

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Instituto de Química - Câmpus de Araraquara

Karina Yuri Toome Saheki

Resolução cinética enzimática de acetato de linalila

Araraquara,
2022

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química - Câmpus de Araraquara

Karina Yuri Toome Saheki

Resolução cinética enzimática de acetato de linalila

Monografia apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Bacharel em
Química.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre

Araraquara,
2022

S131r Saheki, Karina Yuri Toome
Resolução cinética enzimática de acetato de linalila /
Karina Yuri Toome Saheki. -- Araraquara, 2022
49 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado -
Química) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Química, Araraquara
Orientador: Humberto Márcio Santos Milagre

1. Aromaterapia. 2. Biorreatores. 3. Essencias e óleos
essenciais. 4. Hidrólise. 5. Lipase. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca
do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.


Karina Yuri Toome Saheki

Resolução cinética enzimática de acetato de linalila


Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Química.

Araraquara, 09 de janeiro de 2023


Banca examinadora

Documento assinado digitalmente
 HUBERTO MARCIO SANTOS MILAGRE
Data: 16/01/2023 18:55:03-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Documento assinado digitalmente
 IAN CASTRO GAMBOA
Data: 17/01/2023 05:07:30-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Ian Castro Gamboa
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Documento assinado digitalmente
 ISABELE RODRIGUES NASCIMENTO
Data: 18/01/2023 15:05:46-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Para Yumiko e Igor

AGRADECIMENTOS

Ao Prof.Dr. Humberto Márcio Santos Milagre, pela orientação, paciência, compreensão, conselhos e a amizade.

Ao Instituto de Química e à Universidade Estadual Paulista, por todos os proveitosos anos da graduação e pela infraestrutura, indispensáveis à minha formação e à realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre, pelo incentivo, conversas e pela amizade,

Aos integrantes do Milagre Lab, pela amizade e pela convivência diária.

Aos funcionários do Instituto de Química.

À FAPESP, ao CNPq e ao CERSusChem, pelo apoio financeiro para a manutenção do grupo de pesquisa.

À CAPES, pela manutenção do Portal de Periódicos.

Aos meus familiares, por toda a dedicação em construir o caminho para que eu chegasse no final do Curso.

Aos meus amigos e grande companheiros durante os anos de graduação e de caçada de pokémon em torno do Instituto de Química, onde conheci pessoas maravilhosas desde os alunos de graduação até doutorandos de várias áreas de vários departamentos, mas em especial, devo agradecer ao Raul e a Joana por terem me dado conselhos e apoio durante os anos da graduação.

A Laisa e a Luana, por serem minhas companheiras dentro da casa, onde conseguimos ter uma amizade e apoiar umas as outras, mesmo com os cursos diferentes, sendo engenharia química e ciências sociais, tendo assuntos diversos e esclarecedores sobre diferentes visões do espectro político deste País.

Minha mente é a chave que me liberta.

(Harry Houdini)

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidos mini biorreatores de leito fixo, preenchido com lipases imobilizadas em esferas de alginato de cálcio, para aplicação na resolução cinética enzimática visando a produção de (S)-Linalol, um importante composto para as indústrias de perfumaria. Para este sistema foram avaliadas diversas condições reacionais como: I) Reação para a resolução enzimática. II) solvente reacional e III) tipo de lipase. A melhor condição obtida para a hidrólise do acetato de linalila catalisada pela lipase *Candida Rugosa Lipase* em meio aquoso à 30 °C, onde foi obtido resultado da formação do produto.

Palavras-chave: resolução cinética enzimática, biorreatores, fluxo contínuo, hidrólise, lipase, alginato de cálcio, acetato de linalila, linalol.

ABSTRACT

In this work, mini fixed-bed bioreactors were connected and filled with lipases immobilized in calcium alginate spheres for application in enzymatic kinetic resolution, aiming at producing (S)-Linalool, an essential compound for perfumery. Several reaction conditions were evaluated for this system, such as I) Reaction for enzymatic resolution, II) reaction solvent, and III) type of lipase. The best condition was conducted for the hydrolysis of linalyl acetate catalyzed by *Candida Rugosa Lipase* in an aqueous medium at 30 °C, where product formation was obtained.

Keywords: enzymatic kinetic resolution, bioreactors, continuous flow, hydrolysis, lipase, calcium alginate, linalyl acetate, linalool.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Flores e folhas da *Mentha citrata*, conhecida por hortelã bergamota

Figura 2- Representação do alambique arábico e o atual feito de cobre

Figura 3- Sir William Perkin

Figura 4- Reação com Ácido 4-Metil ciclo hex-1-eno-1-carboxílico

Figura 5- Leopold Ruzicka

Figura 6- Síntese do Linalol

Figura 7- Árvore de *Aniba roseodora Ducke*

Figura 8- Mapa da Floresta Amazônica de Pau-Rosa, atualizado no Ano de 2022

Figura 9- Profº Drº Lauro Barata

Figura 10- Estruturas do acetato de linalila e seus enantiômeros

Figura 11- Estruturas do linalol e seus enantiômeros

Figura 12- Classificação das enzimas de acordo com a IUBMB

Figura 13- Mecanismo das Serinas hidrolases

Figura 14- Representação do perfil do sítio catalítico das lipases

Figura 15- Reação de resolução cinética enzimática

Figura 16- Imobilização em forma esférica da enzima com alginato de cálcio

Figura 17- Cromatografia da análise do item 3.2.4 na coluna RTX-5

Figura 18- Espectro de massas da reação

Figura 19- Análise do pico 1 da cromatografia do CG-MS

Figura 20- Espectro de massas do linalol

Figura 21-Análise do pico 2 da cromatografia do CG-MS

Figura 22- Espectro de massas do α - terpineol

Figura 23-Análise do pico 3 da cromatografia do CG-MS

Figura 24- Espectro de massas do acetato de linalila

Figura 25-A peça metálica em T

Figura 26- Sistema construído para a redução do tamanho das esferas de alginato de cálcio

Figura 27- Coluna sem esferas de alginato de cálcio

Figura 28- Coluna empacotada em alginato de cálcio

Figura 29- Montagem do reator

Figura 30- Peso necessário para a coluna continuar imerso na água

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Principais plantas que contém o acetato de linalila e o linalol

Tabela 2 - Métodos de extração de compostos acetato de linalila e linalol

Tabela 3 - Lipases comerciais disponível

Tabela 4- Diâmetros das agulhas e das esferas produzidas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CRL - Lipase de *Candida Rugosa*

GC-FID - Cromatografia gasosa com detector por ionização de chama

GC-MS - Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas

t_R - Tempo de retenção.

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Introdução | 15 |
| 1.1 | Descoberta e obtenção do linalol e do acetato de linalila..... | 15 |
| 1.2 | Fonte de obtenção..... | 18 |
| 1.3 | Estruturas e propriedades químicas..... | 21 |
| 1.4 | Importância para a indústria..... | 23 |
| 1.5 | Método de obtenção dos enantiômeros do linalol e do acetato de linalila..... | 24 |
| 1.6 | Resolução cinética..... | 26 |
| 1.7 | Lipase..... | 26 |
| 1.8 | Aplicações da Lipase em síntese orgânica..... | 29 |
| 2 | Objetivo | 31 |
| 3 | Procedimento experimental | 32 |
| 3.1 | Análises cromatográficas..... | 32 |
| 3.1.1 | Cromatografia gasosa com detector por ionização com chama (CG-FID-Gas Chromatography-Flame Ionization Detector)..... | 32 |
| 3.1.2 | Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-FID-Gas Chromatography- Mass Spectrometry)..... | 32 |
| 3.2 | Resoluções cinéticas enzimáticas..... | 33 |
| 3.2.1 | Resolução cinética do acetato de linalila catalisada pela enzima CRL (<i>Candida Rugosa Lipase</i>) livre no shaker de agitação orbital | 33 |
| 3.2.2 | Imobilização enzimática em esferas de alginato de cálcio..... | 33 |
| 3.2.3 | Teste de resistência das esferas de CRL imobilizadas no tampão fosfato...33 | |
| 3.2.4 | Resolução cinética do acetato de linalila catalisadas por enzimas de <i>Candida Rugosa Lipase</i> imobilizadas..... | 34 |
| 3.2.5 | Resolução cinética do acetato de linalila catalisada por enzimas de <i>Candida Rugosa Lipase</i> imobilizada e empacotadas no reator..... | 34 |
| 3.2.6 | Resolução cinética do acetato de linalila catalisada por enzimas de <i>Candida Rugosa Lipase</i> imobilizadas no shaker de agitação orbital..... | 34 |
| 4 | Resultados e Discussões | 35 |
| 4.1 | Resolução cinética enzimática do acetato de linalila e linalol..... | 35 |
| 4.1.1 | Caracterização e análise cromatográfica do acetato de linalila e do linalol..... | 35 |
| 4.1.2 | Resolução cinética do acetato de linalila catalisada pela enzima CRL (<i>Candida Rugosa Lipase</i>) imobilizadas no shaker de agitação orbital | 35 |
| 4.1.3 | Imobilização enzimática em esferas de alginato de cálcio..... | 36 |
| 4.1.4 | Resolução cinética do acetato de linalila catalisada por enzimas de <i>Candida Rugosa Lipase</i> imobilizadas no shaker de agitação orbital..... | 36 |
| 4.1.5 | Resolução cinética do acetato de linalila catalisada por enzimas de <i>Candida Rugosa Lipase</i> imobilizadas e empacotadas no reator..... | 41 |

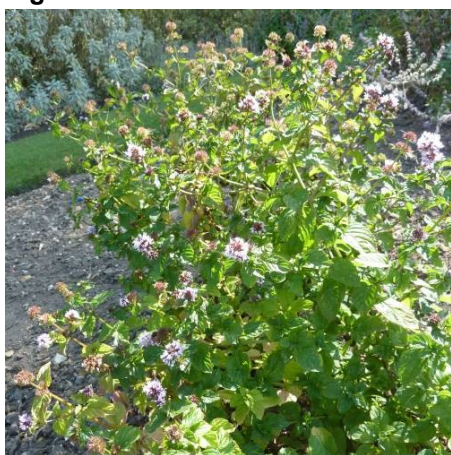
| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.1.6 | Resolução cinética do acetato de linalila catalisada por enzimas de <i>Candida Rugosa</i> Lipase imobilizadas no shaker de agitação orbital..... | 45 |
| 5 | Conclusão..... | 46 |
| 6 | Referências..... | 47 |

1- Introdução

1.1- Descoberta e obtenção do linalol e do acetato de linalila:

A história da humanidade é marcada pelo uso de compostos aromáticos, desde os séculos (V a.C) até a atualidade. Existem registros históricos que na Grécia antiga, Theophrastus/Teofrasto (370 a.C), foi importante pelos seus trabalhos em botânica e possui uma pequena contribuição para a perfumaria. Onde, se relata a utilização da planta hortelã bergamota (*Mentha citrata*), Figura 1, que é semelhante a lavanda (sendo seus principais constituintes o acetato de linalila e o linalol) (POUCHER,1991,p. 8)

Figura 1- Flores e folhas da *Mentha citrata*, conhecida por hortelã bergamota



Fonte: <https://m.planfor.pt/comprar,hortela-bergamota,3908,PO> (2009)

Para produzir os perfumes, utilizavam várias partes das plantas, como as flores que é o caso da hortelã bergamota, folhas, raízes, madeira, frutas e goma. Por muitas vezes eram a mistura das partes citadas, onde eram macerados e resultaram na criação do pó perfumado utilizado para a produção das fragrâncias. Na alimentação, misturavam o pó macerado como receita de pratos sofisticados e aromatização em vinhos, os óleos extraídos na maceração eram misturados com outros líquidos produzindo os óleos perfumados e o pó também era misturado com líquido formando os incensos (POUCHER,1991,p. 9) e (ASHCAR, 2007).

