

GABRIEL OLIVEIRA JANUÁRIO

*Resolução Cinética Enzimática em Síntese Orgânica:
Desenvolvimento de Mini Biorreatores*

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
2017

GABRIEL OLIVEIRA JANUÁRIO

**RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA EM SÍNTESE ORGÂNICA:
DESENVOLVIMENTO DE MINI BIORREATORES**

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

Araraquara, 13 de Dezembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

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

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

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

Para Fernando, Fátima, Letícia, Mel e Meg.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre, pela orientação, paciência, incentivo e amizade.

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

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

Aos integrantes do Milagre Research Group, pela amizade e pela convivência diária.

Aos funcionários do Instituto de Química.

À FAPESP e ao CNPq, pelo apoio financeiro para 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 até aqui.

À Manuella, pelo amor, pela amizade e pelas palavras de incentivo em todos os momentos.

Aos meus grandes companheiros durante os anos de graduação: Douglas, Leonardo, Walter, Diego, Vinícius e Allan.

*Chemistry itself can be neither 'good' or 'bad' in a moral sense(...).
Chemists, however, possess the knowledge and skills to make decisions (...) that
can result in immense benefit to society or cause harm to life and living systems.*

(Paul T. Anastas and John C. Warner)

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidos mini biorreatores de leito fixo, preenchidos com lipases imobilizadas em esferas de alginato de cálcio, para aplicação na resolução cinética em fluxo contínuo de blocos construtores quirais. Para estes sistemas foram avaliadas diversas condições reacionais como: i) reação para a resolução cinética enzimática; ii) tipo de lipase; iii) solvente reacional; iv) temperatura e v) substrato. A melhor condição obtida foi para a hidrólise do acetato de 1-feniletila catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* em meio aquoso à 40 °C, onde foram obtidos os melhores resultados de conversão e excesso enantiomérico. Posteriormente, foi realizada a etapa de imobilização da lipase, onde a maior conversão reacional e o maior excesso enantiomérico foram obtidos com a enzima imobilizada em esferas de alginato de cálcio com diâmetro de 1,0 mm. Constatada a ótima atividade catalítica dos biocatalisadores imobilizados, estas condições reacionais foram transpostas para um mini biorreator, desenvolvido para realização da reação em fluxo contínuo. Os resultados obtidos se mostraram muito promissores para a aplicação na síntese assimétrica de blocos construtores, atingindo ótimos excessos enantioméricos.

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

ABSTRACT

In this work, we developed a continuous-flow mini bioreactor packed with calcium alginate beads to perform the enzymatic kinetic resolution of chiral building blocks. Several reaction conditions as i) the kind of reaction for the kinetic resolution, ii) type of lipase, iii) reaction media, iv) temperature and v) substrate were evaluated. The best result was obtained for the hydrolysis of 1-phenylethyl acetate catalyzed by the lipase from *Burkholderia cepacia* on water media at 40 °C, which reached the best conversion and enantiomeric excess. The immobilization of the lipase was performed, the immobilized biocatalysts were tested for the selected reaction and the best results acquired were for the 1,0 mm diameter calcium alginate beads. Then, a mini bioreactor was developed to work with the best conditions achieved, but now in continuous-flow mode, which gave excellent results in terms of conversion and enantiomeric excess, making it a promising system for the asymmetric synthesis of building blocks.

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

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Hidrólise de acilgliceróis catalisada por lipase.
- Figura 2 – Mecanismo das serina hidrolases.
- Figura 3 – Resolução cinética enzimática da (*rac*)-1-feniletilamina (**1**).
- Figura 4 – Perfil do sítio catalítico das lipases com a molécula de **1**.
- Figura 5 – Tipos de imobilização.
- Figura 6 – Estrutura do alginato.
- Figura 7 – Ligações cruzadas no alginato de cálcio.
- Figura 8 – Configurações de reatores. a) leito fixo, b) leito fluidizado, c) membrana, d) tanque agitado.
- Figura 9 – Reação para a síntese de **2**.
- Figura 10 – Reação para a síntese de **3**.
- Figura 11 – Reação para a síntese de **4**.
- Figura 12 – Vias da resolução cinética dos substratos modelos.
- Figura 13 – Cromatograma da análise de **1** na coluna RTX-5.
- Figura 14 – Resultados da análise de GC-MS de (*rac*)-**2**.
- Figura 15 – Cromatogramas superpostos das análises de **1** e **2** na coluna RTX-5.
- Figura 16 – Cromatograma da análise de (*rac*)-**1** coluna HYDRODEX β -3P.
- Figura 17 – Cromatogramas superpostos das análises de (*rac*)-**1** e (*S*)-**1** na coluna HYDRODEX β -3P.
- Figura 18 – Cromatograma da análise de (*rac*)-**2** na coluna HYDRODEX β -3P.
- Figura 19 – Cromatogramas superpostos das análises de (*rac*)-**2** e (*S*)-**2** na coluna HYDRODEX β -3P.
- Figura 20 – Resolução cinética enzimática para **1**.
- Figura 21 – Perfil cinético da condição B de resolução cinética para **1**.
- Figura 22 – Reação para a resolução cinética de **1** via hidrólise de **2**.
- Figura 23 – Análise de **3** na coluna RTX-5.
- Figura 24 – Cromatograma e espectro de massas para análise via GC-MS de **4**.
- Figura 25 – Cromatogramas superpostos das análises de **3** e **4** na coluna RTX-5.
- Figura 26 – Cromatograma da análise de (*rac*)-**3** na coluna HYDRODEX β -3P.
- Figura 27 – Cromatogramas superpostos das análises de (*rac*)-**3** e (*S*)-**3** na coluna HYDRODEX β -3P.

Figura 28 – Cromatograma da análise de (*rac*)-**4** na coluna HYDRODEX β -3P.

Figura 29 – Cromatogramas superpostos das análises de (*rac*)-**4** e (*S*)-**4** na coluna HYDRODEX β -3P.

Figura 30 – Reação da resolução cinética de **3** pela hidrólise de **4**.

Figura 31 – Cromatograma da alíquota da extração da condição B.

Figura 32 – Método de imobilização por gotejamento.

Figura 33 – Sistema construído para redução do tamanho das esferas de alginato de cálcio.

Figura 34 – Partes do sistema de extrusão. a) peça metálica em T; b) agulha presa à peça metálica; c) bomba de ar Master®; d) válvula dupla de plástico; e) sistema de extrusão.

Figura 35 – Reação da resolução cinética enzimática de **3** pela hidrólise de **4** com lipases imobilizadas.

Figura 36 – Cromatograma referente à extração do meio reacional da resolução cinética enzimática de **3** pela hidrólise de **4** na coluna HYDRODEX β -3P.

Figura 37 – Perfil cinético e excessos enantioméricos da resolução cinética enzimática de **3** pela hidrólise de **4** na presença de lipase imobilizada.

Figura 38 – Mini Biorreatores, a) Biorreator A, b) Biorreator B.

Figura 39 – Reator C.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Aplicações industriais de biocatalisadores.

Tabela 2 – Resultados para a resolução cinética enzimática de álcoois e aminas secundários com diferentes lipases.

Tabela 3 – Resultados para a resolução cinética de **1**.

Tabela 4 – Resultados para a resolução cinética de **3** via hidrólise de **4**.

Tabela 5 – Diâmetros das agulhas e das esferas produzidas.

Tabela 6 – Condições e resultados da resolução cinética enzimática em fluxo contínuo para o reator B.

Tabela 7 – Condições e resultados da resolução cinética enzimática em fluxo contínuo para o reator C.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCL – Lipase de *Burkholderia cepacia*

DMAP – Dimetilaminopiridina

ee – excesso enantiomérico

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

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas

CCD – Cromatografia em camada delgada

t_R – Tempo de retenção

SUMÁRIO

1	Introdução	14
1.1	Lipases	16
1.2	Imobilização de biocatalisadores	21
1.3	Reatores	23
2	Objetivo	26
3	Parte experimental	27
3.1	Análises cromatográficas	27
3.1.1	Cromatografia em camada delgada (CCD)	27
3.1.2	Cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (GC-FID – Gas Chromatography - Flame Ionization Detector)	28
3.1.3	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS – Gas Chromatography – Mass Spectrometry)	28
3.2	Análise e síntese dos padrões reacionais	29
3.2.1	Síntese da 1-feniletacetamida (2)	29
3.2.2	Síntese do 1-feniletanol (3)	30
3.2.3	Síntese do acetato de 1-feniletila (4)	30
3.3	Resoluções cinéticas enzimáticas	31
3.3.1	Resolução cinética da 1-feniletilamina (1) catalisada pela enzima NOVOZYM 435 utilizando o acetato de vinila como doador de acila	31
3.3.2	Resolução cinética da 1-feniletilamina (1) catalisada pela enzima NOVOZYM 435 utilizando o acetato de etila como doador de acila	32
3.3.3	Resolução cinética da 1-feniletilamina (1) catalisada pela lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> utilizando o acetato de etila como doador de acila	32
3.3.4	Resolução cinética da 1-feniletilamina (1) através da hidrólise da 1-feniletacetamida (2) utilizando a lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	33
3.3.5	Resolução cinética do 1-feniletanol (3) através da hidrólise de acetato de 1-feniletila (4)	34
3.4	Imobilização enzimática em esferas de alginato de cálcio	35

3.5 Resolução cinética enzimática do 1-feniletanol (3) através da hidrólise do acetato de 1-feniletila (4) na presença de enzimas imobilizadas	35
3.6 Resolução cinética enzimática do 1-feniletanol (3) através da hidrólise do acetato de 1-feniletila (4) em fluxo contínuo.....	36
4 Discussão e resultados	37
4.1 Resolução cinética enzimática da 1-feniletilamina (1)	38
4.1.1 Caracterização e análise cromatográfica da 1-feniletilamina (1) e da 1-feniletilacetamida (2).....	38
4.1.2 Análise quiral da 1-feniletilamina (1) e da 1-feniletilacetamida (2)	40
4.1.3 Resoluções cinéticas enzimáticas da 1-feniletilamina (1)	42
4.1.4 Resolução cinética enzimática da 1-feniletilamina (1) através da hidrólise da 1-feniletilacetamida (2)	44
4.2 Resolução cinética enzimática do 1-feniletanol (3).....	45
4.2.1 Caracterização e análise cromatográfica do 1-feniletanol (3) e do acetato de 1-feniletila (4)	45
4.2.2 Análise quiral do 1-feniletanol (3) e do acetato de 1-feniletila (4).....	47
4.2.3 Resolução cinética do 1-feniletanol (3) através da hidrólise de acetato de 1-feniletila (4).....	49
4.3 Imobilização enzimática em esferas de alginato de cálcio.....	50
4.4 Resolução cinética do 1-feniletanol (3) pela hidrólise do acetato de 1-feniletila (4) com enzimas imobilizadas	53
4.5 Construção dos mini biorreatores e resolução cinética do 1-feniletanol (3) em fluxo contínuo.....	54
5 Conclusão	59
6 Referências.....	60

1 Introdução

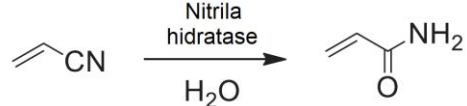
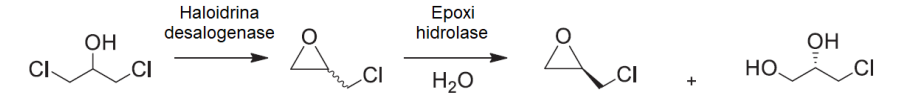
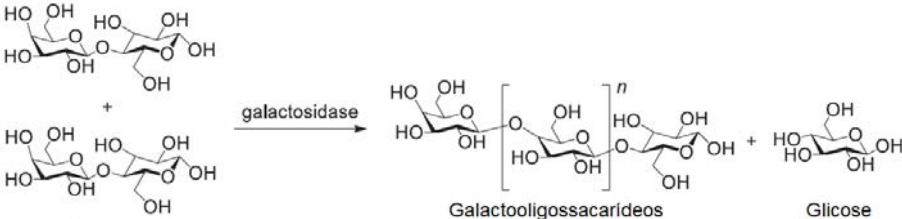
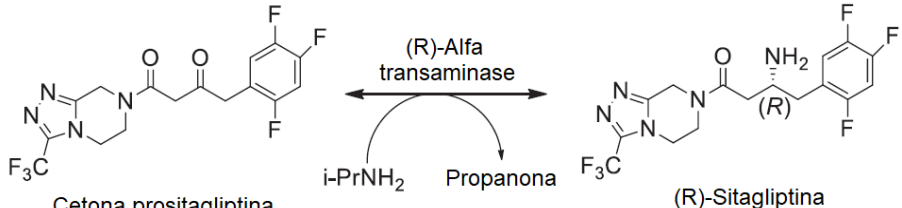
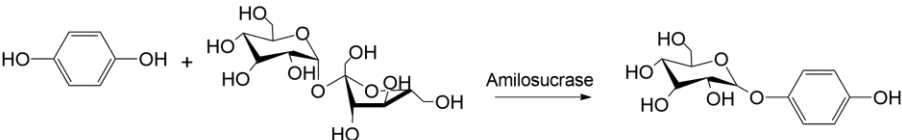
A biocatálise é definida como o processo pelo qual catalisadores biológicos, usualmente células ou enzimas, realizam transformações orgânicas. Antes mesmo de adquirir os conhecimentos químicos mais básicos, o ser humano já utilizava a biocatálise na confecção de alimentos e bebidas, mas só no início da década de 80 é que os pesquisadores passaram a utilizar essa ferramenta da natureza em reações de síntese orgânica (Sheldon e Pereira, 2017).

Nas três últimas décadas, os estudos na área de biocatálise aumentaram gradativamente (Riva, 2013; Truppo, 2017), pois o uso de biocatalisadores apresenta grandes vantagens como: são biodegradáveis, biocompatíveis, oriundos de fontes renováveis, possuem alta quimio, regio e enantiosseletividade e viabilizam reações em condições mais brandas, diminuindo gastos energéticos (Faber, 2011; Gonçalves e Marsaioli, 2013; Ringborg e Woodley, 2016; Ferreira-Leitao *et al.*, 2017; Sheldon e Pereira, 2017; Sheldon e Woodley, 2017).

Mundialmente, cerca de 80% dos processos químicos se utilizam de catalisadores (Faber, 2011), os quais o uso é praticamente necessário para obtenção de um processo rápido e eficaz. Outro aspecto, entretanto, tem ganhado grande importância nas últimas décadas: a sustentabilidade. Portanto, a fim de unir essas três características, processos baseados nos princípios da Química Verde têm sido almejados e aplicados, tendo a biocatálise como um dos pilares para alcançá-los com eficiência (Truppo, 2017).

Os processos industriais que já utilizam biocatalisadores são bastante diversos, como exemplificado na Tabela 1. As aplicações ocorrem para indústrias de química fina e pesada, farmacêutica, alimentícia e cosmética (Choi *et al.*, 2015).

Tabela 1 – Aplicações industriais de biocatalisadores.

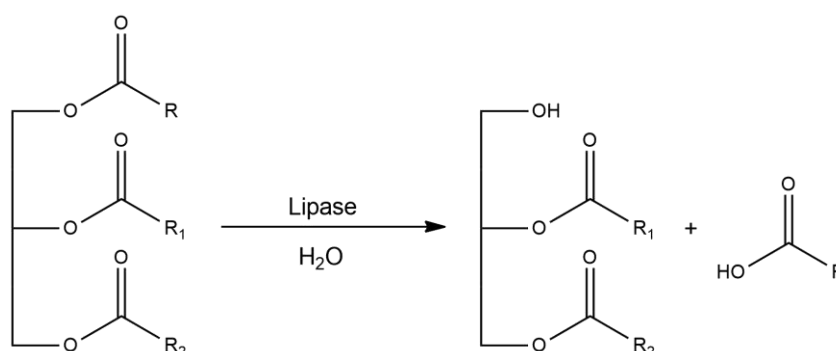
Processo	Companhia/ Referência
 <p data-bbox="459 600 927 629">Acrlonitrila $\xrightarrow[\text{H}_2\text{O}]{\text{Nitrila hidratase}}$ Acrilamida</p>	<p data-bbox="1190 488 1406 629">Mitsubishi Rayon / Cui <i>et al.</i>, 2014</p>
 <p data-bbox="245 824 1150 853">1,3-dicloro-2-propanol $\xrightarrow{\text{Haloidrina desalogenase}}$ (rac)-Epicloridrina $\xrightarrow[\text{H}_2\text{O}]{\text{Epoxi hidrolase}}$ (R)-Epicloridrina + 3-cloro-1,2-propanodiol</p>	<p data-bbox="1198 678 1398 891">The Dow Chemical Company / Jin e Ouyang, 2015</p>
 <p data-bbox="245 1160 1150 1178">Lactose $\xrightarrow{\text{galactosidase}}$ Galactooligosacarídeos + Glicose</p>	<p data-bbox="1179 925 1417 1182">Yakult Pharmaceutical Industry Co. / Rodríguez-Colinas <i>et al.</i>, 2011</p>
 <p data-bbox="245 1473 1150 1496">Cetona pro-sitagliptina $\xrightarrow[\text{50\% DMSO}]{\text{(R)-Alfa transaminase}}$ (R)-Sitagliptina 99.95% e.e.</p>	<p data-bbox="1187 1305 1406 1485">Merck Sharp & Dohme Corp. / Thalen <i>et al.</i>, 2009</p>
 <p data-bbox="245 1731 1150 1753">Hidroquinona + Sacarose $\xrightarrow{\text{Amiloscucrase}}$ Arbutina</p>	<p data-bbox="1182 1619 1417 1720">Ezaki Glico Co. / Seo <i>et al.</i>, 2012</p>

1.1 Lipases

As lipases são enzimas denominadas de triacilglicerol hidrolases, e são classificadas pelo *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* como EC 3.1.1.3, o que significa que são hidrolases (EC 3) que atuam em ligações éster (EC 3.1) de ésteres carboxílicos (EC 3.1.1) e que são lipases (EC 3.1.1.3) (Webb, 1992).

Na natureza, as lipases são encontradas em plantas, animais e micro-organismos, onde atuam na hidrólise de acilgliceróis, como apresentado na Figura 1. Por atuarem em substratos insolúveis em água, as lipases são conhecidas por sua resistência a solventes orgânicos, usualmente mais utilizados em processos sintéticos. Além disso, o amplo espectro de substratos no qual atuam permite que essas enzimas sejam largamente utilizadas em vários processos e, portanto, são produzidas em grande escala para comercialização, atingindo toneladas/ano (Bornscheuer e Kazlauskas, 2006; Angajala *et al.*, 2016).

Figura 1– Hidrólise de acilgliceróis catalisada por lipase.

