvem ($\delta = 2,24$ ppm) como um singlete com integral para 3 hidrogênios.

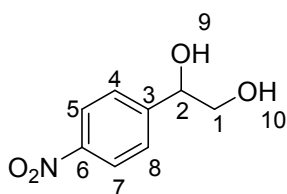
Através da análise do espectro de ressonância magnética nuclear de carbono 13 foi observado o sinal ($\delta = 191,0$ ppm) referentes a carbonila da cetona (C-2) e o sinal ($\delta = 170,2$ ppm) referente a carbonila (C-9) do grupo acetoxila.

Na espectroscopia do infravermelho são destacadas duas bandas de deformação axial das carbonilas, uma de cetona (C-2) em 1703 cm^{-1} e outra de éster (C-9) em 1748 cm^{-1} .

4.10.11 Identificação do (RS)1-(4-nitrofenil)-1,2-etanodiol (6b)

Tabela 25: Dados de RMN ^a de ¹H e ¹³C do produto (6b) em CDCl₃

	Posição	δ ¹ H (ppm), mult.	δ ¹³ C (ppm)
	1	3,87-3,81 (m, 1H), 3,68-3,59 (m, 1H)	68,2
	2	4,97-4,93 (m, 1H)	74,9
	3	–	148,6
	4 e 8	7,58-7,54 (m, 2H)	128,4
	5 e 7	8,24-8,20 (m, 2H)	124,2
	6	–	151,3
	9	2,91 (s, 1H)	–
	10	2,20 (s, 1H)	–



^a 200 MHz para ¹H e 50 MHz para ¹³C

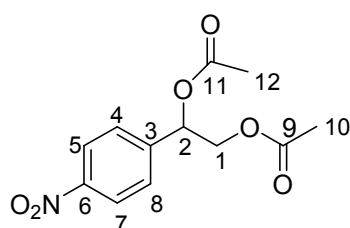
Os deslocamentos químicos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e suas multiplicidades indicam a formação de **6b**. Os referentes hidrogênios ligados diretamente ao oxigênio absorvem como um singlete com integral para 1 hidrogênio, um em $\delta = 2,91$ ppm (H-9) e o outro em $\delta = 2,20$ ppm (H-10). Estes sinais, provavelmente são das duas hidroxilas do diol. O hidrogênio (H-2) ligado ao carbono assimétrico absorve entre $\delta = 4,97-4,93$ ppm como um multiplete com integral para 1 hidrogênio. O sinal dos hidrogênios diastereotópicos por serem vizinhos a um carbono assimétrico e estes hidrogênios não possuem equivalência magnética, aparecem desdobrados um entre $\delta = 3,87-3,81$ ppm e o outro entre $\delta = 3,68-3,59$ ppm.

A análise do espectro de ressonância magnética nuclear de carbono 13 mostra claramente o desaparecimento dos sinais ($\delta = 191,0$ ppm e $\delta = 170,2$ ppm) correspondentes as duas carbonilas do material de partida **5b**.

Na espectroscopia do infravermelho são destacadas duas bandas de deformação axial de O-H uma em 3395 cm^{-1} e outra em 3299 cm^{-1} , referente as hidroxilas do diol, e duas bandas de deformação axial de C-O de álcool, uma em 1093 cm^{-1} e outra em 1067 cm^{-1} .

4.10.12 Identificação do Diacetato de (*RS*)-1-(4-nitrofenil)-1,2-etano-di-ila (**7b**)Tabela 26: Dados de RMN ^a de ¹H e ¹³C do produto (**7b**) em CDCl₃

Posição	δ ¹ H (ppm), mult.	δ ¹³ C (ppm)
1	4,36-4,29 (m, 2H)	66,08
2	6,00-6,23 (m, 1H)	73,25
3	–	144,2
4 e 8	7,57-7,53 (m, 2H)	126,9
5 e 7	8,26-8,22 (m, 2H)	124,7
6	–	147,4
9^c	–	168,9
10^b	2,16 (s, 3H)	20,50
11^c	–	170,0
12^b	2,06 (s, 3H)	20,80



^a 200 MHz para ¹H e 50 MHz para ¹³C; ^{b,c} valores permutáveis

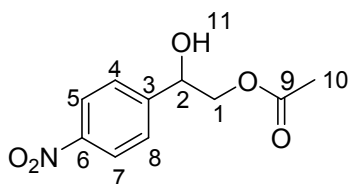
Os deslocamentos químicos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e suas multiplicidades indicam a formação de **7b**. As metilas ligadas diretamente as carbonilas, absorvem como um singlete com integral para 3 hidrogênios, um em $\delta = 2,06$ ppm (H-12) e o outro em $\delta = 2,16$ ppm (H-10). O hidrogênio (H-2) ligado ao carbono assimétrico absorve entre $\delta = 6,00-6,23$ ppm como um multipeto com integral para 1 hidrogênio. Os sinais dos hidrogênios diastereotópicos aparecem juntos e absorvem como multipeto ($\delta = 4,36-4,29$ ppm) com integral para 2 hidrogênios.

A análise do espectro de ressonância magnética nuclear de carbono mostra claramente o aparecimento dos sinais ($\delta = 168,9$ ppm e $\delta 170,0$ ppm) referentes as duas carbonilas (C-9 e C-11).

4.10.13 Identificação do Acetato de (*RS*)-2-(4-nitrofenil)-2-hidroxi-etila (**8b**)

Tabela 27: Dados de RMN ^a de ¹H e ¹³C do produto (**8b**) em CDCl₃

	Posição	δ ¹ H (ppm), mult.	δ ¹³ C (ppm)
	1	4,37-4,32 (m, 1H), 4,19-4,10 (m, 1H)	68,84
	2	5,12-5,06 (m, 1H)	71,6
	3^b	–	147,7
	4 e 8	7,61-7,53 (m, 2H)	126,9
	5 e 7	8,25-8,21 (m, 2H)	123,7
	6^b	–	147,0
	9	–	171,2
	10	2,11 (s, 3H)	20,7
	11	2,92 (s, 1H)	–



^a 200 MHz para ¹H e 50 MHz para ¹³C; ^b valores permutáveis

Os deslocamentos químicos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e suas multiplicidades indicam a formação de **8b**. O hidrogênio (H-2) ligado ao carbono assimétrico absorve entre $\delta = 5,12-5,06$ ppm como um multiplete com integral para 1 hidrogênio. O sinal dos hidrogênios diastereotópicos por serem vizinhos a um carbono assimétrico e estes hidrogênios não possuírem equivalência magnética, aparecem desdobrados um entre $\delta = 4,37-4,32$ ppm e o outro entre $\delta = 4,19-4,10$ ppm. O singlete (δ

= 2,92 ppm) com integral para 1 hidrogênio, provavelmente é referente ao hidrogênio da hidroxila do álcool (H-11). E o singlete ($\delta = 2,11$ ppm) com integral para 3 hidrogênios é referente aos hidrogênios (H-10) da metila ligada diretamente a carbonila.

A análise do espectro de ressonância magnética nuclear de carbono 13 mostra claramente o desaparecimento do sinal ($\delta = 191,0$ ppm) correspondente a carbonila (C-2) do material de partida **5b**.

Na espectroscopia do infravermelho destaca-se uma banda de deformação axial em 3414 cm^{-1} , referente a ligação O-H do álcool, e uma banda de deformação axial em 1740 cm^{-1} referente a carbonila e o estiramento C-O de éster em 1098 cm^{-1} .

5. Conclusão

Os métodos de imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* foram muito eficientes. Foi possível imobilizar a lipase tanto pela via física (fisissorção) quanto por ligação covalente usando os métodos de funcionalização com carboxibenzaldeído e glutaraldeído (quimissorção). Foi determinada a quantidade de proteína adsorvida nas nanopartículas magnéticas para as 3 metodologias. A atividade enzimática da lipase imobilizada foi testada na reação de transesterificação enantiosseletiva de alcoóis racêmicos, obtendo altos excessos enantioméricos (>99 %) e com conversões satisfatórias.

Para o método de imobilização por fisissorção foi possível imobilizar 0,21 mg de proteína em 20 mg de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com o grupo amino. Enquanto para o método de quimissorção utilizando carboxibenzaldeído como reagente de ligação (suporte e enzima) foi possível imobilizar 0,26 mg de proteína em 20 mg de nanopartículas magnéticas funcionalizadas. Para imobilização utilizando glutaraldeído a melhor relação encontrada neste trabalho foi de 0,28 mg de proteína por 20 mg de nanopartículas magnéticas funcionalizadas.

Os melhores parâmetros encontrados para a reação de transesterificação enantiosseletiva dos alcoóis racêmicos foram: acetato de vinila, como agente acilante, tolueno como solvente e o agitador de microtubos (*thermomixer*[®]) como aparelho de agitação. Para cada método de imobilização foi encontrada a melhor temperatura e tempo reacional. Para o método de fisissorção utilizando como substrato o (RS)-2-bromo-1-

(fenil)etanol, a melhor temperatura foi de 42 °C durante 24 horas de reação com conversão de 34 %. Para quimissorção utilizando carboxibenzaldeído, a melhor temperatura foi de 42 °C durante 24 horas de reação com conversão de 24 %. Já para o método que se utilizou glutaraldeído a melhor temperatura foi de 52 °C durante 48 horas de reação, levando a uma conversão de 34 %. O álcool de configuração absoluta (S)-2-bromo-1-(fenil)etanol é o que reage mais rápido na reação de transesterificação enantiosseletiva catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em nanopartículas magnéticas nas diferentes metodologias. Utilizando como substrato o (RS)-2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanol para os 3 métodos de imobilização não levou a resultados satisfatórios, com a conversão variando entre 8-11%. Para a resolução cinética dos substratos (RS)-1-(fenil)etanol e (RS)-1-(4-nitrofenil)etanol com a lipase imobilizada nas 3 metodologias a 32 °C e 24 horas de reação, levaram a uma conversão de 50 % e excesso enantiomérico de 99 % para o respectivo (R)-éster formado e o (S)-álcool. Quando se compara os resultados de RCE do (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol com os (RS)-1-(fenil)etanol e (RS)-1-(4-nitrofenil)etanol pode-se observar que o bromo influencia fortemente nos resultados de conversão na reação de transesterificação enantiosseletiva, mas não afeta a enantiosseletividade da reação.

Ao utilizar-se do (RS)-1-(fenil)-1,2-etanodiol como substrato adotando a melhor metodologia encontrada com glutaraldeído, obteve-se como resultado 68 % de excesso enantiomérico do (R)-diol e 92 % de excesso enantiomérico para o (S)-diol. Pode-se concluir que o diol de configuração absoluta S é o que reage mais rapidamente na reação de transesterificação

enantiosseletiva catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada por quimissorção.

Através do estudo de estocagem conclui-se que método de imobilização por fisissorção mantém a atividade da enzima após o período de 30 dias de estocagem. Quanto a reciclagem, a imobilização por quimissorção através do glutaraldeído é o melhor tipo de imobilização para ser utilizado no processo de reciclagem, durante 8 ciclos, a conversão se manteve em 50 %.

Pode-se concluir ainda que o processo de imobilização aumentou a estabilidade da enzima quando comparada a livre. Para o (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol utilizando a enzima livre ocorreu uma perda de enantiosseletividade e diminuição da conversão, enquanto que no caso do (RS)-1-(fenil)etanol a conversão foi diminuída para 45 %%, mas manteve-se a enantiosseletividade do éster formado, o mesmo ocorreu para o (RS)-1-(4-nitrofenil)etanol levando a uma diminuição de conversão para 42 %.

6. Parte Experimental

6.1 Material e Métodos

Os materiais e equipamentos que foram utilizados nas análises dos compostos são:

- i. Placas de cromatografia em camada delgada (folhas de alumínio 60 F₂₅₄ Merck).
- ii. Sílica (230-400 mesh) para cromatografia em coluna.
- iii. Cromatógrafo à gás CG/FID (Shimadzu GC-17A) com coluna capilar quiral de ciclodextrina (Chirasil-Dex CB β -cyclodextrin; 25 m x 0,25 mm). O CG possui um autoinjeter acoplado AOC20i da Shimadzu.
- iv. CG/MS (Shimadzu QP5050A) com coluna capilar J & W Scientific DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), operando a 70 eV.
- v. Aparelhos de Ressonância Magnética Nuclear Brucker (DRX200) e da Varian (Gemini200). O solvente utilizado foi o clorofórmio deuterado (CDCl₃). Os deslocamentos químicos (δ) estão expressos em parte por milhão (ppm) em relação ao padrão interno tetrametilsilano (δ TMS=0 ppm).
- vi. Para medida da rotação óptica foi utilizado o polarímetro Jasco DIP-378 (cubeta de 1 dm).
- vii. Os solventes foram utilizados com grau de pureza P.A. ou destilados conforme a necessidade.
- viii. Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CL-10AD Shimadzu) equipado com detector de UV e com autoinjeter.
- ix. Espectrofotômetro Bomem MB 100 com pastilhas de KBr e as frequências de absorção estão expressas em cm⁻¹

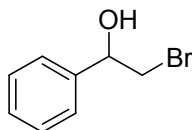
- x. Câmara com luz UV (254 nm) utilizada para a revelação de CCD.
- xi. Solução alcoólica de vanilina utilizada para revelação de CCD com soprador térmico.

Os métodos cromatográficos utilizados para analisar os alcoóis quirais **3a**, **3b**. **Método 1:** (H₂, 100 kPa, Coluna Chirasil-dex CB) – Temperatura do injetor 220 °C; temperatura do detector 220 °C; isoterma: 140°C-30 minutos, t_R (min) = tempo de retenção (*RS*)-2-Bromo-1-(fenil)etanol (**3a**): enantiômero-*R* = 11.00 min; enantiômero-*S* = 10.39 min; (*RS*)-2-Bromo-1-(4-nitrofenil)etanol (**3b**): enantiômero-*R* = 29.8 min; enantiômero-*S* = 27.9 min.

Para **6a**. **Método 2:** Coluna Chiralcel OB (4,6 mm x 250 mm), eluente: *n*-hexano/2-propanol = 98/2, fluxo: 1 mL/min, UV 220 nm. t_R (min) = tempo de retenção (*RS*)-1-(fenil)-1,2-etanodiol (**6a**): enantiômero-*R* = 36,09 min; enantiômero-*S* = 51.60 min; (*RS*)-2-Bromo-1-(4-nitrofenil)etanol.

Para o método de Bradford utilizou-se a albumina de soro bovino, o reagente de Bradford, solução tampão fosfato 25 mM (pH = 7). Para a curva de utilizou-se solução padrão de albumina de soro bovino 1,4mg/mL e a partir dela foram realizadas as diluições.

6.1.1 Síntese do (RS)-2-bromo-1-(fenil)etanol

**3a**

Em um balão de 1 via e sob agitação magnética a temperatura ambiente, adicionou-se *w*-bromo-acetofenona (199 mg, 1 mmol), SiO₂/H₂O (0,13 g, 30% m/m) e NaBH₄ (56,75 mg, 1,5 mmol).

Após o término da reação (~10 min) foram adicionados 10 mL de diclorometano à mistura reacional, filtrou-se, secou-se com sulfato de magnésio anidro e o solvente foi retirado sob vácuo. O produto foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila (8:2) como eluente.

Rendimento: 18 %.

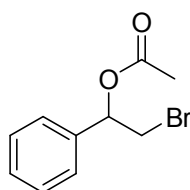
IV (KBr) cm⁻¹: 3395, 3030, 2961, 1493, 1452, 1217, 1061, 991, 761.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ: 7,33-7,33 (m, 5H), 4,89 (dd, 1H, *J*= 3,4Hz, 9Hz), 3,67-3,48 (m, 2H), 2,46 (s, 1H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ: 140,3; 128,5; 128,3; 125,9; 73,7; 39,9.

EM, *m/z* (intensidade relativa): 200 (M⁺, 3), 202 (M+2, 3), 121 (1), 107 (100), 91.05 (6), 79 (51), 65 (4), 51 (15).

6.1.2 Síntese do Acetato de (*RS*)- 2-bromo-1-(fenil)etila

**4a**

Em um balão de 1 via e sob agitação magnética a temperatura ambiente, adicionou-se 2-bromo-1-(fenil)etanol **3a** (207 mg, 1,03 mmol), 2,5 mL de diclorometano, Et₃N (0,42 mL, 3,1 mmol), DMAP (6,32 mg, 0,052 mmol) e anidrido acético (0,3 mL, 3,1 mmol). Acompanhou-se a reação por CCD, utilizando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila (7:3).

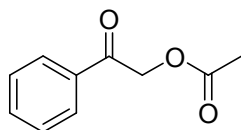
Após 24 horas, a adição de 5 mL de H₂O interrompeu a reação. Lavou-se a mistura reacional com diclorometano (3 x 10 mL) e a fase orgânica com solução saturada de bicarbonato de sódio (3 x 10 mL). Separou-se a fase orgânica, secou-se com sulfato de magnésio anidro e o solvente foi retirado sob vácuo. O produto foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila (7:3) como eluente.

Rendimento: 63%

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ: 7,37-7,34 (m, 5H), 6,01-5,94 (m, 1H), 3,65-3,59 (m, 2H), 2,13 (s, 3H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ: 171,8; 137,6; 128,2; 129,3; 125,9; 73,6; 36,6; 21,0.

6.1.3 Síntese do 2-acetato de -1-(fenil)-2-oxo-etila



5a

Em um balão de 1 via acoplado a um condensador de refluxo com tubo secante, a temperatura ambiente e sob agitação magnética, adicionou-se *ω*-bromo-acetofenona (1990 mg, 10 mmol), 20 mL de THF recém-destilado, acetato de sódio (1640 mg, 10 mmol) e 100 mg de 18-*crown*-6. A mistura reacional foi aquecida, mantida sob refluxo do sistema (~65 °C) e acompanhada por CCD, utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila (9:1) como eluente.

Após 2 horas, o sistema reacional foi resfriado a temperatura ambiente e a adição de 5 mL de H₂O interrompeu a reação. Lavou-se a mistura reacional com diclorometano (3 x 15 mL) e a fase orgânica resultante com solução saturada de bicarbonato de sódio (3 x 15 mL). Separou-se a fase orgânica, secou-se em sulfato de magnésio anidro e o solvente foi retirado sob vácuo. O produto foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila (9:1) como eluente.

Rendimento: 91 %.

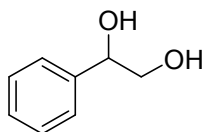
IV (KBr) cm⁻¹: 3118, 2944, 1748, 1703, 1523, 1440, 1347, 1248, 1080, 969, 849.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ: 7,92-7,89 (m, 2H), 7,64-7,44 (m, 3H), 5,34 (s, 2H), 2,22 (s, 3H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ: 192,1; 170,3; 133,8; 128,7; 127,6; 124,0; 65,9; 20,5.

EM, m/z (intensidade relativa): 193 (4), 177 (5), 163 (6), 150 (100), 134 (14), 120 (12), 104 (37), 92 (17), 76 (32), 63 (6).

6.1.4 Síntese do (RS)-1-(fenil)-1,2-etanodiol

**6a**

Em um balão de 1 via e sob agitação magnética a temperatura ambiente, adicionou-se 2-acetóxi-1-(fenil)etanona **5a** (178 mg, 1 mmol), 2,5 mL de metanol e NaBH₄ (57mg, 1,5 mmol). A reação foi acompanhada por CCD, utilizando-se como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila (3:2).

Após 4 horas, o metanol foi retirado sob vácuo e seguido da adição de 5 mL de solução aquosa de HCl 1M interrompeu a reação. Lavou-se a mistura reacional com diclorometano (3 x 10 mL) e a fase orgânica resultante com solução saturada de bicarbonato de sódio (3 x 10 mL). Separou-se a fase orgânica, secou-se em sulfato de magnésio anidro e o solvente foi retirado sob vácuo. O produto foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila (3:2) como eluente.

Rendimento: 56%

IV (KBr) cm⁻¹: 3191, 3059, 2932, 1465, 1451, 1228, 1096, 1054, 890.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ: 7,21-7,33 (m, 5H), 4,80-4,78 (m, 1H), 3,67-3,63 (m, 2H); 3,19 (s, 1H); 2,78 (s, 1H).

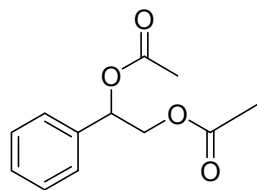
RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ: 137,7; 128,5; 127,9; 126,0; 74,6; 68,0.

EM, m/z (intensidade relativa): 138 (M⁺, 8), 107 (100), 91 (7), 79 (93), 77 (60), 65 (4), 51 (21).

P.F.: 64-65°C (Kamal e Chouhan, 2004)

P.F.: 63-66°C (experimental)

6.1.5 Síntese do Diacetato de (RS)-1-(fenil)-1,2-etano-di-ila

**7a**

Em um balão de 1 via sob agitação magnética e a temperatura ambiente, adicionou-se (RS)-1-(fenil)-1,2-etanodiol **6a** (71 mg, 0,5 mmol), 1,25 mL de diclorometano, Et₃N (0,22 mL, 1,6 mmol), DMAP (3,16 mg, 0,03 mmol) e anidrido acético (0,15 mL, 1,6 mmol). A reação foi acompanhada por CCD, utilizando-se uma mistura de hexano e acetato de etila (7:3) como eluente

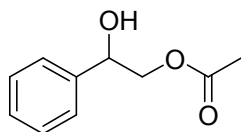
Após 24 horas, a adição de 1 mL de H₂O interrompeu a reação. Lavou-se a mistura reacional com diclorometano (3 x 10 mL) e a fase orgânica resultante com solução saturada de bicarbonato de sódio (3 x 10 mL). Separou-se a fase orgânica, secou-se em sulfato de magnésio anidro e o solvente foi retirado sob vácuo. O produto foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila (7:3) como eluente.

Rendimento: 66%

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ: 7,37-7,33 (m, 5H), 6,04-5,98 (m, 1H), 4,33-4,28 (m, 2H), 2,11 (s, 3H), 2,05 (s, 3H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ: 170,0; 169,7; 136,4; 128,6; 126,7; 73,2; 66,0; 20,8; 20,5.

6.1.6 Síntese do Acetato de (RS)-2-(fenil)etanol

**8a**

Em um balão de 1 via em banho de gelo (0°C), sob agitação magnética, adicionou-se 2-acetóxi-1-(fenil)etanol **5a** (178 mg, 1 mmol), 2,5 mL de metanol e NaBH₄ (38 mg, 1 mmol). Acompanhou-se a reação por CCD, utilizando-se uma mistura de hexano e acetato de etila (3:2) como eluente.

Após 1 hora, o metanol restante foi retirado em rota evaporador e a adição de 5 mL de solução aquosa de HCl 1M interrompeu a reação. Lavou-se a mistura reacional com diclorometano (3 x 10 mL) e a fase orgânica com solução saturada de bicarbonato de sódio (3 x 10 mL). Separou-se a fase orgânica, secou-se em sulfato de magnésio anidro e o solvente foi removido sob vácuo. O produto foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila (3:2) como eluente.

Rendimento: 47 %.

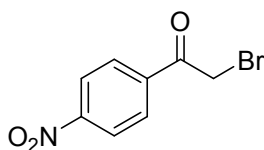
IV (KBr) cm⁻¹: 3443, 3063, 2949, 1740, 1451, 1376, 1254, 1036, 760.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ: 7,39-7,33 (m, 5H), 4,92 (m, 1H), 4,25 (m, 1H) 4,13 (m, 1H), 2,62 (s, 1H), 2,08 (s, 3H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ: 171,2; 139,8; 128,5; 128,2; 126,1; 72,3; 69,3; 20,8.

EM, m/z (intensidade relativa): 162 (1), 149 (3), 120 (31), 107 (100), 91 (7), 79 (79), 77 (35), 65 (4), 51 (15).

6.1.7 Síntese do 2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanona

**2b**

Em um balão de 2 vias em banho de gelo e sob agitação magnética, adicionou-se 4-nitroacetofenona (5 g, 3 mmol) e 200 mL de ácido acético glacial. O bromo (5,1 g, 32 mmol, 1,63 mL) foi adicionado gota-a-gota através de um funil de adição, durante 30 minutos. O banho de gelo foi removido, deixando o sistema a temperatura ambiente e a reação foi acompanhada por CCD, utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila (7:3) como eluente.

Após o término da reação (~2 h), foram adicionados 200 mL de água gelada ao meio reacional e um precipitado amarelo foi formado. Esse precipitado foi separado por filtração a vácuo, recolhendo os cristais do funil que foram utilizados diretamente na síntese do composto **3b**.

Rendimento: 81%.

IV (KBr) cm^{-1} : 3103, 3003, 2936, 1702, 1599, 1521, 1343, 1191, 994, 848.

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ : 8,38-8,33 (m, 2H), 8,19-8,15 (m, 2H), 4,46 (s, 2H).

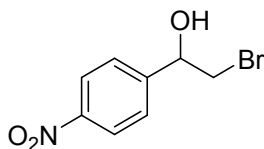
RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ : 189,9; 150,7; 138,4; 130,1; 124,1; 30,3.

EM, m/z (intensidade relativa): 245 (M+2, 1), 150 (100), 134 (2), 120 (8), 104 (28), 92 (16), 76 (21), 63 (7), 50 (23).

P.f.: 98°C (Juneja *et al.*, 2006)

P.f.: 96°C (experimental)

6.1.8 Síntese do (RS)-2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanol

**3b**

Em um balão de 1 via a temperatura ambiente e sob agitação magnética, adicionou-se *w*-bromo-*p*-nitroacetofenona **2b** (244 mg, 1 mmol), SiO₂/H₂O (0,13g, 30% m/m) e NaBH₄ (56,75 mg, 1,5 mmol).

Após o término da reação (~10 min) foram adicionados 10 mL de diclorometano à mistura reacional, filtrou-se, secou-se com sulfato de magnésio anidro e o solvente foi retirado sob vácuo. O produto foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila (4:1) como eluente.

Rendimento: 12%.