Os árabes criaram o alambique (Figura 2), graças ao alquimista Avicenna (980-1037 a.C.), que criou a serpentina de resfriamento e por consequência, o primeiro método de destilação isolando vários óleos essenciais de plantas e de seus sumos (POUCHER,1991,p. 663) e (ASHCAR,2007) .Os óleos essenciais, segundo a definição da ANVISA (BRASIL,1999) na Resolução- RDC nº2, de 15 de Janeiro de 2007, página 2 ,”são produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico

e podem apresentar isoladamente ou misturados entre si, ¹retificados, ²desterpenados ou concentrados”

Figura 2 - Representação do alambique árabe e o atual feito de cobre

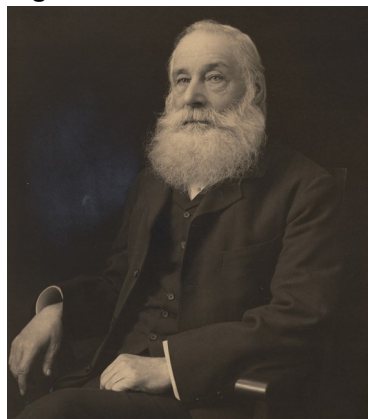


Fonte: <https://clubedobarman.com/destilacao-alambique/>; <https://www.losvinos.com.ar/pt-br/licores-pt-br/alambique/> (2022)

Os conhecimentos adquiridos pelos árabes através das fragrâncias foram difundidos pela Europa devido ao vasto território do Império Romano, onde estes eram os maiores consumidores de fragrâncias, estimulando assim as rotas comerciais para a Arábia, China e Índia, sendo que a Roma foi considerada no século III a.C. a capital mundial do banho (ASHCAR,2007).

A obtenção desses compostos foi feita através da história com a maceração e destilação das plantas, já a descoberta, ou seja, a identificação deles foi durante a Segunda Revolução Industrial (1850-1945), por Sir William Henry Perkin, Figura 3.

Figura 3- Sir William Perkin



Fonte: <https://www.sciencehistory.org/historical-profile/william-henry-perkin> (2017)

Sir Perkin foi o criador do corante sintético mauveine (anilina púrpura), desenvolveu a síntese da glicina em 1858 e dois anos depois o ácido tartárico.

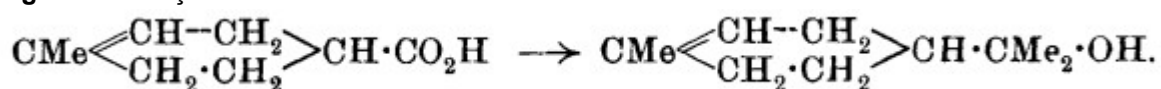
1 Retificado - de que se separou da fase aquosa, destilado novamente para maior grau de purificação do substrato (Oxford Languages)

2 Desterpenação- consiste na concentração dos óleos essenciais pela retirada de hidrocarbonetos terpênicos podendo ser retirados por meio da extração líquida ou por extração por solventes

Desenvolveu e patenteou a fabricação do corante sintético avermelhado denominado alizarina, foi o responsável pela reação de Perkin na síntese de perfumes como a cumarina (sendo este o primeiro perfume artificial criado em 1874), responsável pelo estudos da rotação óptica. Creditado como o descobridor do linalol, acetato de linalila e cumarina (POUCHER,1991,p. 676).

Sir Perkin estudou sobre os terpenos, através de sínteses para estudos de rotação óptica, baseado no artigo escrito pelo seu filho William Perkin Junior, sobre os experimentos do pai, para a determinação das rotações dos enantiômeros do Terpeneol, onde a reação inicial é dada na figura apresentada abaixo.

Figura 4 - Reação com Ácido 4-Metil ciclo hex-1-eno-1-carboxílico



Fonte: http://www.simm.cas.cn/zcg/zcg_lwzz/201512/W020151209651698913986.pdf (1911)

Obtidas as rotações ópticas deste ácido, foi modificado para obtenção das rotações ópticas do Terpeneol, na qual necessita de um processo de cristalização, onde nas observações do próprio autor as rotações obtidas podem ser contaminados pois pode ser através da mistura racêmica dos produtos, mesmo utilizando o fracionamento de cristais, uma vez que a quantidades obtidas eram pequenas.

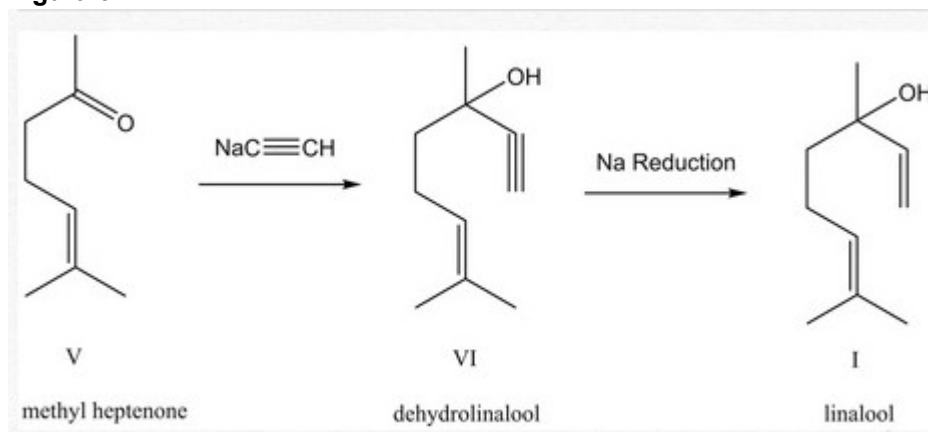
O linalol foi sintetizado pelo cientista Leopold Ruzicka (laureado em Nobel de Química de 1939), no ano de 1919, através da reação representado na Figura 5:

Figura 5- Leopold Ruzicka



Fonte: [Lavoslav \(Leopold\) Ruzicka, rodák z chorvatského Vukovaru: Vnuk českého krejčího získal nobelovku! | Blesk.cz](http://www.blesk.cz) (2014)

Figura 6 - Síntese do Linalol



Fonte: <https://www.mjlphd.net/blog/linalool-synthesis-using-sodium-acetylid> (2013)

Ruzicka contribuiu para a indústria de perfumaria com as descobertas estruturais das moléculas de Muscone³ e civetone⁴, sua maior contribuição e que rendeu o seu Nobel foi a descoberta das estruturas moleculares de hormônios masculinos, sendo os mais notáveis a testosterona e a androsterona, e subsequentemente, as suas sínteses (MLA style: Leopold Ruzicka – Facts. NobelPrize.org. Nobel Prize Outreach AB 2022. Mon. 7 Nov 2022. <<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1939/ruzicka/facts/>>).

1.2- Fonte de obtenção:

O acetato de linalila e o linalol são encontradas em várias plantas, como apresentado na Tabela 1.:

Tabela 1- Principais plantas que contém o acetato de linalila e linalol

| Nome comum | Nomenclatura científica | Composto(s) | Concentração(ões) % |
|------------------|-------------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| Sálvia Esclaréia | <i>Salvia sclarea</i> L. | Acetato de linalila/ Linalol | (45,3-73,6%)/ (9,0-19,3%) |
| Lavanda | <i>Lavandula angustifolia</i> | Acetato de linalila/ Linalol | (25,0-46,0%)/ (25,0-45,0%) |
| Bergamota | <i>Citrus reticulata</i> | Acetato de linalila/ Linalol | (17,1-40,4%)/ (1,7-20,6%) |
| Lavandim Grosso | <i>Lavandula hybrida</i> | Acetato de linalila/Linalol | (28,0-38,0%)/ 35% |
| Manjerona Doce | <i>Origanum majorana</i> | Acetato de linalila | (4,4-10,5%) |
| Neroli | <i>Citrus aurantium</i> | Acetato de linalila/ Linalol | (0,6-10,0%)/ (31,4-54,3%) |
| Cardamomo | <i>Elettaria cardamomum</i> | Acetato de linalila | (0,7-7,7%) |

3 Retirado do feromônio almíscar de um corça

4 Retirado do feromônio de um civeta africana

| | | | |
|---------------------------|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| Hortelã Bergamota | <i>Mentha citrata</i> | Acetato de linalila/Linalol | (25,0-46,0%)/(25,0-45,0%) |
| Ho Leaf | <i>Cinnamomum camphora</i> | Linalol | (66,7-90,6%) |
| Pau-Rosa | <i>Aniba roseodora Ducke</i> | Linalol | (82,3-90,3) |
| Coriandro Sementes | <i>Coriandrum sativum L.</i> | Linalol | (59,0-87,5%) |
| Tomilho QT Linalol | <i>Thymus serpyllum L.</i> | Linalol | (73,6-79,0%) |
| Manjeriçao QT Linalol | <i>Ocimum canum</i> | Linalol | (53,7-58,3%) |
| Lavadinha | <i>Lavandula X Intermedia</i> | Acetato de linalila/Linalol | (10,0%)/(30,0-38,0%) |
| Ylang-Ylang | <i>Cananga odorata var. macro.</i> | Linalol | (0,8-30%) |
| Petitgrain | <i>Citrus aurantium</i> | Linalol | (20,8-30,2%) |
| Gerânio | <i>Pelargonium graveolens</i> | Linalol | (0,5-13,8%) |
| Sálvia Espanhola | <i>Salvia lavandulifolia</i> | Linalol | (0,2-11,2%) |
| Manjeriçao-de-folha-larga | <i>Ocimum basilicum L.</i> | Linalol | (0,04-0,7%) |
| Milefólio | <i>Achillea millefolium L.</i> | Linalol | (0,2-1,0%) |

Fonte: <https://www.quinari.com.br/loja/acetato-de-linalila/> (2022) e <https://www.quinari.com.br/loja/linalol/> (2022)

Das plantas apresentadas na tabela 1, podemos destacar o *Aniba roseodora Ducke*, mais conhecida pelo seu nome popular de pau-rosa.

Figura 7 - Árvore de *Aniba roseodora Ducke*



Fonte: <https://portalamazonia.com/amazonia/pau-rosa-o-fixador-de-perfume-da-floresta-amazonica> (2021) e <http://www.klimanaturali.org/2011/05/pau-rosa-aniba-rosaeodora-var-amazonica.html> (2011)

Essa planta é nativa da Floresta Amazônica, mais precisamente na Amazônia Central podendo ser encontrada em florestas altas e não inundáveis ou em florestas baixas de areia branca na região do alto do Rio Negro (LORENZI, HARRI, 1998-2002).

A sua madeira é muito perfumada devido a presença do óleo essencial linalol, sendo visado pelas indústrias de perfumes e cosméticos em geral, para a extração desse óleo. Foi o terceiro maior produto de exportação da Amazônia, perdendo somente para a borracha e a castanha, tendo o início da sua exploração em 1920.

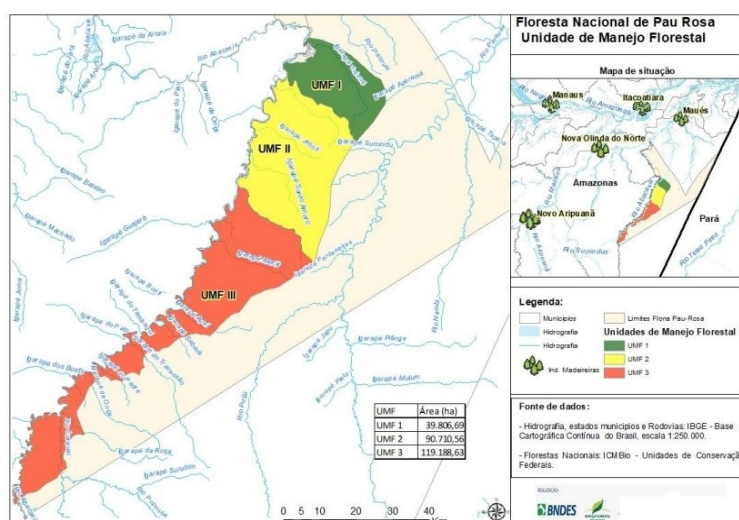
Em 1992, entrou para a lista de espécies ameaçadas do Instituto Nacional do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais (IBAMA) e também está inclusa nas listas das espécies em extinção na Colômbia e no Suriname, estima-se que entre 1932-2002, dois milhões destas árvores foram derrubadas em cerca de 10 milhões de hectares da Floresta Amazônica, onde atualmente é encontrado nos municípios de Parintins, Maués, Presidente Figueiredo e Nova Aripuanã.

Para se produzir 10 litros de óleo essencial de linalol é necessário da derrubada de uma árvore de aproximadamente 1 tonelada, para um barril de 180 litros é necessário de 15-20 toneladas e é necessário plantar cerca de 80 mudas para equivaler ao que foi derrubado.

