



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**FRANCISCO FELIPE MAIA DA SILVA**

PROCESSOS BIOCATALÍTICOS UTILIZANDO A CASCA DA LARANJA  
DA TERRA (*Citrus aurantium* L)

FORTALEZA

2012

**FRANCISCO FELIPE MAIA DA SILVA**

**PROCESSOS BIOCATALÍTICOS UTILIZANDO A CASCA DA LARANJA  
DA TERRA (*Citrus aurantium* L)**

Dissertação submetida ao  
Curso de Pós-Graduação em Química, da  
Universidade Federal do Ceará, como  
requisito parcial para obtenção do grau de  
Mestre em Química.

Área de Concentração: Química Orgânica

Orientadora: Profa. Dra Telma Leda Gomes de Lemos

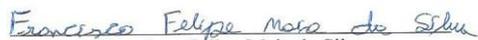
FORTALEZA-CE

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

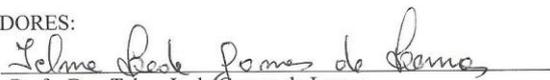
- 
- S583p Silva, Francisco Felipe Maia da.  
Processos biocatalíticos utilizando a casca da laranja da terra (*Citrus aurantium L*) / Francisco Felipe Maia da Silva. – 2012.  
140 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Mestrado (Dissertação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciência, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Mestrado em Química, Fortaleza, 2012.  
Área de Concentração: Química Orgânica.  
Orientação: Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos.
- 1.Rejeitos industriais . 2.Resíduos orgânicos. 3.Biocatalização. I. Título.

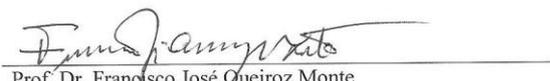
Esta Dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

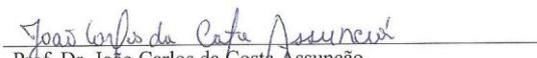
  
Francisco Felipe Maia da Silva

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 24/01/2012

EXAMINADORES:

  
Prof. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos  
Universidade Federal do Ceará – UFC

  
Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte  
Universidade Federal do Ceará – UFC

  
Prof. Dr. João Carlos da Costa Assunção  
Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia - IFCE

Aos meus Pais e a toda  
Minha Família que sempre  
estiveram ao meu lado  
contribuindo para realização dos  
meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, por ter compartilhado seus conhecimentos em prol de uma melhor formação profissional e pessoal para minha pessoa.

Ao Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, por permite a coleta do material vegetal utilizado neste trabalho.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio durante todo o curso.

Aos colegas de turma de Mestrado pela colaboração no meu aprendizado durante o Curso.

Aos meus amigos e amigas do LBPN, que hoje considero como Irmãos e Irmãs, pelo companheirismo e troca de experiências proporcionadas durante este trajeto.

Aos amigos do LBPS pelo apoio prestado durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os operadores que realizaram as análises qualitativas e quantitativas que nortearam a realização deste trabalho.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação em Química, em Especial, aos Professores (as): Telma Leda, Nilce Viana, Daniel, Gilvandete, Francisco Monte, Otília Pessoa e Marcus que em muito contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

A minha namorada, pelo apoio, compreensão e companheirismo durante toda realização deste trabalho.

“Um verdadeiro Químico não é aquele que busca simplesmente entender e dominar as transformações da matéria, mas sim, aquele que busca entendê-las e dominá-las para a construção de um mundo melhor”.

(Felipe Maia)

## RESUMO

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja e de suco de laranja, sendo este setor de grande importância para economia brasileira, responsável por gerar mais de 400 mil empregos e movimentar cifras de bilhões de reais por ano. Mas, este setor também é responsável pela produção de grande quantidade de rejeitos industriais, que equivalem a 50% do peso da fruta, sendo estes resíduos utilizados na maioria das vezes como ração animal. Portanto o uso eficiente destes rejeitos se faz necessário em um mundo em que as reservas naturais vêm se esgotando. Neste sentido a biocatálise mostra-se como uma ferramenta promissora no uso destes resíduos, que possuem enzimas em sua constituição, para obtenção de produtos de alto valor agregado, as substâncias enantiopuras. A aplicação de diferentes metodologias, práticas e de baixo custo, possibilitou a síntese de alcoóis quirais com alto excesso enantiomérico (*ee*) e boas taxas de conversão. Reações de hidrólise e redução foram processadas em meio aquoso e, as reações de esterificação foram realizadas em solvente orgânico, utilizando as casca da laranja como fonte de biocatalisadores. O uso das cascas da laranja como fonte de biocatalisador apresentou resultados bastante promissores, demonstrando capacidade catalítica em várias reações (redução/oxidação, hidrólise/esterificação) através de metodologias simples e de baixo custo. Conversões de 46,90-96,70% foram alcançadas nas reações de biorredução acompanhado de *ee* variando de 21,15-99,00%. Nas reações de hidrólise verificaram-se taxas de conversões de 19,20-80,82% e *ee* variando de 9,60-45,52%. Já nas reações de esterificação, *ee* acima de 99% foram observados e conversões maiores que 80% foram alcançadas. Portanto, este estudo abre precedentes para uma ampla faixa de aplicação desta fonte de biocatalisador (cascas da laranja), que atualmente é considerado como um rejeito industrial, contribuindo sobremaneira para agregar valor a todo um setor produtivo e industrial no qual o Brasil é líder, a indústria de suco de laranja.

Palavras-chave: biocatalisador, rejeito industrial, excesso enantiomérico, pureza ótica, alcoóis quirais, biorredução, hidrólises e esterificação enzimática.

## ABSTRACT

The Brazil is the producing greater of world of orange and orange juice, being this sector of great importance for Brazilian, responsible economy for generating 400 thousand jobs and more than and putting into motion ciphers of billions per year. But, this sector also is responsible for the production of great amount of industrial rejetscs, that are equivalent 50% of the weight of the fruit, being these used residues most of the time as animal ration. Therefore the use efficient of these rejetscs if makes necessary in a world where the natural reserves come if depleting. In this direction biocatalysis is presented as a promising tool in the use of these residues, that contains enzymes in its constitution, for attainment of products of high added value, the substances enantiopure. The application of different methodologies, practical and of low cost, made possible the chiral alcohols synthesis with high enantiomeric excess (ee) and good taxes of conversion. Hydrolysis reactions and reduction had been processed in aqueous way e, the reactions of esterification had been carried through in organic solvent, using the rind of the orange as source of biocatalysis for such reactions. The use of the peel of the orange as biocatalysis source presented resulted sufficiently promising, demonstrating catalytic capacity in some reactions (reduction/oxidation, hydrolysis/esterification) through simple methodologies and of low cost. Conversions of 46,90-96,70% had been reached in the reactions of bioreduction shown of ee varying of 21,15-99,00%. In the hydrolysis reactions taxes of 19,20-80,82% conversions and ee had been verified varying of 9,60-45,52%. Already in the esterification reactions, ee above of 99% had been observed and bigger conversions that 80% had been reached. From there, this study it opens precedents for an ample band of application of this source of biocatalysis (pells of the orange), that currently it is considered as one reject industrial, contributing excessively to add value all a productive and industrial sector in which Brazil is leader, the orange juice industry.

**keywords:** Biocatalysis, rejects industrial, enantiomeric excess, purity optics, chiral alcohols, bioreduction, hydrolysis and enzymatic esterification.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos de compostos que possui propriedades biológicas distintas em função da configuração dos enantiômeros. ....	20
Figura 2. Laranja da terra- árvore (a), Fruto (b e c) e casca (d). ....	24
Figura 3. Enantiômeros da talidomida.....	25
Figura 4. Separação enzimática dos enantiômeros <i>R</i> e <i>S</i> do 3-fenil-3-hidroxi-propanoato de etila .....	29
Figura 5. Síntese do ácido 6-amino penicilânico (CHAMBERS, 2003). ....	30
Figura 6. Resolução cinética de acetatos utilizando lipases de <i>Candida Antarctica</i> .....	31
Figura 7. Processos biocatalíticos utilizando a espécie <i>Daucus Carotas</i> Yadav (2002).....	32
Figura 8. Processos biocatalíticos utilizando <i>Saccharum officinarum</i> como catalisador.....	33
Figura 9. Reações de hidrólise catalisada pela Água de Coco do Ceará (ACC) .....	34
Figura 10. Enantiômero que reagiu mais rapidamente com a enzima <i>Culvaria lunata</i> e <i>Rhizopus nigricans</i> , conforme testes realizado por Prelog (PRELOG, 1964). ....	42
Figura 11. Análise do ( <i>RS</i> )-1-feniletanol através de CLAE-quiral. ....	46
Figura 12. Possibilidade de ataque do hidreto em ambas as faces da acetofenona .....	46
Figura 13. Análise da acetofenona por CLAE.....	46
Figura 14. Espectro de Infravermelho do ( <i>RS</i> )-1-feniletanol. ....	47
Figura 15. Processo biocatalítico geral de redução. A-corte longitudinal, B-retirada manual das cascas seguido de cortes cúbicos, C-adição de água e substratos. ....	48
Figura 16. Gráfico apresentando as variações da conversão e do ee em diferentes quantidades de CLT.....	49
Figura 17. Reação de biorredução da acetofenona com 20g de CLT .....	49
Figura 18. Cromatograma da reação de biorredução da acetofenona com 20g de CLT .....	50
Figura 19. Gráfico da variação da conversão e do ee da biorredução da acetofenona.....	51
Figura 20. Cromatograma da reação de biorredução da acetofenona (1) com CLT após 72h. ....	51
Figura 21. Cromatograma da análise da reação de biorredução conduzida em pH 8,40.....	53
Figura 22. Substratos analisados frente a reação de biorredução com CLT e produtos esperados. ....	55
Figura 23. Cromatograma (CG-MS) do resultado da reação do composto 7 com CLT.....	56
Figura 24. Cromatograma (HPLC) do resultado da reação de biorredução do composto 7.....	57

Figura 25. Cromatograma (CG-MS) do resultado da reação de biorredução de 12.....	57
Figura 26. Reação de biorredução da substância 12 com CLT .....	58
Figura 27. Reação de acetilação via química do (RS)-1-feniletanol.....	59
Figura 28. Cromatograma do (RS)-acetato de 1-feniletila (coluna OB-H).....	59
Figura 29. Espectro de infravermelho do racemato (RS)-acetato de 1-feniletila.....	60
Figura 30. Cromatograma da reação de hidrólise do (RS)-acetato de 1-feniletila .....	61
Figura 31. Cromatograma do controle da reação de hidrólise do (RS)-acetato de 1-feniletila.	61
Figura 32. Processo de obtenção do EBEL. A-corte longitudinal, B-separação das casas seguido de corte cúbicos e, C-trituração mecânica seguido de centrifugação e filtração .....	62
Figura 33. Cromatograma da reação de hidrólise do (RS)-acetato de 1-feniletila com EBEL.	62
Figura 34. Representação da equação química de hidrólise de 2c e 2d com EBEL.....	63
Figura 35. Espectro de RMN 1H da reação de hidrólise dos compostos 2c e 2d produzindo 2a e 2b. ....	64
Figura 36. Espectro de RMN 1H dos compostos 2c e 2d (padrão). ....	64
Figura 37. Espectro de RMN 1H do branco da reação de hidrólise do (RS)-acetato de 1- feniletila.....	65
Figura 38. Gráfico mostrando a diferença no <i>ee</i> e na conversão entre a CLT e o EBEL.....	65
Figura 39. Gráfico da quantidade de catalisador X conversão e <i>ee</i> .....	67
Figura 40. Cromatograma da reação de hidrólise de 2c e 2d com 20mL de EBEL. ....	67
Figura 41. Reação de hidrólise dos compostos 2c e 2d em diferentes pH .....	69
Figura 42. Gráfico da conversão e do <i>ee</i> em diferentes tempos de reação.....	70
Figura 43. Reação de acetilação dos alcoóis racêmicos .....	71
Figura 44. Reação de hidrólise de acetatos por EBEL. ....	72
Figura 45. Conformação destacando o impedimento espacial (a) e possível interação eletrônica (b) presente no composto 3.....	73
Figura 46. Reação de hidrólise do (RS)-acetato de 1-(1,2,3,4-tetrahidro)naftil. ....	74
Figura 47. Compostos 11 e 12 submetidos a reação de hidrólise com EBEL.....	74
Figura 48. Análise da quimiosseletividade do EBEL.....	75
Figura 49. Formação de 13a estabilizado por ligação de hidrogênio intramolecular.....	75
Figura 50. Processo geral para obtenção do EBEL e das CLD .....	77
Figura 51. Reação de esterificação do (RS)-1-feniletanol utilizando CLD como catalisador..	77
Figura 52. Processos biocatalíticos que resultam na racemização do 1-feniletanol.....	78

Figura 53. Reação de esterificação de 2a e 2b com acetato de vinila na presença de CLD .....	81
Figura 54. Cromatograma da reação de 2a e 2b com acetato de vinila utilizando CLD como catalisador.....	81
Figura 55. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da reação de 2a e 2b com anidrido hexanóico utilizando CLD como catalisador.....	83
Figura 56. Reuso das CLD nas reações de esterificação. ....	84
Figura 57. Reutilização da CLD em reações de esterificação de 2c e 2d.....	85
Figura 58. Cromatograma da reação de esterificação de 2a e 2b após reusar as CLD pela 3 <sup>a</sup> vez.....	85
Figura 59. Comparação da taxa de conversão e do <i>ee</i> de CLD frescas e após 30 dias de armazenamento.....	86
Figura 60. Resultado da reação de esterificação de 2a e 2b catalisada por CLD a diferentes temperaturas.....	87
Figura 61. Cromatograma da reação de esterificação de 2a e 2b catalisada por CLD a 55°C .	88
Figura 62. Alcoóis racêmicos utilizados nas reações de esterificação catalisada por CLD .....	89
Figura 63. Cromatograma da reação de esterificação do etan-(4-fluorofenil)-1-ol catalisada por CLD.....	91
Figura 64. 1-reação de adição a ligação olefínica do eugenol; 2-reação de hidrólise em meio alcalino; 3-reação de esterificação catalisada por CLD.....	92
Figura 65. Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto 14 .....	93
Figura 66. Espectro de RMN <sup>13</sup> C do composto 14.....	94
Figura 67. CLMD (à direita), CTD (no centro) e CLCD (à esquerda).....	95
Figura 68. Reação de esterificação catalisada por CLMD .....	96
Figura 69. Fotografia ilustrando a realização do processo de separação por cromatografia em coluna gravitacional.....	99
Figura 70. Fotografia do equipamento de CLAE utilizado nas análises dos <i>ee</i> .....	99
Figura 71. Obtenção das cascas da laranja ralada para posterior extração com acetona.....	105

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos que apresentam características relacionadas à sua configuração.....	26
Tabela 2. Classificação das enzimas segundo a Enzyme Commission (SANTANIELLO, 1992) .....	27
Tabela 3. Estabilidade de enzimas em meio aquoso versus não-aquoso (ZAKS, 1996).....	36
Tabela 4. Resultados da resolução enzimática dos álcoois alílicos via acetilação com acetato de vinila na presença de CALB .....	41
Tabela 5. Análise do teor de proteínas presentes na CLT e no EBEL .....	44
Tabela 6. Taxa de conversão e ee com a variação da quantidade de catalisador. ....	48
Tabela 7. Valores de conversão e ee da biorredução da acetofenona com o tempo.....	50
Tabela 8. Resultados da biorredução da acetofenona com CLT com a variação do pH. ....	52
Tabela 9. Conversão e ee obtidos da reação de hidrólise de 2c e 2d com diferentes quantidades de EBEL. ....	66
Tabela 10. Conversão e ee em diferentes valores de pH.....	68
Tabela 11. Conversão e ee em diferentes tempos de reação de 2c e 2d frente ao EBEL. ....	69
Tabela 12. Reação de hidrólise de acetatos frente a EBEL.....	72
Tabela 13. Valores de conversão e ee da reação de esterificação do (RS)-1-feniletanol em diferentes intervalos de tempo. ....	79
Tabela 14. Influência do solvente na reação de esterificação do (RS)-1-feniletanol com CLD .....	80
Tabela 15. Influência do agente acilante na reação de esterificação de 2a e 2b com CLD. ....	82
Tabela 16. Alcoóis racêmicos submetidos a reação de esterificação utilizando CLD como catalisador.....	90

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CGMS- Cromatografia Gasosa acoplada a Espectroscopia de Massa

CLAE- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLD- Casca da Laranja Desidratada

CLCD- Casca da Laranja Comercial Desidratada

CLMD- Casca do Limão desidratada

CLT- Casca da Laranja da Terra

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

EBEL- Extrato Bruto Enzimático da Laranja

*ee* -Excesso Enantiomérico

IV- Infravermelho

LBPN Laboratório de Biocatálise e Produtos Naturais

LBPS- Laboratório de Biotransformação e Síntese Orgânica

Log P- Coeficiente de partição

MT- Megatonelada

RMN <sup>1</sup>H- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN <sup>13</sup>C- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

T<sub>R</sub> -Tempo de Retenção

UV- Ultravioleta

# SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>23</b>
2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A INDÚSTRIA DE CITRUS .....	23
2.2 A IMPORTÂNCIA DA QUIRALIDADE.....	24
2.3 BIOCATÁLISE EM SÍNTESE ASSIMÉTRICA .....	27
2.4 BIOCATÁLISE EM SOLVENTES ORGÂNICOS .....	34
2.5 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA .....	38
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
3.1 OBJETIVOS GERAIS .....	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	43
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
4.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS .....	44
4.2 PROCESSOS BIOCATALÍTICOS .....	45
4.2.1 QUANTIDADE DE BIOCATALISADOR .....	47
4.2.2 TEMPO DE REAÇÃO .....	50
4.2.3 QUANTO AO PH DO MEIO .....	52
4.2.4 BIORREDUÇÃO DE OUTROS SUBSTRATOS.....	53
4.2.5 REAÇÕES DE HIDRÓLISE CATALISADA PELA CLT .....	58
4.2.6 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO (RS)- ACETATO DE 1-FENILETILA.....	61
4.2.7 QUANTO AO TRATAMENTO DO CATALISADOR.....	62
4.2.8 QUANTIDADE DE CATALISADOR.....	66
4.2.9 PH DA SOLUÇÃO .....	68
4.2.10 TEMPO DE REAÇÃO .....	69
4.2.11OUTROS SUBSTRATOS .....	70
<b>4.3 REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADAS PELA CASCA DA LARANJA DESIDRATADA(CLD) .....</b>	<b>76</b>
4.3.1 EFEITO DO SOLVENTE NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADA POR CLD .....	79

4.3.2 EFEITO DO AGENTE ACILANTE .....	80
4.3.3 REUSO DA CLD NAS REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO DE 2A E 2B .....	84
4.3.3.1 CAPACIDADE DE ARMAZENAMENTO DAS CLD .....	86
4.3.4 EFEITO DA TEMPERATURA NAS REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADAS POR CLD.....	87
4.3.5 REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DE ALCOÓIS RACÊMICOS CATALISADA POR CLD.....	88
<b><u>5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....</u></b>	<b>97</b>
<b>5.1 FONTE DO BIOCATALISADOR .....</b>	<b>97</b>
<b>5.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO (EBEL) .....</b>	<b>97</b>
<b>5.3 MATERIAL UTILIZADO .....</b>	<b>97</b>
<b>5.4 MÉTODOS DE SEPARAÇÃO E ANÁLISES.....</b>	<b>98</b>
5.4.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) .....	98
5.4.2 CROMATOGRAFIA DE ADSORÇÃO .....	98
5.4.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) .....	99
5.4.3.1 CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO DOS SUBSTRATOS .....	100
5.4.4 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-EM) .....	102
5.4.5 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN <sup>1</sup> H) .....	103
5.4.6 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (IV) .....	103
5.4.7 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLENTA-VISÍVEL (UV-Vis) .....	103
<b>5.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS .....</b>	<b>103</b>
5.5.1 MÉTODO PARA DETERMINAR O TEOR DE PROTEÍNAS .....	104
<b>5.6 PROCESSO BIOCATALÍTICO DAS REAÇÕES DE BIORREDUÇÃO .....</b>	<b>104</b>
5.6.1 PROCEDIMENTO GERAL PARA REAÇÕES DE BIORREDUÇÃO .....	104
5.6.2 PROCEDIMENTO GERAL PARA REAÇÕES EFETUADAS COM EBEL .....	105
5.6.3 PROCEDIMENTO GERAL PARA AS REAÇÕES DE BIOESTERIFICAÇÃO .....	105
5.6.4 PROCEDIMENTO GERAL PARA AS REAÇÕES DE REDUÇÃO DOS COMPOSTOS CARBONÍLICOS POR VIA QUÍMICA. .	106
5.6.5 PROCEDIMENTO GERAL PARA REAÇÃO DE ACETILAÇÃO POR VIA QUÍMICA DE ALCOÓIS. ....	106
5.7 PROCEDIMENTO PARA REAÇÃO DE ADIÇÃO DE ÁCIDO A LIGAÇÃO OLEFÍNICA DO EUGENOL.....	106
<b>5.8 PROCEDIMENTO PARA CALCULAR O EXCESSO ENANTIOMÉRICO (EE).....</b>	<b>107</b>
<b><u>6. CONCLUSÕES.....</u></b>	<b>108</b>

**7. REFERÊNCIAS..... 110**

**APÊNDICES..... 119**

## 1.INTRODUÇÃO

Ao longo da história a humanidade sempre buscou aperfeiçoar suas ferramentas e processos visando obter uma maior produtividade com menor custo. Hoje esta busca torna-se bem mais complexa, uma vez que, além de continuar a desenvolver novos processos que maximizem a produção e minimizem os custos, a responsabilidade ambiental na atualidade há de ser levada em consideração para que os sistemas de produção e transformação não tenham que sacrificar o meio ambiente para alcançar seus objetivos.

Assim, a utilização dos recursos naturais de forma que venham a garantir um aproveitamento máximo, torna-se cada vez mais importante em um planeta em que muitas matérias-primas estão se esgotando, o que pode culminar com a escassez de produtos que hoje a humanidade é praticamente dependente. Com isso, o aproveitamento de rejeitos industriais em tecnologias práticas e de baixo custo que venham a agregar valor ao processo como todo é essencial para a obtenção de uma maior produtividade em consonância com a preservação ambiental.

Dentro desta realidade a indústria de *Citrus* é, atualmente, uma das que se destacam na produção de rejeitos industriais na atualidade. A industrialização de *Citrus* para a produção de sucos gera grandes quantidades de resíduos, que equivale a 50% do peso da fruta e tem uma umidade aproximada de 82%. Hoje, os resíduos da laranja são utilizados principalmente como complemento para ração animal (ABECITRUS, 2008).

Com o crescimento da produção dessas indústrias de transformação no mundo, crescem proporcionalmente a disponibilidade de grandes quantidades de rejeitos, principalmente, sementes e cascas de *Citrus* que podem ser utilizadas de forma mais eficiente (AKPATA, 1999).

A literatura já reporta vários estudos que visam agregar valor aos rejeitos industriais oriundos da indústria de *Citrus*, destacando-se: a obtenção de fertilizantes orgânicos, pectina, óleos essenciais, compostos antioxidantes e como substratos para a produção de diversos compostos com alto valor agregado, tais como proteínas microbianas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e metabólitos secundários biologicamente ativos. Essas são boas alternativas para evitar a poluição do meio ambiente e agregar valor a essas substâncias

até então tratadas como resíduos da indústria de processamento da laranja (ABECITRUS, 2008).

Mesmo com um número considerável de estudos visando o aproveitamento desses rejeitos nota-se pouco enfoque em se utilizar os subprodutos da indústria de Citrus, especialmente, as cascas (albedo e flavedo), de forma direta e prática, uma vez que processos tais como a produção de enzima mediada por microorganismo, onde se utiliza as cascas Citrus como fonte de carbono, demanda de custos adicionais, envolvendo um número considerável de etapas, tornando muitas vezes o processo global inviável economicamente.

Nesse contexto, a biocatálise, que pode ser considerada como o ramo da ciência que estuda a aplicação de catalisadores oriundos de fontes biológicas (microorganismos, células de plantas, culturas de células e enzimas isoladas) na modificação de substâncias químicas diversas, mostra-se como uma alternativa promissora para o aproveitamento dos rejeitos da indústria de Citrus, pois estes apresentam em sua constituição natural, enzimas, macromoléculas biológicas capazes de catalisar um grande número de reações químicas.

As enzimas se destacam por terem características bastante peculiares, dentre as quais se ressalta: atuação em condições brandas de temperatura e pressão, capacidade de catalisar reações diversas, atividade em meios não convencionais (solventes orgânicos), baixa ou nenhuma produção de compostos tóxicos ao meio ambiente e alta quimio-, regio-, e enantiosseletividade, devido à quiralidade inerente a estes catalisadores.

Nos últimos anos a biocatálise conseguiu superar muitas barreiras que impediam sua utilização efetiva no mercado mundial e, por isto, é a área que atualmente apresenta maior crescimento na produção industrial de moléculas biologicamente ativas (OLSON E RATZKIN, 1999).

Os biocatalisadores podem ser utilizados em síntese orgânica na forma de células íntegras de animais, vegetais e microorganismos, ou de enzimas isoladas destas fontes. Podem ainda, ser imobilizados em diversos suportes. Este procedimento permite a recuperação do biocatalisador no meio convencional mais facilmente e o aumento da sua estabilidade, agregando importantes vantagens para utilização dos mesmos (D'SOUZA, 1999).

Vários fatores contribuem para uma crescente aceitação dos biocatalisadores em síntese orgânica, seja na pesquisa ou na produção industrial. Cada vez mais, características conhecidas das enzimas, como, por exemplo, a enantioespecificidade, soma-se à tendência mundial de investimentos nas tecnologias limpas. As enzimas aumentam a velocidade das reações, acelerando-as em até  $10^{15}$  vezes. As condições moderadas de reação em que opera a maior parte das enzimas permitem reduzir as reações secundárias, diminuindo a formação de subprodutos indesejáveis, a decomposição e a racemização de substratos e produtos. Geralmente as enzimas atuam em meio aquoso, em valores de pH entre 5 e 8 e temperaturas que variam de 20 a 40°C. A capacidade de diferenciar um dos enantiômeros de um racemato, ou de uma mistura enriquecida em um dos isômeros é uma característica fundamental em áreas em que a pureza ótica dos produtos é imprescindível (ELBA, 2008). Um exemplo da importância da pureza ótica na síntese orgânica pode ser visualizado na figura 1, onde os efeitos fisiológicos são muitas vezes distintos para um par de enantiômeros.

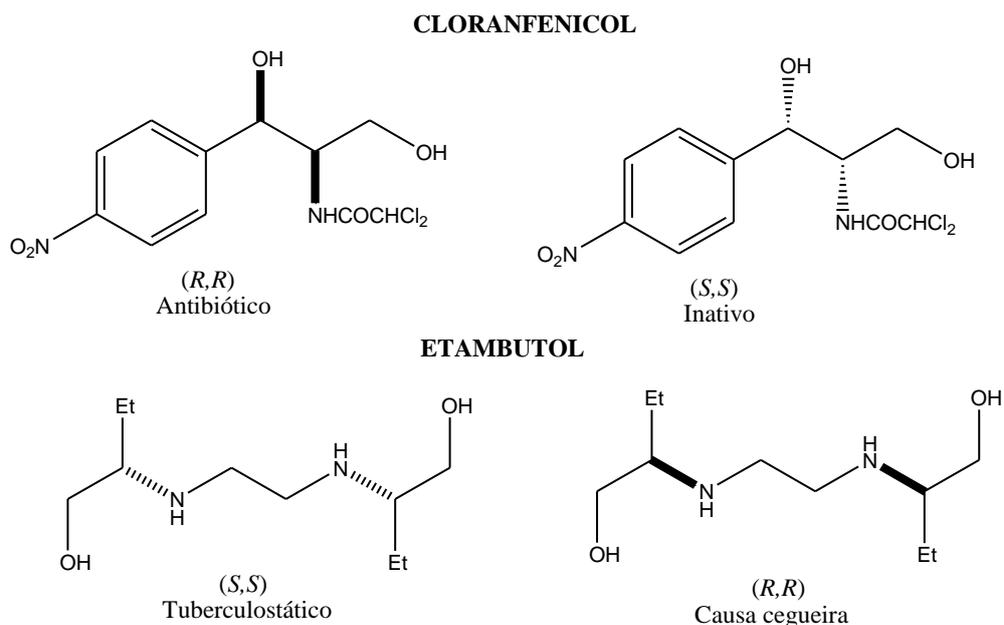


Figura 1. Exemplos de compostos que possui propriedades biológicas distintas em função da configuração dos enantiômeros.

Até o início da década de 90, cerca de 90% das drogas quirais sintéticas eram ainda comercializadas na forma racêmica. Em 1992 a FDA ( Food and Drug Administration), nos EUA, introduziu uma diretriz considerando que os fármacos quirais devem ser preferencialmente comercializados em sua forma enantiomericamente pura, e não mais, na

forma racêmica (FDA, 2009). Para um fármaco quiral ser comercializado na sua forma racêmica ou com diferentes proporções enantioméricas, o fabricante deverá fazer um estudo de atividade biológica para seus enantiômeros separadamente. Tal regulamentação para fármacos sintéticos resultou em um aumento significativo na proporção de drogas enantiomericamente puras no mercado. No ano de 2000, a venda mundial de compostos na forma enantiomericamente pura alcançou 123 bilhões de dólares (STINSON, 2001; ROUHI, 2002). Assim, o desenvolvimento e aperfeiçoamento de métodos eficientes para alcançar este objetivo, tem sido um substancial desafio para os químicos de instituições de pesquisa e indústria (MAY, 2002).

A incessante busca por compostos com atividade farmacológica os quais, em sua grande maioria, são compostos quirais com pelo menos um centro estereogênico, o que pode dificultar sua obtenção através de reações por via química convencional, torna os estudos de biocatálise e a busca de novas fontes biocatalíticas cada vez mais comuns. Em função disto, as maiores aplicações da biocatálise são referentes à sua utilização em síntese assimétrica, onde as enzimas vêm sendo utilizadas em substituição dos processos químicos clássicos (PANKE *et al.*, 2004).

A literatura vem demonstrando outro enfoque capaz de aumentar o espectro de aplicação da biocatálise: a junção de processos químicos e biotecnológicos, processos quimioenzimáticos (PANKE E WUBBOLTS, 2002). A produção de blocos quirais de construção, mediante esses processos está sendo utilizada na produção de pesticidas, pigmentos, cristais líquidos, aromas, fragrâncias e polímeros (BOMMARIUS, 1998).

A grande maioria das reações enzimáticas utiliza bactérias e fungos, mas também são relatados ensaios com enzimas isoladas e mais recentemente, com células íntegras. O uso de células íntegras está relacionado com a utilização da biomassa (VILELA, 2000) da fonte enzimática nas reações em questão, pois, em reações químicas e bioquímicas, o uso de enzimas puras pode ser dispendioso e seu descarte após o uso é economicamente inviável. Além disso, a recuperação do meio reacional pode ser difícil (FABER, 2000).

Visando desenvolver metodologias práticas e de baixo custo, operacional e econômico, o presente trabalho investigou o potencial uso dos rejeitos da indústria de *Citrus*, em especial, as cascas (albedo e flavedo) da laranja, na biocatálise, para a produção de

compostos com alto valor de mercado (os compostos enantiomericamente puros). Para avaliar a capacidade biocatalítica dos rejeitos industriais da indústria de citrus, as cascas da espécie *Citrus aurantium* L, conhecida popularmente como Laranja da Terra, foram utilizada em reações de redução de cetonas aromáticas pró-quirais, e em reações de resolução cinética, hidrólise e esterificação de racematos de ésteres e alcoóis quirais, respectivamente.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Considerações sobre a indústria de *Citrus*

Os *Citrus* são originários da Ásia, devido às condições favoráveis para seu desenvolvimento foram introduzidas no Brasil pelos portugueses (COSTA, 2000). *Citrus* são reconhecidas como uma das mais importantes fruteiras do mundo. São colhidas em muitos países com clima tropical ou subtropical e os principais produtores são Brasil, China, Japão, México, Paquistão, E.U.A. e os países da região do Mediterrâneo. A produção citrícola mundial é de cerca de 105 MT / ano. Os resíduos da indústria de suco, como cascas, sementes e polpas, que representam cerca de 50% das frutas, é uma fonte potencial de valiosos subprodutos (ANWAR *et al.*, 2008).

O Brasil se destaca como um dos maiores produtores e o maior exportador de sucos cítricos (LUZIA; JORGE, 2009). Detém 30% da produção mundial de laranja e 59% de suco de laranja. O sistema agroindustrial citrícola movimenta R\$ 9 bilhões por ano e gera mais de 400 mil empregos diretos e indiretos. Com o crescimento da competitividade internacional as inovações em pesquisa, tecnologia e logística estão na base da eficiência e liderança do Brasil tanto na atividade produtiva quanto na industrial (JANK, 2006).

A citricultura é um relevante segmento da economia mundial, presente em mais de 80 países. Atualmente o Brasil é o maior produtor de laranja do mundo, seguido por Estados Unidos da América, México, Índia e Espanha (FAO, 2008). No Brasil, a citricultura encontra-se concentrada em poucas variedades de laranja (Hamlin, Natal, Pêra e Valência) o que concentra a produção em parte do ano e aumenta o risco de incidência generalizada de pragas e doenças. Entretanto, ainda há espécies cítricas sub-utilizadas seja como porta-enxerto (sapota branca), (CAVALCANTE *et al.*, 2008), seja para a produção de frutos de mesa, como a laranja da terra.

Os frutos da laranja-da-terra, *Citrus aurantium* L, são consumidos *in natura* na forma de sucos e temperos e a casca utilizada na culinária para a produção de doces e geléias (LORENZI *et al.*, 2006).

A espécie *Citrus aurantium* L. (figura 1a), é popularmente conhecida como laranja-azedada (figura 1b e 1c). Esta tem origem no Sudoeste asiático, e no Brasil é encontrada

em pomares domésticos. Sua multiplicação é feita através de sementes e as plantas são caracterizadas por apresentarem porte mediano, flores aromáticas, espinhos agudos e frutos do tipo baga, arredondado com casca medianamente grossa e amarga, sendo utilizada na alimentação, medicina e indústria (LORENZI *et al.*, 2006).



Figura 2. Laranja da terra- árvore (a), Fruto (b e c) e casca (d).

## 2.2 A Importância da Quiralidade

Uma molécula é considerada quiral quando não é sobreponível a sua imagem especular e não apresenta qualquer elemento de simetria. Compostos como DNA, enzimas, anticorpos e hormônios, que estão diretamente relacionados com o bom funcionamento do corpo dos seres vivos, são compostos quirais, o que torna a quiralidade uma propriedade extremamente importante tanto no ponto de vista da indústria farmacêutica quanto da indústria química e bioquímica (QUEIROZ, 2002).

Um caso clássico e até certo ponto, trágico, da importância da quiralidade na indústria farmacêutica é dirigido ao efeito da talidomida que, durante a década de 60, foi comercializada na forma racêmica como sedativo para aliviar náuseas matinais em gestantes. O medicamento foi retirado do mercado por apresentar diversos efeitos colaterais. Estudos posteriores comprovaram que o isômero *R* possuía a atividade sedativa desejada, já o

composto que apresentava configuração *S* levava a deformações congênitas nos fetos quando utilizado em gestantes (SILVA Jr et al., 2009).

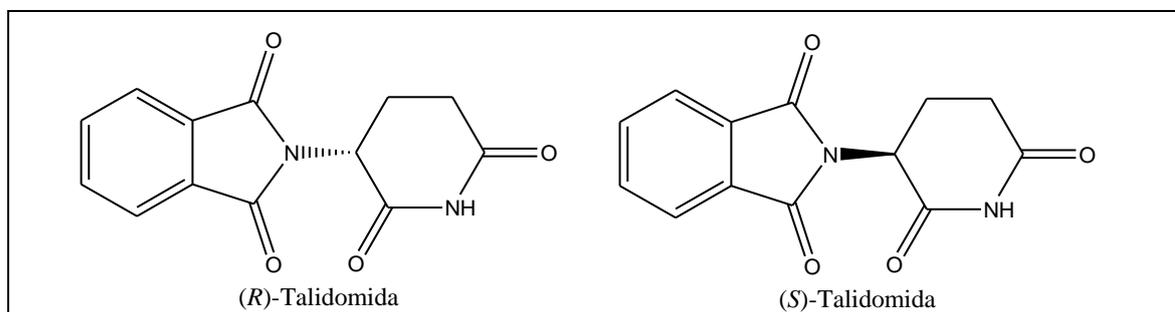


Figura 3. Enantiômeros da talidomida

Além da talidomida, diversos outros compostos são encontrados na natureza e apresentam propriedades biológicas e farmacológicas relacionadas com sua configuração. Alguns desses compostos são mostrados a seguir na Tabela 1 (QUEIROZ, 2002; Fassihi, 1993).

Tabela 1. Compostos que apresentam características relacionadas à sua configuração.

Composto	Configuração	Propriedade biológica/farmacológica
Limoneno	R	Aroma de laranja
	S	Aroma de limão
Asparagina	R	Sabor doce
	S	Sabor amargo
Pacloutrazol	2R,3R	Fungicida
	2S,3S	Regulador decrescimento
Etambutol	SS	Tuberculostático
	RR	Pode provocar cegueira
Penicilamina	S	anti-artrítico
	R	Extremamente tóxico
Estrona	Forma (+)	Hormônio estrogênico
	Forma (-)	Inativo
Adrenalina	Forma (-)	A forma levógira é 20 vezes mais ativa e igualmente mais tóxica
Talidomida	R	Sedativo
	S	Teratogênico
Salbutamol	R	80 vezes mais ativo que a forma S(+)
Anfetamina	+	2 vezes mais ativa que o enantiômero (-)
Indacrinona	+	Ação diurética e retenção do ácido úrico
	-	Efeito uricosúrico
Clorfeniramina	S	Atividade anti-histamínica

R

Praticamente inativo

Ações diferenciadas podem ser apresentadas por dois enantiômeros sobre os organismos vivos, levando a diferentes sabores, odores, toxicidades e ações biológicas (THALL, 1996). Tal enantiodiferenciação é baseada nas diferentes propriedades físicas dos diastereoisômeros formados a partir da interação entre os enantiômeros de um substrato e os receptores biológicos, que são macromoléculas quirais. Esta ação diferenciada dos enantiômeros de uma substância nos organismos vivos levou ao surgimento de processos industriais onde a pureza ótica é fundamental para a qualidade do produto, tais como: farmacêutica, alimentícia, de produtos agrícolas e perfumaria (AITKEN, 1994).

### 2.3 Biocatálise em Síntese Assimétrica

As enzimas são capazes de catalisar grande variedade de reações úteis na síntese orgânica e são tradicionalmente divididas em seis classes: oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (tabela 2).

Tabela 2. Classificação das enzimas segundo a Enzyme Commission (SANTANIELLO, 1992)

Classe	Tipo de reação	Necessidade de Coenzima
Oxirredutases	Reduções/Oxidações	Sim
Transferases	Transferência de grupos $A-(B) + C = A-C + (B)$	Sim
Hidrolases	Hidrólises e condensações	Não
Liases	Adições/ eliminações	Não
Isomerases	Isomerizações	Não
Ligases	Formação e clivagem de ligações C-X (como C-O, C-S e C-N)	Sim

A forma do sítio ativo é decorrente da estrutura tridimensional da enzima e pode ser afetada por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças conformacionais na proteína. Por isso, além do substrato a ser transformado, o meio de reação deve conter os íons necessários e valores de pH e temperatura ajustados para a plena atividade enzimática. Algumas reações também exigem a presença de coenzimas, como NADH e NADPH. Estas devem ser regeneradas por um segundo sistema catalítico, em presença de um co-substrato, para que o processo se torne economicamente viável (TORRES, 2001).

O uso de enzimas isoladas é mais comum em reações de hidrólise, mas também apresenta a vantagem de permitir a catálise de reações que não são realizadas em meio aquoso, como esterificações, transesterificações e lactonizações. O equilíbrio entre as reações de hidrólise e o reverso (síntese) pode ser controlado pela atividade de água na mistura Reacional: a alta atividade de água favorece a hidrólise; em atividade de água reduzida, as reações de síntese predominam (VILLENEUVE et al., 2000). Vale ressaltar que nem sempre a especificidade verificada nas reações de hidrólise se mantém em condições de síntese (LORTIE, 1997).

Enzimas hidrolíticas podem ser utilizadas na resolução de racematos. Bhushan et al. (2008) empregaram uma lipase isolada de *Arthrobacter* sp. para separar os enantiômeros do 3-fenil-3-hidroxiopropanoato de etila através da formação do ácido (*S*)-3-fenil-3-hidroxiopropanoico (figura 4). Após a reação, o ácido foi separado do éster por recristalização em hexano e acetato de etila. Ribeiro, Passaroto e Brenelli (2001) realizaram a mesma reação, porém em banho ultrassônico e catalisada por outras enzimas (lipase de *Pseudomonas cepacia*, lipase de *Candida rugosa* e esterase hepática de porco). Os produtos foram separados por extração ácido-base. Com a lipase de *P. cepacia*, o (*R*)-hidroxiéster foi obtido com mais de 98% *ee*, enquanto o ácido de configuração (*S*) foi obtido com 76% *ee*.