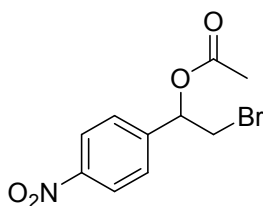
IV (KBr) cm⁻¹: 3546, 3025, 1605, 1518, 1345, 1196, 1070, 855, 707.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ: 8,25-8,21 (m, 2H), 7,61-7,57 (m, 2H), 5,06 (m, 1H), 3,68 (m, 1H), 3,54 (m, 1H), 2,44 (s, 1H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ: 153,0; 147,3; 126,9; 123,8; 72,6; 39,2.

EM, m/z (intensidade relativa): 245 (M⁺, 0,6), 247 (M+2, 0,6), 152 (100), 136 (2), 122 (6), 106 (10), 94 (12), 77 (17), 65 (7), 51 (12).

6.1.9 Síntese do Acetato de (*RS*) 2-bromo-1-(4-nitrofenil)etila

**4b**

Em um balão de 1 via e sob agitação magnética, adicionou-se 2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanol **3b** (253 mg, 1,03 mmol), 2,5 mL de diclorometano, Et₃N (0,42 mL, 3,1 mmol), DMAP (6,32 mg, 0,052 mmol) e anidrido acético (0,3 mL, 3,1 mmol). A reação foi mantida a temperatura ambiente e acompanhada por CCD, utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila (3:2) como eluente.

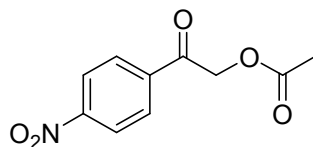
Após 24 horas, a adição de 5 mL de H₂O interrompeu a reação. Lavou-se a mistura reacional com diclorometano (3 x 10 mL) e a fase orgânica com solução saturada de bicarbonato de sódio (3 x 10 mL). Separou-se a fase orgânica resultante, secou-se em sulfato de magnésio anidro e o solvente foi retirado sob vácuo. O produto foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila (3:2) como eluente.

Rendimento: 53%

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ: 8,38-8,31 (m, 2H), 7,58-7,51 (m, 2H), 5,90-5,81 (m, 1H), 3,88-3,85 (m, 1H), 3,82-3,80 (m, 2H), 2,08 (s, 3H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ: 171,8; 148,0; 144,4; 126,2; 125,9; 73,65; 36,08; 21,02.

6.1.10 Síntese do Acetato de 2-(4-nitrofenil)-2-oxo-etila



5b

Em um balão de 1 via acoplado a um condensador de refluxo com tubo secante, a temperatura ambiente e sob agitação magnética, adicionou-se 2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanonona **2b** (1220 mg, 5 mmol), 10 mL de THF recém-destilado, acetato de sódio (820 mg, 10 mmol) e 50 mg de 18-crown-6. A mistura reacional foi aquecida, mantida a temperatura de refluxo do sistema (~65 °C) e acompanhada por CCD, utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila (4:1) como eluente.

Após 2 horas, o sistema reacional foi resfriado a temperatura ambiente e a adição de 5 mL de H₂O interrompeu a reação. Lavou-se a mistura reacional com diclorometano (3 x 15 mL) e a fase orgânica com solução saturada de bicarbonato de sódio (3 x 15 mL). Separou-se a fase orgânica resultante, secou-se em sulfato de magnésio anidro e o solvente foi retirado em rota evaporador. O produto foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila (8:2) como eluente.

Rendimento: 87 %.

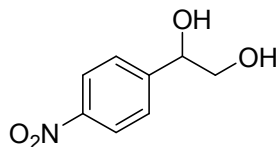
IV (KBr) cm⁻¹: 3118, 2944, 1748, 1703, 1523, 1440, 1347, 1248, 1080, 969, 849.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ: 8,37-8,32 (m, 2H), 8,11-8,07 (m, 2H), 5,35 (s, 2H), 2,24 (s, 3H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ: 191,1; 170,2; 150,0; 138,5; 128,8; 124,0; 66,0; 20,3.

EM, m/z (intensidade relativa): 193 (4), 177 (5), 163 (6), 150 (100), 134 (14), 120 (12), 104 (37), 92 (17), 76 (32), 63 (6).

6.1.11 Síntese do (RS)-1-(4-Nitrofenil)-1,2-etanodiol

**6b**

Em um balão de 1 via a temperatura ambiente e sob agitação magnética, adicionou-se 2-acetóxi-1-(4-nitrofenil)etanona **5b** (223mg, 1 mmol), 2,5 mL de metanol e NaBH₄ (57 mg, 1,5 mmol). A reação foi acompanhada por CCD, utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila (1:1) como eluente.

Após 4 horas, o metanol restante foi retirado em rota evaporador e a adição de 5 mL de solução aquosa de HCl 1M interrompeu a reação. Lavou-se a mistura reacional com diclorometano (3 x 10 mL) e a fase orgânica com solução saturada de bicarbonato de sódio (3 x 10 mL). Separou-se a fase orgânica resultante, secou-se em sulfato de magnésio anidro e o solvente foi retirado sob vácuo. O produto foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila (1:1) como eluente.

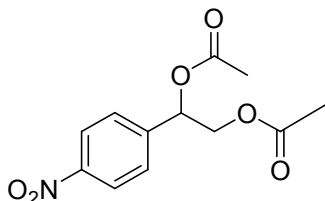
Rendimento: 51%

IV (KBr) cm⁻¹: 3395, 3299, 2933, 1696, 1607, 1536, 1351, 1093, 1067, 903, 856, 823.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ: 8,24-8,20 (m, 2H), 7,58-7,54 (m, 2H), 4,97-4,93 (m, 1H), 3,87-3,81 (m, 1H), 3,68-3,59 (m, 1H), 2,91 (s, 1H), 2,20 (s, 1H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ: 151,3; 148,6; 128,4; 124,2; 74,9; 68,2.

EM, m/z (intensidade relativa): 154 (4), 153 (46), 152 (100), 136 (18), 122 (12), 106 (37), 105 (29), 94 (25), 78 (43), 77 (50), 66 (18), 51 (31).

6.1.12 Síntese do Diacetato de (RS)-1-(4-nitrofenil)-1,2-etano-di-ila**7b**

Em um balão de 1 via, sob agitação magnética a temperatura ambiente, adicionou-se (RS)-1-(4-Nitrofenil)-1,2-etanodiol **6b** (56 mg, 0,30 mmol), 0,72 mL de diclorometano, Et₃N (0,12 mL, 0,9 mmol), DMAP (1,84 mg, 0,015 mmol) e anidrido acético (0,086 mL, 0,9 mmol). A reação foi acompanhada por CCD, utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila (7:3) como eluente.

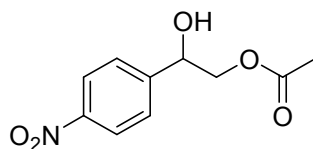
Após 24 horas, a adição de 0,5 mL de H₂O interrompeu a reação. Lavou-se a mistura reacional com diclorometano (3 x 10 mL) e a fase orgânica com solução saturada de bicarbonato de sódio (3 x 10 mL). Separou-se a fase orgânica resultante, secou-se em sulfato de magnésio anidro e o solvente foi retirado sob vácuo. O produto foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila (7:3) como eluente.

Rendimento: 56%

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ: 8,26-8,22 (m, 2H), 7,57-7,53 (m, 2H), 6,00-6,23 (m, 1H), 4,36-4,29 (m, 2H), 2,16 (s, 3H), 2,06 (s, 3H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ: 170,0; 168,9; 147,4; 144,2; 126,9; 124,7; 73,2; 66,0; 20,8; 20,5.

6.1.13 Síntese do Acetato de (*RS*)-2-(4-nitrofenil)-2-hidroxi-etila

**8b**

Em um balão de 1 via em banho de gelo e sob agitação magnética, adicionou-se 2-acetóxi-1-(4-nitrofenil)etanona **5b** (223mg, 1 mmol), 2,5 mL de metanol e NaBH₄ (38 mg, 1 mmol). A reação foi acompanhada por CCD, utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila (1:1) como eluente.

Após 1 hora, o metanol restante foi retirado em rota evaporador e a adição de 5 mL de solução aquosa de HCl 1M interrompeu a reação. Lavou-se a mistura reacional com diclorometano (3 x 10 mL) e a fase orgânica com solução saturada de bicarbonato de sódio (3 x 10 mL). Separou-se a fase orgânica resultante, secou-se em sulfato de magnésio anidro e o solvente foi removido sob vácuo. O produto foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila (1:1) como eluente.

Rendimento: 57 %.

IV (KBr) cm⁻¹: 3414, 3060, 2947, 1740, 1519, 1347, 1270, 1098, 1030, 936, 857, 806, 699.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ: 8,25-8,21 (m, 2H), 7,61-7,53 (m, 2H), 5,12-5,06 (m, 1H), 4,37-4,32 (m, 1H), 4,19-4,10 (m, 1H), 2,92 (s, 1H), 2,11 (s, 3H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ: 171,2; 147,7; 147,0; 126,9; 123,7; 71,6; 68,84; 20,7.

EM, m/z (intensidade relativa): 196 (2), 195 (16), 166 (5), 165 (49), 153 (46), 136 (33), 135 (26), 122 (7), 106 (35), 105 (19), 94 (12), 91 (20), 78 (24), 77 (35), 74 (100), 65 (15), 63 (8).

6.1.14 Obtenção da magnetita nanoparticulada funcionalizada com o grupo amino

Essa parte do trabalho foi realizada em colaboração com o grupo do Prof. Henrique Toma do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

A síntese das nanopartículas magnéticas (12nm) foi realizada a partir da reação de co-precipitação de Fe^{2+} e Fe^{3+} em NaOH, seguido da reação de silanização com APTES (aminopropil-trietóxisilano) como descrito abaixo.

Em um balão A coloca-se 1100 mL de água deionizada e este foi aquecido até a ebulição sob borbulhamento de N_2 . Aplicando-se ao balão A uma atmosfera positiva de N_2 transferem-se 100 mL de água deste balão para o frasco denominado B.

Adiciona-se 20g de NaOH ao balão A e 1,269g de FeCl_2 e 5,406g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ao frasco B. O frasco B é colocado em um banho de ultra-som até a total dissolução dos sais de ferro.

O agitador mecânico é ligado e, aplicando-se uma atmosfera positiva de N_2 ao frasco B, a solução de ferro é adicionada lentamente ao frasco A sob agitação de aproximadamente 2000 rpm. A agitação é mantida por 30 minutos.

Após a reação, as partículas são lavadas com água deionizada e deaerada até obter-se $\text{pH}=7$, com a ajuda de um campo magnético permanente que as mantém agrupadas em um local do balão. As nanopartículas então são tratadas para serem revestidas com o silano desejado.

As nanopartículas obtidas tendem a agregar quando em solução. Para evitar que este fenômeno ocorra, realiza-se logo em seguida à síntese, a silanização das nanopartículas com o silano desejado.

A solução de nanopartículas foi lavada 2 vezes com metanol deaerado e a esta solução é adicionada uma mistura de solventes (1:1 de metanol/tolueno), em atmosfera inerte. Esta solução foi aquecida a 95°C até que seu volume se reduza pela metade e a seguir adiciona-se 35mL de metanol deaerado. Este processo é repetido 3 vezes para garantir que toda a água em excesso seja retirada do sistema.

O sistema de arraste da água funciona a partir de misturas azeotrópicas: metanol/tolueno (27% de tolueno v/v) e água/tolueno (87% de tolueno v/v). A primeira mistura tem ponto de ebulição de 63,5°C, enquanto a temperatura de ebulição para a segunda é de 84,1°C. Desta maneira evita-se a reação de hidrólise do silano no seio da solução impedindo que haja desperdício de reagente.

Assim, 0,02 mL de silano para cada 1 mg de Fe₃O₄ nanoparticulado é adicionado e o sistema foi mantido na temperatura de refluxo (~110 °C) em tolueno por 12 horas. O sistema utilizado para fazer a retirada de água (através de um tubo de Dean-Stark) e o refluxo em atmosfera inerte através do uso de uma bexiga contendo N₂ que é colocada em um septo situado ao final do condensador.

As nanopartículas obtidas são lavadas com água deionizada, deaerada e secas em dessecador a vácuo durante 2 semanas, obtendo-se um pó preto.

6.1.15 Montagem da curva de calibração para quantificação da proteína através do método de Bradford

Adicionou-se 7 mg da albumina de soro bovino em um balão volumétrico de 5 mL e completou-se seu volume com solução tampão fosfato 100 mM (pH = 7). A partir desta solução de concentração 1,4 mg/mL fez-se diluições para as seguintes concentrações: 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3; 0,35; 0,40; 0,45; 0,50; 0,75; 1,00; 1,20 mg/mL. A cada 100 µL destas soluções, adicionou-se 3 mL do reagente de Bradford, aguardou-se 5 minutos e mediu-se a absorvância em 595 nm. O branco (controle) desta curva de calibração foi medido a partir da mistura de 100 µL de solução tampão fosfato 100 mM (pH = 7) e 3 mL do reagente de Bradford.

6.1.16 Preparação da solução enzimática

Para a quantificação da lipase Amano PS/*Burkholderia cepacia*, pesou-se 100, 50 e 10 mg desta lipase e adicionou-se 1 mL de solução tampão fosfato 100 mM (pH=7) para cada pesagem. Centrifugou-se a 6000 rpm durante 3 minutos. Recolheu-se 100 µL de cada solução, adicionou-se 3 mL de Bradford, aguardou-se 5 minutos e mediu-se a absorvância em 595 nm.

6.1.17 Funcionalização das nanopartículas magnéticas com carboxibenzaldeído

Em um balão de 1 via a 0°C, adicionou-se 500 mg de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com grupo amino preparadas conforme mostrado na seção 6.1.14 em uma solução de 250 mL de etanol e 250 mL de TBME (1:1), 6,5 g de carboxibenzaldeído (0,18 M) em uma solução de 250

mL de etanol:250 mL de TBME (1:1). Manteve-se a temperatura a 0°C durante 4 horas. Lavou-se as nanopartículas e deixou-se em dessecador por 24 horas.

A esse complexo formado, adicionou-se 10 mg de borohidreto de sódio, 24 mg de ácido benzóico e todo o sistema foi macerado por 1 hora e depois lavados com solução saturada de bicarbonato de sódio (1 mL) e TBME (1 mL), deixou-se no dessecador por 6 horas. 20 mg desse complexo foram pesados e adicionados a um frasco com solução 0,25 % de EDC que ficaram 10 minutos em sonicador. Após esse tempo, este complexo foi lavado com 1 mL de solução tampão fosfato 100 mM (pH = 7) e mantidos por 6 horas em dessecador à vácuo. E posteriormente foi utilizado para o processo de imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia*.

6.1.18 Funcionalização das nanopartículas magnéticas com glutaraldeído

Em um frasco de plástico (2 mL eppendorf®) 20 mg de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com o grupo amino preparadas conforme mostrado na seção 6.1.14 foram adicionadas e 25 µL de solução de glutaraldeído 25 % (v/v). Colocou-se o frasco contendo a mistura reacional em um agitador de tubos (*thermomixer*®), 800 rpm, 25°C durante 2 horas. Lavou-se com solução tampão fosfato 100 mM (3 x 500 µL) e deixou-se em dessecador por 24 horas. E posteriormente foi utilizado para o processo de imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia*.

6.1.19 Imobilização por fisissorção e quimissorção

Em um frasco de plástico (2 mL eppendorf®) 20 mg de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com carboxibenzaldeído ou glutaraldeído, foram adicionadas, 1 mL de solução da lipase de *Burkholderia cepacia* de concentração 0,55 mg/mL. Colocou-se o frasco contendo a mistura reacional em um agitador de tubos (*thermomixer*®), 800 rpm, 32°C durante 1 hora. Lavou-se com solução tampão fosfato 100 mM (3 x 100 µL) e deixou-se em dessecador por 12 horas. E posteriormente foi utilizado para a reação de resolução cinética enzimática

6.1.20 Resolução cinética enzimática

Em um frasco de plástico (2 mL eppendorf®) 20 mg de nanopartículas magnéticas contendo a enzima imobilizada foram adicionadas 1 mL de solvente, 0,3 mmol de acilante e 0,01 mmol de substrato. Colocou-se o eppendorf contendo a mistura reacional em um agitador de tubos (*thermomixer*®), 800 rpm, 32°C, 42°C e 52°C durante 24, 48 e 72 horas. Após estes períodos, recolheu-se uma alíquota do sobrenadante para análise de conversão e excessos enantioméricos.

7. Referências Bibliográficas

- Alcalde, M., Ferrer, M., Plou, F. J., Ballesteros, A., Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. *Trends Biotechnol.* **2006**, 24, (6), 281-287.
- Arica, M. Y., Yavuz, H., Patir, S., Denizli, A., Immobilization of glucoamylase onto spacer-arm attached magnetic poly(methylmethacrylate) microspheres: characterization and application to a continuous flow reactor. *J. Mol. Catal B-Enzym.* **2000**, 11, (2-3), 127-138.
- Atanasijevic, T., Shusteff, M., Fam, P., Jasanoff, A., Calcium-sensitive MRI contrast agents based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles and calmodulin. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, (40), 14707-14712.
- Bahar, T., Celebi, S. S., Performance of immobilized glucoamylase in a magnetically stabilized fluidized bed reactor (MSFBR). *Enzyme Microb. Tech.* **2000**, 26, (1), 28-33.
- Bayramoglu, G., Arica, M. Y., Preparation of poly (glycidylmethacrylate-methylmethacrylate) magnetic beads: Application in lipase immobilization. *J. Mol. Catal B-Enzym.* **2008**, 55, (1-2), 76-83.
- Bayramoglu, G., Kiralp, S., Yilmaz, M., Toppare, L., Arica, M. Y., Covalent immobilization of chloroperoxidase onto magnetic beads: Catalytic properties and stability. *Biochem. Eng. J.* **2008**, 38, (2), 180-188.
- Bhushan, I., Parshad, R., Qazi, G. N., Ingavle, G., Jamalpure, T. M., Rajan, C. R., Ponrathnam, S., Gupta, V. K., Macroporous beads for lipase immobilization: Kinetic resolution of a racemic drug intermediate. *J. Bioact. Compat. Pol.* **2007**, 22, (2), 174-194.
- Bhushan, I., Parshad, R., Qazi, G. N., Ingavle, G., Rajan, C. R., Ponrathnam, S., Gupta, V. K., Lipase enzyme immobilization on synthetic beaded macroporous copolymers for kinetic resolution of chiral drugs intermediates. *Process Biochem.* **2008**, 43, (4), 321-330.
- Bier, M., Colowick, S. P., Kaplan, N. O., Lipases, in *Methods in Enzymol.* Academic Press, New York **1955**, 1, 627-642.
- Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, (1-2), 248-254.
- Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J. P., Christiansen, L., Hugejensen, B., Norskov, L., Thim, L., Menge, U., A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* **1990**, 343, (6260), 767-770.

- Breuer, M., Ditrich, K., Habicher, T., Hauer, B., Kessler, M., Sturmer, R., Zelinski, T., Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2004**, 43, (7), 788-824.
- Brockman, H. L., Borgstrom, B., General features of lipolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches. *Elsevier Science Publishers, Amsterdam* **1984**.
- Brodfehrer, P. R., Smith, P., Dillon, J. L., Vemishetti, P., Asymmetric synthesis of the antiarrhythmia agent d-sotalol. *Org. Process Res. Dev.* **1997**, 1, (2), 176-178.
- Cao, L. Q., van Langen, L., Sheldon, R. A., Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Curr. Opin. Biotech.* **2003**, 14, (4), 387-394.
- Carrea, G., Ottolina, G., Riva, S., Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media. *Trends Biotechnol.* **1995**, 13, (2), 63-70.
- Caruana, C. M., Enzymes tackle tough processing. *Chem. Eng. Prog.* **1997**, 93, (11), 13-&.
- Chaubey, A., Parshad, R., Koul, S., Taneja, S. C., Qazi, G. N., Enantioselectivity modulation through immobilization of *Arthrobacter sp* lipase: Kinetic resolution of fluoxetine intermediate. *J. Mol. Catal B-Enzym.* **2006**, 42, (1-2), 39-44.
- Chaubey, A., Parshad, R., Taneja, S. C., Qazi, G. N., *Arthrobacter sp* lipase immobilization on magnetic sol-gel composite supports for enantioselectivity improvement. *Process Biochem.* **2009**, 44, (2), 154-160.
- Chen, C. S., Fujimoto, Y., Girdaukas, G., Sih, C. J., Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, (25), 7294-7299.
- Chen, C. S., Sih, C. J., General aspects and optimization of enantioselective biocatalysis in organic solvents: the use of lipases. *Angew. Chem. Int. Edit.* **1989**, 28, (6), 695-707.
- Chen, J. P., Lin, W. S., Sol-gel powders and supported sol-gel polymers for immobilization of lipase in ester synthesis. *Enzyme Microb. Tech.* **2003**, 32, (7), 801-811.
- Clayden, J., Greeves, N., Warren, S., Wothers, P., Organic Chemistry. *Oxford University Press, Oxford* **2000**, Cap. 25.
- Corey, E. J., Reichard, G. A., Enantioselective and practical syntheses of R- and S-fluoxetine. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, (39), 5207-5210.
- Cygler, M., Schrag, J. D., Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. *Methods Enzymol. part. A* **1997**, 284, 3-27.
- Demirjian, D., Moris-Varas, F., Gololobov, M., Calugaru, S., Biocatalysis in chemical processing. *Chemical Process.* **1999**, 62, (6), 57-58.
- Dyal, A., Loos, K., Noto, M., Chang, S. W., Spagnoli, C., Shafi, K., Ulman, A., Cowman, M., Gross, R. A., Activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on gamma-Fe₂O₃ magnetic nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, (7), 1684-1685.

- Ericsson, D. J., Kasrayan, A., Johansson, P., Bergfors, T., Sandstrom, A. G., Backvall, J. E., Mowbray, S. L., X-ray structure of *Candida antarctica* lipase shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. *J. Mol. Biol.* **2008**, 376, (1), 109-119.
- Faber, K., Biotransformations in Organic Chemistry. *Berlin, Springer-Verlag* **2000**.
- Fernandez-Lorente, G., Palomo, J. M., Mateo, C., Munilla, R., Ortiz, C., Cabrera, Z., Guisan, J. M., Fernandez-Lafuente, R., Glutaraldehyde cross-linking of lipases adsorbed on aminated supports in the presence of detergents leads to improved performance. *Biomacromolecules* **2006**, 7, (9), 2610-2615.
- Ferrato, F., Carriere, F., Sarda, L., Verger, R., A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. *Methods Enzymol. part. A* **1997**, 286, 327-347.
- Gan, Z. F., Jiang, J. S., Yang, Y., Du, B., Qian, M., Zhang, P., Immobilization of homing peptide on magnetite nanoparticles and its specificity in vitro. *J. Biomed. Mater. Res. A.* **2008**, 84A, (1), 10-18.
- Goswami, A., Goswami, J., DMSO-triggered enhancement of enantioselectivity in novozyme [435]-catalyzed transesterification of chiral 1-phenylethanol. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, (25), 4411-4413.
- Gotor-Fernandez, V., Brieva, R., Gotor, V., Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. *J. Mol. Catal B-Enzym.* **2006**, 40, (3-4), 111-120.
- Gupta, A. K., Gupta, M., Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* **2005**, 26, (18), 3995-4021.
- Guss, C. O., Rosenthal, R., Bromohydrins from Olefins and N-Bromosuccinimide in Water. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, (9), 2549-2549.
- Hara, P., Hanefeld, U., Kanerva, L. T., Sol-gels and cross-linked aggregates of lipase PS from *Burkholderia cepacia* and their application in dry organic solvents. *J. Mol. Catal B-Enzym.* **2008**, 50, (2-4), 80-86.
- Herd, A. R., Kim, B. S., Taton, T. A., Encapsulated magnetic nanoparticles as supports for proteins and recyclable biocatalysts. *Bioconjugate Chem.* **2007**, 18, (1), 183-189.
- Hong, J., Xu, D. M., Gong, P. J., Sun, H. W., Dong, L., Yao, S. D., Covalent binding of alpha-chymotrypsin on the magnetic nanogels covered by amino groups. *J. Mol. Catal B-Enzym.* **2007**, 45, (3-4), 84-90.
- Huang, S. H., Liao, M. H., Chen, D. H., Direct binding and characterization of lipase onto magnetic nanoparticles. *Biotechnol. Progr.* **2003**, 19, (3), 1095-1100.
- Hung, T. C., Giridhar, R., Chiou, S. H., Wu, W. T., Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. *J. Mol. Catal B-Enzym.* **2003**, 26, (1-2), 69-78.

- Ito, A., Shinkai, M., Honda, H., Kobayashi, T., Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *J. Biosci. Bioeng.* **2005**, 100, (1), 1-11.
- Ivanov, A. E., Schneider, M. P., Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **1997**, 3, (6), 303-309.
- Jaeger, K. E., Eggert, T., Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotech.* **2002**, 13, (4), 390-397.
- Jaeger, K. E., Reetz, M. T., Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* **1998**, 16, (9), 396-403.
- Jia, H. F., Zhu, G. Y., Wang, P., Catalytic behaviors of enzymes attached to nanoparticles: The effect of particle mobility. *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, 84, (4), 406-414.
- Johnson, A. K., Zawadzka, A. M., Deobald, L. A., Crawford, R. L., Paszczynski, A. J., Novel method for immobilization of enzymes to magnetic nanoparticles. *J. Nanopart. Res.* **2008**, 10, (6), 1009-1025.
- Juneja, S. K., Choudhary, D., Paul, S., Gupta, R., In situ-generated zinc bromide-catalyzed alpha-bromination of alkanones in water. *Synthetic Commun.* **2006**, 36, (19), 2877-2881.
- Kamal, A., Chouhan, G., Chemoenzymatic synthesis of enantiomerically pure 1,2-diols employing immobilized lipase in the ionic liquid [bmim]PF₆. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, (48), 8801-8805.
- Katz, E., Willner, I., Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: Synthesis, properties, and applications. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2004**, 43, (45), 6042-6108.
- Kim, D. K., Mikhaylova, M., Zhang, Y., Muhammed, M., Protective coating of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chemistry of Materials* **2003**, 15, (8), 1617-1627.
- Kim, J., Grate, J. W., Wang, P., Nanostructures for enzyme stabilization. *Chem. Eng. Sci.* **2006**, 61, (3), 1017-1026.
- Kim, K. K., Song, H. K., Shin, D. H., Hwang, K. Y., Suh, S. W., The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure* **1997**, 5, (2), 173-185.
- Klibanov, A. M., Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **2001**, 409, (6817), 241-246.
- Koneracka, M., Kopcansky, P., Timko, M., Ramchand, C. N., de Sequeira, A., Trevan, M., Direct binding procedure of proteins and enzymes to fine magnetic particles. *J. Mol. Catal B-Enzym.* **2002**, 18, (1-3), PII S1381-1177(1302)00016-00014.