Pau-rosa: o fixador de perfume da floresta amazônica. Portal Amazonia, 2021. Disponível em: <https://portalamazonia.com/amazonia/pau-rosa-o-fixador-de-perfume-da-floresta-amazonica>. Acessado em :07. nov. 2022 e Pau-rosa: sua própria essência quase a levou à extinção, AMDA (Associação Mineira de Defesa do Ambiente), 2013. Disponível em: <https://www.amda.org.br/index.php/comunicacao/especie-da-vez/2645-pau-rosa-sua-propria-essencia-quase-a-levou-a-extincao>. Acessado em: 07.nov.2022

Figura 8- Mapa da Floresta Amazônica de Pau-Rosa, atualizado no Ano de 2022

2. MAPA DA FLORESTA NACIONAL DE PAU ROSA E DAS UNIDADES DE MANEJO FLORESTAL



O professor da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), do Laboratório de Química de Produtos Naturais, Lauro Euclides Soares Barata.

Figura 9- Profº Drº Lauro Barata



Fonte: <https://revistapesquisa.fapesp.br/lauro-barata-a-rede-da-riqueza-natural-2/> (2019)

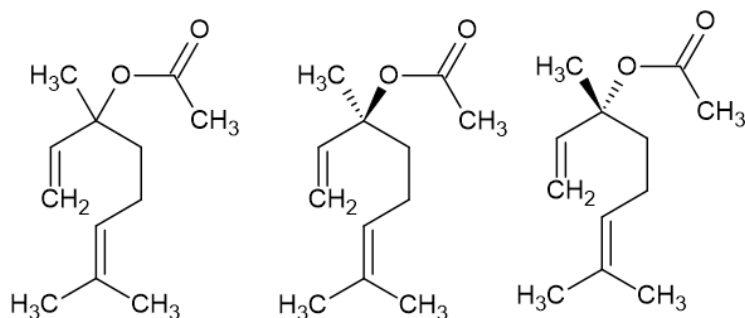
Desenvolveu um projeto de extração de óleos essenciais das folhas do pau-rosa em que obteve rendimentos e qualidades semelhantes ao extraído da madeira, no ano de 1998, sendo financiado pelo Banco da Amazônia (BASA), e teve o pontapé inicial a pressão sofrida pela Chanel por ecologistas franceses que queriam boicotá-los, pois um dos seus principais carros chefes é o perfume Chanel nº5, que tem na sua composição o linalol, a empresa contratou a ONG Pro-Natura de origem franco-brasileira que chamaram o professor para auxiliá-los nos estudos para a produção sustentável desta árvore.

O extrato da folha obtida foi enviada para 2 representantes de casa perfumistas internacionais no Brasil para a avaliação, onde foi constatado que a diferença entre as essências das folhas com o da madeira eram mínimas e um deles afirmou que a fragrância das folhas era superior e que atualmente é realizado pelas indústrias, inclusive a Chanel, ajustando o processo de destilação conforme diz o professor Lauro Barata, em entrevista para a Revista FAPESP, no artigo “ Lauro Barata: A rede da riqueza natural”, realizado no dia 5 de novembro de 2019.

1,3- Estruturas e propriedades químicas:

A estrutura do acetato de linalila e de seus enantiômeros são apresentados na Figura 10.

Figura 10- Estruturas do acetato de linalila e seus enantiômeros



Forma racêmica do acetato de linalila, (S)-Acetato de linalila e (R)-Acetato de linalila, respectivamente

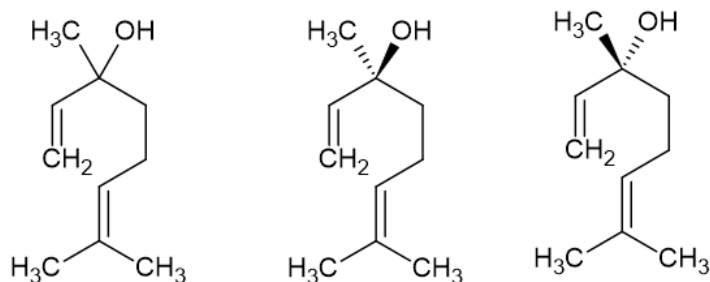
Fonte: Próprio Autor (2022)

O acetato de linalila apresenta as seguintes atividades biológicas:

- Anti inflamatório;
- Previne lesão isquêmica (AVC);
- Antioxidante;
- benéfico no tratamento de dermatites e asma;

A estrutura do linalol e de seus enantiômeros são apresentadas na Figura 11, e as propriedades biológicas deste composto são:

- Apresenta ação antibacteriana;
- Atividade antifúngica;
- Atividade antiviral;
- Atividade anti inflamatória, observada pelo enantiômero (R)-linalol ou (-)-linalol;
- Atividade antinociceptiva, observada pelo enantiômero (R)-linalol ou (-)-linalol;
- Atividade depressora no sistema nervoso central (SNC);
- sedativo dose-dependente, tendo propriedades hipnóticas, anticonvulsivantes e hipotérmicas;
- Atividade antiparasitária, contra leishmania (*Leishmania amazonensis*) *in vitro*;
- Antioxidante;
- Antidepressiva e ansiolítica;
- Analgésicas;
- Anticancerígena;
- Neuro-protetora;
- Repelente

Figura 11- Estruturas do linalol e seus enantiômeros

Forma racêmica do linalol, (*S*)- linalol e (*R*)-linalol, respectivamente

Fonte: Próprio Autor (2022)

As propriedades terapêuticas descritas acima foram retiradas do livro “Química dos produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia”, dos autores YUNES.R.A ;FILHO.V.C e (Orgs), 2007,p 211-232.

Encontradas naturalmente na forma racêmica e seus enantiômeros, tendo como diferença a fragrância emanada por esses enantiômeros, sendo o (*S*)-linalol possui odor adocicado, herbáceo e cítrico e o (*R*)-linalol possui odor amadeirado, floral e refrescante. Para a aromaterapia o (*S*)-linalol apresenta a propriedade de ser um agente “ativador”, aumentando o estado de alerta e o (*R*)-linalol é um agente “relaxante” atuando como diminuição de estresse.

AZAMBUJA,W. LINALOL. Óleos essenciais org,2011. Disponível em: <https://www.oleosessenciais.org/linalol/>. Acessado em: 07.nov.2022.

1,4- Importância para a indústria:

O linalol e o seu derivado acetato de linalila é utilizado na aromaterapia, um ramo da medicina fitoterápica, que utiliza os óleos essenciais para promover a melhora da qualidade de vida do paciente. No Brasil a aromaterapia é descrita como Práticas Integrativas e Complementares (PIC) e não possui órgão fiscalizador por não ser regulamentada como profissão e sim como especialização da área médica, tendo como maior atuação como antidepressivos e anti-ansiolíticos, sendo muitas vezes inalados, segundo o Conselho Federal de Enfermagem (Cofen), no Parecer nº34/2020.

Para a indústria de cosméticos e de perfumaria, ambos são utilizados como componentes odoríferos, tendo como principal o odor floral, o linalol é muito utilizado e visado pela alta perfumaria considerado um ingrediente floral insubstituível e muito utilizado pela marca Chanel com o perfume Chanel nº5 que foi consolidado pela atriz norte americana Marilyn Monroe, o linalol sintético está sendo comercializado para mercados menos exigentes dos cosméticos, como os sabonetes, os shampoos, entre outros, pois a alta perfumaria não aprovou a sua utilização nas suas formulações (sendo que a síntese de linalol sintético se deu no ano de 1960).Pau-rosa: o fixador de perfume da floresta amazônica. Portal Amazonia,

2021. Disponível em: <https://portalamazonia.com/amazonia/pau-rosa-o-fixador-de-perfume-da-floresta-amazonica>. Acessado em :07. nov. 2022

Com relação à indústria farmacêutica podemos citar os estudos com os óleos essenciais para formulações de novos fármacos, principalmente com o linalol, na indústrias das vitaminas, é um importante intermediário da síntese da vitamina E e assim como o geraniol é utilizado como ponto de partida para a síntese da vitamina A e estudos recentes indicam que ele auxilia em doenças como Alzheimer e isquemia cerebral.

O acetato de linalila previne o AVC isquêmico, e pesquisas recentes afirmam que ele junto do linalol tem eficácia contra psoríase (doença crônica na pele) induzida por Imiquimod (quimioterápico tópico usado no tratamento de tumores na pele) (PRAGADHEESH et al.,2017).

Para a indústria alimentícia ambos são usados como flavorizantes, além de serem encontrados em condimentos naturais como sálvia, canela, frutas como bergamota, entre outros.

1,5- Método de obtenção dos enantiômeros do linalol e do acetato de linalila:

O linalol e seus enantiômeros são encontrados assim como o acetato de linalila em plantas aromáticas, sendo que, o enantiômero (*R*)-linalol é encontrado majoritariamente em botões das plantas, enquanto o enantiômero (*S*)-linalol é encontrado majoritariamente nas flores maturadas (PRAGADHEESH et al,2017).

Os métodos mais conhecidos para a separação desses compostos são: destilação a vapor que extrai 93% dos óleos essenciais, hidrodestilação, extração por solvente orgânico, destilação por fluido supercrítico no caso é o CO₂, enfloração, prensagem a frio, entre outros, nas quais esses métodos conseguem extrair cerca de 7% dos óleos essenciais, onde são explicados e mostrados as suas desvantagens na Tabela 2.

Os métodos mais empregados comercialmente são a destilação a vapor, a extração por solventes orgânicos e a extração com fluídos supercríticos estão sendo empregados por algumas indústrias do ramo de óleos essenciais.

Independente do método utilizado a extração dos óleos essenciais são inferiores a 1%, sendo que alguns casos excepcionais como no caso da extração de botões florais de cravo onde o rendimento é de até 15%.

Tabela 2- Métodos de extração dos compostos Acetato de linalila e Linalol

| Método de extração | Resumo do método | Desvantagem/(s) |
|--------------------|---|---|
| Hidrodestilação | Método antigo e versátil no qual o material vegetal permanece em contato com a água em ebulição, sendo que o vapor força a abertura das paredes celulares ocorrendo a evaporação do óleo contido nas plantas, | Proporciona degradação de alguns compostos presentes no óleo essencial devido o contato direto com a água em ebulição |

| | | |
|------------------------------------|---|---|
| | <p>neste vapor ocorre a mistura de óleo e água, que passando por um condensador e sendo esfriando, a mistura dos vapores formam duas fases, devido os componentes voláteis são imiscíveis, facilitando na separação dos mesmos.</p> <p>Empregado na extração de flores, raízes, madeiras e cascas</p> | por longos períodos de tempo |
| Destilação por arraste a vapor | Utilizado para materiais sensíveis à temperatura, baseada na diferença de volatilidade de determinados compostos presentes na matéria-prima vegetal. A indústria prefere a destilação por arraste a vapor devido à sua maior simplicidade e economia, pois permite tratar de uma única vez quantidades significativas de material vegetal. Produzindo óleos de alta qualidade, | A principal desvantagem é que em relação ao tempo de processo, se por um lado, extrações em curtos períodos de tempo produzem óleos de alta qualidade, em processos mais longos, além do custo que aumenta, ocorre também a formação de compostos não-apreciáveis, interferindo na qualidade do produto |
| Extração por solventes orgânicos | Determinados tipos de óleos são instáveis em diferenças bruscas de temperatura, nesses casos solventes orgânicos como hexano, benzeno, metanol, etanol, propanol, acetona, pentano, solventes clorados, destes a preferência é a utilização de solventes apolares. Esses solventes tem que possuir como características principais, seletividade, baixa temperatura de ebulição, ser quimicamente inerte e possuir baixo custo. | Por medidas de segurança devem ser observadas as especificidades de cada óleo, para não ocorrer reações secundárias afetando a qualidade do produto. Os solventes podem retirar as ceras e pigmentos da matéria-prima caracterizando com contaminantes, a remoção dos solventes residuais necessita de muita energia e alto custo de investimentos de equipamentos, podem provocar as alterações químicas nas moléculas, alterando aroma e extrato e apresentar toxicidade |
| Extração por fluidos supercríticos | Fluido supercrítico é um gás que se encontra em uma temperatura em que o mesmo não pode ser liquefeito por compressão isotérmica, sendo chamada de temperatura crítica, o gás apresenta baixa viscosidade e elevada densidade permitindo a extração de solutos por matrizes sólidas. As substâncias mais utilizadas são: metano, etileno, etano, porém o gás carbônico apresenta características apreciadas para a extração, apresenta facilidade de separação do soluto por ser extremamente volátil, não tóxico, não inflamável, relativamente barato e não apresenta odor. Obtém-se óleos de melhor qualidade pois a extração mantém a integridade dos compostos ativos. | Tem como desvantagem o alto grau de periculosidade, devido a utilização de altas pressões empregadas, no caso do gás carbônico necessita de uma pressão de 200 atm. |
| Enfloração (Enfleurage) | Utilizado para flores que apresentam baixos teores de óleos essenciais, que por serem instáveis, não se pode utilizar métodos como a destilação por arraste a vapor devido a perda quase completa dos compostos | O processo é bastante lento, complexo e caro. |

| | | |
|------------------|--|--|
| | aromáticos. Esse método consiste na decomposição das pétalas das flores em temperatura ambiente sobre uma camada de gordura (absorve os constituintes voláteis) durante um certo período de tempo, sendo as pétalas substituídas por novas até a saturação total, onde a gordura é tratada com álcool sendo destilado em temperaturas baixas, o óleo extraído possui alto valor comercial | |
| Prensagem a frio | Método utilizado para extração dos óleos voláteis de frutos cítricos, onde coloca-se os frutos inteiros diretamente em uma prensa hidráulica, sendo coletados o suco e o óleo presente nas cascas e depois a emulsão formada com a água é separada por centrifugação, decantação ou por destilação fracionada. | |