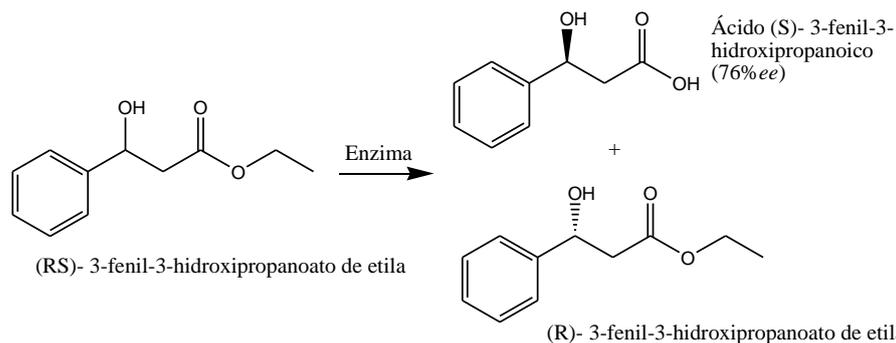


Figura 4. Separação dos enantiômeros R e S do 3-fenil-3-hidroxiopropanoato de etila por hidrólise enantiosseletiva catalisada por lipase de *Pseudomonas Cepacia* (RIBEIRO, 2001).

As células íntegras, pela presença de muitas enzimas, geralmente catalisam diferentes reações para o mesmo substrato. Com o uso de enzimas isoladas, as reações indesejadas são minimizadas. Todavia, as etapas de isolamento e purificação das enzimas costumam ser dispendiosas. Em alguns casos esse problema pode ser solucionado com o emprego de preparações enzimáticas de baixa pureza ou pela imobilização da enzima para reutilização. Extratos enzimáticos são particularmente interessantes quando as enzimas são extracelulares, pois as intracelulares exigem a destruição do microrganismo, originando uma mistura complexa (MEDEIROS, 2002).

As substâncias com atividade biológica frequentemente apresentam centros estereogênicos, ou seja, têm em sua estrutura um ou mais átomos com orientação tridimensional muito bem definida. Qualquer alteração nessa orientação espacial pode conduzir à sua completa inativação ou ao surgimento de efeitos indesejados. Com a crescente demanda por compostos opticamente puros como precursores de drogas modernas e a dificuldade na resolução de racematos, as reações estereosseletivas passaram a ter especial importância para a indústria farmacêutica e de química fina (COELHO, 2001; PINHEIRO e FERREIRA, 1998).

Os biocatalisadores são amplamente utilizados na preparação de intermediários necessários na síntese de fármacos, como o ácido 6-aminopenicilânico (Figura 4). Essa substância é obtida por desacilação enzimática de penicilinas naturais (G e V) para o uso na síntese das penicilinas semissintéticas (como ampicilina e amoxicilina) pela adição de uma cadeia lateral. As penicilinas semissintéticas exibem diversas vantagens clínicas, pois são

tipicamente mais ativas contra bactérias Gram-negativas e podem ser administradas por via oral (CHAMBERS, 2003).

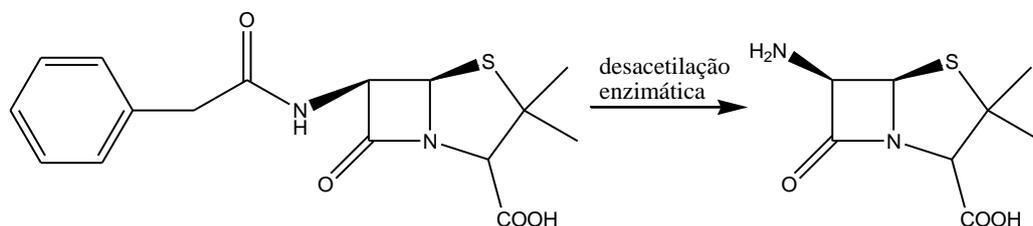


Figura 5. Síntese do ácido 6-amino penicilânico (CHAMBERS, 2003).

As vantagens da biocatálise estão relacionadas às propriedades da catálise enzimática. As enzimas são proteínas com capacidade catalisadora que aceleram as reações por estabilizarem o estado de transição, o que diminui a energia de ativação. Quase todos os catalisadores biológicos são enzimas (proteínas), com exceção de algumas moléculas de RNA (ribozimas) que também exibem atividade catalítica (STRYER, 1995).

Toda enzima possui um centro ativo, local onde se processam as reações com determinados substratos. Esse centro ativo é geralmente constituído de alguns resíduos de aminoácidos da cadeia de proteína e um grupo não-protéico, sendo responsável pela atividade biológica da enzima. Algumas enzimas dependem somente da sua própria estrutura protéica (apoenzima) para exercer sua atividade, enquanto outras necessitam também de um ou mais componentes não-proteicos chamados de cofatores, que podem ser íons metálicos ou moléculas orgânicas denominadas de coenzimas. Muitas enzimas dependem de ambos. Outras enzimas possuem um grupo prostético que é similar ao cofator, mas está firmemente ligado à apoenzima. O complexo cataliticamente ativo enzima-cofator é denominado de holoenzima (WHITAKER, 1972; DIXON, 1979; PALMER, 1985; LEHNINGER, 1986; GAVA, 1988; BOBBIO, 1989; VOET, 1995; STRYER, 1995; DEVLIN, 1997).

Enzimas são, portanto, na sua grande maioria proteínas que catalisam com grande eficiência as reações biológicas. Essas aceleram várias reações metabólicas importantes para a vida sob condições fisiológicas de pH, temperatura, meio iônico etc. As reações catalisadas por enzimas há muito tempo vêm sendo usadas com diferentes propósitos como a determinação de atividades enzimáticas, inibidores entre outros. Em virtude de sua alta seletividade (em alguns casos especificidade) e poder catalítico, as enzimas vêm sendo muito

empregadas em química analítica, bem como na medicina, agricultura, tecnologia de alimentos e estudos ambientais (DIXON, 1979).

As enzimas possuem especificidade quanto ao tipo de reação catalisada: uma enzima catalisa um único tipo de reação química ou um grupo de reações intimamente relacionadas. Também possuem elevada seletividade quanto ao substrato. Isso ocorre porque uma molécula, para sofrer a reação e ser considerada substrato, deve ter a configuração adequada para promover o encaixe induzido para a formação do complexo ativado (STRYER, 1995). Técnicas de biologia molecular podem ser utilizadas com o objetivo de modificar a seletividade, aumentar a atividade e a estabilidade de enzimas, através da modificação de aminoácidos localizados no sítio catalítico (SANTANIELLO et al., 1992).

As enzimas têm a capacidade de exercer uma influência quiral importante na reação, permitindo a realização de sínteses estereosseletivas. Por possuírem um sítio ativo quiral, apenas um enantiômero de um reagente quiral encaixa-se apropriadamente e é capaz de sofrer a reação. Misturas racêmicas podem ser resolvidas e reações podem originar produtos com elevado excesso enantiomérico (ZAKS e DODDS, 1997).

Kadnikova (2008) em estudo utilizando lípases obteve vários alcoóis (*R*)-1-alilarilícos através da hidrólise enantiosseletiva de acetatos de 1-alilarilas. O acetato de 1-alilfenila foi completamente resolvido (50 % de conversão e *ee*>99 %) com apenas 1 dia de reação em sistema água/acetonitrila resultando no álcool (*R*)-1-alilfenílico (KADNIKOVA e THAKOR et al., 2008).

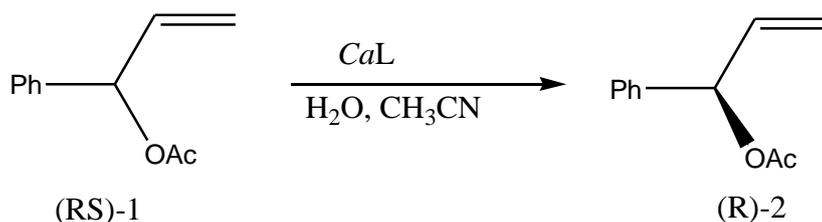


Figura 6. Resolução cinética de acetatos utilizando lipases de *Candida Antarctica*

A capacidade biocatalítica de alguns microrganismos e suas enzimas na produção de certos compostos químicos já é de muito conhecida. As rápidas produções de biomassa onde, em curtos espaços de tempo, uma biomassa considerável é alcançada, agregado às

técnicas de manipulação genética existentes tornam a utilização de microrganismos um método vantajoso em biocatálise. Por outro lado, reações que ocorrem em células de plantas podem ser bastante complexas e algumas dessas reações ocorrem apenas por enzimas únicas existentes nesses sistemas (GIRI et al., 2001).

O uso de vegetais em reações de biocatálise, mesmo com o número de investigações realizadas até o momento, ainda é um campo muito novo visto a enorme diversidade de espécies vegetais existentes e ao pequeno número de espécies investigadas. Só no Brasil, o número de espécies de plantas ultrapassa os 56 000, o que compreende quase 19 % da flora mundial, sendo que o conhecimento da biodiversidade no país ainda é muito incompleto (GIULIETTI et al., 2005).

Estudo realizado por Yadav (2002) utilizando células íntegras da espécie tuberosa *Daucus carota* na biorredução de cetonas alifáticas e aromáticas,  $\beta$ -cetoésteres e azidocetonas, figura 6, demonstrou grande simplicidade e excelentes rendimentos e excessos enantioméricos.

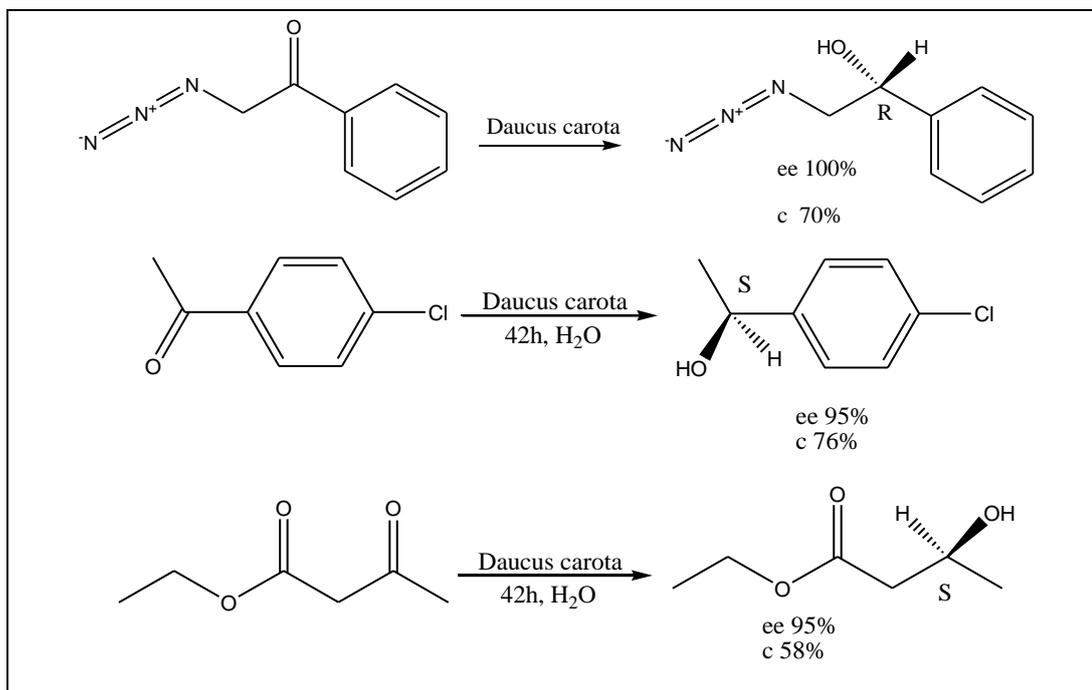


Figura 7. Processos biocatalíticos utilizando a espécie *Daucus Carotas* Yadav (2002)

Posteriormente, outras investigações usando a espécie *Daucus carota* em reações de biocatálise foram realizadas. Comasseto (2004) explorou a espécie na obtenção de alcoóis

organocalcogeno- $\alpha$ -metilbenzil quirais (COMASSETO et al., 2004), já Ferraz (2008) obteve  $\alpha$ -tetralóis substituídos, amplamente encontrados como intermediários em síntese, a partir da redução de  $\alpha$ -tetralonas (FERRAZ et al., 2008).

Assunção (2008) obteve excelentes rendimentos e moderada enantiosseletividade ao investigar o potencial de redutases do caldo de cana obtido da moagem da cana-de-açúcar, *Saccharum officinarum*, como fonte enzimática para a redução de uma série de cetonas, figura 8, e aldeídos, entre outros compostos (ASSUNÇÃO et al., 2008).

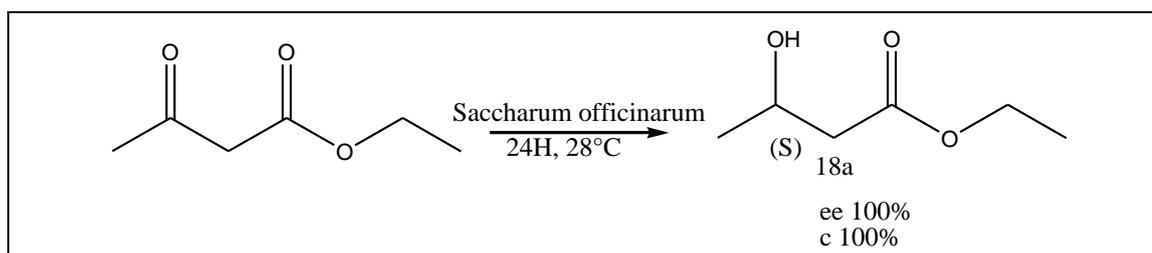


Figura 8. Processos biocatalíticos utilizando *Saccharum officinarum* como catalisador

Machado (2008) estudou reações de biorredução de aldeídos e cetonas utilizando as cascas do maracujá (*Passiflora edulis*) como catalisador biológico. Todos os substratos estudados foram reduzidos aos seus respectivos alcoóis, exceto no caso do 2-hidróxi-3-metóxi-benzaldeído, com valores de conversão entre 30-97 % e excessos enantioméricos moderados (MACHADO et al., 2008).

O potencial da água de côco verde do Ceará (*Cocos nucifera*) foi explorado por Fonseca (2008) com uma série de aldeídos e cetonas alifáticas e aromáticas em reações de redução. Os alcoóis obtidos apresentaram excelentes rendimentos (88-99%) e altos valores de excesso enantiomérico. Além dessas classes de compostos, foram utilizados também ésteres, amidas (figura 8) e nitrobenzeno em reações de hidrólises com resultados bastante satisfatórios (FONSECA et al., 2008).

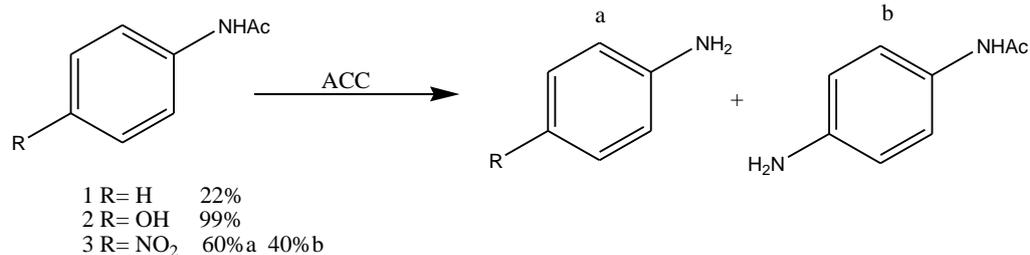


Figura 9. Reações de hidrólise catalisada pela Água de Coco do Ceará (ACC)

## 2.4 Biocatálise em Solventes Orgânicos

Tradicionalmente, a catálise enzimática limitava-se ao estudo de reações em meio aquoso, o que restringia em muito as possibilidades de aplicações industriais. A partir da observação de que muitas enzimas, tais como lipases, desidrogenases, esterases e outras, atuam *in vivo* em ambientes ricos em lipídeos, constatou-se que os ambientes aquo-restritos também poderiam ser meios adequados à catálise enzimática (BARON, 2003). Assim, foram iniciadas pesquisas dedicadas a explorar a catálise enzimática nos chamados meios reacionais não-convencionais, nos quais se incluem os solventes orgânicos, fluidos supercríticos, fluidos iônicos, fases gasosas e sólidas (ADLERCREUTZ, 1996; CERNIA e PALOCCI, 1997; LANGONE 1998; OLIVEIRA, 1999).

O primeiro trabalho que observou a presença de atividade enzimática em solventes orgânicos data da década de 60 (DASTOLI et al, 1966; ZAKS, 1996). No entanto, apenas a partir dos anos 80 se vislumbrou o potencial das aplicações biocatalíticas em meio orgânico, principalmente a partir de trabalhos desenvolvidos por KLIBANOV (1986 e 1989).

Entre os meios não-convencionais, que incluem solventes orgânicos, sistemas gasosos e líquidos iônicos, os solventes orgânicos são os que mais vêm sendo estudados, principalmente devido ao interesse na síntese de compostos enantioméricos puros e resolução de misturas racêmicas, de grande importância para a indústria farmacêutica (BEVILAQUA, 2005).

Existem diversas composições de sistemas reacionais com meios orgânicos nos quais se pode empregar a biocatálise. A seguir encontra-se classificação desses sistemas em termos de homogeneidade (ILLANES, 1994; ADLERCREUTZ, 1996):

- Sistema homogêneo: solventes miscíveis em água (ex. glicerol, etanol, metanol)
- Sistemas macro-heterogêneos: líquido-líquido (solvente imiscível e enzima diluída na fase aquosa); sólido-líquido (biocatalisador sólido em solvente miscível); sólido-líquido-líquido (biocatalisador sólido em solvente imiscível)
- Sistema micro-heterogêneo: misturas reversas

Baron (2003) comparou os rendimentos obtidos pela utilização de lipase de *Penicillium corylophilum* para a síntese de oleato de n-butila em diferentes sistemas aquo-restritos ( $a_w = 0,11$ ): micelas reversas, macro-heterogêneo com lipase liofilizada e macro-heterogêneo com enzima imobilizada em gel de octil sepharose. Os rendimentos obtidos na síntese foram de 80% no sistema empregando micelas reversas, 57% no meio contendo a enzima livre, 20% no meio com enzima liofilizada na presença de  $\beta$ -ciclodextrina, e de apenas 9% no sistema com enzima imobilizada.

A biocatálise em meio orgânico amplia as possibilidades de aplicação das enzimas. As principais vantagens em se utilizá-la estão listadas a seguir (GUPTA, 1992; ILLANES, 1994):

- Conversão de substratos insolúveis em meio aquoso;
- Variação na especificidade e seletividade enzimática;
- Alteração no equilíbrio da reação como efeito da partição de substratos e produtos;
- Facilidade de recuperação de produtos e do biocatalisador;
- Aumento da termoestabilidade do biocatalisador;
- Menor risco de contaminação microbiana;
- Maior facilidade de integração com etapas de síntese química convencional.

O aumento da termoestabilidade das enzimas em meio orgânico resulta da diminuição da dinâmica molecular protéica. Os exemplos listados na Tabela 3 ilustram a enorme diferença entre os tempos de meia-vida de enzimas em meio aquoso e orgânico. Como pode ser verificado nesta tabela, o tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) de uma preparação de lipase de pâncreas de porco em meio orgânico ( $t_{1/2} = 26$  horas) aumentou em cerca de 800 vezes quando comparado com o meio aquoso ( $t_{1/2} = 2$  minutos) (ZAKS, 1996). Neste caso, deve-se ressaltar que, além da maior estabilidade térmica proporcionada pelo meio orgânico, há concomitantemente o efeito de estabilização por substrato (tributirina).

Tabela 3. Estabilidade de enzimas em meio aquoso versus não-aquoso (ZAKS, 1996)

Enzima	Condição	Tempo de meia vida*
Lipase de pâncreas de porco	Tributirina Aquoso; pH 7,0	$t_{1/2} < 26h$ $t_{1/2} < 2min$
Lipase de <i>Candida SP</i>	Tributirina/heptanol Aquoso; pH 7,0	$t_{1/2} 1,5 h$ $t_{1/2} < 2min$
Quimiotripsina	Octano; 100°C Aquoso; pH 8,0; 55°C	$t_{1/2} 80min$ $t_{1/2} 15 min$
Tirosinase	Clorofórmio; 50°C Solução aquosa; 50°C	$t_{1/2} 90 min$ $t_{1/2} 10 min$

\*Tempo de meia-vida é o tempo decorrido até que haja o decaimento da atividade enzimática até metade da atividade original.

Apesar da biocatálise em meio orgânico oferecer numerosas características favoráveis, o uso destes sistemas apresenta algumas desvantagens que devem ser levadas em consideração antes de se decidir por sua utilização, entre estas destacam-se(ILLANES, 1994):

- Possibilidade de desnaturação e/ou inibição do biocatalisador pelo solvente;
- Aumento da complexidade do sistema reacional;
- Custos adicionais com solventes, co-solventes e surfactantes.

Sistemas com as mais diversas composições podem ser empregadas como biocatalisadores de reações em meio orgânico. A utilização de preparações sólidas (enzimas liofilizadas ou imobilizadas) é mais freqüente, no entanto também é possível fazer modificações químicas na proteína que possibilitem o emprego da enzima na forma solúvel em solventes orgânicos. As principais formas de emprego das enzimas em meio orgânico são (ADLERCREUTZ, 1996):

- Preparações sólidas: liofilização e imobilização
- Preparações solúveis: modificação covalente (ex. polietilenoglicol – PEG, poliestireno e poliácridatos), complexos não-covalentes (ex. surfactantes, ácidos graxos, polímeros), e micro-emulsões.

Os sistemas em meio orgânico nos quais são utilizadas preparações de enzimas solubilizadas encontram maiores limitações quanto às suas aplicações que aqueles com preparações enzimáticas sólidas. Há restrições maiores inclusive quanto aos solventes que poderão ser empregados. Hidrocarbonetos aromáticos ou clorados são os solventes mais comuns quando se empregam enzimas modificadas covalentemente com polietilenoglicol (PEG). Estes sistemas, no entanto, podem ser úteis na catálise de substratos sólidos como por exemplo no método de síntese enzimática de peptídeos catalisada por proteases modificadas com PEG, no qual a cadeia peptídica cresce ligada a uma resina sólida (ADLERCREUTZ, 1996). Embora recuperar essas enzimas solubilizadas no meio orgânico através de

modificações covalentes seja mais difícil que a recuperação das preparações sólidas, é possível fazê-lo através de técnicas de precipitação por solventes apolares ou por retenção com membranas (ADLERCREUTZ, 1996).

## 2.5 Imobilização Enzimática

A tecnologia de imobilização de enzimas teve início nos anos 50, quando foram pela primeira vez produzidas preparações enzimáticas imobilizadas por inclusão em matrizes poliméricas e por ligação em suportes (TISCHER e KASCHE, 1999). Desde então numerosos métodos de imobilização em diferentes materiais foram desenvolvidos.

Os métodos de imobilização são frequentemente classificados segundo o tipo de ligação empregada e o suporte (LIMA et al., 2001):

- Separação por membrana
- Encapsulamento
- Membranas fibrosas semi-permeáveis
- Microencapsulamento
- Entrelaçamento com polímeros
- Formação de ligações covalentes
- Adsorção

O uso de enzimas imobilizadas oferece importantes vantagens em processos industriais e tem sido utilizado extensivamente por facilitar o desenvolvimento de processos em escala comercial (TISCHER e KASCHE, 1999). São várias as vantagens da utilização de enzimas imobilizadas em relação ao uso de enzimas livres. As principais vantagens apontadas por diversos autores são (FREIRE, 1988, ILLANES, 1994; BENJAMIN e PANDEY, 1998; VILLENEUVE et al., 2000; GUISÁN et al., 2001):

**Facilidade de recuperação do biocatalisador.** O uso de enzimas imobilizadas facilita a aplicação da biocatálise pois, as operações empregadas na separação do biocatalisador são simples (filtração ou centrifugação). Não é necessário realizar procedimentos de inativação enzimática como a desnaturação térmica ou por pH, que podem levar a alterações indesejáveis do produto final. Além disso, os efluentes são gerados livres do biocatalisador.

**Processo pode ser operado continuamente.** A facilidade em se reter o biocatalisador permite que processos contínuos sejam implementados utilizando reatores variados, como os reatores tubulares (PFR) ou tanques de agitação (CSTR), e o controle do processo é facilitado.

**Previne a formação de agregados em meio orgânico.** Enzimas livres, quando suspensas em um solvente orgânico, tendem a se agregar e a prender nas paredes do reator, principalmente se for adicionada água a esse sistema. A imobilização de enzimas em suportes sólidos pode contornar esse problema.

**Facilidade de separação dos produtos.** O emprego de enzimas imobilizadas é especialmente indicado para processos cujos produtos finais requeiram elevado grau de pureza, pois o biocatalisador é facilmente removido do meio.

**Minimização de efeitos desnaturantes e maior proteção contra desativação por produtos químicos.** A diminuição da dinâmica molecular minimiza a ocorrência de desnaturação por efeitos térmicos ou por pH. Certas técnicas de imobilização, como a adsorção seguida por recobrimento da enzima com polímeros hidrofílicos, diminuem a interação entre a enzima e o meio reacional prevenindo a desnaturação por efeito de produtos químicos.

**Manutenção de micro-ambiente com alta atividade de água.** A imobilização permite a manutenção de uma camada de solvatação no micro-ambiente em torno da enzima capaz de manter uma dinâmica molecular mínima, essencial à atividade enzimática em ambientes orgânicos.

**Propriedades enzimáticas (como atividade e termoestabilidade) podem ser alteradas favoravelmente.** A interação entre a enzima e o suporte além de reduzir a dinâmica molecular da enzima pode ocasionar mudanças conformacionais. A escolha de suportes e técnicas de imobilização adequadas podem ser empregados para provocar alterações desejadas nas propriedades das enzimas.

**Custos com manejo de materiais são minimizados.** A melhor estabilidade da enzima imobilizada facilita a sua estocagem e diminui as exigências para sua manipulação.

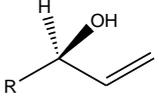
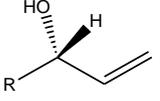
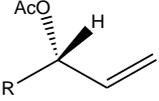
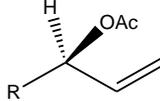
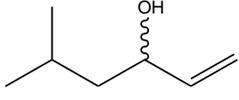
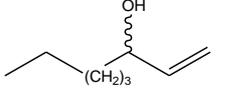
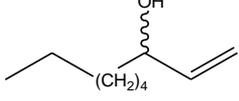
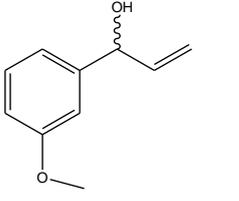
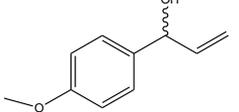
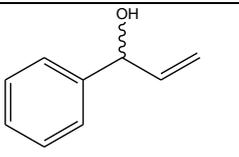
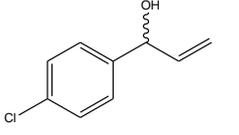
Apesar das vantagens do emprego das enzimas imobilizadas em relação ao uso de enzimas livres, as técnicas de imobilização apresentam alguns problemas. O principal obstáculo ao uso mais amplo da imobilização de enzimas reside no aumento do custo do biocatalisador. Vários dos suportes normalmente empregados em imobilizações são de custo elevado e diversas técnicas são muito trabalhosas. Além disso, freqüentemente, ocorre redução da atividade enzimática, o que constitui um custo a mais, pois uma maior quantidade do biocatalisador precisará ser empregada no processo. A decisão entre o uso de enzimas livres ou imobilizadas deve avaliar as características do processo e as exigências técnicas para a sua execução bem como e o balanço econômico considerando as vantagens e desvantagens proporcionadas pelo uso de cada biocatalisador (BEVILAQUA, 2005).

## **2.6 Obtenção de alcoóis secundários enantiomericamente puros**

Dentre os diversos intermediários químicos quirais empregados na síntese de produtos farmacêuticos, alimentícios e agroquímicos, os alcoóis secundários quirais destacam-se, pois, além da grande versatilidade sintética dessa função orgânica, em inúmeros casos ela está presente na estrutura química do produto desejado. Estes compostos podem sofrer diversas transformações químicas levando a outros grupos funcionais, como por exemplo, aminas e haletos. E ainda os alcoóis secundários são atrativos materiais de partida, porque algumas vezes eles são mais facilmente obtidos do que as correspondentes cetonas (STRAUSS, 1999; GRUBER, 2006).

A acetilação de alcoóis secundários quirais com acetato de vinila na presença de enzima comercial CALB foi realizado por Oliveira obtendo conversões acima de 97% e *ee* maiores que 94% como pode ser observado na tabela 4 (OLIVEIRA, 2007) .

Tabela 4. Resultados da resolução enzimática dos álcoois alílicos via acetilação com acetato de vinila na presença de CALB

Álcool	Tempo (h)				
	11	> 99%	<1%	(94% e.e.) %97	3%
	11	> 99%	<1%	97% (94% e.e.)	3%
	11	> 99%	<1%	97,2% (94,4% e.e.)	2,8%
	8	> 99%	<1%	> 99%	<1%
	8	> 99%	<1%	> 99%	<1%
	8	> 99%	<1%	> 99%	<1%
	8	> 99%	<1%	> 99%	<1%

Kazlauskas (2000) testou a enantiosseletividade de várias esterases e lipases realizando testes em mais de 130 ésteres de álcoois secundários baseando-se nos substituintes ligados ao carbono da hidroxila e estereocentro do álcool.

O teste mostrou que, para uma média acima de 93% do grupo de alcoóis, a enzima reage mais rapidamente com o enantiômero que apresenta o estereocentro envolvendo a hidroxila voltada para frente na molécula. Isto está em conformidade com Prelog que já havia realizado testes envolvendo *Culvaria lunata* na redução de cetonas e hidrólise de ésteres racêmicos catalisadas por enzimas de *Rhizopus nigrigans*. No teste realizado Prelog determinou que tanto na hidrólise quanto na acetilação de álcoois secundários a enzima reage mais rapidamente com o enantiômero que apresenta o grupamento contendo o oxigênio voltado para frente da molécula, quando a estrutura é desenhada como na Figura

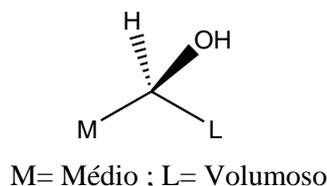


Figura 10. Enantiômero que reagiu mais rapidamente com a enzima *Culvaria lunata* e *Rhizopus nigrigans*, conforme testes realizados por Prelog (PRELOG, 1964).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos Gerais

- Investigar o potencial biocatalítico das casca da laranja da terra visando agregar valor a rejeito industrial;
- Desenvolver processos que possibilitem a obtenção de compostos enantiopuros através de reações quimioenzimáticas;
- Aplicar metodologias que possibilitem a produção de compostos quirais em paralelo com a preservação ambiental;
- Ampliar o arsenal de bioprocessos aplicados a síntese orgânica.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Determinar o teor de proteínas presentes em amostras de casca da laranja da terra;
- Verificar o potencial das enzimas presentes nas cascas (albedo e flavedo) da laranja da terra na catalise de reações de Oxido/redução, hidrólise e esterificação;
- Aperfeiçoar as condições de reação, com um substrato modelo, de maneira a obter as melhores conversões e os melhores excessos enantiomérico (*ee*);
- Analisar a estereosseletividade do complexo enzimático presente na CLT nos diversos processos biocatalíticos;
- Realizar reações biocatalíticas, esterificação, em meio orgânico utilizando as células íntegras da CLT;
- Analisar os produtos das reações através de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectroscopia de Massa (CG-EM), espectroscopia de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ), e Cromatografia Líquida de Alta eficiência com coluna quiral (CLAE-quiral).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Determinação do teor de proteínas

A grande maioria das biomoléculas dotadas de propriedades catalíticas são proteínas, denominadas de enzimas. A exceção são moléculas de RNA chamadas de Ribozimas que também são capazes de catalisar algumas reações químicas (STRYER,1995). Portanto, os métodos de quantificação de proteínas são bons parâmetros para averiguar a probabilidade de se encontrar enzimas. Para a quantificação do teor de proteínas presentes na casca da laranja da terra (CLT) foi utilizado o método de Bradford (BRADFORD, 1976), que é uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de “Coomassie brilliant blue” BG-250. Este método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (COMPTON, 1985).

Neste trabalho, foi analisado o teor de proteínas do extrato aquoso da casca da laranja da terra (CLT), obtido como descrito no item 5.5i nas condições otimizadas, e do extrato bruto enzimático da laranja (EBEL) em diferentes valores pH: 5,2; 6,2; 7,2 e 8,0; obtido como descrito no procedimento experimental no item 5.5ii. Os resultados apresentam-se na tabela 5.

Tabela 5. Análise do teor de proteínas presentes na CLT e no EBEL

Material vegetal	Teor de proteínas (mg.L <sup>-1</sup> )
CLT	272,50
EBEL (pH 5,2)	81,90
EBEL (pH 6,2)	62,60
EBEL (pH 7,2)	185,90
EBEL (pH 8,0)	138,60

EBEL (água destilada)	201,20
-----------------------	--------

Os resultados apresentados na tabela 5 demonstram uma maior concentração de proteínas na CLT, e uma variação considerável na concentração de proteínas em função do pH no caso do EBEL. Este resultado pode ser explicado pelo fato de as proteínas (incluindo-se as enzimas) possuírem sua estrutura covalente (primária) formada por aminoácidos com grupos ionizáveis em suas cadeias laterais, alterando sua solubilidade de acordo com a mudança da acidez do meio e com a seqüência de aminoácidos particular de cada proteína. Proteínas que possuem resíduos de aminoácidos que aumentam o número de grupos ionizados em um dado pH, tende a ser mais solúveis em meio aquoso. Já aquelas em que há um menor grau de ionização das cadeias laterais dos aminoácidos, em geral, apresentam menores solubilidades em solventes polares, em um determinado pH, pois, as interações intramoleculares são maximizadas, o que diminui a interação com solventes de significativa polaridade, no caso, a água.

#### 4.2 Processos Biocatalíticos

A otimização do processo biocatalítico foi realizada analisando-se a influência da quantidade de biocatalisador, do tempo e do pH do meio na conversão e no excesso enantiomérico (*e.e.*) do álcool obtido através da biorredução da acetofenona (substrato modelo). O excesso enantiomérico foi calculado de acordo com procedimento descrito no item 5.8 e a conversão calculada a partir da curva de calibração da acetofenona e do (*RS*)-1-feniletanol, respectivamente. As curvas de calibração podem ser visualizadas nos apêndice A e B. O padrão do (*RS*)-1-feniletanol foi obtido por via química, através da redução com borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) resultando em uma mistura racêmica. O cromatograma obtido através de cromatografia líquida de alta eficiência com coluna quiral (figura 11) apresenta o (*S*)-1-feniletanol com tempo de retenção de 10,02min e o (*R*)-1-feniletanol 14,66min.

Como trata-se da redução de um composto pró-quiral (acetofenona) por um agente redutor aquiral ( $\text{NaBH}_4$ ) o resultado foi uma mistura racêmica, que pode ser constatada pela equivalência das áreas registradas no cromatograma da Figura 11. Isso é devido à igualdade de condições de ataque do hidreto em ambas a face da acetofenona (Figura 12).

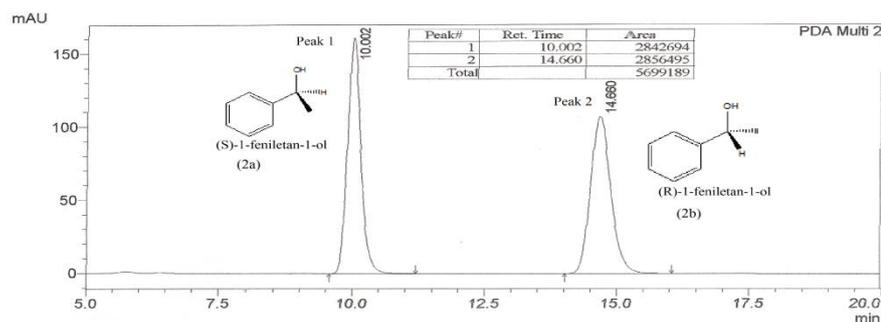


Figura 11. Análise do (*RS*)-1-feniletanol (500ppm) através de CLAE-quiral.

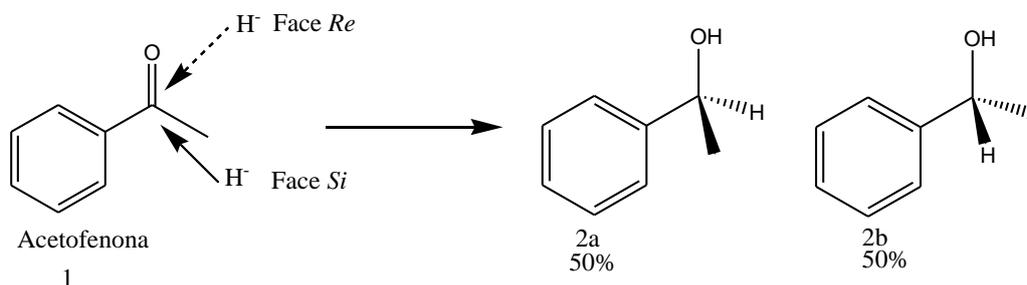


Figura 12. Possibilidade de ataque do hidreto em ambas as faces da acetofenona

A acetofenona quando analisada por CLAE (coluna OB-H) apresentou um tempo de retenção de 13,295min (Figura 13) próximo do (*R*)-1-feniletanol.

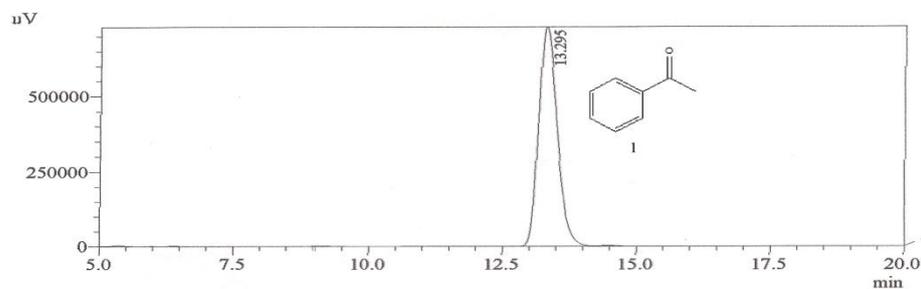


Figura 13. Análise da acetofenona por CLAE

O (*RS*)-1-feniletanol foi caracterizado via espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (IV-FT), figura 14, onde as bandas de absorção características do estiramento da ligação O-H ( $3200-3500\text{cm}^{-1}$ ), centrada em  $3370\text{cm}^{-1}$ , é típica da função

álcool.

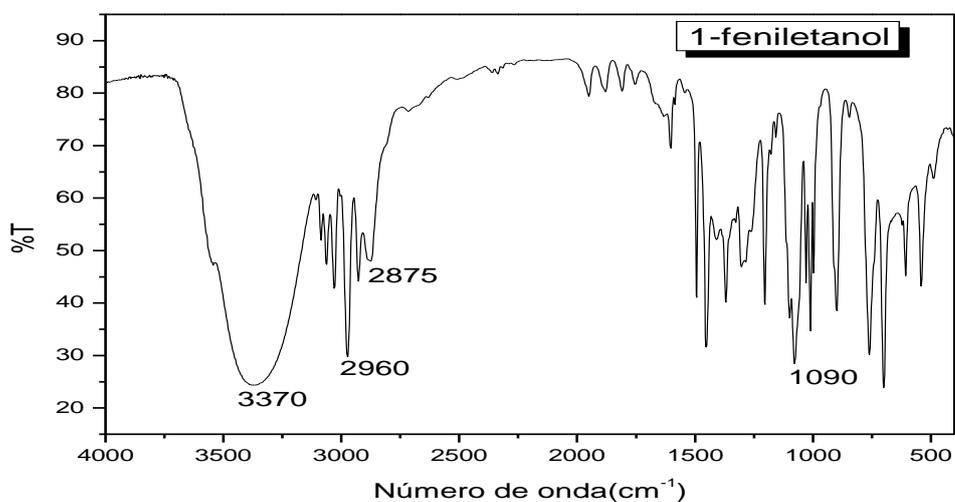


Figura 14. Espectro de Infravermelho do (RS)-1-feniletanol.