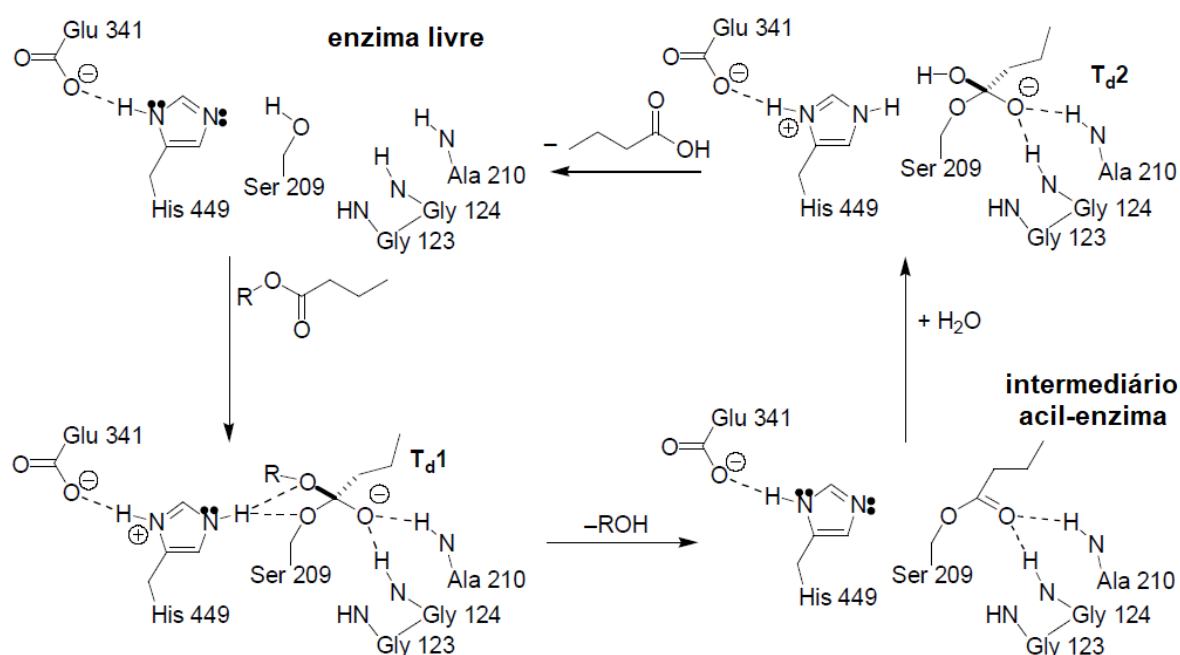


Fonte: autor.

O mecanismo para uma reação de hidrólise promovida por uma lipase envolve uma tríade catalítica formada pelos aminoácidos ácido aspártico, histidina e serina, sendo denominadas serina hidrolases (Angajala *et al.*, 2016). O mecanismo da hidrólise catalisada pelas serina hidrolases é apresentado na Figura 2 e consiste de duas etapas: na primeira, o resíduo de ácido aspártico abstrai um próton do nitrogênio do anel imidazólico da histidina, que por sua vez abstrai um próton da hidroxila do resíduo de serina para manter a aromaticidade do anel. Com um par de elétrons livres, o oxigênio da serina realiza um ataque nucleofílico ao doador de acila, liberando um alcóxido, que é rapidamente protonado ao álcool correspondente. Ao fim desta etapa,

o intermediário acil-enzima é estabelecido, possibilitando o começo do segundo passo, que se caracteriza pelo ataque nucleofílico de uma espécie ao carbono carbonílico do grupo acetil. Os resíduos de aminoácidos da tríade retornam então aos seus estados iniciais pela transferência de prótons inversa à ocorrida na primeira etapa, enquanto o produto é liberado do sítio catalítico da enzima (Bornscheuer e Kazlauskas, 2006; Faber, 2011).

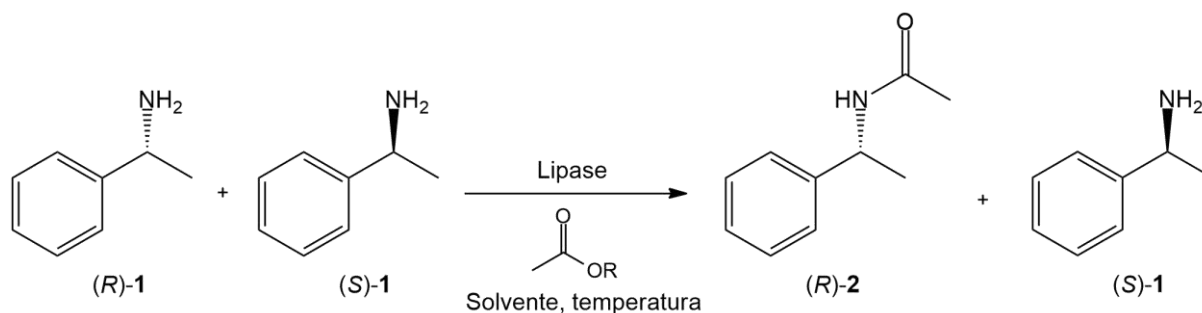
Figura 2 – Mecanismo das serina hidrolases.



Fonte: Adaptado de Bornscheuer e Kazlauskas, 2006.

Uma das maiores aplicações industriais das lipases está focada na área de química fina para a resolução cinética de blocos construtores em síntese orgânica, muito utilizados na indústria farmacêutica (Patel, 2017). Nesse processo, as lipases atuam como agentes quirais e interagem de maneira distinta com os enantiômeros de um racemato. Com isso, somente um dos enantiômeros é transformado no produto, enquanto o outro permanece inalterado, resultando em um rendimento teórico de 50%. Na Figura 3 está representada a resolução cinética enzimática da (*rac*)-1-feniletilamina (**1**).

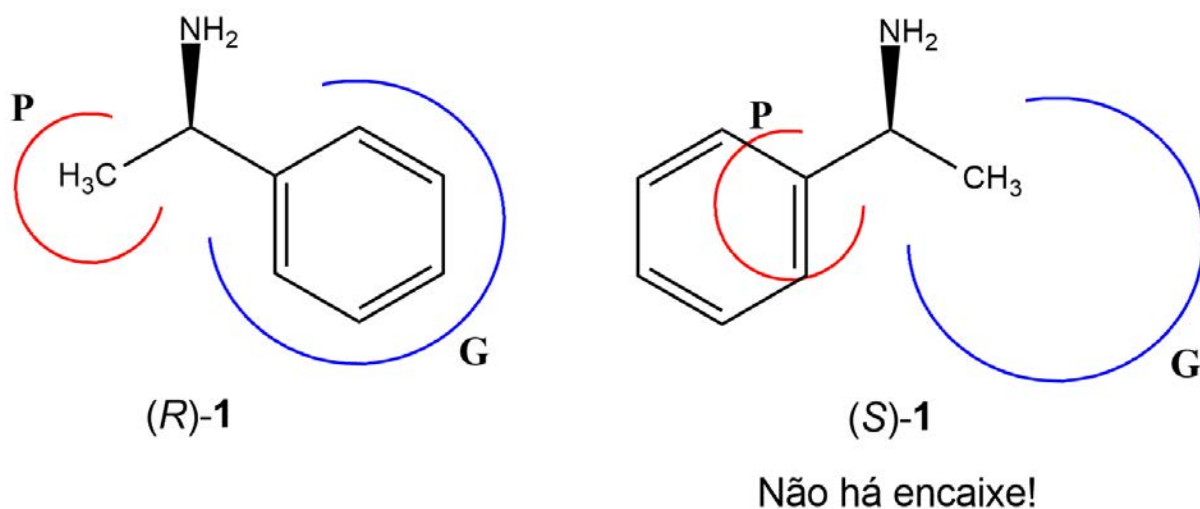
Figura 3 – Resolução cinética enzimática da (*rac*)-1-feniletilamina (**1**).



Fonte: autor.

Nas lipases, o sítio catalítico é bastante característico, sendo formado por dois bolsões, um maior (G, em azul) e um menor (P, em vermelho), como representado na Figura 4. A enantiosseletividade da lipase ocorre de acordo com o tamanho dos substituintes ligados ao centro assimétrico do substrato, reagindo preferencialmente o enantiômero cuja configuração possui melhor encaixe dos grupos nos bolsões. Esta regra é chamada de regra de Kazlauskas. (Kazlauskas *et al.*, 1991) Por isso, moléculas que possuem grupos com tamanhos distintos são melhor resolvidas pelas lipases, como pode-se observar na Figura 4 em que o enantiômero (*R*)-**1** se encaixa mais apropriadamente do que o enantiômero (*S*)-**1**.

Figura 4 – Perfil do sítio catalítico das lipases com a molécula de **1**.



Fonte: autor.

Dois parâmetros de extrema importância para a avaliação de uma metodologia de resolução cinética são o excesso enantiomérico (ee), que determina a pureza

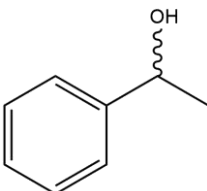
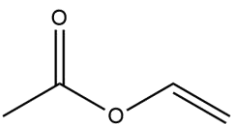
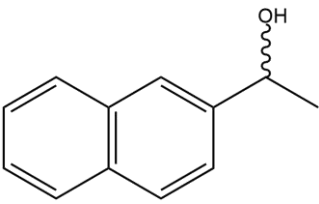
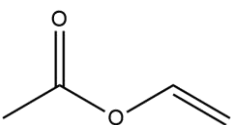
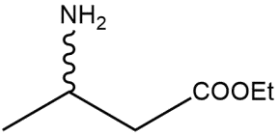
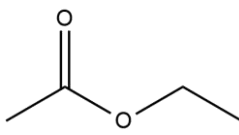
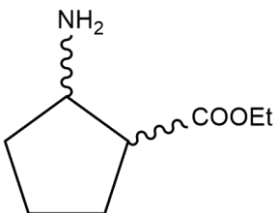
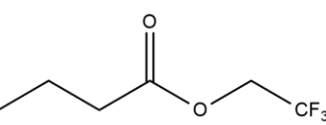
enantiomérica obtida (Equação 1), e a razão enantiomérica (E), que se estabelece uma relação entre as constantes cinéticas dos dois enantiômeros na reação realizada (Equação 2). Valores de E iguais ou abaixo de 20 são considerados inviáveis para a aplicação às resoluções cinéticas, ao passo que valores entre 50 e 100 são considerados bons e aqueles acima de 100, excelentes (Bornscheuer e Kazlauskas, 2006).

$$ee = \frac{R - S}{R + S} \times 100 \quad (1)$$

$$E = \frac{\ln \left[\frac{1 - ee_S}{1 + \left(\frac{ee_S}{ee_P} \right)} \right]}{\ln \left[\frac{1 + ee_S}{1 + \left(\frac{ee_S}{ee_P} \right)} \right]} \quad (2)$$

A Tabela 2 apresenta alguns resultados já obtidos para a resolução cinética enzimática de amins e álcoois secundários através de reações de acetilação catalisadas por lipases.

Tabela 2 – Resultados para a resolução cinética enzimática de álcoois e amins secundários com diferentes lipases.

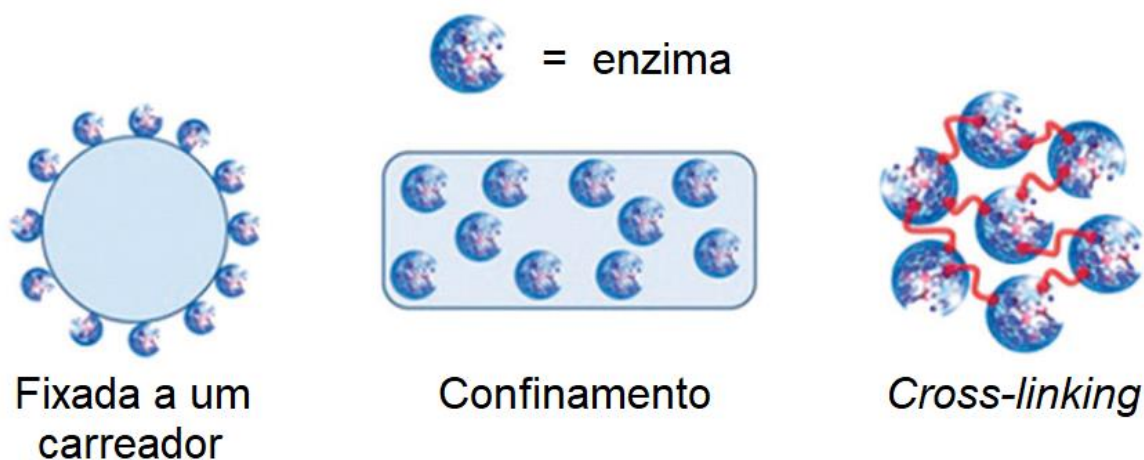
Substrato	Enzima	Doador de acila	E
	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>		>100
	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>		150
	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>		74-82
	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>		>100 (cis)

1.2 Imobilização de biocatalisadores

O uso de biocatalisadores foi prontamente idealizado para tornar os processos industriais mais sustentáveis. Porém, a rápida perda de estabilidade operacional e a dificuldade de recuperação desses biocatalisadores para reuso foram obstáculos pertinentes na aplicação dessa metodologia. Para superar estes problemas, a imobilização tornou-se uma solução simples e eficiente, possibilitando manipulação facilitada dos catalisadores, por encontrarem-se em uma forma sólida, e diminuindo seu custo por quilograma do produto devido à recuperação e ao reuso (Bhushan *et al.*, 2008; Sheldon e Van Pelt, 2013). Além disso, os biocatalisadores ficam mais resistentes às condições mais extremas de reação, como pHs ácidos e básicos, temperatura mais elevadas e solventes orgânicos (Orive *et al.*, 2006).

A Figura 5 apresenta alguns dos principais tipos de imobilização de enzimas.

Figura 5 – Tipos de imobilização enzimática.



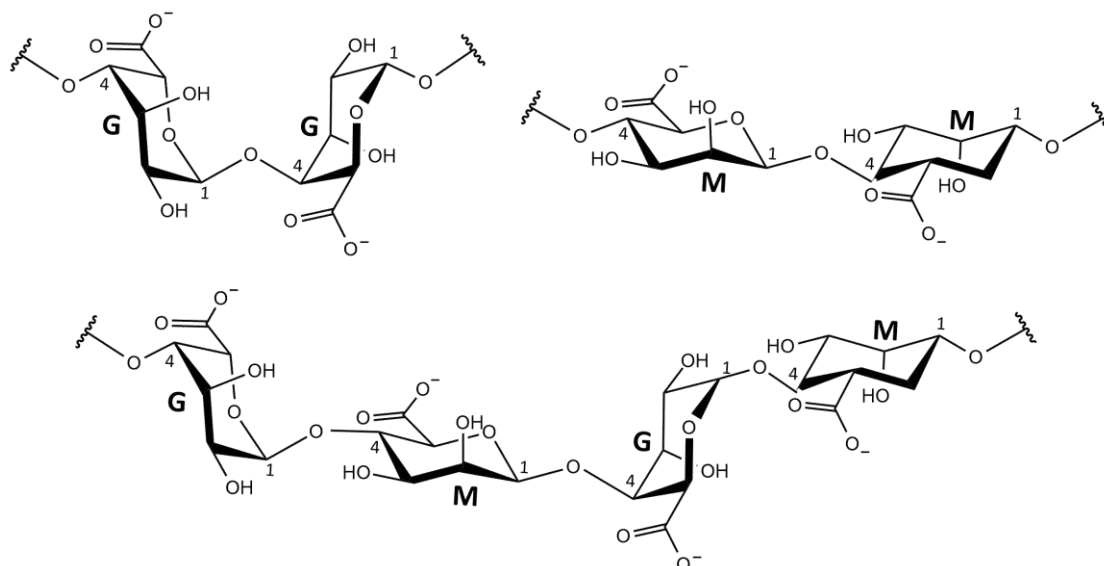
Fonte: Adaptado de Sheldon e Van Pelt, 2013.

A fixação de uma enzima a um carreador pode ocorrer física, iônica ou covalentemente. O confinamento é feito pela presença da enzima no ato da síntese da matriz escolhida e a imobilização em *cross-linking* se trata do uso de reagentes bifuncionalizados para preparação de macropartículas que contêm o biocatalisador (Sheldon e Van Pelt, 2013).

Uma das principais matrizes para a imobilização de enzimas é o alginato, um polissacarídeo linear extraído de algas marinhas pardas (feofíceas) e que possui

estrutura composta por ácidos β -D-manurônico (M) e β -D-gulurônico (G), como apresentado na Figura 6 (Orive *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2014).

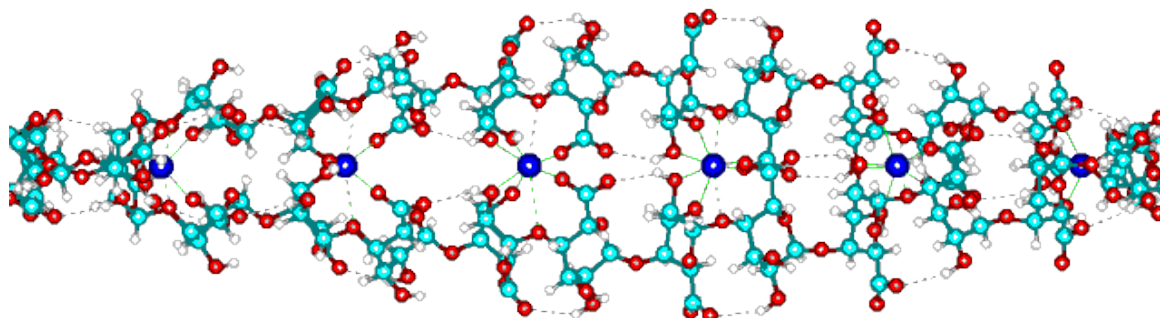
Figura 6 – Estrutura do alginato



Fonte: autor.

Por ter origem natural, o alginato que apresenta uma grande biocompatibilidade para a imobilização de enzimas e células microbianas. A propriedade mais notável desse polímero é a gelificação ionotrópica decorrente do contato entre seu sal sódico, a forma como é obtido, e uma solução de cátions bivalentes, como por exemplo de íons cálcio (Ca^{2+}). O que ocorre é a troca dos cátions Na^+ por Ca^{2+} , provocando a formação de ligações cruzadas (Figura 7) entre as cadeias poliméricas lineares e, conseqüentemente, a formação de uma rede polimérica rígida e termoestável (Orive *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2014).