Fonte: [LEVANTAMENTO E ANÁLISE DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS Jeniffer Cristina Silveira](#) (2012)

1,6- Resolução cinética

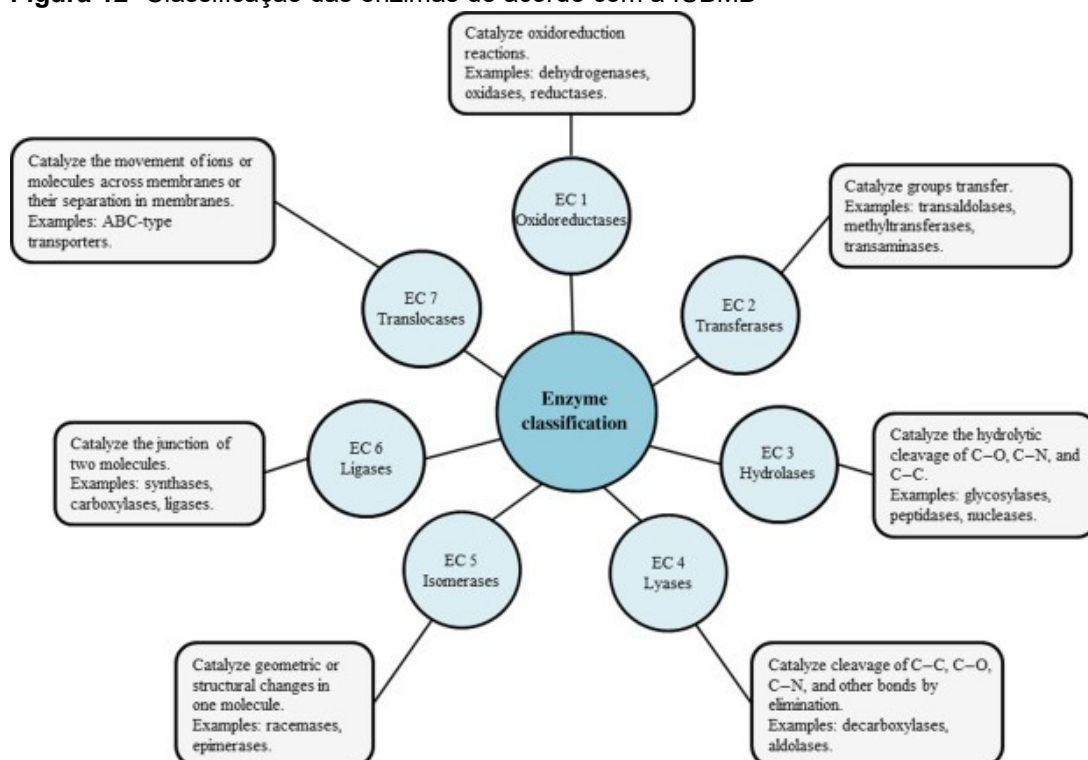
O que é a resolução cinética: de acordo com o União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), refere-se à separação parcial ou completa dos enantiômeros de um racemato (que contém ambos os enantiômeros), em virtude de taxas desiguais de reação dos enantiômeros com um agente quiral. Se este agente for uma enzima é denominado resolução cinética enzimática ou resolução biocatalítica.

Se o processo de resolução cinética enzimática for eficiente, espera-se que a diferença das energias de ativação dos complexos seja maior ou igual a 18,83 kJ/mol para que somente um dos enantiômeros seja transformado no produto desejado, e assim, a conversão máxima teórica é de 50% e possuem elevada pureza óptica ($ee > 99\%$), para se determinar o quanto a enzima consegue distinguir os enantiômeros é utilizada o coeficiente enantiomérico conhecido como valor E, quando E for 1 significa que a reação é não-seletiva, enquanto $E > 20$ são consideradas úteis para a síntese orgânica.

1,7- Lipase:

De acordo com a União Internacional de Bioquímica Molecular (IUBMB) classificaram as enzimas de sete grandes classes de acordo com a reação que catalisam, sendo codificados inicialmente com a abreviação E.C (Enzyme Commission) e pode ser seguida por até 4 números referentes às subclasses que a enzima pertence (Bandeira, 2015).

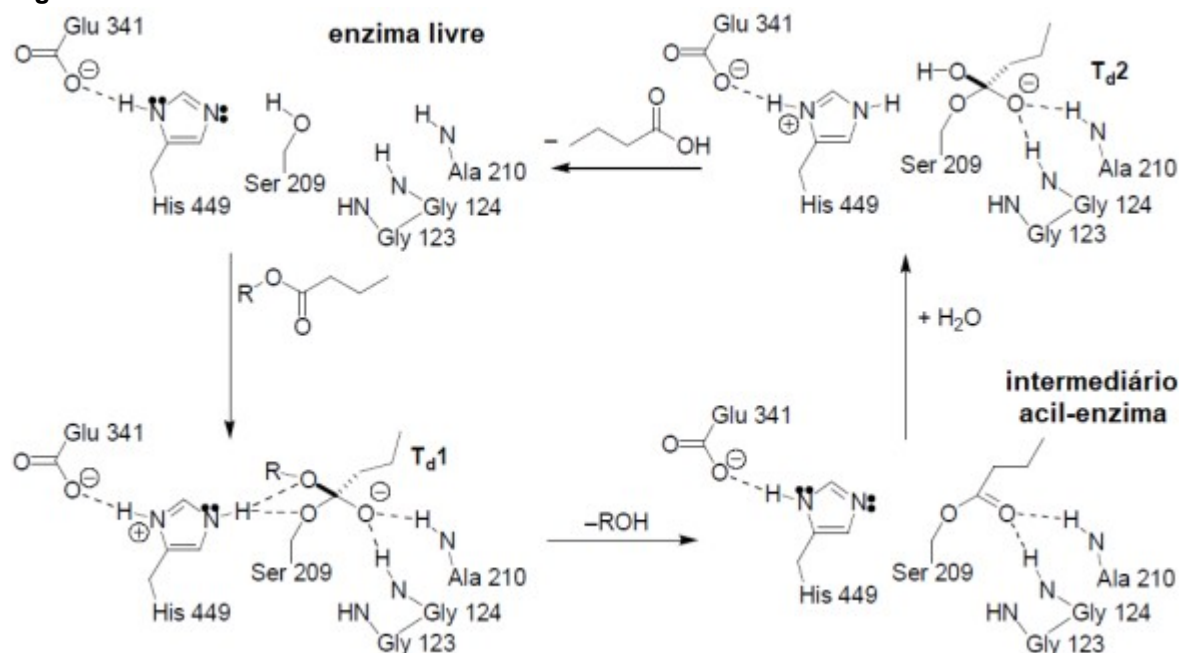
Figura 12- Classificação das enzimas de acordo com a IUBMB



Fonte: Chapter 2- Classification of enzymes and catalytic properties (2020)

As lipases apresentam-se como EC 3.1.1.3, referenciando que elas são das classes das hidrolases (EC 3), atuando em ligações éster (EC 3.1.) de ésteres carboxílicos (EC 3.1.1.), e que são lipases (EC 3.1.1.3) (Webb,1992).

Seu mecanismo de reação é descrito como uma tríade catalítica formada pelos seus aminoácidos presentes, sendo estes, o ácido aspártico, histidina e a serina, denominada como serina hidrolases (Angajala *et al*,2016), tendo o seu mecanismo de reação explicado abaixo.

Figura 13- Mecanismo das Serinas hidrolases

Fonte: Januário, Gabriel, 2017⁵

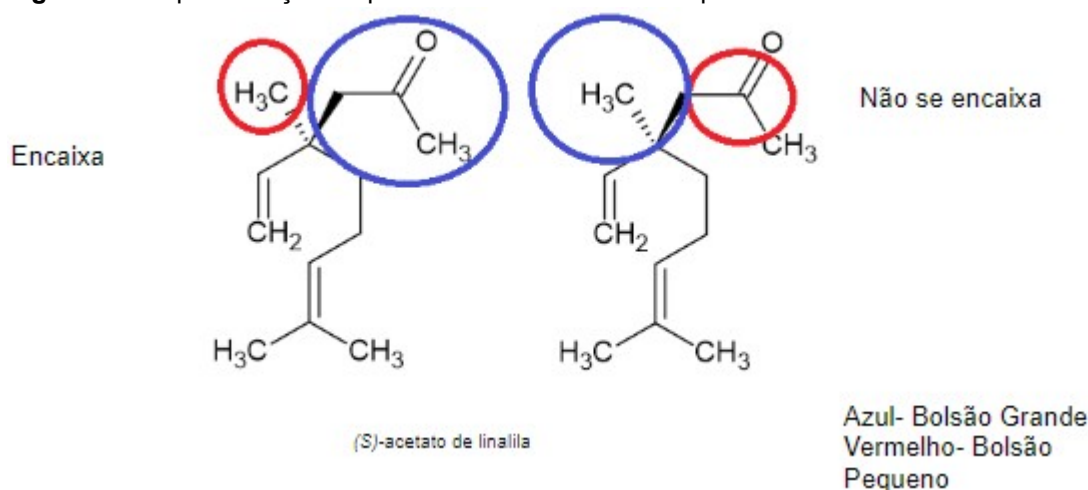
Conforme observado na figura acima, o mecanismo consiste em 2 etapas:

- (1) O resíduo de ácido aspártico abstrai um próton do nitrogênio do anel imidazólico da histidina, onde este abstrai um próton da hidroxila do resíduo de serina para manter o anel aromático, o oxigênio da serina que contém um par de elétrons livres realiza um ataque nucleofílico ao doador de acila resultando na liberação um alcóxido, onde este é rapidamente protonado ao álcool correspondente.
- (2) Quando a etapa 1 é encerrada, o intermediário formado acil-enzima é estabelecido, onde este sofre um ataque nucleofílico de uma espécie ao seu carbono carbonílico do grupo acetil, os resíduos de aminoácidos da tríade retornam aos seus estados iniciais pela transferência dos prótons de forma inversa à ocorrida na primeira etapa e o produto formado é liberado do sítio catalítico da enzima. (Bornscheuer e Kazlauskas,2006; Faber,2011)

Para determinar qual é o melhor enantiômero que será formado na biocatálise com as lipases, os sítios catalíticos são importantes para o entendimento da enantiosseletividade dessas enzimas, sendo estes bastantes característicos, formados por dois bolsões, sendo 1 grande representado em azul e 1 menor representado em vermelho (Kazlauskas *et al*,1991). Observado na figura abaixo:

5 retirado do Trabalho de Conclusão de Curso- com o título- “ Resolução Cinética Enzimática em Síntese Orgânica: Desenvolvimento de Mini Biorreatores”

Figura 14- Representação do perfil do sítio catalítico das lipases



Fonte: Próprio Autor (2022)

Devido aos bolsões dos sítios catalíticos das lipases, a enantiosseletividade é de acordo com o tamanho dos substituintes ligados ao centro quiral do substrato, o enantiômero com a melhor configuração para o encaixe dos bolsões é a que reage preferencialmente, esta regra é chamada de regra de Kazlauskas, e portanto, moléculas com diferenças de tamanhos dos grupos ligados no centro quiral são melhor resolvidas pelas lipases (Kazlauskas *et al*,1991).

1,8- Aplicação da Lipase em síntese orgânica:

As lipases são enzimas hidrolíticas mais exploradas na obtenção de compostos enantiomericamente puros, estimando-se que 40% de todas as biotransformações relevantes para a indústria são realizadas por essas enzimas (Bandeira,2015).