#### 4.2.1 Quantidade de Biocatalisador

Para avaliar como a quantidade de Biocatalisador altera o rendimento e o *ee* da reação, foram avaliadas diferentes quantidades de CLT nas reações de biorredução, onde as demais variáveis (pressão, temperatura, agitação, quantidade de água, quantidade de substrato e tempo de reação) permaneceram constantes. As reações foram conduzidas conforme descrito no procedimento 5.6.1 e ilustrado na Figura 15. As quantidades de CLT analisadas foram 2, 5, 10, 15 e 20g. As análises da conversão e do *ee*, foram feitas através de CLAE com coluna quiral OB-H utilizando-se fluxo de 0,500mL/min do eluente hexano/isopropanol 95:5 v/v%. A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos.

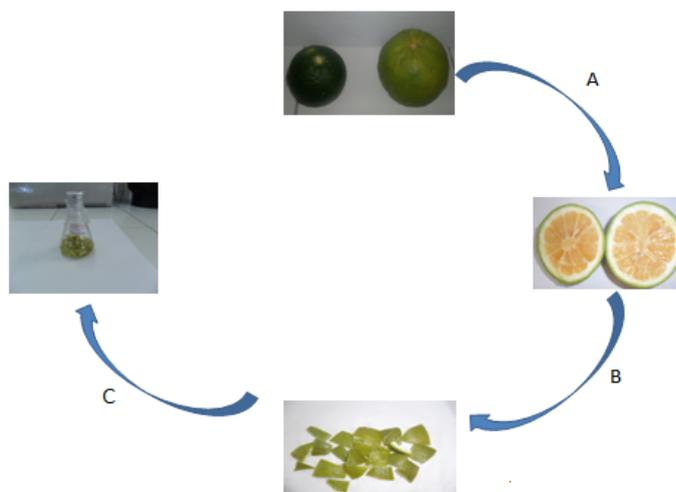


Figura 15. Processo biocatalítico geral de Bio-redução. (A-corte longitudinal, B-retirada manual das cascas seguido de cortes cúbicos, C-adição de água e substratos).

Tabela 6. Taxa de conversão e *ee* com a variação da quantidade de catalisador.

Quantidade de catalisador (g)	Conversão (%)	Excesso enantiomérico (%) /Configuração
2	1,14	35,00 (R)
5	1,81	34,00 (R)
10	3,68	69,51 (R)
15	40,14	35,06 (R)
20	46,89	94,00 (R)

Os resultados podem ser visualizados nos gráficos da figura 16 onde se observa claramente o aumento na conversão da acetofenona com o aumento da quantidade de biocatalisador (CLT). Já para o *ee* se observa um melhor resultado quando se utiliza 20g de CLT.

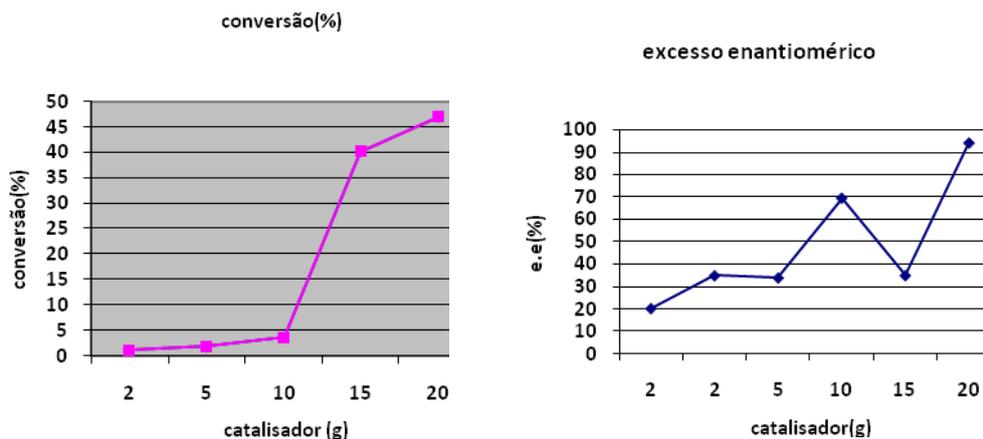


Figura 16. Gráfico com as variações da conversão e do *ee* em diferentes quantidades de CLT.

A reação de biorredução da acetofenona originando um dos enantiômeros, preferencialmente, está representada na figura 17.

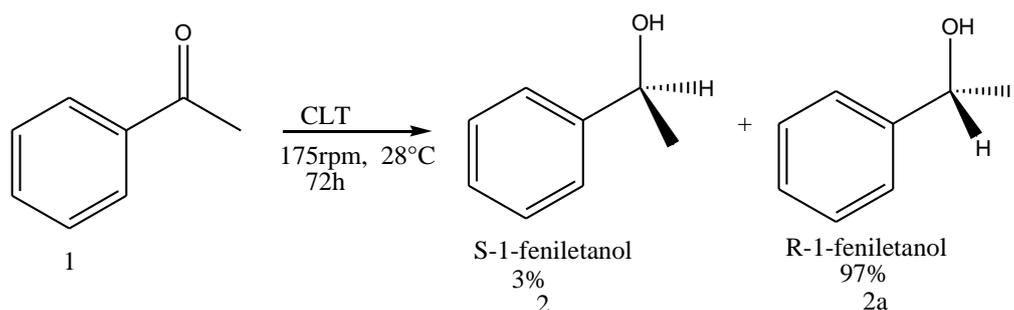


Figura 17. Reação de biorredução da acetofenona com 20g de CLT

Os resultados obtidos demonstram que os sistemas reacionais biocatalíticos estão de acordo com a lei de Michaelis-Menten, onde a velocidade da reação enzimática é diretamente proporcional a quantidade de enzima para uma mesma quantidade de substrato (COELHO, 2008). Os resultados demonstram ainda que a utilização de 20g de catalisador é a que promove um melhor *ee*, 94%, e uma melhor conversão, 46,89%, evidenciando que dentre as quantidades (2, 5, 10, 15 e 20g) de catalisador analisadas, esta foi o que apresentou os resultados mais promissores e por isso, foi a massa de Biocatalisador selecionada para os demais experimentos. O cromatograma da reação de biorredução da acetofenona com 20g de CLT pode ser visualizado na figura 18.

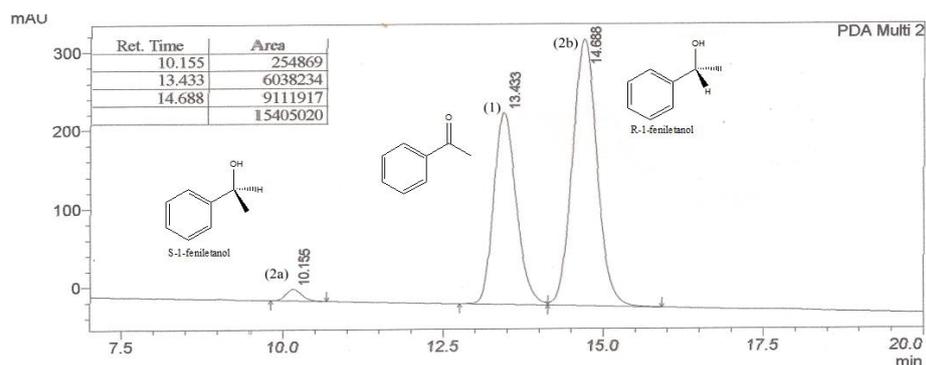


Figura 18. Cromatograma da reação de biorredução da acetofenona com 20g de CLT

#### 4.2.2 Tempo de Reação

A cinética de uma reação é sem dúvida uma das variáveis de maior importância para otimização de qualquer processo químico e, especialmente, bioquímico, pois, além de expressar a quantidade de produto formado por unidade de tempo, nos dar uma idéia do grau de afinidade entre enzima e substrato. Visando obter o tempo mais viável para as reações de biorredução da acetofenona com CLT, foram investigadas as taxas de conversão e o *ee* em períodos de 24, 48 e 72 horas. As reações foram conduzidas conforme procedimento descrito no item 5.6.1, alterando-se apenas o tempo de reação. A cada período de tempo analisado, alíquotas de 5mL foram retiradas dos meios reacionais, particionadas com diclorometano (3x5mL) e tratadas posteriormente como descrito no item 4.3.3. Em seguida foram analisadas por CLAE equipado com coluna quiral OB-H, assim como no experimento descrito no item 5.4.2. A conversão e o *ee* referente a cada período de tempo de reação podem ser observados na Tabela 7 e no gráfico da Figura 19.

Tabela 7. Valores de conversão e *ee* da biorredução da acetofenona com o tempo.

Tempo de reação (h)	Conversão (%)	Excesso enantiomérico (%)
24	1,44	21,15 (R)
48	28,12	68,73 (R)
72	46,89	94,00 (R)

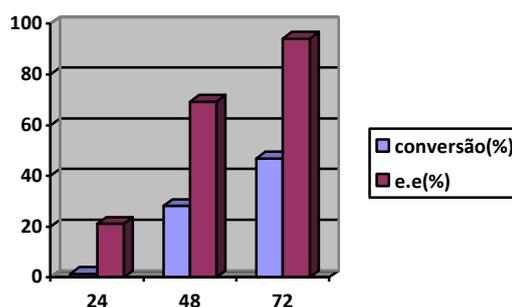


Figura 19. Gráfico da variação da conversão e do *ee* da biorredução da acetofenona.

Os dados demonstram que em todos os períodos de tempo avaliados houve redução da acetofenona, com *ee* do álcool de configuração *R*. O período de 24h de reação foi o único que não apresentou taxas de conversão (1,44%) e *ee* (21,15) consideráveis. Os demais tempos de reação apresentaram resultados significantes observando-se uma taxa de conversão de 46,89% e um *ee* de 94%. Os resultados obtidos demonstraram a necessidade da otimização da reação quanto as demais variáveis com o objetivo de implementar uma fonte de biocatalisador economicamente viável e ambientalmente sustentável. Como no período de 72h foi obtido um maior percentual de conversão, atrelado a uma boa enantiosseletividade da enzima, produzindo um *ee* razoável do (*R*)-1-feniletanol (2b), este tempo de reação foi selecionado nos demais experimentos. O cromatograma após 72h de reação está apresentado na Figura 20.

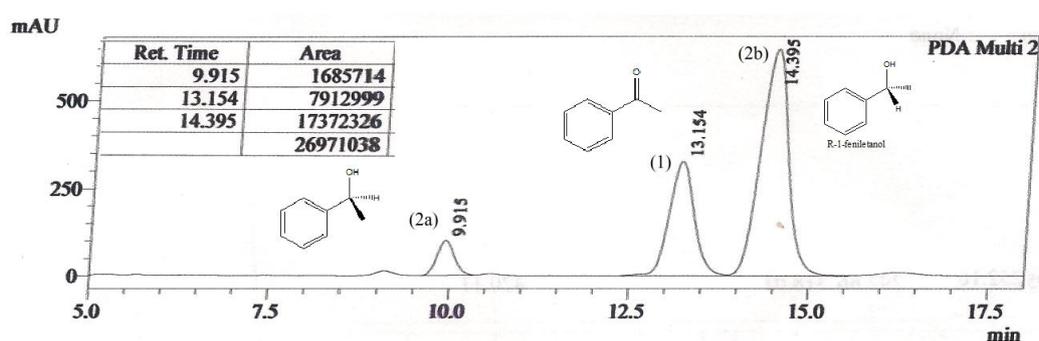


Figura 20. Cromatograma da reação de biorredução da acetofenona (1) com CLT após 72h.

### 4.2.3 Quanto ao pH do Meio

Para estudar a influência do pH na atividade das enzimas redutases foram preparadas soluções tampões, o sistema ácido etanóico/etanoato de sódio ( $C_2H_4O_2$ )/( $C_2H_3O_2Na$ ) foi utilizado para o pH ácido (5,4) e para o pH 8,5 (básico) utilizou-se o sistema dihidrogenofosfato de potássio/hidrogenofosfato de sódio  $KH_2PO_4/NaHPO_4$ . As reações foram conduzidas conforme procedimento geral descrito no item 5.6.1 modificando-se o pH do meio (variável em estudo). Após 72h de reação os sistemas reacionais foram tratados conforme procedimentos descritos nos itens 5.4.2. Os métodos de análise, identificação e quantificação das substâncias foram os mesmos do experimento descrito no item 5.4 e os resultados podem ser analisados na Tabela 8.

Tabela 8. Resultados da biorredução da acetofenona com CLT com a variação do pH.

pH	Conversão (%)	<i>ee</i> (%)
5,4	49,19	64,44 (R)
8,4	94,70	64,00 (R)
Água destilada	46,89	94,00 (R)

Os resultados foram condizentes com o fato das atividades das enzimas variarem com o pH, algumas catalisam reações em condições aproximadamente neutras, outras, a exemplo da pepsina, apresentam melhores atividades de catálises em meio ácido. Já a tripsina possui seu ápice de desempenho catalítico em sistemas que possuem pH alcalino. Estes fatos podem ser entendidos se considerarmos que as enzimas são macromoléculas constituídas de aminoácidos, que em grande parte, possuem em suas cadeias laterais grupos ionizáveis (ácidos e/ou básicos) que uma vez sendo ionizados modificarão as interações eletrostáticas entre os grupos da molécula e o solvente, que por sua vez provocará alterações em sua conformação tridimensional dando maior ou menor flexibilidade ao seu sítio ativo, que é, de fato, o centro de operação da catálise enzimática, alterando com isso o rendimento químico e o *ee*. Os resultados apresentados sugerem que as reações conduzidas em água destilada demonstraram um maior excesso enantiomérico, 94,00%, apesar de no quesito conversão, o

pH 8,4 apresentou um melhor resultado (94,70%). O cromatograma da reação conduzida em pH 8,4 está mostrado na Figura 21.

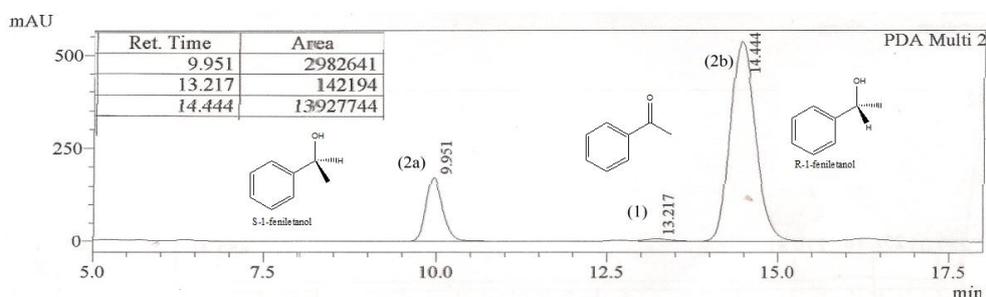
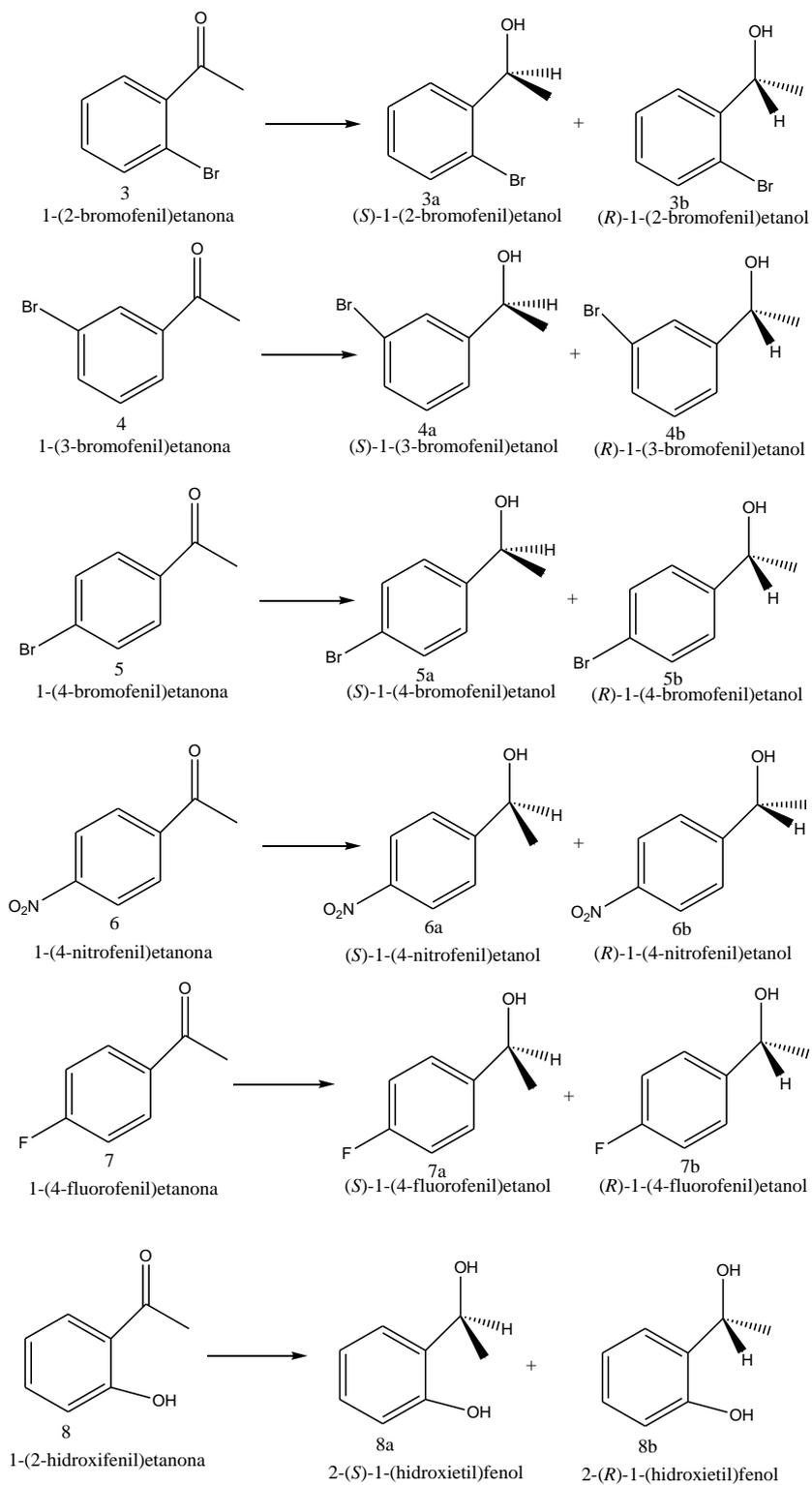


Figura 21. Cromatograma da análise da reação de biorredução conduzida em pH 8,40.

Como a reação conduzida em água destilada é menos laboriosa, mais econômica e apresenta um melhor *ee*, os próximos experimentos foram realizados utilizando-se água destilada como solvente.

#### 4.2.4 Biorredução de outros Substratos

Com as condições ideais de reação (pH, quantidade de catalisador e tempo de reação) otimizadas, avaliou-se a atividade catalítica e enantiosseletiva das redutases presentes na CLT frente a diferentes cetonas pró-quirais aromáticas (3-14 – Figura 12) esperando obter preferencialmente um dos possíveis enantiômeros.



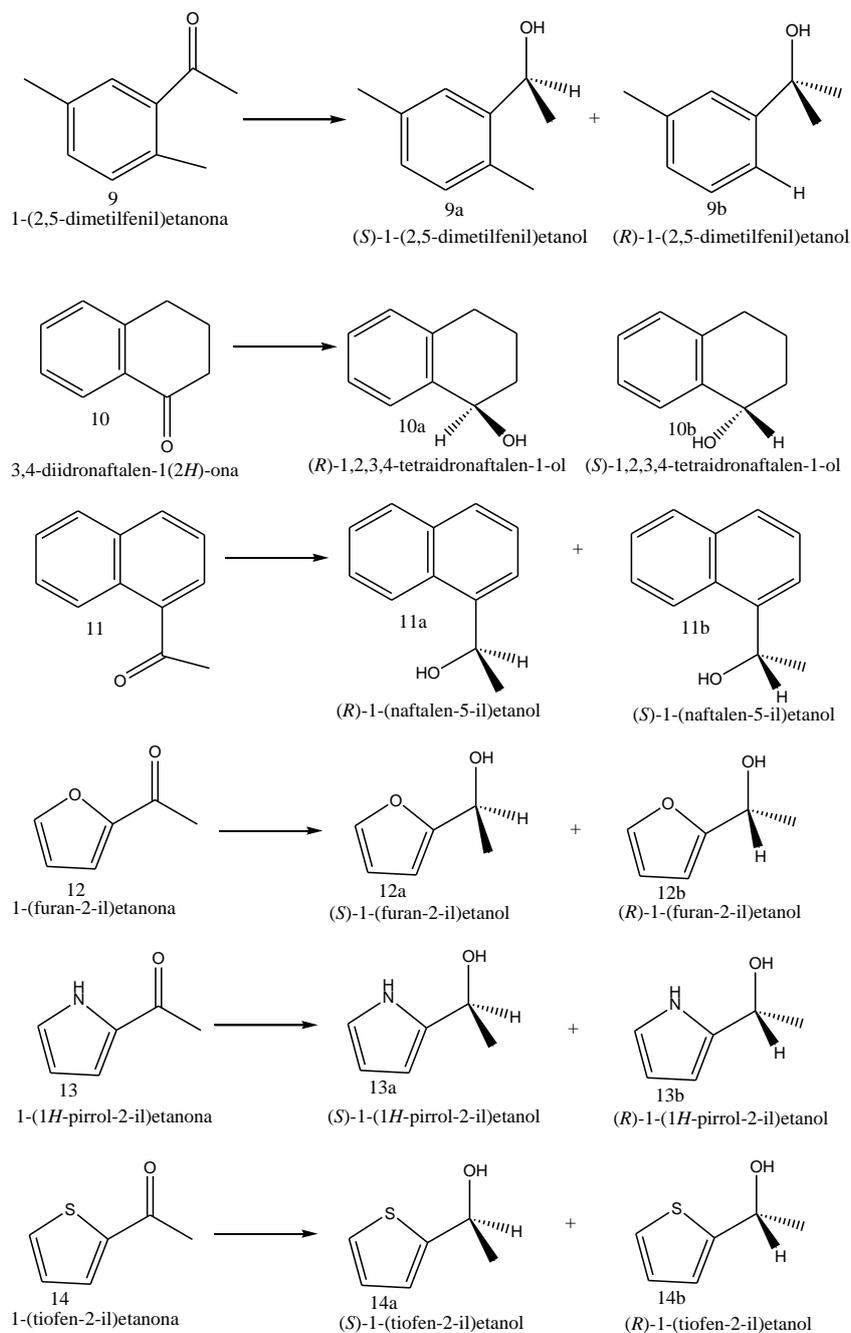


Figura 22. Substratos analisados frente a reação de biorredução com CLT e produtos esperados.

Todos os substratos relacionados na Figura 22, foram submetidos às condições reacionais otimizadas: 0,42mmol do substrato, 72h , 50mL de água destilada e 20g de CLT. Após o tempo de reação os meios reacionais foram tratados conforme procedimentos descritos nos itens 5.4.1a e 5.4.2, sendo que apenas para os meios contendo os substratos 12,

13 e 14 foram utilizados como eluente na coluna gravitacional uma mistura binária de hexano/acetato de etila (70:30) v/v.

Todas as amostras foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa. Dentre os compostos testados (3-14), apenas 7 e 12 foram reativos frente ao complexo enzimático de CLT. A identificação dos produtos foi realizada através de comparação entre seus espectros de massa com aqueles registrados em espectroteca do equipamento. Os espectros de massas encontram-se nos apêndices (K-Z). A quantificação foi obtida pelo método da normalização, tomando-se as áreas dos picos do composto de partida e de seus respectivos produtos

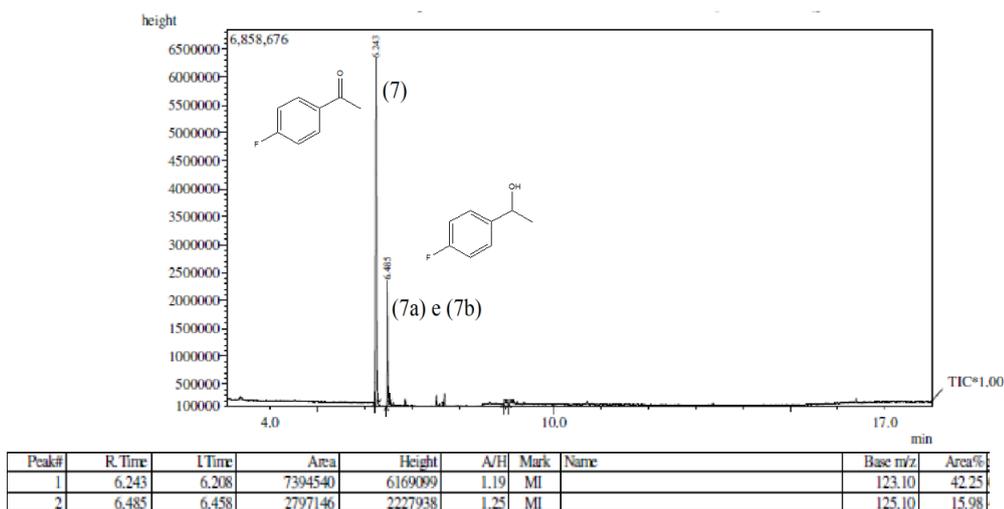


Figura 23. Cromatograma (CG-MS) do resultado da reação do composto 7 com CLT

Para o composto 7 (1-(4-fluorofenil)etanona constatou-se uma redução de 27,44% do composto (7) ao álcool 7a (Figura 23). A análise do excesso enantiomérico conforme cromatograma da figura 24 permitiu constatar uma enantiosseletividade >99%, tendo sido detectada a presença de apenas um dos enantiômeros.

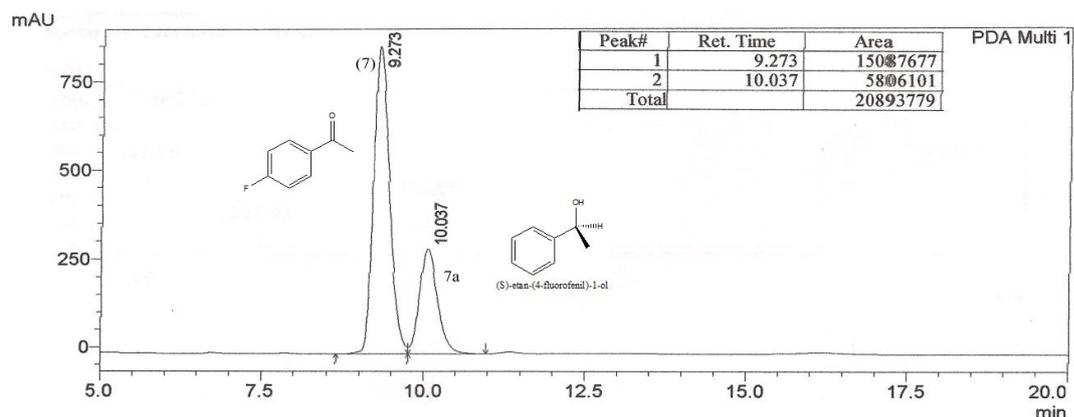


Figura 24. Cromatograma (HPLC) do resultado da reação de biorredução do composto 7.

Já no caso do composto 12, cujo cromatograma (CG-MS) está apresentado na Figura 25, observou-se uma conversão de 41,20%, com um *ee* de 44,42%, valores estes menores, quando comparado com o composto 7. O espectro de massa de 12, 12a e 12b estão nos apêndices (K-Z).

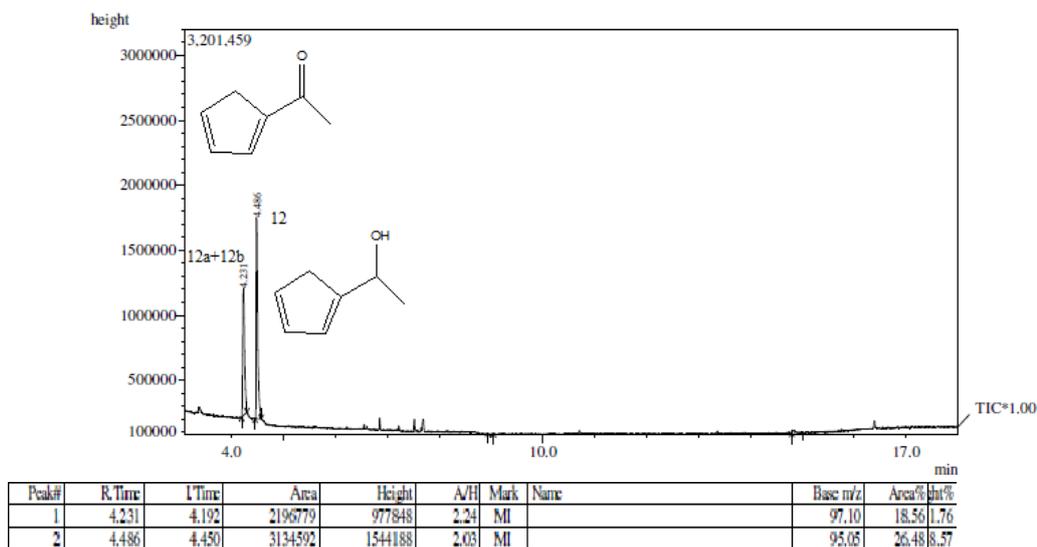


Figura 25. Cromatograma (CG-MS) do resultado da reação de biorredução de 12.

O esquema reacional da figura 26 ilustra de forma resumida a reação de Biorredução do composto 12 e as respectivas percentagens de produtos formados. A comparação com dados da literatura (MACHADO, 2008) nos permite afirmar que o álcool formado em excesso foi o de configuração absoluta *S*, ou seja, o composto 12a.

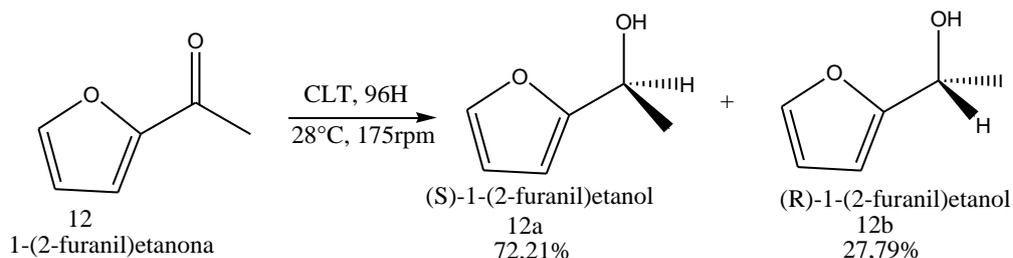


Figura 26. Reação de biorredução da substância 12 com CLT

Além da especificidade da enzima, podemos levar em conta a reatividade (eletrofilicidade), dos substratos para explicarmos estes resultados, especialmente dos compostos heterocíclicos. Quando analisamos as energias de conjugação do furano (16Kcal/mol), pirrol (21Kcal/mol) e tiofeno (29 Kcal/mol), precursores de 12, 13 e 14 respectivamente, percebe-se que o furano possui a menor energia de conjugação. Isto deve-se ao seu sexteto de elétrons  $\pi$  deslocalizado parcialmente, fazendo com que o mesmo tenha propriedades químicas intermediárias entre as de sistemas aromáticos altamente deslocalizados, como o benzeno (36Kcal/mol) e as de um dieno cíclico simples que também seja um éter enólico (NORMAN, 1978). Estas evidências sugerem que no caso do furano, tem-se uma deslocalização eletrônica do sistema aromático menos efetiva, o que deixa o grupo carbonila mais eletrofílico e, portanto, mais reativo.

Os resultados demonstraram que apesar do complexo enzimático não ter apresentado uma atividade catalítica em uma faixa ampla de substratos, observou-se reduções praticamente enantioespecíficas (no caso do composto 7) e bons rendimentos químicos.

#### 4.2.5 Reações de hidrólise catalisada pela CLT

Visando ampliar o espectro de aplicações biocatalíticas do complexo enzimático da CLT foi realizado um experimento preliminar para verificar o seu potencial hidrolítico na resolução de racematos. Para isso, a mistura racêmica dos alcoóis (*RS*)-1-feniletanol (2a e 2b) produzidos através de metodologia descrita no item 5.6.4, foram acetilados, conforme procedimento experimental descrito no item 5.6.5 resultando na mistura racêmica do (*RS*)-acetato de 1-feniletila como pode ser visualizado no esquema reacional apresentado na figura 27.

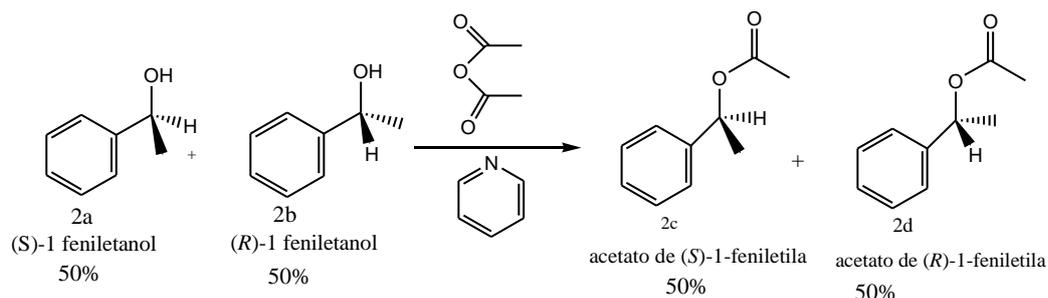


Figura 27. Reação de acetilação via química do (*RS*)-1-feniletanol

Os padrões do acetato foram analisados através de CLAE equipado com coluna quiral OB-H e OD-H utilizando um fluxo de 0,500ml/min. de uma mistura binária de hexano/isopropanol (95:5 v/v), cujo os enantiômeros apresentaram tempos de retenção de 6,19 e 6,68min, como demonstrado no cromatograma da Figura 28, onde observa-se áreas equivalentes para ambos os picos, o que é de fato esperado, para uma mistura racêmica.

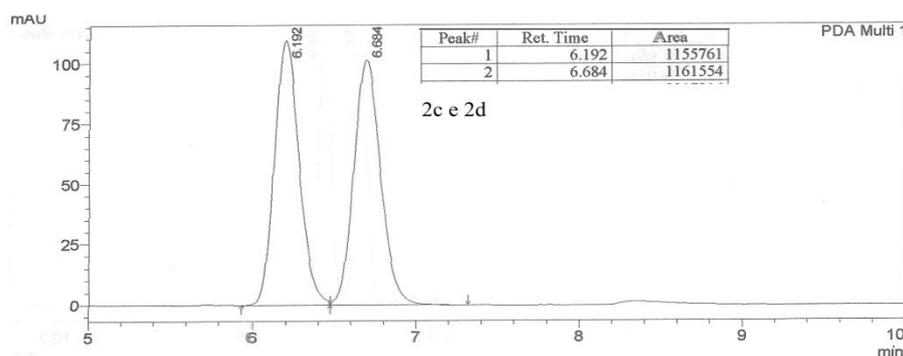


Figura 28. Cromatograma do (*RS*)-acetato de 1-feniletila (coluna OB-H)

O racemato (*RS*)-acetato de 1-feniletila foi caracterizado por IV (Figura 29), apresentando uma absorção intensa em  $1733\text{ cm}^{-1}$ , compatível com estiramento da ligação C=O de éster. Também se observa, em  $1242\text{ cm}^{-1}$ , uma banda característica de estiramento de ligação O-CO presente no acetato.

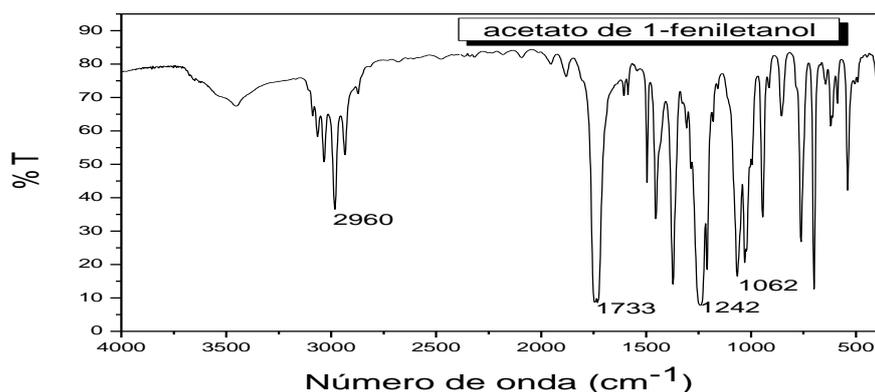


Figura 29. Espectro de infravermelho do racemato (RS)-acetato de 1-feniletila.

O experimento preliminar utilizado nas reações de hidrólises, constou do uso células integras da CLT, de acordo com a metodologia descrita no procedimento experimental no item 5.6.1, onde se utilizou 40mg de (RS)-acetato de 1-feniletila em meio aquoso (50mL) e 10g de CLT por um período de 24 horas. Passado o tempo de reação, o sistema foi tratado conforme procedimento descrito nos itens 5.4.2. As amostras foram posteriormente analisadas através de CLAE utilizando-se o mesmo método do (RS) acetato de 1-feniletila descrito anteriormente. A conversão dos produtos foi calculada através da curva de calibração dos alcoóis e dos acetatos (apêndice B e C), preparada anteriormente. O excesso enantiomérico (*ee*) foi calculado de acordo com o procedimento descrito no item 5.8, apresentando uma enantiosseletividade insignificante nas condições analisadas. Entretanto, a conversão foi excelente, tendo hidrolisado quase 100% do substrato em apenas 24h. O cromatograma da reação apresentado na Figura 30, mostra os picos com  $t_r$  de 6,46 e 6,80min, referentes aos ésteres, e os que apresentam  $t_r$  de 9,53 e 11,19min são referentes aos alcoóis.

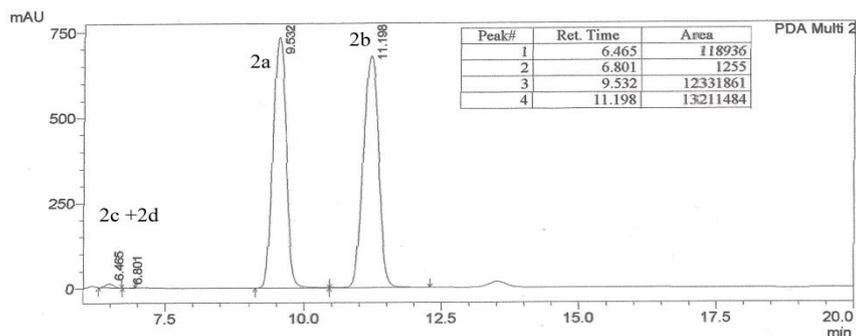


Figura 30. Cromatograma da reação de hidrólise do (RS)-acetato de 1-feniletila (coluna OD-H).

Visando garantir que a hidrólise foi realizada por intermédio enzimático, foi realizado um branco, onde o substrato foi colocado nas mesmas condições de reação, exceto pela ausência de CLT. O cromatograma do branco pode ser visualizado na Figura 31, onde, identificam-se os picos referentes aos ésteres nos tempos de retenção de 6,03 e 6,47min. É possível constatar a ausência total de alcoóis, pois, não existe nem um pico entre 9 e 15min, faixa em que se insere os tempos de retenção dos alcoóis. Isso vem a corroborar com o fato de a hidrólise está sendo realizada pelos catalisadores bioquímicos.

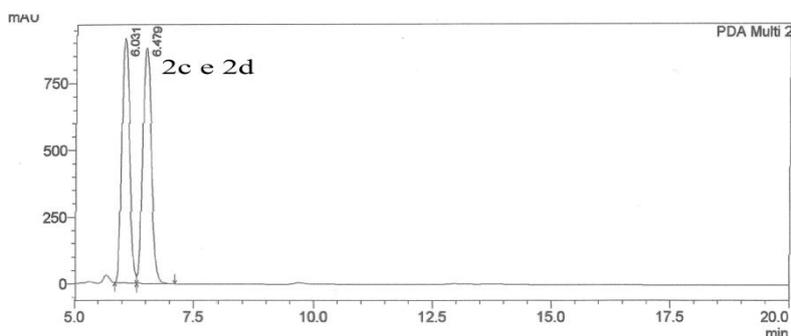


Figura 31. Cromatograma do controle da reação de hidrólise do (RS)-acetato de 1-feniletila.

#### 4.2.6 Otimização das condições de reação de hidrólise do (RS)- acetato de 1-feniletila.

Uma vez que o experimento preliminar demonstrou um promissor potencial hidrolítico do complexo enzimático da CLT (> 96% de conversão), resolveu-se investigar e aperfeiçoar algumas variáveis que interferem no processo de catálise enzimática, tais como:

tratamento da fonte do Biocatalisador, quantidade do Biocatalisador, pH da solução e tempo de reação.