- Krug, R. R., Hunter, W. G., Grieger, R. A., Enthalpy-entropy compensation. Some fundamental statistical problems associated with the analysis of van't Hoff and Arrhenius data. *J. Phys. Chem.* **1976**, 80, (21), 2335-2341.
- Kumar, P., Upadhyay, R. K., Pandey, R. K., Asymmetric dihydroxylation route to (*R*)-isoprenaline, (*R*)-norfluoxetine and (*R*)-fluoxetine. *Tetrahedron-Asymmetr.* **2004**, 15, (24), 3955-3959.
- Lauva, M., Auzans, E., Levickis, V., Plavins, J., Selective HGMS of colloidal magnetite-binding cells from whole blood. *J. Magn. Magn. Mater.* **1990**, 85, (1-3), 295-298.
- Lee, G., Kim, J., Lee, J. H., Development of magnetically separable polyaniline nanofibers for enzyme immobilization and recovery. *Enzyme Microb. Tech.* **2008a**, 42, (6), 466-472.
- Lee, J., Lee, Y., Youn, J. K., Bin Na, H., Yu, T., Kim, H., Lee, S. M., Koo, Y. M., Kwak, J. H., Park, H. G., Chang, H. N., Hwang, M., Park, J. G., Kim, J., Hyeon, T., Simple synthesis of functionalized superparamagnetic magnetite/silica core/shell nanoparticles and their application as magnetically separable high-performance biocatalysts. *Small* **2008b**, 4, (1), 143-152.
- Lei, L., Bai, Y. X., Li, Y. F., Yi, L. X., Yang, Y., Xia, C. G., Study on immobilization of lipase onto magnetic microspheres with epoxy groups. *J. Magn. Magn. Mater.* **2009**, 321, (4), 252-258.
- Lemke, K., Theil, F., Kunath, A., Schick, H., Lipase-catalysed kinetic resolution of phenylethan-1,2-diol by sequential transesterification - The influence of the solvent. *Tetrahedron-Asymmetr.* **1996**, 7, (4), 971-974.
- Li, G. Y., Huang, K. L., Jiang, Y. R., Yang, D. L., Ding, P., Preparation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase immobilized on magnetic nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* **2008**, 42, (5), 405-412.
- Li, L. P., Li, G. S., Smith, R. L., Inomata, H., Microstructural evolution and magnetic properties of NiFe₂O₄ nanocrystals dispersed in amorphous silica. *Chemistry of Materials* **2000**, 12, (12), 3705-3714.
- Liao, M. H., Chen, D. H., Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase on magnetic nanoparticles for improving its stability. *Biotechnol. Lett.* **2001**, 23, (20), 1723-1727.
- Lin, S., Yun, D., Qi, D. W., Deng, C. H., Li, Y., Zhang, X. M., Novel microwave-assisted digestion by trypsin-immobilized magnetic nanoparticles for proteomic analysis. *J. Proteome Res.* **2008**, 7, (3), 1297-1307.
- Liu, C. Z., Honda, H., Ohshima, A., Shinkai, M., Kobayashi, T., Development of chitosan-magnetite aggregates containing *Nitrosomonas europaea* cells for nitrification enhancement. *J. Biosci. Bioeng.* **2000**, 89, (5), 420-425.
- Liu, J. Y., Lin, S., Qi, D. W., Deng, C. H., Yang, P. Y., Zhang, X. M., On-chip enzymatic microreactor using trypsin-immobilized superparamagnetic nanoparticles for highly efficient proteolysis. *J. Chromatogr. A.* **2007**, 1176, (1-2), 169-177.

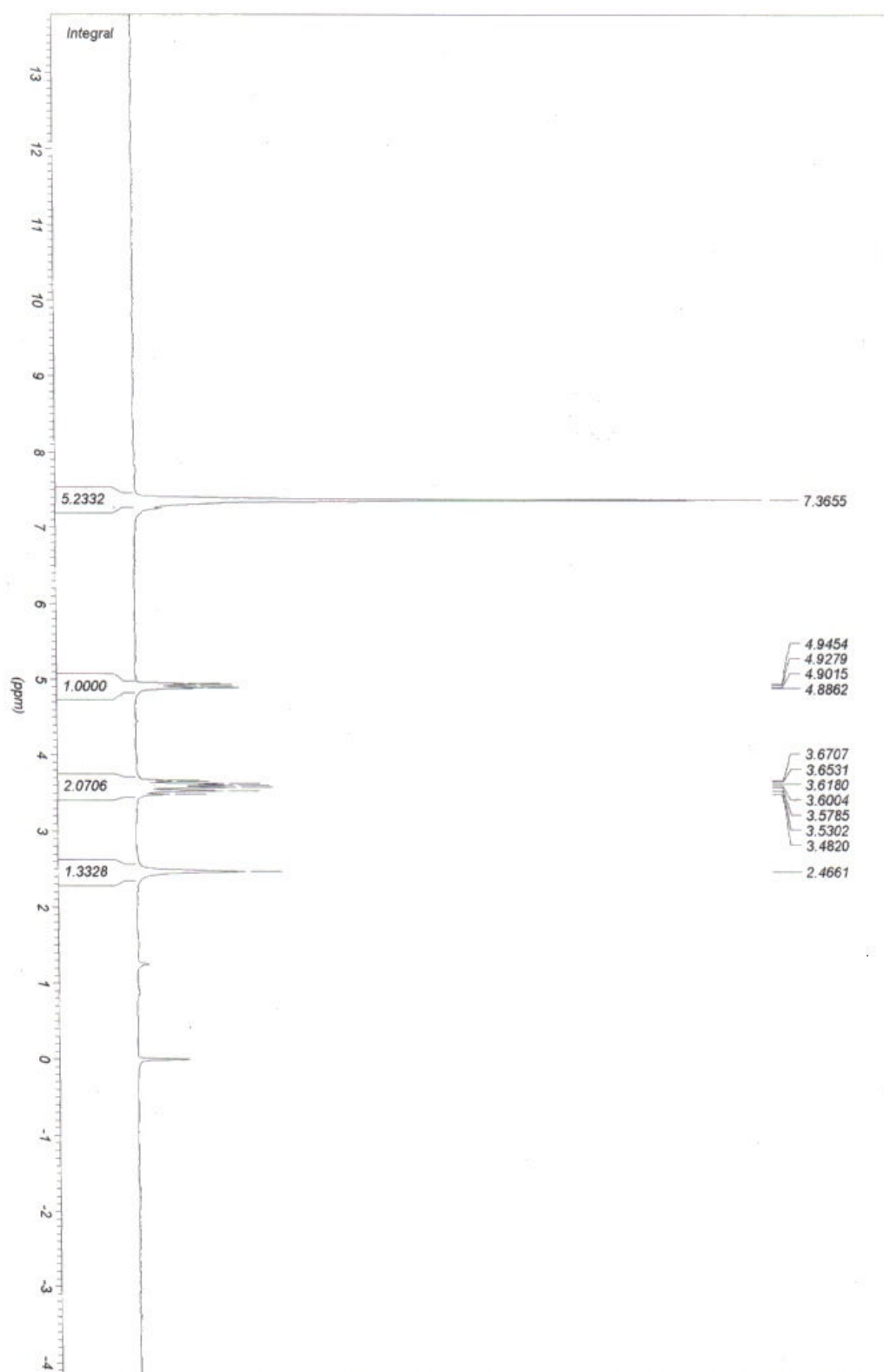
- Liu, W. T., Nanoparticles and their biological and environmental applications. *J. Biosci. Bioeng.* **2006**, 102, (1), 1-7.
- Liu, X. Q., Xing, J. M., Guan, Y. P., Shan, G. B., Liu, H. Z., Synthesis of amino-silane modified superparamagnetic silica supports and their use for protein immobilization. *Colloid.Surface A.* **2004**, 238, (1-3), 127-131.
- Lu, A. H., Salabas, E. L., Schuth, F., Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2007**, 46, (8), 1222-1244.
- Majewski, P., Thierry, B., Functionalized magnetite nanoparticles - Synthesis, properties, and bio-applications. *Crit Rev. Solid State* **2007**, 32, (3-4), 203-215.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., Fernandez-Lafuente, R., Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Tech.* **2007**, 40, (6), 1451-1463.
- McQuarrie, D. A., Simon, J. D., Physical Chemistry, a molecular approach. *University Science Books* **1997**, 1295-1298.
- Mikhaylova, M., Kim, D. K., Berry, C. C., Zagorodni, A., Toprak, M., Curtis, A. S. G., Muhammed, M., BSA immobilization on amine-functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chemistry of Materials* **2004**, 16, (12), 2344-2354.
- Neuberger, T., Schopf, B., Hofmann, H., Hofmann, M., von Rechenberg, B., Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *J. Magn. Magn. Mater.* **2005**, 293, (1), 483-496.
- Palomo, J. M., Segura, R. L., Fernandez-Lorente, G., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M., Glutaraldehyde modification of lipases adsorbed on aminated supports: A simple way to improve their behaviour as enantioselective biocatalyst. *Enzyme Microb. Tech.* **2007**, 40, (4), 704-707.
- Pamies, O., Backvall, J. E., Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of beta-halo alcohols. An efficient route to chiral epoxides. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, (25), 9006-9010.
- Pankhurst, Q. A., Connolly, J., Jones, S. K., Dobson, J., Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D Appl. Phys.* **2003**, 36, (13), PII S0022-3727(0003)40035-40031.
- Pauster, L., M'emoire sur la fermentation de l'acide tartrique. *Cr hebdomadaire Acad Sci* **1858**, 46, 615-618.
- Pileni, M. P., Reverse micelles as microreactors. *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, (27), 6961-6973.

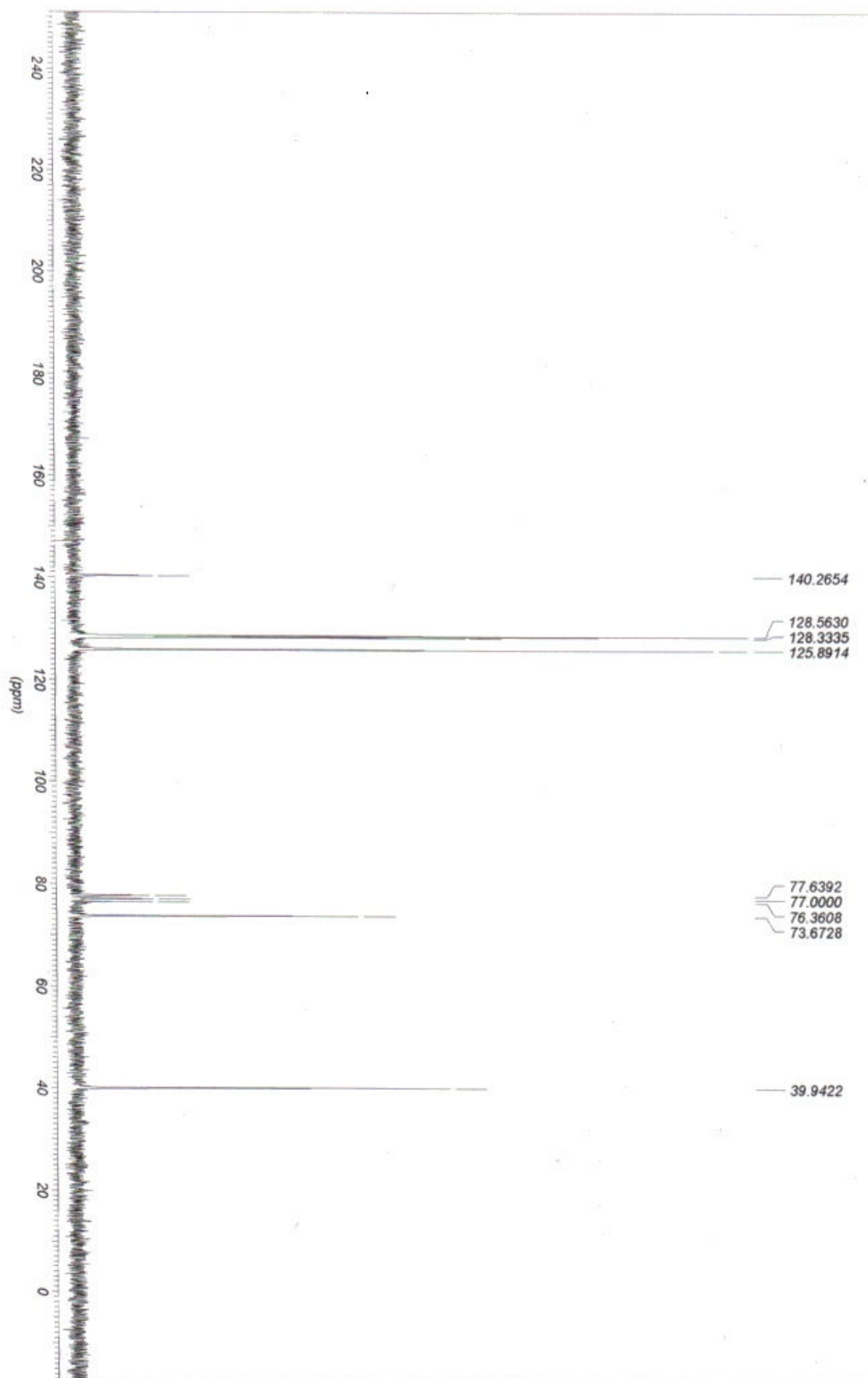
- Pillai, V., Kumar, P., Hou, M. J., Ayyub, P., Shah, D. O., Preparation of nanoparticles of silver halides, superconductors and magnetic materials using water-in-oil microemulsions as nano-reactors. *Adv. Colloid Interfac Sci.* **1995**, 55, 241-269.
- Pleiss, J., Fischer, M., Schmid, R. D., Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chem. Phys. Lipids* **1998**, 93, (1-2), 67-80.
- Reetz, M. T., Zonta, A., Vijaykrishnan, V., Schimossek, K., Entrapment of lipases in hydrophobic magnetite-containing sol-gel materials: magnetic separation of heterogeneous biocatalysts. *J. Mol. Catal. A-Chem.* **1998**, 134, (1-3), 251-258.
- Robinson, P. J., Dunnill, P., Lilly, M. D., The properties of magnetic supports in relation to immobilized enzyme reactors. *Biotechnol. Bioeng.* **1973**, 15, (3), 603-606.
- Rossi, L. M., Quach, A. D., Rosenzweig, Z., Glucose oxidase-magnetite nanoparticle bioconjugate for glucose sensing. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, 380, (4), 606-613.
- Rotthaus, O., Kruger, D., Demuth, M., Schaffner, K., Reductions of keto esters with baker's yeast in organic solvents - A comparison with the results in water. *Tetrahedron* **1997**, 53, (3), 935-938.
- Sarda, L., Desnuelle, P., Action de la lipase pancreatique sur les esters en emulsion. *Biochim. Biophys. Acta* **1958**, 30, (3), 513-521.
- Savage, N., Diallo, M. S., Nanomaterials and water purification: Opportunities and challenges. *J. Nanopart. Res.* **2005**, 7, (4-5), 331-342.
- Schmid, R. D., Verger, R., Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Edit.* **1998**, 37, (12), 1609-1633.
- Sharma, A., Qiang, Y., Antony, J., Meyer, D., Kornacki, P., Paszczynski, A., Dramatic increase in stability and longevity of enzymes attached to monodispersive iron nanoparticles. *Ieee T. Magn.* **2007**, 43, (6), 2418-2420.
- Shaw, S. Y., Chen, Y. J., Ou, J. J., Ho, L., Preparation and characterization of *Pseudomonas putida* esterase immobilized on magnetic nanoparticles. *Enzyme Microb. Tech.* **2006**, 39, (5), 1089-1095.
- Shu, B., Zheng, G., Wei, L., Yan, S., Resolution of (+/-)-menthol by immobilized *Candida rugosa* lipase on superparamagnetic nanoparticles. *Food Chem.* **2006**, 96, (1), 1-7.
- Sing, K. S. W., Everett, D. H., Haul, R. A. W., Moscou, L., Pierotti, R. A., Rouquerol, J., Siemieniewska, T., Reporting Physisorption data *Pure Appl. Chem.* **1985**, 57, (4), 603-619.
- Srinivasan, B., Huang, X. F., Functionalization of magnetic nanoparticles with organic molecules: Loading level determination and evaluation of linker length effect on immobilization. *Chirality* **2008**, 20, (3-4), 265-277.

- Stevens, P. D., Fan, J. D., Gardimalla, H. M. R., Yen, M., Gao, Y., Superparamagnetic nanoparticle-supported catalysis of Suzuki cross-coupling reactions. *Org. Lett.* **2005**, 7, (11), 2085-2088.
- Straathof, A. J. J., Jongejan, J. A., The enantiomeric ratio: origin, determination and prediction. *Enzyme Microb. Tech.* **1997**, 21, (8), 559-571.
- Sugimoto, T., Preparation of monodispersed colloidal particles. *Adv. Colloid Interfac.* **1987**, 28, (1), 65-108.
- Sugimoto, T., Matijevic, E., Formation of uniform spherical magnetite particles by crystallization from ferrous hydroxide gels. *J. Colloid Interfac. Sci.* **1980**, 74, (1), 227-243.
- Sun, S. H., Murray, C. B., Weller, D., Folks, L., Moser, A., Monodisperse Fe-Pt nanoparticles and ferromagnetic Fe-Pt nanocrystal superlattices. *Science* **2000**, 287, (5460), 1989-1992.
- Sun, S. H., Zeng, H., Robinson, D. B., Raoux, S., Rice, P. M., Wang, S. X., Li, G. X., Monodisperse MFe_2O_4 ($M = Fe, Co, Mn$) nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, (1), 273-279.
- Swanson, P. E., Dehalogenases applied to industrial-scale biocatalysis. *Curr. Opin. Biotech.* **1999**, 10, (4), 365-369.
- Taran, F., Gauchet, C., Mohar, B., Meunier, S., Valleix, A., Renard, P. Y., Creminon, C., Grassi, J., Wagner, A., Mioskowski, C., High-throughput screening of enantioselective catalysts by immunoassay. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2002**, 41, (1), 124-127.
- Tartaj, P., Morales, M. P., Gonzalez-Carreño, T., Veintemillas-Verdaguer, S., Serna, C. J., Advances in magnetic nanoparticles for biotechnology applications. *J. Magn. Magn. Mater.* **2005**, 290, 28-34.
- Tratnyek, P. G., Johnson, R. L., Nanotechnologies for environmental cleanup. *Nano Today* **2006**, 1, (2), 44-48.
- Tsai, S. W., Cheng, I. C., Huang, C. M., Effects of hydrolysis and esterification side-reactions on the kinetic resolution of enzyme-catalyzed irreversible transesterification in organic solvents. *Chem. Eng. Sci.* **2000**, 55, (20), 4571-4582.
- Uhlen, M., Magnetic separation of DNA. *Nature* **1989**, 340, (6236), 733-734.
- Vijayalakshmi, A., Tarunashree, Y., Baruwati, B., Manorama, S. V., Narayana, B. L., Johnson, R. E. C., Rao, N. M., Enzyme field effect transistor (ENFET) for estimation of triglycerides using magnetic nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, 23, (11), 1708-1714.
- Virsu, P., Liljebblad, A., Kanerva, A., Kanerva, L. T., Preparation of the enantiomers of 1-phenylethan-1,2-diol. Regio- and enantioselectivity of acylase I and *Candida antarctica* lipases A and B. *Tetrahedron-Asymmetr.* **2001**, 12, (17), 2447-2455.

- Wirth, D. D., Miller, M. S., Boini, S. K., Koenig, T. M., Identification and comparison of impurities in fluoxetine hydrochloride synthesized by seven different routes. *Org. Process Res. Dev.* **2000**, 4, (6), 513-519.
- Wohlgemuth, R., Interfacing biocatalysis and organic synthesis. *J. Chem. Technol. Biot.* **2007**, 82, (12), 1055-1062.
- Yamaura, M., Camilo, R. L., Sampaio, L. C., Macedo, M. A., Nakamura, M., Toma, H. E., Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **2004**, 279, (2-3), 210-217.
- Yang, W., Xu, J. H., Xie, Y., Xu, Y., Zhao, G., Lin, G. Q., Asymmetric reduction of ketones by employing *Rhodotorula sp.* AS2.2241 and synthesis of the beta-blocker (R)-nifenalol. *Tetrahedron-Asymmetr.* **2006**, 17, (12), 1769-1774.
- Yong, Y., Bai, Y. X., Li, Y. F., Lin, L., Cui, Y. J., Xia, C. G., Preparation and application of polymer-grafted magnetic nanoparticles for lipase immobilization. *J. Magn. Magn. Mater.* **2008**, 320, (19), 2350-2355.
- Yu, C. C., Lin, P. C., Lin, C. C., Site-specific immobilization of CMP-sialic acid synthetase on magnetic nanoparticles and its use in the synthesis of CMP-sialic acid. *Chem. Commun.* **2008**, (11), 1308-1310.
- Zarevucka, M., Zalska, Z., Rejzek, M., Streinz, L., Wimmer, Z., Mackova, M., Demnerova, K., Lipase-mediated hydrolysis and esterification. *Enzyme Microb. Tech.* **1995**, 17, (10), 866-869.
- Zeynizadeh, B., Behyar, T., Fast and efficient method for reduction of carbonyl compounds with NaBH₄/Wet SiO₂ under solvent free condition. *J. Brazil Chem. Soc.* **2005**, 16, (6A), 1200-1209.
- Zhang, W. X., Nanoscale iron particles for environmental remediation: An overview. *J. Nanopart. Res.* **2003**, 5, (3-4), 323-332.
- Zhang, Y. M., Li, J., Han, D. F., Zhang, H. D., Liu, P., Li, C., An efficient resolution of racemic secondary alcohols on magnetically separable biocatalyst. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **2008**, 365, (4), 609-613.
- Zheng, G., Shu, B., Yan, S., Preparation and characterization of immobilized lipase on magnetic hydrophobic microspheres. *Enzyme Microb. Tech.* **2003**, 32, (7), 776-782.

