UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Instituto de Química

Dissertação de Mestrado

Dessimetrização enantiosseletiva de derivados pro - quirais catalisados por lipases

Marcela França Penna Ribeiro

RIO DE JANEIRO
Janeiro /2017

Dessimetrização enantiosseletiva de derivados pro - quirais catalisados por lipases

Marcela França Penna Ribeiro

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIENCIAS.

Orientadores:
Denise Maria Guimarães Freire, D.Sc.
Evelin Andrade Manoel, D.Sc.

RIO DE JANEIRO
JANEIRO/2017

Ribeiro, Marcela França Penna

Dessimetrização enantiosseletiva de derivados pro - quirais catalisados por lipases

[Rio de Janeiro] – 2017.

Dissertação (Mestrado) -Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Programa em Bioquímica – IQ, 2017.

Orientador: Profa. Dra. Denise Maria Guimarães Freire
Profa. Dra. Evelin Andrade Manoel

1. Biocatálise. 2. *myo*-inositol. 3. Lipase. 4. Biorreator. 5. Substâncias bioativas–I. Título II. Universidade Federal do Rio de Janeiro- IQ. III- Série

Dedicatória

Ao meu amado, meu protetor, meu companheiro,
meu ídolo, meu fã número um.
Rodrigo, meu marido.
Obrigada por todo carinho, compreensão e ajuda.
Te amo um mol.

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer aos professores da banca, Anderson, Ângelo e Ivaldo que tão gentilmente concordaram em participar da minha defesa neste período de início do ano.

Em segundo às minhas orientadoras Evelin e Denise, pelos puxões de orelha, elogios, ensinamentos. Pela disponibilidade, por acreditarem no meu potencial e por torcerem por mim.

Ao professor Alessandro e à sua aluna Bárbara, sem os quais esse trabalho seria impossível.

Aos meus pais, Márcia e Marcelo e ao meu padrasto, Nestor, por sempre me apoiarem e me incentivarem de todas as formas.

Ao meus amigos do LaBiM. Sabrini, com quem dividi todas as correrias, todas as ansiedades e as alegrias. Meus companheiros de bancada, mesa azul e comilança : Jaque 1, Joab, Carol, Érika, Keysson, Maysa, Priscila, Kássia, Duda, Anderson, Elisa, Ana C, Eliane, Mateus, Candida e Gal. Obrigada por tudo vocês fizeram até o mais quente e estressante dos dias se tornar alegre. Aos amigos do sétimo andar, Rui, Douglas e Júlia que sempre salvam a minha vida e principalmente o Rei do HPLC, Fábio.

Ao meu Marido Rodrigo por todo carinho, atenção, conversas, por me acalmar, cuidar de mim, ler os meus textos, sempre me dar todo o suporte para conseguir escrever.

Á minha família, principalmente à minha Tia Beth, minha Avó Lia, meus primos Leandro e Duda, minha Sogra Laura e minha Cunhada Fernanda por torcerem por mim e entenderem as minhas ausências.

Aos meus amigos Juliana e Facundo que sempre estão por perto nos momentos bons e ruins, para conversarmos e espairecer.

À minha amiga Vivi que torce por mim e que escuta minhas coletâneas de áudio de 5 minutos cada no zap.

Resumo

Lipases são vastamente utilizadas em processos de biotransformação industrial e se destacam, dentre inúmeros fatores, pela estabilidade em solventes orgânicos, não exigência de cofatores e pela capacidade de discriminar entre grupos enantiotópicos e racematos de enantiômeros, revelando uma alta regio-, chemo- e estereosseletividade. Neste trabalho um derivado simétrico de *mio*-inositol foi utilizado como substrato em reações de dessimetrização catalisadas por lipases. Essas enzimas foram empregadas devido à capacidade de produção de um produto enantiopuro em apenas uma etapa, diferente da síntese química. O interesse na obtenção de derivados de *mio*-inositóis enantiomericamente puros deve-se à grande versatilidade em síntese química e na síntese de novos fármacos, e na importância destes na sinalização celular como segundos mensageiros. Os derivados de *mio*-inositol são moléculas orgânicas polihidroxiladas envolvidas em diversas funções no organismo. Esses são amplamente utilizadas na área medicinal, como anticoagulantes, antibióticos e vacinas como o derivado 1-D-6-desóxi-6-flúor-*mio*-inositol (6-FIns), que é um forte inibidor do crescimento do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas. Entretanto, durante a síntese química desses compostos, diversos subprodutos podem ser formados, levando à redução do rendimento e da eficiência da síntese e aumento do tempo de reação, o que eleva os custos de síntese. O objetivo deste trabalho foi o estudo de novas rotas sintéticas para obtenção dos derivados de *mio*-inositol em rotas mais curtas. Inicialmente, realizou-se uma seleção utilizando oito diferentes lipases comerciais (*i.e.*, Lipozyme TL IM, *Rhizomucor miehei*, Lipozyme RM IM, Novozyme 435, PS Amano, PSC Amano II, PS-IM, AK Amano, AY-30 Amano, lipase G Amano, lipase D Amano, Lipomod 34P) com objetivo da dessimetrização do substrato 1,3-di-*O*-benzil-*mio*-inositol. Das lipases testadas, Lipozyme RM-IM e Lipozyme TL-IM foram capazes de realizar a dessimetrização do substrato supracitado. Essas mostraram a mesma régio- e enantosseletividade, formando o produto (L)-1,3-di-O-benzil-4-acetil-mio-inositol, resultando em mais de 95% de conversão. Em contrapartida, Novozyme 435 e Lipomo 34P mostraram regiosseletividade diferente, formando o produto simétrico 1,3-di-O-benzil-5-acetil-mio-inositol. Em seguida, foi realizada uma investigação do solvente e agente acilante utilizados na reação para os biocatalisadores Lipozyme RM-IM e Lipozyme TL-IM. O acetato de vinila mostrou ser o melhor agente acilante para ambos

biocatalisadores e os melhores solventes foram o TBME e o acetato de etila, respectivamente. A taxa inicial da reação em TMBE e acetato de etila para a lipase de TL-IM foi de 1444,2 $\mu mol.min^{-1}.g^{-1}$ e 835,9 $\mu mol.min^{-1}.g^{-1}$. , respectivamente. O estudo do excesso enantimoérico mostrou que os solventes não alteram a enantosseletividade da enzima. O estudo cinético para esses biocatalisadores, nas condições otimizadas, mostrou que em seis horas foi possível obter um produto enantiomericamente puro utilizando a lipase RM-IM, e em duas horas obteve-se o mesmo produto utilizando TL-IM. A enzima TL-IM pode ser reutilizada 7 vezes na presença do acetato de etila como solvente. Entretanto, o reuso da reação em TBME não foi possível, uma vez que o suporte foi destruído. Dentre os fatores estudados, condição reacional escolhida com a mais vantajosa foi a que a Lipozyme TL-IM atua como biocatalisador, acetato de vinila como agente acilante, na presença de EtOAc como solvente.

Abstract

Lipases are widely used in industrial biotransformation processes and stand out, among many factors, for their stability in organic solvents, non-requirement of cofactors and for it high regio- and stereoselectivity. At this work a symmetrical derivative of *myo*-inositol was used as a substrate in lipase-catalyzed desimetrization reactions. These enzymes were employed due to their ability to produce, in one step, an enantiopure product. The interest in obtaining derivatives of enantiomerically pure *myo*-inositois is due to their great versatility in chemical synthesis, as well as in the synthesis of new drugs and their importance in cell signaling as second messengers. *Myo*-inositol derivatives are polyhydroxylated organic molecules involved in various functions on cell function. These are widely used in the medical field, such as anticoagulants, antibiotics and vaccines such as the 1-D-6-deoxy-6-fluoro-*myo*-inositol derivative (6-FIns), which is a strong inhibitor of the growth rate of the etiological agent of Chagas Disease, *Trypanosoma cruzi*. However, during the chemical synthesis of these compounds, several sub-products may be formed, reducing yield and efficiency of the synthesis, increasing reaction time and increasing synthesis costs. The objective of this work was the study of new synthetic strategies to obtain the *myo*-inositol derivatives in shorter enantio-pure routes. Initially, we made a selection using eight different commercial lipases (i.e. Lipozyme TL IM, Lipozyme RM IM, Novozyme 435, PS Amano, PSC Amano II, PS-IM, AK Amano, AY-30 Amano, Lipase G Amano, Xlipase D Amano, Lipomod 34P) for the dessimetrization of the inositol substrate, 1,3-di-O-benzyl-Iinositol (S1). Among the lipases tested, Lipozyme RM-IM and Lipozyme TL-IM were able to carry out the substrate dissimetrization described above. These showed the same regio- and enantioselectivity, forming the product (L) -1,3-di-O-benzyl-4-acetyl-*myo*-inositol, resulting in more than 95% of conversion. In contrast, Novozyme 435 and Lipomo 34P showed different regioselectivity, forming the symmetrical product 1,3-di-O-benzyl-5-acetyl-myo-inositol. Then, we perform the optimization of the solvent and acyl donor for the biocatalysts Lipozyme RM-IM and Lipozyme TL-IM. For all the biocatalysts used, vinyl acetate showed to be the best acyl donor, while the best solvents were TBME and ethyl acetate (EtOAc), respectively. The initial velocity of the reaction with the solvent TMBE was 1444,2 $\mu mol.min^{-1}.g^{-1}$ and the reaction with the solvent EtOAc was 835,9 $\mu mol.min^{-1}.g^{-1}$. The study of the enantimeric excess showed that the solvents did not change the enantioselectivity of

the enzyme. The kinetic study for these biocatalysts under the optimized conditions showed that at six hours it was possible to obtain an enantiomerically pure product using RM-IM lipase and at two hours the same product was obtained using TL-IM. It was possible to reuse the biocatalyst TL-IM at least seven times without detecting reduction in it activity. We studied the reuse of the biocatalyst under two different conditions using the solvents whose reactions showed higher initial velocities (TBME and EtOAc). The reuse in presence TBME was not possible, since the support was destroyed, while in the presence of EtOAc there was no decrease of the activity during the reuses. In a nutshell, among the studied features, the reactional condition that we found to be the best was the reaction catalyzed by TL-IM with Vinyl Acetate as acyl donor, in the presence of EtOAc as solvent.

Sumário

Resumo 6
Abstract 8
ÍNDICE DE ABREVIAÇÕES 15
1.Introdução 16
2.0 Objetivos 19
2.1 Objetivo Geral 19
2.2 Objetivos específicos 19
3.0 Revisão Bibliográfica 20
3.1 Rotas para a obtenção de compostos enantiomericamente puros 20
3.2. Lipases 22
3.2.1 Estrutura proteica de lipases 24
3.2.2 Fenômeno da ativação interfacial em Lipases 26
3.2.3 Aplicação Industrial das Lipases 31
3.2.4 Principais Microrganismos Utilizados Para a Produção de Lipases 33
3.3. Aplicação de lipases na síntese de fármacos 35
3.4. Lipases de Rhizomucor miehei e Thermomices Lanuginosus 36
3.4.1. Lipase de Rhizomucor miehei. 36
3.4.2. Lipase de Thermomyces lanuginosus 37
3.4. Mecanismo Cinético de lipases 39
3.5. Dessimetrização de derivados pró-quirais catalisado por lipases 42
Devido à relativa rigidez conformacional, os compostos cíclicos são frequentemente preferidos como substratos para a dessimetrização. Além disso, uma grande variedade de compostos enantio-enriquecidos carbocíclicos altamente funcionalizadas foi sintetizada por reações catalíticas assimétricas de dessimetrização. A acilação dos álcoois livres por meio de uma reação de transesterificação ou de hidrólise do acilo dos álcoois tem sido utilizada na dessimetrização enzimática. (Manna & Mukherjee, 2015). 43
3.6. Influência do solvente 44
3.7. Inositóis 47
4.0 Materiais e Métodos 50
4.1 Síntese química do substrato a ser estudado 50
4.2. Seleção das lipases que catalisam a reação de acetilação 50
4.3 Efeito do agente acilante na conversão e na enantiosseletividade sobre a dessimetrização de S1. 51
4.4 Efeito do solvente na conversão e na enantiosseletividade sobre a reação de dessimetrização de S1. 51

4.5 Métodos Analíticos 52
4.5.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) das reações de acetilação 52
4.6 Cinética enzimática das reações 55
4.7 Estudo do reuso do biocatalizador 55
4.8 Dosagem de atividade de esterificação por método titulométrico 56
4.9 Quantificação de Proteína por método de espectrofotométrico de Bradford 57
5.Resultados e discussão 59
5.1. Seleção de lipases 59
5.2. Seleção do agente Acilante 63
5.3. Efeito do Solvente 68
5.4. Estudo da Cinética da reação de dessimetrização de S1 70
5.4.1.Estudo da velocidade inicial 70
5.4.2. Cinética da reação de dessimetrização 72
5.5 Estudo do Reuso do biocatalisador 76
7.0 Conclusões e Perspectivas 81
8. Referências Bibliográficas: 82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Métodos para obtenção de compostos enantiomericamente puros.....21

Figura 2: Reação de hidrólise catalisada por lipases..... 23

Figura 3: Reações catalisadas por lipases..... 24

Figura 4: Diagrama esquemático do enovelamento canonico α/β-hidrolase..... 26

Figura 5: Hidrólise de triacetina pela lipase pancreática e esterase como função da concentração do substrato 28

Figura 6: Conformações tampa fechada (azul) e tampa aberta (amarelo) em várias lipases..... 29

Figura 7: Representação esquemática do sítio de ligação em diferentes lipases..... 31

Figura 8: Estrutura das formas aberta e fechada da RML..... 37

Figura 9: Estrutura de formas aberta e fechada da TLL..... 39

Figura 10: Esquema da reação de hidrólise de ligações éster catalisada por esterases e lipases..... 41

Figura 11: Mecanismo cinético (Ping Pong Bi Bi) de reações com múltiplos produtos e substratos catalisadas por lipases..... 42