Conforme a Tabela 3, mostra as principais lipases comercializadas para fins de pesquisa em laboratórios de pesquisa e para as indústrias e sua principal aplicação.

Tabela 3- Lipases comerciais disponível

| Origem | Fonte de lipases | Aplicações |
|----------|---------------------------------|--|
| Fungo | <i>Candida rugosa</i> | Síntese orgânica |
| Fungo | <i>Candida antarctica</i> | Síntese orgânica |
| Fungo | <i>Thermomyces lanuginosus</i> | Aditivo de detergentes |
| Fungo | <i>Rhizomucor miehei</i> | Processamento de alimentos |
| Bactéria | <i>Burkholderia cepacia</i> | Síntese orgânica |
| Bactéria | <i>Pseudomonas alcaligenes</i> | Aditivo de detergentes |
| Bactéria | <i>Pseudomonas mendocina</i> | Aditivo de detergentes |
| Bactéria | <i>Chromobacterium viscosum</i> | Síntese orgânica na catálise de triglicerídeos em glicerol e ácido |

Fonte: Resolução cinética enzimática de álcoois alifáticos empregando lipase de metagenômica (2015)

Sendo que as lipases microbianas apresentam uma grande diversidade de aplicações industriais, por serem mais estáveis em relação aos animais, vegetais, podem ser produzidas a baixos custos, com alta velocidade de síntese, grande versatilidade, e com maior simplicidade na manipulação ambiental e genética da capacidade produtiva dos microrganismos, sendo na maioria extracelulares, que facilita a sua extração, isolamento e purificação (Bandeira, 2015).

As lipases têm como potencial biotecnológico é de catalisar diversas reações, sendo estas a esterificação, transesterificação e a hidrólise, usando as lipases microbianas como exemplo para utilização em escala industrial.

- Indústria alimentícia: produção de aditivos alimentares-intensificação de aroma, hidrólise de gordura do leite, aceleração do processo de maturação, fabrico de derivados de queijo e hidrólise de gorduras e óleo ;
- Indústria de detergentes: hidrólise de gorduras;
- Indústria de cosméticos: remoção de lipídeos;
- Tratamento de efluentes: decomposição e remoção de substâncias oleosas;
- Química fina: síntese de ésteres;
- Indústria farmacêuticas: utilizados para reconhecimento, síntese de produtos opticamente puros, produção de antidepressivos, anti-hipertensivos e vasodilatadores;

Na química fina e na farmacêutica a utilização das lipases estão cada vez mais comuns, devido às características catalíticas de químio-, regio- e/ou estereosseletividade.

Na indústria oleoquímica também são enormes, através da transesterificação de triglicérides com álcoois de cadeia curta, podendo ser estes óleos de girassol, soja, coco e palma, entre outros.

2. Objetivo

Para adequação dos processos industriais aos princípios da Química Verde, o escalonamento de reações ambientalmente amigáveis que transformam substratos em produtos de alto valor agregado é fundamental e a biocatálise tem se mostrado como uma alternativa muito viável para tal propósito. O objetivo do trabalho, portanto, consiste na construção e implementação de um mini biorreator de leito fixo, preenchido com lipases imobilizadas em alginato de cálcio, visando à resolução cinética enzimática de acetato de linalila sob fluxo contínuo para a aplicação em síntese de (S)-linalol, muito visado para as indústrias de cosméticos.

3 - Procedimento Experimental:

Para as resoluções cinéticas realizadas, os reagentes utilizados foram: Acetato de linalila (Sigma-Aldrich, 97%), etanol grau PA (Synth, 99,5%) ou HPLC (Tedia). O tampão fosfato utilizado no primeiro momento do experimento foi feito com fosfato de sódio bifásico heptaidratado (Synth, 98-102%) e fosfato de potássio monobásico anidro (Nuclear, 98%) e o tampão Tris/HCl foi produzido com Tris base (KASVI, 99,9%) e ácido clorídrico (Fmaia, 37%). A lipase utilizada foi a CRL (*Candida Rugosa Lipase*) (Sigma-Aldrich, 2 U/mg).

Todas as extrações feitas utilizaram acetato de etila grau HPLC e sulfato de magnésio (Vetec, 98%), como agente secante.

Todas as análises de cromatografia gasosa foram feitas utilizando acetato de etila grau HPLC (Panreac, 99,9%).

As imobilizações utilizaram alginato de sódio Protanal® PC6650 e cloreto de cálcio (Vetec, 96%).

3.1- Análises cromatográficas

3.1.1- Cromatografia gasosa com detector por ionização com chama (GC-FID- Gas Chromatography- Flame Ionization Detector)

As análises em GC-FID foram realizadas em cromatógrafo gasoso SHIMADZU GC-2010 Plus utilizando a coluna RTX-5 (fase normal). O injetor utilizado foi do tipo Split em razão 1:100 e o gás de arraste foi hidrogênio a 1,22 mL.min⁻¹.

A coluna HP-5 possui as dimensões de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. O método utilizado foi: temperatura inicial 80°C (mantida por 3 minutos). velocidade de aquecimento 30°C/min, temperatura final 280°C (mantida por 3 minutos). As temperaturas do injetor e do detector foram de 260°C e 300°C, respectivamente, e as injeções foram de 1,0 µL na concentração de 0,25 e 1,5 mg.mL⁻¹.

A coluna HP-5 ocorreu em junho a quebra dele, perdendo cerca de 2,5 m, tendo como consequência a mudança no tempo de retenção.

3.1.2- Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS - Gas Chromatography- Mass Spectrometry).

A análise foi feita em cromatógrafo gasoso 7890B acoplado a espectrômetro de massas 5977A da marca Agilent, com fonte de ionização por elétrons a 70 eV. A coluna utilizada foi a HP-5MS com o seguinte método: temperatura inicial de 80°C (mantida por 30 minutos), velocidade de aquecimento de 30°C/min até a temperatura final de 280°C (mantida por 3 minutos). As temperaturas do injetor e da linha de transferência foram de 260°C e 280°C, respectivamente, utilizando-se hidrogênio como gás de arraste a uma vazão de 1,22 mL.min⁻¹. As injeções foram

feitas com volume de 1,0 μL em concentração próxima a 0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, no modo Split em razão 1:100.

3.2- Resoluções cinéticas enzimáticas

3.2.1- Resolução cinética do acetato de linalila catalisada pela enzima CRL (*Candida Rugosa Lipase*) livre no shaker de agitação orbital.

Para o erlenmeyer 1, adicionaram 10 mL de tampão fosfato 0,2 M pH 7,0 a um erlenmeyer de 250 mL e 250 mg da enzima CRL, para o erlenmeyer 2, adicionaram 40 mL de tampão de fosfato 0,2 M pH 7,0 a um erlenmeyer 250 mL e 250 mg da enzima CRL, para os erlenmeyers 3 e 4, foram os brancos das reações para avaliação dos resultados, no erlenmeyer 3, adicionar 10 mL de tampão fosfato 0,2 M e pH 7,0 e para o erlenmeyer 4, adicionar 40 mL de tampão fosfato 0,2 M pH 7,0.

Deixar os 4 erlenmeyers foram mantidos no shaker com rotação de 150 rpm e na temperatura de 30°C por 5 minutos e os substratos foram preparados em 4 eppendorfs adicionar 100 mg de acetato de linalila solubilizado em etanol grau PA ou HPLC até completar de 1,0 mL do eppendorf.

Após os 5 minutos, os substratos foram adicionados nos erlenmeyers e as alíquotas das reações foram retiradas no período de 24 horas.

3.2.2- Imobilização enzimática em esferas de alginato de cálcio.

Para a produção de esferas de alginato de cálcio com enzimas imobilizadas, solubilizar-se 15 mg de lipase de *Candida Rugosa* em 25 mL de água destilada e 25 mg de alginato de sódio foram adicionados, agitando a solução até a homogeneidade. Essa mistura foi então extrudada em solução de cloreto de cálcio 0,2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ utilizando-se de uma bomba peristáltica da marca MILAN, modelo 202, série 38 10.

3.2.3- Teste de resistência das esferas de CRL imobilizadas no tampão fosfato.

Após a formação das esferas de CRL, utilizando de um mini reator, foi elaborado um teste de resistência dessas esferas com o tampão fosfato 0,2 M pH 7,0, deixando-os agitar durante um intervalo de tempo, na qual, foi constatado que 1 hora após o início da agitação, as esferas foram destruídas uma vez que o fosfato sequestra o cálcio presente no alginato, tendo como consequência, o desprendimento das enzimas.

Foi necessário mudar o tampão utilizado, optando pelo tampão Tris-HCl 1 M, pH 7,0.

3.2.4- Resolução cinética do acetato de linalila catalisada por enzimas de *Candida Rugosa Lipase* imobilizadas.

Para o erlenmeyer 1, foi adicionado 40 mL de tampão Tris-HCl 1 M pH 7,0 a um erlenmeyer de 125 mL e 250 mg da enzima CRL imobilizada, para o erlenmeyer 2, foi adicionado 40 mL de tampão Tris-HCl 1 M pH 7.0. Os 2 erlenmeyers foram mantidos no shaker de agitação orbital a 150 rpm e na temperatura de 30°C por 5 minutos e os substratos foram preparadas em 2 eppendorfs com 100 mg de acetato de linalila solubilizado em etanol grau PA ou HPLC até a marca de 1,0 mL do eppendorf.

Após os 5 minutos, os substratos foram adicionados nos erlenmeyers, sendo que as alíquotas das reações foram retiradas em intervalos de tempo de 24 horas durante 1 semana para monitoramento em CG-FID, avaliando a conversão da reação. Após 1 semana, a mistura reacional foi filtrada para a retirada da enzima, realizando-se três extrações de 20,0 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio ($MgSO_4$) seco e filtrada para ser evaporada à pressão reduzida em um rota-evaporador.

3.2.5- Resolução cinética do acetato de linalila catalisada por enzimas de *Candida Rugosa Lipase* imobilizada e empacotadas no reator.

Para o reator, foi adicionado 42 mL de tampão Tris-HCl 1 M pH 7,0, em um frasco SCHOTT de 50 mL adaptado para o sistema, e 39 mg de acetato de linalila extraído com etanol grau PA ou HPLC, a enzima foi empacotada na coluna de reação, em determinados intervalos de tempo foram recolhidas alíquotas para monitoramento no CG-FID, onde não foi obtido êxito na reação.

3.2.6- Resolução cinética do acetato de linalila catalisada por enzimas de *Candida Rugosa Lipase* imobilizadas no shaker de agitação orbital .

Para o erlenmeyer 1, foi adicionado 40 mL de tampão Tris-HCl 1 M pH 7,0 a um erlenmeyer de 125 mL e 100 mg da enzima CRL imobilizada, para o erlenmeyer 2, foi adicionado 40 mL de tampão Tris-HCl 1 M pH 7.0. Os 2 erlenmeyers foram mantidos no shaker de agitação orbital a 109 rpm e na temperatura de 30°C por 5 minutos os substratos preparados em 2 eppendorfs com 50 mg de acetato de linalila solubilizado em etanol grau PA ou HPLC até a marca de 1,0 mL do eppendorf.

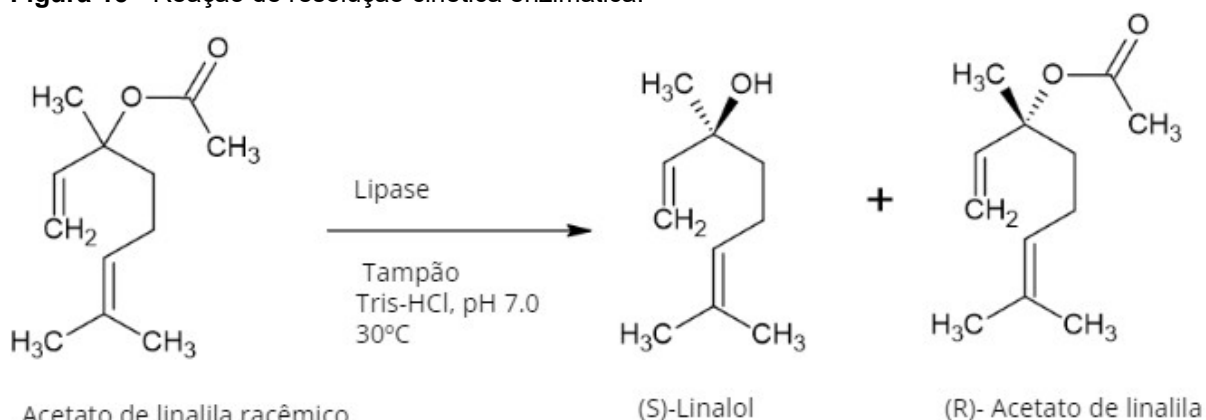
Após os 5 minutos, os substratos foram adicionados nos erlenmeyers e reiniciar a rotação em 109 rpm, sendo que as alíquotas das reações foram retiradas em intervalos de tempo de 24 horas durante 1 semana para monitoramento em CG-FID, avaliando a conversão da reação. Após 1 semana, a mistura reacional foi descontinuada e descartada.