Figura 7 – Ligações cruzadas no alginato de cálcio

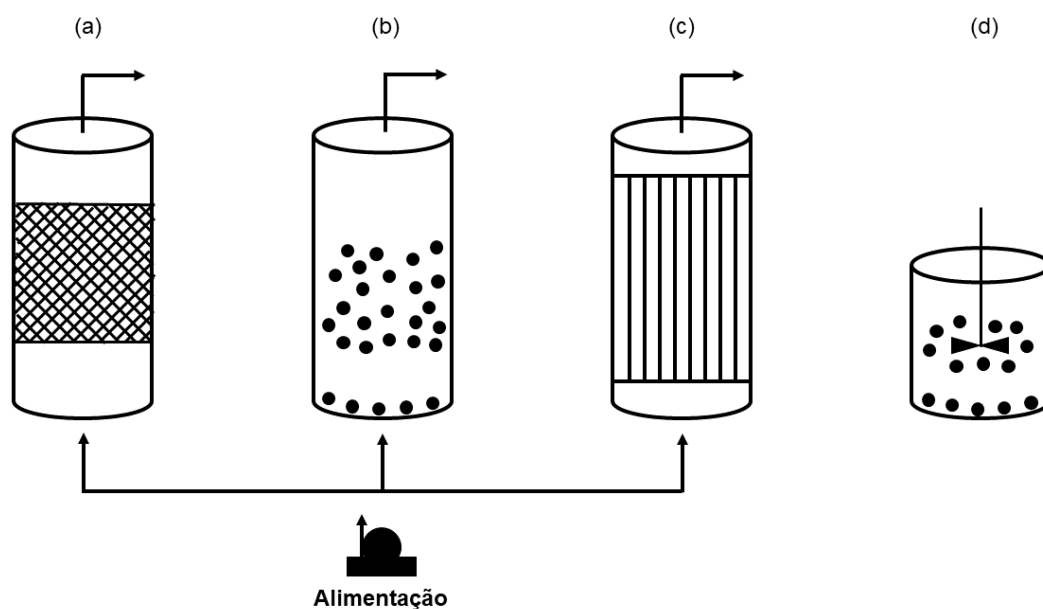


Fonte: Milagre, 2005.

1.3 Reatores

Visando o escalonamento das reações, a aplicação de biocatalisadores em um reator é fundamental e exige um estudo das dimensões físicas, vazão, tempo de residência, produtividade e estabilidade operacional (Milagre *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2005; Milagre *et al.*, 2006; Milagre *et al.*, 2009). Os principais tipos de reatores utilizados em processos biocatalíticos são apresentados na Figura 8 (Lothar e Oetterer, 1995; Milagre, 2005).

Figura 8 – Configurações de reatores. a) leito fixo, b) leito fluidizado, c) membrana, d) tanque agitado



Fonte: Milagre, 2005.

O reator de leito fixo (Figura 9.a), selecionado para este trabalho, é composto por uma coluna preenchida com o biocatalisador imobilizado, de forma que o líquido é bombeado para seu interior, difundindo o substrato por entre o recheio. A grande vantagem dessa configuração é o menor dano causado ao biocatalisador pela ausência de agitação do sistema e uma desvantagem é a dificuldade da difusão homogênea do substrato devido à formação de caminhos preferenciais no momento do preenchimento com a matriz em que o biocatalisador se encontra imobilizado (Milagre, 2005).

No reator de leito fluidizado (Figura 9.b), os biocatalisadores imobilizados são mantidos em suspensão pela vazão do líquido ou por gases borbulhados; no reator de membrana (Figura 9.c), os biocatalisadores são mantidos separados por membranas de porosidade controlada e o tanque agitado (Figura 9.d) atua em processos por batelada ou em fluxo contínuo (Milagre, 2005).

As variáveis mais importantes a um processo biocatalítico são a vazão (U), que se trata do volume de líquido medido na saída do reator por unidade de tempo (Equação 3),

$$U = \frac{\text{Volume}}{\text{Tempo}} \quad (3)$$

o volume útil (V_u), que é o volume aproveitado do reator para realizar a reação, o tempo de residência (T_r), que seria o tempo que o substrato permanece dentro do reator, dado pela razão entre volume útil e vazão (Equação 4),

$$T_r = \frac{V_u}{U} \quad (4)$$

a taxa de diluição (T_d), que é inversa ao tempo de residência (Equação 5)

$$T_d = \frac{1}{T_r} = \frac{U}{V_u} \quad (5)$$

a produtividade (P), que é a velocidade de formação do produto por unidade de tempo (Equação 6),

$$P = \frac{\text{Concentração do produto (mmol/L)}}{T_r \text{ (h)}} \quad (6)$$

a velocidade específica (μ), que se trata da formação de produto por unidade de tempo e normalizada pela massa de enzima adicionada (Equação 7),

$$\mu = \frac{\text{Concentração do produto (mmol/L)}}{\text{Massa de enzima (g)} \times T_r \text{ (h)}} \quad (7)$$

a extensão da reação, que é a porcentagem de substrato convertido efetivamente em produto (Equação 8),

$$\text{Extensão da reação}_{t=t}(\%) = \frac{\text{Produto}_{t=t}}{\text{Substrato}_{t=0} - \text{Substrato}_{t=t}} \times 100 \quad (8)$$

e o grau de conversão (C), ou seja, a porcentagem de substrato convertido em produto (Equação 9).

$$C_{t=t}(\%) = \frac{\text{Substrato}_{t=0} - \text{Substrato}_{t=t}}{\text{Substrato}_{t=0}} \times 100 \quad (9)$$

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 blocos construtores quirais sob fluxo contínuo para a aplicação em síntese orgânica.

3 Parte experimental

Para a síntese dos padrões de estudo, os seguintes reagentes foram utilizados: acetofenona (Sigma-Aldrich, 99%), boroidreto de sódio (Merck, 96%), etanol grau HPLC (NEON, 99,5%), (*rac*) 1-feniletilamina (Sigma Aldrich, 99%), dimetilaminopirina – DMAP – (Sigma Aldrich, 99%), piridina (Synth, 99%), anidrido acético (Vetec, 97%) e diclorometano anidro (Sigma Aldrich, 99,8%). As análises das configurações absolutas dos compostos foram feitas utilizando os padrões quirais (S) 1-feniletilamina (Alta Aesar, 98%) e (S) 1-feniletanol (Alta Aesar 99%).

Para as resoluções cinéticas realizadas, os reagentes utilizados foram: acetato de vinila (Alta Aesar, 99%), tolueno (Synth, 99,5%), acetato de etila grau PA (NEON ou Synth, 99,5%), éter etílico (Synth, 98 e etanol grau PA (Qhemis, 99,5%). O tampão fosfato utilizado foi feito com fosfato de sódio bibásico 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%). As lipases utilizadas foram a NOVOZYM® 435 (NOVOZYM, 5000 U/g) e a lipase de *Burkholderia cepacia* (Amano, 30000 U/g).

Todas as extrações feitas utilizaram acetato de etila grau PA (NEON ou Synth, 99,5%) 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 em camada delgada (CCD)

As análises foram realizadas em placas da marca Macherey-Nagel com tamanho 7,5 cm de comprimento x 2,5 cm de largura e filme de sílicagel 60 F₂₅₄ sobre suporte de alumínio. A fase móvel utilizada foi a de hexano/acetato de etila 80:20.

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

As análises em GC-FID foram realizadas em cromatógrafo gasoso SHIMADZU GC-2010 Plus utilizando-se duas diferentes colunas: RTX-5 (fase normal) e HYDRODEX β -3P (fase quiral). O injetor utilizado foi do tipo *Split* em razão 1:100 e o gás de arraste foi hidrogênio a $1,22 \text{ mL min}^{-1}$.

A coluna RTX-5 possui as dimensões de $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$. O método utilizado foi: temperatura inicial $80 \text{ }^\circ\text{C}$ (mantida por 3 minutos), velocidade de aquecimento $30 \text{ }^\circ\text{C/min}$, temperatura final $280 \text{ }^\circ\text{C}$ (mantida por 3 minutos). As temperaturas do injetor e do detector foram de $260 \text{ }^\circ\text{C}$ e $300 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente, e as injeções foram de $1,0 \mu\text{L}$ na concentração de $0,25$ a $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$.

A coluna HYDRODEX β -3P possui as dimensões de $25 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$ e foi utilizada para determinação dos excessos enantioméricos. O método utilizado foi: temperatura inicial $100 \text{ }^\circ\text{C}$ (mantida por 3 minutos), velocidade de aquecimento $1 \text{ }^\circ\text{C/min}$ até temperatura de $115 \text{ }^\circ\text{C}$ (mantida por 2 minutos) e novo aquecimento a velocidade $10 \text{ }^\circ\text{C/min}$ até temperatura $180 \text{ }^\circ\text{C}$ (mantida por 10 minutos). As temperaturas do injetor e do detector foram de $200 \text{ }^\circ\text{C}$ e $220 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. As injeções feitas foram de $1,0 \mu\text{L}$ em concentração $0,25$ a $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$.

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

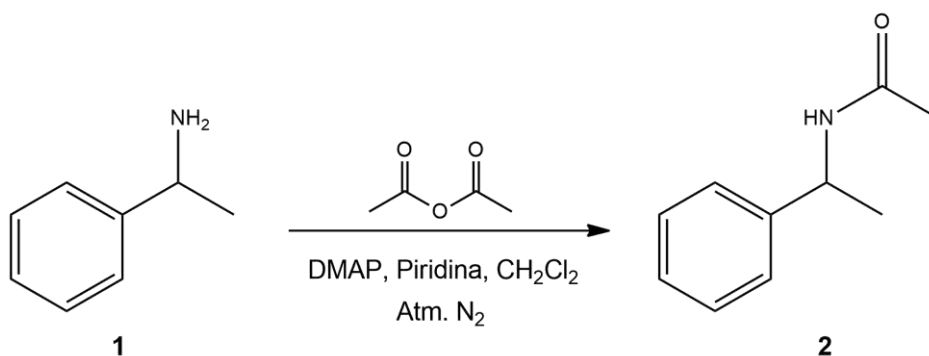
As análises foram feitas em cromatógrafo gasoso 7890B acoplado a espectrômetro de massas 5977A da marca Agilent, com fonte de ionização por elétrons a 70 eV . A coluna utilizada foi a HP-5MS com o seguinte método: temperatura inicial $80 \text{ }^\circ\text{C}$ (mantida por 3 minutos), velocidade de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

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

3.2 Análise e síntese dos padrões reacionais

3.2.1 Síntese da 1-feniletilacetamida (2)

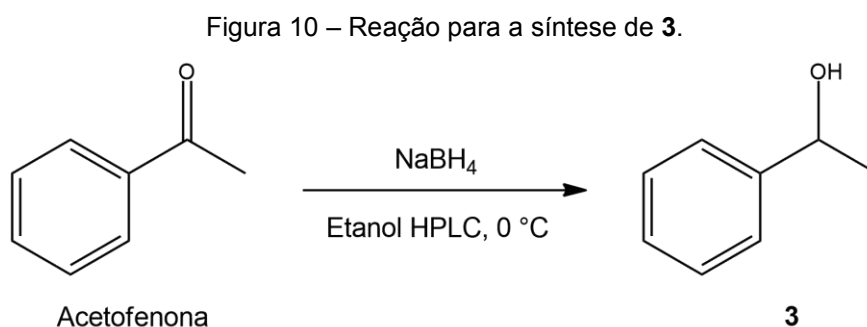
Figura 9 – Reação para a síntese de 2.



Fonte: autor.

Para a síntese da 1-feniletilacetamida (2), foram adicionados 1,0 g de 1-feniletilamina (1) (8,2 mmol) e 15,0 mL de diclorometano (CH_2Cl_2) anidro a um balão de fundo redondo de 25 mL, deixando-se o conteúdo sob agitação e purgado com nitrogênio. A outro balão de fundo redondo de duas bocas, de 50 mL, 15,0 mL de diclorometano anidro, 0,25 g de DMAP (2,0 mmol), 1,0 mL de piridina (12 mmol) e 5,0 mL de anidrido acético (53 mmol) foram adicionados, também deixando-se o conteúdo sob agitação e purgado com gás nitrogênio. Com auxílio de uma cânula, o conteúdo do primeiro balão foi transferido para o segundo, deixando o mesmo em banho de gelo por quinze minutos e depois em banho de água à temperatura ambiente por 5,0 horas. A elaboração da reação foi realizada lavando-se a fase orgânica com 30,0 mL de água destilada três vezes. A fase orgânica foi seca com MgSO_4 e evaporada à pressão reduzida em um rotaevaporador, para obtenção de um sólido amarelado. O produto (2) foi obtido com rendimento de 98%.

3.2.2 Síntese do 1-feniletanol (3)

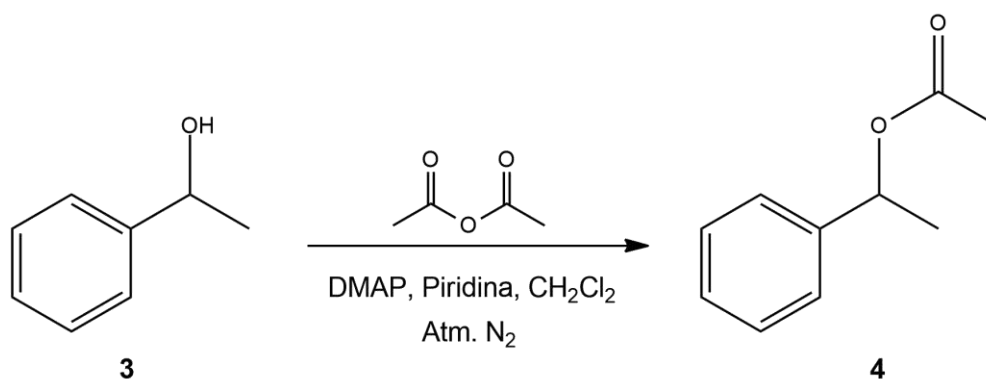


Fonte: autor.

Para síntese do 1-feniletanol (3), 1,0 g de acetofenona (8,3 mmol) e 25,0 mL de etanol grau HPLC foram adicionados a balão de fundo redondo de 50 mL. Deixando-se o conteúdo sob agitação suave, colocou-se o balão em banho de gelo e adicionaram-se lentamente 0,50 g de boroidreto de sódio (13 mmol). A reação foi mantida sob agitação por 4,0 horas. Para a elaboração da reação, evaporou-se o etanol sob pressão reduzida e em seguida adicionaram-se 20,0 mL de água destilada ao balão, 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. O produto (3) foi obtido como um óleo incolor com rendimento de 95%.

3.2.3 Síntese do acetato de 1-feniletila (4)

Figura 11 – Reação para a síntese de 4.



Fonte: autor.

Para a síntese do acetato de 1-feniletila (**4**), utilizou-se procedimento similar ao da síntese de (**2**), adicionando-se ao primeiro balão 0,70 g de (**3**) (5,7 mmol) e 20,0 mL de diclorometano anidro e ao segundo balão 0,18 g de DMAP (1,5 mmol), 1,0 mL de piridina (12 mmol), 4,0 mL de anidrido acético (42 mmol) e 20,0 mL de diclorometano anidro. A elaboração da reação foi realizada lavando-se a fase orgânica acetato de etila:diclorometano (7:3) com 30,0 mL de água destilada três vezes. A mesma fase foi seca com MgSO₄ e evaporada à pressão reduzida para obtenção de óleo amarelado. O produto (**4**) foi obtido com rendimento de 88%.

3.3 Resoluções cinéticas enzimáticas

3.3.1 Resolução cinética da 1-feniletilamina (1**) catalisada pela enzima NOVOZYM 435 utilizando o acetato de vinila como doador de acila**

Para esta reação, pesaram-se 0,12 g da (*rac*)-**1** (1,0 mmol) e 0,27 g de acetato de vinila (3,1 mmol) em um balão de fundo redondo de 25 mL. 10,0 mL de tolueno foram adicionados ao balão, o qual foi deixado sob agitação em banho de óleo à 70 °C. Foram adicionados 20 mg de NOVOZYM 435[®] para início da reação. Com 22h de reação, a elaboração foi feita adicionando-se 10,0 mL de acetato de etila ao balão reacional e três lavagens de 10,0 mL de água destilada foram realizadas. As fases orgânicas foram unidas, secas com MgSO₄, filtradas e rotaevaporadas. O rendimento obtido foi de 80% para óleo marrom viscoso. Um experimento branco da reação foi realizado em meia escala para avaliação dos resultados.

3.3.2 Resolução cinética da 1-feniletilamina (1) catalisada pela enzima NOVOZYM 435 utilizando o acetato de etila como doador de acila

Nesta reação, utilizou-se acetato de etila como doador de acila e solvente reacional. Foram pesados 0,056 g de (*rac*)-1 (0,46 mmol) em balão de fundo redondo de 25 mL de duas bocas. Adicionaram-se 6,0 mL de acetato de etila e acoplou-se o balão a um condensador, colocando-se o mesmo em banho de água à 30 °C. Foram pesados e adicionados 21 mg de NOVOZYM 435® ao balão para iniciar-se a reação. Retiraram-se alíquotas em diferentes intervalos de tempo para monitoramento em GC-FID, avaliando-se a conversão. Após 71h, a mistura reacional foi filtrada para retirada da enzima e 10,0 mL de acetato de etila foram adicionados. Lavou-se a fase orgânica com três volumes de 20,0 mL de água destilada, secou-se a mesma com MgSO₄, filtrou-se e rotaevaporou-se para obtenção do produto. O rendimento calculado foi de 25%. Um experimento branco da mesma reação também foi realizado em mesma escala para avaliação dos resultados.

3.3.3 Resolução cinética da 1-feniletilamina (1) catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* utilizando o acetato de etila como doador de acila

A resolução cinética enzimática foi realizada usando a lipase de *Burkholderia cepacia*. Para isso, pesaram-se 0,13 g de (*rac*)-1 (1,0 mmol) em balão de fundo redondo de 25 mL de duas bocas. Adicionaram-se então 4,0 mL de *n*-heptano e 2,0 mL de acetato de etila, acoplando-se o balão a condensador e colocando-se o mesmo em banho de óleo à 40 °C. Para iniciar a reação, adicionaram-se 19 mg da lipase de *Burkholderia cepacia*. Retiraram-se alíquotas em intervalos de tempo para monitoramento em GC-FID, avaliando-se a conversão da reação. Após 29h de reação, filtrou-se a mistura reacional para retirada das enzimas e rotaevaporou-se o filtrado. O rendimento obtido foi de 63%.

3.3.4 Resolução cinética da 1-feniletilamina (1) através da hidrólise da 1-feniletilacetamida (2) utilizando a lipase de *Burkholderia cepacia*

Duas tentativas de resolução cinética enzimática através da hidrólise de **2** foram realizadas: uma em tampão fosfato e outra em tampão Tris/HCl, não foi obtido êxito em nenhuma reação.