Figura 12: Mecanismo de transdução celular..... 48

Figura 13: Estereoisômeros do inositol..... 49

Figura 14: Nomenclatura e plano de simetria do mio-inositol..... 50

Figura 15: Reação realizada no Laboratório Roderick-Barnes para a síntese do substrato usado na dissertação 51

Figura 16: Fotografia da aparelhagem real e esquema do sistema experimental empregado nas reações de acetilação enzimática..... 52

Figura 17: Cromatograma referente ao padrão do substrato por CLAE em fase reversa com tr de 4,7 min..... 54

Figura 18: Cromatograma referente ao produto por CLAE em fase reversa em diferentes concentrações (mg/mL) com tr de 8,3min 54

Figura 19: Cromatograma referente ao padrão do substrato por CLAE em fase reversa em diferentes concentrações (mg/mL) com TR de 4,5 min..... 56

Figura 20: Cromatograma da coluna quiral do Padrão racêmico obtido por síntese química, (D)-isômero e (L)-isômero do 1,3-O-benzil 4-O-acetil-mio-inositol (S1) B) Cromatograma do produto enantiopuro obtido por síntese enzimática..... 59

Figura 21: Gráfico da curva padrão usado na dosagem de proteína por método de Bradford..... 60

Figura 22: Estratégia reacional adotada para a dessimetrização de S1..... 61

Figura 23: Esquema reacional da resolução cinética de S1 catalisada pelas Lipases em acetato de vinila A mono-O-acetilação do substrato 1,3-di-O-mio-inositol catalisada pelas lipases..... 62

Figura 24: TCL das reações de o-acetilação do 1,3-di-O-benzil-mio-inositol..... 63

Figura 25: Esquema das reações e produtos usados pelo grupo do Laboratório Roderick Barnes para a atribuição da configuração do produto quiral (+) - 2 através da conversão para (+) – 5..... 64

Figura 26: Conversões encontradas com os agentes acilantes EtOAc e acetato de vinila após 96h com as enzimas Lipozyme RM-IM e Lipozyme TL-IM..... 66

Figura 27: onversões encontradas com os agentes acilantes EtOAc e acetato de vinila após 96h de reação com a enzima Novozyme 435..... 67

Figura 28: Cromatogramas dos produtos obtidos nas reações de seleção dos agentes acilantes..... 68

Figura 29: A) substrato tribenzilado utilizado por Manoel et al, 2012, a benzila adicional confere maior hidrofobicidade ao substrato. B) Substrato di-benzilado usado neste trabalho..... 70

Figura 30: Gráfico utilizado para exemplificar como é calculada a velocidade inicial das reações. Os pontos utilizados para calcular a velocidade inicial da reação catalisada pela Lipozyme TL-IM e TBME como solvente..... 72

Figura 31: Curva de Progresso da reação de dessimetrização..... 74

Figura 32: Curva de progresso de 0 a 120 min da reação catalisada pela Lipozyme TL-IM nos solventes TBME e EtOAc..... 75

Figura 33: Estudo da viabilidade do biocatalisador através do reuso. Cada ciclo com duração de 2h..... 78

Figura 34: Gráfico que representa os ciclos de reuso com cada ciclo tendo a duração de 1h..... 79

Figura 35: Gráfico que representa os ciclos de reuso com cada ciclo tendo a duração de 1h, entre cada ciclo foi realizada uma etapa de lavagem com hexano..... 80

Figura 36: Fotografia mostrando o aspecto macroscópico final do Lipozyme RM-IM ao final dos reciclos..... 81

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Principais áreas aplicações, produtos e tipos de reações desempenhadas pelas lipases 32

Tabela 2: Valor de log P de solventes orgânicos (uma vez que diminui a camada de solvatação do sítio ativo) que o enantiômero lento, diminuindo a enantiosseletividade da reação 46

Tabela 3: Atividades dos biocatalizadores que foram usados na reação de esterificação do 1,3-di-O-benzil-mioinositol. As atividades de esterificação foram determinadas por método titulométrico.....58

Tabela 4: triagem dos Biocatalizadores que dessimetrizaram o 1,3-di-O-benzil-mio-inositol.....61

Tabela 5: Conversões encontradas nas reações com os respectivos solventes usando com agente acilante acetato de vinila após. A tabela representa as conversões encontradas após 96h de reação com as enzimas Lipozyme RM-IM e Lipozyme TL-IM.....66

Tabela 6: Representa as velocidades iniciais encontradas nas reação catalisadas pela Lipozyme TL-IM e os respectivos como solventes.....73

Tabela 7: Comparativo das informações contidas no safety card do TBME e do acetato de etila.....76

ÍNDICE DE ABREVIAÇÕES

Ac Grupo acila

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Bn Grupo benzila

CDC *Center of Dieses and Control*

CLAE Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ee excesso enantiomérico

EtOAc Acetato de Etila

FDA Food and drugs Administration

His Histitina

IPPN Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais

IUPAC União Internacional de Química Pura e Aplicada

OMS Organização mundial da saúde

RM-IM Lipase de Rhizomucor miehei

TBME Éter terc-metil butílico

TLC *Thin Layer Chromatograph* (Cromatografia em Camada Delgada)

TL-IM Lipase de Thermomyces lanuginose

TR Tempo de retenção

*S*1 1,3-di-o-benzil mio-inositol

S2 4-O-acetil-1,3di-*O*-benzil-*mio*-inositol

Ser Serina

Q1 5-O-acetil-1,3di-*O*-benzil-*mio*-inositol

Vi Velocidade Inicial

ΔG variação da energia livre de Gibbs

1.Introdução

Desde o começo do século XX, enzimas isoladas têm sido usadas na transformação de compostos orgânicos. Entretanto, nos últimos anos, diferentes técnicas foram desenvolvidas para o estudo e otimização destas biotransformações,. Entre essas, pode-se citar a técnica de imobilização das enzimas em diferentes tipos de suportes (HANEFELD *et al.,* 2009; RODRIGUES *et al.*, 2013) e o uso da Engenharia Genética no desenvolvimento de novos biocatalisadores. Em 1985, Mutter relatou a possibilidade de criação de enzimas completamente novas, ou fusões de parte de enzimas distintas. O uso da Engenharia Genética é feito majoritariamente com técnicas de mutações sítio dirigidas e expressão heteróloga. Essas modificações pontuais na sequência de aminoácidos da enzima são baseadas nos seguintes fatores: conhecimento da sua estrutura e função (FOX & HUISMAN 2008; FERRARIO *et al*., 2015); mapeamento do sítio ativo e predição da afinidade da enzima pelo substrato (LEACH, *et al*., 2006.); estudo da variação do solvente (*solvent engineering*) (HADFIELD, 1994; KLIBANOV, 2001; BARBOSA, *et al.,* 2015.); estudos da variação dos doadores de acila em reações de transesterificação (EMA *et al.,* 1996; SALEM, *et al.,* 2010). Dessas, a técnica que apresenta menor custo de processo é a otimização de solventes, além de apresentar maior flexibilidade, simplicidade e maior velocidade de execução (COSTA & AMORIM, 1999; BARBOSA, *et al.,* 2015; SALIHU & ALAM, 2015).

Dessa forma, o uso de novos biocatalisadores obtidos por engenharia genética e imobilizados vieram satisfazer a demanda das indústrias química e farmacêutica por sínteses de novos compostos de modo mais eficiente. Consequentemente, as transformações químicas catalisadas por enzimas se tornaram reconhecidas como alternativas práticas à síntese orgânica tradicional (não-biológica), e como soluções para certos problemas sintéticos difíceis de serem solucionados (KOELLER & WONG, 2001).

A maioria dos compostos bioativos são moléculas quirais, podendo apenas um dos enantiômeros apresentar atividade biológica. Por essa razão, alguns requisitos como regio-, enantio- e qui*mio*sseletividades são essenciais para a produção dessas substâncias. Nessa vertente, o uso de enzimas se torna um atrativo, uma vez que essas são catalisadores altamente seletivos,. A regiosseletividade das enzimas, mesmo em moléculas complexas, dispensa necessidade de grupos de

proteção utilizados na síntese química convencional . Isso reduz o número de etapas da síntese, reduzindo o tempo, consumo de produtos químicos e a geração de resíduos (RASOR & VOSS, 2001).

Dentre as enzimas mais utilizadas em processos de biotransformações industriais, estão as esterases, lipases e proteases. Essas têm sido amplamente aplicadas à preparação de compostos enantiopuros a partir de compostos racemicos, pró-quirais ou meso. Estas hidrolases, em geral, possuem uma alta regio-, qui*mio*-, estereosseletividade, além de alta especificidade frente a diferentes substratos (THEIL 1995; JAEGER & REETZ, 1998; KOELLER & WONG, 2001; JAEGER & EGGERT 2002; CHOJNACKA *et al*., 2007). Essas enzimas também se destacam pela estabilidade em solventes orgânicos e a não dependência de cofatores na reação (THEIL, 1995; GHANEM *et al.,* 2004; BARBOSA, *et al.,* 2015; SALIHU & ALAM, 2015). Este grupo de enzimas se destaca ainda pela capacidade de catálise tanto em meio aquoso quanto em meio orgânico (com baixa atividade de água) (SIH & WU, 1989; FERRABOSCHI *et al.*, 1990; THEIL, 1995; STECHER e FABER, 1997)

Dentro deste grupo de enzimas as lipases são uma alternativa bastante interessante por manterem sua estabilidade e atividade em contato com uma gama de solventes orgânicos, não necessitarem de cofatores e quase não gerarem subprodutos. . Além disso, essas enzimas podem ser obtidas em grande quantidade por via microbiana e, dependendo do processo, possuem custo reduzido (BEZBORODOV & ZAGUSTINA, 2016). Adicionalmente, essas podem, após passarem pelo processo de imobilização, ser empregadas nas condições comumente usadas nas indústria química e farmacêutica, como temperaturas mais elevadas e solventes orgânicos (BARBOSA, *et al.,* 2015). Essas enzimas também são capazes de catalisar uma ampla variedade de substratos, já que possuem capacidade de alteração em sua conformação, dependendo da estrutura do material de partida utilizado (THEIL, 1995; BEZBORODOV & ZAGUSTINA, 2016).

Lipases também são eficientes na resolução cinética para a obtenção de moléculas enantiomericamente puras. Essas enzimas são muito empregadas uma vez que a maioria das substâncias biologicamente ativas como fármacos, defensivos agrícolas, fragrâncias, são moléculas quirais. Estima-se que 70% das moléculas ativas em produtos farmacêuticos sejam quirais (BEZBORODOV & ZAGUSTINA, 2016), o que justifica a necessidade de resolução óptica destes compostos. Em 2011, nos Estados Unidos, 120 dos 200 medicamentos mais receitados e vendidos

possuíam moléculas com estereocentros (ZENG *et al.,* 2016), necessitando de resolução óptica para a obtenção de um produto enantiomericamente puro (ANOVÁ & HUTTA, 2003).

A catálise enzimática de produtos intermediários simplifica a síntese de compostos que requerem rearranjos por meio da modificação de uma ou várias ligações na molécula. Por um lado, a síntese química não fornece produtos de alta pureza enantiomérica, dando origem à misturas racémicas de difícil resolução. Por outro lado, as lipases permitem transformações regio- e estereoseletivas de substratos não naturais em meio aquoso e solventes orgânicos. Em termos de moléculas terapêuticas, isômeros ópticos podem apresentar diferenças farmacológicas, sendo essencial a produção de formas enantiomericamente puras (BEZBORODOV & ZAGUSTINA, 2016).Dentre os precursores para síntese de novos fármacos a obtenção de derivados de *mio*-inositóis enantiomericamente puros justifica-se pela sua grande versatilidade em síntese química. Os *mio*-inositós são interessantes pois podem servir de precursores para novos fármacos, além de atuarem na sinalização celular como segundos mensageiros, desempenhando papéis como contração muscular, metabolismo, secreção, etc. (ALMEIDA *et al.*, 2003).

Recentemente, SIMAS *et al.* (2010), CUNHA *et al.* (2010 e 2013), VASCONCELOS, *et al.* (2014), MANOEL *et al. (*2012, 2013, 2015) testaram novos derivados de *mio*-inositol utilizando resolução cinética e dessimetrização catalisadas por lipases. Os autores publicaram trabalhos de seleção de lipases, modelagem molecular e cinética de resolução, efeito do agente acilante, efeito do solvente e reuso dos biocatalizadores, obtendo enantiômeros puros com sucesso. Entretanto, esses ainda relatam a necessidade do emprego de outros derivados, como materiais de partida em resoluções cinéticas.

Dentro do contexto apresentado, neste trabalho pretendeu-se realizar a reação de dessimetrização do 1,3-di-*O*-benzil-*mio*-inositol produzido previamente por síntese química, utilizando lipases imobilizadas . Além disso, foram investigados os aspectos que influenciam a enantiosseletividade e a conversão, como o meio e condições reacionais (tipo de solvente, agente acilante). Também foram estudadas as cinéticas das reações mais promissoras e o reuso do biocatalizadores frente a diferentes condições reacionais.

2.0 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho foi realizar o estudo da dessimetrização do derivado 1,3-di-*O*-benzil-*mio*-inositol (S1) por meio da catálise utilizando lipases.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Estudar a Resolução cinética de derivados aquirais de 1,3-di-*O*-benzil-*mio*-inositol catalisadas por lipases em solvente orgânico;
- Selecionar o melhor par lipase-substrato utilizando lipases comerciais;
  Investigar a influência de diferentes solventes e agentes acilantes na reação enantiosseletiva;
- Estudar a cinética das reações de dessimetrização de 1,3-di-*O*-benzil-*mio*-inositol com os agentes acilantes e solventes mais promissores;
- Estudar o reuso dos biocatalizadores comerciais mais promissores.

3.0 Revisão Bibliográfica

3.1 Rotas para a obtenção de compostos enantiomericamente puros

Os estereocentros dos carbonos quaternários, isto é, átomos de carbono portadores de quatro substituintes diferentes, são um desafio para síntese orgânica (TROST & JIANG, 2005). Atualmente, existem alguns métodos para a obtenção de compostos enantiomericamente puros. Esses métodos podem ser divididos em categorias, dependendo do tipo do material de partida utilizado, como visto na Figura 1.