4- Resultados e Discussões:

O objetivo principal deste projeto é desenvolvimento de um novo sistema de resolução cinética enzimática do acetato de linalila visando a obtenção do linalol enantiomericamente puro utilizando mini biorreator. para isto foi desenvolvido um reator de leito fixo com a enzima imobilizada em microesferas de alginato de cálcio.

A resolução cinética enzimática foi realizada pela lipase por uma reação de hidrólise do substrato acetato de linalila (Figura 15)

Figura 15 - Reação de resolução cinética enzimática.



Fonte: Próprio Autor. (2022)

4.1- Resolução cinética enzimática do acetato de linalila e linalol.

4.1.1- Caracterização e análise cromatográfica do acetato de linalila e do linalol.

Primeiramente os dados cromatográficos do acetato de linalila e o linalol foram obtidos para o monitoramento das reações de resolução.

Tendo à disposição os padrões analíticos do substrato acetato de linalila e do produto linalol, uma análise em GC-FID foi realizada, obtendo-se os cromatogramas, que indicam os tempos de retenção (t_R) do acetato de linalila igual a 6,442 e o do linalol igual a 5,346.

4.1.2- Resolução cinética do acetato de linalila catalisada pela enzima CRL (*Candida Rugosa Lipase*) livre no shaker de agitação orbital.

Relatado no item 3.2.1 a extração não ocorreu de forma esperada, a enzima de *Candida Rugosa Lipase* (CRL) livre forma emulsificação com o acetato de etila grau PA ou HPLC, sendo necessário mais etapas para a extração do produto, portanto, esta abordagem foi descontinuada e optou-se para a imobilização das enzimas.

4.1.3- Imobilização enzimática em esferas de alginato de cálcio.

A imobilização da lipase em alginato de cálcio é frequentemente realizada na forma de esferas, utilizando uma seringa contendo a solução de alginato de sódio com a enzima a ser imobilizada gotejando em uma solução de cloreto de cálcio, formando as esferas instantaneamente, como apresentado na Figura 16.

Figura 16 - Imobilização em forma esférica da enzima com alginato de cálcio.



Fonte: Próprio Autor.(2022)

Para avaliar o tamanho das esferas obtidas pelo método de esferificação, realizou-se um estudo relacionado aos diâmetros das agulhas disponíveis no laboratório e tamanho das esferas de alginato de cálcio obtidas. Os dados são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Diâmetros das agulhas e das esferas produzidas.

| Agulhas nº | Diâmetro agulha (mm) | Diâmetro médio esferas de alginato (mm) |
|------------|----------------------|---|
| 1 | 0,7 | 1,6 |
| 2 | 1,4 | 2,4 |
| 3 | 2,0 | 2,5 |

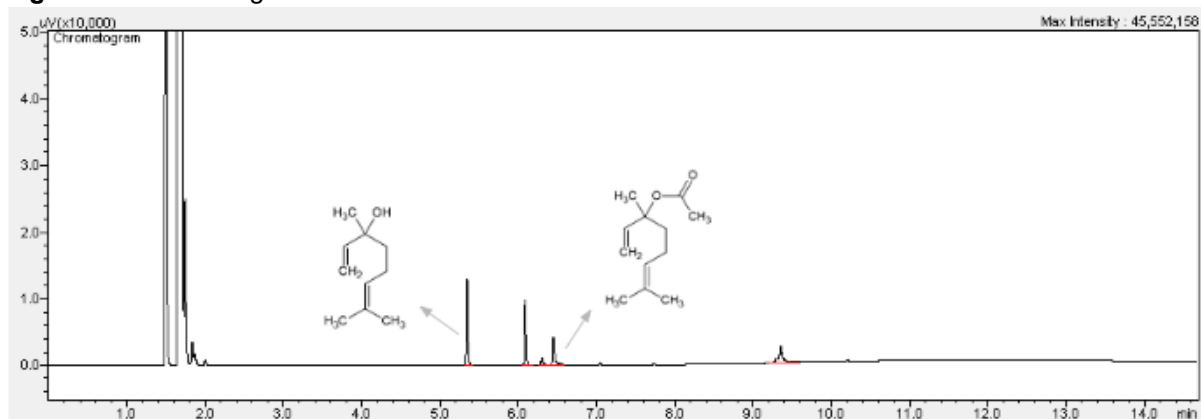
Fonte: Januário, Gabriel. (2017)

Como o objetivo era obter um microrreator, optamos por selecionar as esferas de 1,6 mm geradas quando utilizamos a agulha de diâmetro de 0,7 mm.

4.1.4- Resolução cinética do acetato de linalila catalisada por enzimas de *Candida Rugosa Lipase* imobilizadas no shaker de agitação orbital.

Como descrito no item 3.2.4, a extração dos compostos foram caracterizados por CG-FID, onde os tempos de retenção (t_R) do acetato de linalila igual a 6,449 e do linalol igual a 5,347 .

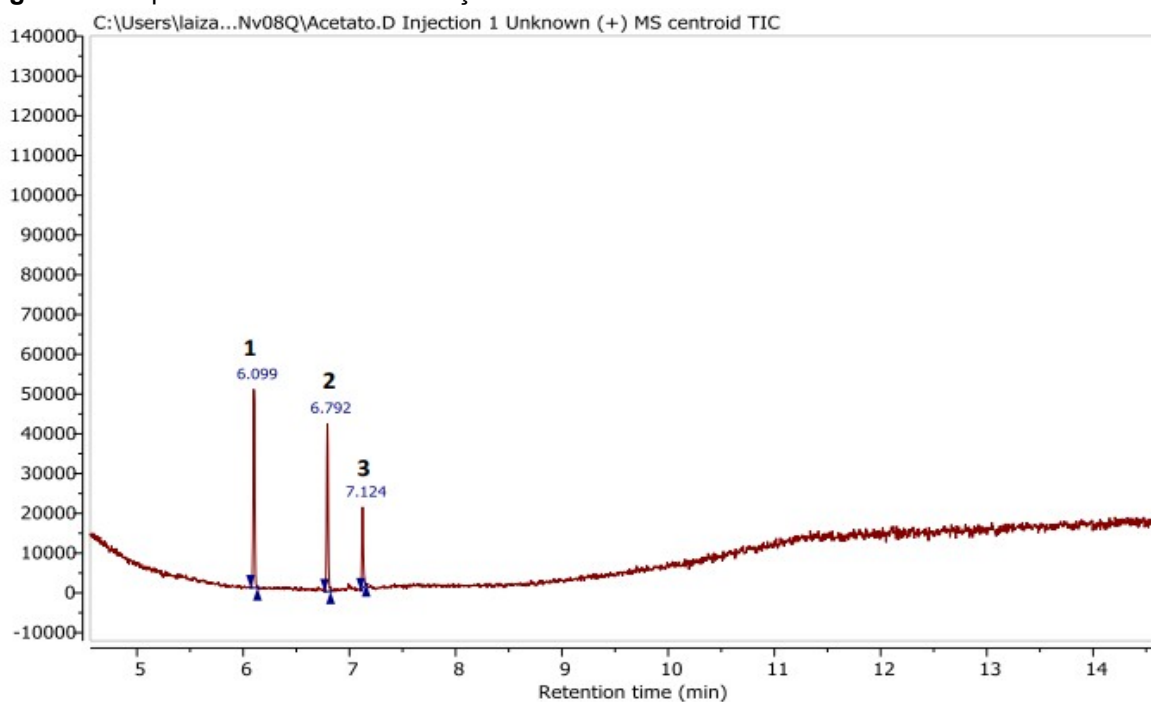
Figura 17 - Cromatografia da análise do item 3.2.4 na coluna RTX-5



Fonte: Próprio Autor (2022)

Analisando a corrida cromatográfica, observa-se que entre os picos do produto e do substrato, respectivamente, há dois picos formados, onde pela análise do CG-MS, foi identificado a formação do produto (*S*)-Linalol, a partir do pico do substrato, houve o consumo deste para a formação majoritária do produto de interesse, também foi identificado a formação dos produtos laterais da reação, são os dois picos entre os picos do substrato e produto.

Figura 18- Espectros de massas da reação.

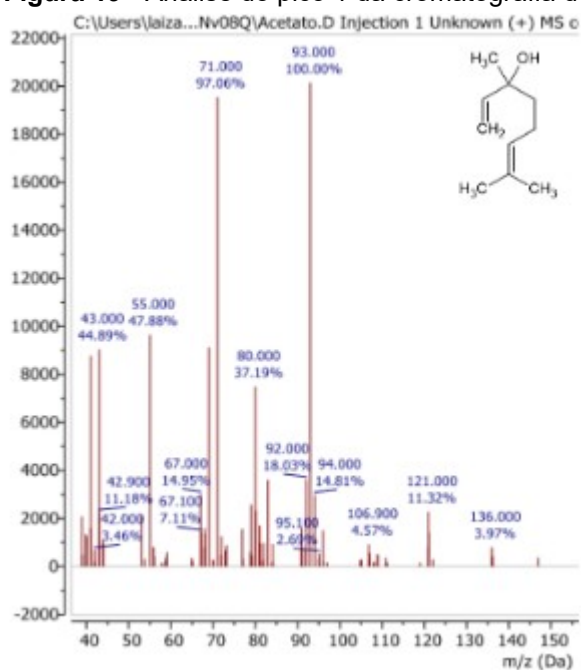


Fonte: Próprio Autor.(2022)

Analisando separadamente cada pico formado pelo CG-MS, sendo analisados cada pico respectivamente:

- Pico 1 - Identificado como linalol.

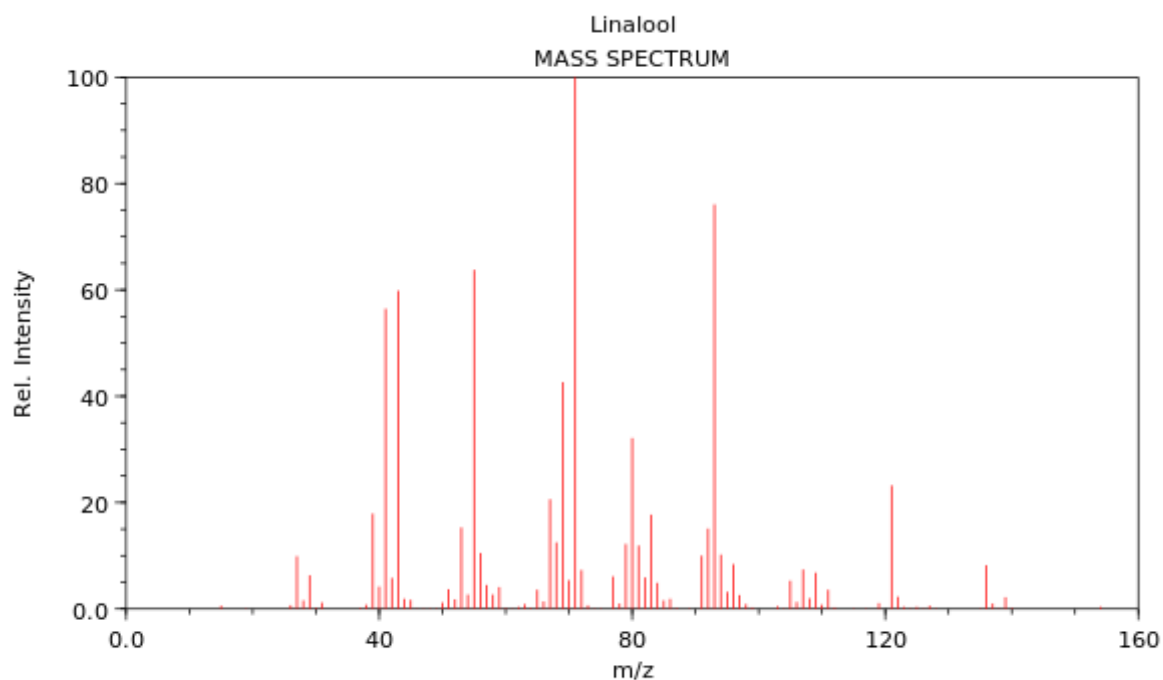
Figura 19 - Análise do pico 1 da cromatografia do CG-MS



Fonte: Próprio Autor (2022)

Pela análise foi identificado o produto linalol comparando com o espectro de massas teórico pela NIST - NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY (U.S. Department of Commerce). Disponível em: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=78-70-6>. Acessado em: 23/11/2022.