3.3.4.1 Resolução cinética em tampão Tris/HCl

Adicionaram-se 3,0 mL de tampão Tris/HCl 0,1 M pH 7,0 a um balão de fundo redondo de 10 mL e 0,081 g de (*rac*)-**2** (0,50 mmol) foram adicionados a um eppendorf, solubilizados em 200 µL de etanol. A solução do eppendorf foi transferida gota a gota para o balão com conteúdo sob agitação. O balão foi colocado em banho de água à temperatura de 40 °C. Pesaram-se 9,7 mg de lipase de *Burkholderia cepacia*, os quais foram adicionados ao balão para dar início à reação. Alíquotas foram retiradas em determinados intervalos de tempo, extraídas com acetato de etila grau HPLC e injetadas em GC-FID para monitoramento da reação. Após 22h, o conteúdo do balão foi extraído três vezes com 5,0 mL de acetato de etila. As fases orgânicas foram unidas, secas com MgSO₄, filtradas e rotaevaporadas, obtendo-se rendimento de 77%. Um experimento branco foi feito simultaneamente para avaliação dos resultados.

3.3.4.2 Resolução cinética em tampão fosfato

3,0 mL de tampão Na₂HPO₄/KH₂PO₄ 0,133 M pH 7,0 foram adicionados a balão de fundo redondo de 10 mL. 0,081 g de (*rac*)-**2** (0,50 mmol) foram solubilizados em 200 µL de etanol em eppendorf e transferidos gota a gota ao balão. Para início da reação, 31 mg de lipase de *Burkholderia cepacia* foram adicionados ao balão, que foi colocado em banho de água à 30 °C Alíquotas foram retiradas em determinados

intervalos de tempo, extraídas com acetato de etila grau HPLC e injetadas em GC-FID para monitoramento da reação.

3.3.5 Resolução cinética do 1-feniletanol (3) através da hidrólise de acetato de 1-feniletila (4)

3.3.5.1 Resolução cinética catalisada pela lipase NOVOZYM® 435

A um balão de fundo redondo de duas bocas de 25 mL foram adicionados 4,0 mL de tampão $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,133 M pH 7,0 e 22 mg da lipase NOVOZYM® 435. O balão foi colocado em banho de água à 40 °C e acoplado a condensador com banho termostático à 15 °C. Adicionaram-se 0,16 g de (*rac*)-**4** (1,0 mmol) e 2,0 mL de éter etílico a eppendorf, o qual foi agitado e teve o conteúdo transferido ao balão reacional. O sistema foi vedado e alíquotas foram retiradas para monitoramento por GC-FID. Após 65h, a elaboração da reação foi realizada filtrando-se a solução reacional para retirada das enzimas e extraindo-se o conteúdo do balão com três volumes de 10,0 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi seca em MgSO_4 , evaporada sob pressão reduzida e o rendimento foi calculado em 21%. A conversão e os excessos enantioméricos foram avaliados por GC-FID. Um experimento branco da mesma reação foi realizado em meia escala para avaliação dos resultados.

3.3.5.2 Resolução cinética catalisada por lipase de *Burkholderia cepacia*

Realizou-se mesmo procedimento de 3.3.5.1, mas substituiu-se a enzima utilizada para a lipase de *Burkholderia cepacia*, utilizando-se 0,10 g de (*rac*)-**4** (0,60 mmol). Obteve-se rendimento de 65% e a conversão e os excessos enantioméricos também foram avaliados por GC-FID.

3.4 Imobilização enzimática em esferas de alginato de cálcio

Para a produção de esferas de alginato de cálcio com enzimas imobilizadas, solubilizaram-se 30 mg de lipase de *Burkholderia cepacia* em 4,0 mL de água destilada e 80 mg de alginato de sódio foram adicionados, agitando a solução até homogeneidade. Essa mistura foi então extrudada em solução de cloreto de cálcio 10% (m/v) utilizando-se uma bomba peristáltica da marca MILAN, modelo 202, série 38 10.

Para a reação descrita no item 3.5, as esferas produzidas foram liofilizadas. Após imobilização das lipases, as esferas foram secas levemente com papel toalha e armazenadas em tubo Falcon de 50 mL durante 14 horas a -11 °C para congelamento. Após esse período, foram submetidas ao liofilizador Enterprise I da marca Terroni, que trabalhou durante 4 horas com vácuo de 0,170 µHg e temperatura do condensador em -48 °C. As esferas foram então retiradas do liofilizador e armazenadas em tubo Falcon deixado em dessecador até momento do uso.

3.5 Resolução cinética enzimática do 1-feniletanol (3) através da hidrólise do acetato de 1-feniletila (4) na presença de enzimas imobilizadas

Utilizando as esferas de alginato de cálcio produzidas e liofilizadas, como descrito no item 3.4, a resolução cinética enzimática foi realizada adicionando-se 10,0 mL de água destilada a um balão de fundo redondo de duas bocas de 50 mL. Em eppendorf, pesaram-se 0,16 g de (*rac*)-**4** (1,0 mmol), os quais foram misturados a 2,0 mL de éter etílico. A mistura foi adicionada gota a gota ao balão reacional, o qual já se encontrava em banho de óleo à 40 °C e acoplado a um condensador com banho termostático à 5 °C. Alíquotas foram retiradas e extraídas com acetato de etila grau HPLC para monitoramento por GC-FID. Após 31h de reação, a elaboração foi realizada filtrando-se o conteúdo do balão para retirada das esferas de alginato. A fase aquosa foi extraída três vezes com 10,0 mL de acetato de etila. As fases orgânicas foram unidas, secas com MgSO₄, filtradas e rotaevaporadas. Obteve-se rendimento de 39%.

3.6 Resolução cinética enzimática do 1-feniletanol (3) através da hidrólise do acetato de 1-feniletila (4) em fluxo contínuo

Após a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* nas esferas de alginato de cálcio e o preenchimento do reator com as mesmas, realizou-se o condicionamento do sistema. Para isso, água destilada foi bombeada pelo reator, que se encontrava incubado em banho de água à 40 °C, a uma vazão de 0,92 mL/min durante uma hora.

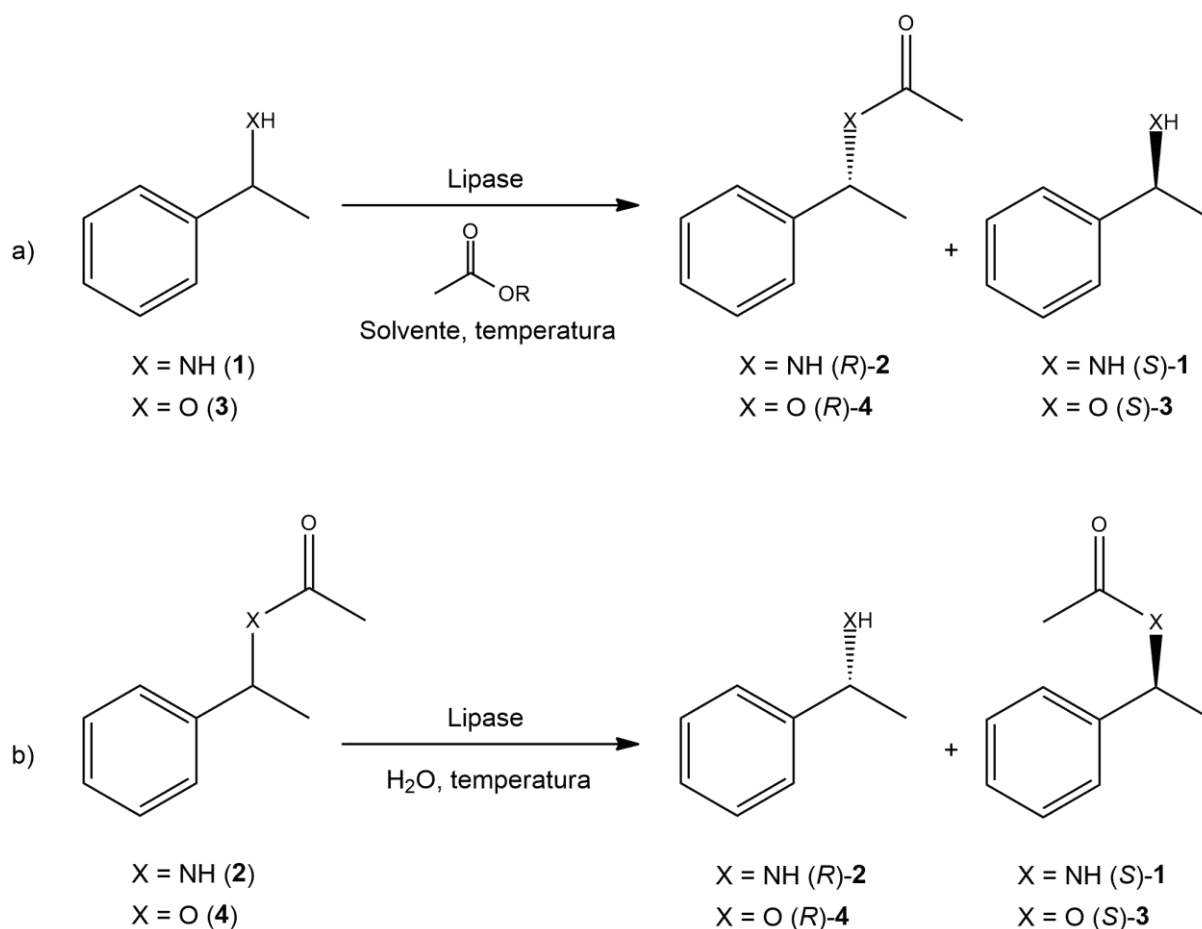
Com o reator devidamente condicionado, adicionaram-se 80,0 mL de água destilada a um erlenmeyer de 125 mL e, sob intensa agitação, gotejou-se uma solução contendo 30 mg de (*rac*)-3 solubilizados em 2,0 mL de éter etílico. Essa solução foi bombeada pelo reator, mantendo-se a vazão do condicionamento, e recolhida em erlenmeyer também de 125 mL. A solução foi então extraída com três volumes de 80,0 mL de acetato de etila. As fases orgânicas foram unidas, secas com MgSO₄, filtradas e rotaevaporadas à pressão reduzida, obtendo-se rendimento igual a 39% e 49% para as duas reações realizadas, respectivamente. Em ambos os experimentos, mantiveram-se constantes a vazão da bomba, a concentração do substrato e a temperatura do banho do reator. A proporção de enzimas imobilizadas em alginato de cálcio também foi mantida constante, mas utilizaram-se, respectivamente, 30 mg e 120 mg da lipase de *Burkholderia cepacia*.

4 Discussão e resultados

O objetivo principal deste trabalho é o desenvolvimento de um mini biorreator para realizar a resolução cinética enzimática visando a síntese de blocos construtores quirais. Para esta finalidade foram selecionados dois substratos modelo: a 1-feniletilamina (**1**) e o 1-feniletanol (**3**), Figura 12. Estes substratos foram selecionados por serem blocos construtores em síntese orgânica com a resolução cinética enzimática bem estabelecida. (Bornscheuer e Kazlauskas, 2006; De Miranda *et al.*, 2013; Melais *et al.*, 2016)

A resolução cinética enzimática pode ser realizada pelas lipases de duas maneiras: pela reação de acilação (Figura 12a) ou pela reação de hidrólise dos substratos acetilados (Figura 12b).

Figura 12 – Vias da resolução cinética dos substratos modelos.



Fonte: autor.

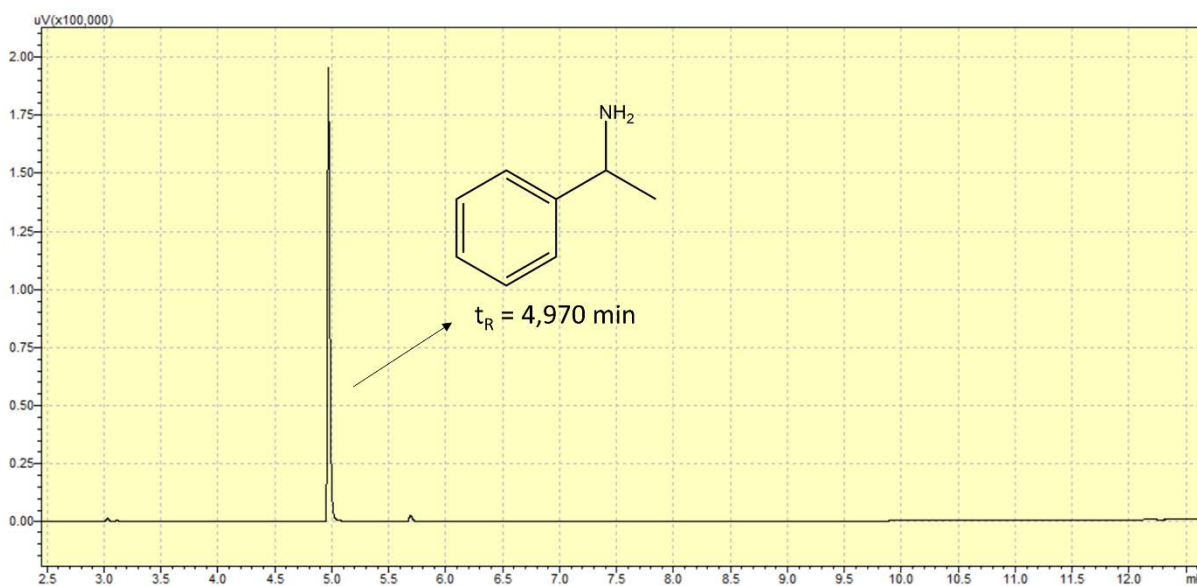
4.1 Resolução cinética enzimática da 1-feniletilamina (1)

4.1.1 Caracterização e análise cromatográfica da 1-feniletilamina (1) e da 1-feniletilacetamida (2)

Primeiramente os dados cromatográficos de **1** e **2** foram obtidos para o monitoramento das reações de resolução.

Tendo à disposição o padrão analítico de (*rac*)-**1**, uma análise em GC-FID foi realizada, obtendo-se o cromatograma da Figura 13, que indicava tempo de retenção (t_R) igual a 4,970 min.

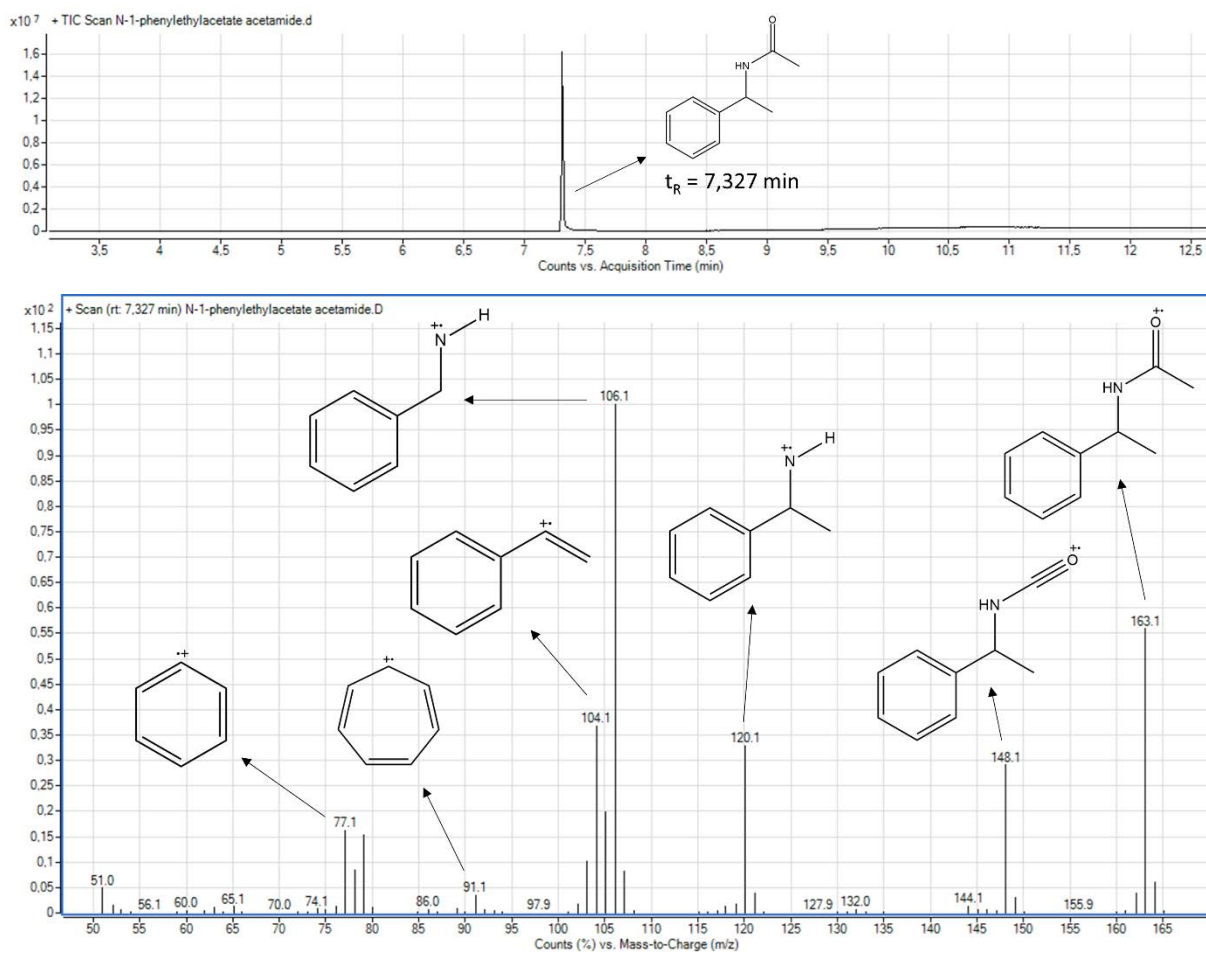
Figura 13 – Cromatograma da análise de **1** na coluna RTX-5.



Fonte: autor.