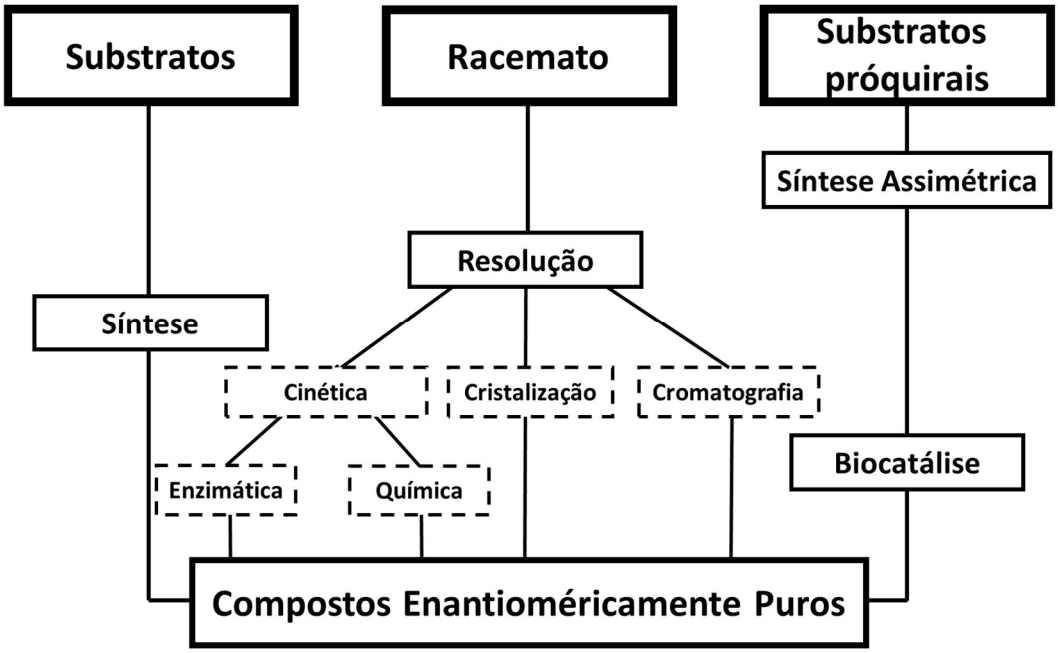


Figura 1: Métodos para obtenção de compostos enantiomericamente puros (Adaptado de GHANEM *et al.,* 2004).

A resolução de enantiômeros pode ser dividida em três categorias dependendo do substrato a ser utilizado: resolução cinética, cristalização e cromatografia. Dois métodos podem ser utilizados para a obtenção de compostos enantioméricamente puros utilizando enzimas, a resolução de racematos e a dessimetrização a partir de precursores pró quirais (ELIEL, 2008).

Na resolução cinética catalisada por lipases o sucesso da mesma depende da interação entre cada um dos dois enantiômero com a enzima. Sendo assim, a diferença de velocidade de formação enzima-substrato resultará na resolução preferencial de um enantiômero. A resolução cinética de compostos racêmicos é, de longe, a transformação mais comum catalisada por lipases, na qual a enzima cataliza

a reação de tranferência de um grupo acil de um enantiomero mais rapidamente que o outro (GHANEM *et al*.,2004).

De acordo com a recomendação da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), a resolução cinética é definida como a realização de resolução completa ou parcial de um racemato em virtude da diferença nas velocidades de reação dos enantiômeros (R e S) proporcionadas por um agente quiral (reagente, solvente e catalisador químico ou enzimático). Os enantiômeros interagem com o agente quiral para gerar dois estados de transição diasteroisoméricos. A variação da energia livre de Gibbs (ΔG) em cada estado de transição define a velocidade de conversão dos enantiômeros onde ,um reage mais rapidamente que e o outro (GHANEM, 2007).

Na resolução cinética o substrato de partida é uma mistura racêmica, entretanto, outra metodologia que vêm sendo bastante explorada na síntese quimio-enzimática, para a obtenção de compostos enantiomericamente puros, é a dessimetrização. Na dessimetrização o substrato de partida não possui um estereocentro, sendo ele denominado de um precursor pró-quiral. A dessimetrização apresenta vantagens únicas, como a menor possibilidade de impedimento estérico e c substratos, muitas das vezes, mais fáceis de serem preparados. (Zeng, *et al.,* 2016). Além disso, o rendimento teórico da dessimetrização pode alcançar o máximo de 100%, enquanto o rendimento teórico da resolução cinética não pode exceder 50% para se obter um produto que contenha apenas com um único enantiômero. Deste modo, devido a essas vantagens, há o interesse crescente no desenvolvimento de reações de dessimetrização enantiosseletiva (Zeng, *et al.,* 2016). Por outro lado, como a máxima conversão na resolução cinética é de 50%, existem outras técnicas que possibilitam que sejam alcançadas conversões maiores, como a Resolução Cinética Dinâmica (DKR), onde são empregados metais ou solventes quirais, a fim de auxiliar na reracemização do enantiomero não reagido (WARNER *et al*.,2013).

Apesar dos novos progressos na síntese assimétrica, o método de produção que prevalece para obter um único enantiômero na síntese industrial é a resolução cinética enzimática (GHANEM *et al.,* 2004).

3.2. Lipases

Lipases (EC. 3.1.1.3) são definidas como enzimas que atuam nas ligações éster catalisando a hidrólise de triacilgliceróis, cujos ácidos graxos sejam de cadeia média ou longa. Geralmente a hidrólise ocorre na interface água/lipídio. Além da hidrólise, na presença de solventes orgânicos, podem ser levadas a cabo reações de síntese, tais como esterificação e transesterificação (HOUDE *et al*., 2004, REIS *et al*., 2009). Por outro lado, as esterases (EC 3.1.1.13) são definidas como enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres e triacil gliceróis de cadeia curta liberando ácidos graxos livres em meio aquoso, A maioria das esterases conhecidas foram relatadas como possuindo tanto atividade de lipase como atividade de esterase sendo também capazes de realizar reações de síntese na presença de solventes orgânicos. Pela razão de não haver uma classificação exata que defina uma cadeia longa de acordo com o número de carbonos, alguns autores a definem como os triacilgliceróis que são constituídos por ácidos graxos com mais de 10 carbonos. Ambas enzimas são definidas como carboxilesterases (EC 3.1.1) e como produto da reação de hidrolise do triacilglicerol há a liberação de ácidos graxos e glicerol (Figura 2) (JAEGER *et al*., 1994; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

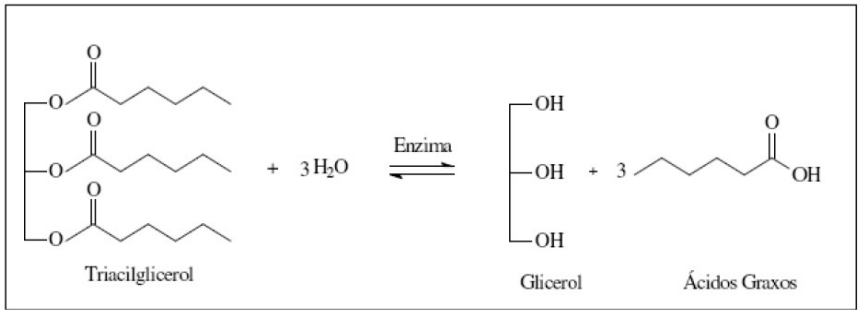


Figura 2: Reação de hidrólise catalisada por lipases (reproduzido de MANOEL, 2011)

Uma vez que as lipases são capazes de realizar catálise de reações em ambientes com baixa atividade de água, essas enzimas podem atuar na síntese de mono, di ou triacilglicerois a partir de ácidos graxos e glicerol (SAXENA *et al*., 1999). Apesar de os substratos de preferências das lipases serem os triglicerídeos de cadeia longa, esses biocatalisadores também atuam em diversos ésteres não lipídicos (substratos não naturais). A facilidade com que essas enzimas catalisam uma gama de substratos não naturais e de diversos tamanhos sugere que a espinha dorsal

polipeptídica da mesma seja flexível, podendo adotar diferentes conformações. Consequentemente, a baixa barreira energética necessária para que ocorram as mudanças conformacionais dificulta a modelagem e a previsão de interações estereoquímicas para esse grupo de biocatalisadores (COSTA e AMORIN, 1999).

As lipases catalisam uma série de reações diferentes. Os processos básicos que fundamentam o mecanismo catalítico (hidrólise e síntese de ésteres) podem ser associados pela enzima para resultar em reações de acidólise, alcoólise e transesterificação, dependendo dos reagentes de partida empregados e do solvente utilizado. Além de água e álcool, outros compostos podem ser utilizados, como nucleófilos em reações catalisadas por essas enzimas. Dessa forma, as lipases podem catalisar outras reações como aminólise, tiotransesterificação, lactonização e peroxidação em solventes orgânicos, com elevada seletividade (KRIEGER *et al.*, 2004; CASTRO *et al.*, 2004; SALIHU & ALAM, 2015). A Figura 3 ilustra as principais reações catalisadas por lipases.

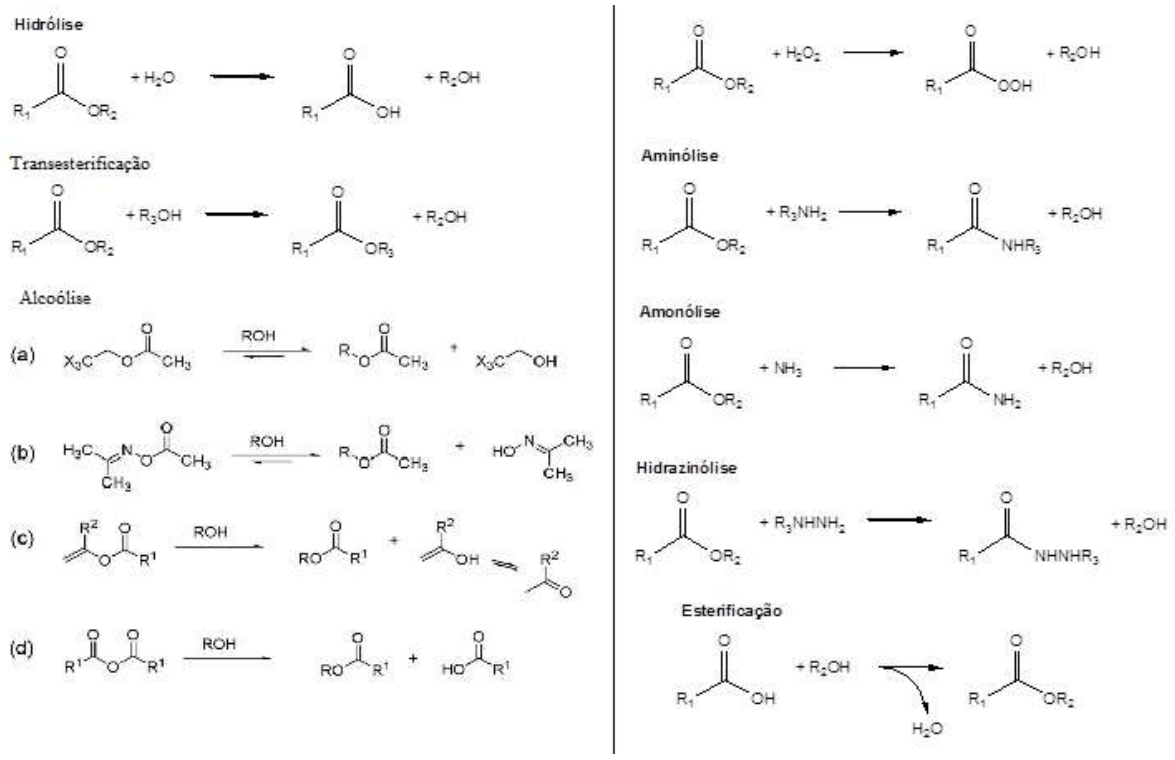


Figura 3: Reações catalisadas por lipases. (Modificado de GOTOR *et al.,* 2006 por CUNHA, 2009).

As lipases são amplamente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de microrganismos selvagens ou geneticamente modificados e ainda a partir de fontes animais e vegetais. Os bioprocessos são os principais meios utilizados na produção de lipases, pois apresentam maior facilidade de controle, maior capacidade produtiva e custo de obtenção reduzido (BALCÃO *et al.,* 1996 e PANDEY *et al.,* 1999). Do ponto de vista econômico e industrial, as lipases mais utilizadas são aquelas obtidas por microrganismos (bactérias, leveduras e fungos), devido à sua relativa facilidade de produção, abundância de microrganismos capazes de sintetizá-las, alta velocidade de síntese, alto rendimento de conversão de substrato em produto, grande versatilidade, estabilidade em condições extremas (SALIHU & ALAM, 2015) e maior simplicidade na manipulação ambiental e genética de sua capacidade produtiva (ILLANES, 1994; FREIRE e CASTILHO, 2010, BARRIUSO, *et al.,* 2016). Os fungos são especialmente valorizados porque as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, o que facilita a sua recuperação do meio de fermentação.

3.2.1 Estrutura proteica de lipases

Até o presente momento, as lipases caracterizadas possuem massa molecular entre 19 e 60 kDa e apresentam uma estrutura terciária comum, formada pelo dobramento canônico, ou seja, o dobramento α/β hidrolase (Figura 4) comum às lipases, que é altamente conservado. Quanto à estrutura secundária, no enovelamento de α/β hidrolase canônico, o núcleo central é formado por 8 a 11 cadeias de folhas β altamente retorcidas, no qual a maioria dessas folhas são paralelas. As Folhas β são conectadas e flanqueadas em ambos os lados por α hélices , sendo seis cadeias no total (POUDEROYEN *et al.*, 2001; MARCHOT & CHATONNET, 2012). As folhas β têm orientação para a esquerda, e a primeira e a última fita possuem um ângulo de aproximadamente 90º entre si.