8. Anexos

Figura 20: Espectro de ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) referente a (3a)

Figura 21: Espectro de ^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3) referente a (3a)

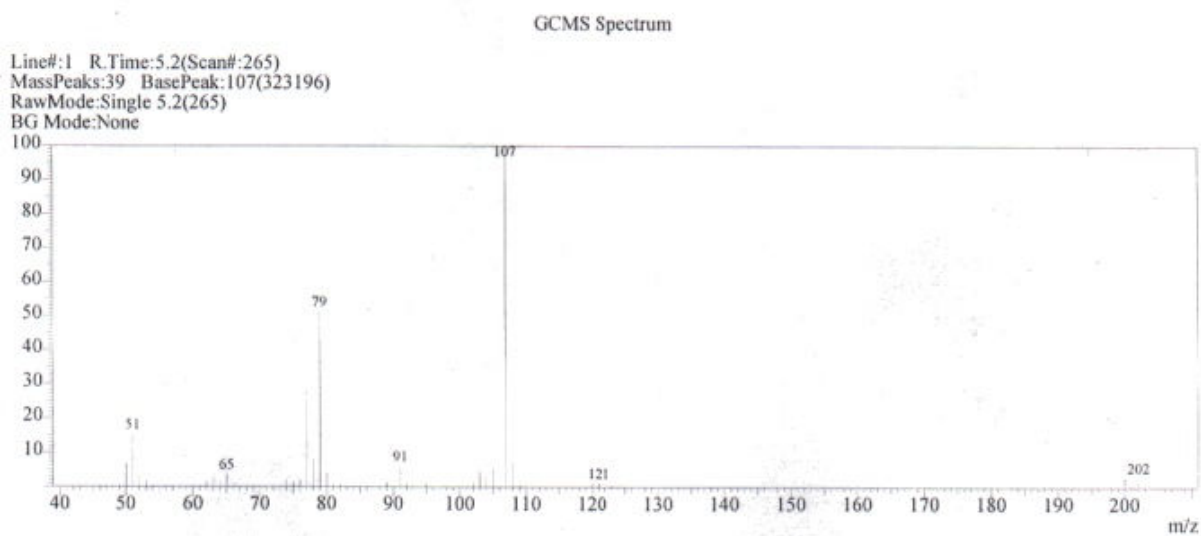
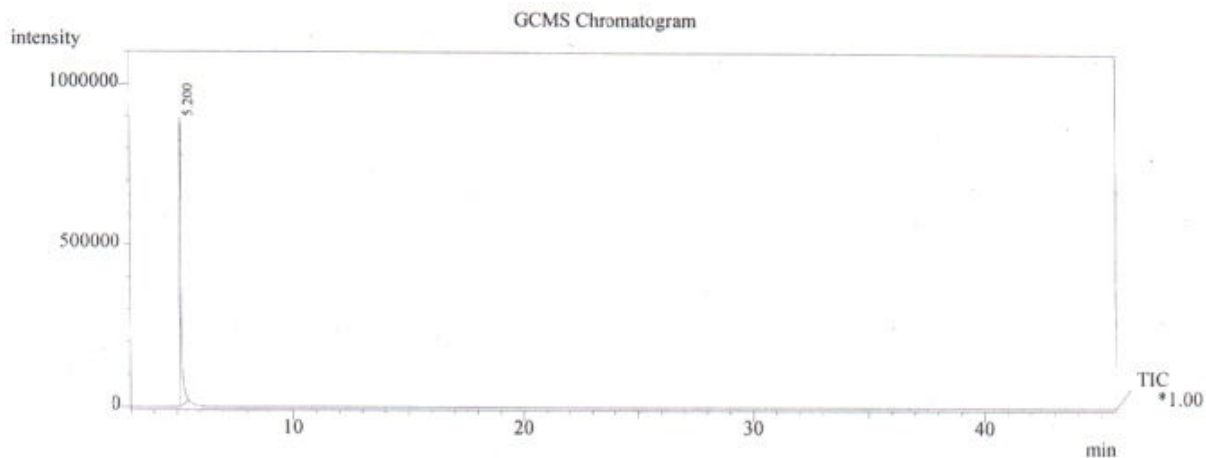


Figura 22: Espectro de CG/MS referente a (3a)

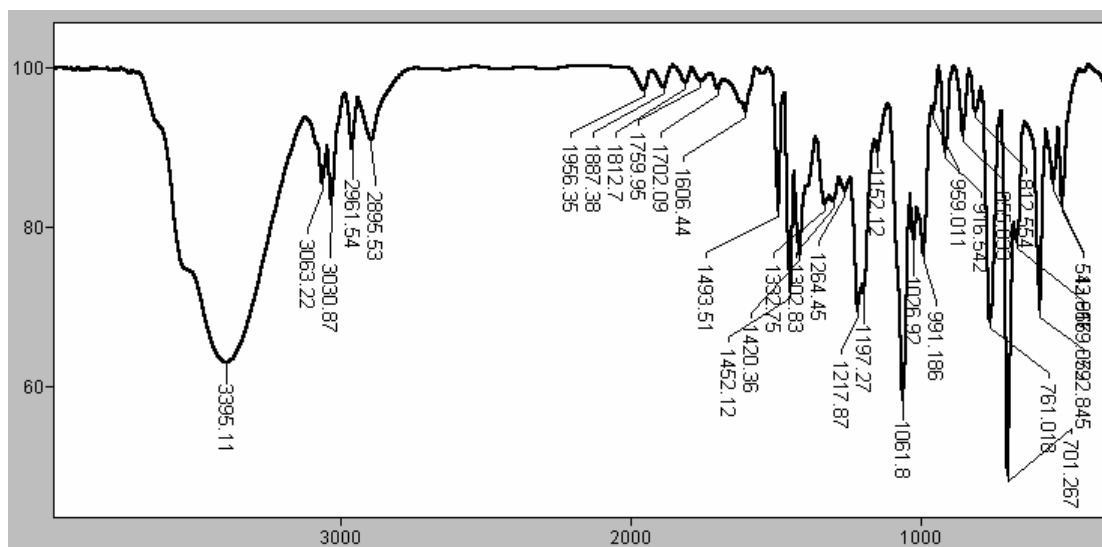
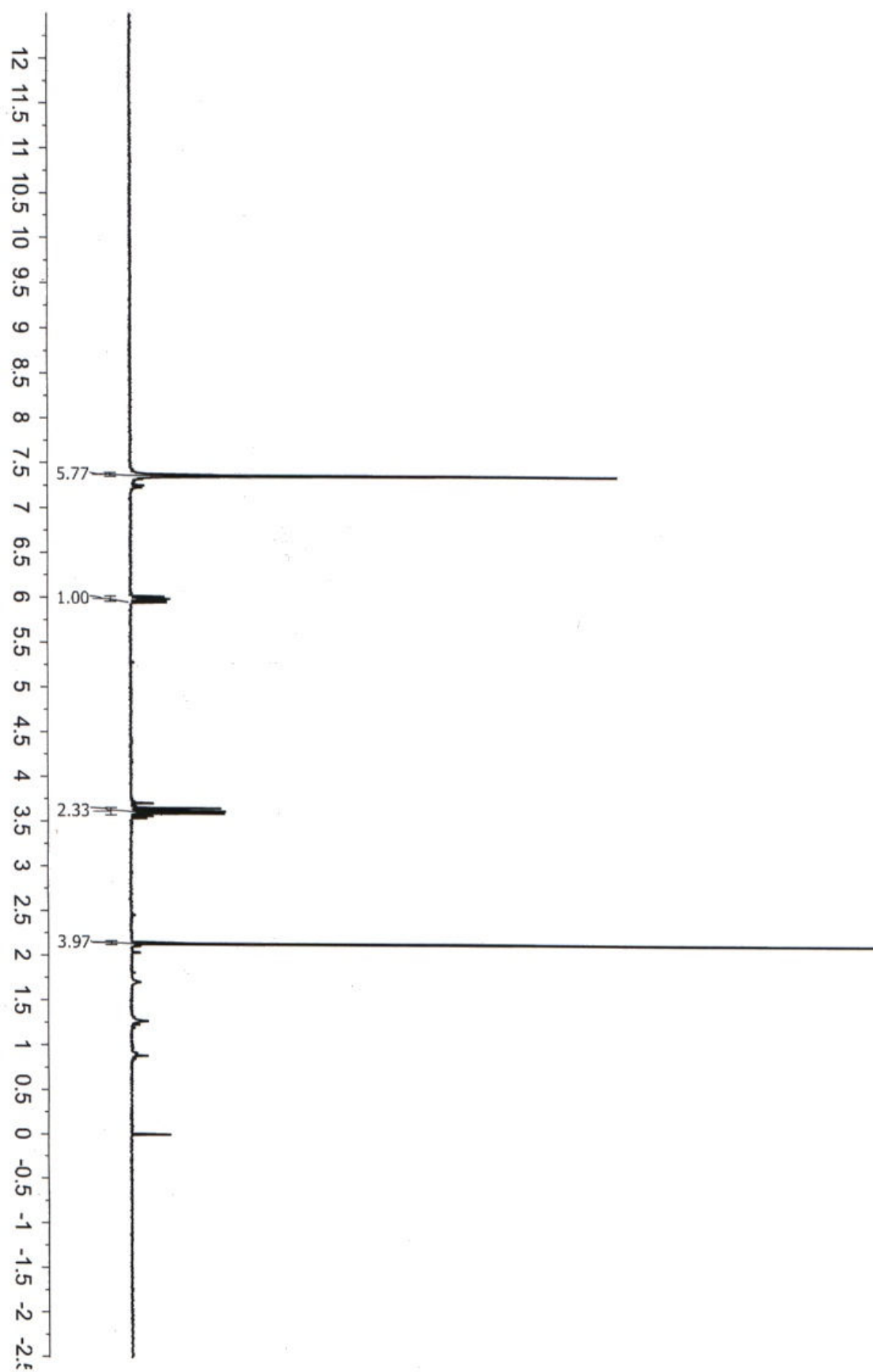
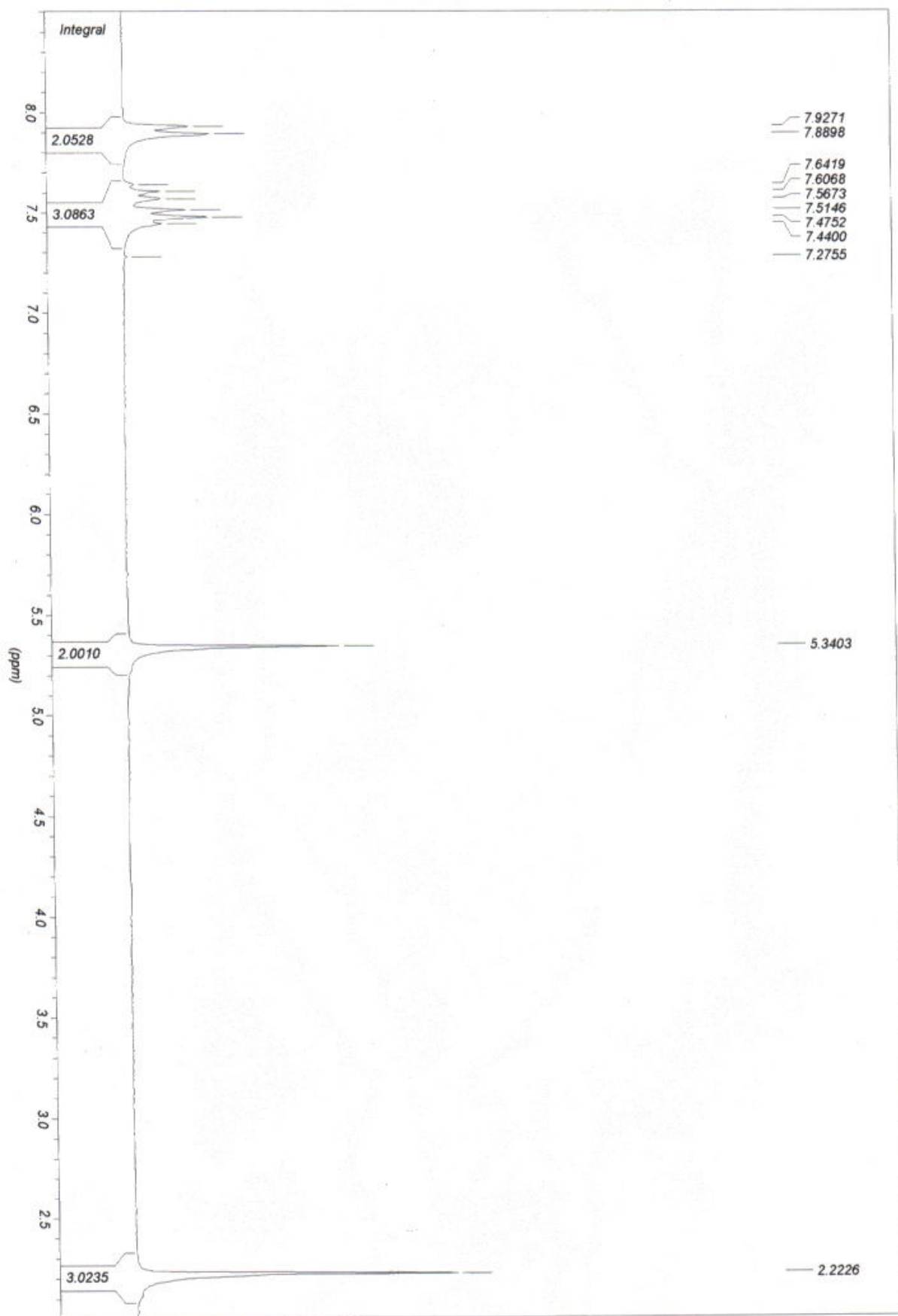
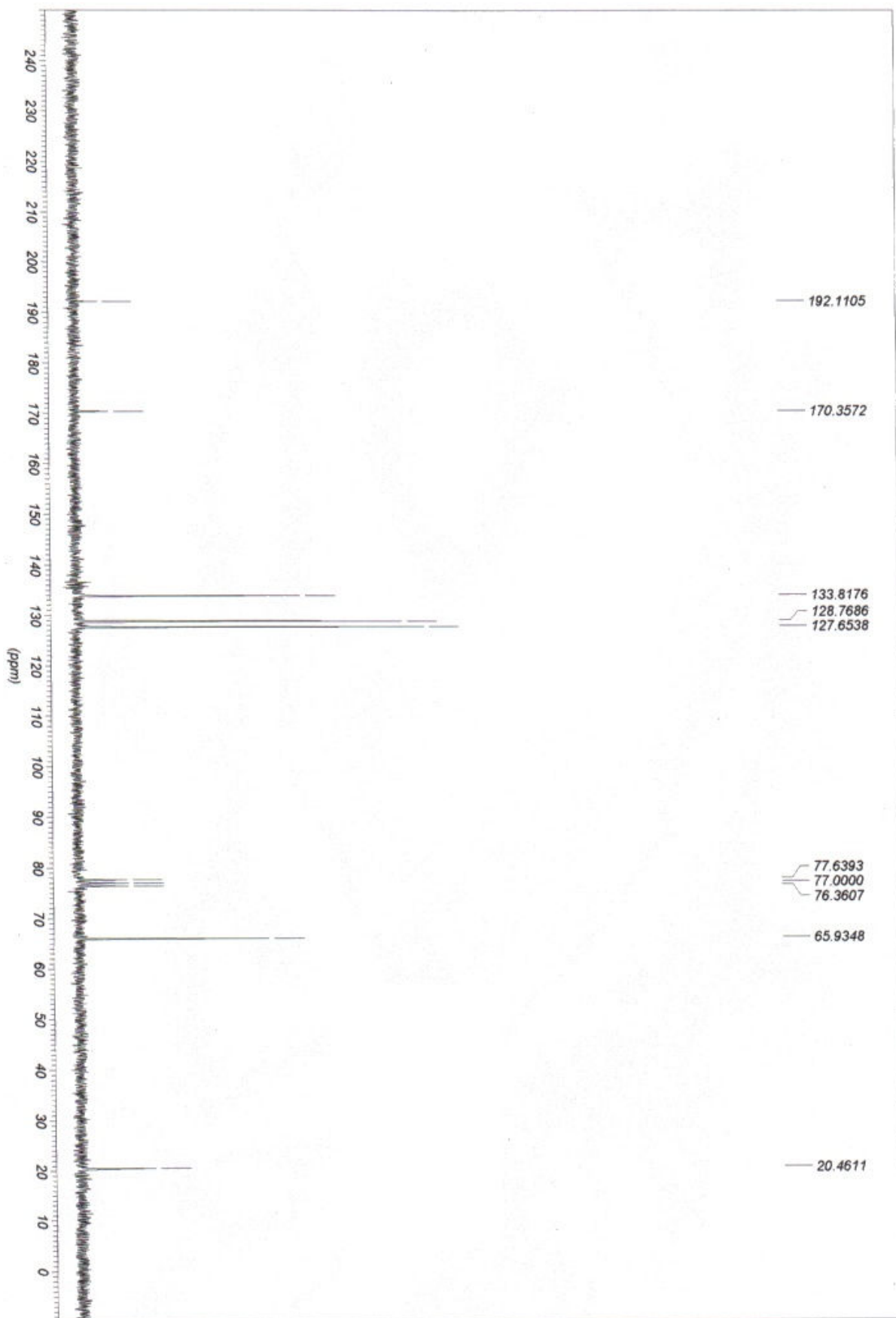


Figura 23: Espectro de IV referente a (3a)

Figura 24: Espectro de ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) referente a (4a)

Figura 25: Espectro de ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) referente a (5a)

Figura 26: Espectro de ^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3) referente a (5a)

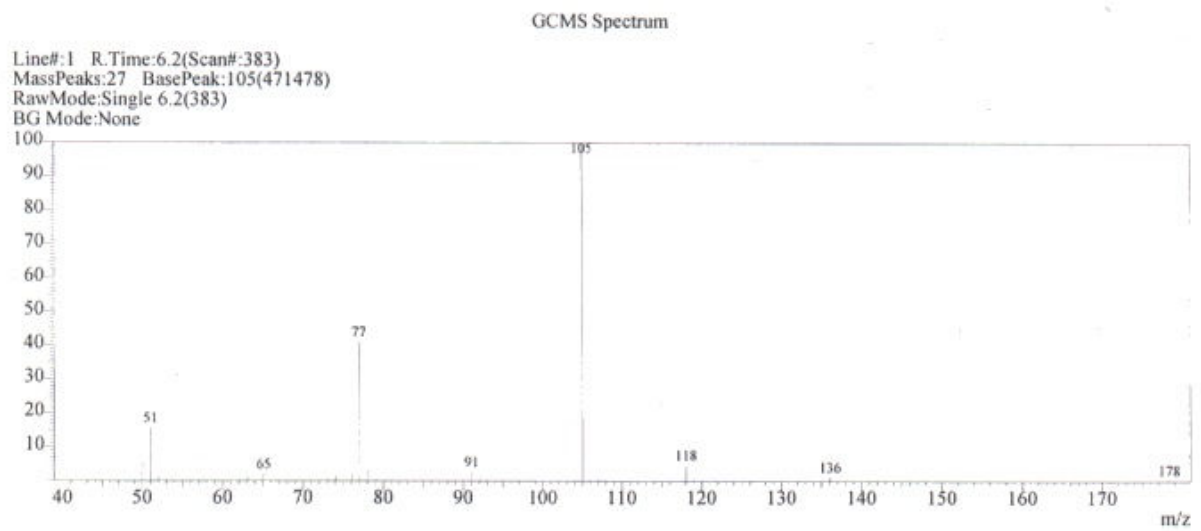
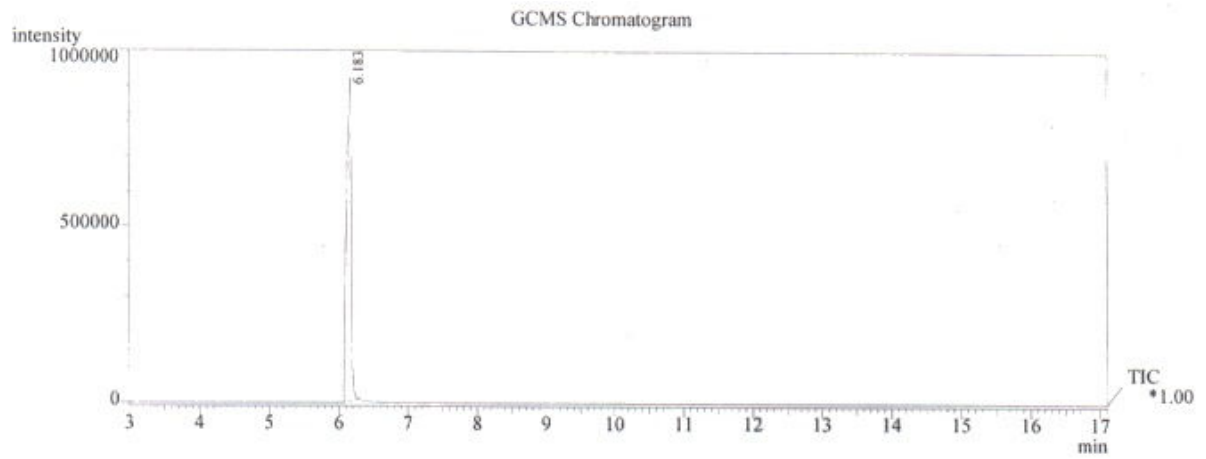


Figura 27: Espectro de CG/MS referente a (5a)

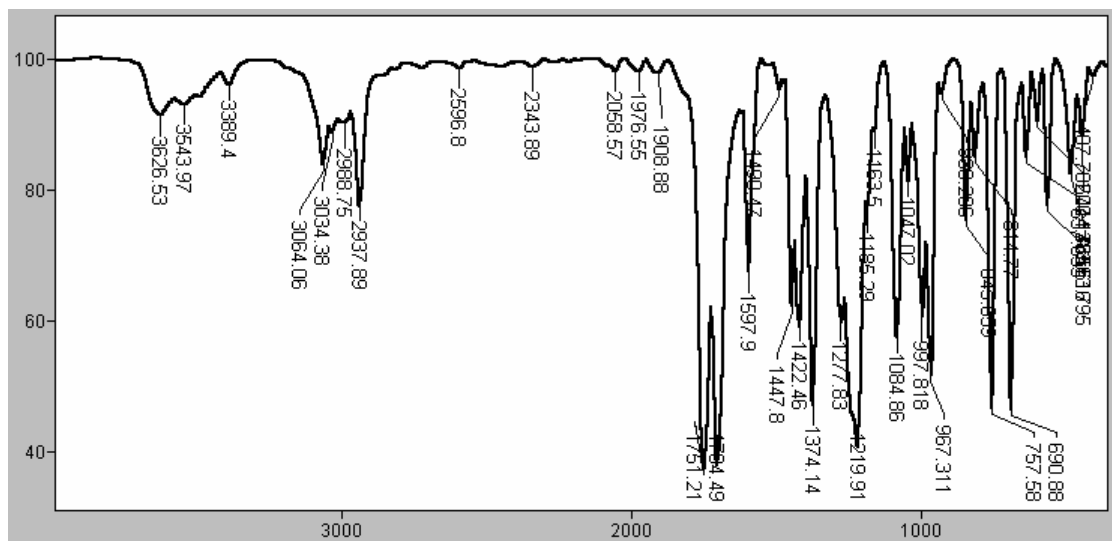


Figura 28: Espectro de IV referente a (5a)

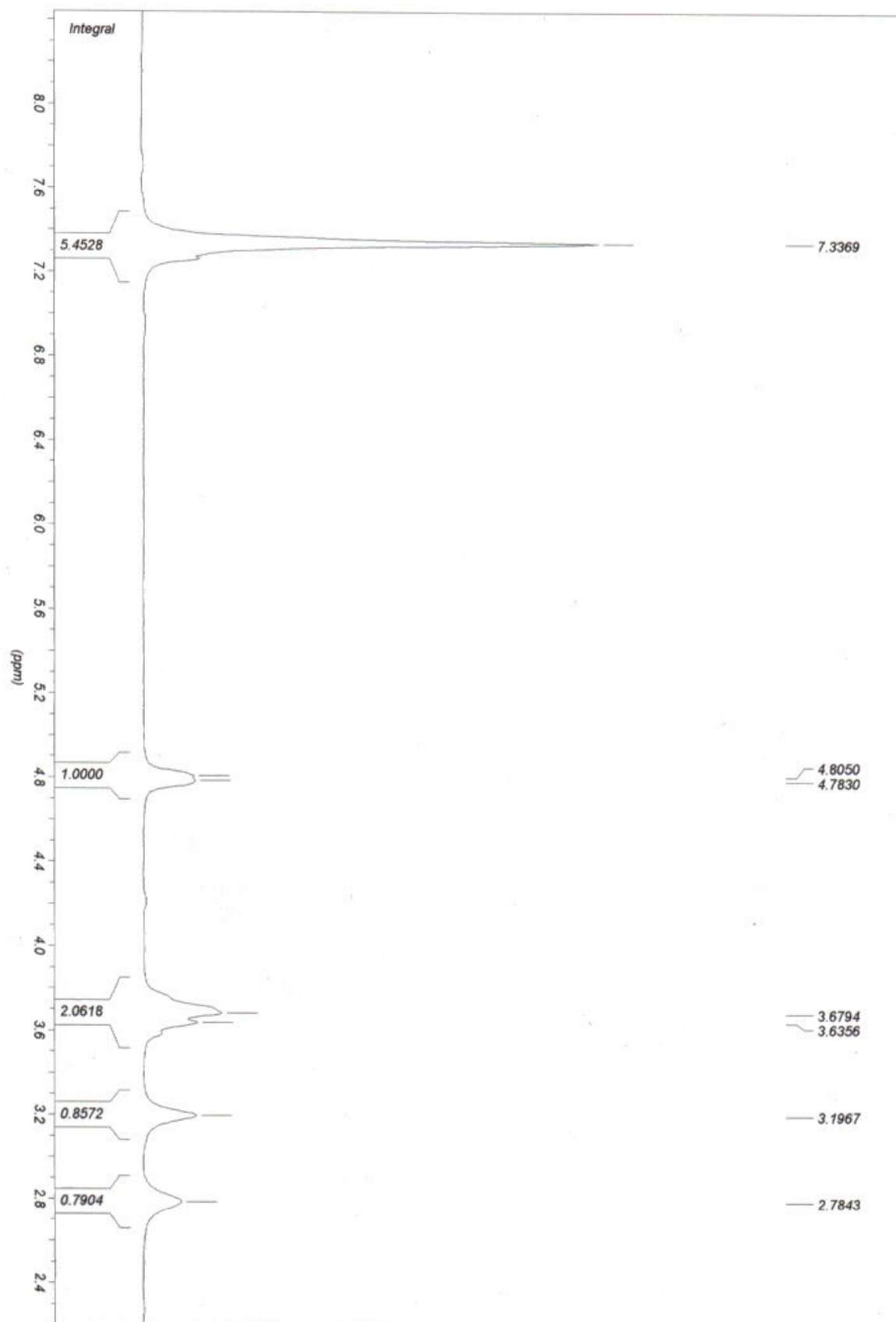


Figura 29: Espectro de ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) referente a (6a)