#### 4.2.7 Quanto ao tratamento do catalisador

A fonte de biocatalisador foi tratada conforme procedimento experimental descrito no item 5.2 e ilustrado na Figura 32. Foram utilizados os extratos brutos enzimáticos das CLT e EBEL, sendo as reações conduzidas conforme procedimento do item 5.6.2 por um período de 24h . As amostras foram analisadas por CLAE utilizando-se coluna com fase estacionária quiral, OB-H e ressonância magnética nuclear de hidrogênio, RMN  $^1\text{H}$ . O cromatograma da reação é apresentado na figura 33.

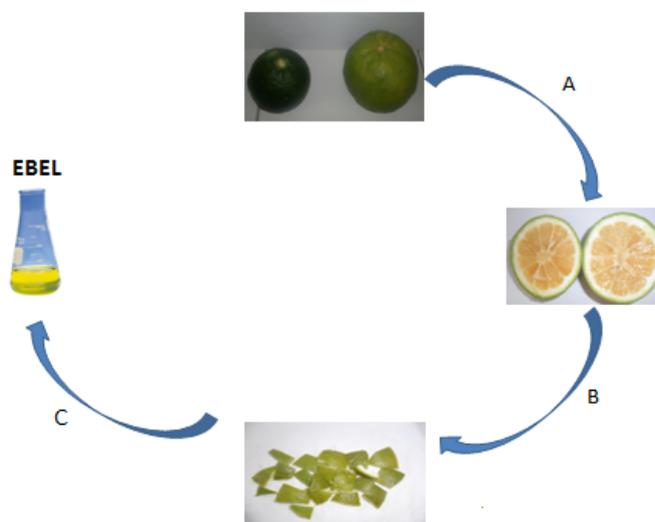


Figura 32. Processo de obtenção do EBEL. A-corte longitudinal, B-separação das cascas seguido de corte cúbicos e, C-trituração mecânica seguido de centrifugação e filtração

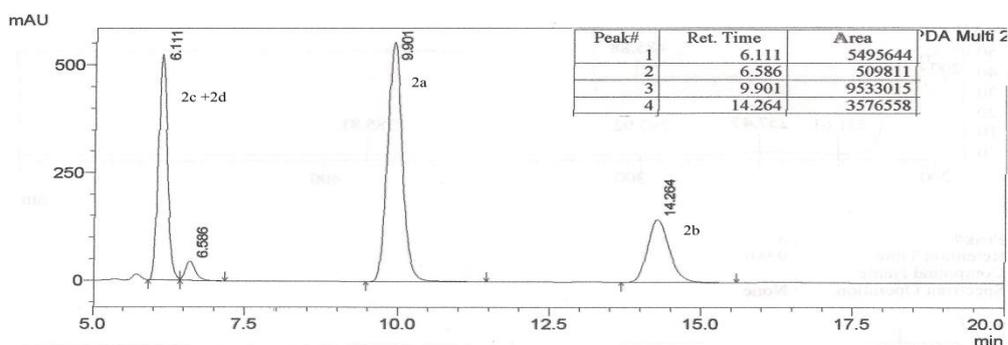


Figura 33. Cromatograma da reação de hidrólise do (RS)-acetato de 1-feniletila com EBEL

Observou-se um grande incremento na capacidade de resolução da mistura racêmica pelo complexo enzimático (*ee* saltou de 4,40 para 44,11%) aumentando a enantiosseletividade da reação em mais de dez vezes quando comparada com a reação utilizando as CLT. O esquema reacional apresentado na Figura 34 mostra os produtos obtidos da reação do EBEL com (*RS*)-acetato de 1-feniletila, assim como as condições na qual ocorreu a hidrólise do racemato.

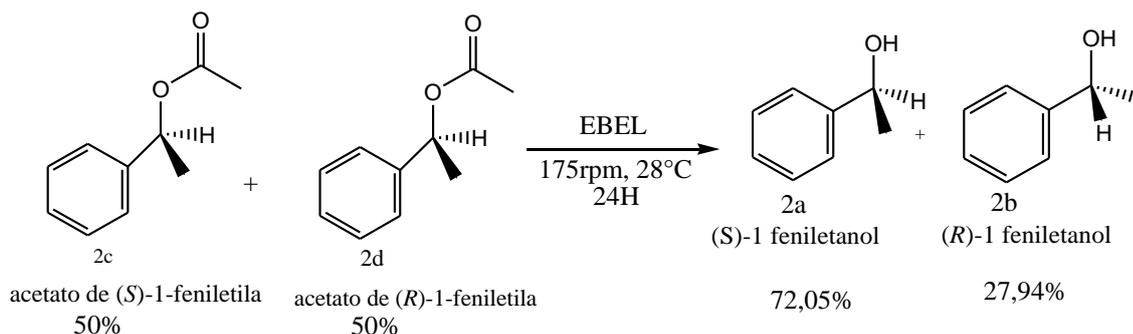


Figura 34. Representação da equação química de hidrólise de 2c e 2d com EBEL

No quesito conversão, o EBEL apresentou menor capacidade quando comparado com a CLT, tendo convertido 57,20% dos ésteres aos respectivos alcoóis. A conversão foi calculada também, através da integração dos sinais dos hidrogênios carbinólicos em 4,90 ppm (*q*; *J*=6,0; 1,07 H) e 5,90 ppm (*q*; *J*=6,0; 1,00 H) dos alcoóis e dos ésteres, respectivamente, apresentando 51,60% de conversão. Estes dados demonstram que as técnicas fornecem resultados de quantificação similares para os compostos analisados. O espectro de RMN <sup>1</sup>H da mistura reacional do acetato de 1-feniletanol com EBEL pode ser visualizado na Figura 35.

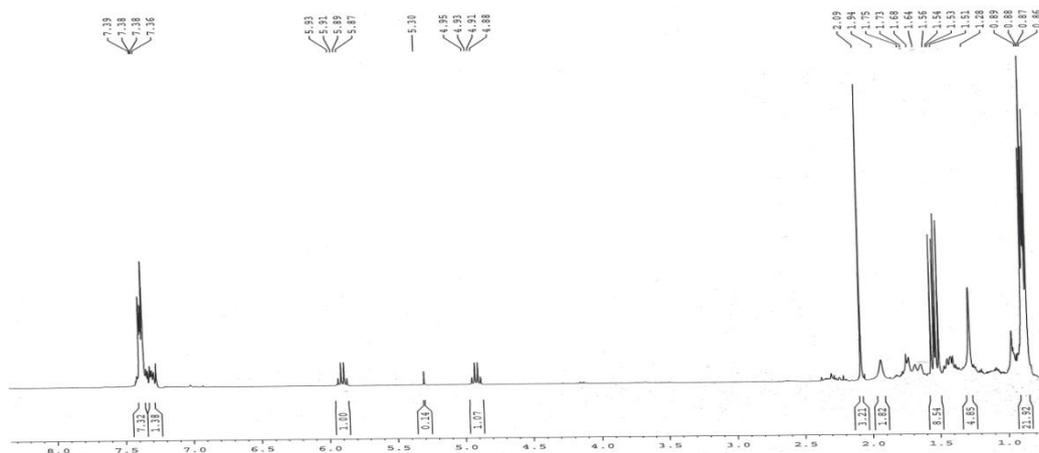


Figura 35. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da reação de hidrólise dos compostos 2c e 2d produzindo 2a e 2b.

Os sinais dos hidrogênios metílicos do 1-feniletanol e do acetato de 1-feniletila aparecem em 1,51ppm e 1,55 ppm, respectivamente. Fato este que pode ser observado no espectro de RMN  $^1\text{H}$  do padrão (*RS*)-acetato de 1-feniletila, apresentado na Figura 36.

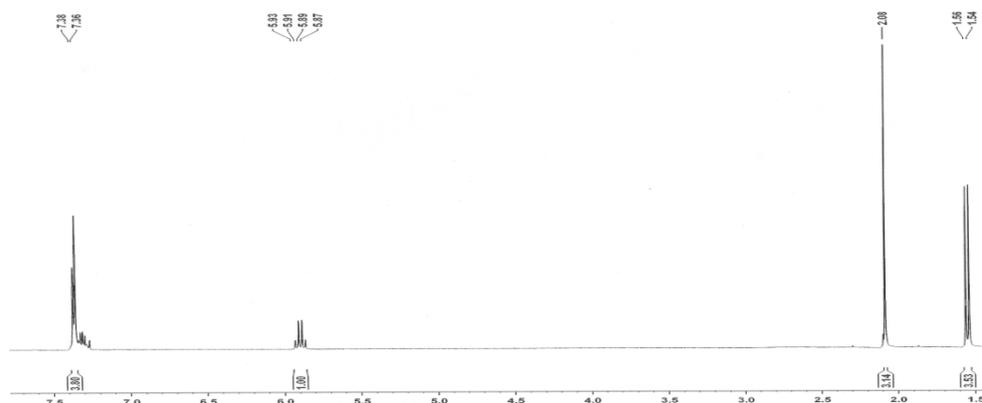


Figura 36. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) dos compostos 2c e 2d (padrão).

Os demais picos presentes no espectro da reação de hidrólise podem ser atribuídos a impurezas presentes na amostra e/ou resultantes do tratamento pelo qual a amostra passou, visto que, o espectro do branco (acetato de 1-feniletila com água) apresentou os mesmos picos, com exceção, dos que foram referentes ao (*RS*)-1-feniletanol, destacando-se:  $\delta_{\text{H}}$  4,90 (q;  $J=6\text{Hz}$ ; 1H),  $\delta_{\text{H}}$  1,52 (d; $J=6\text{Hz}$ ; 3H), ausentes no branco da reação, como pode ser visualizado no espectro da Figura 37.

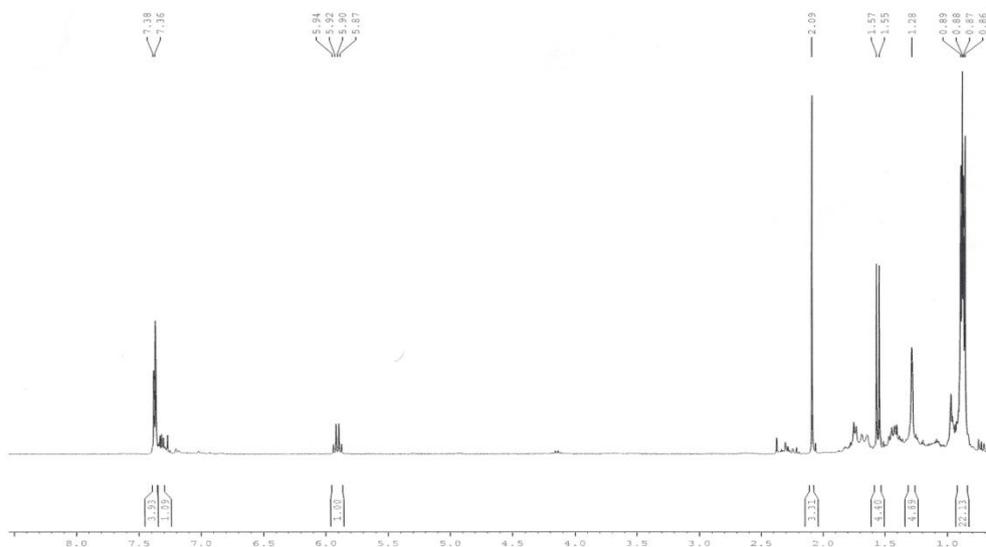


Figura 37. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do branco da reação de hidrólise do (*RS*)-acetato de 1-feniletila.

O gráfico da Figura 38 mostra a comparação entre os processos biocatalíticos utilizando a CLT e o EBEL quanto à capacidade de conversão e resolução dos ésteres para os respectivos alcoóis. Observou-se que apesar de ter ocorrido um decréscimo na conversão, obteve-se um aumento de mais de 100% na enantiosseletividade do processo. Esse fato pode ser consequência das diferenças de solubilidade das enzimas na solução de extração (água destilada), ou seja, o extrato aquoso possui um número mais reduzido e seletivo de enzimas. O que é confirmado quando se analisa o teor de proteínas presentes nos extrato enzimáticos de CLT e de EBEL, onde a concentração de proteínas para o primeiro apresentou foi maior quando comparado com segundo, resultados estes apresentados na Tabela 5 (p.43).

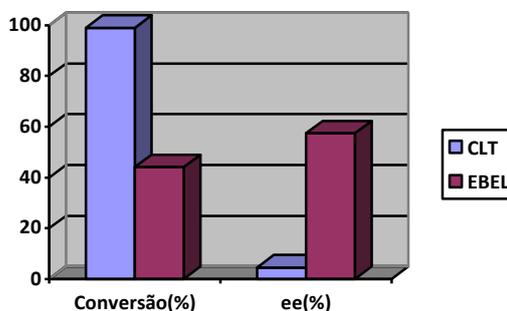


Figura 38. Gráfico mostrando a diferença no *ee* e na conversão entre a CLT e o EBEL.

Os resultados experimentais sugerem que a forma de tratamento do material vegetal pode alterar bastante sua atividade biocatalítica. Como o EBEL apresentou uma melhor capacidade de resolução, este foi selecionado para os experimentos.

#### 4.2.8 Quantidade de catalisador

Objetivando avaliar a influência da quantidade de biocatalisador na conversão e enantiosseletividade 40mg de (*RS*)-acetato de 1-feniletanol foram adicionados a diferentes quantidades de EBEL (10mL, 20mL, 40mL e 50mL). As demais variáveis da reação (temperatura, tempo, agitação) foram as mesmas dos experimentos anteriores, assim como o processo de extração e análise. Os resultados mostraram que a cinética da reação está de acordo com a equação de Michaelis-Menten, onde a velocidade da reação é diretamente proporcional a concentração de enzima, mantendo-se a concentração de substrato constante (COELHO, 2008),  $V_m = K \cdot [E]$ , onde  $V_m$  é a velocidade máxima da reação,  $[E]$  é a concentração de enzima e  $K$  a constante de equilíbrio da reação de decomposição do complexo enzima-substrato nos respectivos produtos. A porcentagem de conversão e *ee* estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Conversão e *ee* obtidos da reação de hidrólise de 2c e 2d com diferentes quantidades de EBEL.

EBEL(mL)	Conversão (%)	<i>ee</i> (%)
10	12,95	74,89 (R)
20	30	68,00 (R)
40	50,98	49,55 (R)
50	57,20	45,46 (R)

Outro fato relevante observado é a diminuição da resolução do (*RS*)-acetato de 1-feniletila a medida que a quantidade de EBEL aumenta. O que pode ser explicado em parte,

pelo fato de algumas enzimas possuírem uma estrutura tridimensional bastante flexível, daí quando se tem uma maior relação quantidade de enzima/quantidade de substrato, esta é capaz de alterar sua conformação, hidrolisando o enantiômero de configuração oposta à medida que a concentração do enantiômero preferencial vai diminuindo. A relação entre a concentração da enzima, os *ee* e as conversões é mostrada no gráfico da Figura 39.

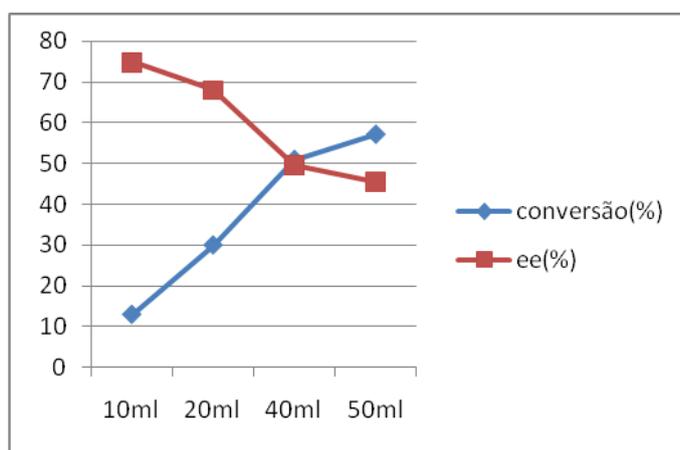


Figura 39. Gráfico da quantidade de catalisador X conversão e *ee*

Das quantidades de EBEL analisadas optou-se pela utilização de 20 mL para ser utilizada nos próximos experimentos, uma vez que essa concentração mostrou um bom *ee* (68%) atrelado a uma boa conversão (30%), considerando o tempo de reação de 24h. O cromatograma da reação de 2c e 2d com 20mL de EBEL é mostrado na Figura 40.

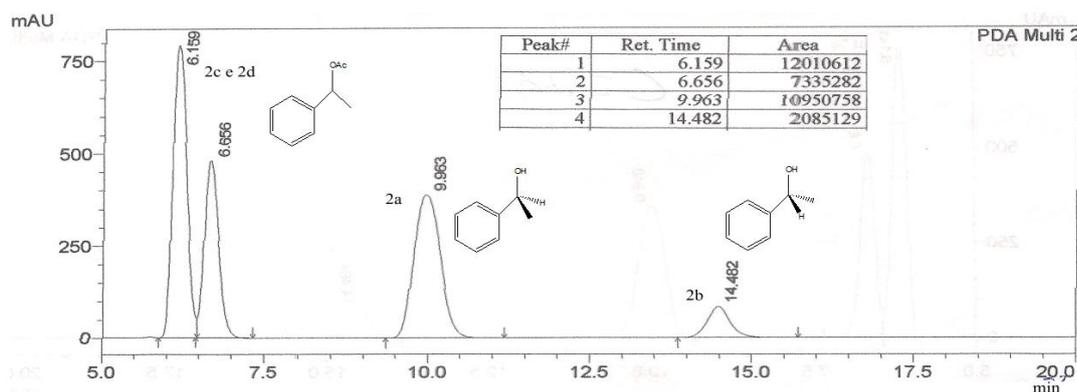


Figura 40. Cromatograma da reação de hidrólise de 2c e 2d com 20mL de EBEL.

#### 4.2.9 pH da solução

A atuação catalítica das enzimas presentes no EBEL foi avaliada frente a hidrólise do (*RS*)-acetato de 1-feniletila em diferentes pH visando obter o máximo de rendimento químico concomitantemente com altos *ee*. Foram utilizados EBEL preparados com soluções tendo os seguintes pH: 5,2; 6,2; 7,2 e 8,0. As reações foram conduzidas e tratadas conforme procedimento experimental descrito no item 5.6.2, por um período de 24h e analisadas por CLAE. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 10.

Tabela 10. Conversão e *ee* em diferentes valores de pH

pH	Conversão (%)	<i>ee</i> (%)
5,2	45,40	47,67 ( <i>S</i> )
6,2	53,99	34,48 ( <i>S</i> )
7,2	64,25	22,00 ( <i>S</i> )
8,0	63,03	28,86 ( <i>S</i> )
Água destilada	30	68,00

A variação da conversão e do *ee* também pode ser visualizado no gráfico da Figura 41 onde se percebe um aumento na conversão com o aumento do pH, com conseqüente diminuição do *ee*, o que nos leva a acreditar que o aumento do pH induz a uma maior mobilidade no sítio ativo das enzimas, fazendo com que ocorra a hidrólise de ambos os ésteres (2c e 2d), ou, ainda em pH mais elevados há uma maior solubilização de enzimas (fato que confirmado pelos dados presentes na (Tabela 5) o que pode provocar uma menor enantiosseletividade do processo biocatalítico já que há uma maior quantidade de diferentes enzimas para a mesma quantidade de substrato.

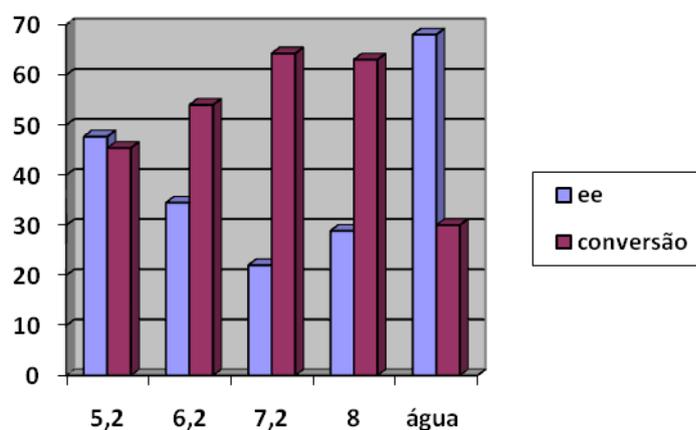


Figura 41. Reação de hidrólise dos compostos 2c e 2d em diferentes pH

A análise dos resultados mostra que o processo biocatalítico que conduz a um melhor *ee* é aquele que é realizado apenas com água destilada (68%). Apesar de apresentar uma menor conversão (30%) a reação em água destilada torna o processo como um todo mais econômico e mais prático. Portanto, este foi o meio utilizado nos demais experimentos.

#### 4.2.10 Tempo de Reação

Foram avaliados três tempos de reação: 24, 48 e 72h. A cada período de tempo selecionado, alíquotas de 5 mL foram retiradas do meio reacional e tratadas conforme procedimento descrito no item 5.4.2 utilizado-se diclorometano (3x5mL) como solvente de extração. Resultados na Tabela 11.

Tabela 11. Conversão e *ee* em diferentes tempos de reação de 2c e 2d frente ao EBEL.

Tempo de reação (H)	Conversão (%)	<i>ee</i> (%)
24	30,00	68,00 (S)
48	63,85	28,00 (S)
72	91,50	17,00 (S)

Os resultados, também apresentados graficamente na Figura 42, demonstram que até 24 horas o complexo enzimático mantém uma boa enantiosseletividade do processo. Após 48h, considerável aumento foi verificado na conversão do (*RS*)-acetato de 1-feniletila, em detrimento da estereosseletividade. A análise dos resultados demonstrou que o processo onde se obteve um maior *ee* foi conduzido por um período de 24h. Por isso, esse intervalo de tempo foi utilizado nos demais experimentos.

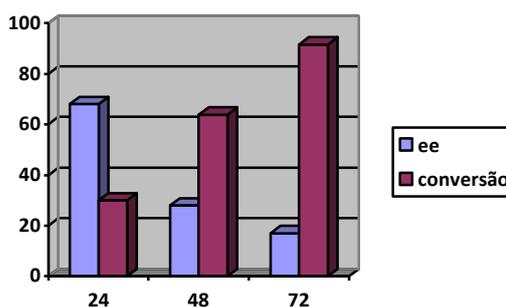


Figura 42. Gráfico da conversão e do *ee* em diferentes tempos de reação.

#### 4.2.11 Outros Substratos

Para avaliar a atividade catalítica nas reações de hidrólise, 5 acetatos racêmicos foram sintetizados e hidrolisados com EBEL nas condições otimizadas para o (*RS*)-acetato de 1-feniletila. A síntese partiu dos compostos 3, 4, 5, 7 e 10 que foram reduzidos com borohidreto de sódio NaBH<sub>4</sub> conforme procedimento descrito no item 5.6.4 obtendo-se os respectivos alcoóis (3a, 3b, 4a, 4b, 5a, 5b, 7a, 7b, 10a e 10b). As misturas racêmicas dos alcoóis obtidos por via química foram então submetidos a uma reação de acetilação com anidrido acético em piridina como catalisador de acordo com o procedimento descrito no item 5.6.5, gerando os respectivos produtos acetilados (3c, 3d, 4c, 4d, 5c, 5d, 7c, 7d, 10c e 10d). Estes produtos foram caracterizados por espectroscopia de IV (apêndices FF-LL) e RMN <sup>1</sup>H (apêndices MM-QQ). Os esquemas reacionais estão representados na Figura 43.

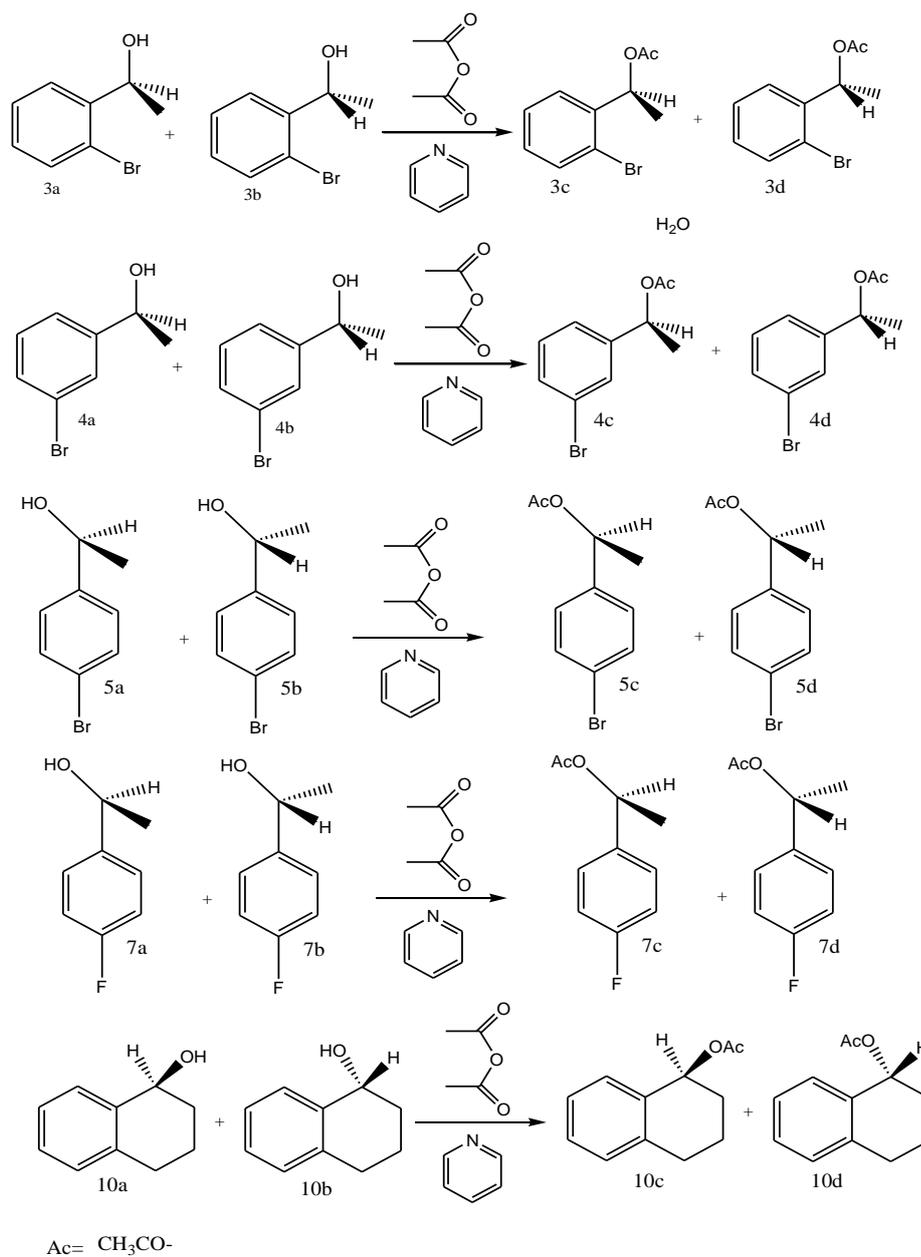


Figura 43. Reação de acetilação dos alcoóis racêmicos

O esquema reacional da Figura 44 representa de maneira sumária as condições nas quais os substratos foram submetidos á hidrólise com EBEL.

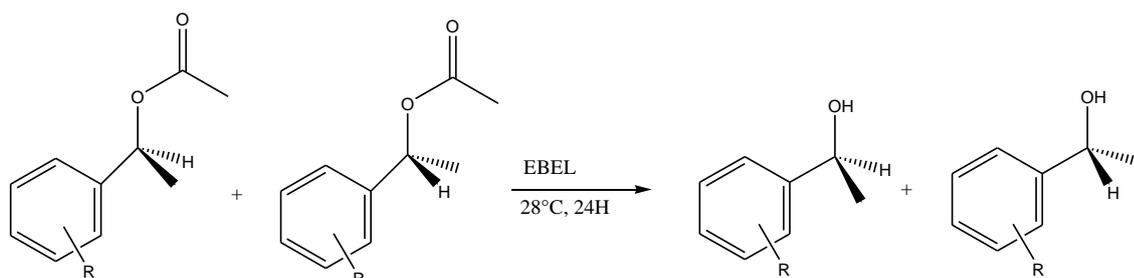


Figura 44. Reação de hidrólise de acetatos por EBEL.

Na Tabela 8 observa-se a conversão e o *ee* dos diferentes resultantes da hidrólise dos diferentes acetatos racêmicos.

Tabela 12. Reação de hidrólise de acetatos racêmicos com EBEL

Grupo R	Posição	Conversão (%)	<i>ee</i> (%)
-Br	2	21,81	11,95
-Br	3	62,82	7,71
-Br	4	46,82	45,52
-F	4	80,82	26,93

Pela análise desses resultados percebeu-se, que a mistura 3c/3d apresentou o menor rendimento químico (21,81%). Isso pode ser devido, em parte, a um considerável impedimento estérico presente na carbonila, resultante da proximidade do átomo de bromo e do grupo acila. A análise dos espectros de massas dos referidos compostos (apêndices P-W) v corroborar a com a hipótese acima, pois, percebe-se que: i) apenas no caso do composto 3c/3d não se detecta a presença do íon molecular, devido a perda do grupo acil com transferência de próton, resultando no pico  $m/z$  200, ii) visualiza-se a presença do pico em  $m/z$  163, produzido pela saída do átomo de bromo, e iii) apresenta o pico em  $m/z$  121, resultante da perda do grupo acil e do átomo de bromo, bem mais intenso que no caso de seus isômeros posicionais (compostos 4c/4d e 5c/5d). Este espectro de fragmentação particular pode está sendo favorecido por um provável impedimento espacial presente na molécula, ou seja, ou se detecta

o íon sem o átomo de bromo, ou sem o grupo acila, mas não com ambos, o que seria o íon molecular. A Figura 45a ilustra e destaca a proximidade do grupo acila com o átomo de bromo assim como uma possível interação eletrônica presente no (*RS*)-acetato de 1-(2-bromofenil)etila.

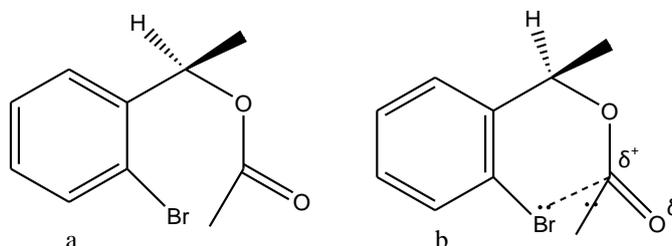


Figura 45. Conformação destacando o impedimento espacial (a) e possível interação eletrônica (b) presente no composto 3.

Apesar de a conformação descrita na Figura 45a não ser a conformação espacial mais estável possível do ponto de vista energético para essa molécula, ela pode está sendo viabilizada por uma interação eletrônica entre os elétrons livres do átomo de bromo e o carbono do grupo carbonila (Figura 45b), que possui uma eletrofilicidade considerável devido está ligado a dois átomos de oxigênio. Este impedimento espacial pode está deixando o composto 3c/3d menos acessível para hidrólise enzimática, ocasionando menor rendimento químico.

Quando se compara os demais compostos da Tabela 12, observa-se que o (*RS*)-acetato de 1-(4-fluorofenil)etila apresentou maior rendimento químico (80,82%), porém baixo *ee* (26,93%). Já o (*RS*)-acetato de 1-(4-bromofenil)etila apresentou uma conversão de 46,82%, menor que o rendimento do (*RS*)acetato de 1-(3-bromofenil)etila (62,82%) e maior que o do (*RS*)-acetato de 1-(2-bromofenil)etila.

No caso da reação de hidrólise do (*RS*)-acetato de 1-(1,2,3,4-tetraidro)naftila (10c e 10d) com EBEL, reação mostrada na Figura 46, obteve-se uma conversão de 19,90% e um *ee* de 9,6%. O baixo rendimento pode ser justificado pela relativa rigidez na conformação presente em um sistema bicíclico.

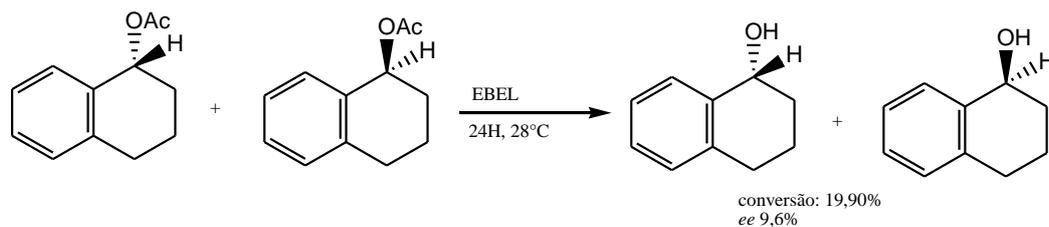


Figura 46. Reação de hidrólise do (*RS*)-acetato de 1-(1,2,3,4-tetrahidro)naftil.

Os resultados apresentados mostram que a hidrólise dos acetatos, de uma maneira em geral, apresentaram uma significativa conversão (acima de 20%) deixando a desejar quanto a enantiosseletividade, significativa apenas para o (*RS*)-acetato de 1-(4-bromofenil)etila, o que sugere que um desses enantiômeros do racemato provoca uma maior alteração no sítio ativo da enzima, resultando em uma maior diferença de energia nos respectivos estados de transição, fazendo com que a mesma seja mais seletiva. A baixa taxa de conversão dos ésteres pode também está atrelada a baixa solubilidade dos mesmos em solução aquosa, resultando em um menor contanto da enzima com o substrato. Experimentos outros, com adição de co-solventes devem ser realizados para aprofundamento desta sugestão.

Reações de hidrólises enzimáticas também foram testadas com os substratos, benzoato de metila(11) e benzoato de etila (12), apresentados na Figura 47, onde não foi obtido conversão dos ésteres aos respectivos ácidos. Isto pode ser devido ao fato de que algumas enzimas são mais seletivas e, portanto, mais sensíveis a mudanças no grupo acila e/ou alquila .

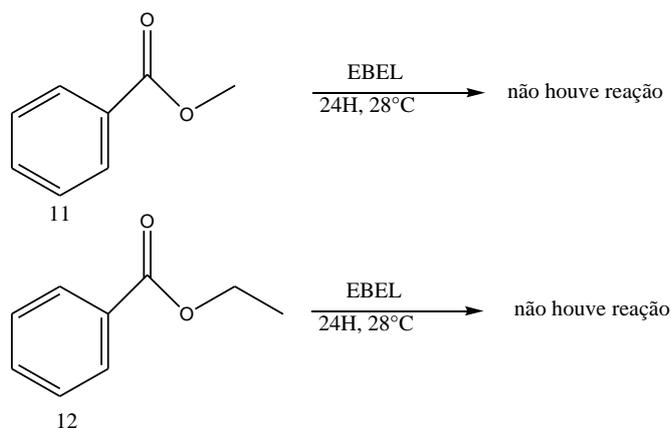


Figura 47. Compostos 11 e 12 submetidos a reação de hidrólise com EBEL.

Para avaliar a quimiosseletividade do complexo enzimático presente no EBEL o composto acetoacetato de etila(13) foi posto a reagir sob as mesmas condições de hidrólise dos demais substratos avaliados até aqui. Observou-se através de CG-MS, cujo cromatograma e espectros de massa se encontra nos apêndices (K, DD e EE), que não houve reação de hidrólise do éster. No entanto, ocorreu uma redução do grupo cetona com rendimento de 96,69% indicando que as enzimas redutases possuem uma maior afinidade pelo substrato em análise, que as hidrolases, pois, a função éster permaneceu intacta. O esquema reacional da figura 48 mostra a reação do EBEL com o acetoacetato de etila.

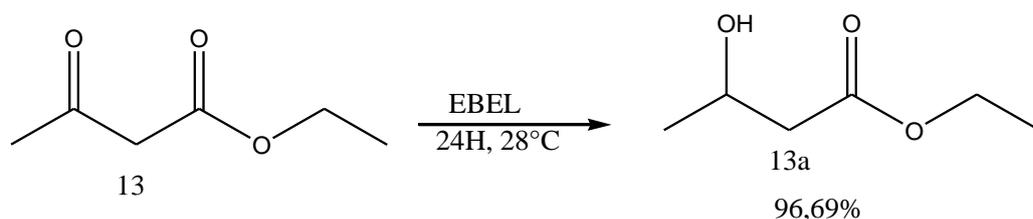


Figura 48. Análise da quimiosseletividade do EBEL.

Este resultado revela um potencial catalítico a mais para ser explorado, especialmente, para as reações de biorredução, pois, até então o EBEL só tinha sido avaliado frente a reações hidrolíticas. Essa ótima conversão, em um período relativamente curto de reação (24h) sugere que: a) o EBEL apresenta um meio propício, quanto à quantidade e estabilidade das enzimas, para as reações de redução; b) a possibilidade de o produto está formando ligação de hidrogênio intramolecular (13a), estabilizando o produto, diminuindo com isso a probabilidade do mesmo ser novamente oxidado pelo complexo enzimático o que desloca o equilíbrio no sentido da formação dos produtos (adaptado de NORMAN, 1978). A equação química apresentada na figura 49 mostra a formação o composto 13 com a respectiva formação da ligação de hidrogênio intramolecular.

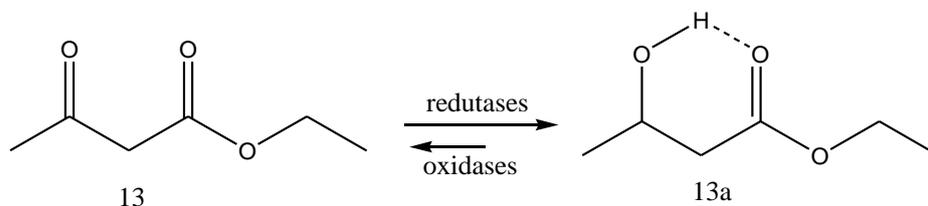


Figura 49. Formação de 13a estabilizado por ligação de hidrogênio intramolecular.

### **4.3 Reações de esterificação catalisadas pela Casca da Laranja Desidratada(CLD)**

As hidrolases são bem conhecidas pela sua capacidade de catalisar reações de hidrólises, mas também bastante relatado na literatura que as mesmas são eficientes nas reações inversas, de esterificação. Sendo que a composição do equilíbrio é em grande parte determinado pela quantidade de água no meio. Geralmente na presença de excesso de água as reações de hidrólises são favorecidas, já em meios dotados de baixas atividades de água, as reações de esterificação tornam-se viáveis (BEVILAQUA, 2005; COELHO, 2008; CARVALHO, 2005).

Uma vez que o complexo enzimático presente na CLT apresentou um significativo potencial hidrolítico, a possibilidade da realização da reação reversa, ou seja, a esterificação, catalisada por enzimas presentes na CLT foi analisada. Para isso tomou-se como base o fato de segundo Rivas *et al* (2008), as casca das laranjas serem constituídas essencialmente de açúcares solúveis (16,90%), celulose (9,21%), hemicelulose (10,50%) e pectina (42,50%). Todas essas estruturas são insolúveis em solventes apolares, constituindo assim um sistema de imobilização enzimático natural em reações conduzidas em meio orgânico. Com isso, as condições do sistema reacional conduzidas nas reações de hidrólise foram alteradas visando obter a reação reversa. Para isso um experimento preliminar foi realizado para averiguar a possibilidade das CLT catalisar a reação de esterificação do (RS)-1-feniletanol na presença de um doador acila, no caso, o anidrido acético. Sabendo que as CLT possui um grande teor de umidade (ABECITRUS, 2008), o que favorece a reação de hidrólise, as CLT foram submetidas a uma extração com acetona (Figura 50), visando retirar o excesso de água, assim como, metabólitos secundários e pigmentos capazes de interferir na reação ou na análise.

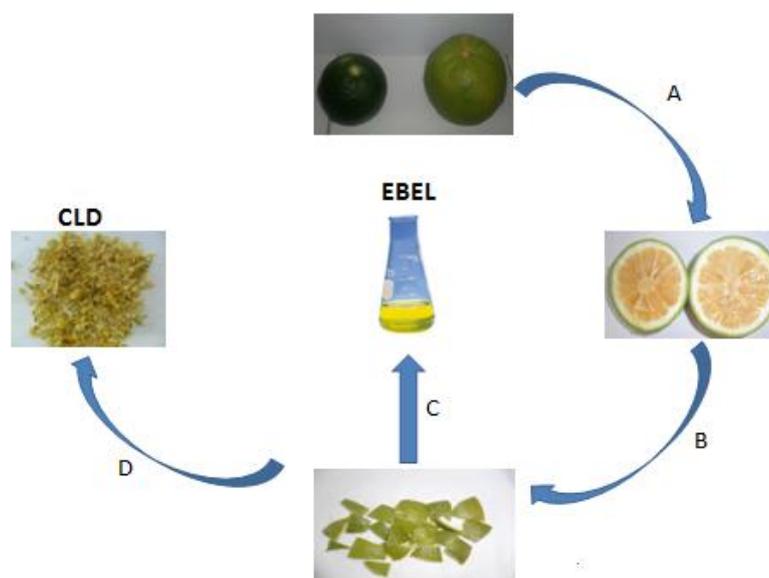


Figura 50. Processo geral para obtenção do EBEL e das CLD (A-corte longitudinal, B-separação manual do albedo seguido de corte, C-trituração em meio aquoso seguido de centrifugação e filtração, D-trituração seguido de extração com acetona e posterior secagem a 30°C).