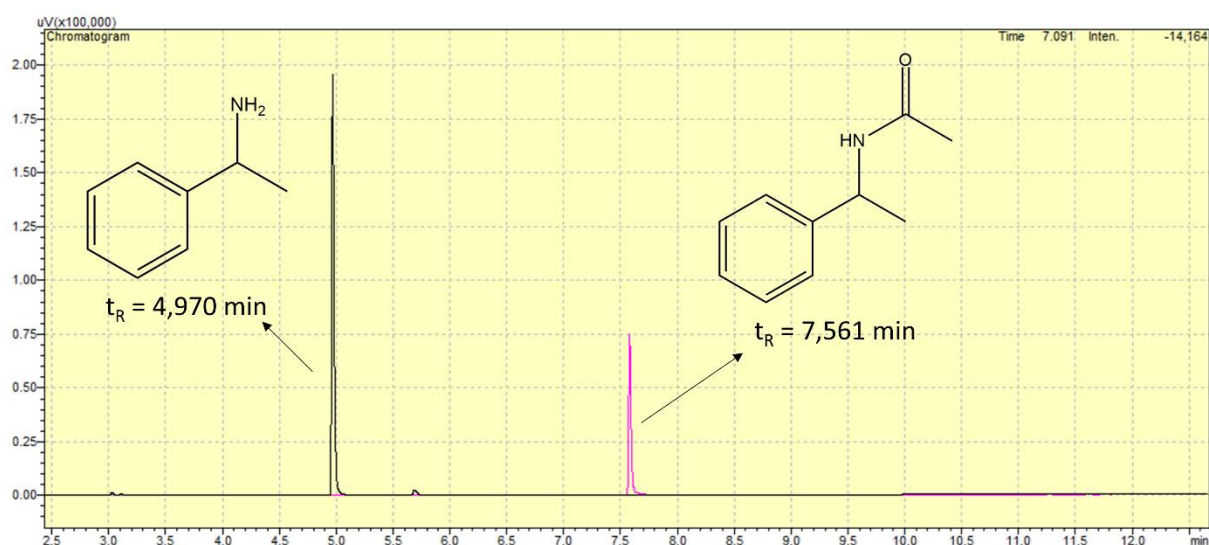
Como descrito no item 3.2.1, o composto (*rac*)-**2** foi sintetizado a partir do padrão de (*rac*)-**1** e caracterizado por GC-MS. A Figura 14 mostra o cromatograma, com pico único em t_R igual a 7,327 minutos, e o espectro de massas, com a respectiva caracterização.

A mesma amostra foi então analisada em GC-FID para comparação dos t_R entre (*rac*)-**1** e (*rac*)-**2**. Como mostrado na Figura 15, a superposição das análises feitas mostra que há boa separação entre os compostos na coluna de fase normal, possibilitando fácil monitoramento das reações.

Figura 14 – Resultados da análise de GC-MS de (*rac*)-2.

Fonte: autor.

Figura 15 – Cromatogramas superpostos das análises de 1 e 2 na coluna RTX-5.



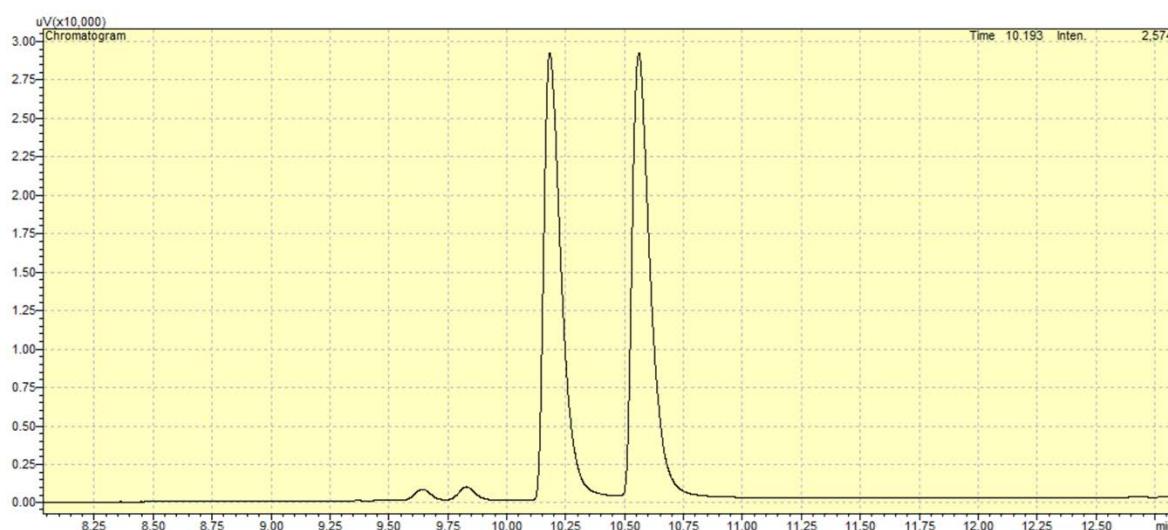
Fonte: autor.

4.1.2 Análise quiral da 1-feniletilamina (1) e da 1-feniletacetamida (2)

Os dados cromatográficos de **1** e **2** em coluna de fase quiral também foram obtidos para avaliação dos excessos enantioméricos das resoluções cinéticas.

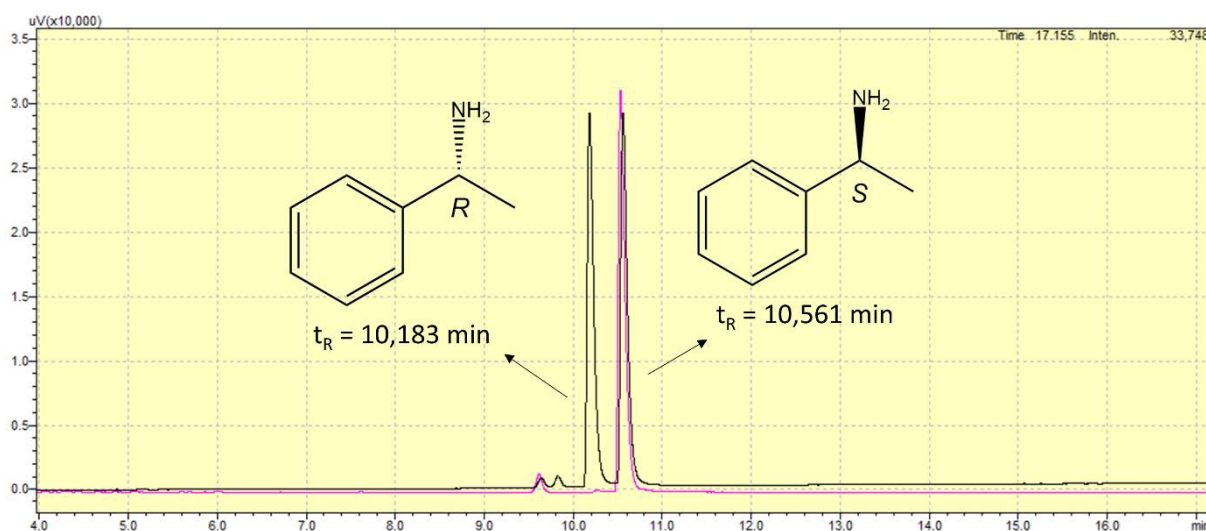
Com os padrões de (*rac*)-**1** e (*S*)-**1** à disposição, ambos foram separadamente analisados em GC-FID. Na Figura 16, o cromatograma do padrão de (*rac*)-**1** é mostrado e na Figura 17 demonstra-se o cromatograma da análise de (*S*)-**1** superposto à Figura 16.

Figura 16 – Cromatograma da análise de (*rac*)-**1** coluna HYDRODEX β -3P.



Fonte: autor.

Figura 17 – Cromatogramas superpostos das análises de (*rac*)-**1** e (*S*)-**1** na coluna HYDRODEX β -3P.

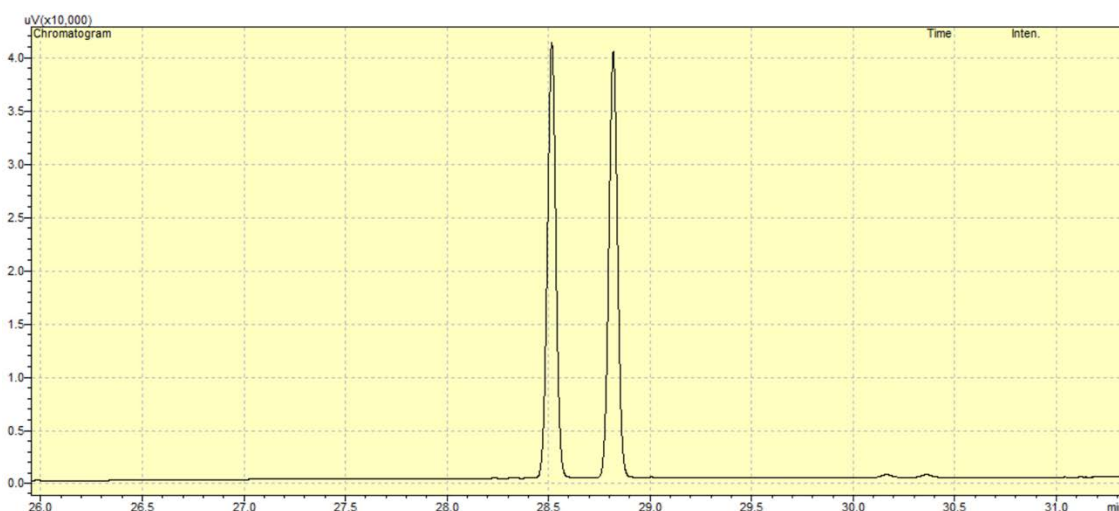


Fonte: autor.

Como pode-se observar, uma ótima separação dos enantiômeros foi alcançada com o método desenvolvido para a coluna de fase quiral, possibilitando análise dos excessos enantioméricos. Os picos superpostos representam (*S*)-**1**, cujo t_R é de 10,561 minutos, e o pico restante, portanto, é referente a (*R*)-**1**, com t_R de 10,183 minutos.

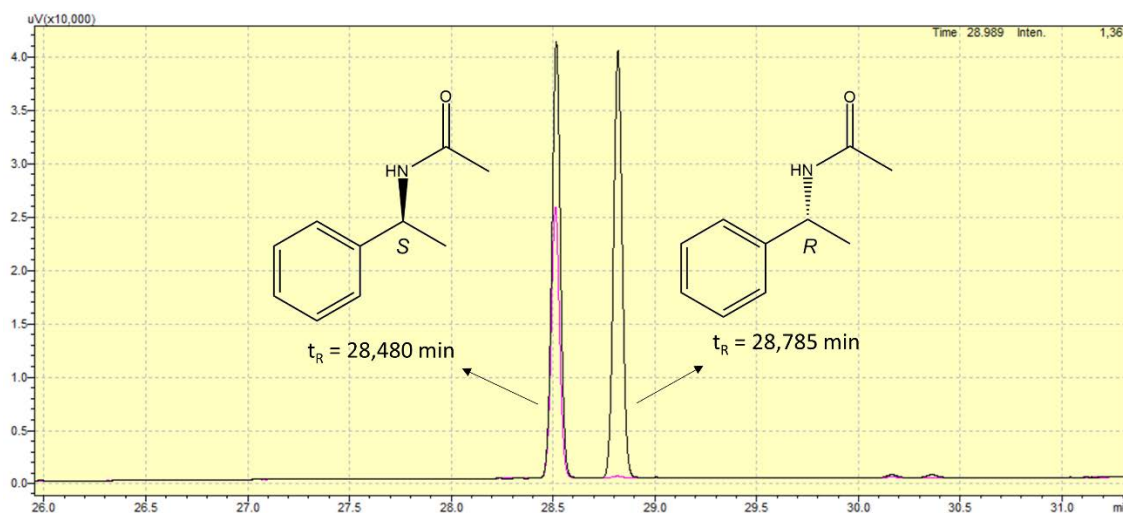
O padrão (*S*)-**2** foi obtido realizando-se novamente a síntese descrita em 3.2.1, mas utilizando como material de partida, dessa vez, o padrão (*S*)-**1**. Com os padrões de (*rac*)-**2** e (*S*)-**2** disponíveis, ambos foram analisados por GC-FID separadamente e os cromatogramas são mostrados nas Figuras 18, que contém apenas a análise de (*rac*)-**2**, e 19, que mostra a superposição dos cromatogramas.

Figura 18 – Cromatograma da análise de (*rac*)-**2** na coluna HYDRODEX β -3P.



Fonte: autor.

Figura 19 – Cromatogramas superpostos das análises de (*rac*)-**2** e (*S*)-**2** na coluna HYDRODEX β -3P.



Fonte: autor.

O mesmo método cromatográfico utilizado para a separação de (*rac*)-**1** também teve sucesso ao separar muito bem os enantiômeros de (*rac*)-**2**. Como pode-se observar, os picos de (*S*)-**2** estão superpostos em t_R igual de 28,480 minutos e o pico de (*R*)-**2**, portanto, possui t_R de 28,785 minutos.

4.1.3 Resoluções cinéticas enzimáticas da 1-feniletilamina (**1**)

Três condições reacionais foram testadas para a resolução cinética de (*rac*)-**1**, mostrada na Figura 20. As condições triadas foram a lipase utilizada (lipase de *Burkholderia cepacia* ou NOVOZYM® 435), o doador de acila (acetato de vinila e acetato de etila), o solvente da reação (tolueno, *n*-heptano e acetato de etila) e a temperatura (30 °C, 40 °C e 70 °C). Os resultados são apresentados na Tabela 3.

Figura 20 – Resolução cinética enzimática para **1**.

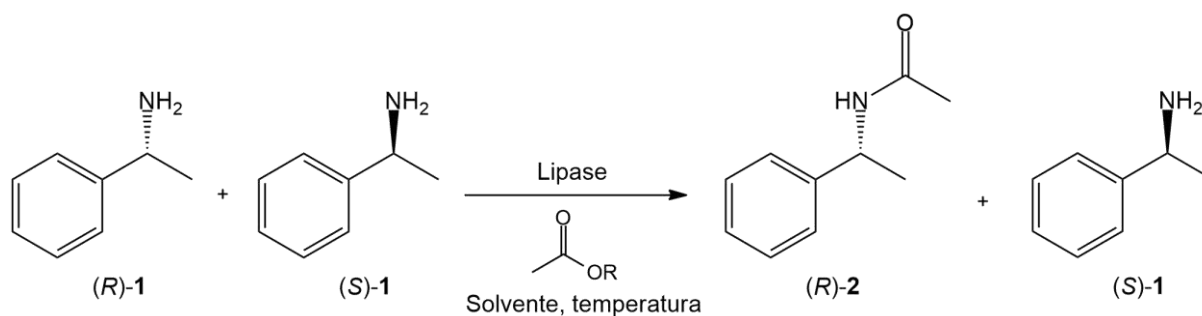
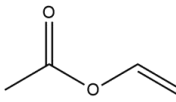
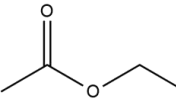
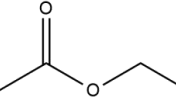
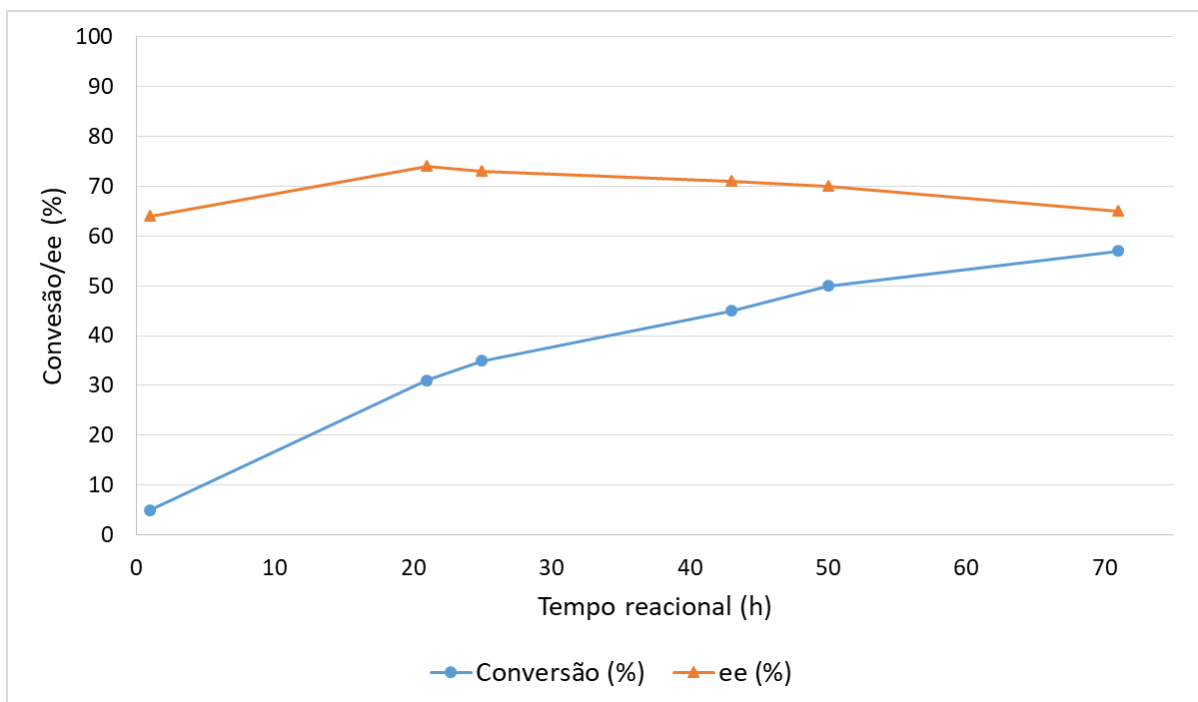


Tabela 3 – Resultados para a resolução cinética de **1**

Condição	Lipase	Solvente	Temp. (°C)	Doador de acila	Conversão (%)	ee (<i>R</i>)- 2 (%)
A	N435	Tolueno	70		98	0
B	N435	Acetato de etila	30		57	65
C	BCL	<i>n</i> -Heptano	40		4	56

Dentre os resultados obtidos, a condição que se mostrou mais promissora foi a B, em que se obteve conversão de 57% após 71 horas de reação e excesso enantiomérico final em 65%. A Figura 21 apresenta a conversão e o excesso enantiomérico de (*R*)-**2** de acordo com o tempo reacional. Percebe-se que ocorre transformação gradativa de **1** em **2** com moderada enantiosseletividade.

Figura 21 – Perfil cinético da condição B de resolução cinética para **1**.



Fonte: autor.

Para a condição A, a conversão quase quantitativa e excesso enantiomérico nulo se deve ao fato de que o acetato de vinila reagiu diretamente com **1**, sem catálise enzimática, para formação de **2**, resultado que foi confirmado no experimento branco da reação. Pela consulta à literatura (Bornscheuer e Kazlauskas, 2006), o acetato de vinila é um doador bastante reativo devido ao efeito de ressonância existente entre a dupla ligação da cadeia lateral e a carbonila, inviabilizando seu uso em resoluções cinéticas para **1**.