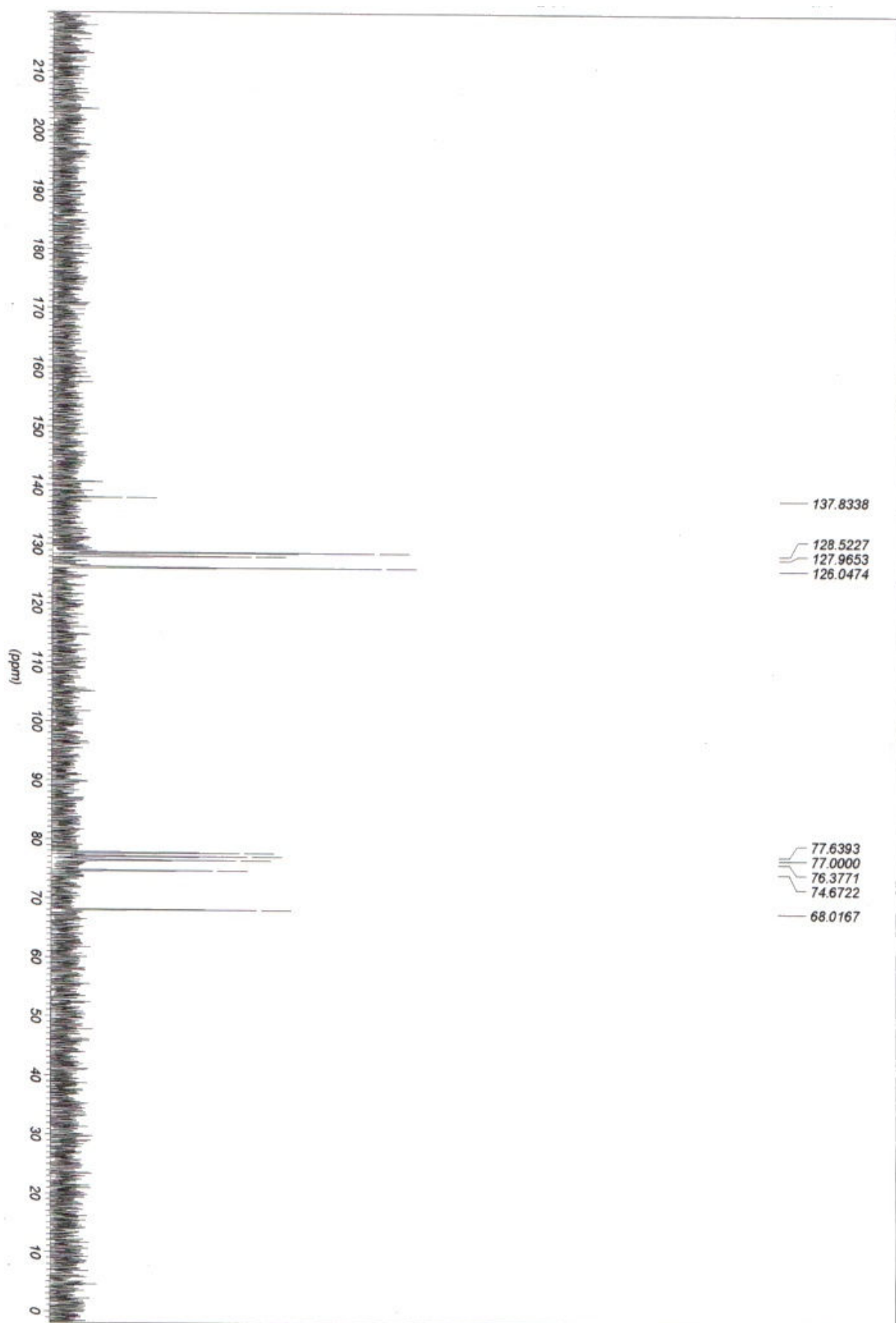


Figura 30: Espectro de ^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3) referente a (6a)

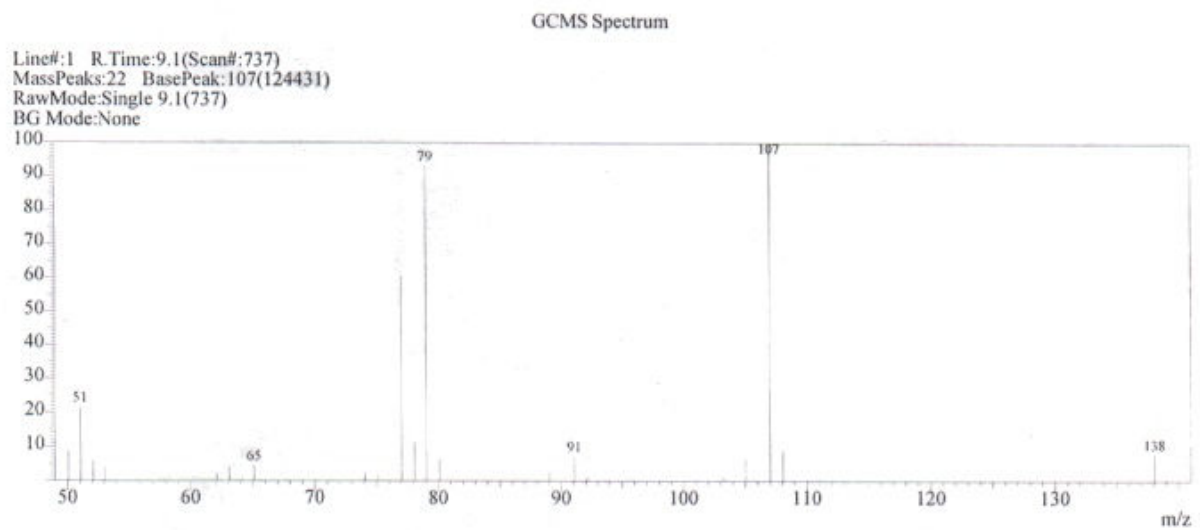
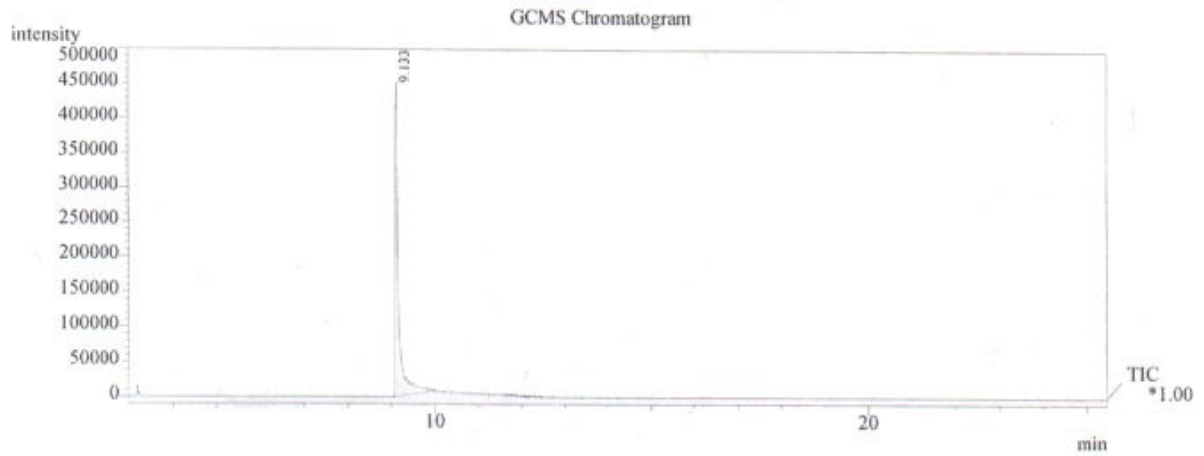


Figura 31: Espectro de CG/MS referente a (6a)

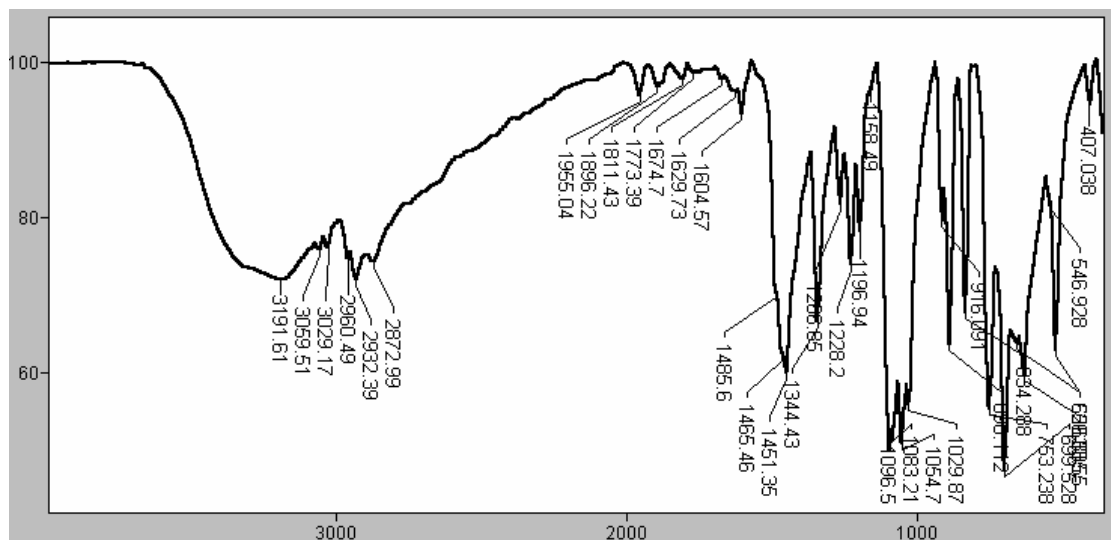


Figura 32: Espectro de IV referente a (6a)

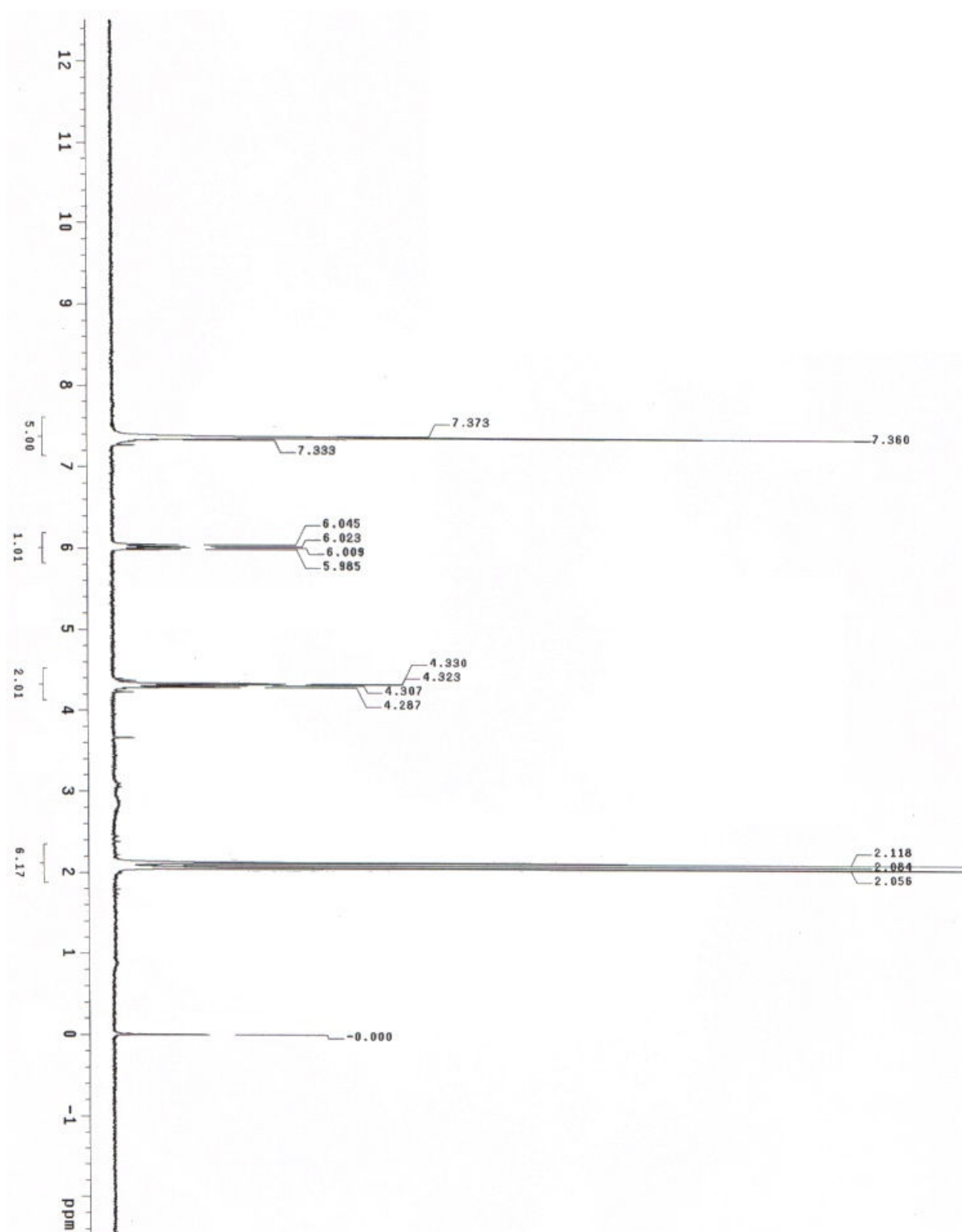


Figura 33: Espectro de ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) referente a (7a)

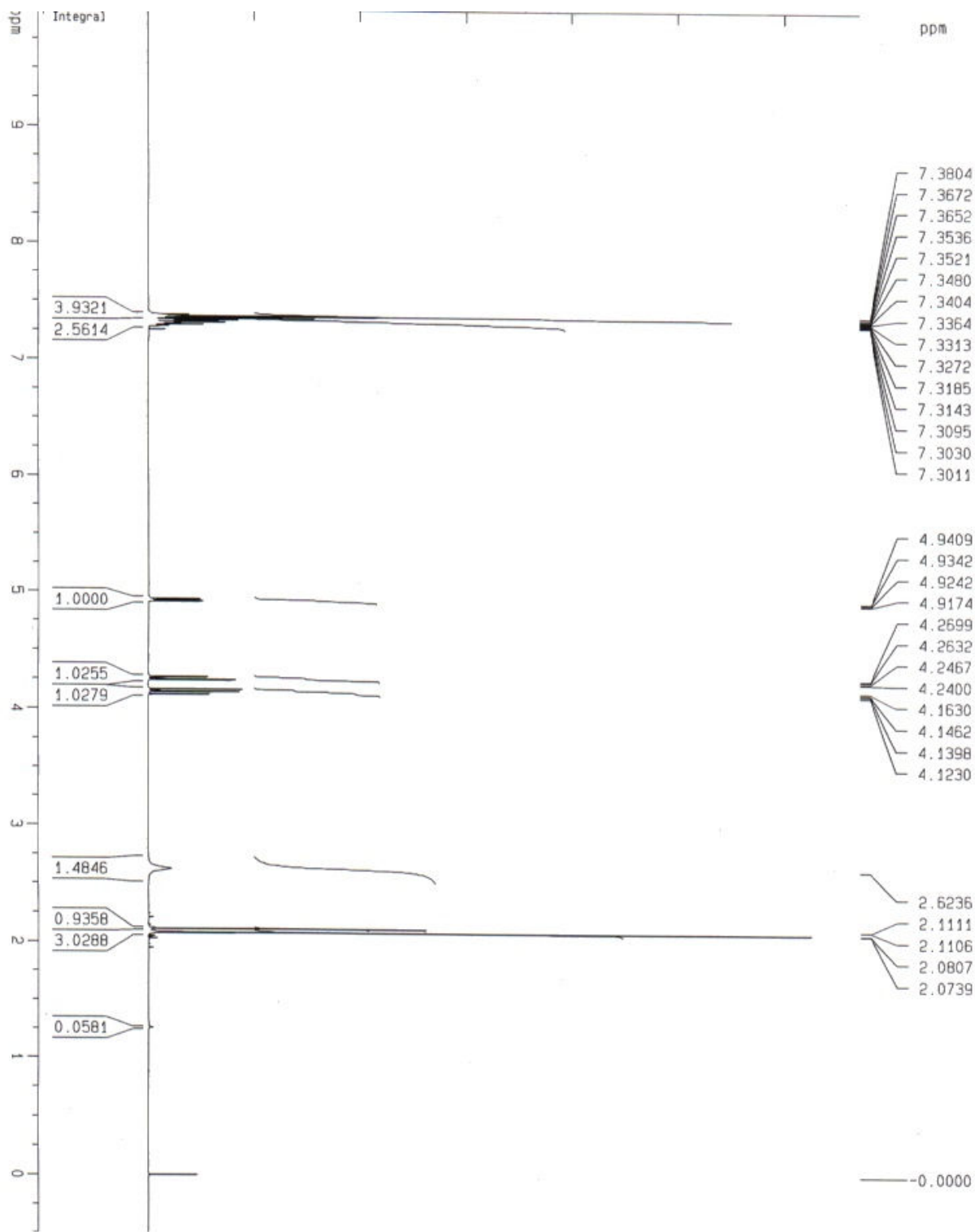


Figura 34: Espectro de ¹H RMN (200 MHz, CDCl₃) referente a (8a)

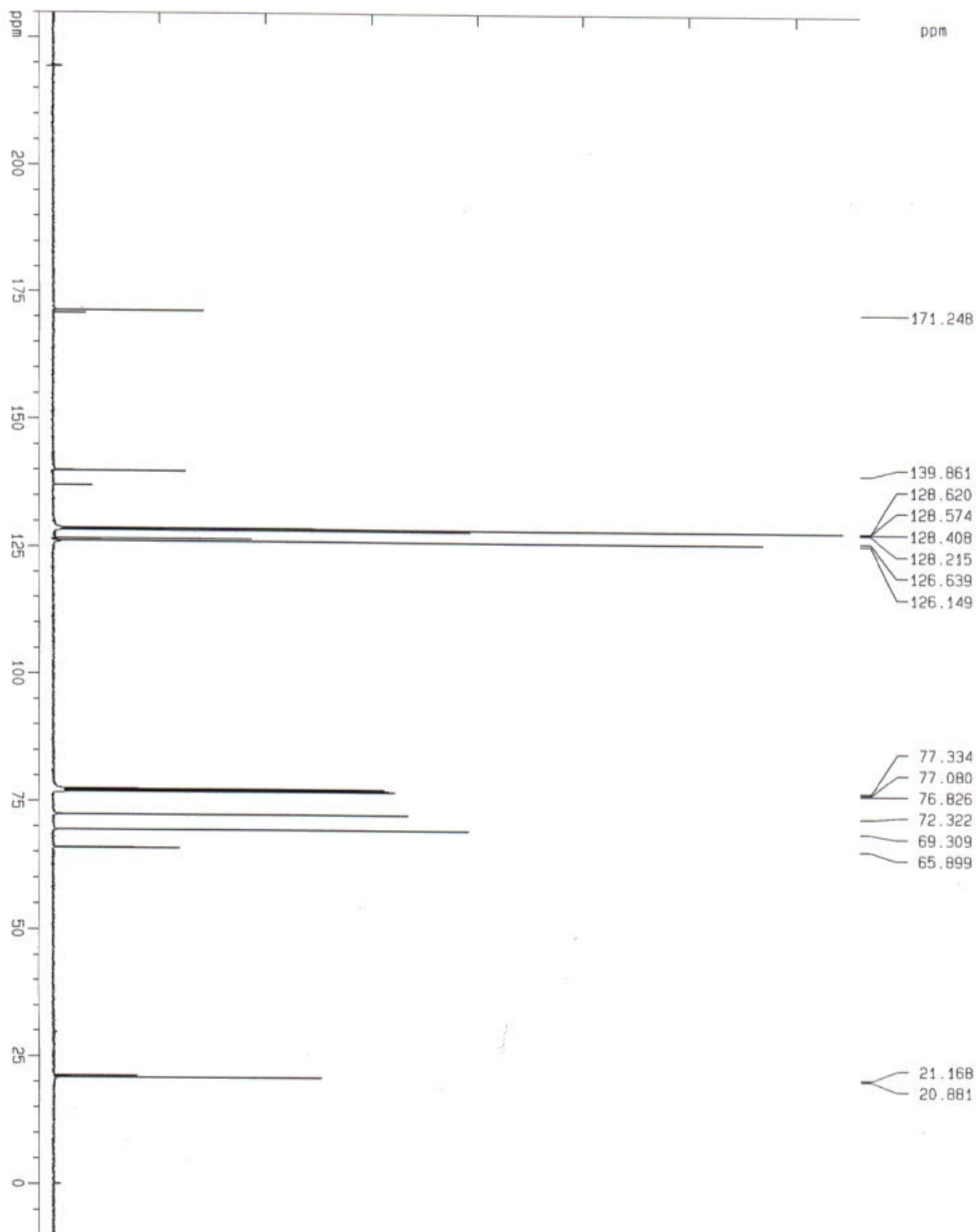


Figura 35: Espectro de ¹³C RMN (50 MHz, CDCl₃) referente a (8a)

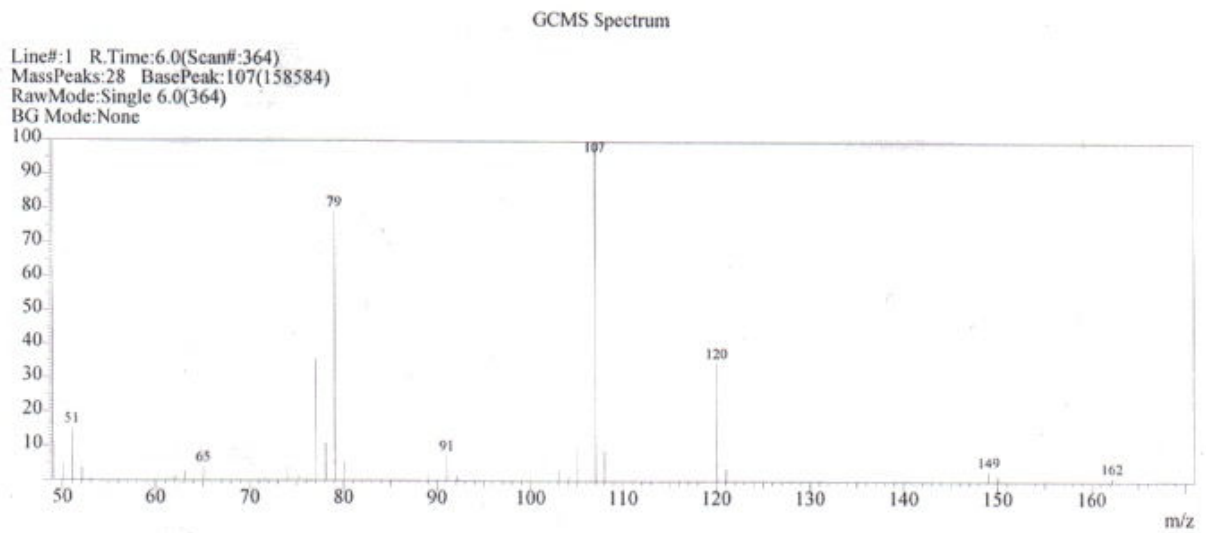
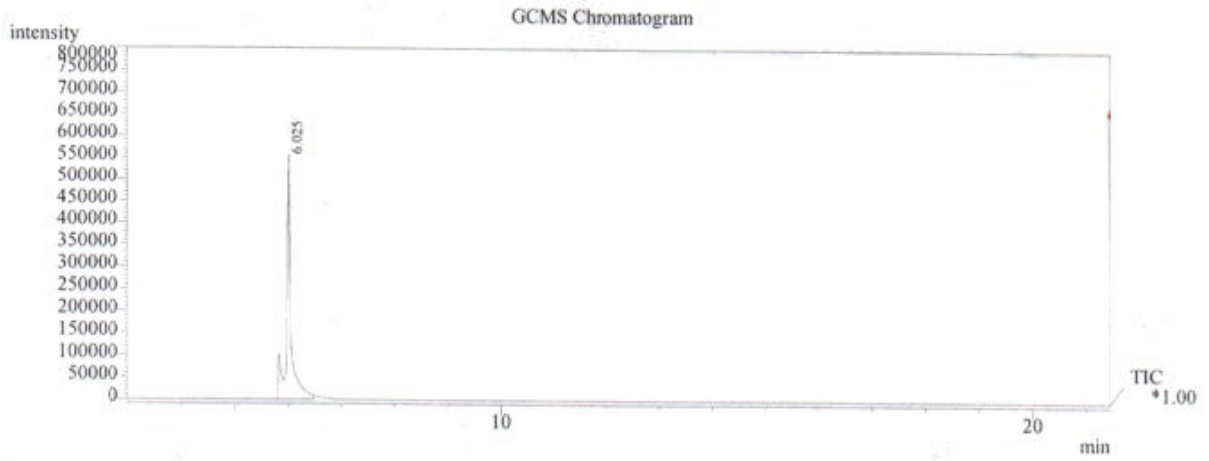


Figura 36: Espectro de CG/MS referente a (8a)

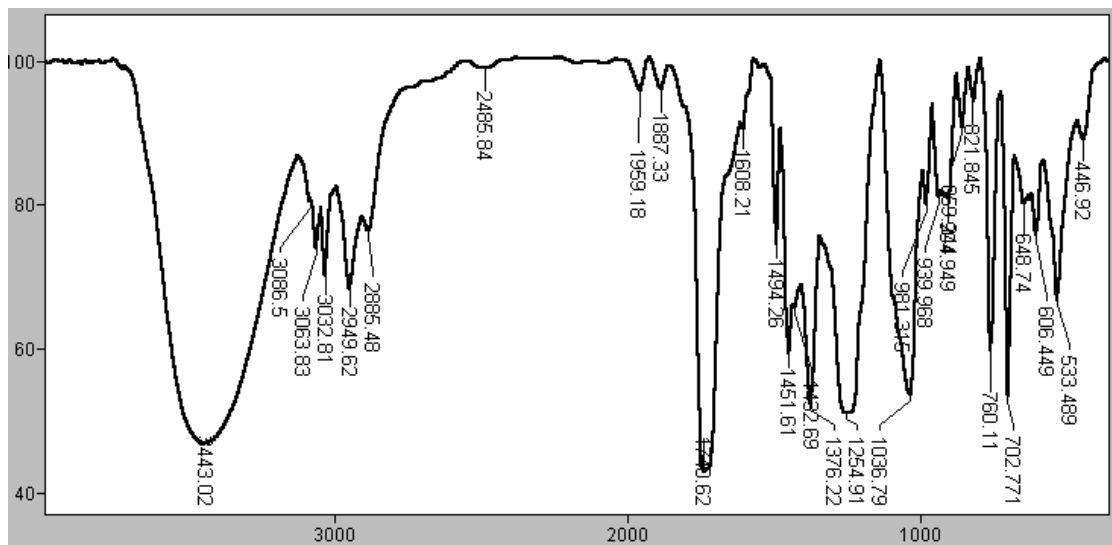


Figura 37: Espectro de IV referente a (8a)