Figura 20 - Espectro de Massas do linalol

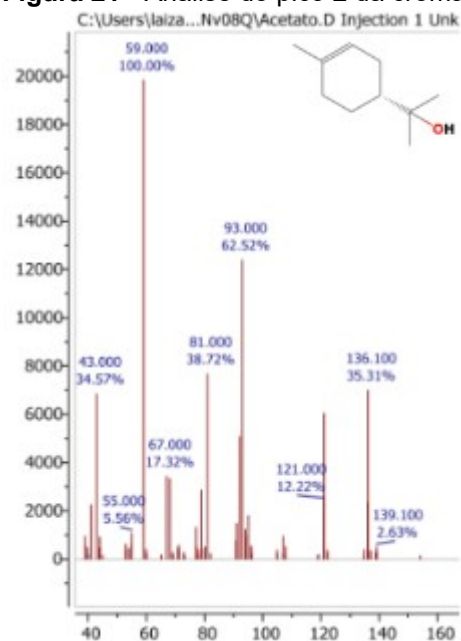


NIST Chemistry WebBook (<https://webbook.nist.gov/chemistry>)

Fonte: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=78-70-6> (2021).

- Pico 2 - Identificado como α - Terpineol.

Figura 21 - Análise do pico 2 da cromatografia do CG-MS.

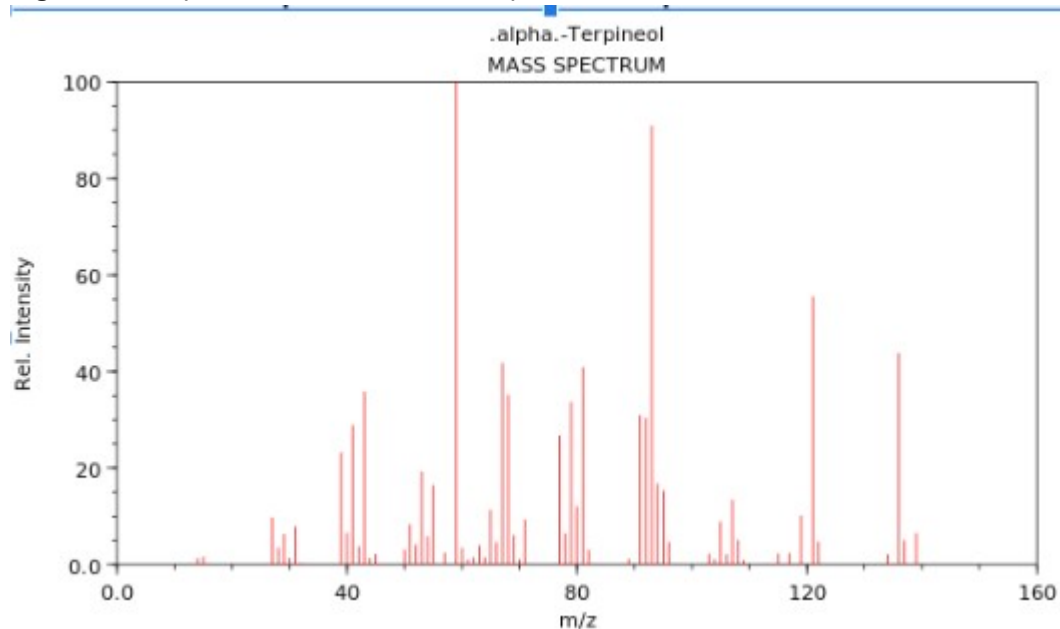


Fonte: Próprio Autor. (2022)

Pela análise foi identificado o produto linalol comparando com o espectro de massas teórico pela NIST - NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND

TECHNOLOGY (U.S. Department of Commerce). Disponível em: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=98-55-5>. Acessado em: 23/11/2022.

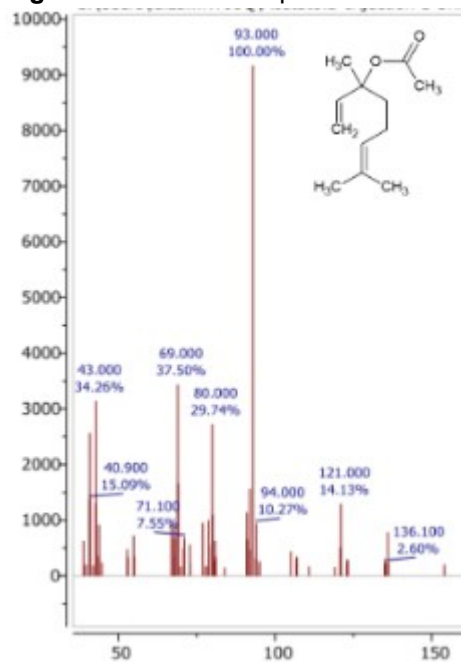
Figura 22 - Espectro de Massas do α - Terpineol.



Fonte: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=98-55-5>. (2021)

- Pico 3 - Identificado como acetato de linalila.

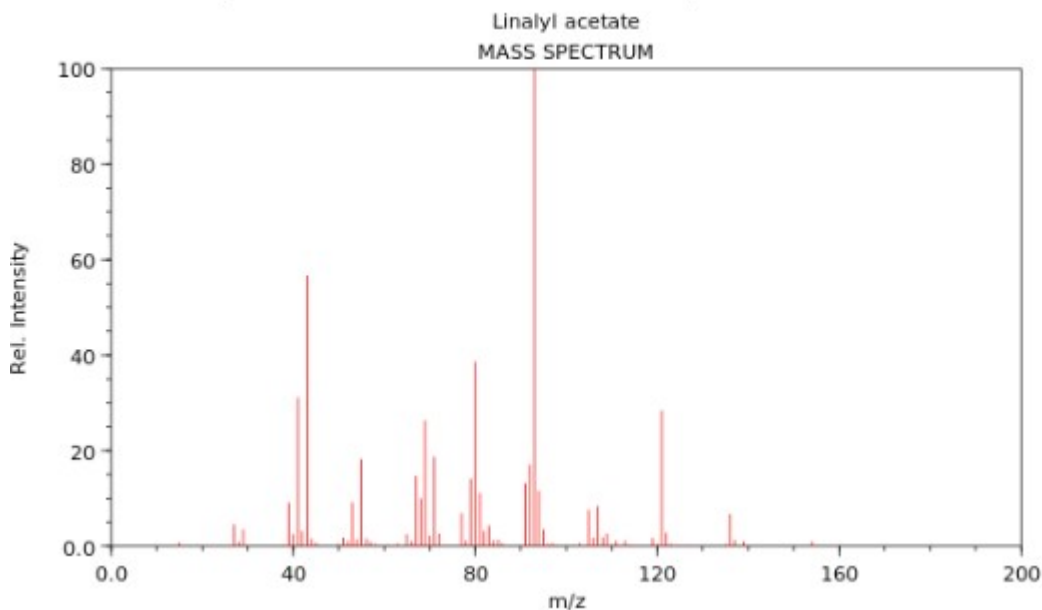
Figura 23 - Análise do pico 3 da cromatografia do CG-MS.



Fonte: Próprio Autor. (2022)

Pela análise foi identificado o produto linalol comparando com o espectro de massas teórico pela NIST - NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY (U.S. Department of Commerce). Disponível em: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C115957&Mask=200>. Acessado em: 23/11/2022.

Figura 24 - Espectro de Massas de acetato de linalila.

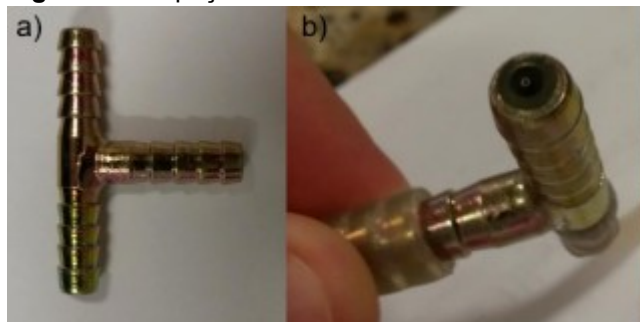


Fonte: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C115957&Mask=200> (2021)

4.1.5 - Resolução cinética do acetato de linalila catalisada por enzimas de *Candida Rugosa Lipase* imobilizada e empacotadas no reator.

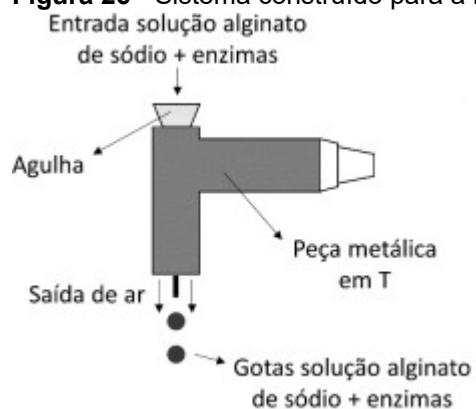
Para o reator foi necessário adaptar o diâmetro da esfera de alginato de cálcio, reduzindo o diâmetro para 1 mm em média, foi necessário utilizar uma adaptação com a bomba peristáltica e uma peça em T (Figura 25) para maior fixação da agulha. Conforme a Figura 26,

Figura 25 - A peça metálica em T



Fonte: Januário, Gabriel. (2017)

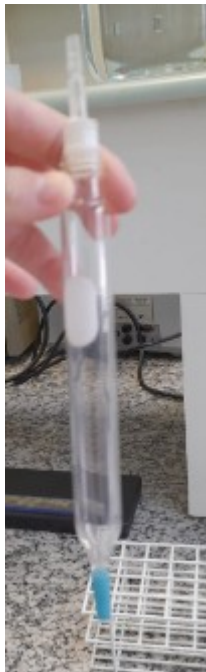
Figura 26 - Sistema construído para a redução do tamanho das esferas de alginato de cálcio



Fonte: Adaptado pelo autor.(2022)

Com a adaptação pronta foi acoplada a bomba peristáltica e configurada a velocidade 5, para a formação das esferas de tamanho adequado para o empacotamento da coluna (Figura 27), conforme a Figura 28 .

Figura 27 - Coluna sem as esferas de alginato de cálcio.



Fonte: Próprio Autor (2022)

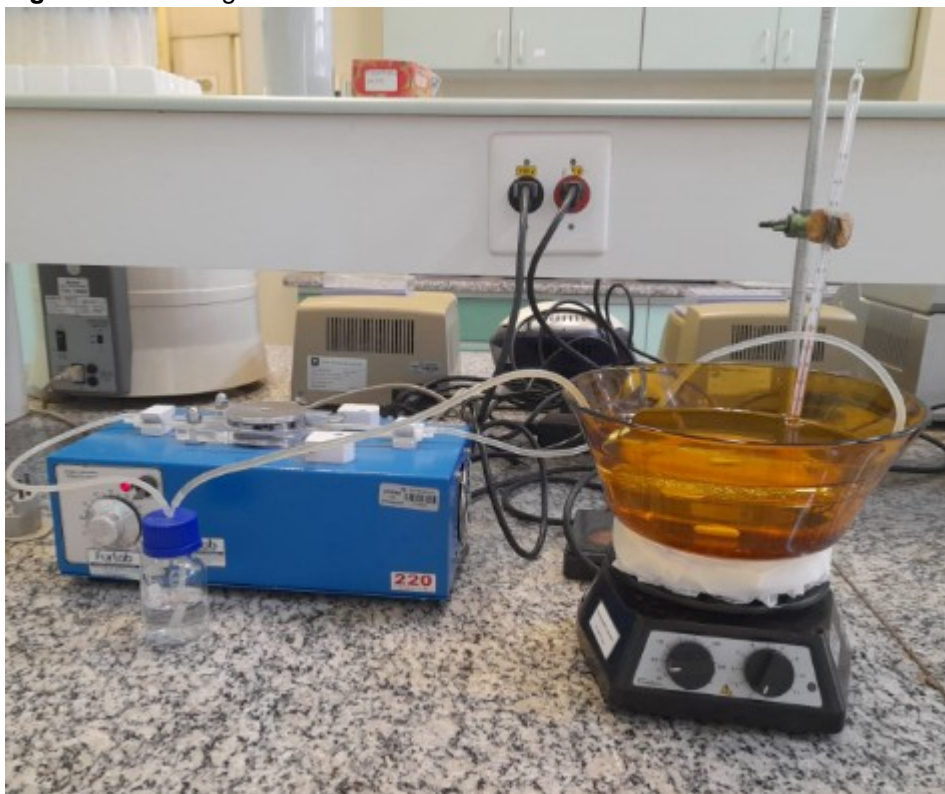
Figura 28- Coluna empacotada com alginato de cálcio.