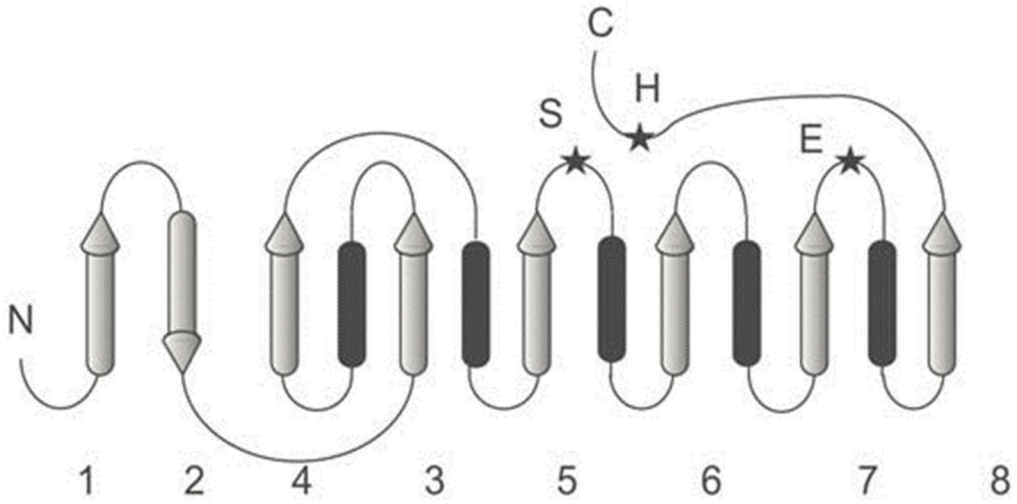


Figura 4: Diagrama esquemático do enovelamento canonico α/β-hidrolase. As cadeias β, numeradas a partir do N-terminal para o C-terminal, estão indicadas por setas cinzas e α-hélices por cilindros pretos. As posições dos resíduos nucleófilos (S) / histidina (H) / ácidos (E) (Reproduzido de MARCHOT & CHATONNET, 2012).

Para a ligação do substrato, estas enzimas possuem muitas vezes uma estrutura anfipática móvel que cobre o sítio ativo catalítico chamada tampa hidrofóbica ou *lid,* que está envolvida na seletividade de lipases (SECUNDO *et al.,* 2006). Essa estrutura está presente geralmente na posição β8, que prolonga-se sobre o conjunto central de fitas β e sobre o sítio catalítico. Segundo GHANEM (2007), a provável função da tampa hidrofóbica é na interação com a interface lipídeo-água, no fenômeno de ativação interfacial (item 4.2.2), no qual essa estrutura sofre uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo e favorecendo a ligação ao substrato. O tamanho e o formato da tampa varia de lipase para lipase, a exemplo da lipase B de *Candida antarctica* que possui um tampa quase inexistente, já a lipase de *Bacillus thermocatenulatus*, que possui uma segunda tampa (Fernandez-Lafuente, 2010).

O sítio ativo da lipase é formado por uma tríade catalítica constituída pelos resíduos de aminoácidos Serina (Ser), Ácido Aspártico (ou Glutâmico) e Histidina (His). O nucleófilo catalítico, Ser, é responsável pela catálise e interage por ligações de hidrogênio a um resíduo de His; o resíduo carboxilado ligado ao mesmo resíduo de histidina será o terceiro resíduo, o ácido (um aspartato ou glutamato). Essa tríade também pode ser encontrada nas serino-proteases (SCHRAG e CYGLER, 1991,1997; JAEGER *et al.,* 1994; EGLOFF *et al.,* 1995; JAEGER e REETZ, 1998; JAEGER *et al.,* 1999 EGGERT *et al*., 2001; REIS, *et al.*, 2009). A Ser catalítica está localizada na região C-terminal da fita β5 e faz parte de um pentapeptídeo altamente conservado

(JAEGER & REETZ, 1998). Além da tríade, no sítio ativo das lipases há a cavidade do oxiânion, que é um bolso envolvido na catálise. Essa cavidade é formada quando a tampa hidrofóbica se move. Uma excessão à regra é a lipase de *Candida rugosa,* na qual a cavidade está formada mesmo com a tampa fechada (SKJOLD-JØRGENSEN *et al.,* 2006).

Apesar do enovelamento de α/β hidrolase, ser bem conservado diferenças de tamanho, estrutura e posição podem fazer parte da estrutura das lipases conferindo a elas propriedades específicas para a seletividade e/ou afinidade ao substrato (Barriuso *et al.*, 2016).

3.2.2 Fenômeno da ativação interfacial em Lipases

Uma característica única de muitas lipases é o fenômeno da ativação interfacial.. Foi demonstrado há muito tempo que a lipase pancreática exibia pouca atividade quando o triglicerídeo encontra-se solúvel em água. Contudo, uma vez que a concentração do substrato (triglicerídeo) excedesse o limite de solubilidade, a velocidade da reação aumentava dramaticamente (REIS *et al*, 2009).

Em 1958, SARDA e DESNUELLE propuseram definir lipase utilizando como critério a propriedade de ativação na presença de substratos insolúveis em água e emulsionados, ou seja, na presença de uma interface lipídeo/água. Os autores observaram a diferença na atividade das esterases e das lipases. Pela classificação dos autores, as esterases eram as enzimas cuja atividade aumentava em função da concentração do substrato de acordo com o modelo clássico de Michaelis e Menten. Neste modelo a velocidade máxima ocorria antes do limite de solubilidade do substrato ser atingido e antes de ocorrer a formação de micelas (gotas de emulsão) e/ou interfaces. Por outro lado, a atividade das lipases se caracterizou por manter-se constante até que a concentração micelar crítica (CMC) do substrato no sistema fosse alcançada. A partir no momento em que a CMC era alcançada a velocidade de formação de produto aumentava. A esse fenômeno de aumento da atividade enzimática quando há formação de interfaces deu-se o nome de ativação interfacial (SARDA e DESNUELLE, 1958; COSTA e AMORIM, 1999; REIS *et al* 2009; SKJOLD-JØRGENSEN, *et al.,* 2016.). A Figura 5 mostra dois gráficos que ilustram o fenômeno da ativação interfacial.

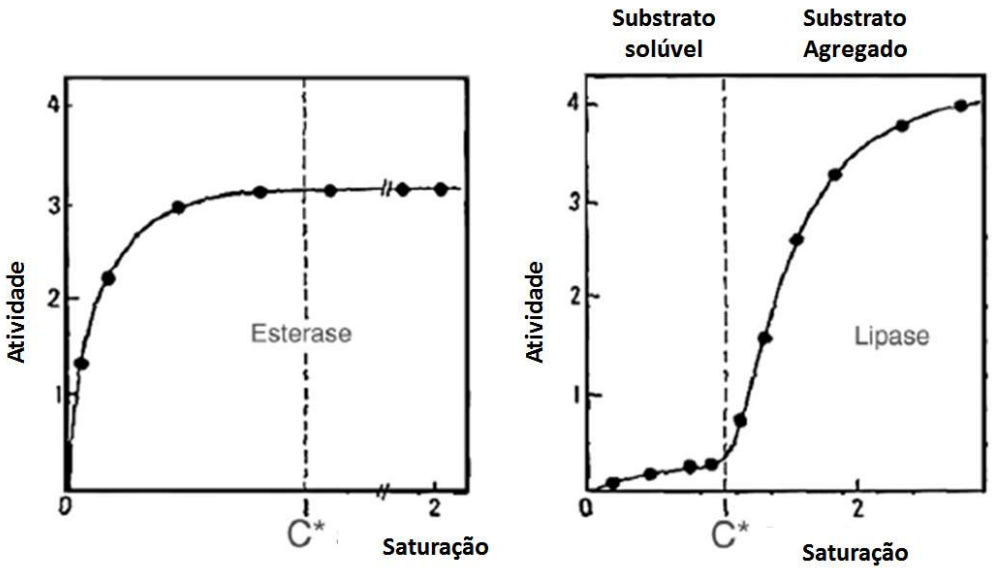


Figura 5: Hidrólise de triacetina pela lipase pancreática e esterase como função da concentração do substrato (Adaptado de REIS *et al.,* 2008, redesenhado de HASAN, *et al*, 2006)

O mecanismo de catálise e o processo de ativação interfacial foram elucidados a partir da resolução da estrutura tridimensional de várias enzimas. O emprego da cristalografia de raios-X permitiu obter a resolução da estrutura tridimensional de algumas lipases como as de *Rhizomucor miehei, Pseudomonas glumae*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida rugosa, Geotrichum candidum,* lipase de pâncreas humano, lipase gástrica humana e de alguns animais, como lipases caninas , em suas formas inativa e ativada interfacialmente (BRZOZOWSKI *et al*., 1991; BRZOZOWSKI *et al*., 2000; GROCHULSKI *et al*., 1994 e ROUSSEL *et al*., 2002) (Figura 6).

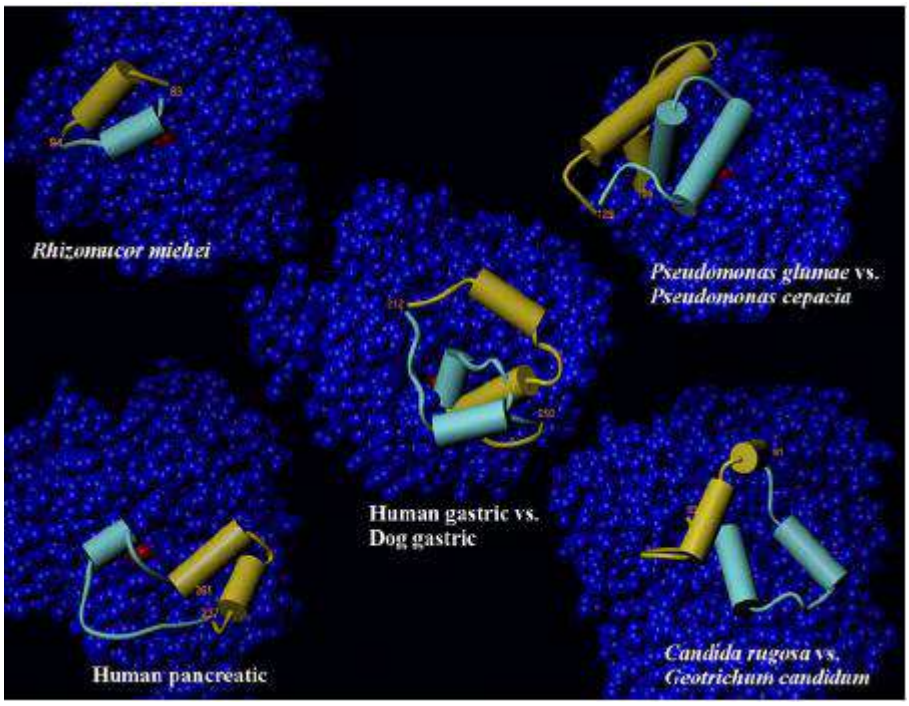


Figura 6:Conformações tampa fechada (azul) e tampa aberta (amarelo) em várias lipases. Reproduzido de ALOULOU *et al.,* (2006).

A ativação interfacial ocorre quando a tampa hidrofóbica entra em contato com outra molécula hidrofóbica na interface. A tampa então se move, levando a uma mudança conformacional da enzima, expondo o sítio ativo e permitindo a catálise da reação (ALOULOU *et al.*, 2006). A mudança conformacional que ocorre durante o processo de ativação interfacial pode ter diferentes magnitudes de acordo com a lipase utilizada. Por exemplo, nas lipases de *Rhizomucor miehei,* a espinha dorsal da enzima é deslocada 7Å, expandindo em 750Å^2 a área hidrofóbica da superfície da enzima (DEREWENDA *et al.,* 1992). Entretanto, outras lipases sofrem alterações conformacionais mais complexas, como o caso da lipase pancreática humana, nas quais a mudança ocorre nas estruturas secundária e terciária. A alteração ocorre de maneira que tanto a tampa como a fita β5 se adaptam totalmente à nova conformação na presença de fosfolipídios e sais biliares. O movimento de abertura da tampa cria uma região eletrofílica próxima do resíduo serina do sítio ativo, denominada cavidade do oxiânion, que é responsável pela estabilização das cargas negativas do intermediário tetraédrico do estado de transição formado durante a hidrólise do éster. As lipases que não possuem a tampa, como a lipase de *Pseudomonas aeruginosa*, apresentam a cavidade do oxiânion pré-formada. (ALOULOU *et al*., 2006).

Do ponto de vista estrutural, existem evidências que sugerem que a tampa pode alterar a atividade catalítica e que ela determina seletividade de algumas lipases (SECUNDO *et al.,* 2006; BARRIUSO *et al*, 2016). As lipases de *Geotrichum candidum* (SCHRAG *et al*., 1991), *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* e *Rhizomucor miehei* (CAJAL *et al.*, 2000 a,b; OLLIS *et al.*, 1992, BRADY *et al.*, 1990) são exemplos de lipases que apresentam a tampa em suas estruturas e sofrem ativação interfacial. Entretanto, em outros casos, a existência da tampa não implica na ativação interfacial. Esse é o caso das lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e da lipase B de *Candida antarctica* (JAEGER e REETZ, 1998 a, JAEGER *et al.,* 1994). Por outro lado, as cutinases, que são as menores lipases de estrutura conhecida (19 kDa), não apresentam a tampa catalítica e não precisam da interface para exercer sua atividade hidrolítica (CYGLER & SCHRAG, 1997; YAO e KÖLLER, 1994). Dessa forma, o fenômeno de ativação interfacial e a existência da tampa hidrofóbica não são suficientes para a caracterização desta enzima. Por isso, o conceito de ativação interfacial foi substituída pela definição de que lipases são carboxilesterases capazes de catalisar a hidrólise de acilgliceróis de cadeia média e longa (VERGER, 1997; FREIRE e CASTILHO, 2010; BARRIUSO, *et al.,* 2016). O fato da maioria das lipases conhecidas ser ativada na interface orgânico-aquosa, proporcionou o desenvolvimento de diversas metodologias de estudo da ativação interfacial (FREIRE e CASTILHO, 2010).