As cascas da laranja desidratada (CLD), assim denominada as CLT depois de submetida à extração com acetona de acordo com o descrito no procedimento experimental do item 5.6.3, e resumido na figura 50, foram adicionadas junto ao anidrido acético e ao (RS)-1-feniletanol utilizando hexano como solvente. Após 24h de reação o meio analisado por CLAE, resultando no cromatograma abaixo.

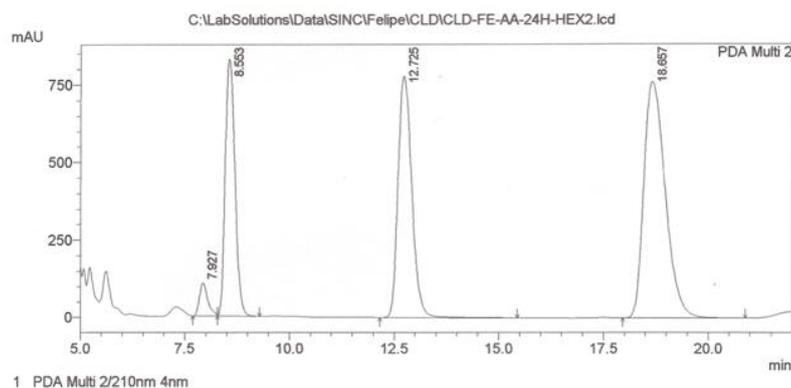


Figura 51. Reação de esterificação do (RS)-1-feniletanol utilizando CLD como catalisador.

A reação conduzida à temperatura praticamente fisiológica (38°C) demonstrou *ee* significativo (79,47%) para o éster, observando-se a formação de um dos enantiômeros preferencialmente. No entanto, no que diz respeito à resolução dos alcoóis, um excesso muito baixo (20,86%) foi observado. Estes dados sugerem que reações biocatalíticas laterais estão ocorrendo no sistema, o que não é de surpreender já que o processo foi conduzido com células íntegras, apresentando um complexo diversificado de enzimas. Uma explicação possível para o fato de termos excesso razoável na formação do éster, e, praticamente nenhum nos alcoóis é a ocorrência de reações de Biooxidação/Bioredução (Figura 52) resultando na racemização do álcool ao final do processo.

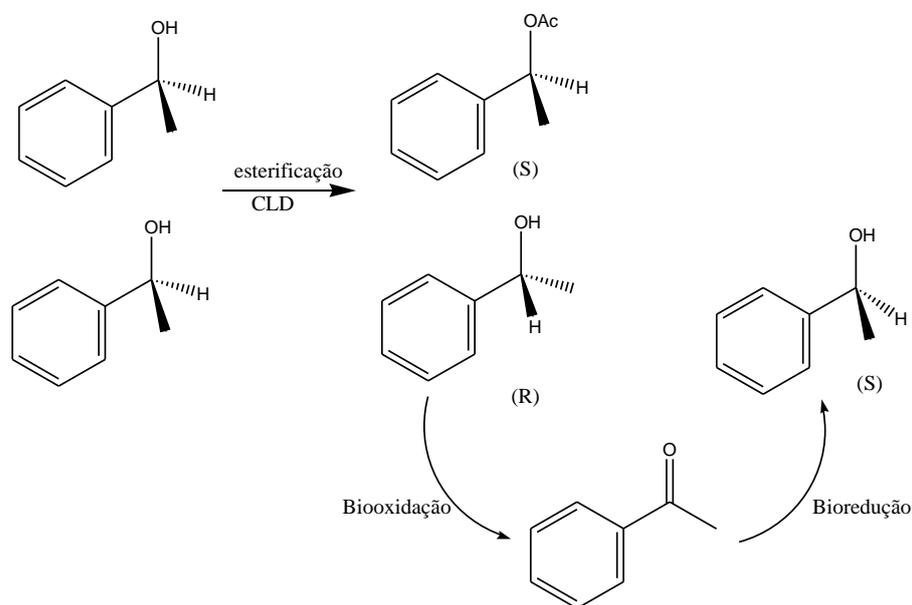


Figura 52. Processos biocatalíticos que resultam na racemização do 1-feniletanol

Esta sugestão é corroborada pelo potencial de catalisar reações de oxidação/redução, já demonstradas neste trabalho pelo complexo enzimático presente nas CLT.

Esta reação foi acompanhada, nas mesmas condições por um período de 96h, sendo que a cada intervalo de tempo analisado, alíquotas eram retiradas do meio reacional e analisadas por CLAE. Os resultados podem ser observados na tabela 13.

Tabela 13. Valores de conversão e *ee* da reação de esterificação do (*RS*)-1-feniletanol em diferentes intervalos de tempo.

Tempo (H)	Conversão (%)	<i>ee</i> <sub>éster</sub>	<i>ee</i> <sub>álcool</sub>
24	65,05	79,47	20,86
48	40,47	79,95	12,32
96	40,94	74,40	25,21

Os resultados apresentados na tabela 13 demonstraram claramente o potencial de catálise da CLD nas reações de esterificação, uma vez que se alcançou um razoável *ee* do éster (79,95%) e uma conversão significativa de 65,05%, utilizando uma metodologia de fácil operação e de baixo custo, características extremamente almejadas pelas indústrias. O período de 24h de reação foi o que apresentou uma melhor conversão e um razoável *ee*.

#### 4.3.1 Efeito do solvente na reação de esterificação catalisada por CLD

O fato de o experimento preliminar ter evidenciado a real possibilidade de produção de substâncias enantiopuras, através da catálise pela CLD, fez com que outras variáveis (solvente, temperatura, doador acila), que podem modificar enantiosseletividade da(s) enzima(s) presente(s) na CLD, fossem analisadas. Dentre estas variáveis, o solvente empregado no meio reacional é de extrema importância, podendo aumentar o teor de conversão e *ee*, assim como reduzir os mesmos, provocando inclusive a inativação de enzimas. A verificação da seletividade e reatividade da CLD em diferentes solventes (acetona, diclorometano, etanol, metanol e acetato de etila) serviu de parâmetro para a escolha do meio no qual as reações de esterificação foram conduzidas. Os *ee* e as conversões nos diferentes solventes podem ser visualizados na Tabela 14.

Tabela 14. Influência do solvente na reação de esterificação do (RS)-1-feniletanol com CLD

Solvente	Conversão (%)	<i>ee</i> <sub>éster</sub>	<i>ee</i> <sub>álcool</sub>
Propanona	-	-	15,00
Acetato de etila	-	-	-
Etanol	-	-	-
Metanol	-	-	-
Diclorometano	2,13	> 99	7,9
Hexano	65,05	79,47	25,21

Os resultados da Tabela 14 demonstram que o uso de hexano como solvente proporcionou uma maior taxa de conversão e um melhor *ee*. Isto pode estar atrelado ao fato do hexano possuir a menor polaridade dos solventes analisados, o que resulta em uma menor capacidade de retirar a água de hidratação da enzima, fazendo com que a mesma tenha melhor atividade. Também se deve levar em conta o fato de que a baixa constante dielétrica do hexano não permite grande mobilidade do sítio ativo da enzima, o que a torna mais rígida e, portanto mais seletiva (ZAKS, 1996). Diante destas análises optou-se pelo uso de hexano nos demais experimentos utilizando a CLD.

#### 4.3.2 Efeito do agente acilante

A investigação do agente acilante que proporciona melhores taxas de conversão e *ee* é de significativa importância. O comprimento da cadeia carbônica do agente acilante preferencial da CLD pode dar uma idéia do tipo de enzima que catalisa esta reação. Uma vez que se tratar de uma lipase, a mesma é capaz de catalisar reações de hidrólise cujo grupo acila possua mais de 10 átomos de carbono. Se for uma esterase, em geral, o grupo acilante preferencial possui menos de 10 átomos de carbono (BORNSCHEUER, 2002). Vale ressaltar que a maioria das lipases podem atuar sobre os substratos das esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (JAEGER, 1999).

Após o experimento com anidrido acético, foi analisado o comportamento do acetato de vinila (reação ilustrada na figura 53) cujo grupo acila possui o mesmo número de carbono do anidrido acético, na esterificação de 2a e 2b. Bom *ee* do álcool de configuração *R* (91,42%) associado a uma conversão de 79,43% foi verificado, comparável a reações químicas convencionais, em um período de 24h de reação. O cromatograma da reação de 2a e 2b com acetato de vinila pode ser visualizado na Figura 54.

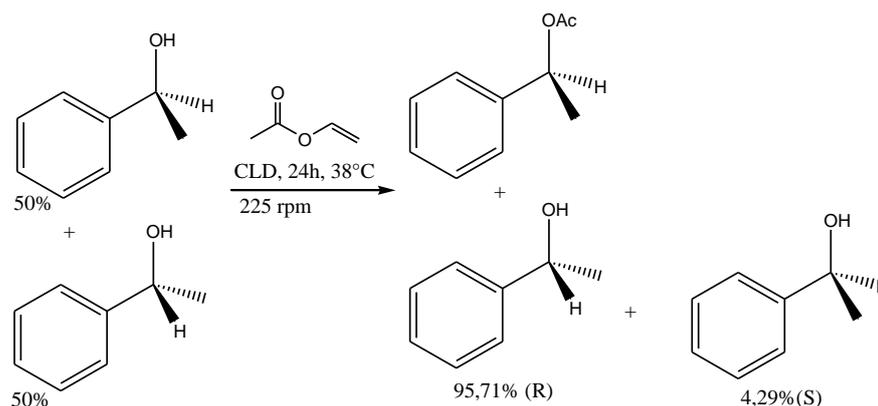


Figura 53. Reação de esterificação de 2a e 2b com acetato de vinila na presença de CLD

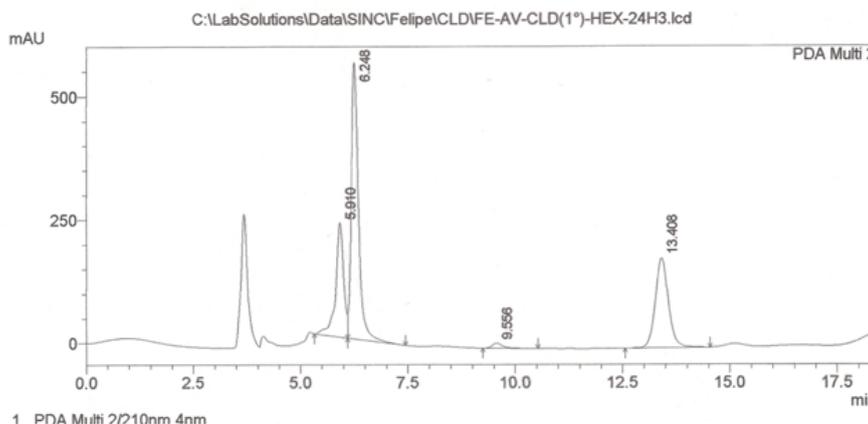
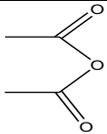
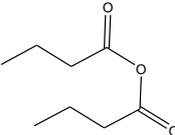
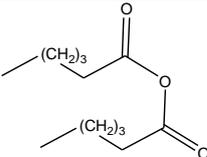
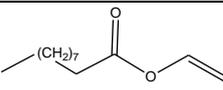
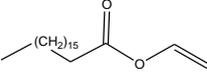


Figura 54. Cromatograma da reação de 2a e 2b com acetato de vinila utilizando CLD como catalisador.

Como as reações de 2a e 2b tiveram uma variação considerável, tanto na conversão como no *ee*, devido à mudança do agente acilante, outros compostos capazes de transferir grupos acilas foram avaliados. Os resultados da reação de esterificação com diversos grupos acilantes (variando a cadeia carbônica de 2 a 18 átomos de carbono) podem ser visualizados na Tabela 15.

Tabela 15. Influência do agente acilante na reação de esterificação de 2a e 2b com CLD.

Agente acilante	Tempo (H)	$ee_{\text{álcool}}$ (%)	Conversão (%) <sup>*</sup>
	24	20,86 (R)	67,77
	48	12,32 (R)	
	96	19,99 (R)	
	120	22,62 (R)	
	24	90,42(R)	69,11
	48	< 2	
	96	37,09 (R)	
	120	> 99 (R)	
	24	-	34,31
	48	-	
	96	-	
	120	-	
	24	8,3 (R)	a
	48	-	
	96	5,2 (R)	
	120	33,40 (S)	
	24	-	a
	48	80,72 (R)	
	96	32,96 (S)	
	120	6,5 (R)	

\* conversão determinada após 120h de reação. a-não apresentaram formação dos ésteres

A determinação dos teores de conversão (Tabela 15) foi realizada através da integração dos sinais de RMN <sup>1</sup>H dos hidrogênios metínicos do álcool (Ha) e do éster (Hb),

respectivamente. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da reação de esterificação de 2a e 2b utilizando anidrido hexanóico como agente acilante, destacando os hidrogênios utilizados para a quantificação do éster formado pode ser visualizado na Figura 55.

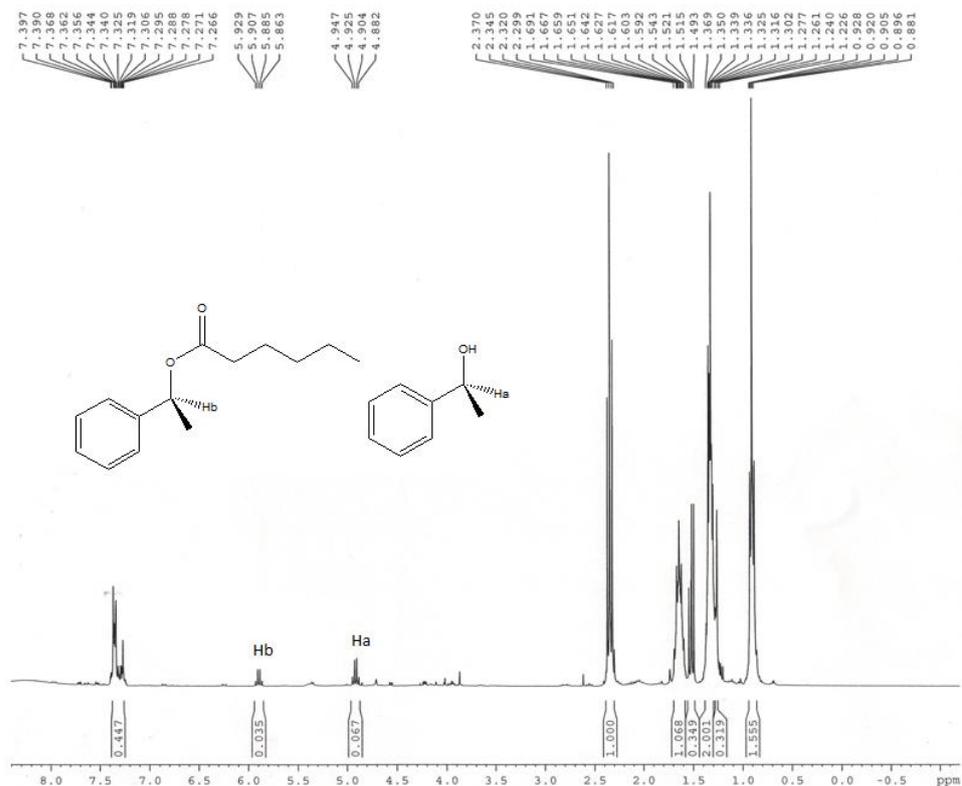


Figura 55. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da reação de 2a e 2b com anidrido hexanóico utilizando CLD como catalisador

Os resultados dos experimentos demonstram que a(s) enzima(s) presente na CLD possui melhor atividade com o anidrido acético e acetato de vinila, estes fatos sugerem que enzimas acetilesterases estão atuando. Esta sugestão é corroborada com o estudo realizado por (NIELSEN, 2002) que demonstrou a presença de acetilesterases no gênero citrus. O fato dos agentes acilantes, estereato de vinila e decanoato de vinila não terem formado os respectivos ésteres também contribuem para esta sugestão. Nota-se que apesar de não ocorrer formação dos ésteres para estes dois agentes acilantes, considerável *ee* do álcool é observado nestes sistema, o que implica a possibilidade de outras reações (bioxidação/bioredução) estarem ocorrendo. O agente acilante, é um dos determinantes da atividade catalítica de cada hidrolase (lípase e esterases). Caso o doador acila possua mais de 10 átomos de carbono, a lípase processa a catálise, se possui menos de 10, a esterase catalisa a reação, ainda, há a

possibilidade de a lipase catalisar a reação de esterificação com ambos agentes acilante. No entanto, o fato das reações de acetilação apresentarem melhores resultados, atrelados a estudo já identificado a presença de acetilesterases no gênero citrus (NIELSEN, 2002), são alguns indícios que apontam para a catálise esta sendo efetuada pelas esterases. Outro dado de grande relevância a ser observado, é que o *ee* teve uma variação significativa com o tempo demonstrando que o controle desta variável para a reação de esterificação utilizando a CLD é essencial. Como a CLD apresentou melhor desempenho, tanto no quesito do *ee* como na conversão, utilizando como agente acilante o acetato de vinila, este foi utilizado nos demais experimentos.

#### 4.3.3 Reuso da CLD nas reações de esterificação de 2a e 2b

A possibilidade de reuso das CLD nas reações de esterificação foi analisada, onde a CLD após 24h de reação, foi submetida a extrações sucessivas com hexano (3x10mL) e em seguida o solvente foi evaporado a pressão reduzida. Depois de secas as CLD foram utilizadas sucessivamente na reação de acetilação dos compostos 2a e 2b, durante 24h.

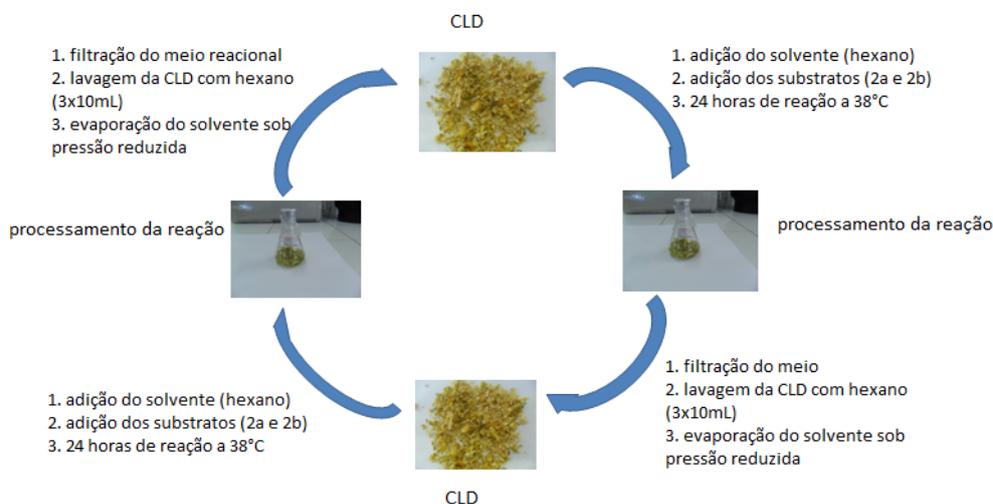


Figura 56. Reuso das CLD nas reações de esterificação.

A cada ciclo de reação, as CLD, passavam pelo mesmo procedimento (Figura 56) e os produtos da reação de bioesterificação era analisado por CLAE-quiral. Ao todo foram realizados 3 reutilizações, onde foram observados bons *ee* e teores de conversão significantes. Os resultados encontram-se no gráfico abaixo (Figura 57).

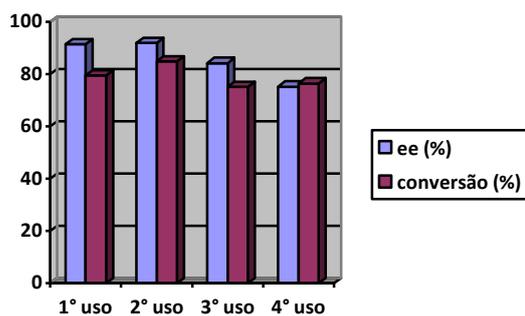


Figura 57. Reutilização da CLD em reações de esterificação de 2c e 2d.

Os resultados da reutilização das CLD, apresentados na Figura 57, demonstram uma capacidade muito boa de esterificação em todos os ciclos de reuso, com *ee* e conversões razoáveis até o 3° ciclo. Quanto a conversão o decréscimo não é muito significativo entre os 4 ciclos, apresentando um leve acréscimo, de 79,43% da primeira utilização para 84,96% na segunda utilização, seguido de um leve decréscimo (84,96 para 75,19%) do 2° para o 3° ciclo, o 4° ciclo de reuso apresentou uma conversão semelhante ao 3° ciclo, de 76,47%.

Já quando analisamos o *ee* do álcool durante os ciclos de reuso, o decréscimo é razoável, passando de 91,42% na 1ª utilização para 75,26% no 3° ciclo. O 1° ciclo de reuso apresentou resultado experimentalmente idêntico ao da 1ª utilização (92,06%) e o 2° ciclo apresentou um *ee* de 84,27%. O cromatograma da reação utilizado as CLD no 3° ciclo de reuso pode ser visualizado na Figura 56.

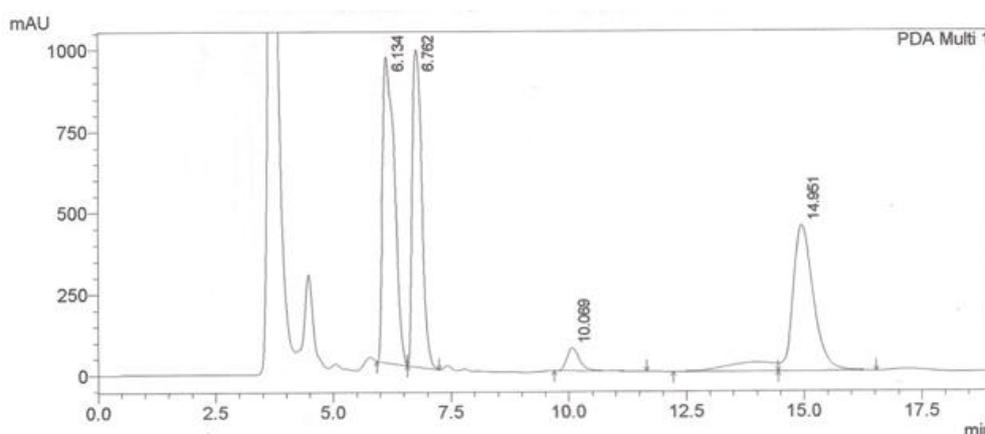


Figura 58. Cromatograma da reação de esterificação de 2a e 2b após reusar as CLD pela 3ª vez.

#### 4.3.3.1 Capacidade de Armazenamento das CLD

Demonstrada a capacidade de reuso das CLD nas reações de esterificação, foi investigado o efeito do armazenamento, sendo mantidas sob refrigeração (4°C) durante 30 dias. Após este período, as CLD foram postas a reagir com os compostos 2a e 2b seguindo a mesma metodologia adotada para as reações de esterificação supracitadas. Os produtos da reação foram analisados por CLAE-quiral (Figura 59) apresentando o leve aumento no teor de conversão e no *ee* com o uso da CLD após ao armazenamento.

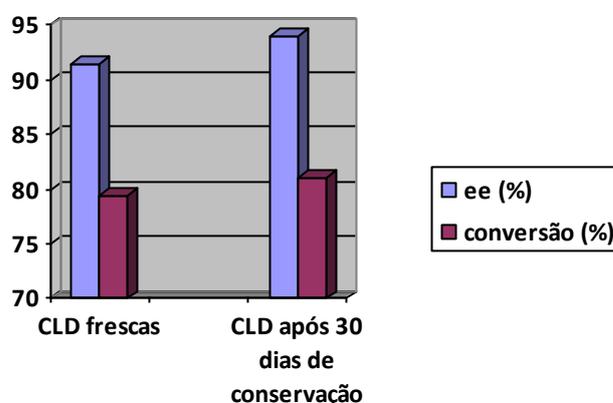


Figura 59. Comparação da taxa de conversão e do ee de CLD frescas e após 30 dias de armazenamento

A comparação entre o uso de CLD fresca e após conservação pode ser visualizado na Figura 59. A explicação para o fato de as CLD apresentarem uma boa conservação, com considerável capacidade de reutilização, pode ser atribuído (em parte) a uso de solventes orgânicos, na extração (acetona) e na condução da reação (hexano) de esterificação. Segundo Júnior e Pastor (2007), o Log P é utilizado como medida estabelecida da toxicidade de microrganismos frente a solventes orgânicos imiscíveis em água. As toxicidades mais altas são observadas em valores de log P entre 1 e 5, sendo que o hexano apresenta log P igual a 3,5. Portanto, a alta toxicidade dos solventes orgânicos frente a microrganismos contribui de maneira significativa para a conservação da rede de polímeros naturais (celulose, pectina e hemicelulose) na qual as enzimas encontram-se naturalmente imobilizadas, diminuindo com isso, o teor de decomposição das mesmas.

#### 4.3.4 Efeito da temperatura nas reações de esterificação catalisadas por CLD

A capacidade de catalisar reações de esterificação das CLD foi avaliada em diferentes temperaturas, visando obter a temperatura mais viável para a reação. A atuação catalítica das mesmas foram avaliadas nas temperaturas de 38, 48 e 55°C. O tempo de reação foi de 24h e as análises foram realizadas por CLAE-quiral. A Figura 60 mostra o *ee* e as conversões nas diferentes temperaturas.

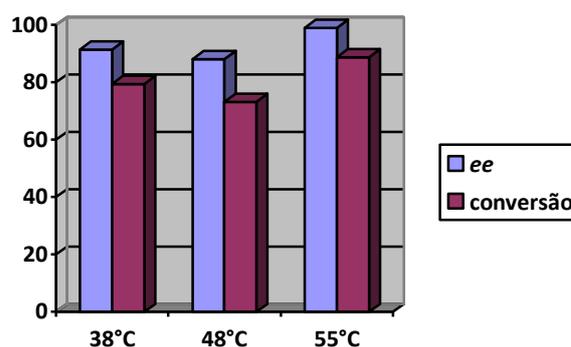


Figura 60. Resultado da reação de esterificação de 2a e 2b catalisada por CLD a diferentes temperaturas.

Os resultados apresentados na Figura 60 demonstram que em todas as temperaturas analisadas houve conversão dos alcoóis aos respectivos ésteres, com considerável *ee*. O estudo revelou que *ee* aumentou gradativamente com a elevação de temperatura para a formação do enantiômero *R*. Comportamento semelhante foi observado para conversão que aumentou de 73,31% a 48°C para 88,39% a 55°C. Vale ressaltar que na reação de resolução de racematos por esterificação enantiosseletiva, o teor de conversão ideal para a reação é de 50% (quando apenas um dos enantiômeros do racemato é esterificado). Assim, para as conversões acima de 50% há o indicativo que parte do enantiômero *R* também está sendo convertido a éster. A Figura 61 apresenta o cromatograma da reação realizada a 55°C.

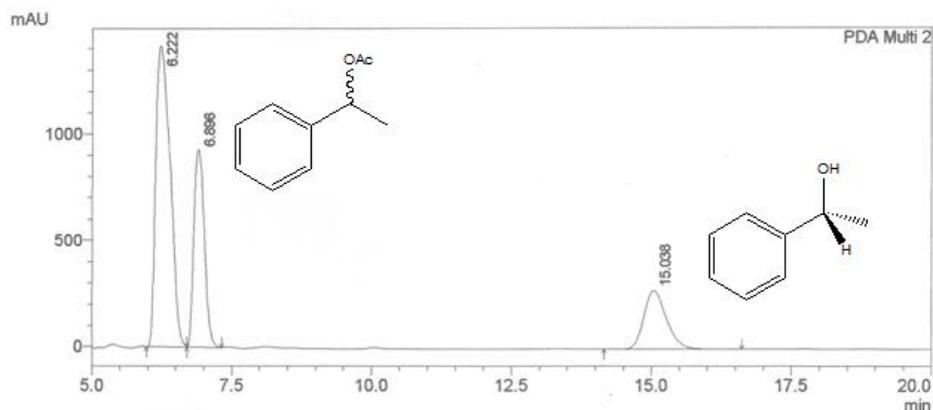


Figura 61. Cromatograma da reação de esterificação de 2a e 2b catalisada por CLD a 55°C

#### 4.3.5 Reação de esterificação de alcoóis racêmicos catalisada por CLD

Uma vez que as CLD apresentaram um desempenho promissor nas reações de esterificação de alcoóis racêmicos [(RS)-1-feniletanol] demonstrando *ee* >90% e teores de conversões maiores que 80%, a aplicação deste biocatalisador foi estendida a outros alcoóis secundários (Figura 62), visando ampliar seu espectro de aplicação em processos de biocatálise. A temperatura escolhida para a condução das reações com estes substratos foi de 38°C, tendo em vista que a mesma proporciona bom rendimento químico associado a *ee* significantes atrelado ao fato de uma menor temperatura (quando comparada com a reação realizada a 55°C) resultar em um menor desgaste para a estrutura da CLD. Os alcoóis racêmicos (Figura 62) foram obtidos por redução via química das respectivas cetonas, com boroidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>), e caracterizados via espectroscopia de IV-FT(apêndice).

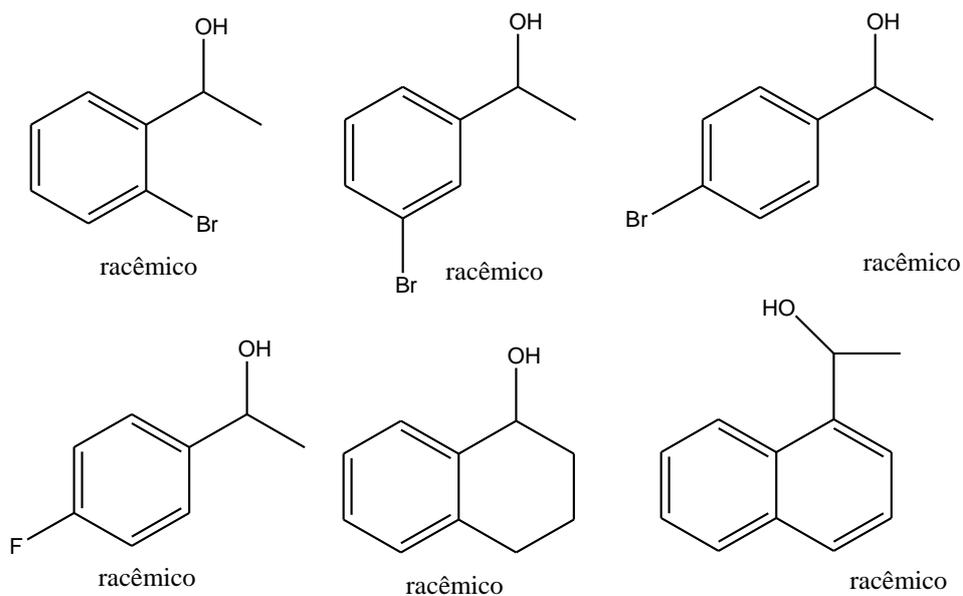
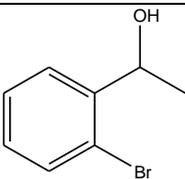
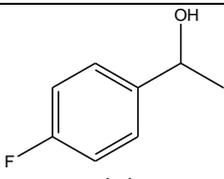
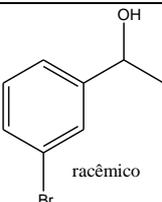
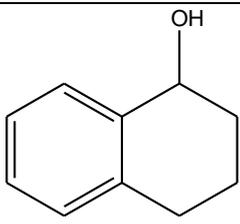
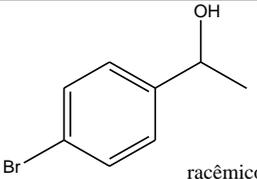
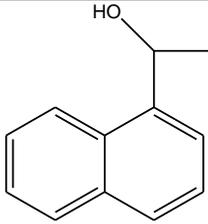


Figura 62. Alcoóis racêmicos utilizados nas reações de esterificação catalisada por CLD

As reações foram processadas durante 24h e a relação entre a quantidade de substrato/agente acilante (acetato de vinila) mantidas as mesmas dos demais experimentos, assim como a agitação (225rpm). Após 24h de reação, o meio foi tratado, o *ee* dos alcoóis foi analisado via CLAE-quiral e os teores de conversão foram avaliados via CG-EM. Os resultados estão sumariados na Tabela 16.

Tabela 16. Alcoóis racêmicos submetidos a reação de esterificação utilizando CLD como catalisador

Substrato	C (%)	ee (%)	Substrato	C (%)	ee (%)
 racêmico	49,47	56,59(R)	 racêmico	70	96,61(R)
 racêmico	58,78	91,56 (R)	 racêmico	28,81	46,41 (R)
 racêmico	67,46	81,22(R)	 racêmico	70,24	52,54 (R)

Nos resultados apresentados na Tabela 16, observa-se que as CLD apresentou atividade frente a todos os substratos avaliados, resultando em *ee* variando de 52,54 a 96,61% e teores de conversões entre 28,81-70,24%. Verifica-se nestes resultados que a mudança da posição (de 2 para 3 e depois para 4) do átomo de bromo resulta em uma elevação tanto do *ee* quanto no teor de conversão, sendo que o halogênio na posição 4 propiciou os melhores resultados quando comparado a seus isômeros posicionais. Também na posição 4, o átomo de flúor, resulta em *ee* elevados, melhores que o 4Br, apresentando 98,30% do álcool enantiômero de configuração (*R*) e apenas 1,69% do enantiômero de configuração (*S*). O cromatograma (CLAE) da análise da reação de esterificação do etan-(4-fluorofenil)-1-ol pode ser visualizado na figura 63.

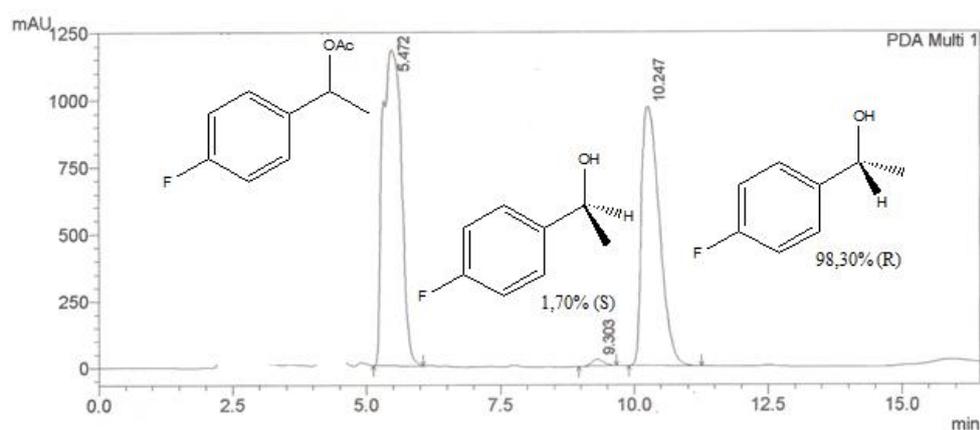


Figura 63. Cromatograma da reação de esterificação do etan-(4-fluorofenil)-1-ol catalisada por CLD.

A análise dos resultados da reação do (*RS*)- $\alpha$ -tetralol e o (*RS*)-1-naftiletanol, demonstrou um grande incremento no *ee* (28,81 para 70,24%) e considerável no teor de conversão (46,41 para 52,54%) deste último, o que pode estar atrelado ao fato de um grupo CH do 1-naftiletanol (menos impedido) proporcionar um acesso mais favorável e um pouco mais seletivo da(s) enzima(s), resultando em uma melhor taxa de conversão. Um dado similar a esse é verificado quando um álcool derivado do eugenol (15), sintetizado através da sequência de reações (adição seguido de hidrólise) apresentadas na Figura 64, é submetido a reação de esterificação catalisada por CLD (etapa 3). Em 24h de reação, todo o álcool é esterificado, não observando-se *ee* considerável. O fato de 15 apresentar um espaçador metileno pode estar contribuindo sobremaneira para maior reatividade da enzima e uma menor enantiodiferenciação.

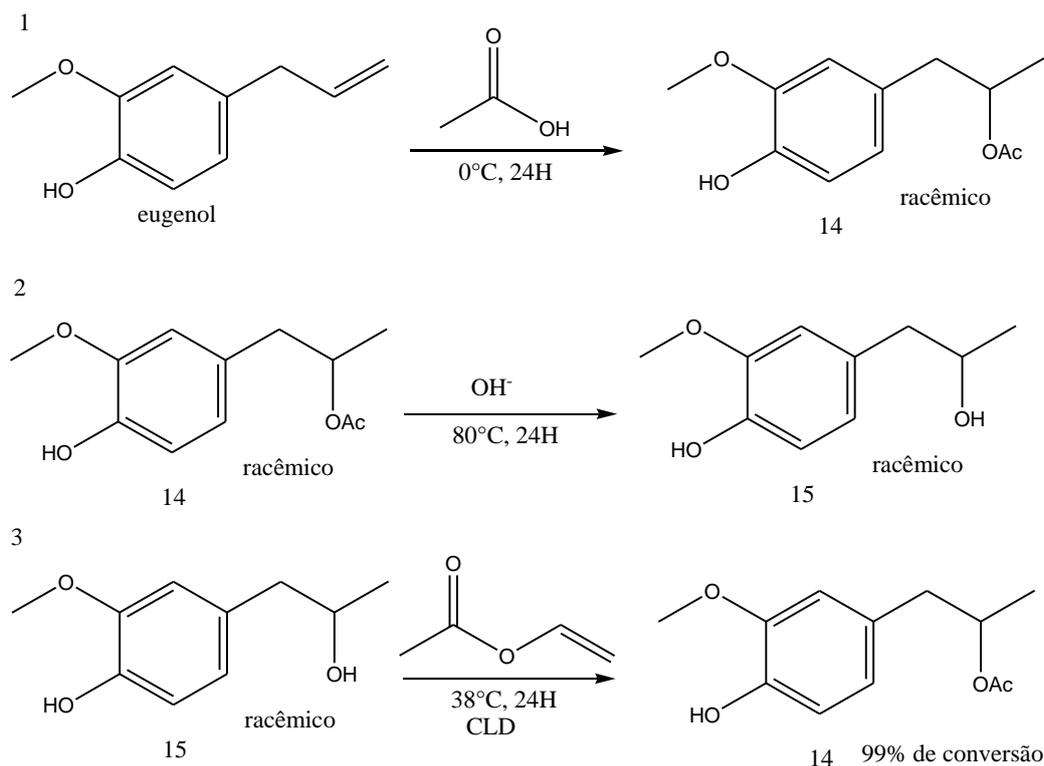


Figura 64. 1-reação de adição a ligação olefínica do eugenol; 2-reação de hidrólise em meio alcalino; 3-reação de esterificação catalisada por CLD.

O éster 14, foi caracterizado através de RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C, onde se observa no espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 65) um multipeto em torno de 5,0ppm atribuído ao hidrogênio carbinólico e um dubleto em aproximadamente 1,20ppm referente aos hidrogênio do grupo metila adjacente ao carbono carbinólico. Estes dados, associados aos 12 sinais de carbono presentes no espectro de RMN <sup>13</sup>C, dos quais 3 aparecem na região de carbonos oxigenados, assim como um sinal na região típica de absorção de carboníla de éster (170ppm), são compatíveis com a estrutura do composto 14.