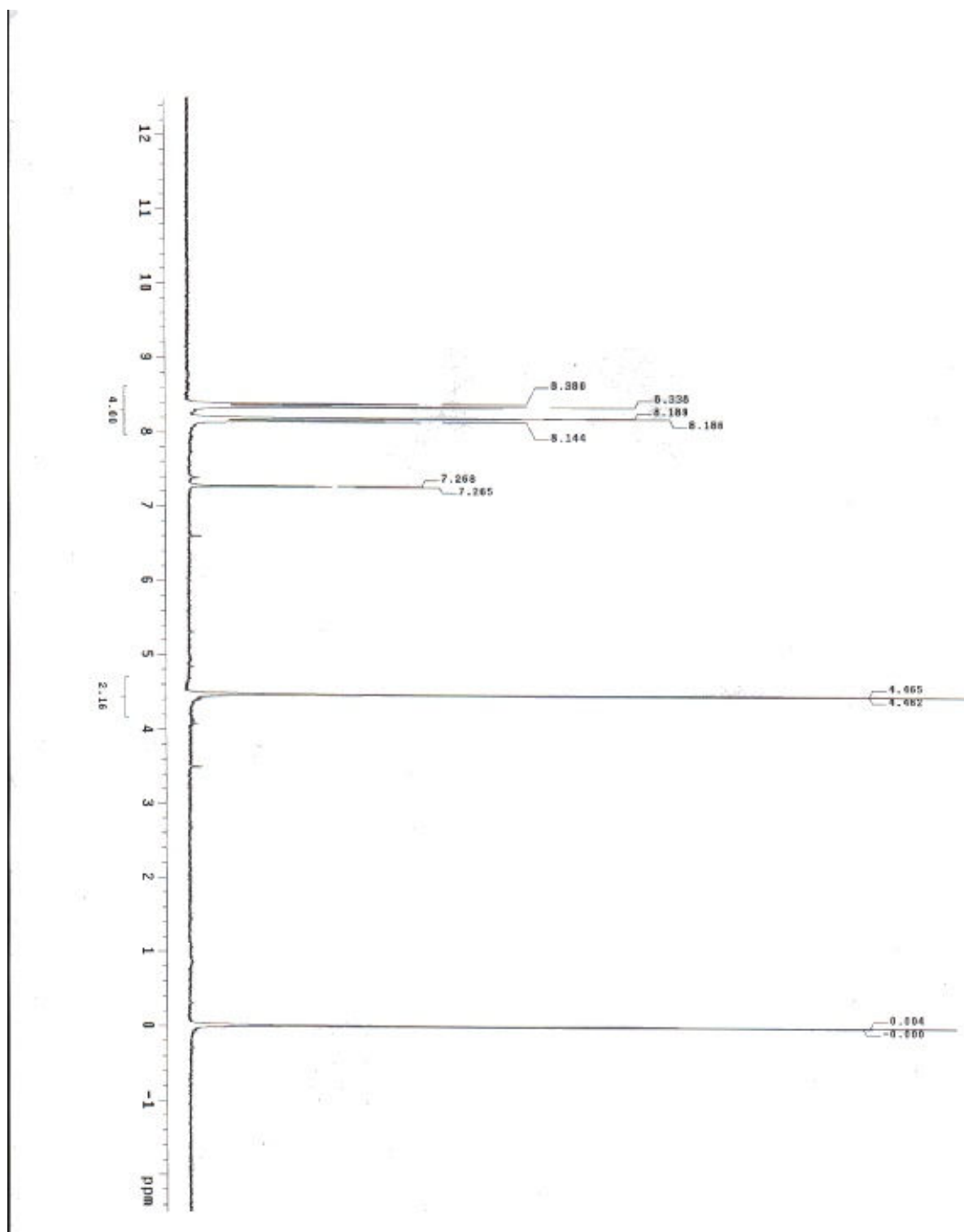


Figura 38: Espectro de ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) referente a (2b)

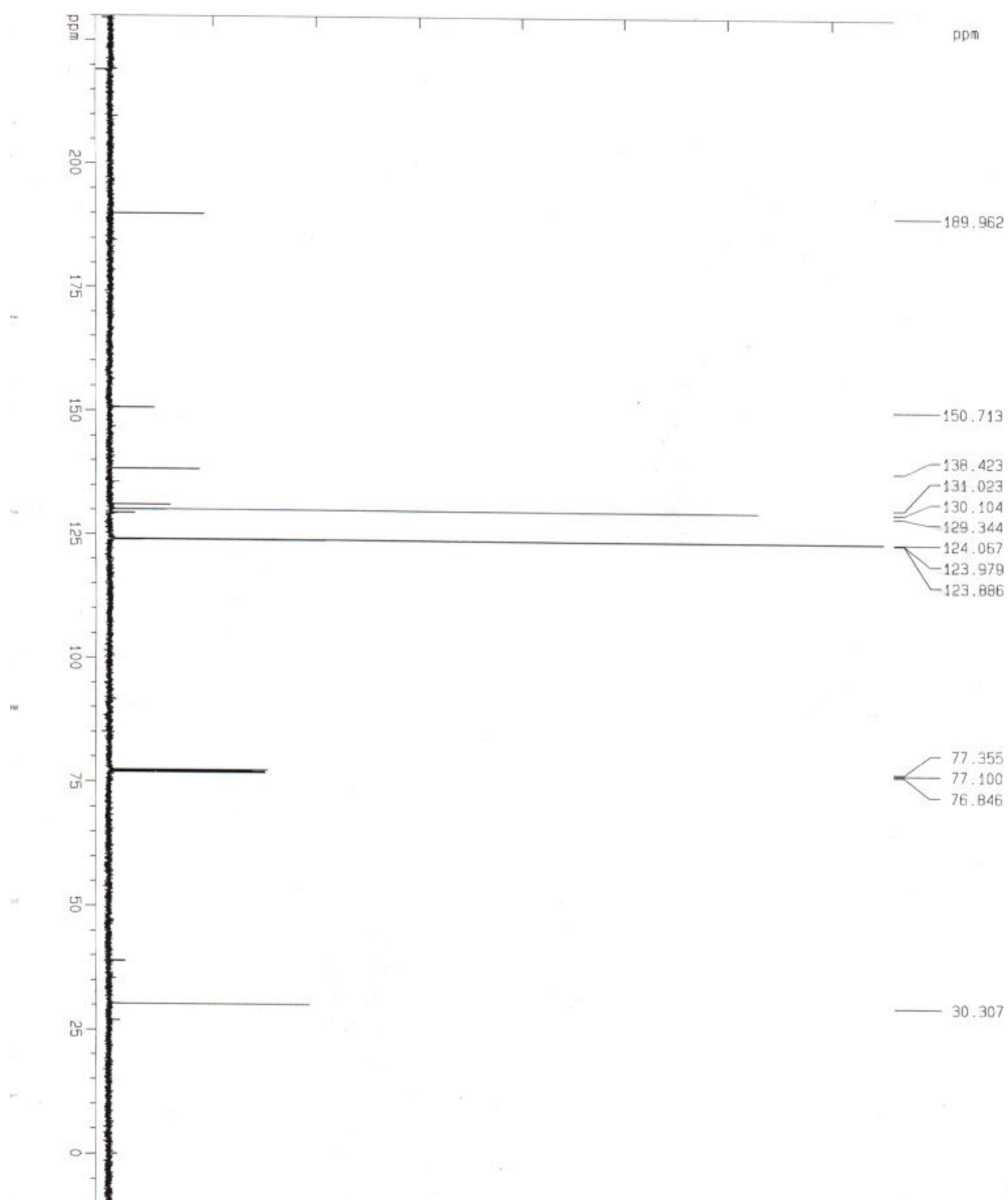


Figura 39: Espectro de ^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3) referente a (2b)

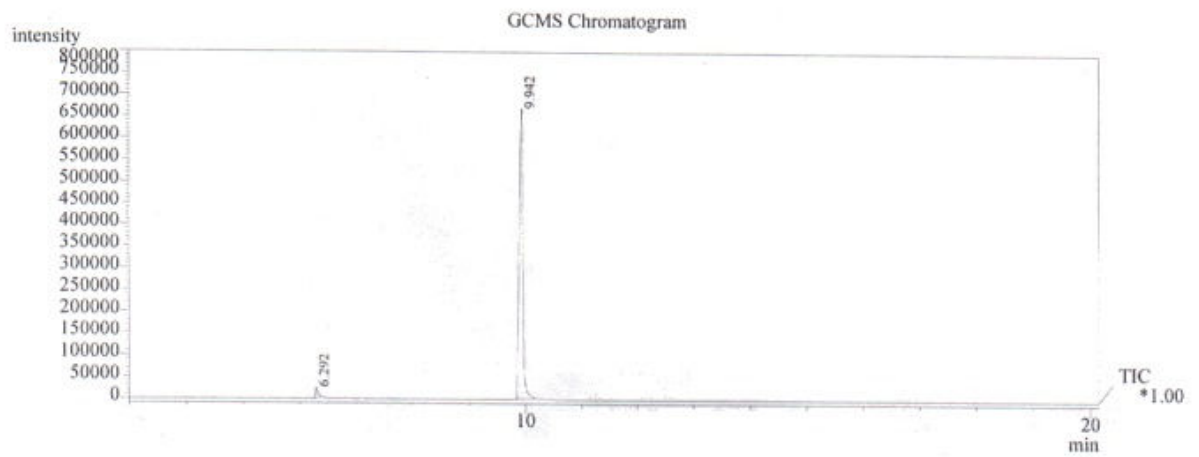


Figura 40: Espectro de CG/MS referente a (2b)

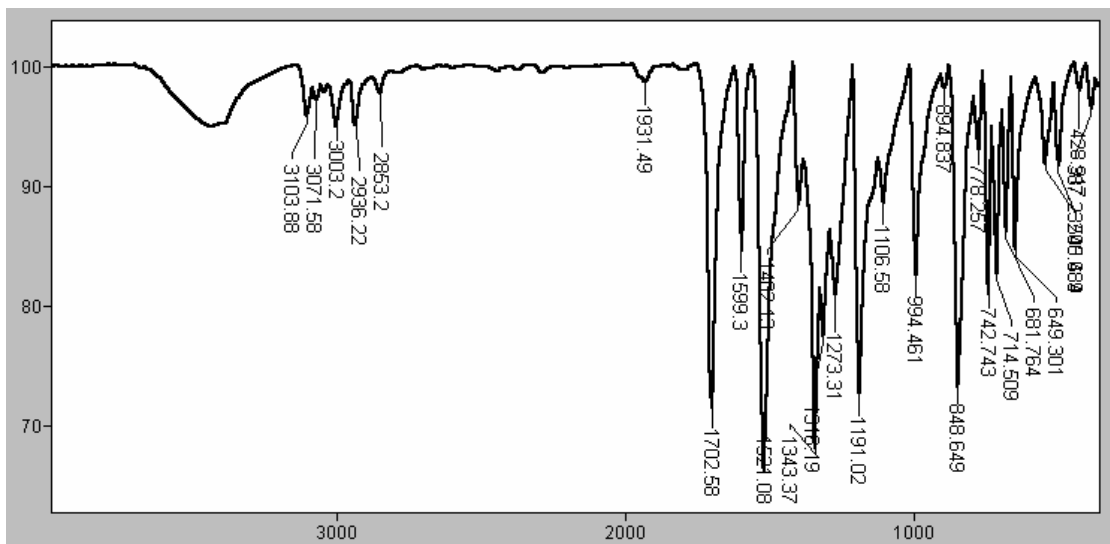


Figura 41: Espectro de IV referente a (2b)

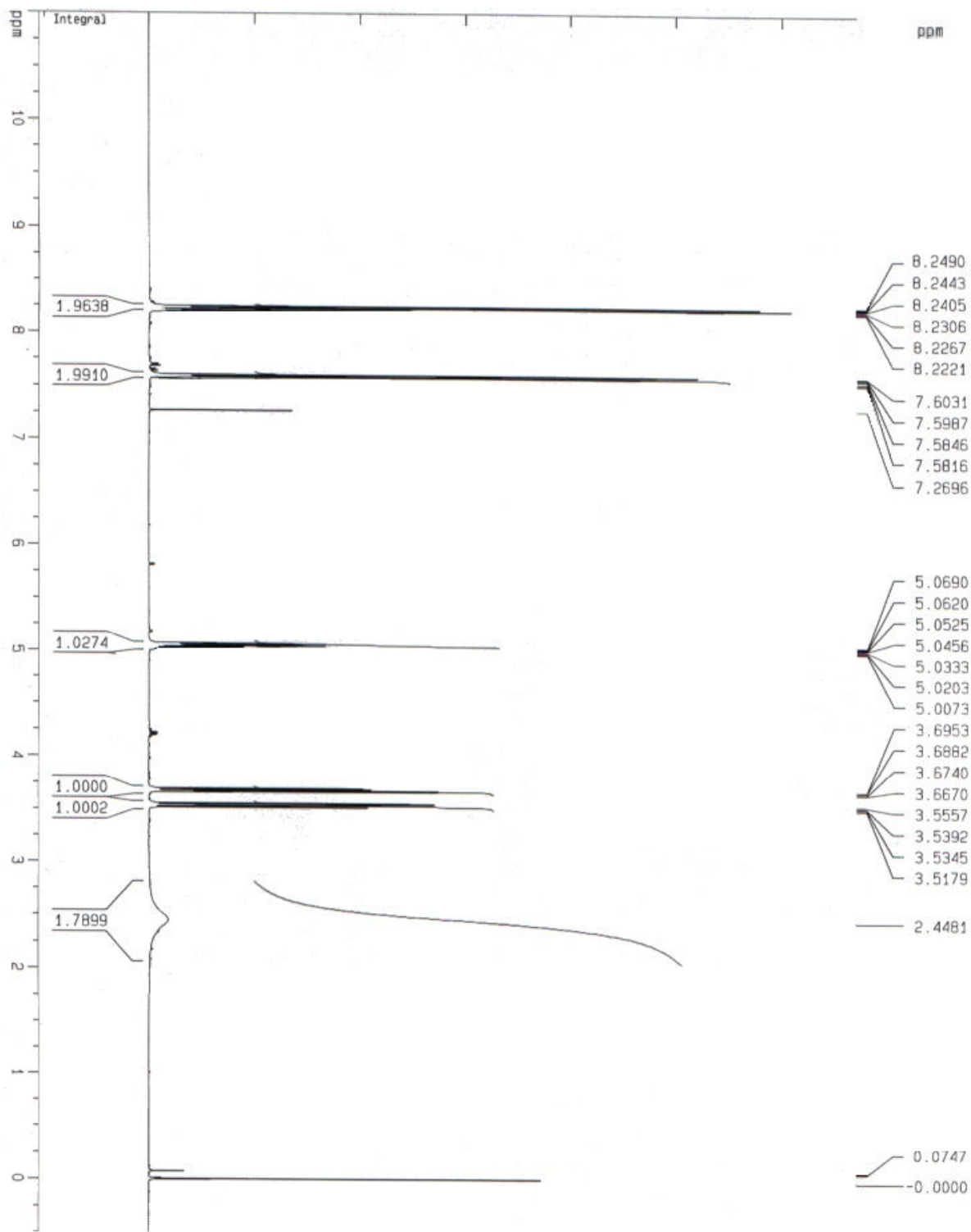


Figura 42: Espectro de ¹H RMN (200 MHz, CDCl₃) referente a (3b)

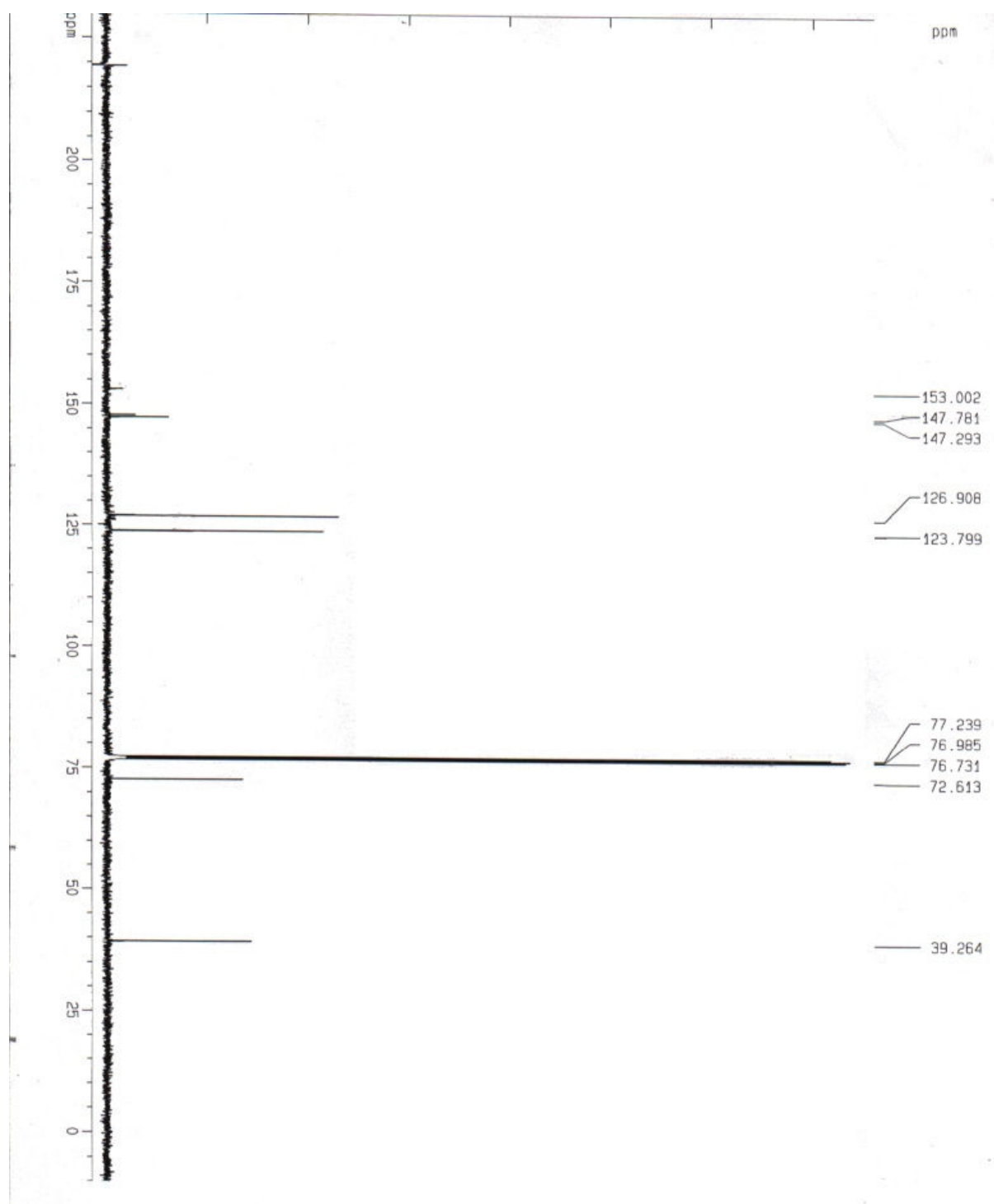
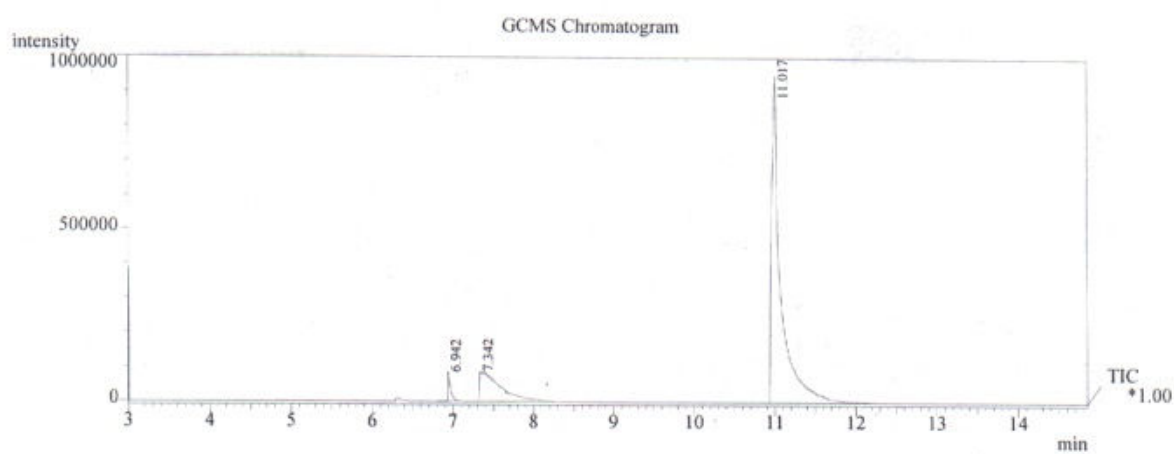


Figura 43: Espectro de ^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3) referente a (3b)



Line#:1 R.Time:11.0(Scan#:963)
MassPeaks:53 BasePeak:152(334648)
RawMode:Single 11.0(963)
BG Mode:None

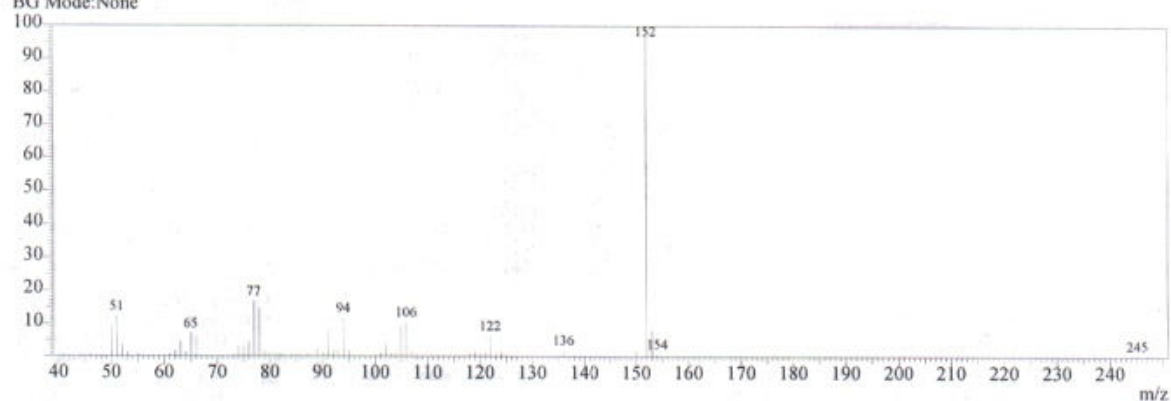


Figura 44: Espectro de CG/MS referente a (3b)

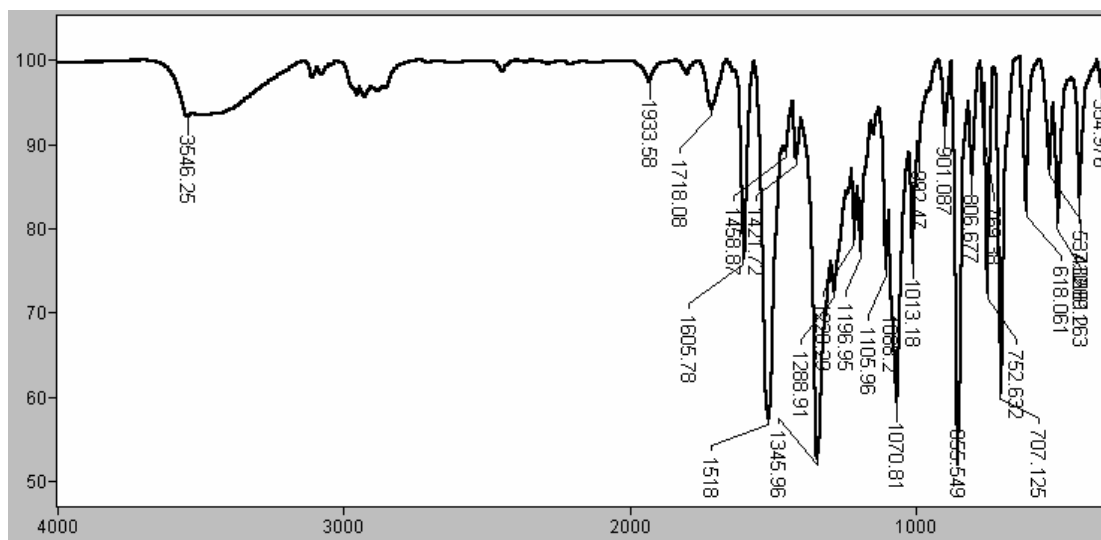


Figura 45: Espectro de IV referente a (3b)