Dependendo da lipase, a localização topológica da tampa hidrofóbica varia. Além disso, o tamanho e complexidade geralmente aumentam com o aumento da quantidade de amino ácidos na sequência primária (JAEGER *et al.,* 1999). A diversidade estrutural entre lipases de diferentes origens é representada esquematicamente na Figura 7.

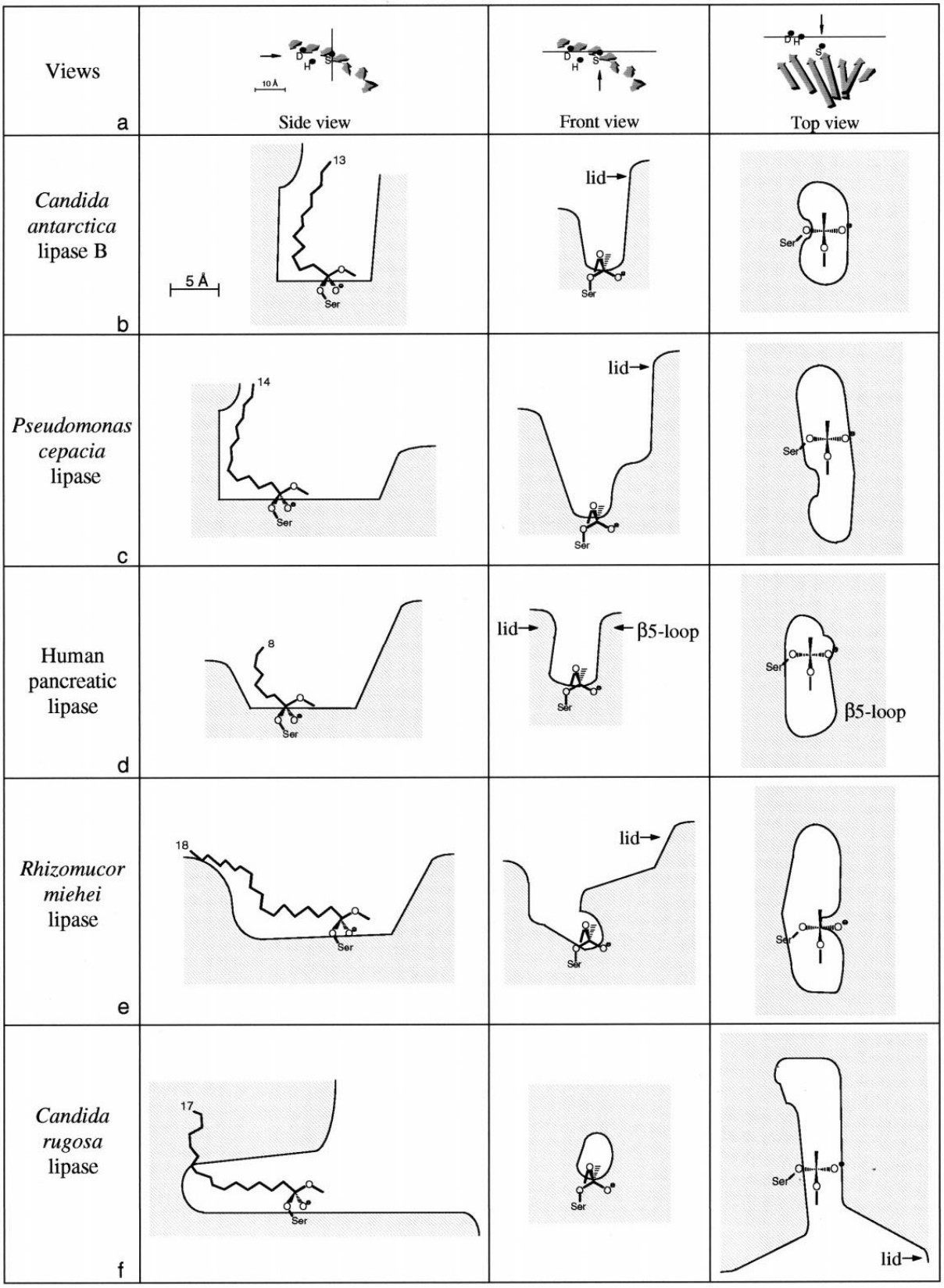


Figura 7: Representação esquemática do sítio de ligação em diferentes lipases. Observa-se que nos exemplos (b) a (f) apenas um modelo do ácido graxo é mostrado, a espécie álcool foi omitida para maior clareza da representação (Reproduzido de PLEISS *et al.*, 1998).

3.2.3 Aplicação Industrial das Lipases

As lipases podem ser usadas como catalisadores biológicos na fabricação de ingredientes alimentares e na indústria de química fina. Essas enzimas são comumente aplicadas no processamento de gorduras, óleos, alimentos, couro, têxteis e detergentes, na fabricação de papel, na síntese de produtos químicos finos e na produção de produtos farmacêuticos, cosméticos, aromas, etc. As lipases também pode ser utilizadas para acelerar a degradação de gorduras em rejeitos. Outros usos e o detalhamento das reações são citados na Tabela 1 (SINGH & MUKHOPADHYAY, 2012).

Tabela 1. Principais áreas aplicações, produtos e tipos de reações desempenhadas pelas lipases

Reação	Áreas de Aplicação	Aplicação	Produtos	Referência
Hidrólise	Alimentos (laticínios)	Hidrólise da gordura do leite	Agentes flavorizantes para queijos e derivados	HASAN et al., 2006; VILLENEUVE et al., 2000 ; SINGH & MUKHOPADHYAY, 2012
	Alimentos (Chá)	Hidrólise da camada lipídica das folhas	Chá mais aromático	SINGH & MUKHOPADHYAY, 2012 ; RAMARETHINAM et al., 2002
	Industria Química (Processa-mento do Óleo)	Hidrólise de óleos e gorduras	Produtos Ácidos graxos, diglicerídeos e monoglicerídeos (emulsificantes, reagentes para análise de lipídios).	HASAN et al., 2006; OSÓRIO et al., 2001; UNDURRAGA et al., 2001; VILLENEUVE et al., 2000; SILVA et al., 2003 ; Leal et al., 2006 SINGH & MUKHOPADHYAY, 2012
	Química Detergente	Remoção de manchas de óleo	Detergentes para lavanderias e uso doméstico	HASAN et al., 2006; KIRK et al., 2002; SHARMA et al., 2001 SINGH & MUKHOPADHYAY, 2012
	Cortumes	Remoção do excesso de gordura da pele	Couro produzido em condições mais brandas	PUVANAKRISHNAN et al., 1988; SINGH & MUKHOPADHYAY, 2012
	Tratamento de efluentes	Hidrólise de camadas de gordura superficiais de Biodigestores	Permissão da passagem de oxigênio, aumento do tempo de funcionamento do Biodigestor	BAILEY & OLLIS, 1986; JEGANATHAN et al., 2007; SINGH & MUKHOPADHYAY, 2012
	Industria Têxtil	Remoção de lubrificantes	Tecido que absorverá melhor a cor	HASAN et al., 2006 ; SINGH & MUKHOPADHYAY, 2012
Esterificação	Química Fina	Aplicações Síntese de ésteres	Produtos Intermediários quirais ésteres, emulsificantes e sabões, aromas	HASAN et al., 2006; VILLENEUVE et al., 2000 ; SINGH & MUKHOPADHYAY, 2012
	Química de alimentos	Esterificação ou transesterificação de óleos e gorduras	Flavorizantes e aromatizantes	HASAN et al., 2006; OSÓRIO et al., 2001; UNDURRAGA et al.,2001; VILLENEUVE et al., 2000; SILVA et al., 2003 ; SINGH & MUKHOPADHYAY, 2012
	Química farmacêutica	Síntese de intermediários de medicamentos preparação de intermediários homoquirais	Precursores e/ ou moléculas biologicamente ativas	HASAN et al., 2006; KIRK et al., 2002; SHARMA et al., 2001 ; SINGH & MUKHOPADHYAY, 2012

Transesterificação	*Biocom-bustíveis*	*Aplicações Transesterificação de óleos vegetais*	*Produtos Biodiesel*	*SALIS et al., 2005; HSU et al., 2004; SALIS et al., 2003; SHIMADA et al., 2002; ZHANG et al., 2002; ISO et al., 2001; ABIGOR et al., 2000; SOUZA et al., 2010; CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2011 ; RIBEIRO, et al., 2011*

Embora a aplicação de lipases se apresente de forma vasta, determinados setores vêm ganhando destaque, como o setor farmacêutico, alimentício, detergentes, agroquímico, tratamento de efluentes e oleoquímica (CAMAROTA e FREIRE, 2006, LEAL *et al.*, 2002; BARON, 2003; WAKABAYASHI, *et al.* 2003; SINGH & MUKHOPADHYAY, 2012).

3.2.4 Principais Microrganismos Utilizados Para a Produção de Lipases

Não há dúvidas que as fontes de lipases mais exploradas são os fungos seguidos pelas bactérias. Isso se deve ao fato de que fungos produtores de lipases podem ser encontrados em diversos habitats, incluindo solos contaminados com óleos, resíduos de óleos vegetais, sementes e alimentos deteriorados, lagos, vulcões, etc. (SINGH & MUKHOPADHYAY, 2012). Além disso, as lipases fúngicas são na maioria extracelulares, o que torna o processo de produção facilitado, dispensando purificações por processos cromatográficos de alto custo. Em comparação com as lipases de plantas e mamíferos, as lipases microbianas são mais adequados para as aplicações industriais devido à facilidade de produção, fermentação relativamente barata e estabilidade em solventes orgânicos. A indústria continua procurando novas fontes de lipases com diferentes características, o que estimula o isolamento e a seleção de novas cepas (SINGH & MUKHOPADHYAY, 2012; BARRIUSO, 2016).

Fungos de diversos gêneros demonstraram ser bons produtores de lipases e as suas enzimas têm sido estudadas sob o ponto de vista acadêmico e industrial. As lipases de *Aspergillus niger*, *A. oryzae, Mucor javanicus, Rhizopus niveus, R. oryzae, Penicillium camembertii, P. roqueforti* e da levedura *Candida rugosa* são comercializadas atualmente pela Amano® (Amano Europe Enzyme Ltd., UK) para processamento de óleos, gorduras e queijos, para a determinação de triglicerídeos, como aditivos em preparações digestivas e para síntese quiral (http://www.amano-enzyme.co.jp/). Gêneros de fungos cujas lipases são de reconhecida importância

comerciais por sua produção massiva são: *Penicillium sp., Aspergillus sp., Mucor sp., Ashbya sp., Geotrichum sp., Beauveria sp., Humicola sp., Rhizomucor sp., Fusarium sp., Acremonium sp., Alternaria sp., Eurotrium, Sp., Ophiostoma sp*., etc.. A produção de lipase pelos fungos varia de acordo com a cepa, a composição do meio de crescimento, as condições de cultivo, temperatura, pH e fontes de carbono e de nitrogênio (SINGH & MUKHOPADHYAY, 2012).

Dentre as bactérias produtoras de lipases comerciais, estão disponíveis as enzimas de *Pseudomonas sp., P. fluorescens, Bulkholderia (Pseudomonas) cepacia* e *Arthrobacter sp*., utilizadas em síntese assimétrica de moléculas quirais. O crescimento celular mais rápido que o dos fungos é uma das vantagens das fontes bacterianas (JAEGER *et al.*, 1999). Apesar de as lipases produzidas por vegetais terem sido purificadas e estudadas quanto às suas características bioquímicas e quanto ao seu potencial em biotransformação de lipídeos, essas são pouco exploradas em escala industrial. Dentre as enzimas lipolíticas vegetais estudadas estão as triacilglicerol lipases, as acil-hidrolases não específicas como as fosfolipases A1, A2 e B, as glicolipases, as sulfolipases e monoacilglicerol lipases, além das fosfolipases C e D (MUKHERJEE, 1994). Entre as espécies estudadas estão *Ricinus communis, Vernonia, Pinus, Brassica napus, Cuphea racemosa* (HELLYER *et al.,* 1999), *Euphorbia characias , E. wulfenii* (PALOCCI *et al.,* 2003; CAVALCANTI *et al*., 2007) e *Jatrophas curcas (*DE SOUSA *et al.,* 2010) .

Lipases humanas têm sido largamente estudadas devido às implicações que sua estimulação ou inibição têm sobre a saúde humana, como problemas associados com a obesidade. Diversas são as doenças que podem ser tratadas utilizando fármacos cujos alvos são lipases. Por exemplo, quando alguns indivíduos apresentam dor epigástrica e/ou apresentam diarreia após ingerirem lipídeos, essa condição é chamada de dispepsia e pode ser tratada com suplementação de lipases antes da refeição (LEVINE, 2015). Um exemplo são os medicamentos que contém pancreatina, como o Pankreoflat®, produzido pelo laboratório Aspen. Como descrito na bula, nesse medicamento está presente um *pool* de enzimas pancreáticas suínas.

Uma condição cujo tratamento está ligado à inibição das lipases é a obesidade. O fármaco Orlistat é um potente inibidor específico das lipases gastrintestinais que atua impedindo a hidrólise dos lipídeos ingeridos, impossibilitando que sejam absorvidos nos enterócitos (GUERCIOLINI, 1997). Outra condição é a

hipercolesterolemia, que é causada por altos níveis de colesterol e triglicerídeos no sangue, podendo levar ao desenvolvimento de aterosclerose. Essa condição pode ser causada pela diminuição da remoção de triglicerídeos circulantes devido à diminuição da atividade da lípase lipoproteica, ou pelo aumento da secreção hepática de VLDL. O aumento o da atividade desta lipase é um dos mecanismos de ação da classe de fármacos dos Fibratos (MUKHERJEE, 2003).