Figura 65. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 14

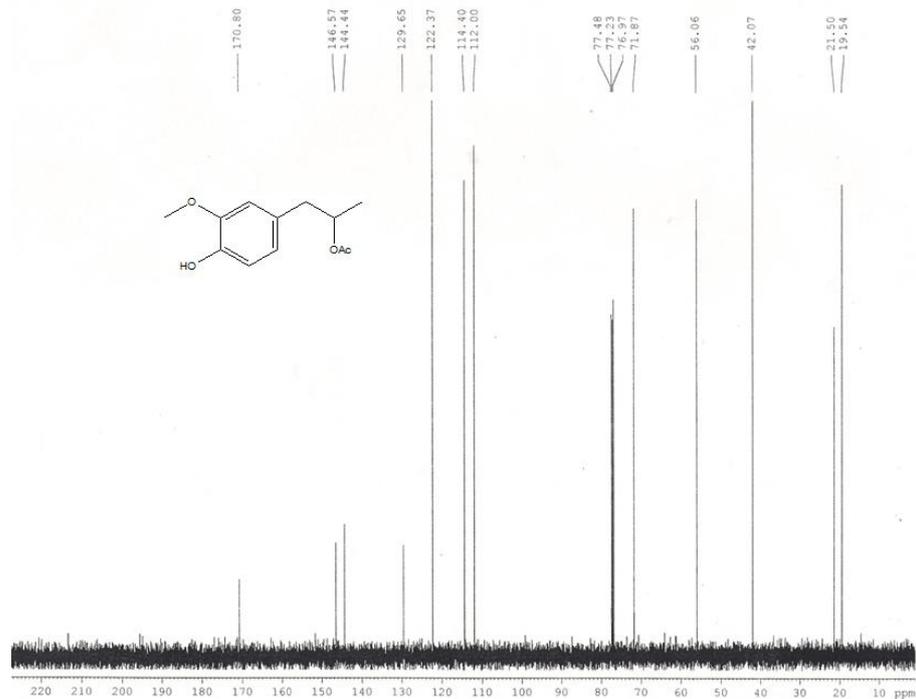


Figura 66. Espectro de RMN <sup>13</sup>C do composto 14

A verificação do potencial de catálise da cascas de diferentes *Citrus* comerciais frente a reações de esterificação foi analisado, uma vez, que fatores extrínsecos (processo de produção, transporte e armazenamento) podem influenciar na atividade enzimática. Com isso três tipo de *Citrus* (Figura 67) vendidos comercialmente (Limão, laranja e tangerina) foram submetidos ao mesmo processo de bioesterificação da CLD. As cascas da laranja, do limão e da tangerina, após passar pelo processo de extração com acetona, foram denominadas de casca da laranja comercial desidratada (CLCD), casca do limão desidratadas (CLMD) e cascas da tangerina desidratadas (CTD), respectivamente.



Figura 67. CLMD (à direita), CTD (no centro) e CLCD (à esquerda).

Com todos os *Citrus* utilizados observou-se (tabela 17) reações de esterificação enantiosseletivas com apreciável teor de conversão. Fatos estes que aumentam o espectro de aplicação destas fontes de biocatalisadores devido ao seu baixo custo e fácil acesso.

Fonte de biocatalisador	<i>ee</i> (%)	Conversão (%)	Tempo de reação (h)
 CLMD	72,98 ( <i>R</i> )	75, 70	48
 CLCD	94, 75 ( <i>R</i> )	67,44	48
 CTD	6% ( <i>R</i> )	52, 90	48

Vale ressaltar que todos os *Citrus* utilizados como fonte de biocatalisador nas reações de esterificação de 2a e 2b, produziram o enantiômero com configuração *R* em excesso. Nota-se também que apenas as CTD apresenta *ee* desprezível, as demais (CLCD e CLMD) forneceram um bom *ee*, com destaque para primeira que produziu o enantiômero *R*

com 94,75% de *ee*. O cromatograma da reação de esterificação catalisada por CLMC pode ser visualizado na Figura 68.

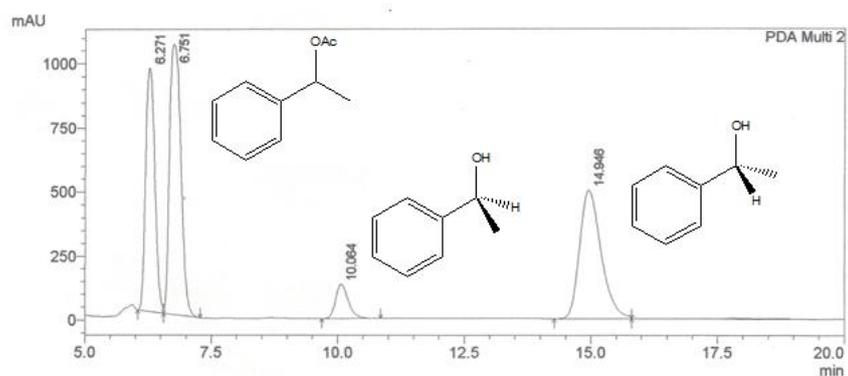


Figura 68. Reação de esterificação catalisada por CLMD

## **5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

### **5.1 Fonte do Biocatalisador**

As laranjas da terra foram coletadas no departamento de fitotecnia da Universidade Federal do Ceará (UFC)-Campus do Pici em Fortaleza-CE, no período de 09/2010 a 11/2011. As excicatas de número 50434 encontram-se depositadas no Herbário Prisco Bezerra da referida Universidade. Após a coleta das frutas, estas foram lavadas com água destilada e sua casca separada da polpa. As cascas foram posteriormente cortadas em pedaços cúbicos de aproximadamente 1cm de aresta lavadas novamente com água destilada e posteriormente colocadas durante 20min em solução de hipoclorito de sódio a 5%. Depois deste período, as cascas das laranjas foram lavadas varias vezes com água destilada, para a completa retirada do hipoclorito de sódio, e colocadas a temperatura ambiente por cerca de 2 horas para secagem. Decorrido este período as cascas foram utilizadas nas reações de redução.

### **5.2 Preparação do extrato bruto enzimático (EBEL)**

Nas reações de hidrólise foram utilizados EBEL. Este foi preparado triturando-se 20g de casca da laranja com 100 mL de água em liquidificador por 2min. Em seguida o extrato foi filtrado à vácuo e centrifugado a 3000rpm durante 20min. O sobrenadante resultante foi denominado de extrato bruto enzimático da laranja, EBEL.

### **5.3 Material utilizado**

As determinações de massas foram realizadas utilizando balança analítica Ohaus Analytical Plus.

As reações enzimáticas foram realizadas em uma mesa agitadora modelo CT-165 da fabricante CIENTEC.

Os solventes utilizados nas reações, tratamento de reações e colunas cromatográficas foram de qualidade P.A, de procedência comercial da Synth. Os reagentes: sulfato de sódio, carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), hidróxido de sódio (NaOH), sulfato cúprico ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) são de procedência VETEC.

O reagente boro-hidreto de sódio tem procedência comercial da PROSYNTH.

## **5.4 Métodos de separação e análises**

As análises necessárias para obtenção dos espectros e cromatogramas, incluindo técnicas de cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria na região do infravermelho e espectroscopia na região do UV/VIS foram realizadas na Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

### **5.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)**

Para cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatoplasmas de gel de sílica 60 ( $\Phi = 2-25\mu\text{m}$ ) sobre poliéster T-6145 provenientes da marca SIGMA CHEMICAL CO com camada de 250  $\mu\text{m}$  de espessura e dimensões de 10x5 cm. Também foram utilizadas placas de vidro revestidas com uma camada de aproximadamente 0,5 mm de espessura de sílica gel 60 ( $\Phi = 0,004-0,005\text{ mm}$ ) código 1094 da marca VETEC.

Após eluição das substâncias nas cromatoplasmas, as mesmas foram reveladas através de pulverização com solução de vanilina ( $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ , 5,0 g) e ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ , 0,75 mol/L, 100 mL) em etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$ , 100 mL) seguida de aquecimento a 100°C com pistola aquecedora da marca Steinel, modelo HL500, por aproximadamente 1 min.

### **5.4.2 Cromatografia de adsorção**

Os produtos reacionais, após extração, foram purificados em coluna cromatográfica utilizando como adsorvente gel de sílica 60 ( $\Phi = 0,025-0,020\text{mm}$ ), código 45 337, de procedência VETEC. O comprimento e diâmetro das colunas variaram de acordo com a quantidade de amostra a ser cromatografada e de sílica utilizadas. Como eluente foram usados hexano e acetato de etila de qualidade PA da marca Synth, puros ou em misturas binárias na proporção 8:2, respectivamente. A Figura 42 ilustra a realização da cromatografia em coluna.



Figura 69. Fotografia ilustrando a realização do processo de separação por cromatografia em coluna gravitacional.

### 5.4.3 Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE)

O excesso enantiomérico dos produtos de biorredução das cetonas pró-quirais e de hidrólise dos racematos foram determinados por Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), figura 43, de marca Shimadzu, com bomba L201147, equipado com coluna quiral OB-H e OD-H de dimensões 150 x 4,6 mm e detector UV-Vis Shimadzu SPD-M20A. Na análise foi utilizado como fase móvel mistura binária de Hexano/Isopropanol variando-se a composição da mesma de acordo com as necessidades da análise.

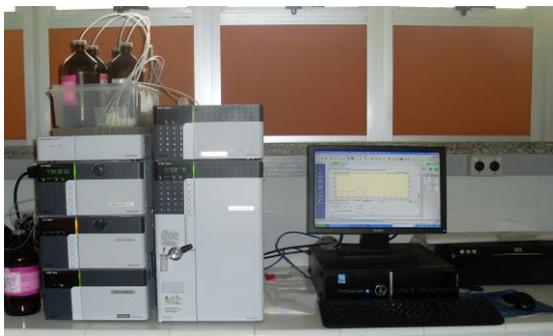
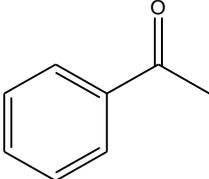
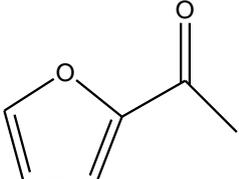
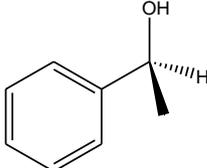
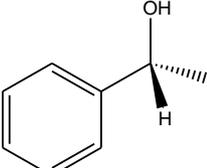
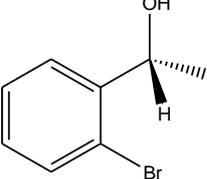
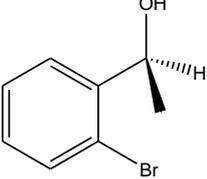
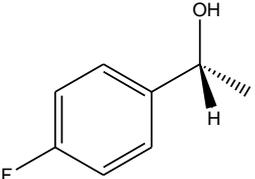
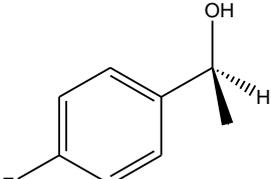
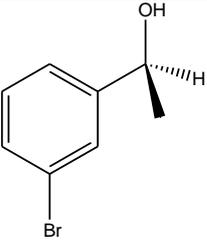
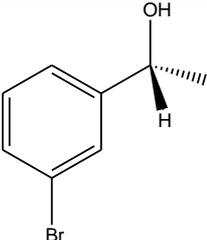
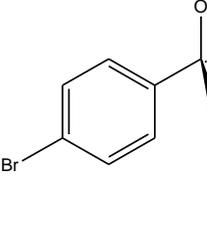
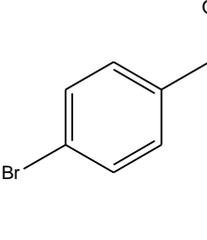
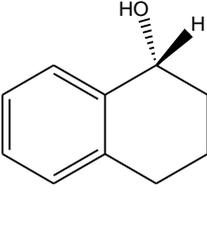
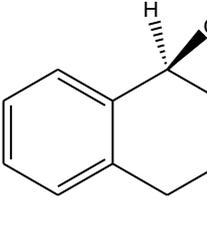
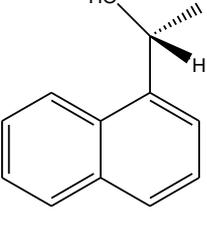
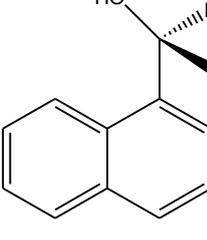
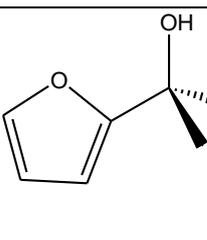
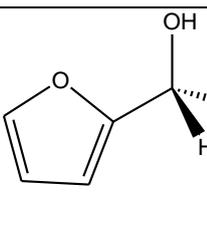
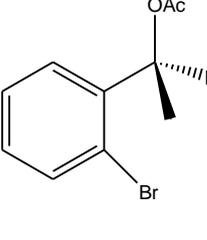
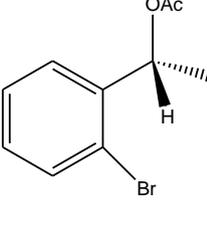


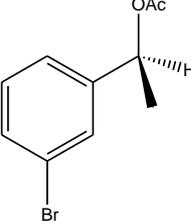
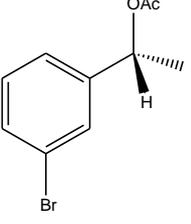
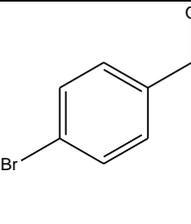
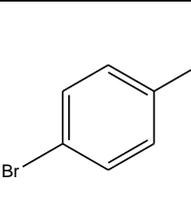
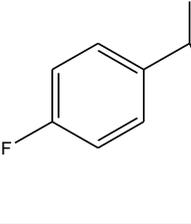
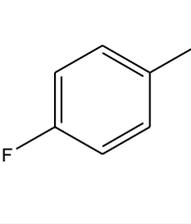
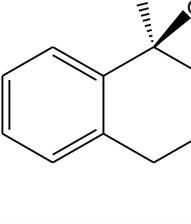
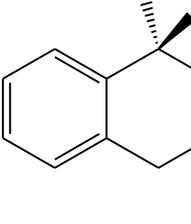
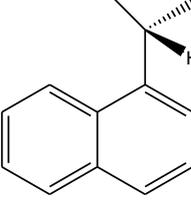
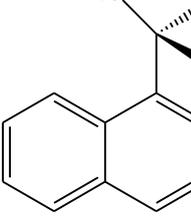
Figura 70. Fotografia do equipamento de CLAE utilizado nas análises dos *ee*.

### 5.4.3.1 Condições de separação dos substratos

As condições (fluxo, fase móvel, tempo de retenção) nas quais foi realizada a separação dos substratos

Substância	Fluxo/Fase móvel/Tempo de retenção	substância	Fluxo/Fase móvel/Tempo de retenção
	0,500mL/min H/Iso 5% $T_r = 13.00\text{min}$		0,500mL/min H/Iso 5% $T_r = 22.87\text{min}$
	0,500mL/min H/Iso 5% $T_r = 10.00\text{min}$		0,500mL/min H/Iso 5% $T_r = 14.00\text{min}$
	0,500mL/min H/Iso 5% $T_r = 7.32\text{min}$		0,500mL/min H/Iso 5% $T_r = 10.08\text{min}$
	0,500mL/min H/Iso 5% $T_r = 9.23\text{min}$		0,500mL/min H/Iso 5% $T_r = 10.21\text{min}$

	0,500mL/min H/Iso 5% T <sub>r</sub> = 10.52min		0,500mL/min H/Iso 5% T <sub>r</sub> = 14.40min
	0,500mL/min H/Iso 5% T <sub>r</sub> = 7.98min		0,500mL/min H/Iso 5% T <sub>r</sub> = 9.38min
	1.00mL/min H/Iso 25% T <sub>r</sub> = 8.26min		1.00mL/min H/Iso 25% T <sub>r</sub> = 13.63min
	0.800mL/min H/Iso 2% T <sub>r</sub> = 15.05min		0.800mL/min H/Iso 2% T <sub>r</sub> = 20.64min
	0.500mL/min H/Iso 5% T <sub>r</sub> = 11.65min		0.500mL/min H/Iso 5% T <sub>r</sub> = 12.99min
	*0.500mL/min H/Iso 5% T <sub>r</sub> = 6.33min		*0.500mL/min H/Iso 5% T <sub>r</sub> = 6.33min

	*0.800mL/min H/Iso 2% T <sub>r</sub> = 7.00min		*0.800mL/min H/Iso 2% T <sub>r</sub> = 7.00min
	0,500mL/min H/Iso 5% T <sub>r</sub> = 6.84min		0,500mL/min H/Iso 5% T <sub>r</sub> = 8.21min
	*0,800mL/min H/Iso 2% T <sub>r</sub> = 5.33min		*0,800mL/min H/Iso 2% T <sub>r</sub> = 5.33min
	0,500mL/min H/Iso 5% T <sub>r</sub> = 4.27min		0,500mL/min H/Iso 5% T <sub>r</sub> = 4.70min
	*0.500mL/min H/Iso 2% T <sub>r</sub> = 6.73min		*0.500mL/min H/Iso 2% T <sub>r</sub> = 6.73min

#### 5.4.4 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)

Os teores de conversão das biorreduções de cetonas pró-quirais e reações de hidrólises de ésteres raçêmicos foram determinados através de Cromatógrafo Gasoso CG-MS QP2010, equipado com coluna DB-1 (30 m x 0,25 mm id x 0,25 um filme), tendo Hélio como gás de arraste em um fluxo de 0,87 mL/min no modo split (ASSUNÇÃO, 2008) com as seguintes condições de análise:

**Temperatura do injetor:** 280 °C

**Temperatura do detector:** 230 °C

**Temperatura da coluna:** 100 °C, 2 °C/min até 180 °C.

#### **5.4.5 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H)**

Outra técnica utilizada para determinação do teor de conversão das biotransformações realizadas foi a Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Os espectros de RMN <sup>1</sup>H foram obtidos no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal de Ceará (CENAUREMN/UFC), utilizando-se Espectrômetros da Bruker, modelo Avance DPX –300 e modelo Avance DRX-500, que operam na frequência de 300 e 500 MHz para hidrogênio, respectivamente. A dissolução das amostras analisadas foi realizada utilizando clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>) como solvente.

#### **5.4.6 Espectroscopia de Infravermelho (IV)**

A espectrometria na região do infravermelho (IV) foi utilizada para caracterização dos alcoóis e acetatos obtidos por via química. Os espectros de IV foram obtidos utilizando espectrômetro Perkin Elmer, modelo (SPECTRUM 100) FT-IR. Nas análises foi utilizado filme de KBr para substâncias líquidas e solúveis em clorofórmio.

#### **5.4.7 Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)**

As medidas de absorbância na região do ultravioleta-visível foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro modelo Cary 50 Conc da Varian. As leituras foram realizadas no comprimento de onda determinado para cada análise, todas em triplicata.

### **5.5 Determinação do Teor de proteínas**

A determinação de proteínas dos extratos aquosos da casca da laranja foi realizada como estudo preliminar da sua utilização como biocatalisadores. As cascas foram primeiramente lavadas com solução de NaOCl 5% durante 20 minutos e, posteriormente, com água destilada. Para obtenção dos extratos utilizou-se as seguintes metodologias;

- i) **Para células integras:** 20,0 g de casca da laranja cortados em cubos de aproximadamente 1,0 cm de aresta e 50 mL de água destilada foram acondicionados em erlenmeyers de 250 mL. A mistura foi mantida sob agitação constante em mesa agitadora por 96h a 175 r.p.m. Os extratos foram filtrados e

submetidos a metodologia de determinação de proteínas solúveis, descrita na literatura por Bradford (BRADFORD, 1976).

ii) **Para o extrato bruto enzimático:** este extrato foi preparado conforme procedimento descrito no item 3.1.1 variando-se o pH da solução de extração, em valores de 5,2; 6,2; 7,2; 8,0 e água destilada. Os extratos foram filtrados a vácuo e submetidos a metodologia de determinação de proteínas solúveis descrita na literatura por Bradford (BRADFORD, 1976).

### **5.5.1 Método para determinar o teor de proteínas**

O reagente de Bradford foi preparado pela dissolução de 50mg do corante “Coomassie brilliant blue” BG-250 (fabricante: Sigma) em 25 mL de etanol seguida da adição de 50mL de ácido fosfórico 85%. Esta mistura foi transferida para um balão volumétrico de 500 mL e seu volume completado com água destilada. A solução final foi guardada em refrigerador a temperatura de aproximadamente 2°C.

Para a determinação da quantidade de proteína no extrato aquoso da casca da laranja foi adotado o seguinte procedimento: 0,1mL do extrato aquoso foi misturado a 2,5mL do reagente de Bradford e, após 2 minutos, foi realizada à leitura desta amostra em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595nm, usando BSA como padrão de proteína da curva de calibração. Este mesmo procedimento também foi empregado para a quantificação das proteínas do EBEL. Foi feito também um branco, constando este de 0,1mL de água destilada e 2,5mL do reagente de Bradford. O procedimento foi realizado em duplicata.

## **5.6 Processo Biocatalítico das reações de Bioedução**

### **5.6.1 Procedimento geral para reações de Bioredução**

Nas reações de biotransformação realizadas, usou-se a seguinte metodologia: a CLT utilizadas foram cortados em pequenos cubos com aproximadamente 1,0 cm de aresta, lavados com solução de hipoclorito de sódio 5 % por 20 minutos e em seguida com água destilada. Foram utilizados 20,0 g das cascas da laranja em erlenmeyers de 125 mL, 0,42mmol de substrato e 50 mL de água destilada (ou solução tampão). Os frascos foram lacrados e submetidos à agitação em mesa agitadora a uma velocidade de 175 r.p.m durante 72 h. Todas as reações foram realizadas em duplicata (adaptado de YADAV *et al*, 2002).

Após o período de 72h de reação os sistema reacionais foram submetidos a uma partição com diclorometano (3x30mL) e em seguida a fase orgânica foi concentrada a pressão reduzida em rotaevaporador a uma temperatura de aproximadamente 60°C (adaptado de MACHADO *et al.* 2006).

### 5.6.2 Procedimento Geral para Reações efetuadas com EBEL

Cerca de 20mL do EBEL preparado como descrito no procedimento 3.1.1 foram adicionados junto com os substratos (0,25 mmol) em elernmeyer de 50mL, em mesa rotatória a 175 rpm, em temperatura ambiente por um período de 24h. Após este período o meio foi particionado com diclorometano(3X15mL). A fase orgânica foi concentrada em rotaevaporador a pressão reduzida, a uma temperatura de aproximadamente 50°C (adaptado de ALUÍSIO, 2009).

### 5.6.3 Procedimento Geral para as reações de bioesterificação

As cascas da laranja desidratada (CLD) foram preparadas através de ralamento manual (Figura 71) seguido de extração com acetona utilizando um volume 5 vezes superior a massa de casca ralada. Posteriormente as CLD foram postas a temperatura ambiente por cerca de 2h. Em seguida cerca de 0,12mmol do álcool racêmico foi adicionado junto com 0,6mmol de acetato de vinila em 10ml de hexano, em erlenmeyer de 25ml com 2g de CLD. As reações foram conduzidas a 38°C, 225 rpm, durante 24h (adaptado de BIZERRA *et al.*, 2011).



Figura 71. Obtenção das cascas da laranja ralada para posterior extração com acetona.

#### **5.6.4 Procedimento Geral para as Reações de redução dos compostos carbonílicos por via química.**

Aproximadamente 2mmol de borohidreto de sódio foram dissolvidos em metanol P.A(15ml) e adicionados a 1mmol do substrato(cetona pró-quiral) sob agitação e banho de gelo por um período de 6h. Após este período, o meio foi acidificado com HCl (pH 5,0) e o metanol foi evaporado sob pressão reduzida, e à fase restante foram adicionados 20mL de água. Nesse meio efetuou-se uma partição com acetato de etila P.A (3x20mL). A fase orgânica, contendo o álcool, foi posteriormente concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida (adaptado de MACHADO, 2008).

#### **5.6.5 Procedimento geral para reação de acetilação por via química de alcoóis.**

1mmol do substrato (álcool), preparado de acordo com item 5.4.3, foi dissolvido junto com 3mmol de anidrido acético, em 1mL de piridina, sob agitação e a temperatura ambiente. As reações foram acompanhadas por CCD, utilizando como eluente uma mistura binária de hexano/acetato de etila 80:20, até a completa acetilação dos alcoóis. Em seguida, foram adicionados 20mL de acetato de etila P.A ao meio reacional, que foi então particionado com uma solução saturada de Sulfato de Cobre II Pentaidratado( $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )(3x20mL),  $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Logo após, a fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) (3x10mL) (adaptado de BIZERRA, 2011).

#### **5.7 Procedimento para reação de adição de ácido a ligação olefínica do eugenol.**

Inicialmente, uma mistura de ácido acético e ácido sulfúrico 2:1 (v/v) foi resfriada a aproximadamente 2°C. Em seguida, cerca de 1mL de eugenol foi adicionado lentamente a mistura ácida resfriada sob banho de gelo. A reação foi processada durante 24h. Passado o tempo de reação a mistura foi tratada com uma solução saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  até cessar o desprendimento de gás ( $\text{CO}_2$ ). Logo após, foi realizada a purificação do produto através de cromatografia em coluna utilizando sílica gel como fase estacionária.

### 5.8 Procedimento para calcular o excesso enantiomérico (*ee*)

Para análise do excesso enantiomérico dos produtos obtidos a partir da biorredução de cetonas pró-quirais, e hidrólise de acetatos racêmicos, alíquotas da mistura reacional foram analisadas em HPLC com coluna quiral OB-H e as áreas dos picos referentes aos respectivos alcoóis foram comparadas segundo a equação abaixo (BIZERRA, 2011).

$$ee (\%) = \frac{A-a}{A+a} \times 100$$

A- área do enantiômero em maior quantidade  
a- área do enantiômero em menor quantidade  
*ee*- excesso enantiomérico

## 6. CONCLUSÕES

O uso das cascas da laranja como fonte de biocatalisador revelou resultados bastante promissores, demonstrando capacidade catalítica para várias reações (redução/oxidação, hidrólise/esterificação), através de metodologias simples e de baixo custo. Conversões de 46,90-96,70% foram alcançadas nas reações de biorredução acompanhado de *ee* variando de 21,15-99%. Nas reações de hidrólise verificaram-se taxas de conversões de 19,20-80,82% e *ee* variando de 9,6-45,52%. Já nas reações de esterificação, *ee* acima de 99% foram observados e conversões maiores que 80% foram alcançadas.

Apesar de as reações de hidrólise de ésteres não ter resultado em altos teores de conversões e *ee*, provavelmente devido à baixa solubilidade dos ésteres em meio aquoso, a verificação de reações hidrolíticas catalisadas pelo extrato bruto enzimático da laranja (EBEL) possibilitou o desenvolvimento de metodologias para realização da reação reversa, a esterificação, uma vez que, as enzimas que catalisam as reações de hidrólises são as mesmas que catalisam as reações de esterificações.

As reações de esterificação catalisadas pelas cascas da laranja desidratada (CLD), conduzidas em meio orgânico demonstraram o potencial deste subproduto na catálise assimétrica, através do uso de metodologia de baixo custo (uma vez que, faz uso da própria rede tridimensional de polímeros estruturais constituintes da casca: celulose, hemicelulose e pectina como um suporte de imobilização natural) em reações realizadas em solventes apolares, pois, estes polímeros são insolúveis nestes, minimizando com isso os custos operacionais e financeiros atrelados aos processos de imobilização com outros suportes (alginato de cálcio, quitosana) que possuem muitas vezes custos elevados e técnicas laboriosas. Ainda, como as enzimas permanecem no seu “habitat” natural a perda de atividade catalítica devido aos processos de imobilização é praticamente eliminada.

O uso de metodologia que permite realizar catálises de reações de esterificação enantiosseletivas utilizando a rede de polímeros natural constituintes dos vegetais como um suporte de imobilização enzimática em processos conduzidos em meio orgânico abre precedentes para uma ampla faixa de aplicações dos mesmos em biotecnologia, pois pode trazer consigo características bastante almejadas pelas indústrias, que são; baixo custo financeiro, simplicidade operacional e eficiência. Vale ressaltar ainda que apesar da extensa

literatura tratando de processos biocatalíticos nos chamados ambientes aquo-restritos, ou seja, solventes orgânicos, os trabalhos publicados referindo-se a aplicação de enzimas vegetais em sínteses assimétricas, nestes sistemas, não são muito numerosos e, em se tratando da utilização de células íntegras vegetais em meio orgânico são raros.

O uso de citrus comercial na catálise de reações de esterificação nas condições otimizadas para as CLD demonstram uma relevante estabilidade de suas hidrolases mesmo diante de intempéries (colheita, transporte e armazenamento) pelas quais passam antes de chegar ao consumidor final. Fato embasado pela verificação de que praticamente nenhum decréscimo no *ee* ou na conversão foi observado nas reações quando utilizado CLD após 30 dias de armazenamento.

Portanto, este estudo abre precedentes para uma ampla faixa de aplicação desta fonte de biocatalisador (cascas da laranja), que atualmente é considerado como um rejeito industrial, contribuindo sobremaneira para agregar valor a todo um setor produtivo e industrial no qual o Brasil é líder, a indústria de suco de laranja.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABECITRUS, História da Laranja e Subprodutos da Laranja, agenda 2015.  
<http://www.abecitrus.com.br>
- ADLERCREUTZ, P., “**Modes of using enzymes in organic media**” In: **Enzymatic reactions in organic media**, Eds: Koskinen e Klibanov, Ed.Blackie academic & professional, Great Britain, 1996.
- AITKEN, R. A.; GOPAL, J.; **Asymmetric Synthesis**; Aitken, R. A.; Kilényi, S. N.; Editors, Blackie Academic & Professional, London cap 4, 1994.
- AKPATA M.I.; AKUBOR, P.I. **Chemical composition and selected functional Properties of sweet orange (*Citrus sinensis*) seed flour**. Plant Foods for Human Nutrition. v. 54, n. 4, p. 353-362, 1999.
- ALUÍSIO M. FONSECA.; FRANCISCO JOSÉ Q. MONTE.; MARIA da C. F. de OLIVEIRA.; MARCOS C. de MATTOS.; GEOFFRY A. CORDELL.; RAIMUNDO B. FILHO.; TELMA L.G. LEMOS. **Coconut water (*Cocos nucifera L.*)- A new biocatalyst system for organic synthesis**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 57, 78-82p. 2009 .
- ASSUNÇÃO, J. C. C.; MACHADO, L. L.; LEMOS, T. L. G.; CORDEL, G. A.; MONTE, F. J. Q. **Sugar Cane for the bioreduction of carbonyl compounds**. Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic, v. 52, p. 194-198, 2008.
- BARON, A.M., “**Biocatálise em ambientes aquo-restrictos:comparação de diferentes sistemas reacionais**”, tese de mestrado, Programa de Pós-Graduação da Universidade federal do Paraná, Curitiba, 2003.
- BENJAMIN, S., PANDEY,A., "Review - **Candida rugosa lipases: molecular biology and versatility in biotechnology**", Yeast, v. 14, pp. 1069-1087, 1998.
- BEVILAQUA J. VAZ. **Estudo da catálise enzimática em meio orgânico para a produção de protótipo de fármaco antiasmático**. Tese de Doutorado. Programas de pós-graduação de engenharia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2005.

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

BIZERRA, A. M. C.; GONZALO, G.; LAVANDERA, I.; FERNÁNDEZ, V. G. MATTOS, M. C.; OLIVEIRA, M. C.F.; LEMOS, T. L. G.; GOTOR, V.; MONTENEGRO, T. G. C. **Enzymatic regioselective production of chloramphenicol esters.** *Tetrahedron*, 67, 2858-2862, 2011

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A.; **Introdução à Química de Alimentos;** Varela; São Paulo, 1989, pp. 109.

BOMMARIUS, A.S.; SCHWARM,M.;DRAUZ,K. **Biocatalysis to aminoacids chiralpharmaceuticals:** Examples and perspectives. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*,5(1-4):1-11, 1998.

BORNSCHEUER, U.T. **Microbial carboxyl esterases classification, properties and application in biocatalysis.** *Federation of European Microbiological Societies. Rev.*, 733, 1-9, 2002.

BRADFORD, M. M. **Analytical Biochemistry.**72, 248, 1976.

CAVALCANTE, Í. H. L.; OLIVEIRA, I. V. M.; BECKMANN-CAVALCANTE, M. Z.; MARTINS, A. B. G. **Substrate for seedling emergence of white sapote in Brazil.** *The Americas Journal of Plant Science and Biotechnology*, London, v. 2, n. 2, p. 47-50, 2008.

CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. Ap.; MARASSI, M.; SILVA, D. M.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R. **Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas.** *Química Nova*, V. 28, No. 4, 614-621, 2005

CERNIA, E., PALOCCI, C., **“Lipases in supercritical fluids”** *Methods of Enzymology.* v. 286 part B, pp.495-508, 1997.

CHAMBERS, H.F. **Antibióticos beta-lactâmicos & outros inibidores da síntese da parede celular**. In: KATZUNG, B.G. (Ed.) *Farmacologia: Básica & Clínica*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 1054 p., cap. 43, p. 656-673.

COELHO, F.A.S. **Fármacos e quiralidade**. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, n. 03, p. 23-32, 2001.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D., **Tecnologia enzimática**- Rio de Janeiro: FAPERJ; Petrópolis, RJ: EPUB, p. 264, 2008.

COMPTON, S. J.; JONES, C. G.; *Anal. Biochem.* **1985**, *151*, 369.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 3.ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2000.

D'SOUZA, S.F. **immobilized enzymes in bioprocess**. *Curr. Sci.* 77(1):69-79, 1999.

DASTOLI, F.R., MUSTO, N.A, PRICE, S. “**Reactivity of active sites of chymotrypsin suspended in organic medium**” *Archives of Biochemistry and Biophysics* ., v. **115**, pp. **44-47**, 1966.

DEVLIN, T. M.; **Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations**; John Wiley & Sons; New, 1997, pp. 127.

DIXON, M.; Webb, E. C.; *Enzymes*; Academic Press; New York, 1979.

ELBA P. S. BON.;MARIA A. FERRARA.; MARIA L. CORVO. **Enzimas em biotecnologia produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: intercência: UFRJ: CAPES: FAPERJ: FCT(Portugal). 2008.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**, 4<sup>a</sup> ed.; Editora Springer-Verlag, Berlin, 2000.

FASSIHI, A. R.; *International Journal of Pharmaceutics* , 92, 1. 1993.

FDA- Food and drug administration. Development of Stereoisomeric Drugs. <http://www.fda.gov/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm122883.htm>(acessado em 02/2009).

FREIRE, D.M.G. “**Imobilização de amiloglicosidase em quitina – caracterização e testes em reatores contínuos de leito expandido**”, Tese de Mestrado, EQ/UFRJ, Rio de Janeiro, 1988.

GAVA, A. J.; **Princípios de Tecnologia de Alimentos**; Nobel; São Paulo, 1988, pp. 95.

GIRI, A.; DHINGRA, V.; GIRI, C. C.; SINGH, A.; WARD, O. P.; NARASU, M. L. **Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and futures prospects**. *Biotechnology advances*, v. 19, p. 175-199, 2001.

GIULLIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M. G. L.; DENBERG, C. V. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Revista Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 52-61, 2005.

GRUBER, C. C.; LAVANDERA, I.; FABER, K.; KROUTIL, W. **From racemate to a single enantiomer: Deracemization by stereoinversion**. *Advanced Synthesis & Catalysis*. 2006, 348, 1789-1805.

GUISÁN, J.M., SABUQUILLO, P., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., FERNANDEZ-LORENTE, G., et al., “**Preparation of new lipases derivatives with high activity-stability in anhydrous media: adsorption on hydrophobic supports plus hydrophilization with polyethylemine**”, *Journal of molecular Catalysis B: enzymatic*, v. 11, pp. 817-824, 2001.

GUPTA, M.N., “**Enzyme function in organic solvents**”, *Eur. J. Biochem.* , v. 203, pp. 25-32, 1992.

ILLANES, A. “**Biotechnologia de enzimas**“, Ediciones Universitarias de Valparaíso, Chile, 1994.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; HERTZ, M. T. **Bacterial biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases**. *Annual Review of Microbiology.*, 53, 315-351, 1999.

JANK, M.; NEVES, M. **Perspectivas da cadeia produtiva da laranja no Brasil: a agenda 2015**. 2006. *Agenda\_Citrus\_PENSAICONE.pdf*>. Acesso em: maio 2010. Disponível em: <http://www.fundacaofia.com.br/pensa/downloads/>.

JÚNIOR, M. R. M.; PASTOR, G. M. **Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólica.** Química Nova, Vol. 30, No. 2, 382-387, 2007.

KADNIKOVA, E. N.; THAKOR, V. A. **Enantioselective hydrolysis of 1-arylallyl acetates catalyzed by *Candida antarctica* lipase.** Tetrahedron: Asymmetry, v. 19, p. 1053-1058, 2008.

KLIBANOV, A.M. **“Asymetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents”**, Accounts of Chemical Research ., v. 23, pp.114-120, 1989.

KLIBANOV, A.M. **“Enzymes work in organic solvents”**, Chemtech, v.16, pp. 354-359, 1986.

KAZLAUSKAS, R. J. **Molecular modeling and biocatalysis: explanations, predictions, limitations and opportunities.** Current opinion in chemical biology, 4, 81-88, 2000.

LANGONE, M.” **Síntese de triglicerídeos utilizando lipase”**, Tese de Doutorado, Coordenação dos Programas de Pós-Graduação em Engenharia (COPPE) / Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1998.

Lehninger, A. L.; **Princípios de Bioquímica**; Sarvier; São Paulo, 1986, p154.

LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W., **“Biotecnologia Industrial”**, v. 1, 1ª ed., 2001.

LIMA, L.M., **“Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos candidatos a fármacos de agentes antiinflatórios e antiasmáticos”**, D.Sc. dissertation, IQ/UFRJ, Rio de Janeiro, 2001.

LORTIE, R. **Enzyme catalyzed esterification.** Biotechnology Advances, v. 15, n. 1, p. 1-15, 1997.

LUZIA, D. M. M. L.; JORGE, N. **Atividade antioxidante do extrato de sementes de limão (*Citrus limon*) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada.** Química Nova, v.32, n.4 p. 1-4, 2009.

MACHADO, L. L.; MONTE, F. Q.; DE OLIVEIRA, M. F.; DE MATTOS, M. C.; GOTOR-FERNANDEZ, V.; DE GONZALO, G.; GOTOR, V. LEMOS. T. L. G. **Bioreduction of aromatic aldehydes and ketones by fruits' barks of *Passiflora edulis***. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 54, p. 130-133, 2008.

MEDEIROS, S.F. **Biotransformação de derivados de artemisinina com ação antimalárica por *Mucor ramannianus***. 2002. 138 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.

NIELSEN, J. E.; CHRISTENSEN, T. M. I. E. **Distribution of pectin methyl esterase and acetyl esterase in the genus *Citrus* visualized by tissue prints and chromatography**. Plant Science 162, 799-807, 2002.

NORMAN L. ALLINGER.; MICHAEL P. CAVA.; DON. de JONGH.; CARL R. JOHNSON.; CALVIN L. STEVENS. **Química Orgânica**. Editor Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, RJ. 687p 1978.

OLIVEIRA, D., “**Estudo comparativo da produção enzimática de ésteres a partir de óleos vegetais em solventes orgânicos e CO<sub>2</sub> supercrítico**”, Tese de Doutorado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, 1999.

OLIVEIRA, M. A. **Resolução Enzimática de Alcoóis Secundário**. Dissertação (Mestrado em Química)- Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná. 2007.

OLSON, E.R; RATZKIN, B. **pharmaceutical biotechnology**. Curr. Opin. Biotechnol., 10(6):525-527, 1999.

PALMER, T.; **Understanding Enzymes**; John Wiley & Sons; New York, 1985.

PANKE, S.; HELD, M.; WOBOLTS, M. **Trends and innovations in industrial biocatalysis for the production of fine chemical**. Current Opinion in Biotechnology, v. 15, p. 272-279, 2004.

PANKE,S.; WUBOLTS,M.G. **Enzyme technology and bioprocess engineering**. Curr.Opn. biotechnol., 13(2): 111-116, 2002.

PINHEIRO, S.; FERREIRA, V.F. **Abordagens em síntese assimétrica**. Química Nova, v. 21, n. 3, p. 312-318, 1998.

PRELOG, V. **This rule has also been extended to reductions catalyzed by baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae***. Pure and Applied Chemistry. 9,109 -130, 1964.

QUEIROZ, N. **Síntese enantiosseletiva de amidas e ésteres catalisada por lípases**. 132 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Curso de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

RIBEIRO, C.M.R.; PASSAROTO, E.N.; BRENELLI, E.C.S. **Ultrasound in enzymatic resolution of ethyl 3-hydroxy-3-phenylpropanoate**. Tetrahedron Letters, v. 42, n. 37, p. 6477-6479, 2001.

RIVAS, B.;TORRADO, A.;TORRES,P.;CONVERTI, A.;DOMINGUÉX, J.M. **Submerged Citric Acid Fermentation on Orange Peel Autohydrolysate**. Journal of Agricultural and Food Chemistry.56. 2008.

SANTANIELLO, E.; FERRABOSCHI, P.; GRISENTI, P.; MANZOCCHI, A. **The biocatalytic approach to the preparation of enantiomerically pure chiral building blocks**. Chemical Reviews, v. 92, n. 5, p. 1071-1140, 1992.

SÁNCHEZ, A., VALERO, F., LAFUENTE, J., SOLÁ, C., “**Highly enantioselective esterification of racemic ibuprofen in a packed bed reactor using immobilised *Rhizomucor miehei* lipase**”, Enzyme and Microbial Technology, v. 27, pp. 157-166, 2000.

SILVA Jr., I. J.; BARRETO Jr., A. G.; SANTANA, C. C. **Separação cromatográfica quiral de anestésicos a partir de soluções diluídas e concentradas em escala preparativa**. Química Nova, v. 32, n. 2, p. 359-364, 2009.