Fonte: Próprio Autor. (2022)

Com a coluna montada e ajustando o volume de esferas de alginato de cálcio formados para preencher a coluna, foi montado o reator, representado na Figura 29 , a bomba peristáltica foi configurada a velocidade 5 que é a velocidade mínima que move os roletes responsáveis para moverem, pressionarem e fecharem a mangueira para a bomba peristáltica, ocasionando o vácuo necessário para deslocar o fluido.(SPLABOR BLOG- EQUIPAMENTOS PARA LABORATÓRIOS. Disponível em: <https://www.splabor.com.br/blog/bombas-peristalticas-2/aprendendo-mais-o-que-e-e-como-funciona-uma-bomba-peristaltica/>. Acessado em: 22/11/2022.

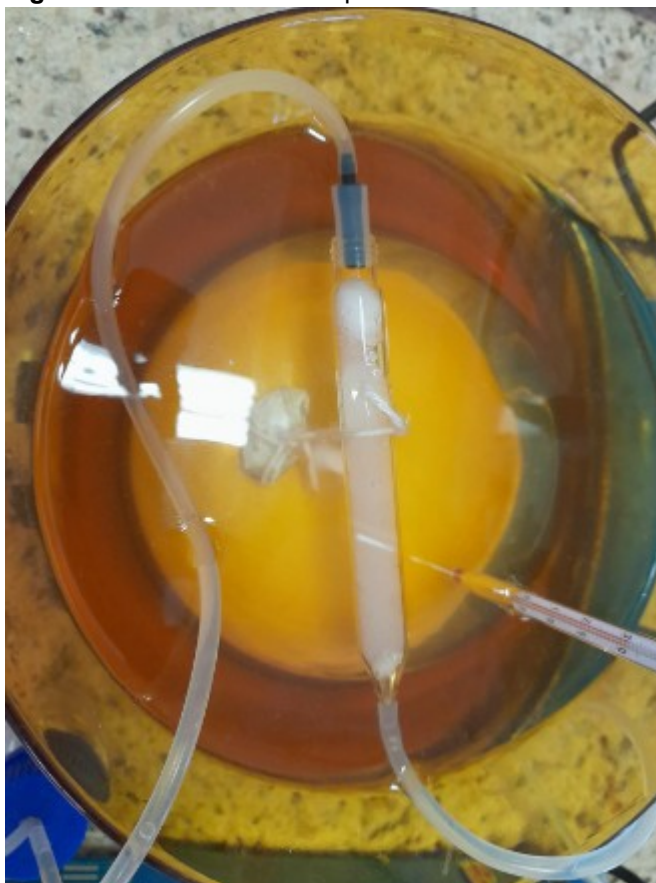
Figura 29 - Montagem do reator.



Fonte: Próprio Autor. (2022)

...
No pirex foi adicionado água até cobrir totalmente a coluna, sendo aquecido com o aquecimento do próprio agitador magnético e a temperatura controlada com o auxílio do termômetro. Foi necessário o auxílio de um peso para que a coluna continuasse submersa na água, foi utilizada uma pedra para ser esse peso conforme a Figura 30 .

Figura 30- Peso necessário para a coluna continuar imersa na água



Fonte: Próprio Autor. (2022)

Durante o experimento, foi observado que a bomba peristáltica durante um determinado intervalo de tempo, os roletes e conseqüentemente o movimento circular do equipamento era parado, ocasionando que o substrato pode ter sido retido, não tendo contato com as esferas imobilizadas de CRL.

Na análise do CG-FID, não foi localizada a corrida do substrato quando retirada a alíquota da reação, e esse mesmo resultado foi observado na alíquota concentrada da reação, e portanto, como não se obteve êxito na reação pelo reator, foi retornado ao shaker de agitação orbital.

4.1.6- Resolução cinética do acetato de linalila catalisada por enzimas de *Candida Rugosa Lipase* imobilizadas no shaker de agitação orbital.

Conforme o item 4.1.4, foi realizado novamente a reação no termo shaker, onde a corrida cromatográfica ficou idêntica ao anterior, formando novamente os subprodutos.

5 - Conclusão

Diversas condições reacionais para a resolução cinética enzimática do acetato de linalila foram avaliadas para tornar a reação mais apropriada, como o tipo de solvente e o tipo de enzima. O melhor resultado obtido foi a resolução cinética enzimática via hidrólise do acetato de linalila catalisada pela lipase imobilizada de *Candida Rugosa* a 30 °C, onde foi observada a produção do produto de interesse e de subprodutos.

A mesma reação foi novamente estudada para um mini biorreator, que durante o experimento não houve êxito, podendo ser a quantidade de substrato utilizada ter sido diluída durante o experimento e/ou a bomba peristáltica não rotacionar durante um prolongado período de tempo. Devido ao estudo do cromatograma obtido por GC-FID não obter o pico do substrato acetato de linalila e nem do produto (S)-linalol.

6- Referências:

QUINARÍ, **Acetato de linalila**, 2022. Disponível em: <https://www.quinari.com.br/loja/acetato-de-linalila/>. Acessado em: 07.nov.2022.

QUINARÍ, **Linalol**,2022. Disponível em: <https://www.quinari.com.br/loja/linalol/>. Acessado em: 07.nov.2022.

MJLPHD, **Linalool synthesis using sodium acetylide**, 2013. Disponível em:<https://www.mjlphd.net/blog/linalool-synthesis-using-sodium-acetylide>. Acessado em: 07.nov.2022.

THE NOBEL PRIZE, **Leopold Ruzicka Biographical**, 2022. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1939/ruzicka/biographical/>. Acessado em : 07.nov.2022.

AZAMBUJA,W.,**Linalol**, Oleos essenciais.org, 2011. Disponível em: <https://www.oleos essenciais.org/linalol/>. Acessado em: 07.nov.2022

BY SAMIA, **Sobre as novas diretrizes para produção de cosméticos com óleos essenciais que contenham um certo teor de Linalol**, 2013.Disponível em: <https://bysamia.com/2013/11/05/sobre-as-novas-diretrizes-para-producao-de-cosmeticos-com-oleos-essenciais-que-contenham-um-certo-teor-de-linalol/>. Acessado em: 07.nov.2022

METYCH,M., **Sir William Perkin**, Britannica, 2022(?). Disponível em:<https://www.britannica.com/biography/William-Henry-Perkin>. Acessado em:07.nov.2022

AMDA, **Pau-rosa: sua própria essência quase a levou a extinção**, ASSOCIAÇÃO MINEIRA DE DEFESA DO AMBIENTE,2013. Disponível em: <https://www.amda.org.br/index.php/comunicacao/especie-da-vez/2645-pau-rosa-sua-propria-essencia-quase-a-levou-a-extincao>. Acessado em: 07.nov.2022

Portal Amazônia, **Pau-rosa: o fixador de perfume da floresta amazônica**,2021. Disponível em: <https://portalamazonia.com/amazonia/pau-rosa-o-fixador-de-perfume-da-floresta-amazonica>. Acessado em: 07.nov.2022.

ERENO,D., **Pau-rosa nº5**, Revista Pesquisa FAPESP, 2005. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/pau-rosa-n5/>. Acessado em: 07.nov.2022

BARATA, Lauro. **Lauro Barata: A rede de riqueza natural**. Entrevista cedida a Maria Guimarães. **Revista Pesquisa FAPESP**, 05.nov.2019. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/lauro-barata-a-rede-da-riqueza-natural-2/>. Acessado em:07.nov.2022.

VAZ.M. CHOUPINA,A. **Lipases: Biocatalisadores da Hidrólise de Triacilgliceróis = Lipases: Biocatalysts of the hydrolysis of triacylglycerols**. **Encontros BIBLI: Revista Eletrônica de Biologia, REB Volume 5 (3): 42-58,2012, ISSN 1983-7682**. Disponível em:<https://core.ac.uk/download/pdf/153411769.pdf>. Acessado em: 07.nov.2022.

MENDES,C.C.R.MONTEIRO,A.M.G. TOLEDO.A.S.OTSUBO.B.K.V. de SOUZA.I. C. R.de MORAIS.I.O. MACHADO. L.C. de S. **Correlação entre os componentes químicos e propriedades terapêuticas dos óleos essenciais na diminuição de sintomas clínicos em cada sistema do corpo humano = Correlation between chemical components and therapeutic properties of essential oils in the reduction of clinical symptoms in each system of the human body**. **Encontros BIBLI: Brazilian Journal of Health Review, Curitiba, v.5,n.1,p. 741-760, jan/feb 2022. ISSN: 2595-6825, DOI: 10.34119/bjhrv5n1-063**. Disponível em: <https://brazilianjournals.com/ojs/index.php/BJHR/article/view/42670/pdf>. Acessado em: 07.nov.2022

SILVEIRA,J.C. BUSATO.N.V. da COSTA.A.O.S. JUNIOR.E.F.da C. **LEVANTAMENTO E ANÁLISE DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS**. **Encontro BIBLI: ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8,n.15; p.2052. 2012**. Disponível em:<https://www.conhecer.org.br/enciclop/2012b/ciencias%20exatas%20e%20da%20terra/levantamento%20e%20analise.pdf>. Acessado em: 07.nov.2022.

JUNIOR,W.H.P. CHOU.T.Q. **LXII.- Experiments on the Synthesis of the Terpenes. Part XVII. d-A3-p-Menthenol(8) and d-A3:'(')- p-Menthadiene**, **Encontro BIBLI: The University of Manchester Library, Published on 01.jan. 1991**. Disponível em:http://www.simm.cas.cn/zcg/zcg_lwzz/201512/W020151209651698913986.pdf. Acessado em: 07.nov.2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, **RESOLUÇÃO- RDC Nº2, DE 15 DE JANEIRO DE 2007**, p.2, Disponível em: central3.to.gov.br/arquivo/281221/. Acessado em: 07.nov.2022.

PRAGADHEESH.V.S.CHANOTIYA.C.S.RASTOGI.S.SHASANY.A.K. **Scent from *Jasminum grandiflorum* flowers: Investigation of the change in linalool enantiomers at various developmental stages using chemical and molecular**

methods. Encontro BIBLI: ELSEVIER, Volume 140, p.83-94, Aug.2017.
DOI:<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.04.018>. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S003194221730167X>.
Acessado em: 07.nov.2022.

BANDEIRA.P.T. Resolução Cinética Enzimática de Álcoois Alifáticos Empregando Lipase de Metagenômica. Orientador: Leandro Piovan. Dissertação [Mestrado em Química]- Faculdade de Química, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2015. Disponível em:
<https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/45310/R%20-%20D%20-%20PAMELA%20TAISLINE%20BANDEIRA.pdf?sequence=1>. Acessado em: 07.nov.2022.

Lorenzi,Harri.**Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil.**2.ed.-.Nova Odessa:Instituto Plantarum, 1998,Print.

Costa, Aloisio Fernandes. **Elementos da flora aromática: O Laboratório de Farmacognosia no estudo de óleos essenciais de Portugal e Angola.** Lisboa: Junta de Investigações Científicas do Ultramar,1975.Print.

Yunes, Rosendo Augusto. et al. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia.** Itajaí:Universidade do Vale do Itajaí, 2007.Print. Cap 9- Óleos essenciais : importância e perspectivas terapêuticas, p-211- 232.

Poucher,W.A. **Perfumes, Cosmetics and Soaps.**9.ed. Vol.2.-. London:Chapman and Hall,1991.Print. p- 8-9.

Poucher,W.A. **Perfumes, Cosmetics and Soaps.**9.ed. Vol.3.-. London:Chapman and Hall,1991.Print. p- 663.