3.3. Aplicação de lipases na síntese de fármacos

A principal importância da aplicação de lipases na síntese de fármacos é na resolução de compostos racêmicos, uma vez que apenas um dos enantiômeros é biologicamente ativo, enquanto o outro pode ser tóxico, inativo ou ter menor atividade biológica. Com isso, a síntese de compostos orgânicos nas indústrias de química fina farmacêutica requer etapas de resolução óptica para a obtenção produtos enantiomericamente puros (ANOVÁ e HUTTA, 2003; ETAYO *et al.*, 2013).

O interesse e a necessidade da produção de moléculas enantiopuras têm aumentado significativamente. De fato, a comercialização de fármacos racêmicos é proibida por diferentes agências regulatórias de diversos países: Nos Estados Unidos, pela Agência reguladora *Food and Drugs Administration* (FDA), na Europa, pelo *European Committee for Proprietary Medicinal Products,* no Canadá, pelo *Health Canada and Pharmaceutical and Medical Devices* e no Japão, pela Agência reguladora Japonesa (IMRAN *et al.,* 2013). Além disso, esses orgãos determinaram que cada enantiômero de um potencial fármaco deve ser caracterizado separadamente quanto à sua atividade biológica (BREUER *et al*, 2004; SKORIDOU *et al*., 2004; TRÄFF *et al.*, 2011).

A falta da pureza enantiomética em um medicamento pode gerar inúmeros problemas de saúde. O caso mais conhecido foi o da Talidomina. Esse medicamento era um hipnóptico leve, prescrito para o tratamento de enjoos, e chegou ao mercado em 1956, mas foi retirado em 1961 devido às más formações fetais. O caso foi uma tragédia e resultou no nascimento de milhares de bebês com focomielia. Posteriormente, descobriu-se que o efeito teratogênico da talidomida advinha do enantiômero de configuração absoluta S, enquanto a R-Talidomida não causou má formação em embriões de camundongo e coelho. (ERIKSSON *et al.,* 1995 ; LIMA *et al*., 2001; ETAYO *et al*., 2013).

3.4. Lipases de *Rhizomucor miehei* e *Thermomices Lanuginosus*

Duas lipases mostraram destaque neste trabalho e serão discutidas mais detalhadamente.

3.4.1. Lipase de *Rhizomucor miehei*.

A lipase de *Rhizomucor miehei* (RML) apresenta massa molecular de 31 kDa. A primeira aplicação dessa enzima foi na indústria alimentícia, uma vez que ela é capaz de catalisar a hidrólise de gorduras, óleos, vegetais, sebo e vários outros substratos sintéticos, como ésteres de sorbitol de ácidos graxos (MOSKOWITZ *et al.,* 1977; RODRIGUES *et al.,* 2009). A enzima é comercializada pela Novozymes® na forma livre chamada de Palatase 2000 ou na forma imobilizada por adsorção ionica no suporte Duolite ES 562 chamada de Lipozyme RM-IM.

A RML foi a primeira lipase cuja estrutura foi resolvida (Figura 8). Portanto, tem sido o tema de muitos estudos e seu mecanismo de ativação interfacial já é bem descrito (DEREWENDA, 1992; RODRIGUES *et al.,* 2009).

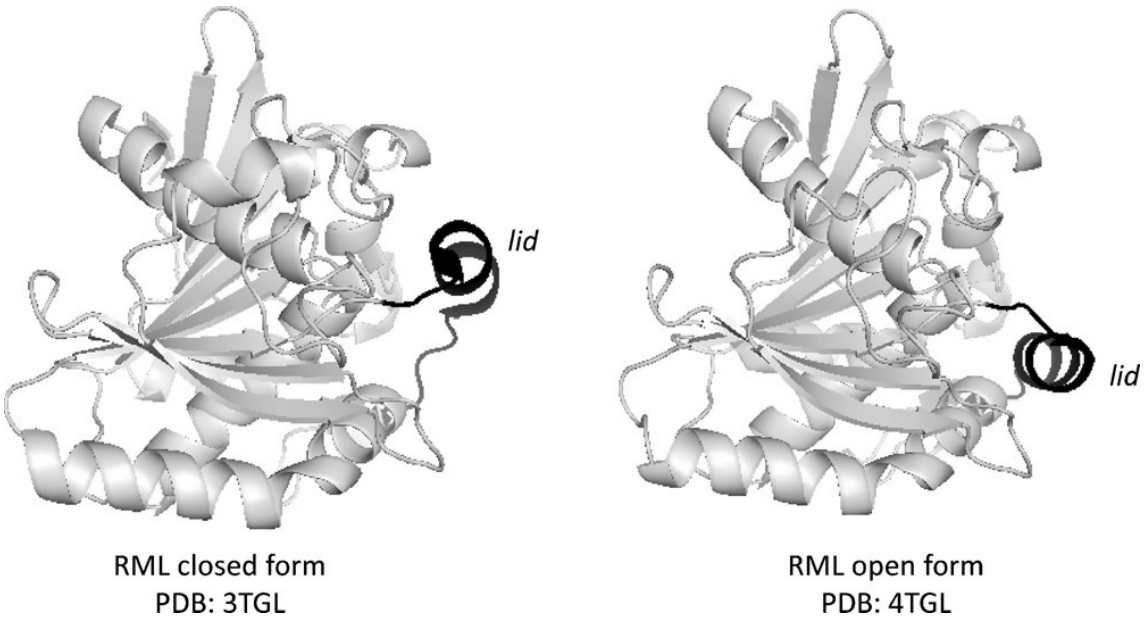


Figura 8: Estrutura das formas aberta e fechada da RML. A estrutura 3D foi obtida a partir do Protein Data Bank (PDB) utilizando Pymol (Reproduzido de Rodrigues *et al*, 2009).

Na presença de solventes orgânicos a atividade da RML aumenta. Esse fenômeno pode ser devido ao aumento da solubilidade dos substratos e/ou alterações conformacionais na estrutura da enzima levando à ativação interfacial. Aditivos como detergentes iônicos podem aumentar em duas vezes a atividade dessa lipase mesmo em meio orgânico. Em contraste, a atividade da RML é inibida na presença de

detergentes catiônicos, pois eles levam à inativação da enzima. Dessa forma, tensoativos aniônicos (isto é, com caudas hidrofóbicas longas, por não serem reconhecidas como substratos da RML) são os melhores surfactantes para reações que utilizam RML como catalisador, nas quais é necessário formar microemulsões. Além disso, a Lipase de *R. Miehei* tende a formar dímeros, com atividade baixa.. Esses dímeros podem ser quebrados por detergentes (por exemplo, Triton X-100). Esse é outro efeito dos detergentes que deve ser considerado quando essa enzima é usada na forma livre. A imobilização na presença de detergentes parece ser uma boa opção para não ocorrer a imobilização de dimeros com baixa atividade (Rodrigues *et al.,* 2009).

Dentre as aplicações mais recorrentes da RML estão a produção de biodiesel via alcoólise ou transesterificação, síntese de ésteres via ácidos carboxílicos ou álcoois e resolução de misturas racêmicas. A resolução de misturas racêmicas pode ser feita via hidrólise ou pela síntese de ésteres. Na resolução por hidrólise ocorre a supra discutida resolução cinética, na qual um dos dois enantiômeros terá a reação catalisada mais rapidamente que o outro, resolvendo a mistura racêmica. Já na resolução de racematos via esterificação ou transesterificação duas são as possibilidades. A primeira é via resolução cinética e a segunda é a dessimetrização de compostos meso. A utilização da RML para resolução de racematos via esterificação ou transesterificação é mais comum do que via hidrólise (Rodrigues *et al.,* 2009).

3.4.2. Lipase de *Thermomyces lanuginosus*

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) (antigamente *Humicola lanuginosa*) é comercializada pela empresa Novozymes® na forma livre com o nome de Lipolase 100 L e na forma imobilizada com o nome de Lipozyme TL-IM. A Lipolase 100 L é produzida por uma cepa geneticamente modificada de *Aspergillus oryzae*. O suporte utilizado na imobilização TLL para produzir Lipozyme TL-IM é um silicato e a imobilização ocorre por adsorção iônica.

A TLL é uma proteína de cadeia simples constituída por 269 aminoácidos. O seu peso molecular é de 31.700 g/mol. A TLL possui aproximadamente forma esférica, com um tamanho de 35 Å × 45 Å × 50 Å, e contém um núcleo central de oito fitas β, predominantemente paralelas com cinco Hélices α . A Figura 9 mostra as estruturas aberta e fechada dessa enzima. A tampa hidrofóbica é um anel formado por uma α

hélice compreendendo os resíduos de aminoácidos 86 ao 93. Essa tampa é altamente móvel. O sítio ativo da TLL possui a tríade catalítica típica, Ser-His-Asp. A TLL é bastante estável, mantendo estabilidade em temperaturas de 55-60 ◦C, com o máximo de atividade em pH em torno de 9 (Fernandez-Lafuente,2010).

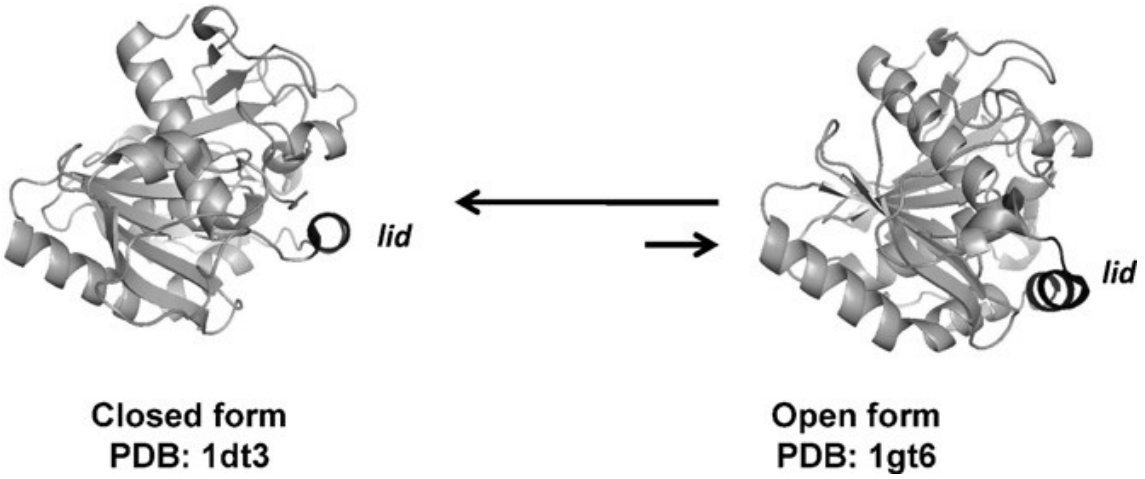


Figura 9:Estrutura de formas aberta e fechada da TLL. A estrutura 3D foi obtida a partir do Protein Data Bank (PDB) utilizando Pymol (Reproduzido de Fernandez-Lafuente, 2010)

Assim como a RML, a TLL também tem tendência a formar dímeros unidos pela região hidrofóbica do sítio catalítico. Esses dímeros impedem a aproximação do substrato, levando à diminuição da atividade catalítica. Detergentes são capazes de quebrar as interações enzima-enzima, produzindo a forma monomérica da enzima. Além disso, podem também estabilizar a forma aberta da lipase (Fernandez-Lafuente, 2010).

Na TLL, a cavidade do oxianion não está formada até o momento da abertura da tampa e o resíduo de Serina 83 move-se para posição correta para ligação -NH com o oxigénio parcialmente carregado sobre o grupamento carbonila do substrato. Quando a tampa da TLL se abre, expõe-se uma grande área hidrofóbica em torno do sitio ativo, de cerca de 750 $Å^2$, o que corresponde a cerca de 8% da superfície total da enzima. Essa superfície hidrofóbica serve para ancorar a lipase na interface água-lípideo, permitindo que o substrato penetre no bolso, para iniciar a catálise (SKJOLD-JØRGENSEN *et al*, 2016).

A alta estabilidade e atividade da TLL permitem a utilização dessa enzima na maioria dos meios reacionais disponíveis, de bifásicos (meios de água-solvente orgânico), meios sem solvente orgânico, meios compostos por apenas solvente orgânico a líquidos iônicos e fluidos super críticos. Muitos processos são catalisados por essa enzima. A TLL é usada para modificação de óleos e gorduras por hidrólise

ou transesterificação, tanto na indústria alimentícia quanto na oleoquímica, e na produção de lipídeos estruturados para produtos que substituem o leite materno. Essa enzima também é empregada na produção de biodiesel e em síntese orgânica na produção de diversos compostos, como produtos químicos úteis para alimentos, pesticidas e produtos farmacêuticos. A TLL também é aplicada na resolução de misturas racêmicas e na dessimetrização de compostos pró-quirais. Outras aplicações que valem ser destacadas é o emprego dessa enzima na degradação de polímeros, tratamento de efluentes de abatedouros, pré-tratamento da lã, etc. (Fernandez-Lafuente, 2010).