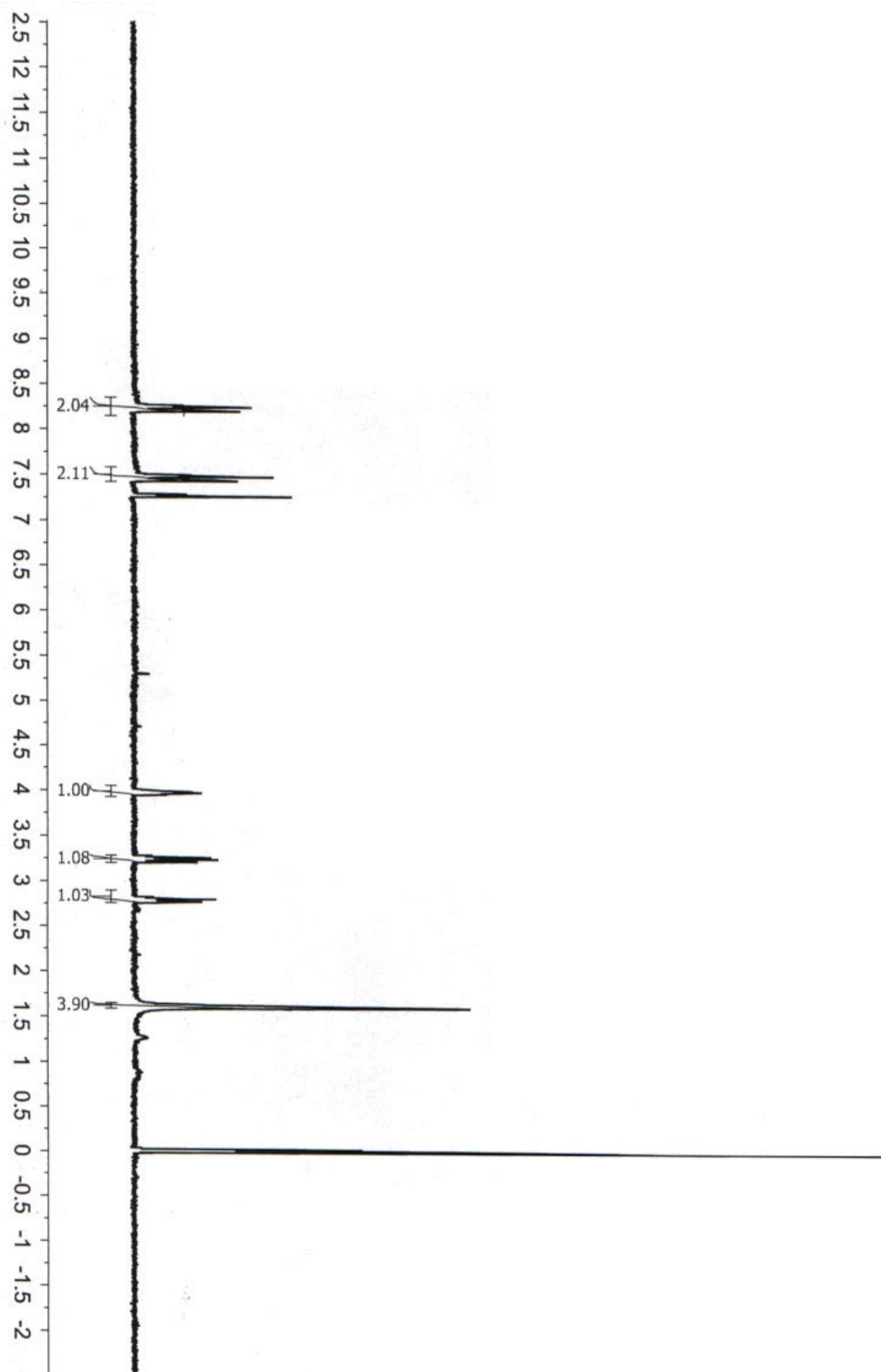
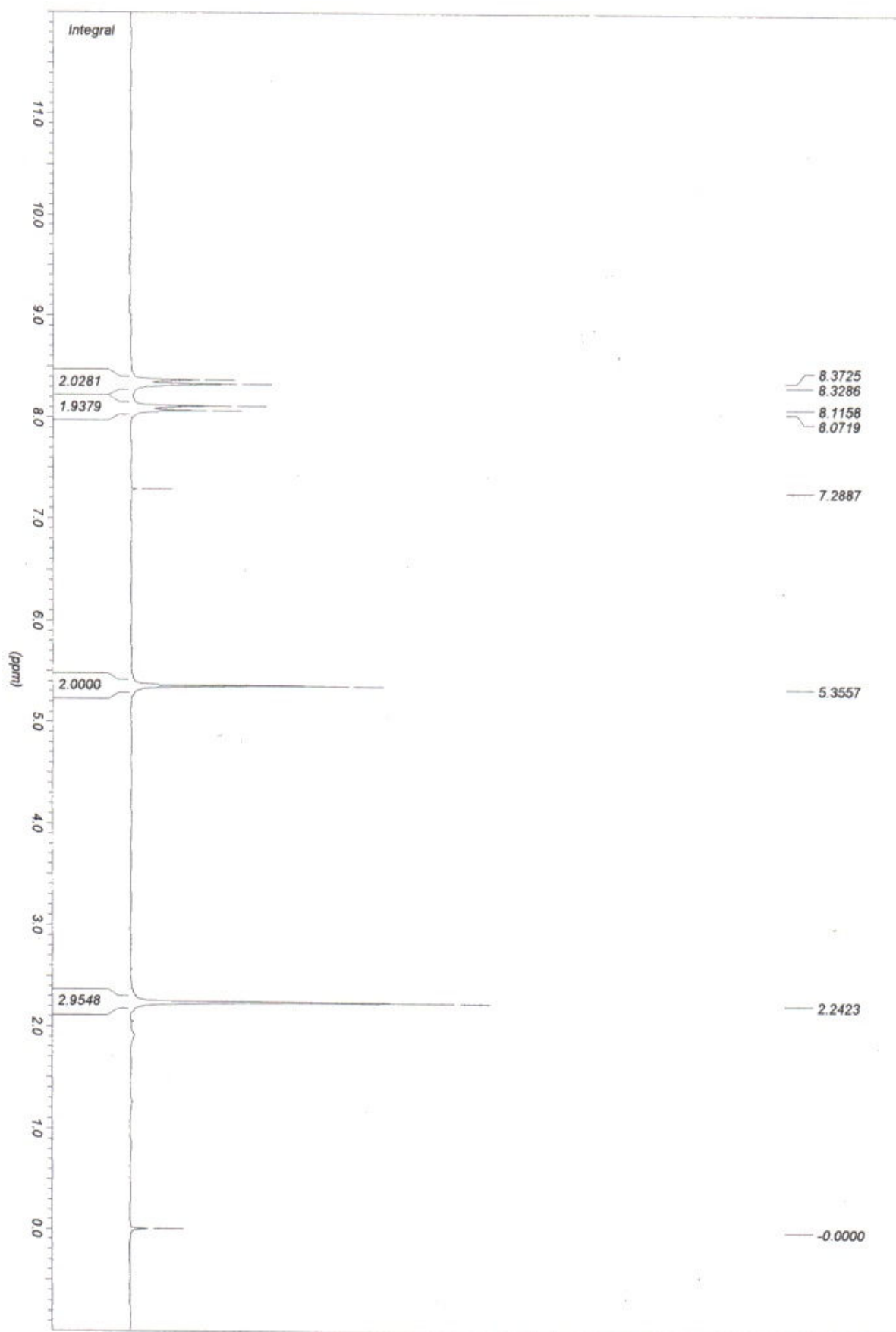
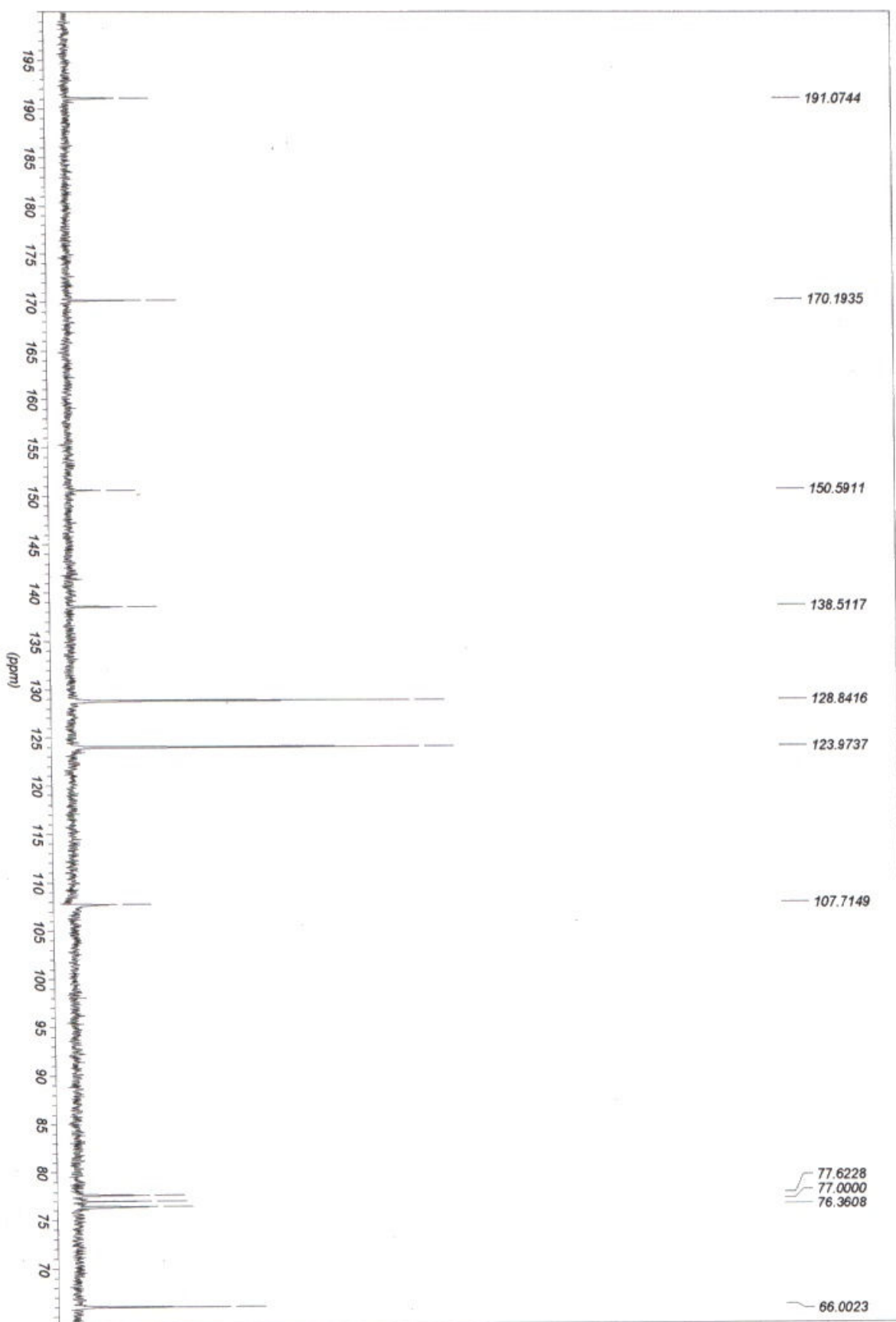
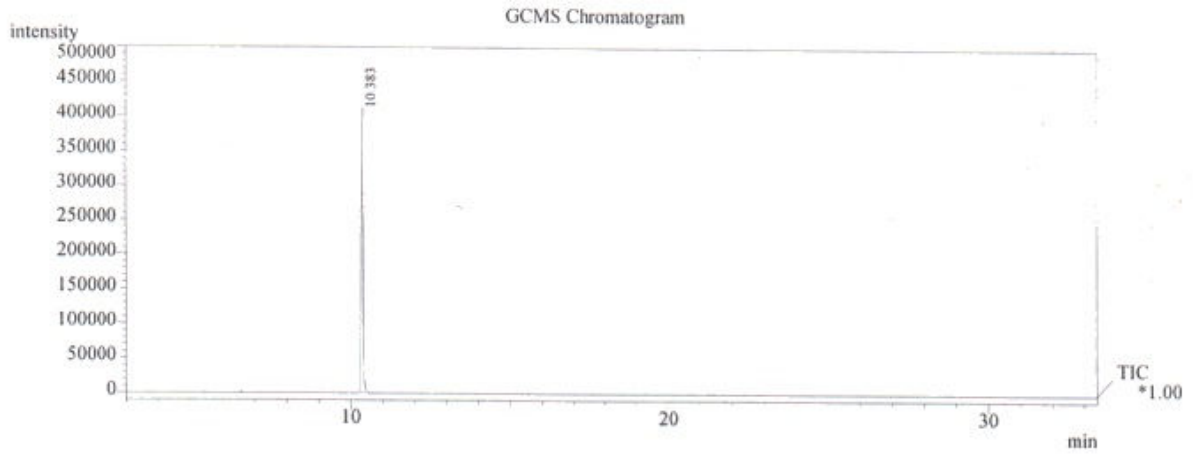


Figura 46: Espectro de ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) referente a (4b)

Figura 47: Espectro de ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) referente a (5b)

Figura 48: Espectro de ^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3) referente a (5b)



Line#:1 R.Time:10.4(Scan#:887)
MassPeaks:33 BasePeak:150(113301)
RawMode:Single 10.4(887)
BG Mode:None

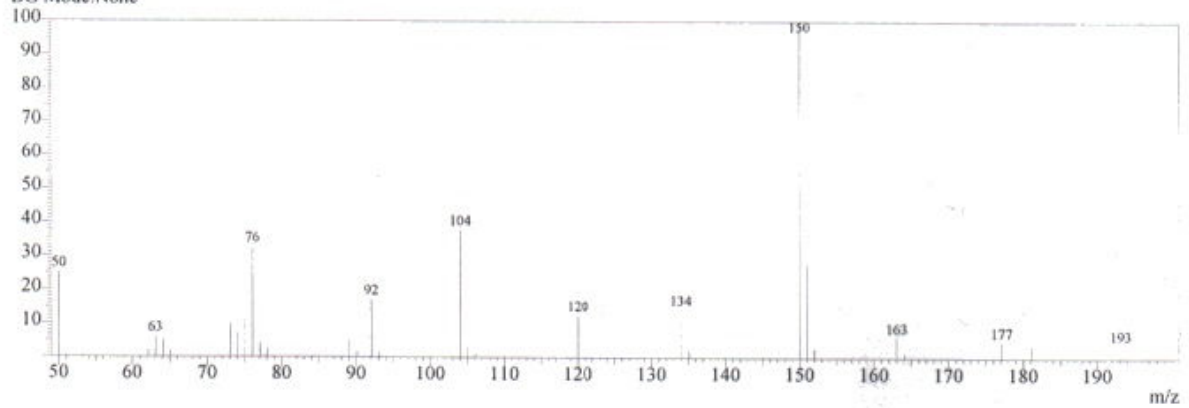


Figura 49: Espectro de CG/MS referente a (5b)

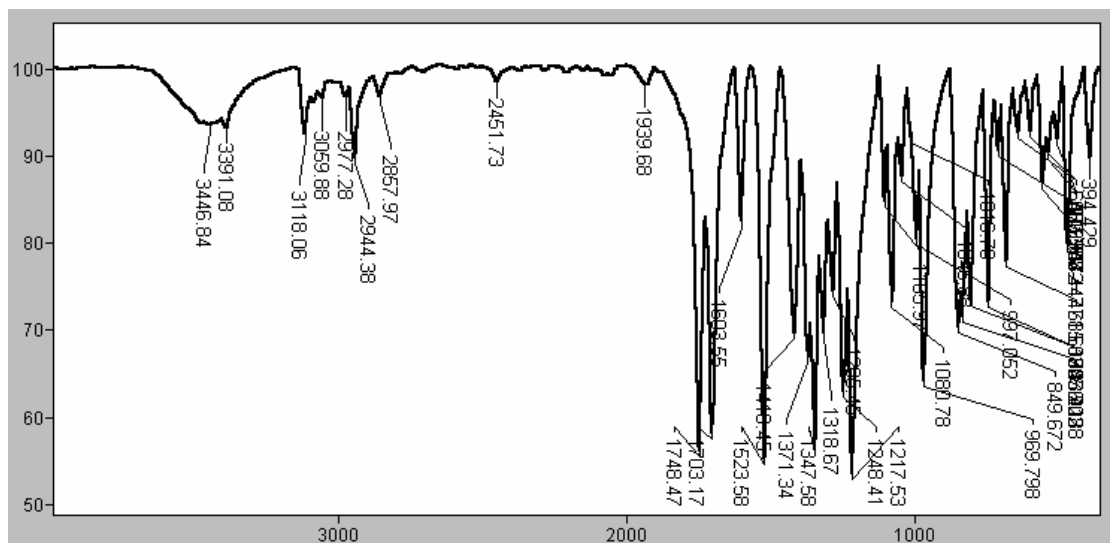


Figura 50: Espectro de IV referente a (5b)

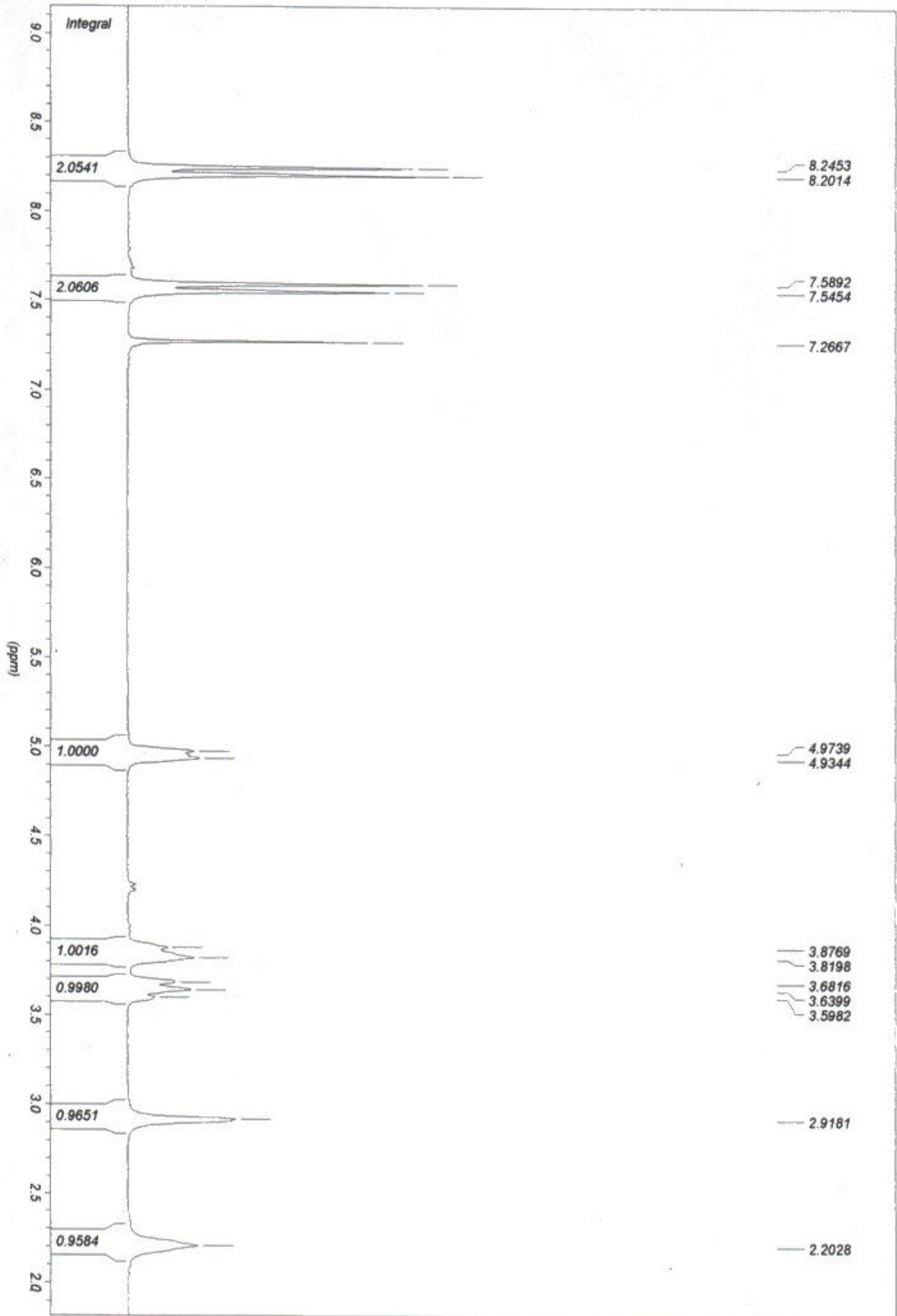


Figura 51: Espectro de ¹H RMN (200 MHz, CDCl₃) referente a (6b)

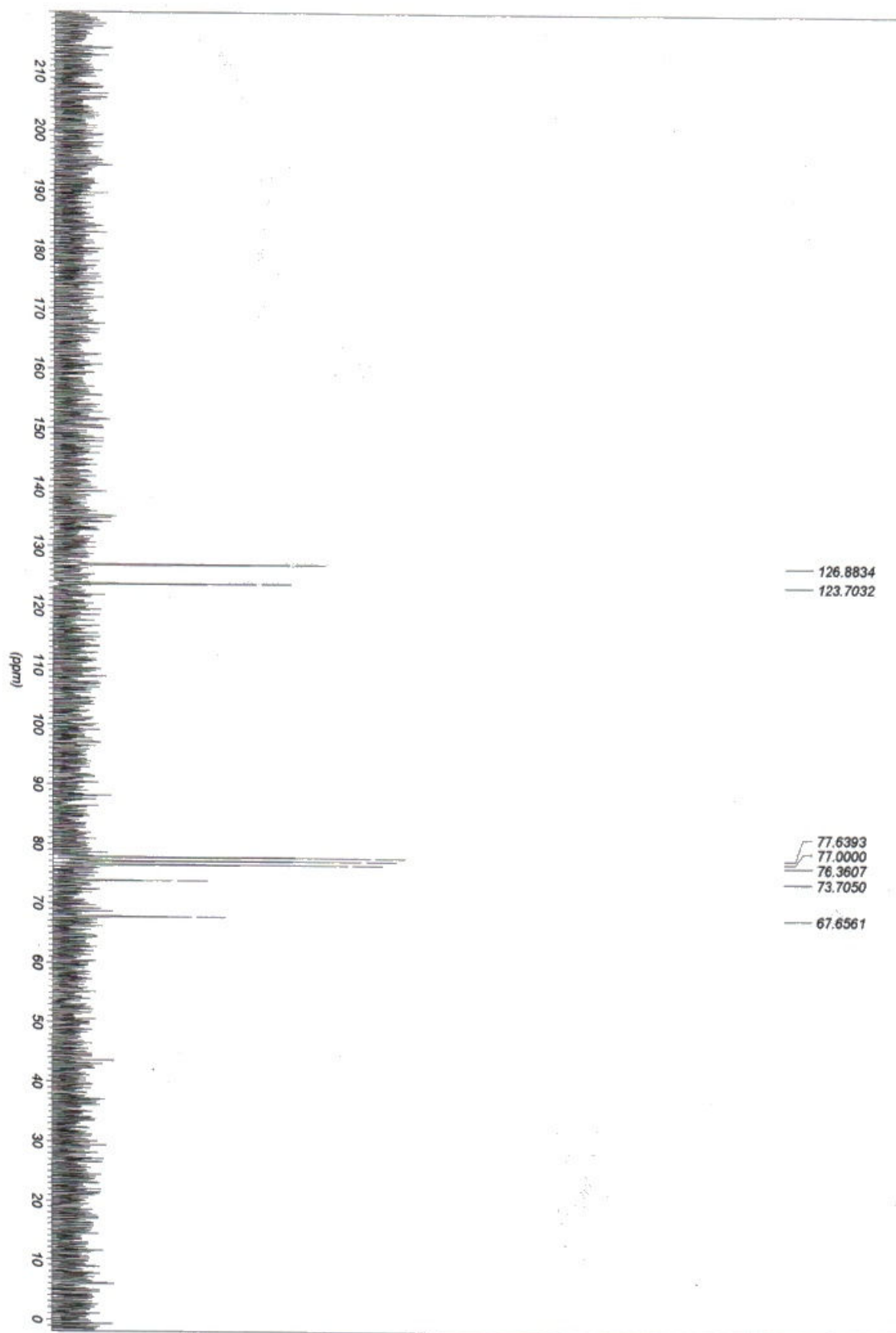
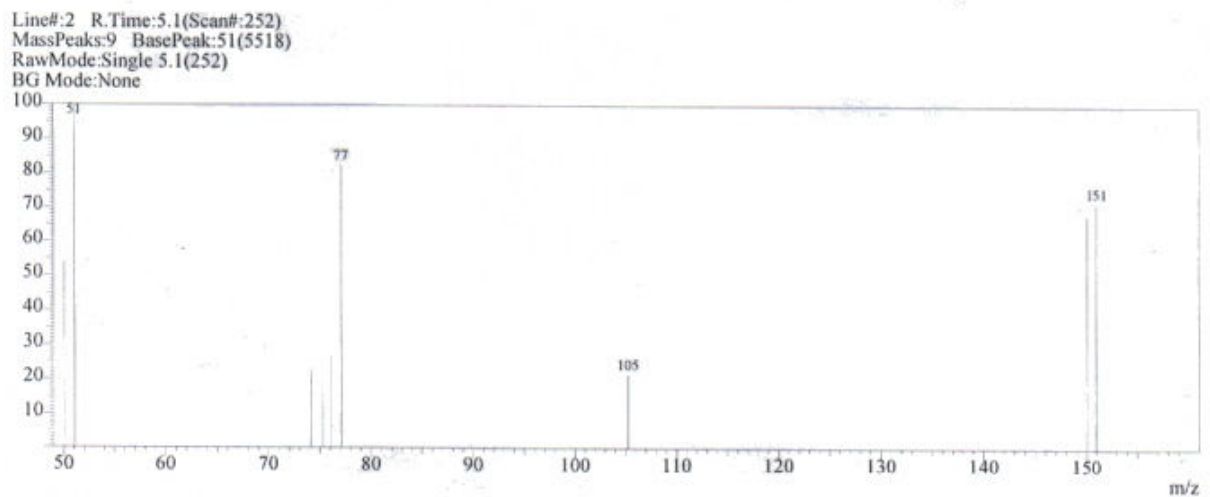
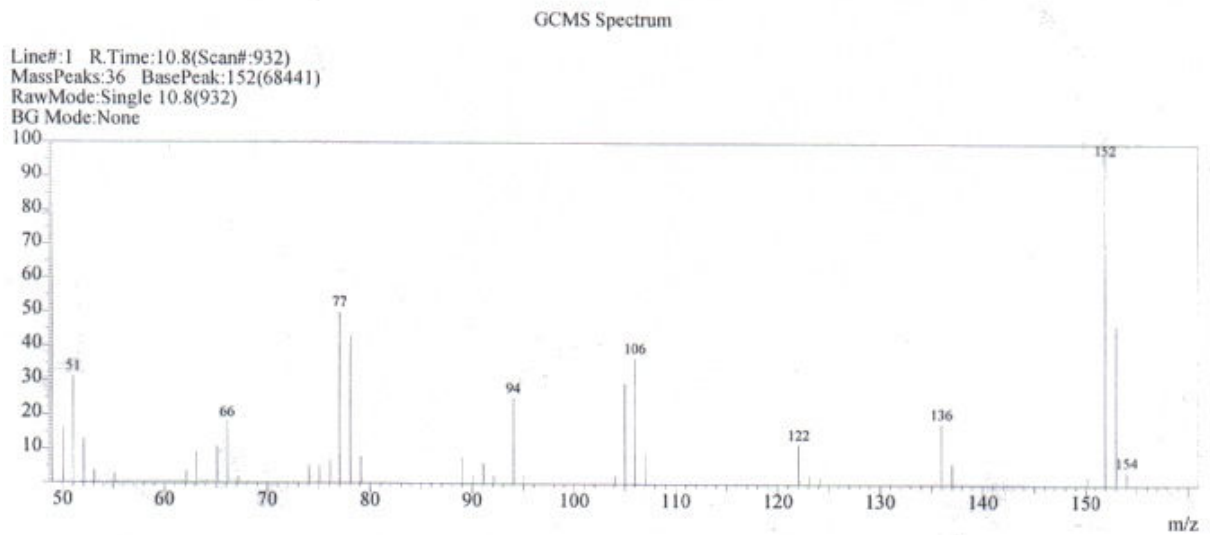
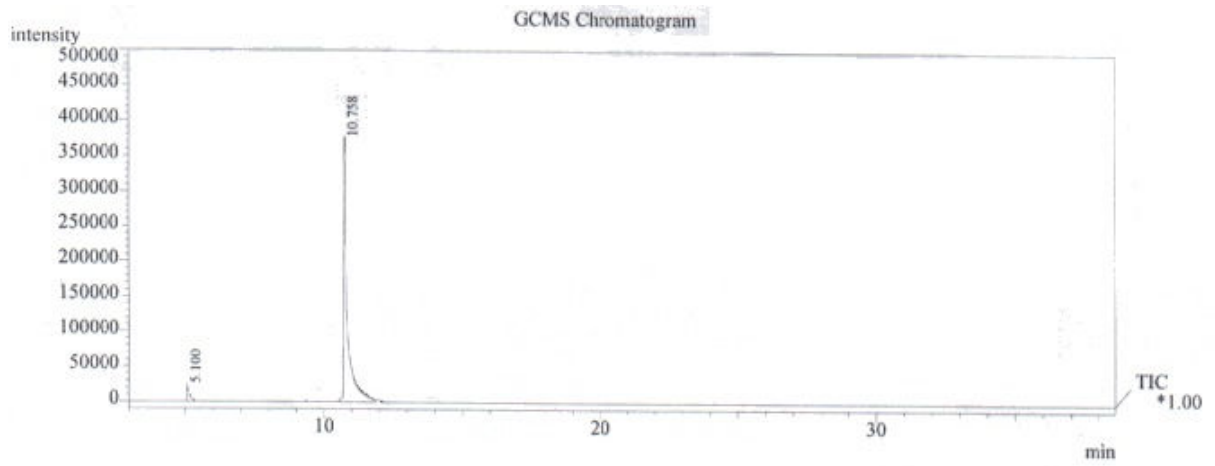