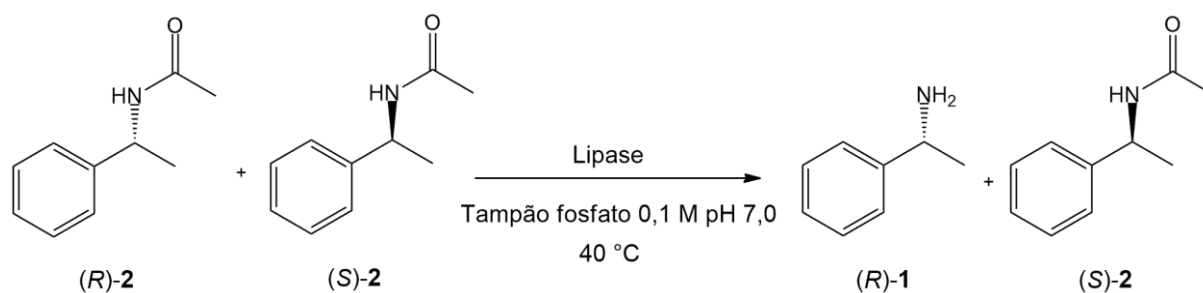
Para a condição C, notou-se conversão muito lenta, 4% em 28 horas, e com moderada enantiosseletividade. Esses resultados se devem provavelmente ao fato de que a lipase de *Burkholderia cepacia* foi utilizada na forma livre, em contato direto com solvente orgânico, o que pode ocasionar perda de estabilidade. Comparada à

NOVOZYM® 435, sua atividade foi muito mais baixa porque esta última está imobilizada em resina acrílica, o que confere maior resistência à enzima.

4.1.4 Resolução cinética enzimática da 1-feniletilamina (1) através da hidrólise da 1-feniletilacetamida (2)

Visto que não foram alcançados grandes resultados com a resolução cinética enzimática via acilação de **1**, optou-se por testar o desempenho das lipases para a reação de hidrólise, como apresentado na Figura 22.

Figura 22 – Reação para a resolução cinética enzimática de **1** via hidrólise de **2**.



Fonte: autor.

A mudança, portanto, do meio orgânico para o meio aquoso trouxe algumas vantagens ao projeto: o uso da lipase de *Burkholderia cepacia*, que se encontra na forma livre, foi facilitado devido à solubilidade em água; os custos foram reduzidos, visto que esta enzima é cinco vezes mais barata do que a NOVOZYM® 435, o reator a ser construído poderia agora ser feito de um material de baixo custo, como plástico, sem o problema da incompatibilidade com solventes orgânicos; e o uso da água como solvente tornou a proposta mais sustentável.

Os dois procedimentos para a hidrólise de **2** foram realizados alterando-se apenas o tampão utilizado, mas os resultados obtidos para ambos foram os mesmos: não houve conversão de **2** em **1**.

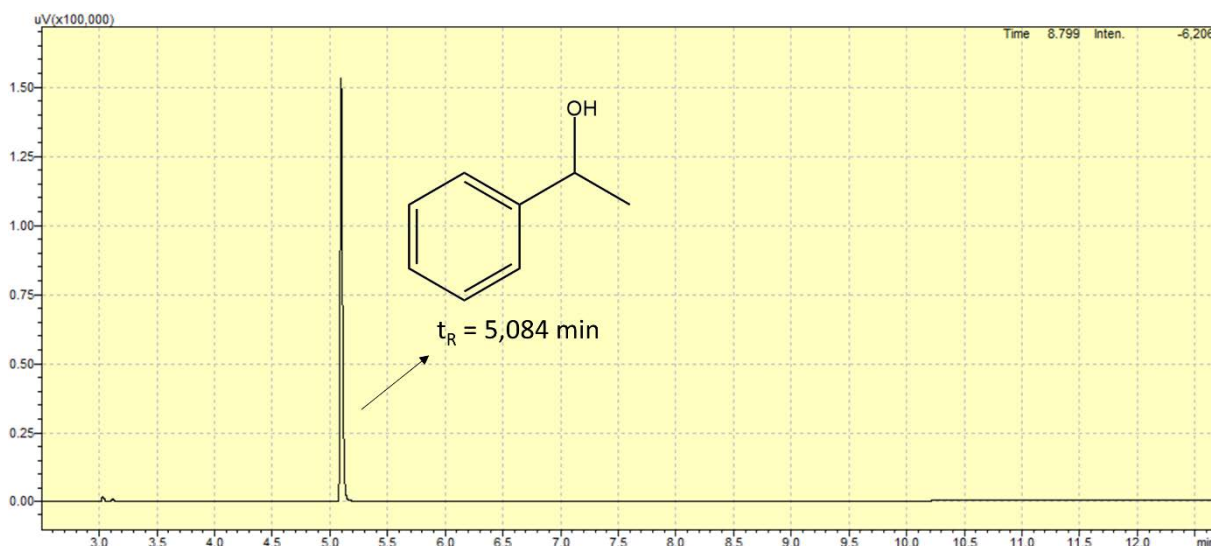
Devido aos resultados negativos, outro substrato foi testado a fim de avaliar o desempenho das lipases na reação de hidrólise.

4.2 Resolução cinética enzimática do 1-feniletanol (3)

4.2.1 Caracterização e análise cromatográfica do 1-feniletanol (3) e do acetato de 1-feniletila (4)

A síntese de (*rac*)-**3** foi realizada através da redução da acetofenona (item 3.2.2) utilizando boroidreto de sódio. Com isso, este padrão foi analisado em coluna de fase normal, como mostrado na Figura 23.

Figura 23 – Análise de **3** na coluna RTX-5.

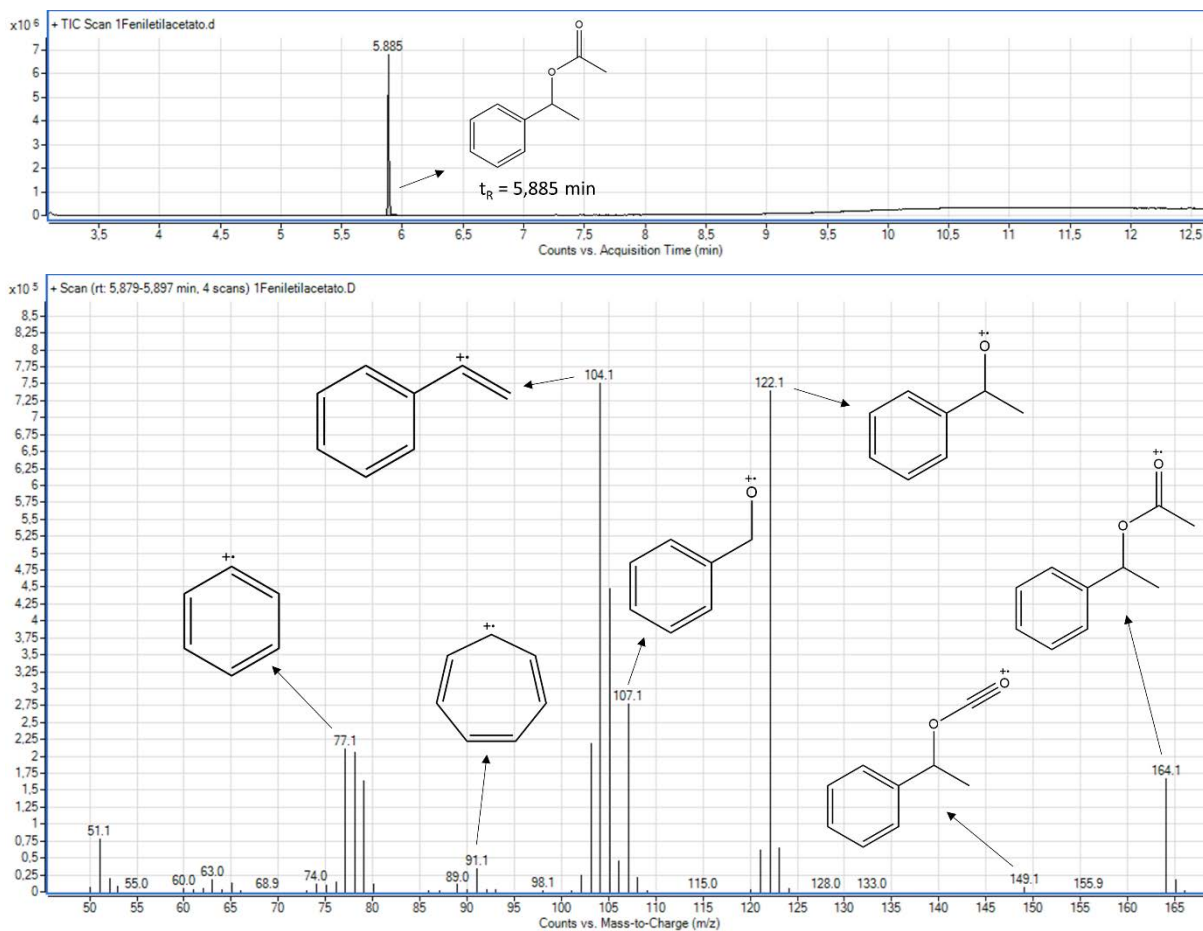


Fonte: autor.

O padrão de (*rac*)-**4** foi sintetizado de acordo com o item 3.2.3 e foi caracterizado por análise em GC-MS. O cromatograma obtido continha um único pico referente a **4** em t_R igual a 5,885 minutos, como demonstrado na Figura 24, e o espectro de massas é apresentado com a caracterização do composto.

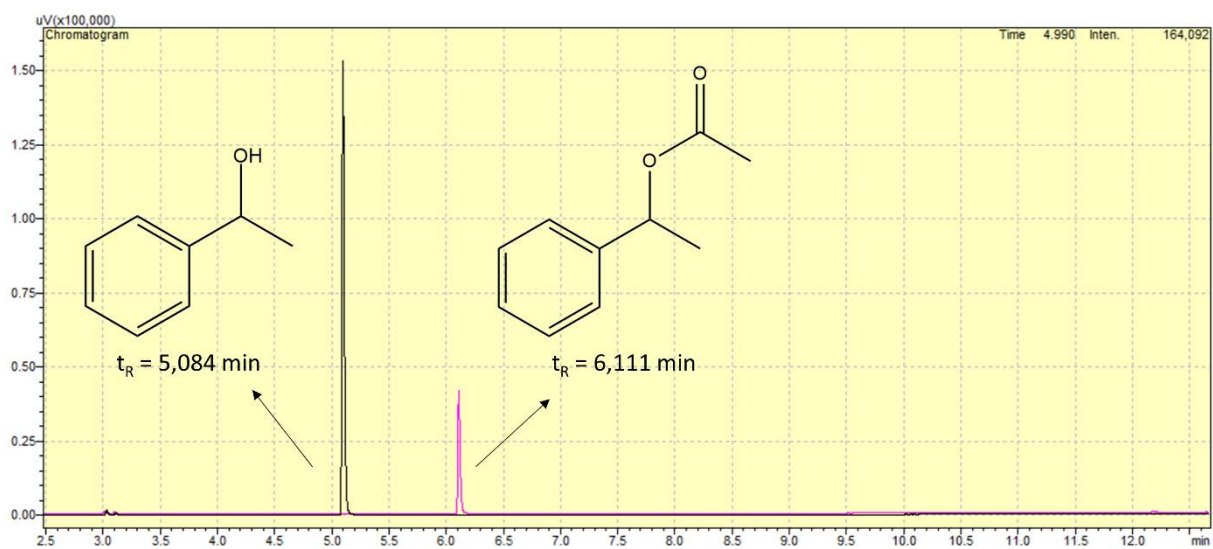
Com a análise do padrão de (*rac*)-**4** em GC-FID, foi possível visualizar, na Figura 25, que a sobreposição dos cromatogramas permite separação muito boa entre **3** e **4** pelo mesmo método aplicado à **1** e **2**, permitindo o monitoramento das reações.

Figura 24 – Cromatograma e espectro de massas para análise via GC-MS de 4.



Fonte: autor.

Figura 25 – Cromatogramas superpostos das análises de 3 e 4 na coluna RTX-5.

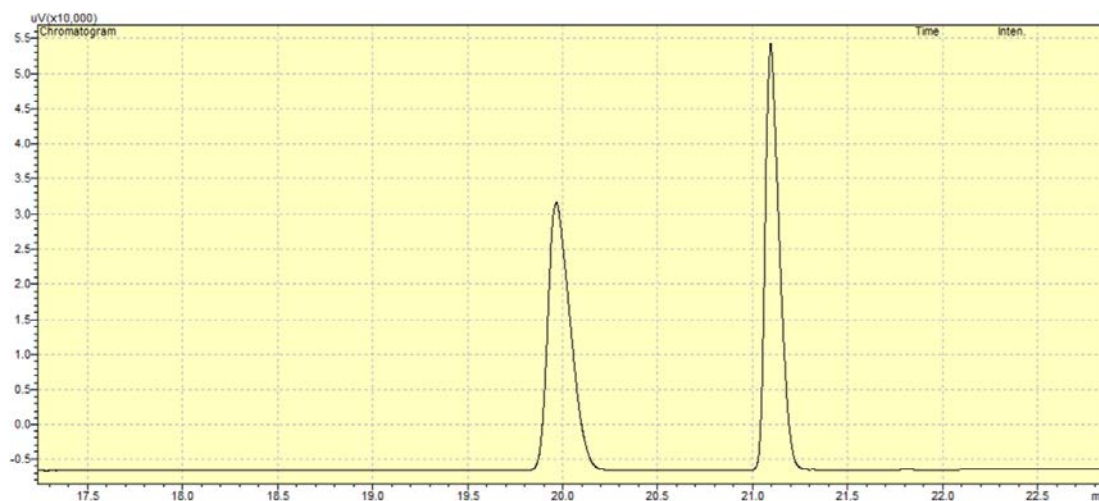


Fonte: autor.

4.2.2 Análise quiral do 1-feniletanol (3) e do acetato de 1-feniletila (4)

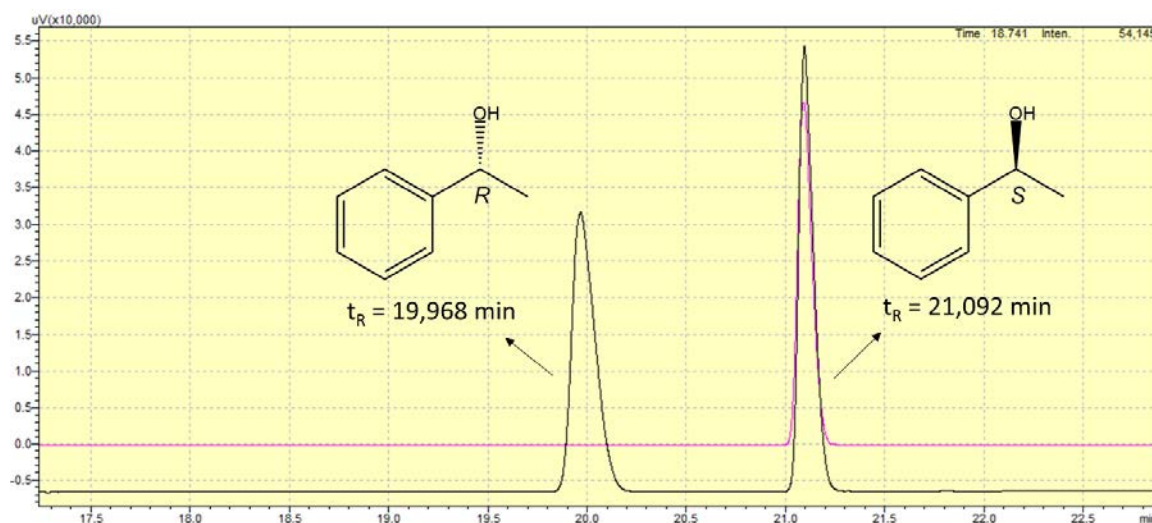
Para obtenção dos dados cromatográficos na coluna de fase quiral, os padrões (*rac*)-3 e (*S*)-3 foram analisados via GC-FID. Os cromatogramas obtidos são apresentados nas Figuras 26 e 27, que contêm, respectivamente, a análise de (*rac*)-3 e a sobreposição dos cromatogramas para associação dos enantiômeros aos t_R obtidos.

Figura 26 – Cromatograma da análise de (*rac*)-3 na coluna HYDRODEX β -3P.



Fonte: autor.

Figura 27 – Cromatogramas superpostos das análises de (*rac*)-3 e (*S*)-3 na coluna HYDRODEX β -3P.



Fonte: autor.

Observa-se que há boa separação dos enantiômeros no método aplicado, o que permite avaliação dos excessos enantioméricos no monitoramento das resoluções cinéticas. A sobreposição de picos ocorre apenas em t_R igual a 21,092 minutos, referente a (*S*)-**3**, e o t_R de 19,968 minutos representa (*R*)-**3**.

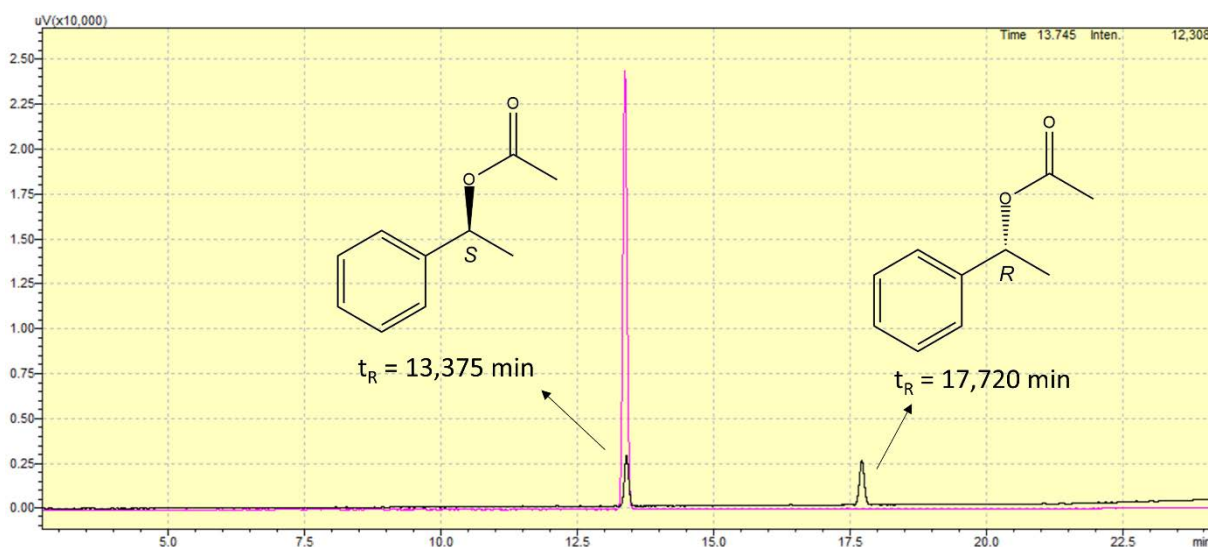
A síntese de (*S*)-**4** foi novamente realizada, mas dessa vez partindo-se do padrão analítico (*S*)-**3**. A análise de (*rac*)-**4** na coluna de fase quiral teve como resultado o cromatograma mostrado na Figura 28, enquanto a Figura 29 apresenta a sobreposição das análises, também indicando os t_R de cada enantiômero.