3.4. Mecanismo Cinético de lipases

O mecanismo cinético mais aceito que descreve a ação das lipases é o Ping Pong Bini. Esse mecanismo consiste em duas etapas. Após a abertura da tampa, ocorre um ataque nucleofílico na ligação éster do substrato causado pelo átomo de oxigênio do grupo hidroxila do resíduo Serina do sítio ativo. Isso resulta na formação do complexo enzimático acilado e desprendimento de espécie álcool do substrato original. Após essa etapa, ocorre hidrólise do complexo enzimático acilado, resultando na regeneração da enzima (JAEGER *et al.*, 1999; PAIVA *et al.*, 2000; REIS *et al.*, 2009). A Figura 10 apresenta de forma esquemática as etapas da hidrólise catalisada por lipases e os estados transientes formados, como se segue:

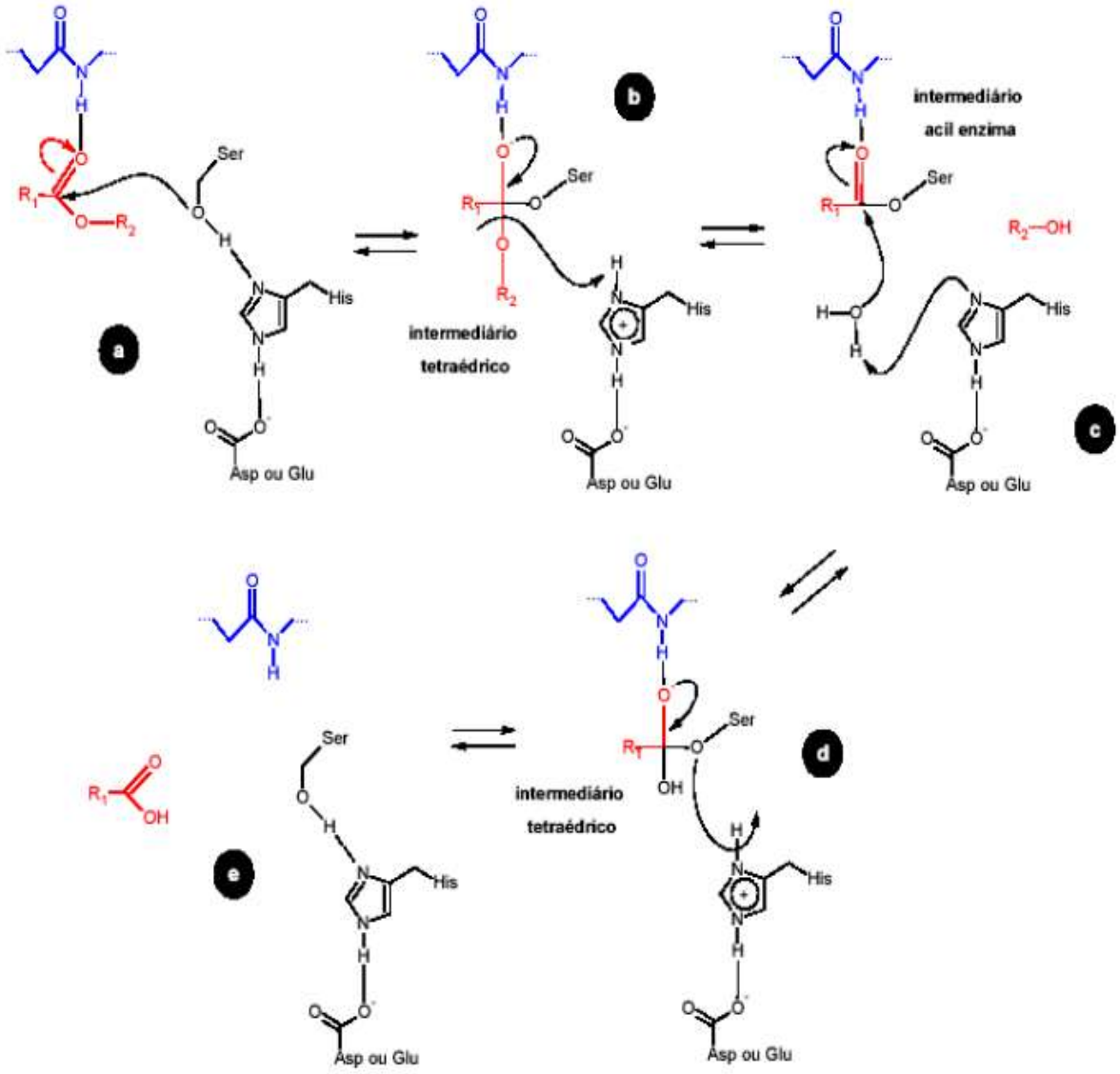


Figura 10: Esquema da reação de hidrólise de ligações éster catalisada por esterases e lipases. *A tríade catalítica e a água são mostradas em preto, os resíduos da cavidade do oxiânion em azul e o substrato em vermelho. Modificado de JAEGER et al. (1994) por ALMEIDA (2005).*

a. O resíduo de serina é ativado. Essa ativação ocorre por desprotonação da carboxila. Para que essa ativação ocorra, necessita-se de Histidina e de um resíduo ácido (aspartato ou glutamato). Com o aumento de sua nucleofilicidade, o resíduo de Serina faz um ataque nucleofílico no átomo de carbono da carbonila do substrato, levando ao rompimento da ligação C=O, originando o intermediário tetraédrico. Nessa fase, a Histidina da tríade catalítica tem um papel fundamental atuando como aceptor

do hidrogênio liberado pela Serina, em seu anel imidazólico. O Aspartato (ou Glutamato) estabiliza a carga positiva formada na Histidina.

b. O intermediário tetraédrico formado é estabilizado por ligações de hidrogênio com os grupamentos amida dos resíduos pertencentes à chamada “cavidade do oxiânion”. Esses resíduos são representados em azul na Figura 10.

c. Em seguida, o intermediário tetraédrico é desfeito pela formação de uma nova ligação C=O, o que leva à clivagem da ligação C-O do éster. O oxigênio, liberado após a clivagem da ligação C-O, recebe um próton proveniente da Histidina, formando assim um álcool que é liberado da enzima. Ocorre a formação do intermediário covalente na forma enzima “acilada”, na qual o componente ácido do substrato encontra-se esterificado com o resíduo serina da enzima. A molécula de água que se aproxima é ativada pelo resíduo Histidina adjacente, e o íon hidroxila resultante promove o ataque nucleofílico ao átomo de carbono da carbonila do intermediário covalente.

d. Há o ataque ao carbono suscetível do intermediário acil-enzima, abrindo a ligação C=O, formando um segundo intermediário tetraédrico devido ao caráter nucleofílico de uma molécula de água. O caráter nucleofílico é ainda acentuado pela ação básica da Histidina protonada.

e. É reestabelecida uma ligação C=O. O segundo intermediário tetraédrico é desfeito levando à liberação do ácido carboxílico e regeneração do sítio catalítico na forma da enzima livre. (JAEGER *et al.,* 1999; PAIVA *et al.,* 2000; Reis, *et al.*, 2009).

A Figura 11 apresenta de forma esquemática o mecanismo Ping Pong Bi Bi envolvendo substratos e produtos múltiplos usando a notação de Cleland.

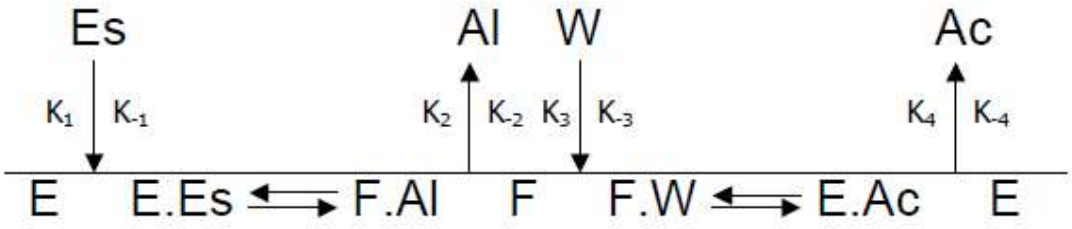


Figura 11: Mecanismo cinético (Ping Pong Bi Bi) de reações com múltiplos produtos e substratos catalisadas por lipases (E: enzima; Es: éster; Al: álcool; Ac: ácido; W: água; i = 1,2,...,I; j=1,2,...,J) (Reproduzido de MANOEL, 2011).

Quando a água está presente em excesso no meio reacional (ou seja, a concentração de água permanece constante) a equação genérica que descreve o mecanismo Ping Pong Bi Bi pode ser simplificada em uma expressão bem mais simples, semelhante a expressão de taxa de reação de Michaelis-Menten, representada pela Equação 1 (MANOEL, 2011):

$$r = \frac{Vmax\ aparente\ [ES]}{Kmaparente + [ES]}$$

(Equação 1) onde, max aparente definida como max,f[W]/(Km,W + [W]) denota a taxa máxima aparente da reação no sentido direto (hidrólise) e Km, aparente definido como Km,Es[W]/(Km,W + [W]) denota uma constante de Michaëlis-Menten aparente.

3.5. Dessimetrização de derivados pró-quirais catalisado por lipases

A quiralidade é uma propriedade geométrica e diz-se que uma molécula que não pode ser sobreposta à sua imagem especular é quiral, enquanto que uma molécula aquiral é aquela na qual sua imagem especular pode ser sobreposta à original sem rompimento ou formação de ligações. Assim, compostos que apresentam centro assimétrico irão apresentar-se na forma de estereoisômeros. Esse elemento de simetria frequentemente é o carbono tetraédrico no qual estão ligados quatro diferentes grupamentos, ou seja, o carbono assimétrico. Os estereoisômeros são divididos em diastereoisômeros, cujas moléculas possuem diferentes arranjos espaciais de seus ligantes mas não são imagens especulares sobreponíveis umas das outras, e enantiômeros, nos quais a molécula apresenta a geometria e a disposição espacial de seus átomos igual à imagem especular do seu par complementar, sendo que somente compostos quirais apresentam esta característica (MARCH, 1992; CAREY & SUNDBERG, 2007).

A construção de compostos quirais contendo um ou mais estereocentros é um desafio para a química orgânica sintética contemporânea (HANESSIAN *et al.,* 2013). Como supramencionado, a resolução cinética é a abordagem mais comum para a obtenção de compostos enantiomericamente puros ou enriquecidos. Dessa maneira, ambos enantiômeros de um racemato são convertidos em produto a taxas diferentes. Uma resolução ideal ocorre quando as velocidades de reação dos dois isômeros são muito diferentes, de forma que um dos enantiomeros permanece

virtualmente não reagido. A vantagem da dessimetrização, frente à resolução cinética, é que na resolução cinética o rendimento máximo teórico é de 50% enquanto na dessimetrização ele pode chegar a 100% (CUNHA *et al.,* 2015; ZENG, *et al.,* 2016).

Nos métodos tradicionais, a indução quiral é geralmente um dos primeiros estágios da via sintética devido à limitação do substrato e às metodologias disponíveis para gerar ou induzir quiralidade passo a passo. Assim, o controle remoto de centros quirais permanece um desafio, mas que muitas das vezes pode ser contornado pela utilização de um método correto (CUNHA *et al.,* 2015).

A dessimetrização de compostos aquirais ou meso constitui uma estratégia interessante para a obtenção de compostos enantiomericamente enriquecidos, uma vez que apresenta vantagem de fornecer o produto desejado com teoricamente 100% de rendimento. Além disso, vários centros estereogênicos podem ser estabelecidos simultaneamente, alguns dos quais podem estar distante do local de reação, de forma que seria difícil introduzí-los por outros meios (CUNHA *et al.,* 2015; MANNA & MUKHERJEE, 2015). Contudo, a aplicação de qualquer transformação enantiosseletiva para a dessimetrização não é uma tarefa trivial. Tipicamente uma reação de dessimetrização requer um processo de quebra da simetria no qual o catalisador deve ser capaz de discriminar entre dois átomos ou grupos enantiotópicos (MANNA & MUKHERJEE, 2015).

Devido à relativa rigidez conformacional, os compostos cíclicos são frequentemente preferidos como substratos para a dessimetrização. Além disso, uma grande variedade de compostos enantio-enriquecidos carbocíclicos altamente funcionalizadas foi sintetizada por reações catalíticas assimétricas de dessimetrização. A acilação dos álcoois livres por meio de uma reação de transesterificação ou de hidrólise do acilo dos álcoois tem sido utilizada na dessimetrização enzimática. (Manna & Mukherjee, 2015).

O parâmetro utilizado para determinar se uma reação foi enantiosseletiva é o excesso enatiomérico. Quando a obtenção do produto enantio puro é realizada por resolução cinética, o excesso enantiomérico é a diferença das frações molares dos enantiômeros da mistura com relação ao substrato. Já quando a obtenção do produto enantio puro é realizada por dessimetrização, excesso enantiomérico é a diferença entre as frações molares dos enantiômeros presentes no produto, uma vez que o substrato era simétrico (CHEN *et al.*, 1982; Manoel, 2011).

3.6. Influência do solvente

Diversos fatores podem afetar uma reação de resolução enantiomérica, desde o sistema de solventes empregado, que tem o poder de alterar a especificidade, qui*mio*-, regio- e enantiosseletividade das lipases, até o teor de água presente na reação. Apesar da grande influência da natureza do solvente sobre a enantiosseletividade da enzima, ainda não foi estabelecido um consenso sobre qual parâmetro melhor descreve a influência do solvente sobre a reação enzimática (COSTA e AMORIM, 1999, LIU *et al*., 2009).

O uso exclusivo de água como solvente restringe a gama de aplicações da biocatálise, bem como limita a produtividade de diversos processos que envolvem substratos hidrofóbicos. Adicionalmente, a constatação de que muitas enzimas operam *in vivo* em ambientes ricos em lipídeos e a estabilidade de lipases a solventes orgânicos levaram à conclusão de que os meios não aquosos são meios alternativos para a biocatálise (KAPOOR & GUPTA, 2012; BEZBORODOV & ZAGUSTINA, 2016; SALIHU & ALAM, 2015). Além disso, observa-se que a utilização de solventes orgânicos desloca o equilíbrio termodinâmico na direção da esterificação ou transesterificação, em detrimento da hidrólise (SALIHU & ALAM, 2015). A convergência desses aspectos conduziu à incorporação ao rol de meios reacionais usados em biocatálise como solventes orgânicos, líquidos iônicos, fluídos supercríticos, fases gasosas ou sólidas, conhecidos hoje como meios não convencionais (AIRES, 2002). Os solventes orgânicos têm sido utilizados como meios reacionais para biotransformações enzimáticas em inúmeros processos de síntese orgânica. Muitos estudos vêm empregando diferentes sistemas de solventes na resolução enantiosseletiva (COSTA e AMORIM, 1999, LIU *et al.,* 2009). A seletividade das enzimas, incluindo enantio-, régio- e qui*mio*sseletividades, é alterada na presença de diferentes solventes, o que pode ser atribuído às modificações conformacionais (alteração de estrutura e flexibilidade) causadas pelo estabelecimento de diferentes tipos de interações enzima-solvente (SHEN *et al.,* 2008; SALIHU & ALAM, 2015).