Figura 52: Espectro de ^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3) referente a (6b)



GCMS Mass Table
Line#:1 R.Time:10.8(Scan#:932)
MassPeaks:36 BasePeak:152(68441)
RawMode:Single 10.8(932)
BG Mode:None

Figura 53: Espectro de CG/MS referente a (6b)

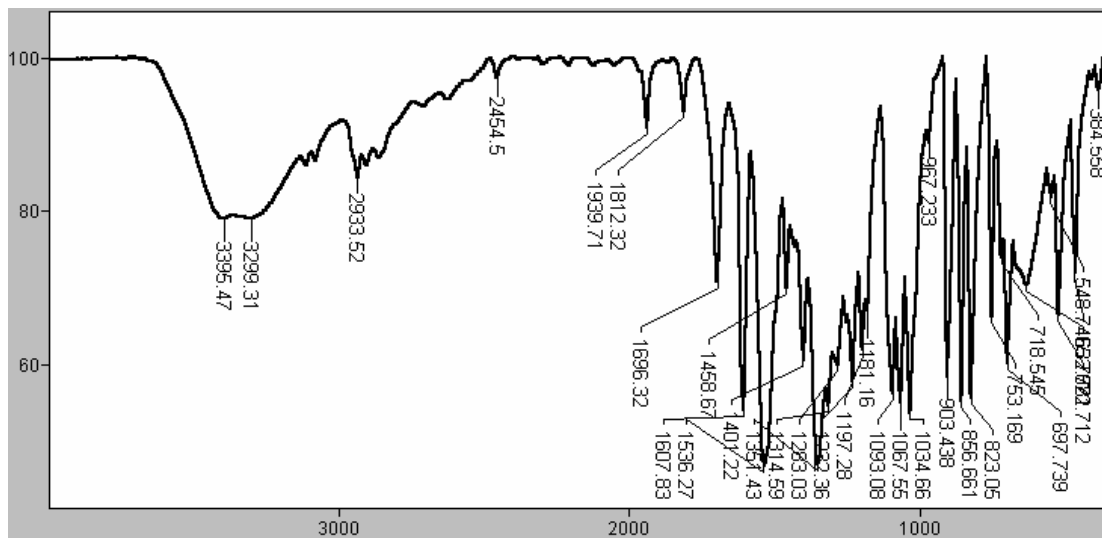
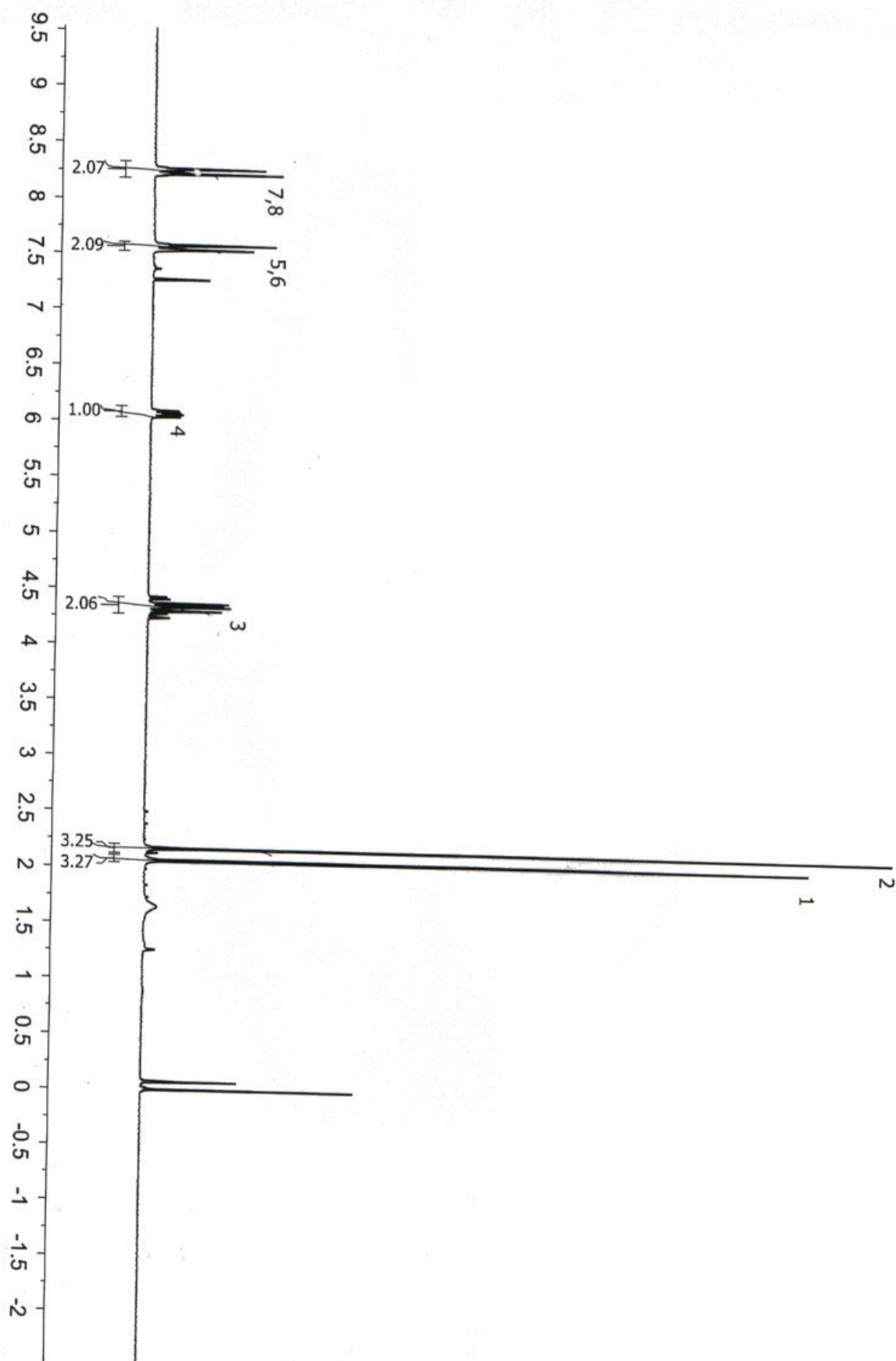
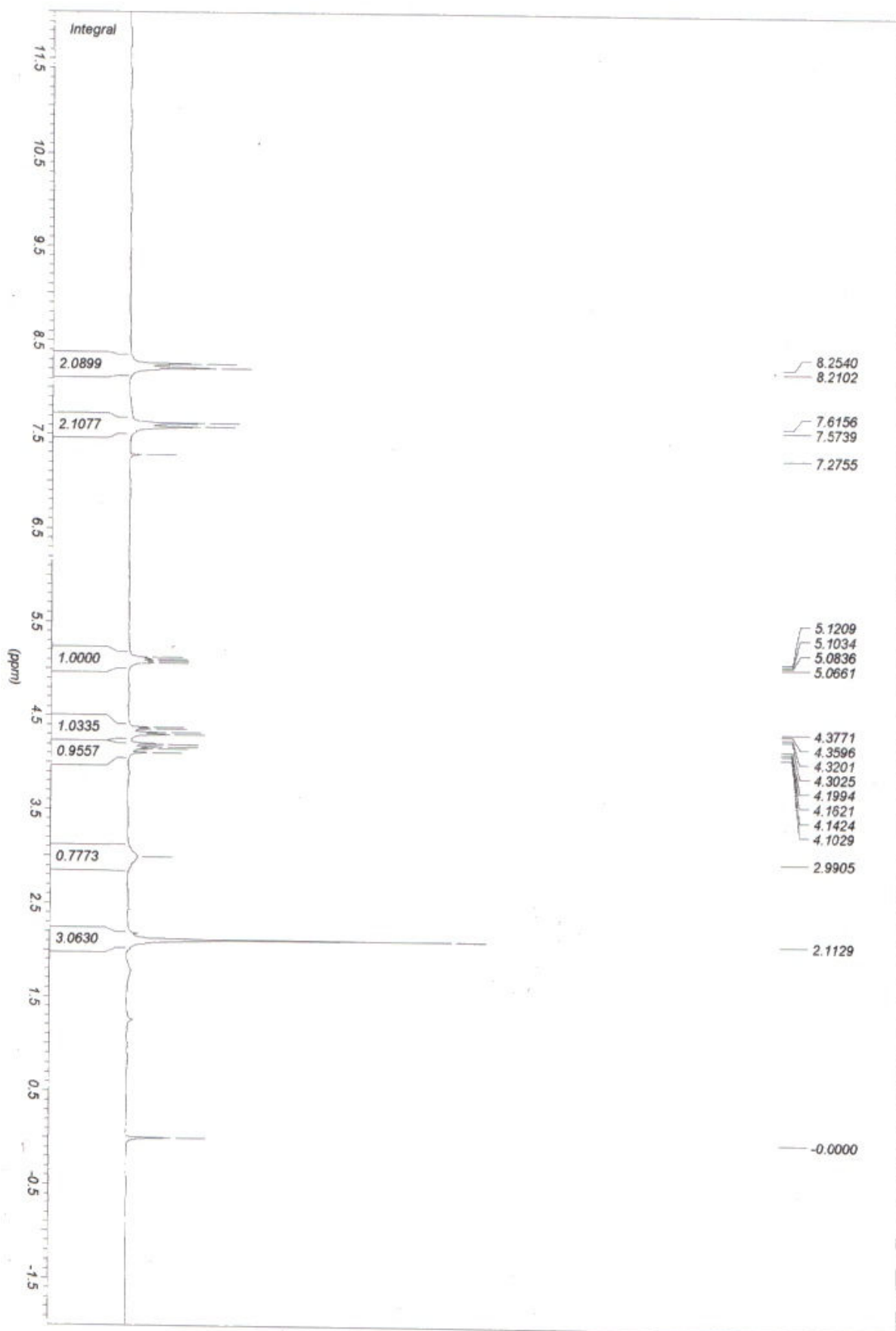
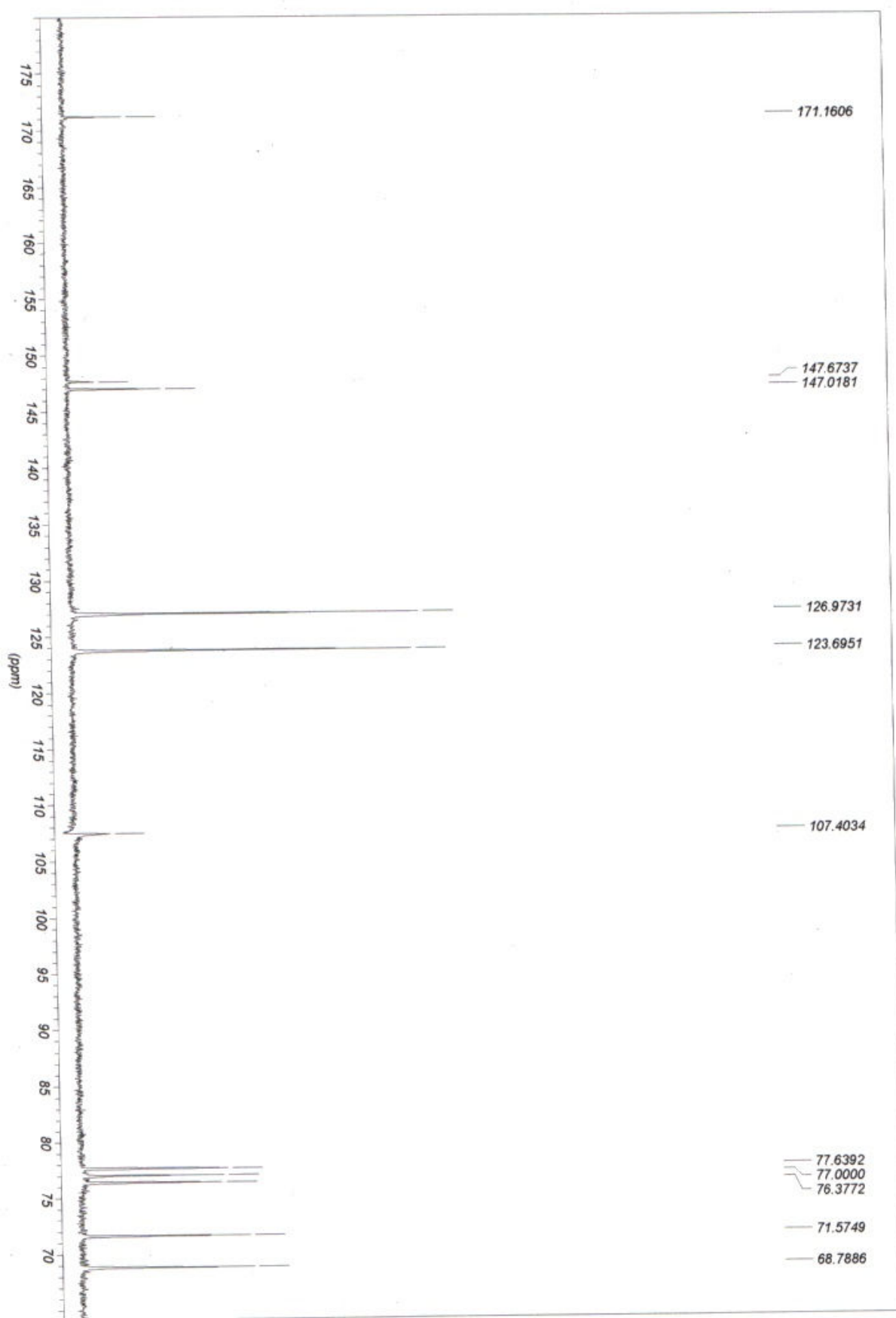


Figura 54: Espectro de IV referente a (6b)

Figura 55: Espectro de ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) referente a (7b)

Figura 56: Espectro de ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) referente a (8b)

Figura 57: Espectro de ^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3) referente a (8b)

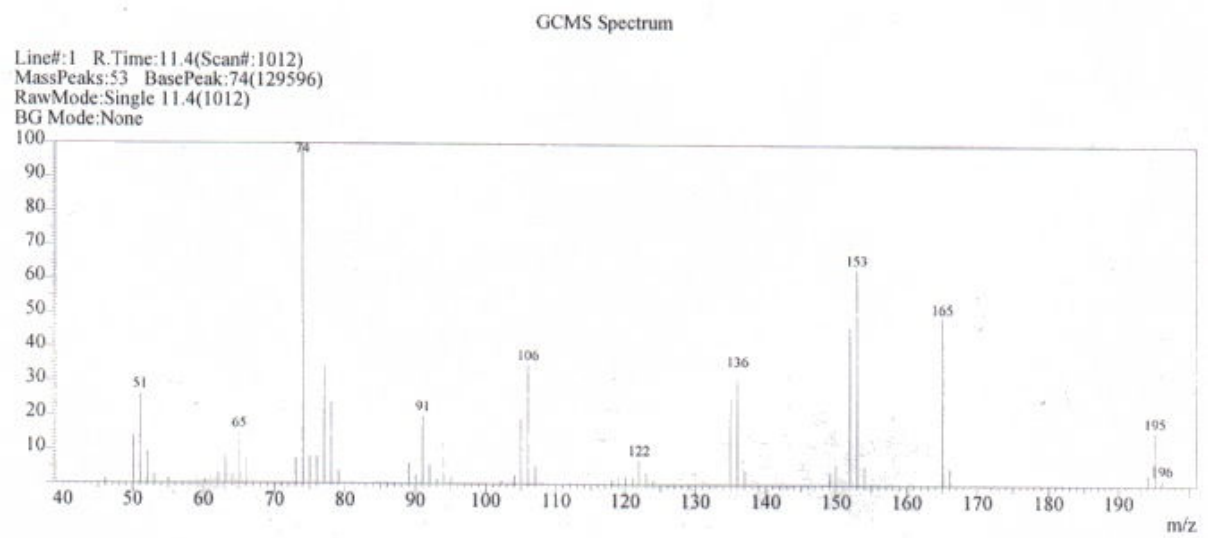
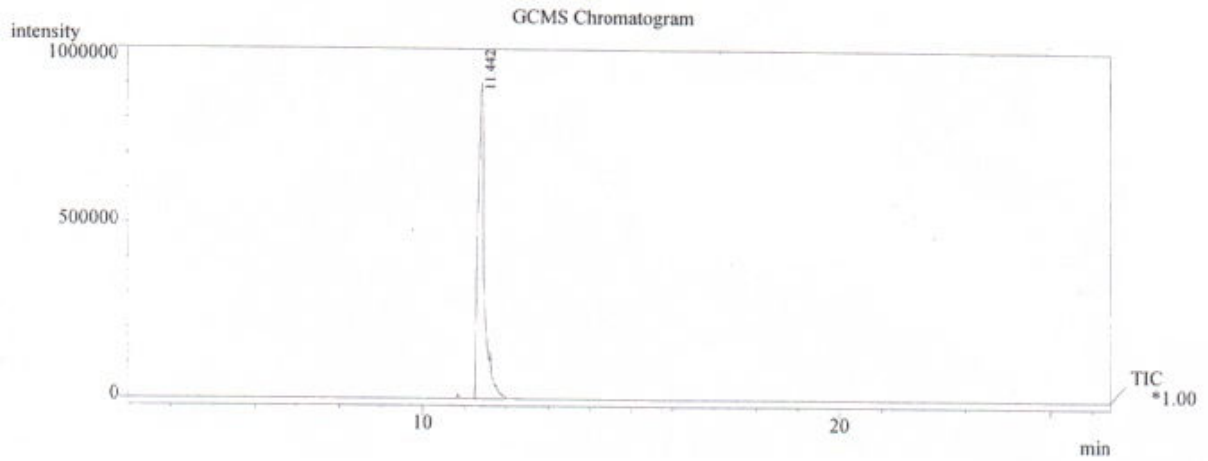


Figura 58: Espectro de CG/MS referente a (8b)

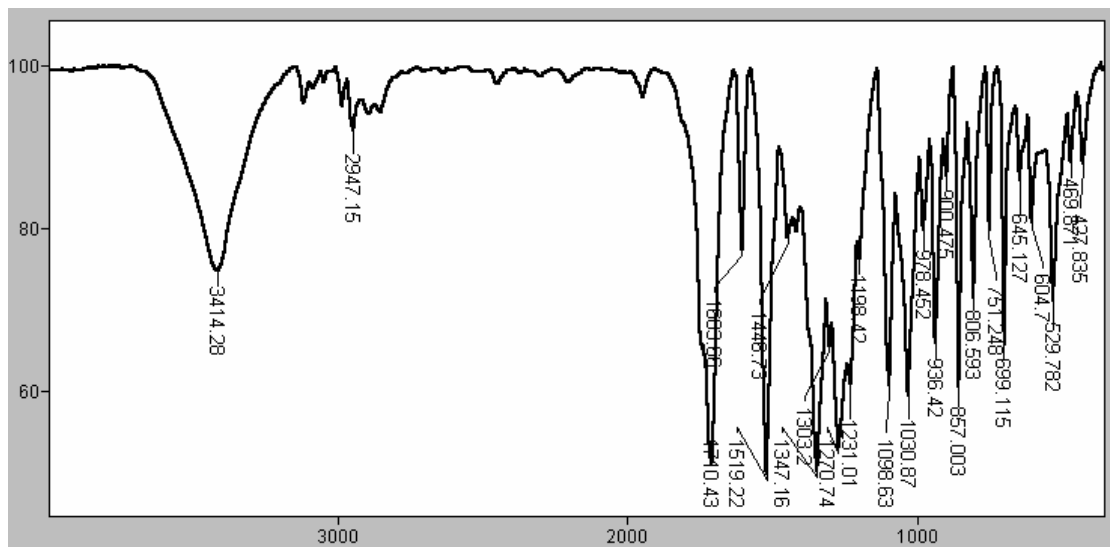


Figura 59: Espectro de IV referente a (8b)

9. Curriculum vitae

Lya Pantoja Rebelo

25 anos – solteira

lprebelo@gmail.com

EXPERIÊNCIA

Mar 2007- Mar 2009

Laboratório de Química Fina e Biocatálise – USP, mestrado, orientação prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade e Dr. Henrique Eisi Toma. Pesquisa em métodos de imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas e aplicação na síntese do intermediário da Fluoxetina (Prozac[®]), utilizando métodos químicos e físicos e todas as técnicas de caracterização espectroscópica e espectrofotométrica.

Jun 2003- Dez 2006

Laboratório de Química Bio-Orgânica – UFSCar, iniciação científica, desde Junho/2003, orientação prof. Dr. Timothy John Brocksom. Pesquisa em síntese de compostos orgânicos com propriedades bioativas, utilizando técnicas de cromatografia líquida e gasosa. Título: Diels-Alder de *p*-benzoquinonas e dienos 1,4-disubstituídos.

Dez 2005- Dez 2006

Um ano de bolsa de iniciação científica da FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo).

EDUCAÇÃO

2007-2008 Mestrado em Química Orgânica pela Universidade de São Paulo (USP), bolsista CNPQ. Título da dissertação: Imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas e sua aplicação na síntese de fármacos.

2004-2006 Professora assistente, auxiliando os alunos nas lições em Química Orgânica, tanto teórica quanto experimental na UFSCar, departamento de Química.

2003-2006 Bacharelado em Química pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), bolsista FAPESP.

IDIOMAS

Inglês fluente

Espanhol intermediário

QUALIFICAÇÕES

Domínio de softwares de desenvolvimento gráfico, como o Origin 7.5 e softwares relacionados à Química, como Chemdraw, Chemwindow, ACD-Labs e endNote X2.

Domínio de cromatógrafos a gás, HPLC, RMN, IV, AAS, UV-vis, CG, CG-MS, AFM e MET.

Expert em MsOffice, Windows, MsProject.

PUBLICAÇÕES

Andrade, L.H.; Toma, H.E.; Rebelo, L. P.; Netto, C.G. Immobilisation of *Burkholderia cepacia* by adsorption on magnetic nanoparticles. In: III Region Meeting of Biocatalysis and Biotransformations, **2008**, San Luís, Argentina.

REBELO, L. P. Application of lipase supported on magnetic nanoparticles for kinetic resolution of 1-phenylethanol. In: 12th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, (BMOS), **2007**, Itapema, Santa Catarina, Brazil.

BROCKSOM, T. J.; REBELO, L. P. Reação de Diels-Alder entre a 2,6-dimetil-*p*-benzoquinona e o sorbato de metila. In: XXIV Congresso de Iniciação Científica, **2006**, São Carlos.

BROCKSOM, T. J. ; REBELO, L. P. Reação de Diels-Alder entre a timoquinona e o sorbato de metila. In: XXIII Congresso de Iniciação Científica, **2005**, São Carlos.

CURSOS

- Janeiro 2008 Nanomaterials and Nanotechnology, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Janeiro- Fevereiro 2006 Tópicos em Química Analítica: estratégias em análise inorgânicas, tratamento de amostras. Prof. Dr. Joaquim Nóbrega, curso de verão na Universidade Federal de São Carlos, em São Carlos, SP.
- Junho 2004 Enterprise Program: Business na qualidade de multiplicador”, São Paulo, SP.
- Junho 2004 Enterprise Program: Tools - MS Project, em São Paulo, SP
- Fevereiro 2004 X Escola de Verão em Química Farmacêutica e Medicinal da UFRJ, Rio de Janeiro, RJ.
- Junho 1999 Citologia voltada para análise microscópica, em Santarém, PA, pela Universidade Federal do Pará (UFPA).

ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS

I Semana da Química da Universidade Federal de São Carlos, "A química e a Sociedade". Em São Carlos, São Paulo, 2005.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)