STINSON, S. **ACS Award for Creative Research in Homogeneous or Heterogeneous Catalysis**. Chemical & Engineering News. 79, 34-35, 2001.

STRYER, L. **Enzymes: basic concepts and kinetics**. In: Biochemistry. 4 ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1995. 1064 p. pt. 2, cap. 8, p.181-206.

STRYER, L.; **Biochemistry**; W. H. Freeman and Company, New York, 1995, pp. 181.

THALL, E. **Drug Stereochemistry: Analytical methods and pharmacology**. Journal of Chemical Education .73, 481, 1996.

TISCHER, W., KASCHE, V., "**Immobilized enzymes: crystal or carriers?**", **Trends in Biotechnology**, v. 17, pp. 326-335, 1999.

TORRES, B.B. Elementos de enzimologia. In: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial: Fundamentos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 4 v. v. 1, cap. 5, p.151-176.

STRAUSS, U. T.; FELFER, U.; FABER, K. **Biocatalytic transformation of racemates into chiral building blocks in 100% chemical yield and 100% enantiomeric excess**. Tetrahedron: Assymetry, 10, 107-117,1999.

VILELA, E. S. D.; SGARBIERI, V. C.; ALVIM, I. D. **Determinação do valor protéico de células íntegras, autolisado total e extrato de levedura (*Saccharomyces Sp.*)**. Revista de Nutrição, v. 13, n. 3, p. 185-192, 2000.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M.J. **Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.

VOET, D.; VOET, J. G.; **Biochemistry**; John Wiley & Sons; New York, pp. 332, 1995.

WHITAKER, J. R.; **Principles of Enzymology for the Food Sciences**; Marcel Dekker; New York, 1972.

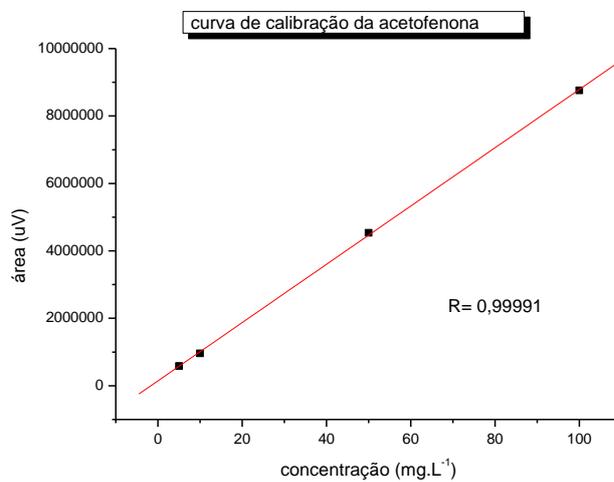
YADAV, J.S.; S. NANDA, P. THIRUPATHI REDDY,; A. BHASKAR RAO. **Efficient enantioselective reduction of ketones with *Caucus carota* Root**. The Journal of Organic Chemistry. **67, 3900-3903. 2002.**

ZAKS, A. "**New enzymatic properties in organic media**" In: **Enzymatic reactions in organic media**, Eds: Koskinen e Klivanov, Ed.Blackie academic & professional, Great Britain, 1996.

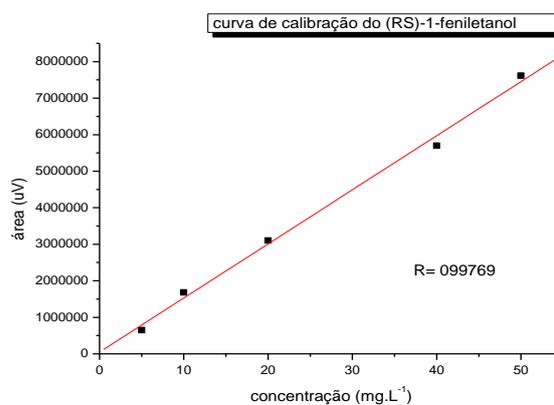
ZAKS, A. **“New enzymatic properties in organic media”** In: **Enzymatic reactions in organic media**, Eds: Koskinen e Klibanov, Ed.Blackie academic & professional, Great Britain, 1996.

ZAKS, A.; DODDS, D.R. **Application of biocatalysis and biotransformations to the synthesis of pharmaceuticals**. Drug Discovery Today, v. 2, n. 12, p. 513-531, 1997.

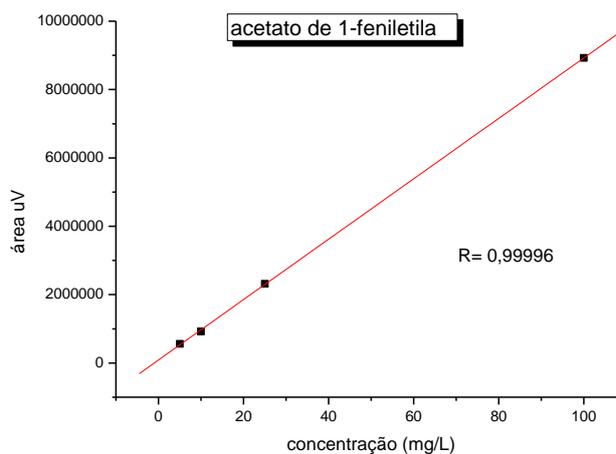
## APÊNDICES



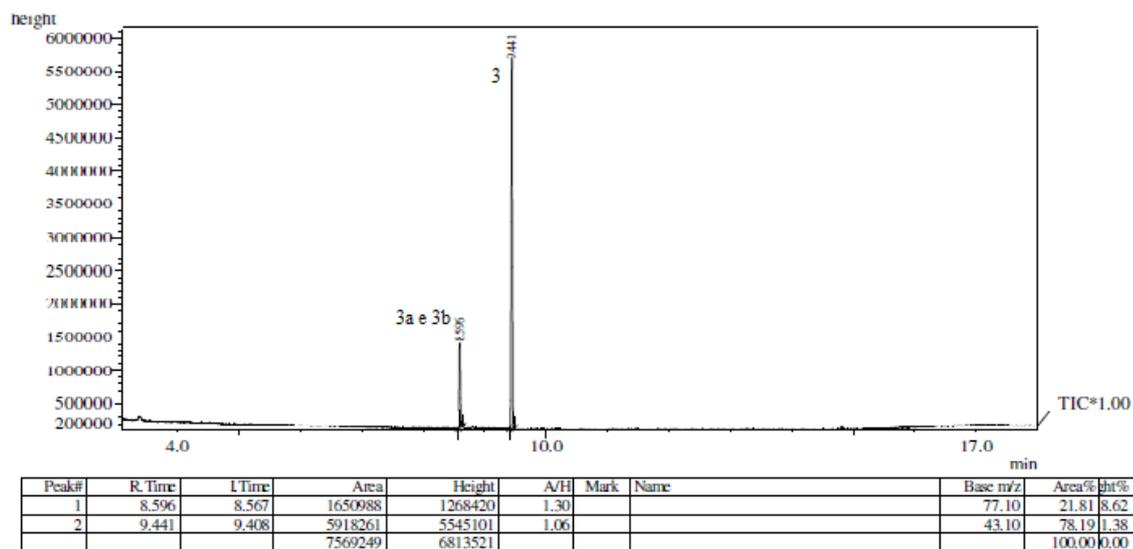
Apêndice A. Curva de calibração da acetofenona.



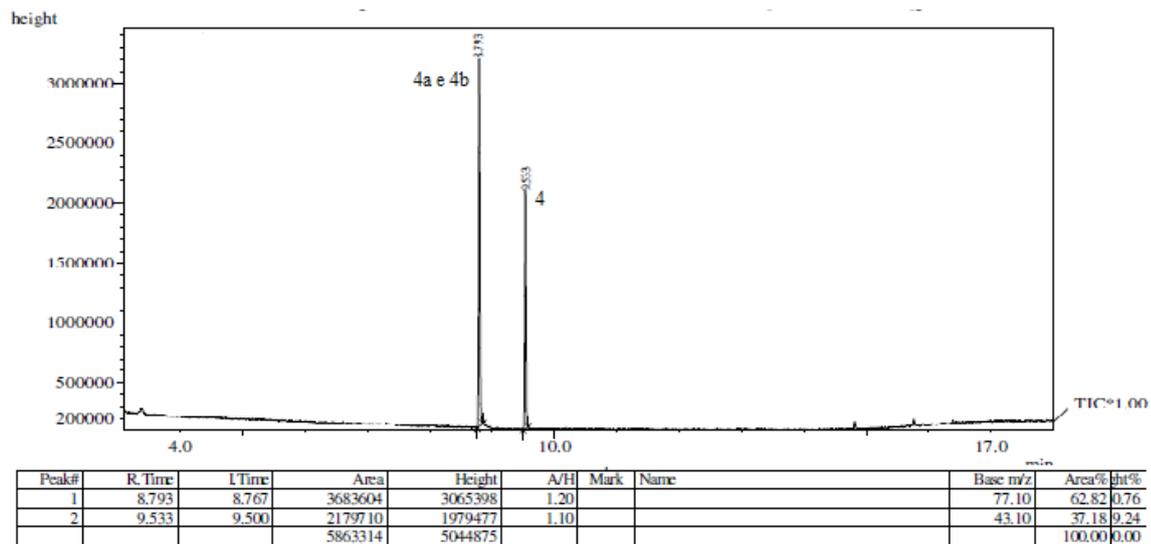
Apêndice B. Curva de calibração do (RS)-1-feniletanol.



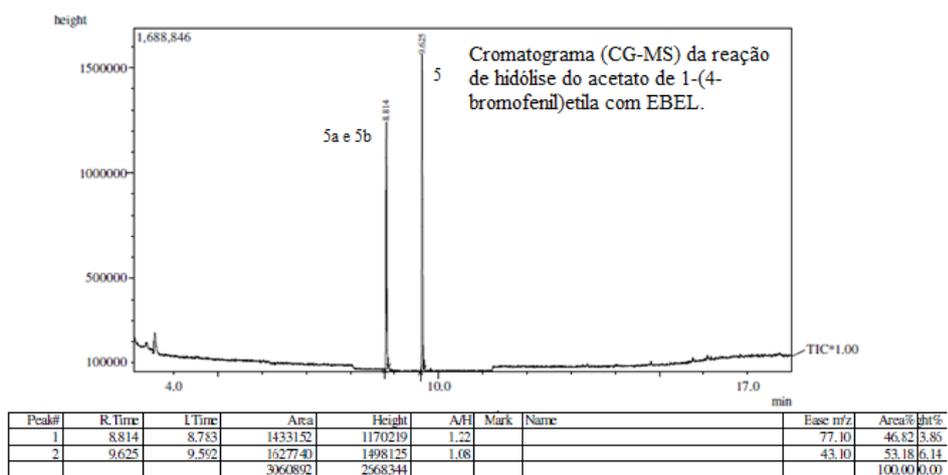
Apêndice C. Curva de calibração do (RS) acetato de 1-feniletila.



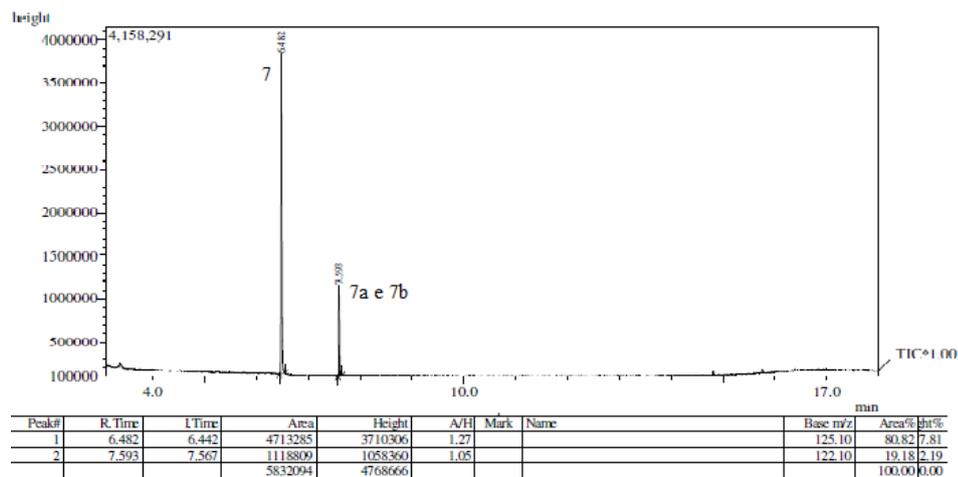
Apêndice D. Cromatograma (CG-MS) da reação de hidrólise do acetato de 1-(2-bromofenil)etila com EBEL.



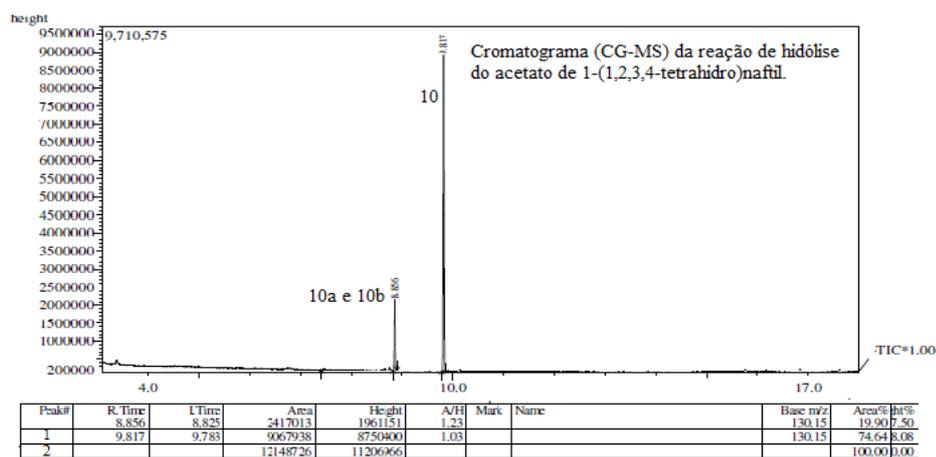
Apêndice E. Cromatograma (CG-MS) da reação de hidrólise do acetato de 1-(3-bromofenil)etila com EBEL.



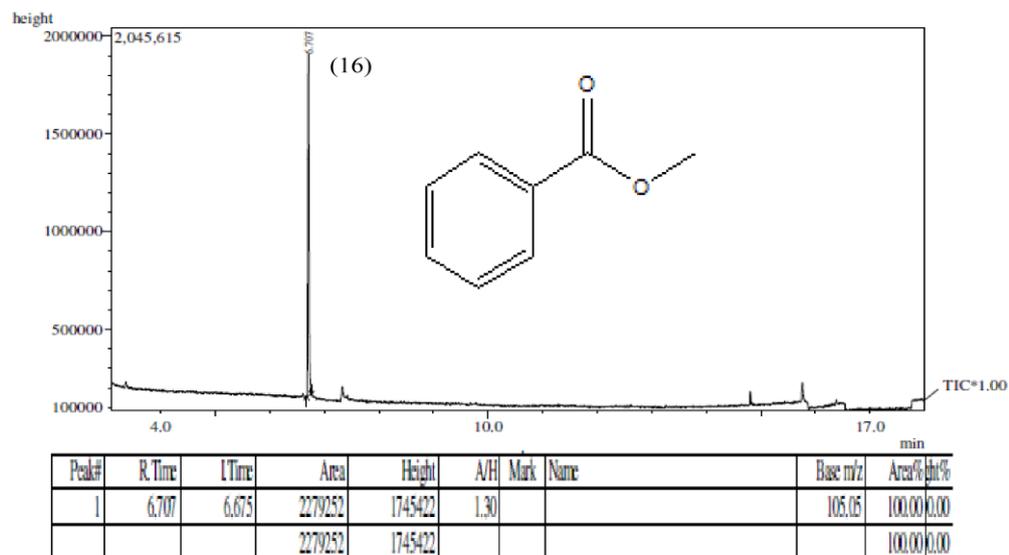
Apêndice F. Cromatograma (CG-MS) da reação de hidrólise do acetato de 1-(4-bromofenil)etila com EBEL.



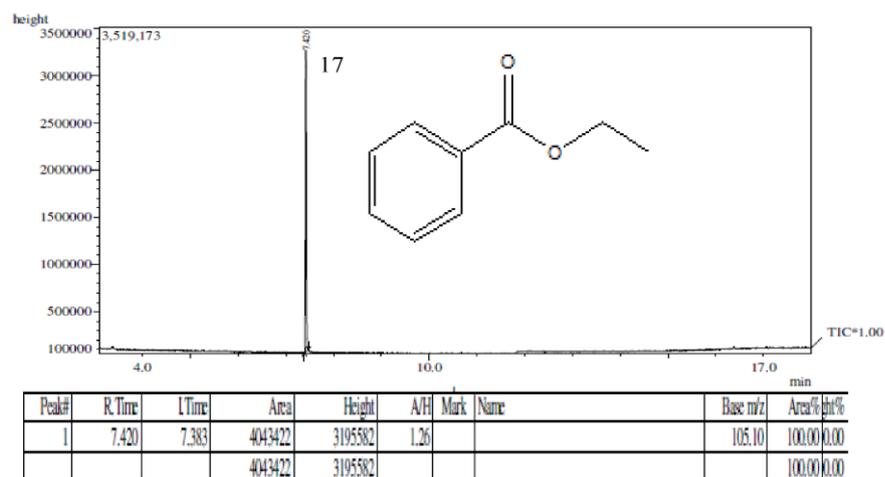
Apêndice G. Cromatograma (CG-MS) da reação de hidrólise do acetato de 1-(4-fluorofenil)etila com EBEL.



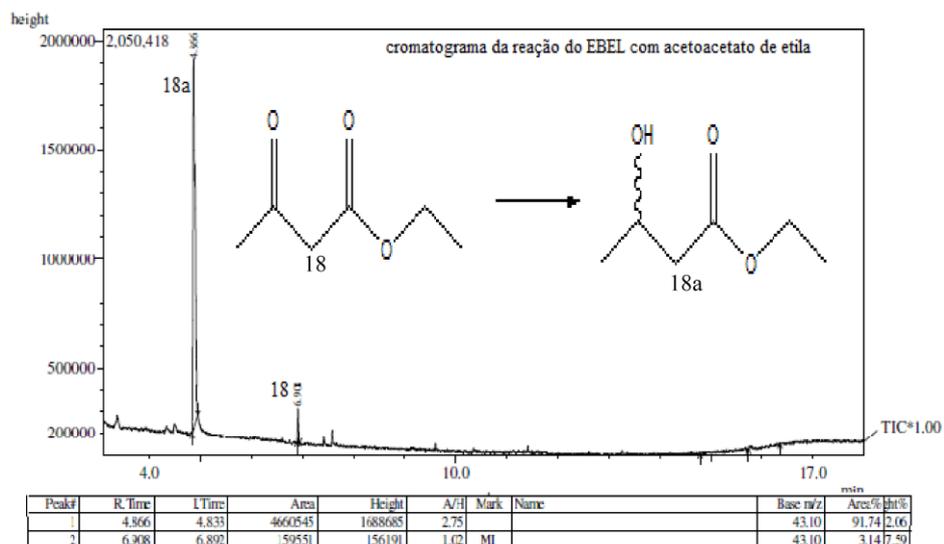
Apêndice H. Cromatograma (CG-MS) da reação de hidrólise do acetato de 1-(1,2,3,4-tetrahidro)naftil.



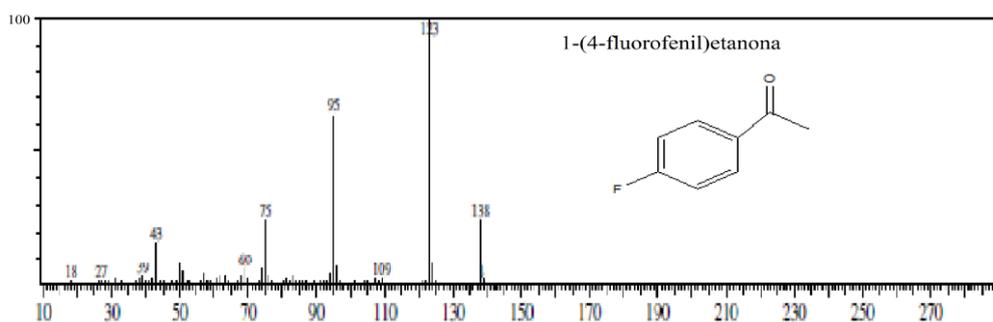
Apêndice I. Cromatograma (CG-MS) da reação de hidrólise do benzoato de metila.



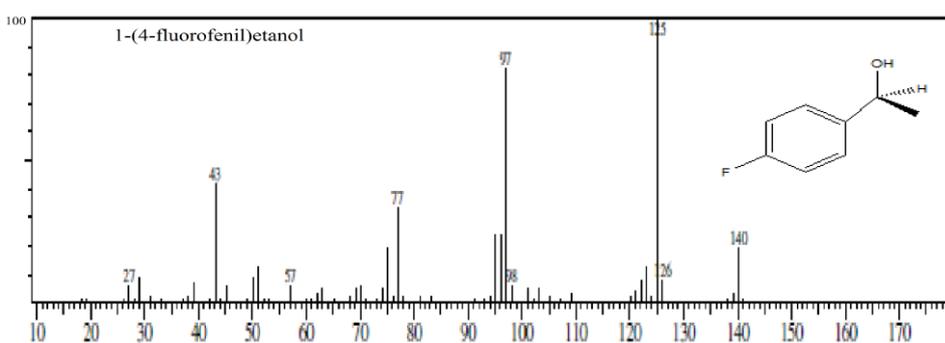
Apêndice J. Cromatograma (CG-MS) da reação de hidrólise do benzoato de etila.



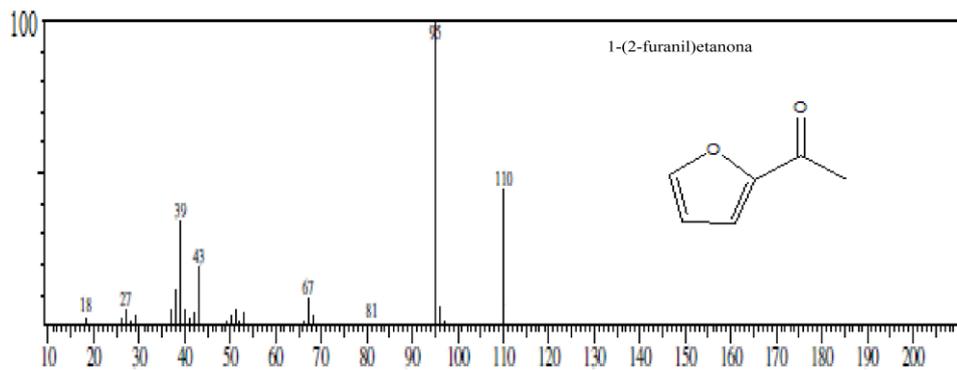
Apêndice K. Cromatograma CG-MS da reação do EBEL com acetoacetato de etila.



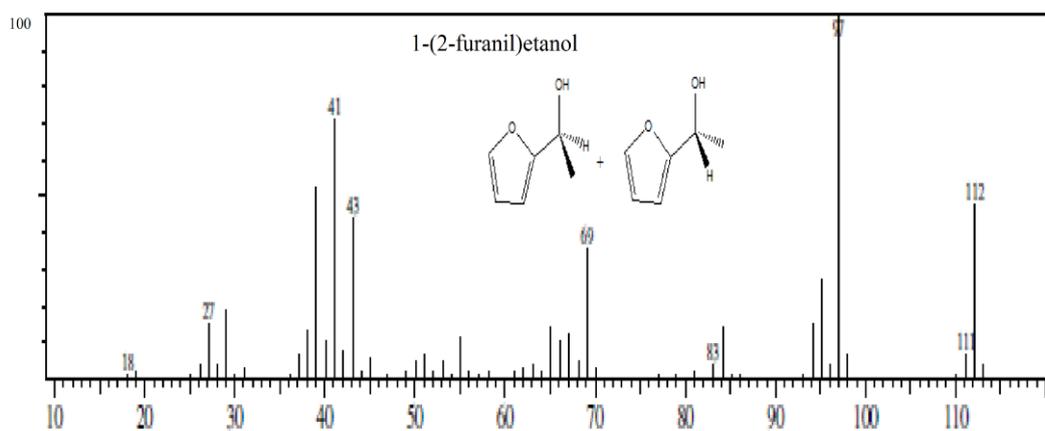
Apêndice L. Espectro de massa (IE) do 1-(4-fluorofenil)etanol.



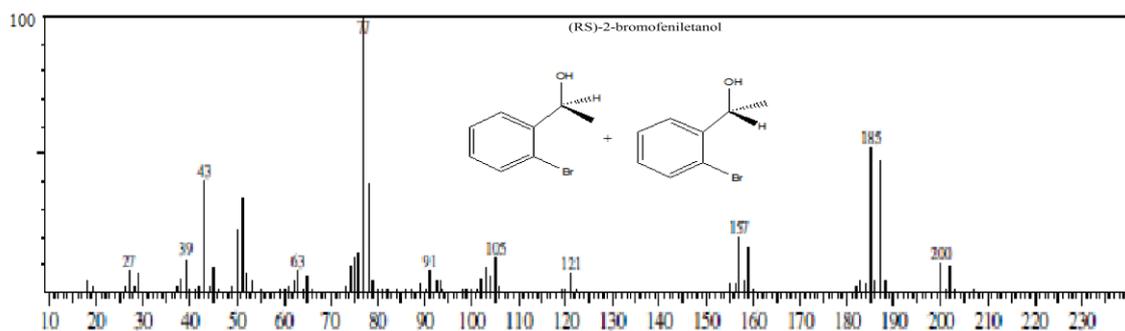
Apêndice M. Espectro de massa (IE) do 1-(4-fluorofenil)etanol.



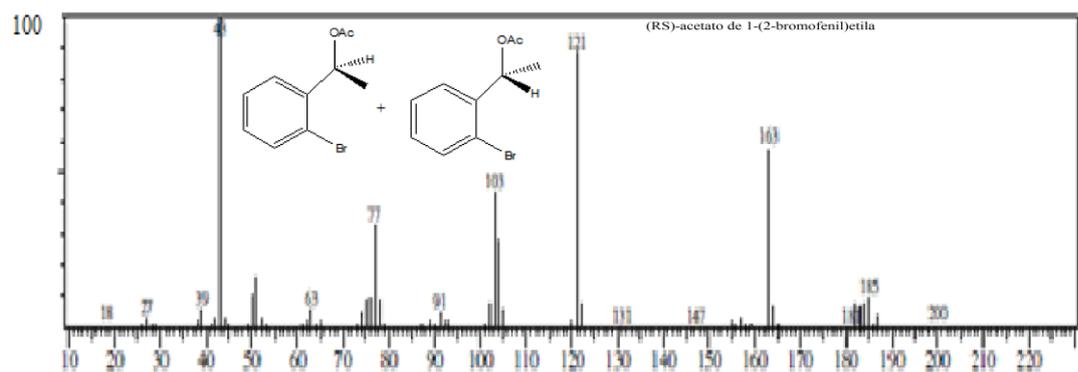
Apêndice N. Espectro de massa (IE) do 1-(2-furanyl)etanona (12)



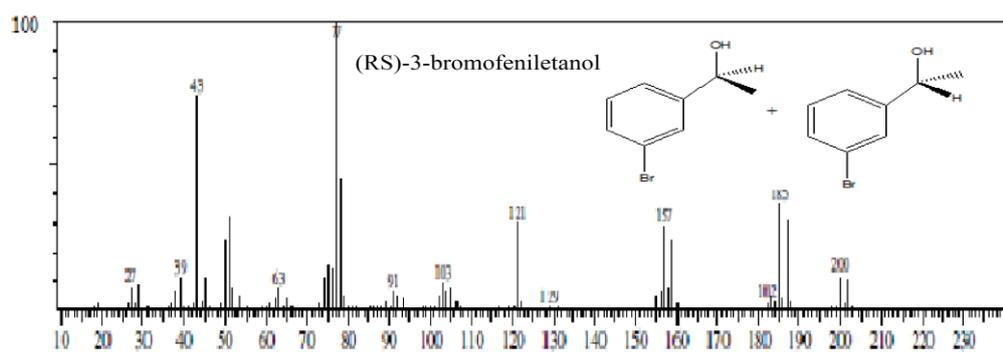
Apêndice O. Espectro de massa (IE) do 1-(2-furanyl)etanol.



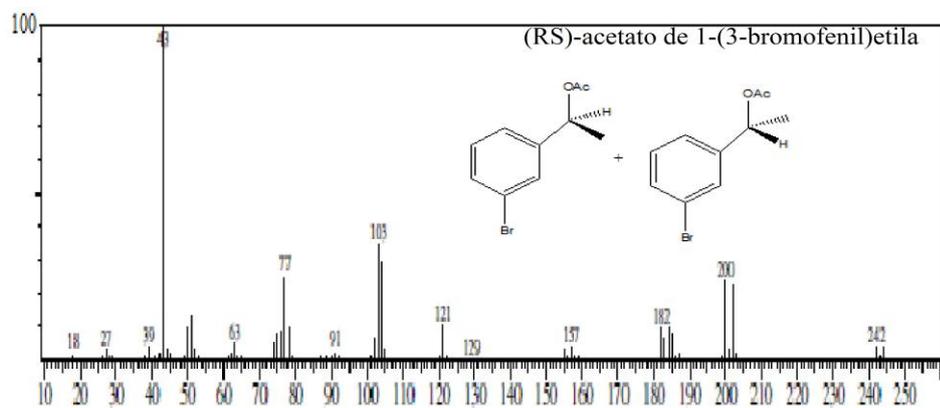
Apêndice P. Espectro de massa (IE) do 2-bromofeniletanol



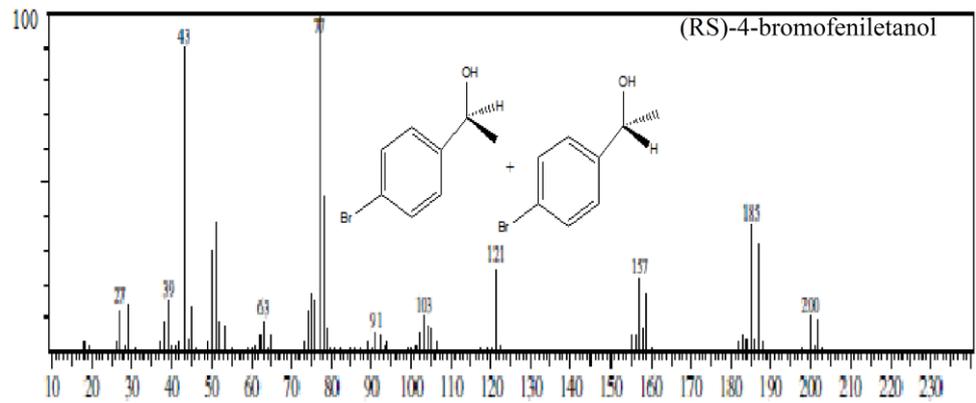
Apêndice Q. Espectro de massa (IE) do acetato de 1-(2-bromofenil)etila



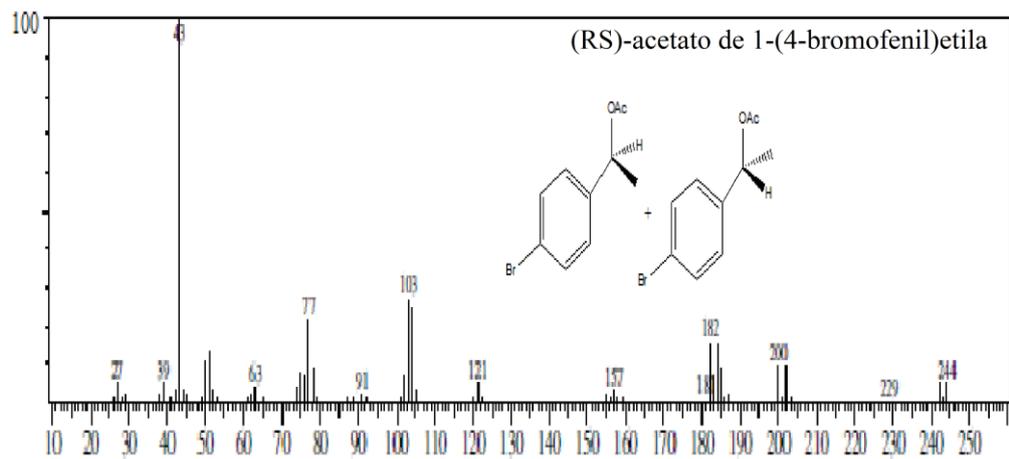
Apêndice R. Espectro de massa (IE) do (RS)-3-bromofeniletanol.



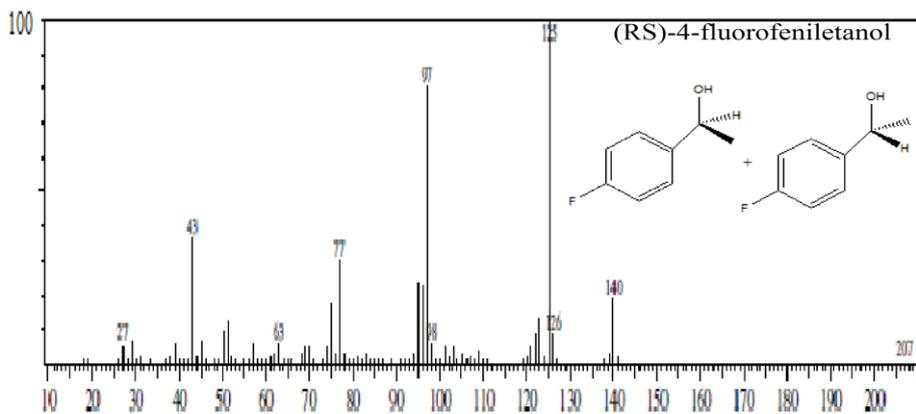
Apêndice S. Espectro de massa (IE) do (RS)-acetato de 1-(3-bromofenil)etila



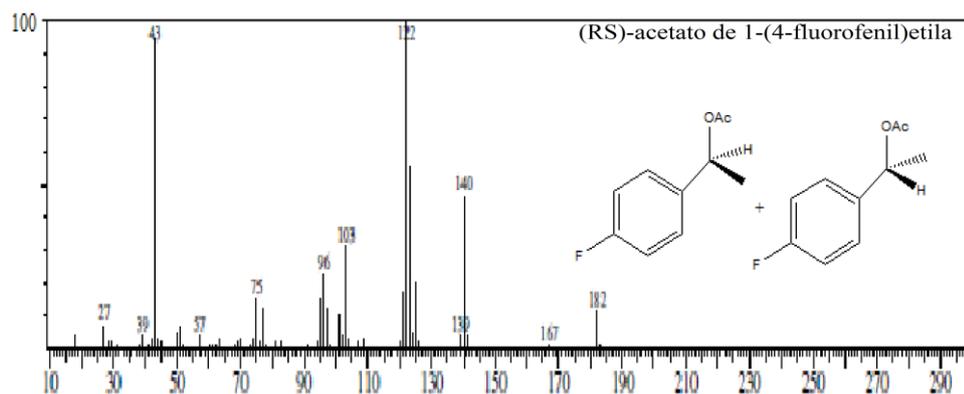
Apêndice T. Espectro de massa (IE) do (RS)-4-bromofeniletanol



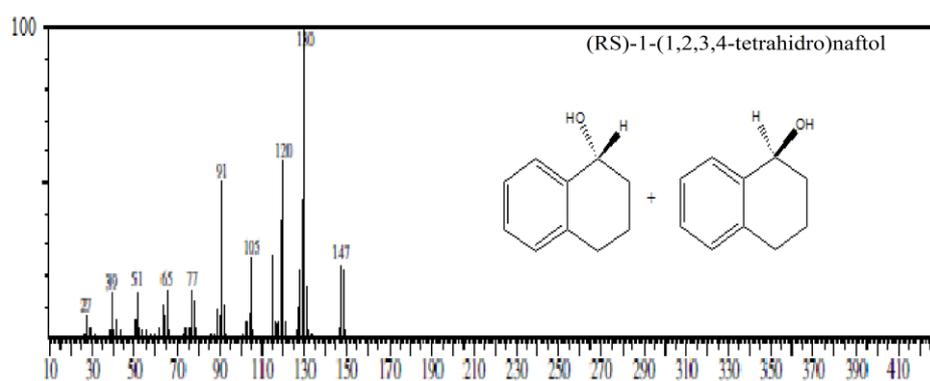
Apêndice U. Espectro de massa (IE) do (RS)- acetato de 1-(4-bromofenil)etila



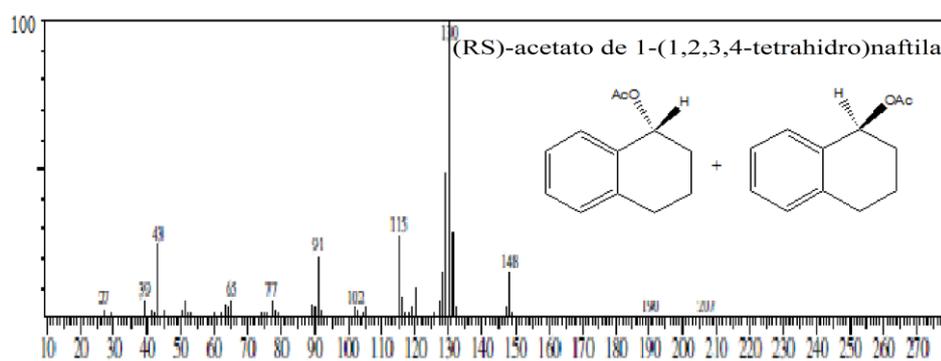
Apêndice V. Espectro de massa (IE) do 4-fluorofeniletanol



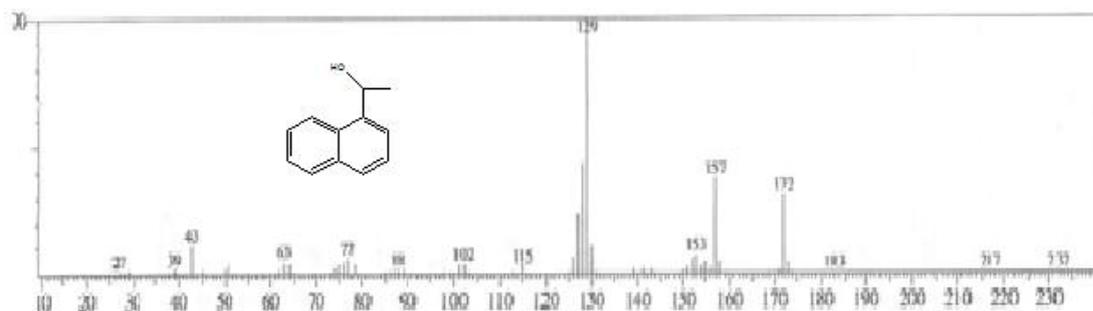
Apêndice W. Espectro de massa (IE) do (RS)-acetato de 1-(4-fluorofenil)etila



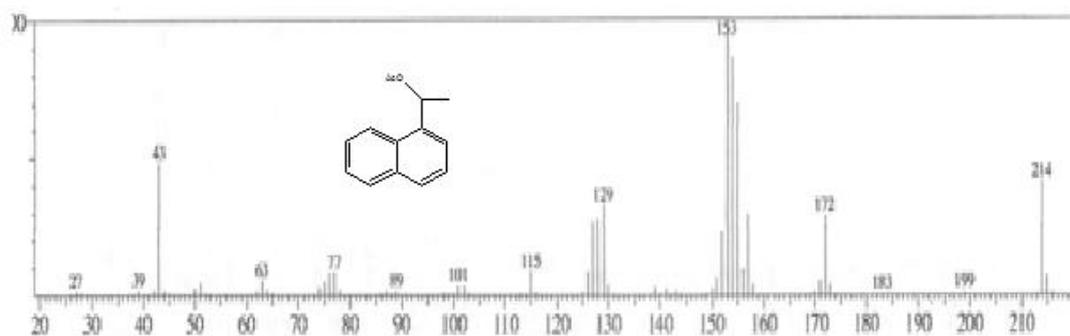
Apêndice X. Espectro de massa (IE) do (RS)-1-(1,2,3,4-tetrahidro)naftol.



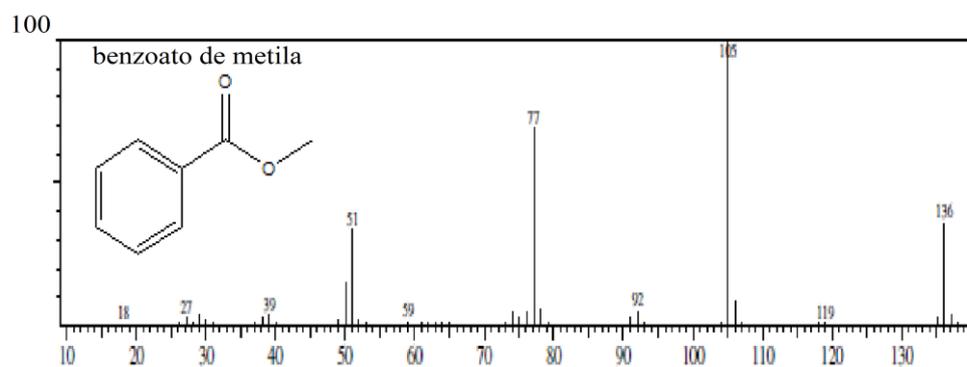
Apêndice Y. Espectro de massa (IE) do acetato de 1-(1,2,3,4-tetrahidro)naftila.