Figura 28 – Cromatograma da análise de (*rac*)-**4** na coluna HYDRODEX β -3P.



Fonte: autor.

Figura 29 – Cromatogramas superpostos das análises de (*rac*)-**4** e (*S*)-**4** na coluna HYDRODEX β -3P.



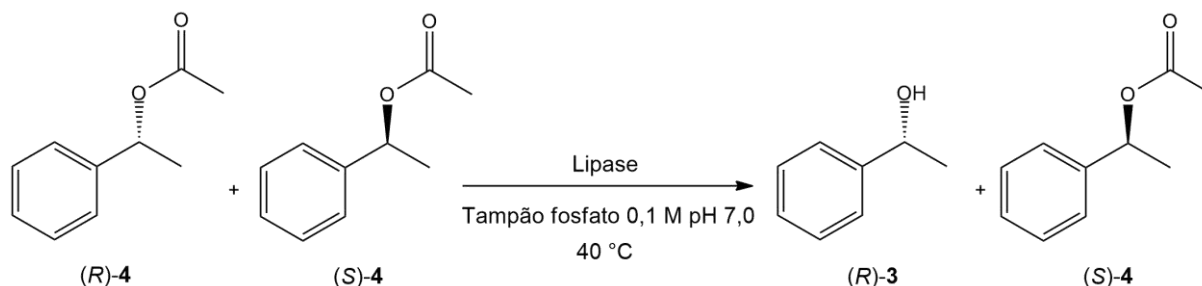
Fonte: autor.

Os enantiômeros (*R*)-**4** e (*S*)-**4** foram separados com sucesso pelo mesmo método aplicado a (*R*)-**3** e (*S*)-**3**. O t_R em 13,375 minutos refere-se aos picos sobrepostos de (*S*)-**4** e (*R*)-**4**, portanto, possui t_R igual a 17,720 minutos.

4.2.3 Resolução cinética do 1-feniletanol (**3**) através da hidrólise de acetato de 1-feniletila (**4**)

Mantendo a mudança do meio orgânico para o meio aquoso, a resolução cinética de **3** através da hidrólise de **4** (Figura 30) foi testada com as lipases NOVOZYM® 435 e de *Burkholderia cepacia*. Os resultados das duas resoluções são apresentados na Tabela 4.

Figura 30 – Reação da resolução cinética enzimática de **3** pela hidrólise de **4**.



Fonte: autor.

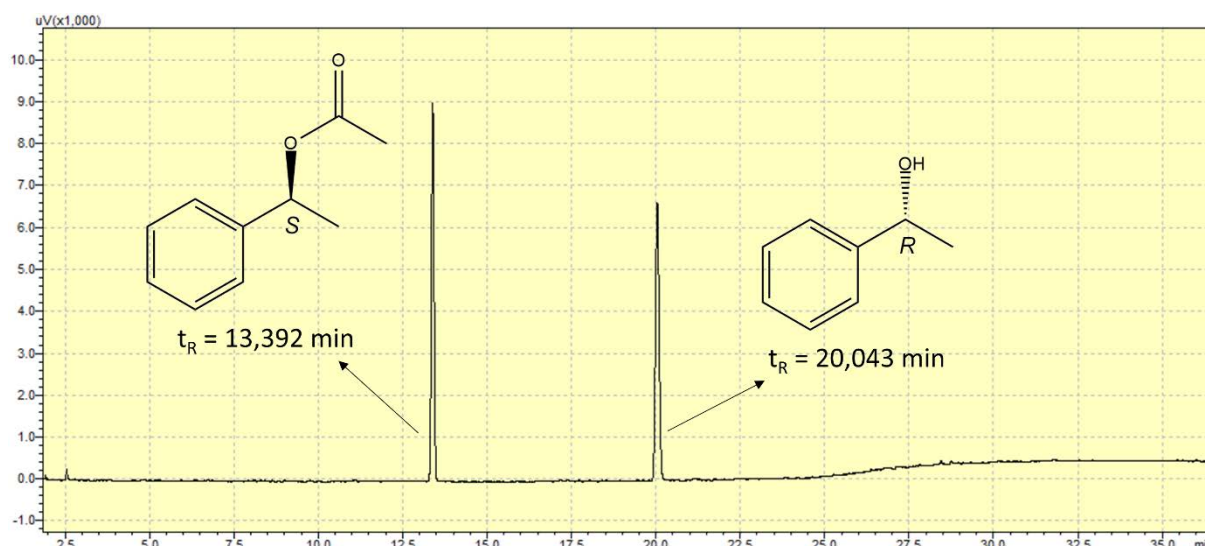
Tabela 4 – Resultados para a resolução cinética de **3** via hidrólise de **4**.

Condição	Lipase	Tempo reacional (h)	Conversão (%)	ee (%)
A	N435	65	74	≥ 99
B	BCL	21	51	≥ 99

Analisando os dados da Tabela 5, percebe-se que na condição A, a conversão de 74% deveria acarretar um excesso enantiomérico bem abaixo do alcançado. O problema encontrado no monitoramento dessas reações foi o de que a solubilidade de **3** é maior do que a de **4** no meio aquoso, o que prejudicou os dados obtidos. Apesar disso, a análise da mesma alíquota feita posteriormente em coluna de fase quiral mostrou o excesso reportado.

Para a condição B, a alíquota da extração analisada apresentou resultado mais condizente entre conversão e excesso enantiomérico, demonstrado na Figura 31. Percebe-se a ausência dos picos referentes a (*R*)-4, totalmente convertido a (*R*)-3, e a (*S*)-3, que não foi produzido devido à conversão de muito lenta de (*S*)-4.

Figura 31 – Cromatograma da alíquota da extração da condição B.



Fonte: autor.

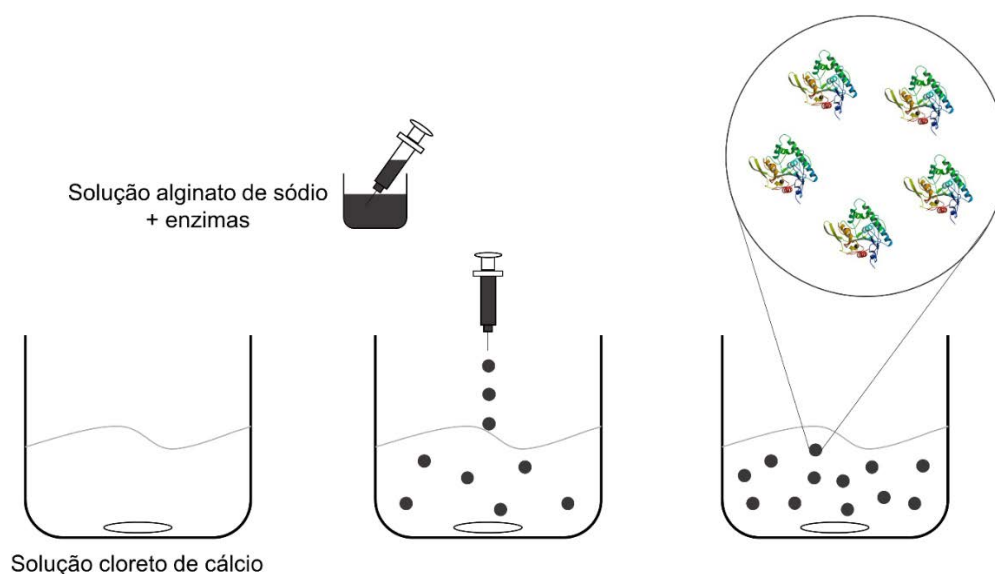
O monitoramento de ambas as reações na coluna de fase quiral demonstrou que o excesso enantiomérico manteve-se em valor $\geq 99\%$ durante todo o tempo reacional.

4.3 Imobilização enzimática em esferas de alginato de cálcio

A imobilização em alginato de cálcio é frequentemente realizada na forma de esferas. Para isso, uma solução contendo alginato de sódio e a enzima a ser imobilizada é gotejada por uma seringa em solução de cloreto de cálcio, formando as esferas instantaneamente, como apresentado na Figura 32.

Para avaliar o tamanho das esferas obtidas por esse método, realizou-se um estudo relacionando os diâmetros das agulhas disponíveis no laboratório e o tamanho das esferas de alginato de cálcio obtidas. Os dados são mostrados na Tabela 5.

Figura 32 – Método de imobilização por gotejamento.



Fonte: autor.

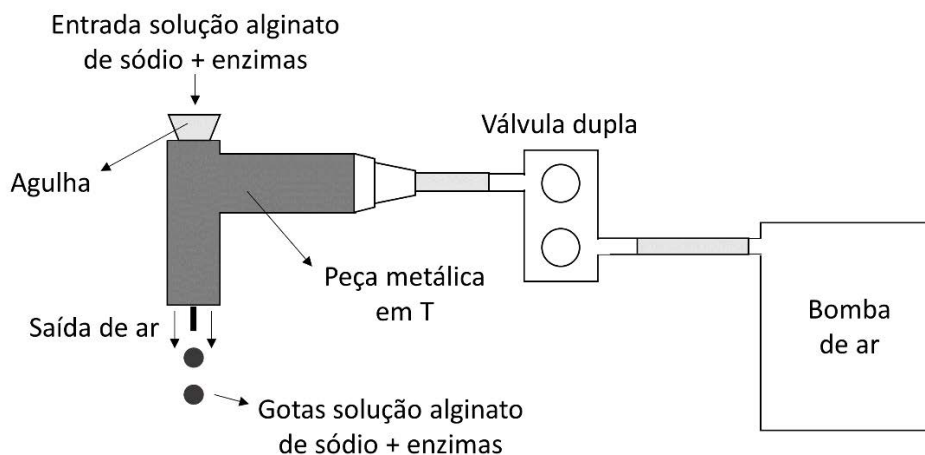
Tabela 5 – Diâmetros das agulhas e das esferas produzidas.

Agulha 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

Visto que a agulha de menor diâmetro disponível produzia esferas de 1,6 mm de diâmetro em média, um sistema para redução do tamanho das gotas formadas precisou ser construído. Optou-se por um método no qual a agulha de extrusão encontra-se rodeada por um jato de ar cuja função é a de expulsar as gotas rapidamente da ponta da agulha (Orive *et al.*, 2006), evitando seu crescimento pela ação da tensão superficial da solução. A Figura 33 apresenta o esquema do sistema construído.

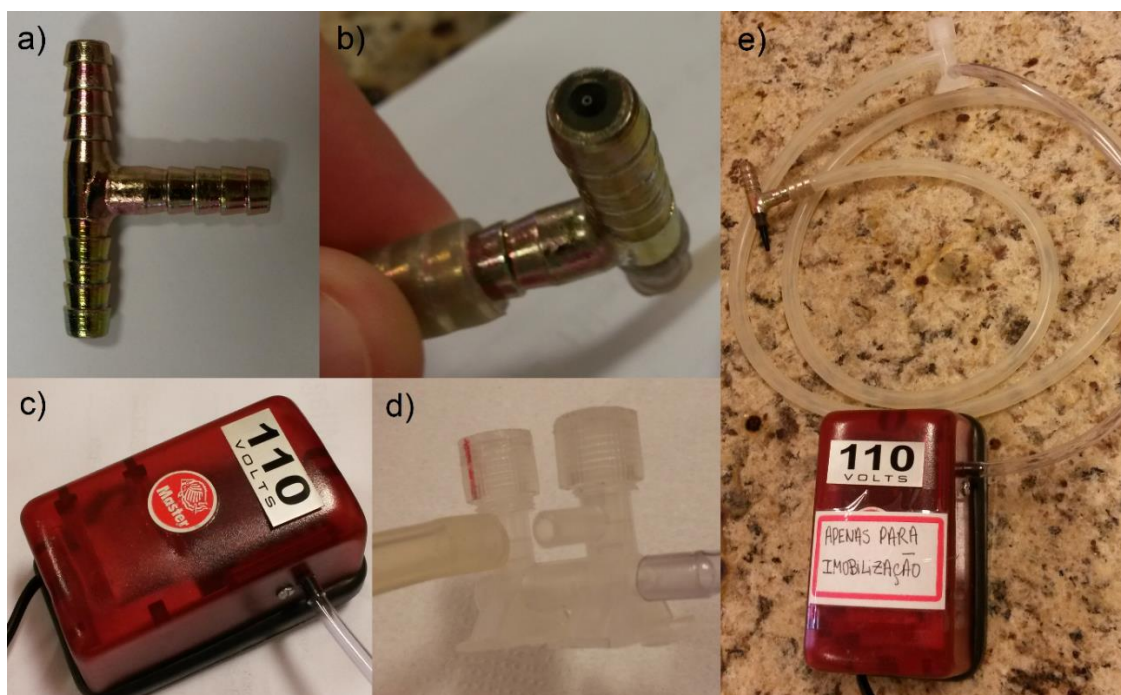
Uma peça metálica em forma de T (Figura 34.a) foi cortada e uma agulha foi presa à peça pela parte interior (Figura 34.b). O sistema de extrusão foi montado com uma bomba de ar da marca Master® (Figura 34.c) acoplada a uma válvula dupla de plástico (Figura 34.d), que regulava a vazão de ar e se ligava à peça metálica por uma mangueira, conduzindo o jato de ar até o entorno da agulha.

Figura 33 – Sistema construído para redução do tamanho das esferas de alginato de cálcio



Fonte: autor.

Figura 34 – Partes do sistema de extrusão. a) peça metálica em T; b) agulha presa à peça metálica; c) bomba de ar Master®; d) válvula dupla de plástico; e) sistema de extrusão.



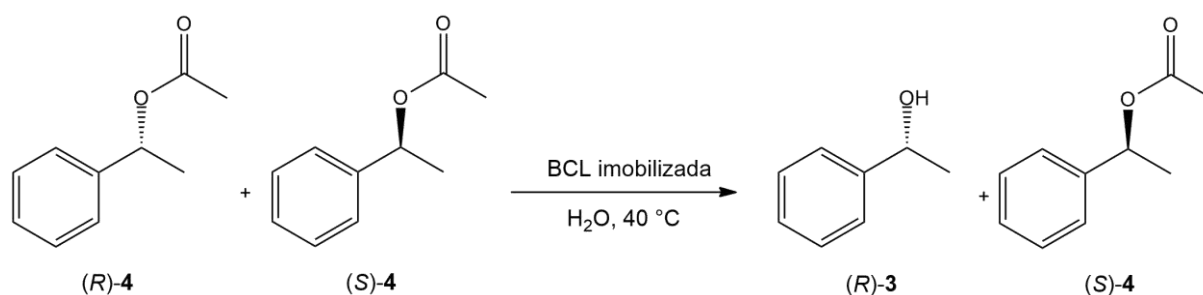
Fonte: autor.

As esferas de alginato tiveram seu diâmetro reduzido de média 1,6 mm para média de 1,0 mm pela ação do jato de ar na extrusão utilizando a agulha nº 1.

4.4 Resolução cinética do 1-feniletanol (**3**) pela hidrólise do acetato de 1-feniletila (**4**) com enzimas imobilizadas

Estabelecida uma condição ótima de reação, como a verificada no item 4.2.3, e a metodologia de imobilização dos biocatalisadores em alginato de cálcio, reportada no item 4.3, realizou-se então a resolução cinética de **3** pela hidrólise de **4** na presença da lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada (Figura 35).

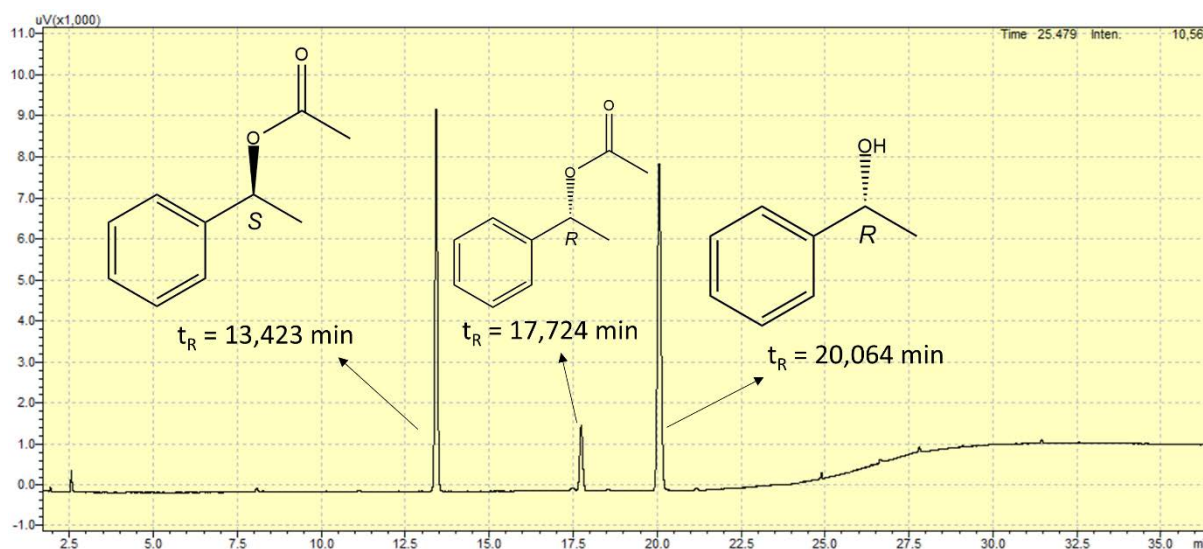
Figura 35 – Reação da resolução cinética enzimática de **3** pela hidrólise de **4** com lipases imobilizadas



Fonte: autor.

Em tempo reacional de 31 horas, a conversão atingida foi de 49% com excesso enantiomérico $\geq 99\%$, como apresentado no cromatograma da Figura 36.