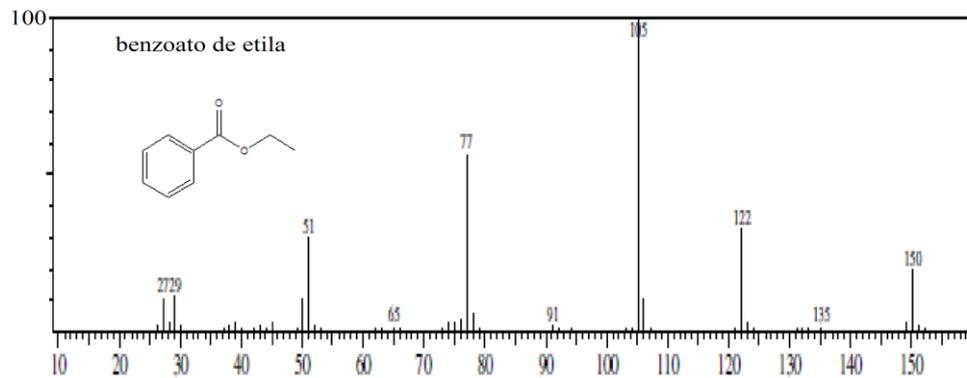
Apêndice Z. Espectro de massa do 1-nafiletanol



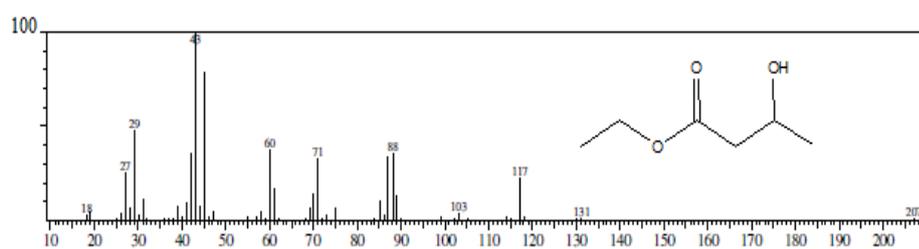
Apêndice AA. Espectro de massa do acetato de 1-nafiletila



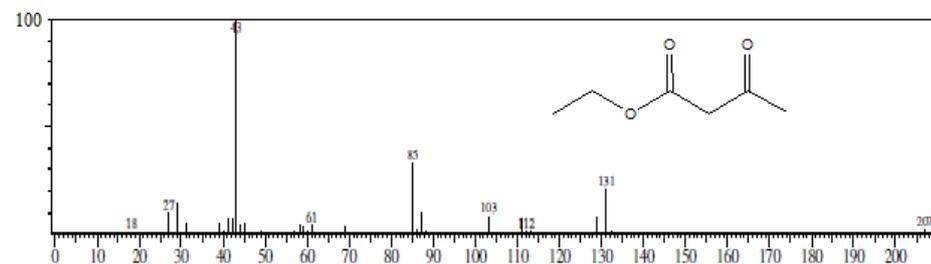
Apêndice BB. Espectro de massa (IE) do benzoato de metila.



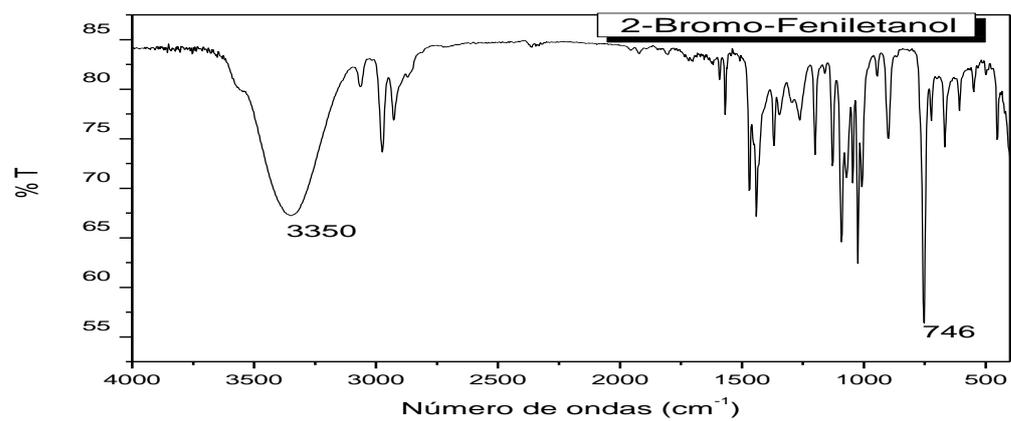
Apêndice CC. Espectro de massa (IE) do benzoato de etila.



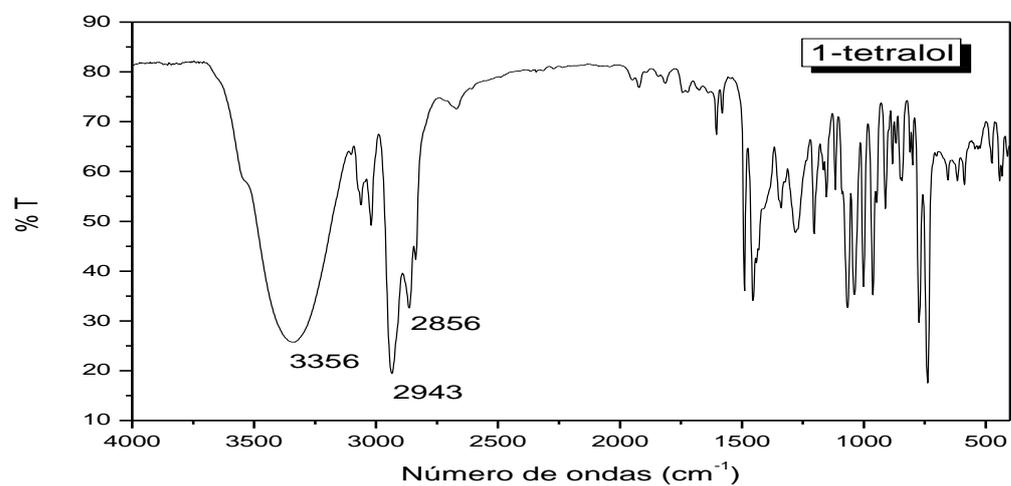
Apêndice DD. Espectro de massa (IE) do 3-hidroxibutanoato de etila



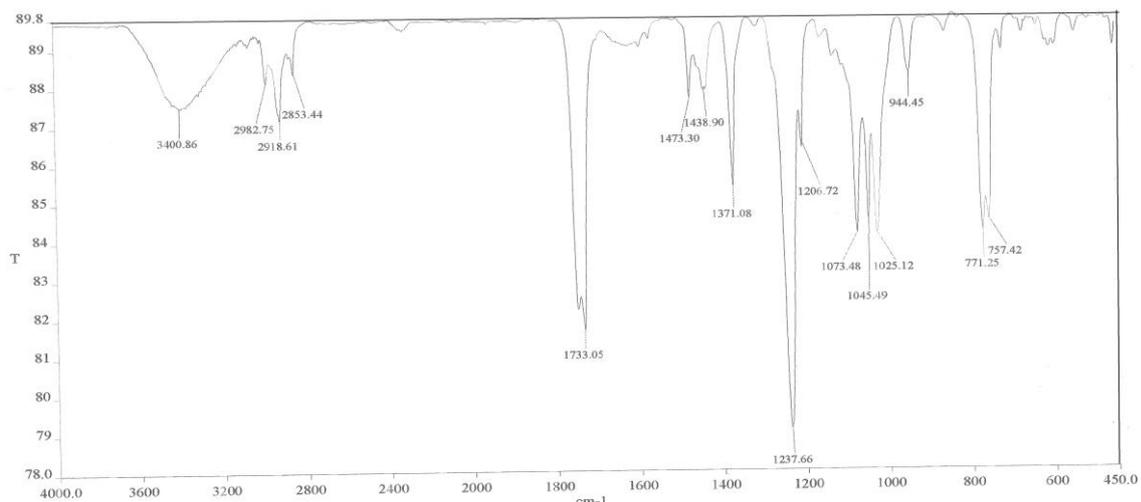
Apêndice EE. Espectro de massa (IE) do 3-oxo-butanoato de etila.



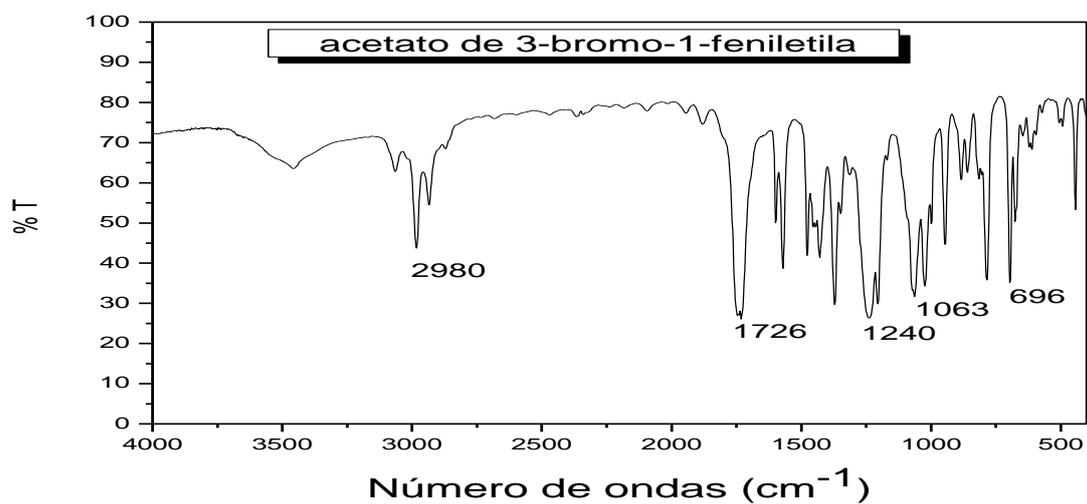
Apêndice FF. Espectro de IV do 2-bromofeniletanol



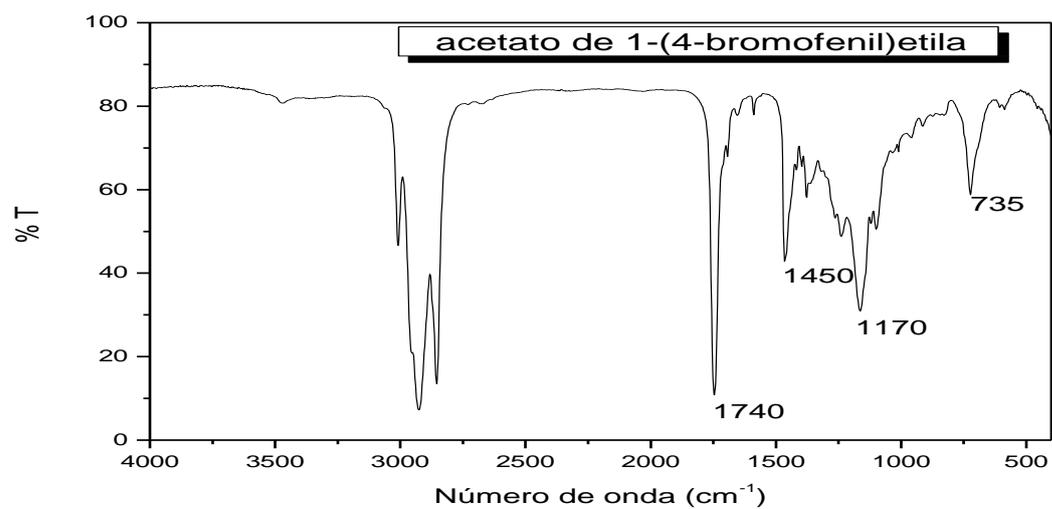
Apêndice GG. Espectro de IV do 1-tetralol



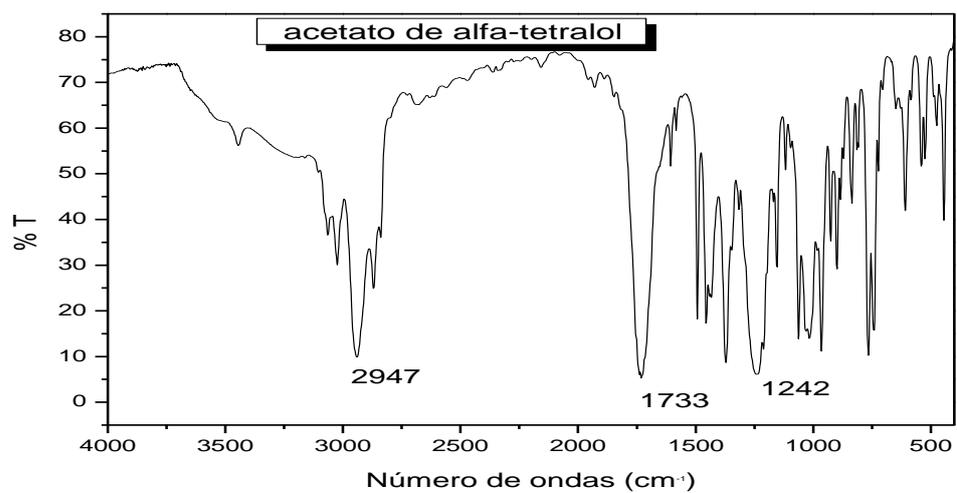
Apêndice HH. Espectro de IV do acetato de 1-(2-bromofenil)etila



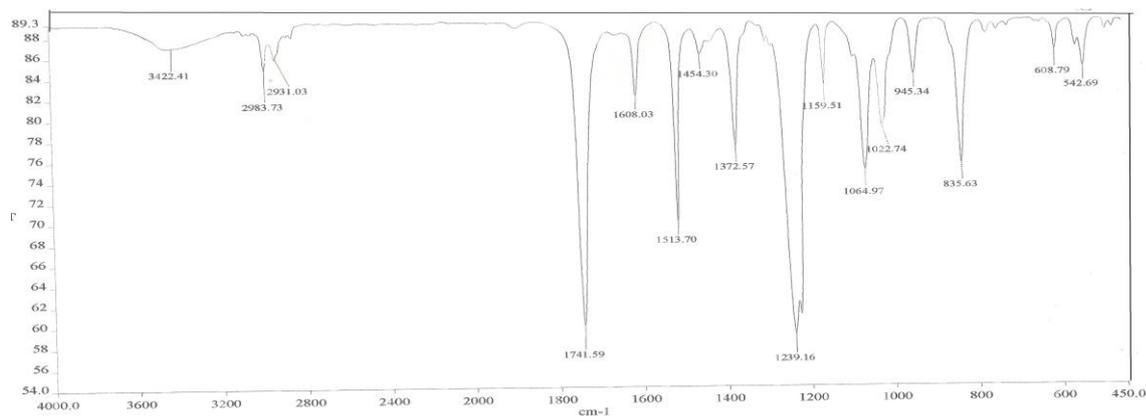
Apêndice II. Espectro de IV do (RS)-acetato de 3-bromofeniletila



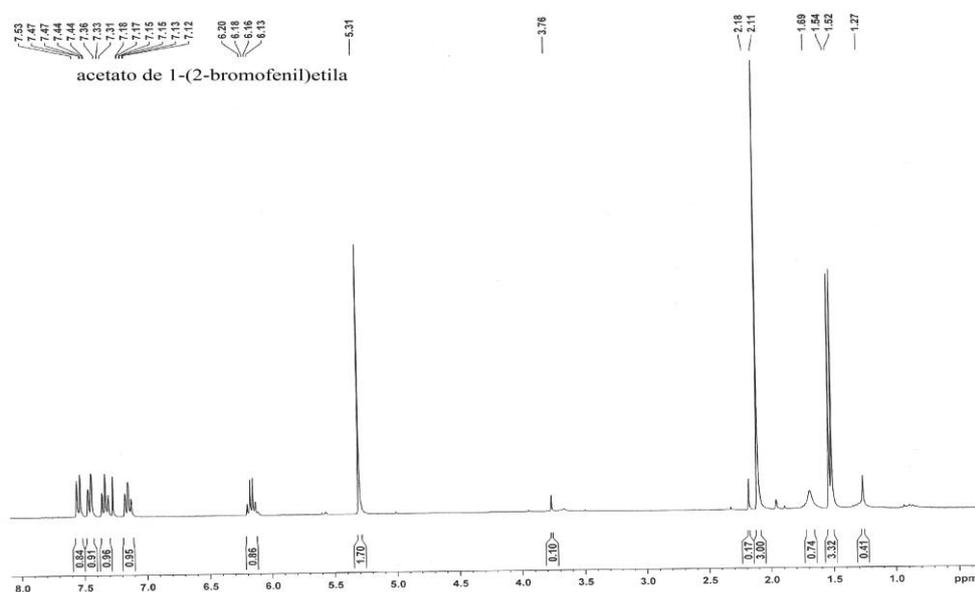
Apêndice JJ. Espectro de IV do acetato de 1-(4-bromofenil)etila



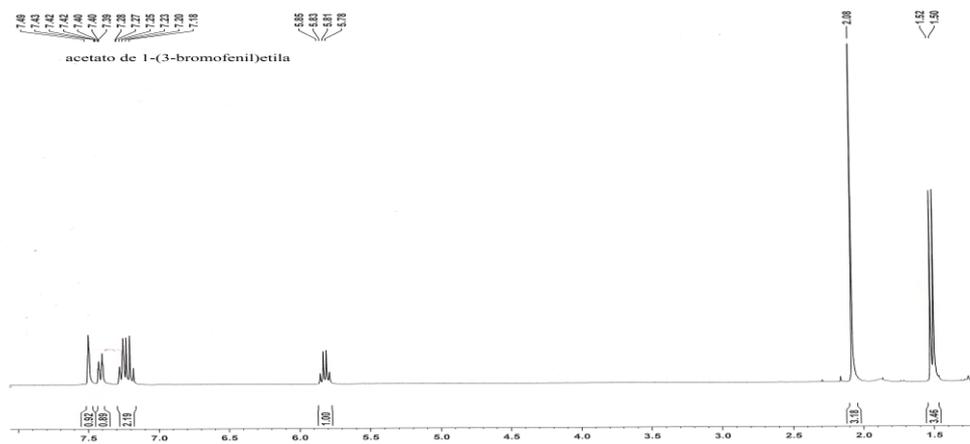
Apêndice KK. Espectro de IV do acetato de alfa-tetralol



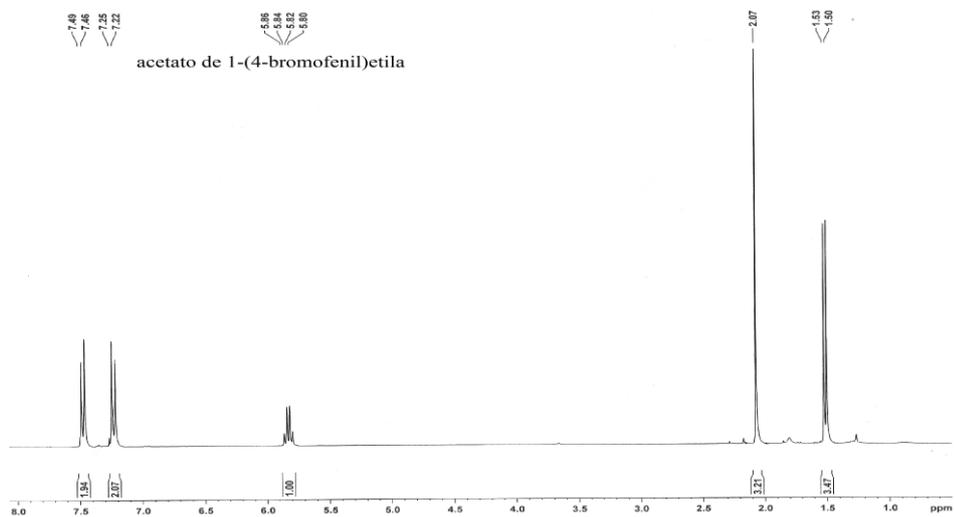
Apêndice LL. Espectro de IV do acetato de 1-(4-fluorofenil)etila.



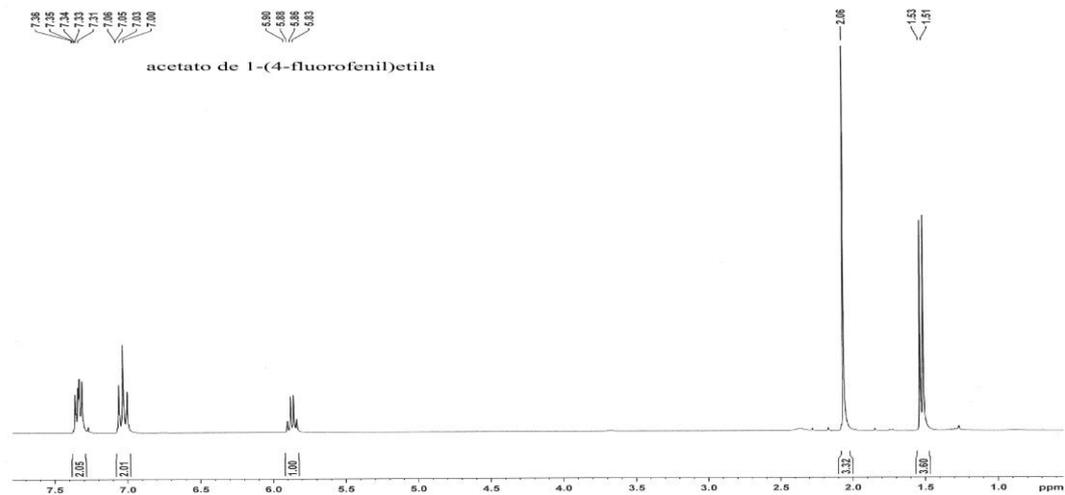
Apêndice MM. Espectro de RMN 1H 300MHz do (RS)-acetato de 1-(2-bromofenil)etila.



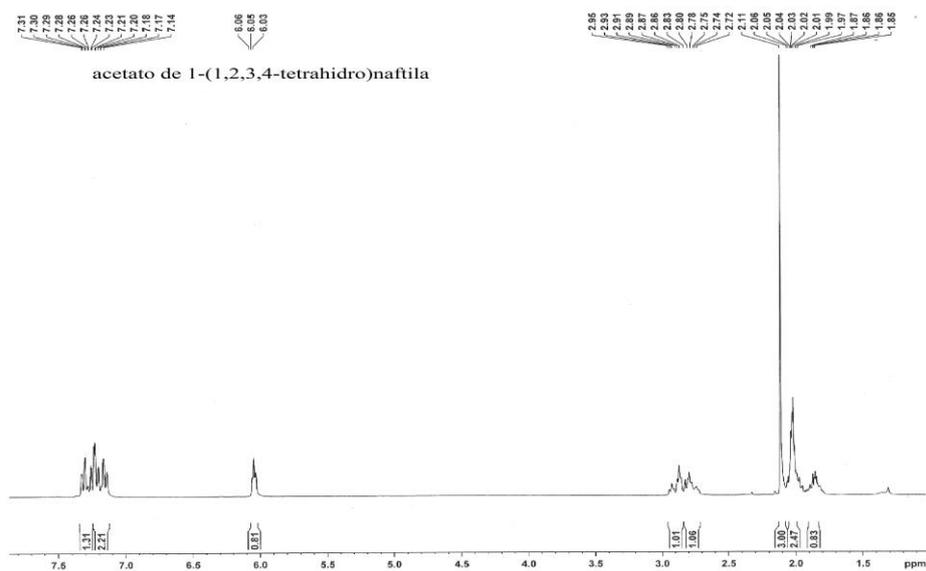
Apêndice NN. Espectro de RMN 1H 300MHz do (RS)-acetato de 1-(3-bromofenil)etila.



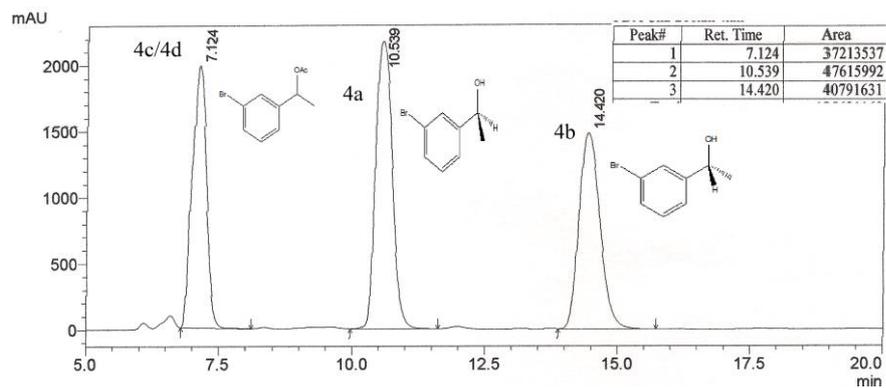
Apêndice OO. Espectro de RMN 1H 300MHz do (RS)-acetato de 1-(4-bromofenil)etila.



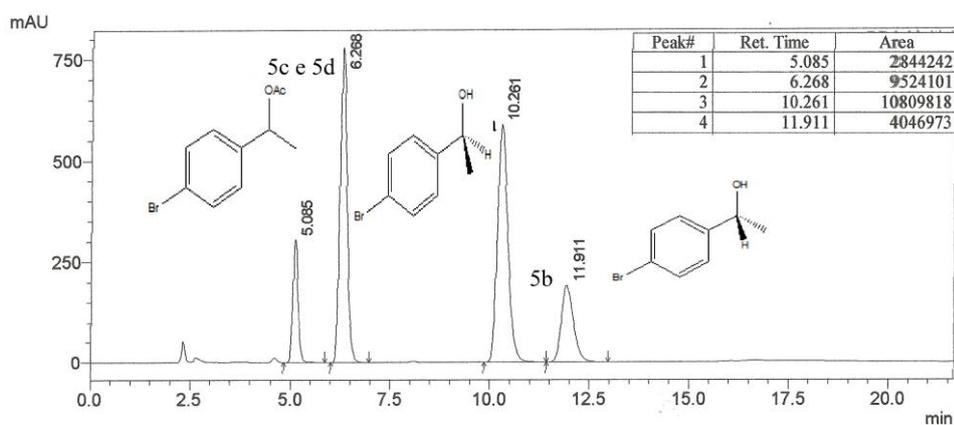
Apêndice PP. Espectro de RMN 1H 300MHz do (RS)-acetato de 1-(4-fluorofenil)etila.



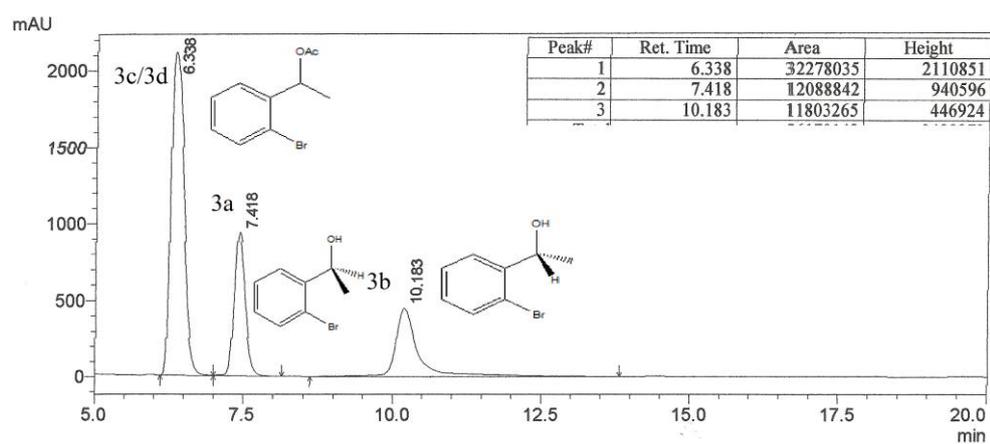
Apêndice QQ. Espectro de RMN 1H 300MHz do (RS)-acetato de 1-(1,2,3,4-tetrahidro)naftila.



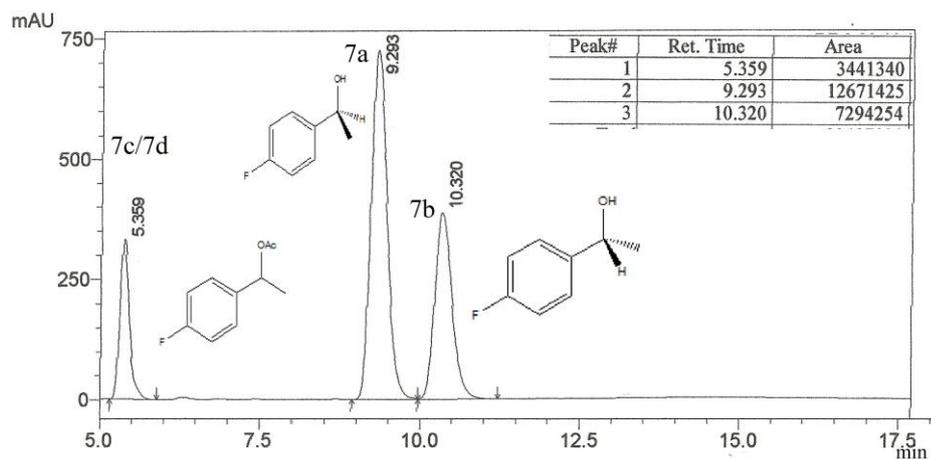
Apêndice RR. Cromatograma (CLAE) da reação de hidrólise do (RS)-acetato de 1-(3-bromofenil)etila



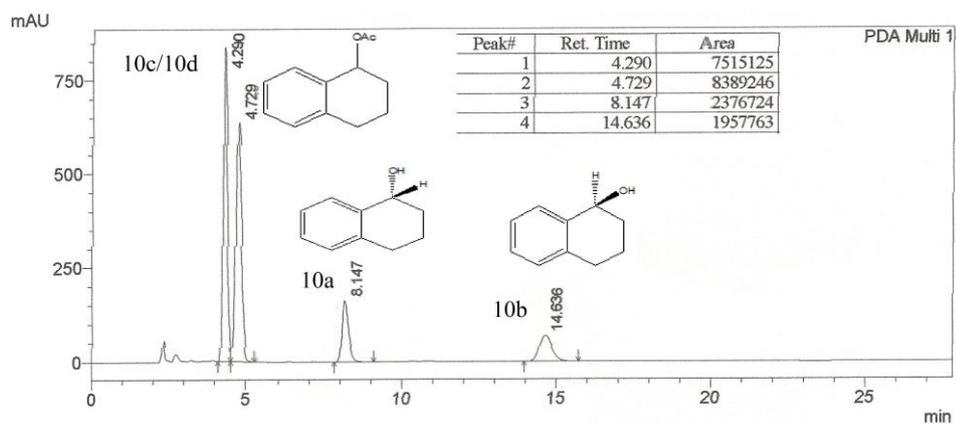
Apêndice SS. Cromatograma (CLAE) da reação de hidrólise do (RS)-acetato de 1-(4-bromofenil)etila.



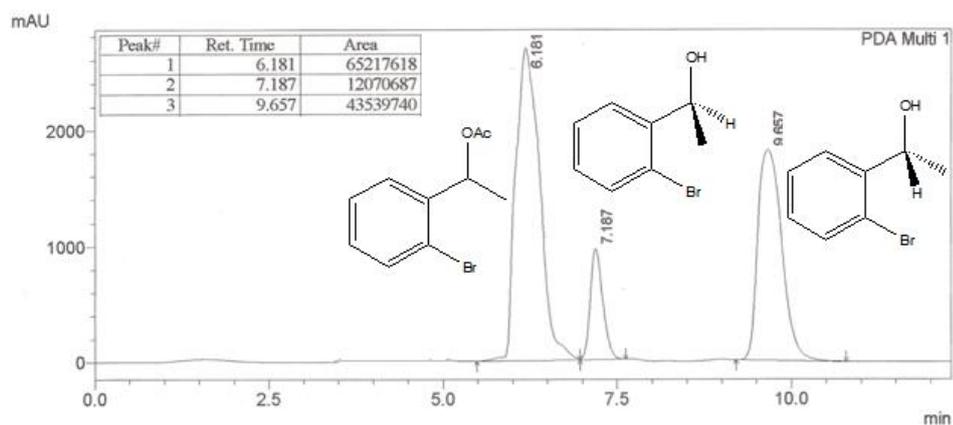
Apêndice TT. Cromatograma (CLAE) da reação de hidrólise do (RS)-acetato de 1-(2-bromofenil)etila.



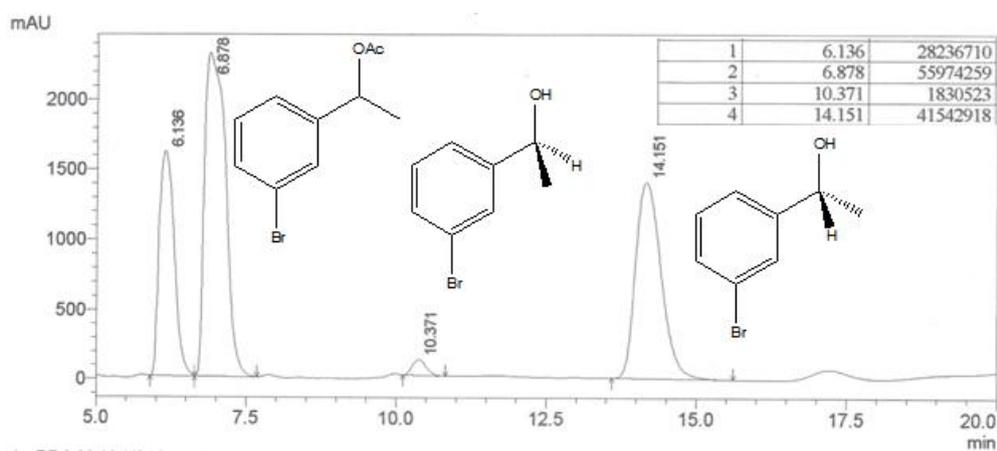
Apêndice UU. Cromatograma (CLAE) da reação de hidrólise do (RS)-acetato de 1-(4-fluorofenil)etila.



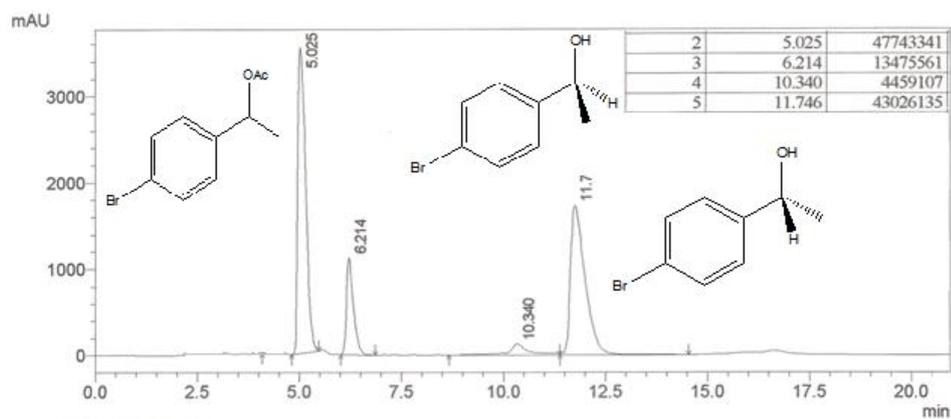
Apêndice VV. Cromatograma (CLAE) da reação de hidrólise do (RS)-acetato de 1-(1,2,3,4-tetrahidro)naftila.



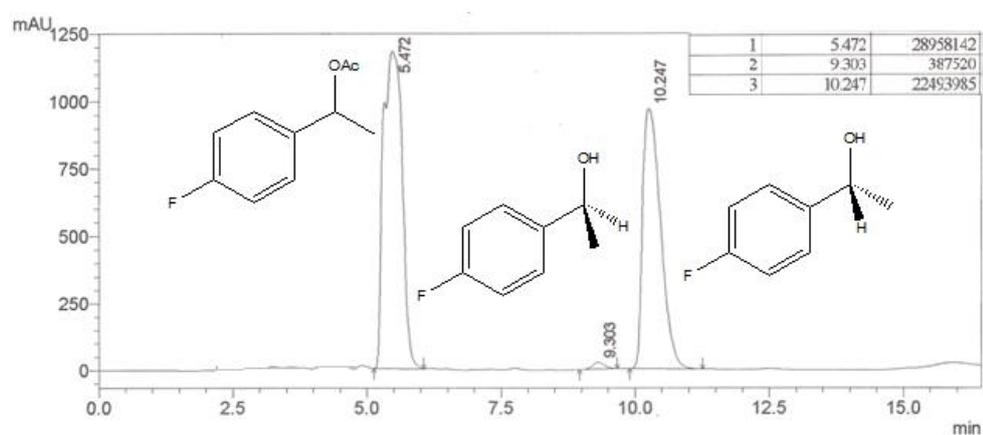
Apêndice WW. Cromatograma da reação de esterificação do etan-(2-bromofenil)-1-ol catalisada por CLD



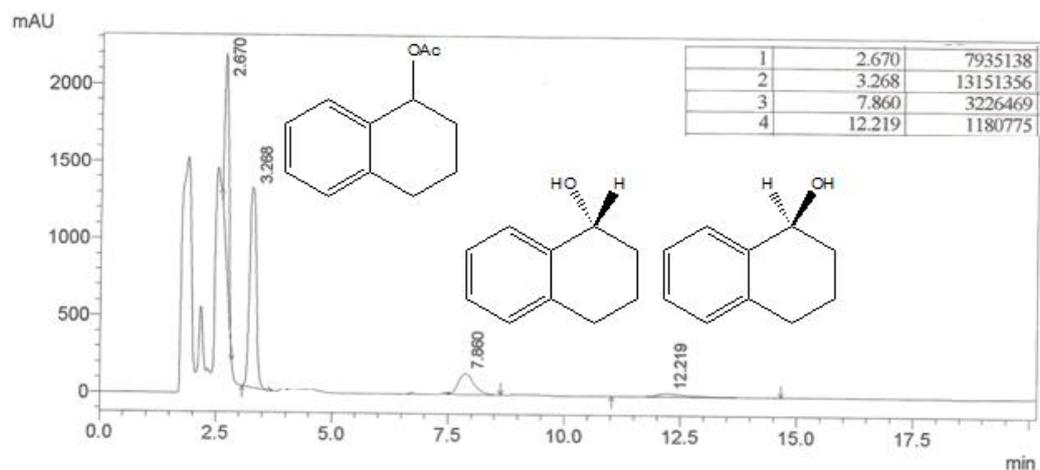
Apêndice XX. Cromatograma da reação de esterificação do etan-(3-bromofenil)-1-ol catalisada por CLD.



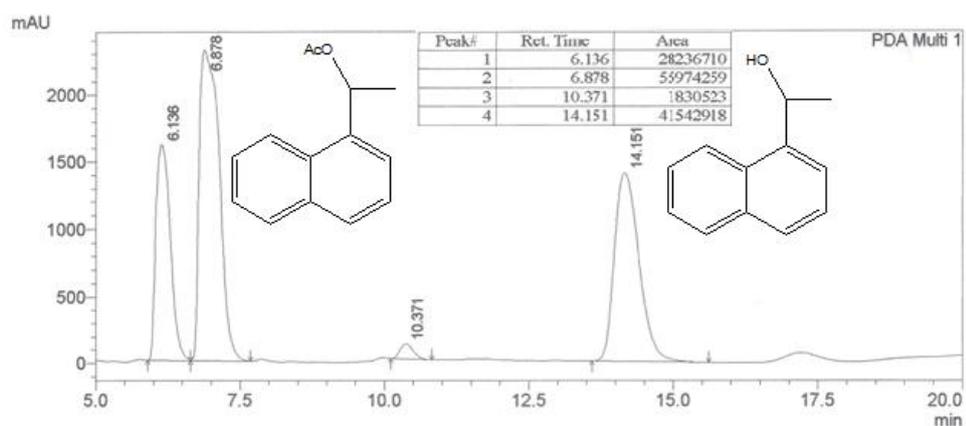
Apêndice YY. Cromatograma da reação de esterificação do etan-(4-bromofenil)-1-ol catalisada por CLD



Apêndice ZZ. Cromatograma da reação de esterificação do etan-(4-fluorofenil)-1-ol catalisada por CLD



Apêndice AAA. Cromatograma da reação de esterificação do 1-(1,2,3,4-tetrahydro)naftanol catalisada por CLD.



Apêndice BBB. CLAE- Reação de esterificação do 1-naftiletanol catalisada por CLD