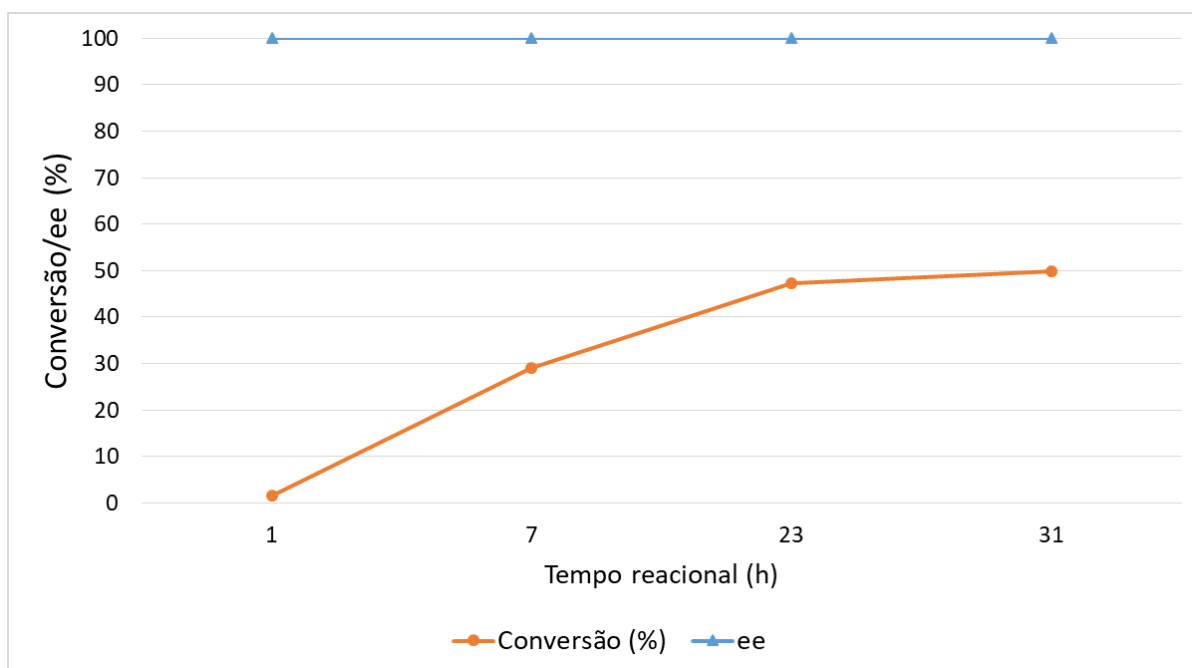
Figura 36 – Cromatograma referente à extração do meio reacional da resolução cinética enzimática de **3** pela hidrólise de **4** na coluna HYDRODEX β -3P.



Fonte: autor.

Com o monitoramento realizado para esta reação, percebeu-se, como mostrado na Figura 37, que a conversão de **4** em **3** foi gradual e com ee $\geq 99\%$ durante todo o processo. O comportamento da lipase também foi bastante similar àquele previsto para a cinética enzimática: conversão mais acentuada no início da reação e diminuição da velocidade conforme o substrato é consumido, caracterizando o estado estacionário da enzima.

Figura 37 – Perfil cinético e excessos enantioméricos da resolução cinética enzimática de **3** pela hidrólise de **4** na presença de lipase imobilizada.



Fonte: autor.

4.5 Construção dos mini biorreatores e resolução cinética do 1-feniletanol (**3**) em fluxo contínuo

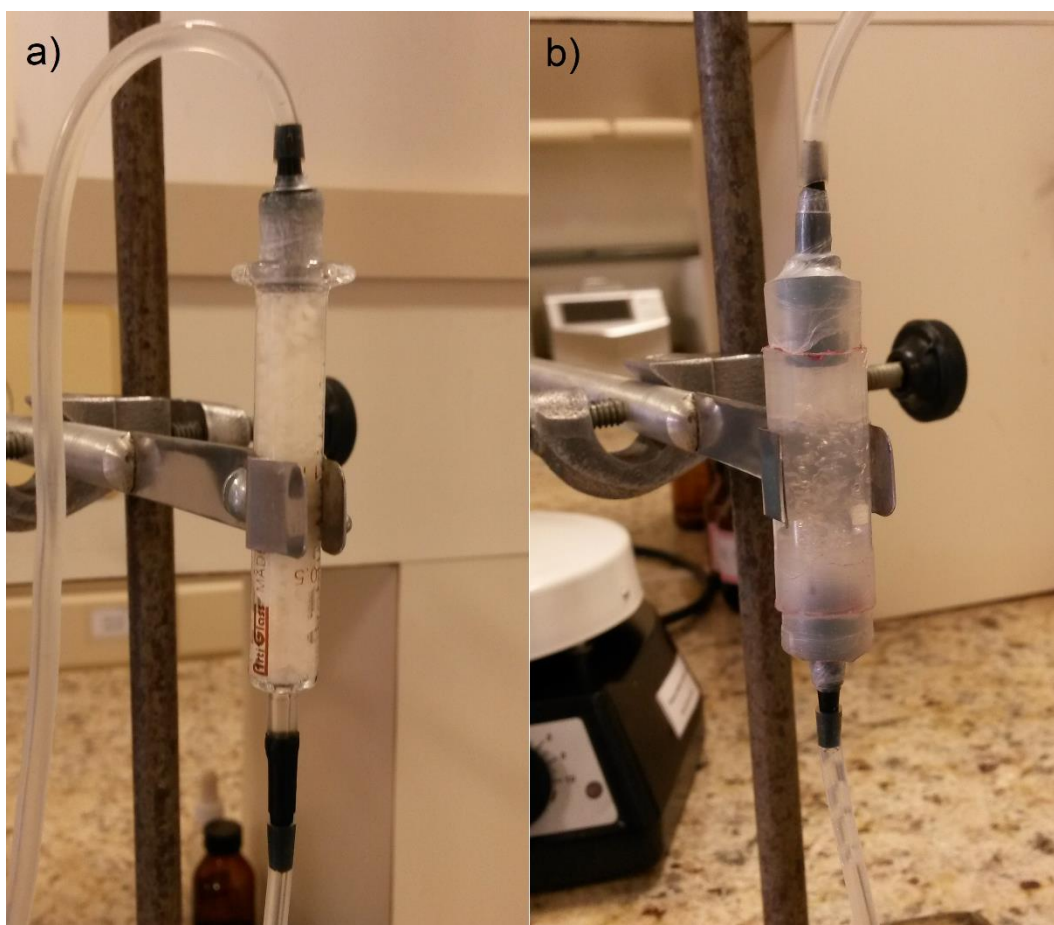
A fim de transpor o sistema em batelada estudado para um fluxo contínuo, a construção dos mini biorreatores foi feita levando-se em consideração o tamanho das esferas de alginato de cálcio nas quais o biocatalisador fora imobilizado.

A princípio, construiu-se um reator utilizando uma seringa de vidro (reator A) de 1,0 mL (Figura 38a). Feitas as devidas adaptações para encaixe das mangueiras da bomba peristáltica, as medidas deste reator foram definidas em 5,5 cm de comprimento x 0,8 cm de diâmetro. Realizou-se então um teste que consistia no

preenchimento do mesmo com células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em esferas de alginato de cálcio e passagem de uma solução de glicose $6,6 \text{ g L}^{-1}$, visando avaliar sua estabilidade. Devido ao diâmetro reduzido, o empacotamento das esferas foi dificultado e a vazão permitida pela extremidade inferior da seringa não suportava o fluxo mínimo da bomba peristáltica utilizada. Outros reatores foram então idealizados.

Procurando aumentar o diâmetro para facilitar o empacotamento das esferas, decidiu-se construir um segundo reator (reator B), dessa vez utilizando uma seringa de plástico de 5,0 mL (Figura 38b). Adaptações também foram realizadas para encaixe apropriado das mangueiras da bomba peristáltica e as medidas deste reator foram definidas em 3,5 cm de comprimento x 1,3 cm de diâmetro. Esferas de alginato de cálcio foram produzidas para avaliar o empacotamento e a vazão do reator preenchido, percebendo uma notável melhora quando comparado ao reator A. O reator B foi então utilizado para aplicação da resolução cinética de 3.

Figura 38 – Mini Biorreatores, a) Biorreator A, b) Biorreator B.



Fonte: autor.

As condições e resultados da resolução cinética no reator B são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Condições e resultados da resolução cinética enzimática em fluxo contínuo para o reator B.

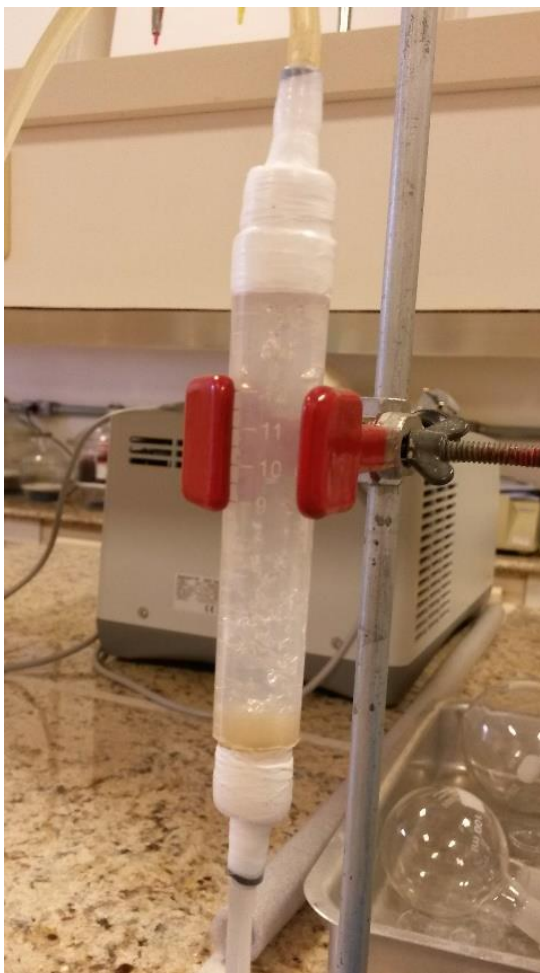
Condições	
Fluxo (mL min ⁻¹)	0,92
Volume interno (mL)	3,1
Volume útil (mL)	1,2
Taxa de diluição (min ⁻¹)	0,77
Fluxo de 4 (mmol L ⁻¹ min ⁻¹)	0,026
Tempo de residência (min)	1,3
Resultados	
Rendimento (%)	39
Extensão de reação (%)	74
Grau de conversão (%)	9
Produtividade de 3 (mmol L ⁻¹ min ⁻¹)	0,16
Velocidade específica de 3 (mmol L ⁻¹ min ⁻¹ g ⁻¹)	5,4
ee _R (%)	≥ 99

O excesso enantiomérico atingido (≥ 99%) foi excelente, mas a conversão foi inferior a 10%. Isso se deve ao fato de que a quantidade de substrato colocado em fluxo no reator era superior à capacidade de conversão pelas lipases em um tempo de residência baixo como o de 1,3 minuto. Portanto, (*R*)-**4** não pôde ser totalmente convertido em (*R*)-**3**. O problema poderia ser sanado por duas soluções: ou aumentasse o tempo de residência do reator, o que implicaria em diminuir o fluxo da bomba peristáltica (já se encontrava no mínimo) ou aumentar as dimensões do reator, ou diluiu-se ainda mais o substrato. Visto que o rendimento atingido foi relativamente baixo, decidiu-se construir um novo reator com dimensões maiores.

O reator C, mostrado na Figura 39, foi construído cortando-se as extremidades de um tubo Falcon de 20 mL e adaptando-as para que as mangueiras da bomba peristáltica pudessem ser devidamente colocadas. As medidas deste biorreator foram definidas como 8,8 cm de comprimento e 1,6 cm de diâmetro. Verificados bons resultados nos testes com o empacotamento das esferas de alginato de cálcio e a vazão do reator, a resolução cinética de **3** pela hidrólise de **4** foi realizada no biorreator

C, mantendo-se a concentração do substrato e a proporção da massa de lipase por volume de solução de alginato necessária para total preenchimento.

Figura 39 – Reator C



Fonte: autor.

Os resultados são apresentados na Tabela 7. Com o aumento do tempo de residência em aproximadamente 3,6 vezes, observou-se mesma proporção no aumento da conversão de (*R*)-4 a (*R*)-3, correlacionando, portanto, as dimensões do mini biorreator à conversão atingida. O excesso enantiomérico continuou superior a 99%.

Considerando o rendimento teórico máximo de 50% da resolução cinética, o resultado obtido para a conversão, de 31%, implica que mais de 60% do rendimento teórico foi alcançado.

Tabela 7 – Condições e resultados da resolução cinética enzimática em fluxo contínuo para o reator C.

Condições	
Fluxo (mL min ⁻¹)	0,92
Volume interno (mL)	12,5
Volume útil (mL)	4,4
Taxa de diluição (min ⁻¹)	0,21
Fluxo de 4 (mmol L ⁻¹ min ⁻¹)	0,031
Tempo de residência (min)	4,8
Resultados	
Rendimento (%)	49
Extensão de reação (%)	74
Grau de conversão (%)	31
Produtividade de 3 (mmol L ⁻¹ min ⁻¹)	0,17
Velocidade específica de 3 (mmol L ⁻¹ min ⁻¹ g ⁻¹)	1,4
ee _R (%)	≥ 99

5 Conclusão

Diversas condições reacionais para a resolução cinética enzimática da 1-feniletilamina e do 1-feniletanol foram avaliadas, dentre elas a reação mais apropriada, o tipo de lipase, a temperatura, o solvente reacional e o substrato. O melhor resultado obtido foi para a resolução cinética via hidrólise do acetato de 1-feniletila catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* a 40 °C, a qual obteve conversão de 51% e ee \geq 99%.

A mesma reação foi novamente estudada para a presença da lipase imobilizada em esferas de alginato de cálcio. O estudo cinético dessa condição foi realizado, observando-se um comportamento condizente com o padrão para reações enzimáticas, e o excesso enantiomérico manteve-se superior a 99% durante toda a reação.

Por fim, o sistema estudado foi transposto a um mini biorreator construído para realizar a reação em fluxo contínuo. Os parâmetros da resolução cinética foram medidos e obteve-se como melhor resultado conversão de 31%, para a qual o ee manteve-se \geq 99%, validando o uso do biorreator para a síntese assimétrica de blocos construtores.

6 Referências

- ANGAJALA, G.; PAVAN, P.; SUBASHINI, R. Lipases: An overview of its current challenges and prospectives in the revolution of biocatalysis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 257-270, Jul 2016.
- BHUSHAN, I. et al. Immobilization of Lipase by Entrapment in Ca-alginate Beads. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 23, n. 6, p. 552-562, Nov 2008.
- BORNSCHEUER, U. T.; KAZLAUSKAS, R. J. **Hydrolases in Organic Synthesis**. 2nd. Wienheim: Wiley-VCH, 2006.
- CHOI, J. M.; HAN, S. S.; KIM, H. S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 7, p. 1443-1454, Nov 2015.
- CUI, Y. T. et al. Improvement of stability of nitrile hydratase via protein fragment swapping. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 450, n. 1, p. 401-408, Jul 2014.
- DE MIRANDA, A. S.; MIRANDA, L. S. M.; DE SOUZA, R. Ethyl acetate as an acyl donor in the continuous flow kinetic resolution of (+/-)-1-phenylethylamine catalyzed by lipases. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 11, n. 20, p. 3332-3336, 2013.
- FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 6th. Berlin: Springer, 2011.
- FERREIRA-LEITAO, V. S. et al. The Protagonism of Biocatalysis in Green Chemistry and Its Environmental Benefits. **Catalysts**, v. 7, n. 1, p. 34, Jan 2017.
- GONÇALVES, C. D. C. S.; MARSAIOLI, A. J. Fatos e tendências da Biocatálise. **Quim. Nova**, v. 36, n. 10, p. 1587-1590, 2013.
- JIN, H. X.; OUYANG, X. K. Enzymatic approaches to the preparation of chiral epichlorohydrin. **Rsc Advances**, v. 5, n. 113, p. 92988-92994, 2015.
- KAZLAUSKAZ, R. J. et al. A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*. **J. Org. Chem.**, v. 56, n. 8, 1991.
- LOTHER, A. M.; OETTERER, M. Microbial cell immobilization applied to alcohol production - a review. **Rev. Microbiol.**, v. 26, n. 3, p. 151-159, 1995.
- MELAIS, N.; ARIBI-ZOUIOUECHE, L.; Riant, O. The effect of the migrating group structure on enantioselectivity in lipase-catalyzed kinetic resolution of 1-phenylethanol. **Comptes Rendus Chimie**, v. 19, n. 8, p. 971-977, Aug 2016.
- MILAGRE, C. D. F. et al. Screening and reaction engineering for the bioreduction of ethyl benzoylacetate and its analogues. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 56, n. 1, p. 55-60, Jan 2009.

MILAGRE, H. M. S. **Síntese Biocatalítica de beta-Amino-alfa-hidroxiácidos. Aplicação na Síntese de Heterociclos Quirais.** 2005. Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP.

MILAGRE, H. M. S. et al. Reduction of ethyl benzoylformate mediated by *Saccharomyces cerevisiae* entrapped in alginate fibers with double gel layers in a continuously operated reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 1, p. 121-125, Jun 2005.

MILAGRE, H. M. S. Asymmetric bioreduction of ethyl 3-halo-2-oxo-4-phenylbutanoate by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in Ca-alginate beads with double gel layer. **Organic Process Research & Development**, v. 10, n. 3, p. 611-617, May 2006.

ORIVE, G. et al. **Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells.** Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2006.

PATEL, R. N. Biocatalysis for Synthesis of Pharmaceuticals. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2017.

RINGBORG, R. H.; WOODLEY, J. M. The application of reaction engineering to biocatalysis. **Reaction Chemistry & Engineering**, v. 1, n. 1, p. 10-22, 2016.

RIVA, S. 1983-2013: the long wave of biocatalysis. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 120-121, Mar 2013.

RODRIGUES, J. A. R. et al. A highly enantioselective chemoenzymatic synthesis of syn-3-amino-2-hydroxy esters: key intermediates for taxol side chain and phenylnorstatine. **Tetrahedron-Asymmetry**, v. 16, n. 18, p. 3099-3106, Sep 2005.

RODRIGUEZ-COLINAS, B. et al. Production of Galacto-oligosaccharides by the β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: comparative analysis of permeabilized cells versus soluble enzyme. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, n. 19, 2011.

SEO, D.-H. et al. High-yield enzymatic bioconversion of hydroquinone to α -arbutin, a powerful skin lightening agent, by amylosucrase. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 94, n. 5, 2012.

SHELDON, R. A.; PEREIRA, P. C. Biocatalysis engineering: the big picture. **Chem. Soc. Rev.**, v. 46, n. 10, 2017.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223-6235, 2013.

SHELDON, R. A.; WOODLEY, J. M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. **Chemical Reviews**, n. Special Issue: Sustainable Chemistry, 2017.

THALEN, L. K. et al. A Chemoenzymatic Approach to Enantiomerically Pure Amines Using Dynamic Kinetic Resolution: Application to the Synthesis of Norserttraline. **Chemistry-a European Journal**, v. 15, n. 14, p. 3403-3410, 2009.

TRUPPO, M. D. Biocatalysis in the Pharmaceutical Industry - The Need For Speed. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, n. 5, 2017.

WEBB, E. C. **Enzyme Nomenclature 1992. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes.** San Diego, California: Academic Press, 1992.

ZHANG, S. et al. Immobilization of Lipase with Alginate Hydrogel Beads and the Lipase-Catalyzed Kinetic Resolution of alpha-Phenyl Ethanol. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 8, p. 6, Apr 2014.