Em biocatálise, as propriedades dos solventes como polaridade (1/ε), hidrofobicidade (geralmente determinada como log P- logaritmo do coeficiente de partição em água-octanol), geometria molecular e habilidade de solvatação são fatores significativos. Dois parâmetros são utilizados por diferentes autores para caracterizar as propriedades físico-químicas dos solventes: log P e constante

dielétrica (ε). Dentre eles, o log P é o mais utilizado para auxiliar na escolha de um solvente mais propício para a reação. Primeiro, porque esse parâmetro é uma medida direta da hidrofobicidade; segundo, porque seu valor pode ser facilmente determinado por método padrão ou calculado com base nas constantes hidrofóbicas tabeladas; e terceiro, porque esse parâmetro possui sensibilidade a pequenas diferenças de polaridade das moléculas (CHUA & SARMIDI, 2006). O Log P é definido como o logaritmo do coeficiente de partição de uma substância em um sistema padrão de duas fases água/1-octanol (ADLERCREUTZ, 1994). Apesar de numerosas exceções, o parâmetro log P é o que apresenta melhor correlação com a atividade enzimática e, geralmente, as lipases apresentam maior atividade em solventes com caráter hidrofóbico (log P>2) (YANG & RUSSEL, 1996; SALIHU & ALAM, 2015). Contudo, o efeito do solvente é distinto para cada uma delas. A Tabela 2, a seguir, lista alguns solventes de uso comum e seus respectivos valores de log P.

Tabela 2: Valor de log P de solventes orgânicos (uma vez que diminui a camada de solvatação do sítio ativo) que o enantiômero lento, diminuindo a enantiosseletividade da reação (SAKURAI *et al.,* 1988).

SOLVENTE	LOG P
METANOL	-0,76
ACETONITRILA	-0,33
ETANOL	-0,23
ACETATO DE ETILA	0,68
TBME	1,5
CLOROFÓR*MIO*	2,0
HEXANO	3,5

A forma como os solventes afetam a atividade enzimática e a enantiosseletividade ainda não é bem compreendida. As hipóteses existentes, até o momento, para explicar esse fenômeno apresentam discrepâncias entre si (COSTA & AMORIM, 1999). Pode-se observar nos trabalhos que exploram esse tema a preocupação em salientar que os resultados alcançados são restritos aos sistemas estudados, evitando-se generalizações.

Diversos autores têm relatado a influência da hidrofobicidade do solvente na enantiosseletividade de enzima. De maneira geral, o efeito tem sido analisado em termos de partição de moléculas de água presentes no sítio ativo da enzima

(SAKURAI *et al.,* 1988) ou de grupos funcionais dos substratos (TAWAKI & KLIBANOV, 1992). Sakurai e colaboradores (1988) observaram uma correlação linear entre a diferença de energia livre de ativação (ΔG) para a transesterificação entre o éster N-acetil-2-cloroetil-alanina e propanol e os valores de log $P_{solvente}$ dos 13 diferentes solventes orgânicos empregados, utilizando subtilisina como catalisador da reação. Os autores encontraram uma relação inversa entre o valor ΔG e da hidrofobicidade, expressa em valores de log P e, como consequência, uma relação inversa na enantiosseletividade. O antagonismo entre esses fatores ocorre, principalmente, pela dificuldade no deslocamento das moléculas de água presentes na cavidade hidrofóbica do sítio catalítico durante a formação do complexo enzima-substrato. O deslocamento das moléculas de água é termodinamicamente menos favorecido em solventes hidrofóbicos do que em solventes hidrofílicos. O enantiômero lento (menos reativo) normalmente se liga de forma não produtiva à enzima, o que significa que a complementariedade do estado de transição desse é menos eficiente que a do enantiômero rápido. Um dos aspectos da falta de complementariedade é que, para que ocorra a reação, o enantiômero lento precisa deslocar mais moléculas de água que o rápido. Em solventes hidrofóbicos, essas moléculas não estarão presentes no sitio catalítico. Nesse caso, o enantiômero rápido sofre, proporcionalmente, uma maior diminuição na sua reatividade em relação ao lento.

Geralmente, solventes hidrofóbicos (com Log P elevados) são preferidos para o uso em reações catalisadas por lipases, uma vez que eles produzem pouco ou nenhum efeito de retirada da camada de solvatação da estrutura protéica, prevenindo a desnaturação e mantendo a estrutura conformacional da enzima. Moléculas do solvente podem também podem interagir com a estrutura proteica e exercer efeitos ativadores ou estabilizadores. Esses efeitos também podem estar relacionados com a presença do suporte quando se trabalha com enzimas imobilizadas (PENCREACH & BARATTI, 1997; SALIHU & ALAM, 2015).

Dentre os efeitos ativadores, podemos citar a interação dos aminoácidos hidrofóbicos da tampa. Essa interação mantém a tampa aberta, expondo o sítio catalítico e permitindo a formação da cavidade do oxiânion, que pode levar ao aumento da atividade da enzima. O efeito do solvente orgânico apolar na enzima mimetiza na estrutura o efeito da ativação interfacial, que ocorre quando o substrato atinge a CMC (RÚA *et al.*,1993; KAPOOR *et al.* 20015*;* SALIHU & ALAM, 2015).

NAKAMURA e colaboradores, em 1991, criaram um modelo empírico para a escolha do solvente mais adequado para reações catalisadas por lipases. Segundo os autores, solventes cíclicos são os mais adequados para encontrar uma maior enantiosseletividade. Os autores estudaram a influência da estrutura do solvente na reação entre 1-nitro-propanol e acetato de vinila, utilizando lipase de *Pseudomonas sp.* como biocatalisador. Eles observaram que em solventes lineares era obtida maior enantiosseletividade do que quando os respectivos solventes ramificados eram empregados. Constataram ainda que em série homóloga aos cicloalcanos a enantiosseletividade diminuía conforme o aumento do número de carbonos na estrutura dos solventes cíclicos. Isso foi explicado pela facilidade dos solventes lineares e cíclicos (com um menor número de carbonos) se acomodarem mais facilmente à cavidade menor do sítio ativo da enzima.

3.7. Inositóis

O inositol é um poliálcool cíclico contendo um anel de seis átomos de carbono e seis grupos OH (cicloexanopoliol), que está envolvido em diferentes processos bioquímicos. Em mamíferos, os inositóis se encontram em forma de derivados fosforilados, os quais participam da sinalização celular (ALMEIDA *et al.,* 2003).

Os inositóis ainda participam da cascata de fosfoinositídeos (Figura 12).

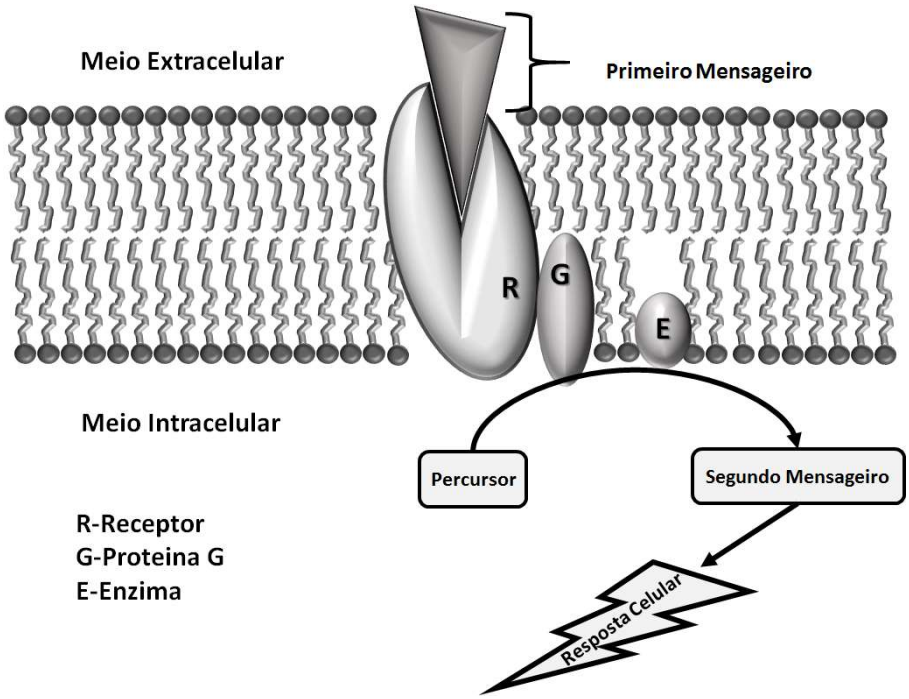


Figura 12. Mecanismo de transdução celular (Redesenhado de Manoel 2011)

Os hormônios endócrinos têm a finalidade de transportar “informações” entre os diferentes tecidos sobre o funcionamento do organismo com a finalidade de manter a homeostase. Essas moléculas são os primeiros mensageiros e circulam no meio extracelular, podendo ser hormônios, fármacos, íons gases ou fatores. Esses primeiros mensageiros participarão da sinalização celular, sendo reconhecidos por receptores na membrana das células. Para que o evento celular atinja sua magnitude, ele deve ser amplificado. Isso faz com que uma série de eventos comece a ocorrer no interior da célula, que levarão à liberação de um segundo mensageiro (p. ex., um derivado do *mio*-inositol, AMPc), o qual ocasiona diversas respostas em nível celular. O derivado trifosfatado InsP3 é o 2º mensageiro mais importante dos derivados dos inositóis.

Os inositóis podem ser arranjados em nove estereoisômeros: *scilo*, *mio, neo, epi,* D e L *quiro, cis, muco e allo* (Figura 13).

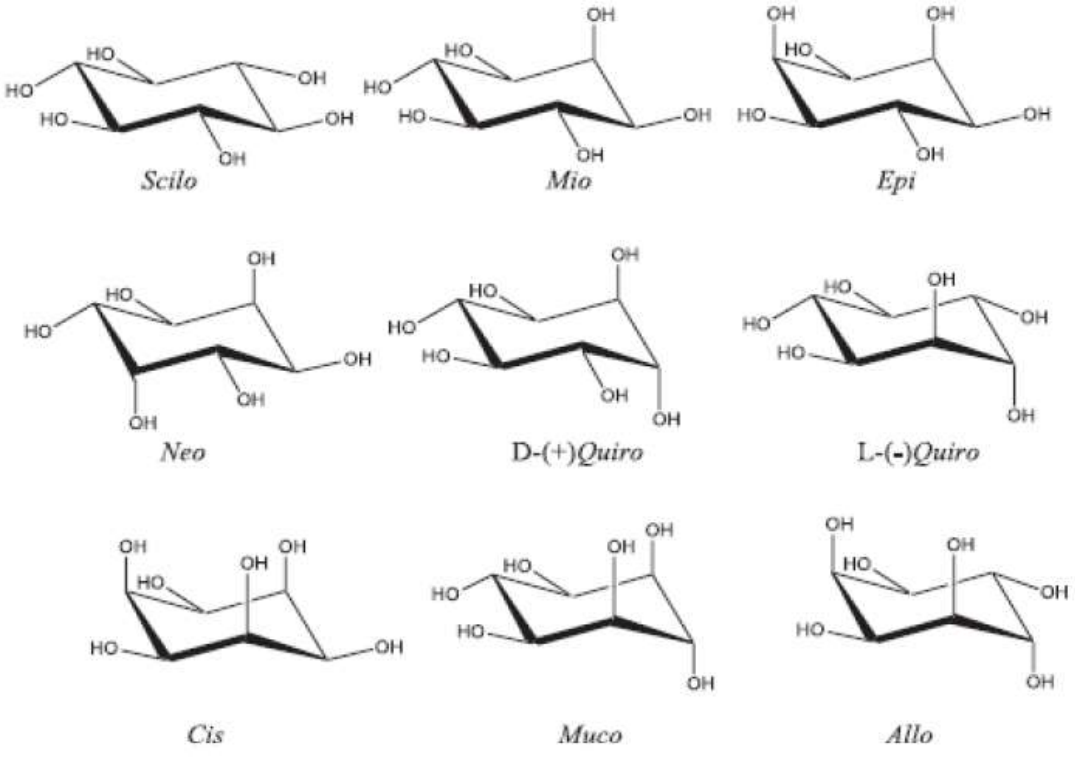


Figura 13 : Estereoisômeros do inositol (Reproduzido por ALMEIDA *et al.,* 2003)

Dos estereoiômeros do inositol, o *mio*-inositol é o mais abundante na natureza, sendo produzido a partir da glicose. O *mio*-inositol é um composto meso (aquiral), visto que apresenta um plano de simetria entre os carbonos C2 e C5 (Figura 13).

Mio-inositóis mono-substituídos, de forma não estereosseletiva, nas posições 1, 3, 4 ou 6 geram racematos. Pesquisadores da UFRJ e colaboradores descobriram que o 1-D-6- desóxi-6-flúor-*mio*-inositol (6-FIns), um análogo fluoretado quiral não comercial de *mio*inositol, é um forte inibidor do crescimento do *Trypanosoma cruzi,* agente etiológico da Doença de Chagas (OLIVEIRA e EINECKER-LAMAS, 2000). A literatura mostra que tem havido um interesse considerável na síntese de derivados de *mio*-inositol (SCHEDLER & BAKER, 2004; KOZIKOVSKI, 1990; VASCONCELOS, *et al.,* 2014; CUNHA *et al.,* 2013; MANOEL *et al.,* 2012, 2013, 2015). Um dos obstáculos para trabalhos de Síntese Orgânica / Química Medicinal voltados para inositóis é a dificuldade de síntese dessas substâncias. Processos de múltiplas etapas estão envolvidos (SURESHAN *et al.*, 2003; POTTER & LAMPE, 1995; BILLINGTON, 1989). Devido à sua disponibilidade, boa parte dos estudos realizados nessa área utiliza o próprio *mio*-inositol para a construção de derivados quirais dessa substância. As rotas baseadas no uso do *mio*-inositol têm como vantagem o uso de reações simples e disponibilidade de protocolos bem estabelecidos. Entretanto, a resolução óptica dos intermediários racêmicos é um desafio (SURESHAN *et al.,* 2003; POTTER &LAMPE, 1995; SIMAS *et al.*, 2011; CUNHA *et al.*, 2010).

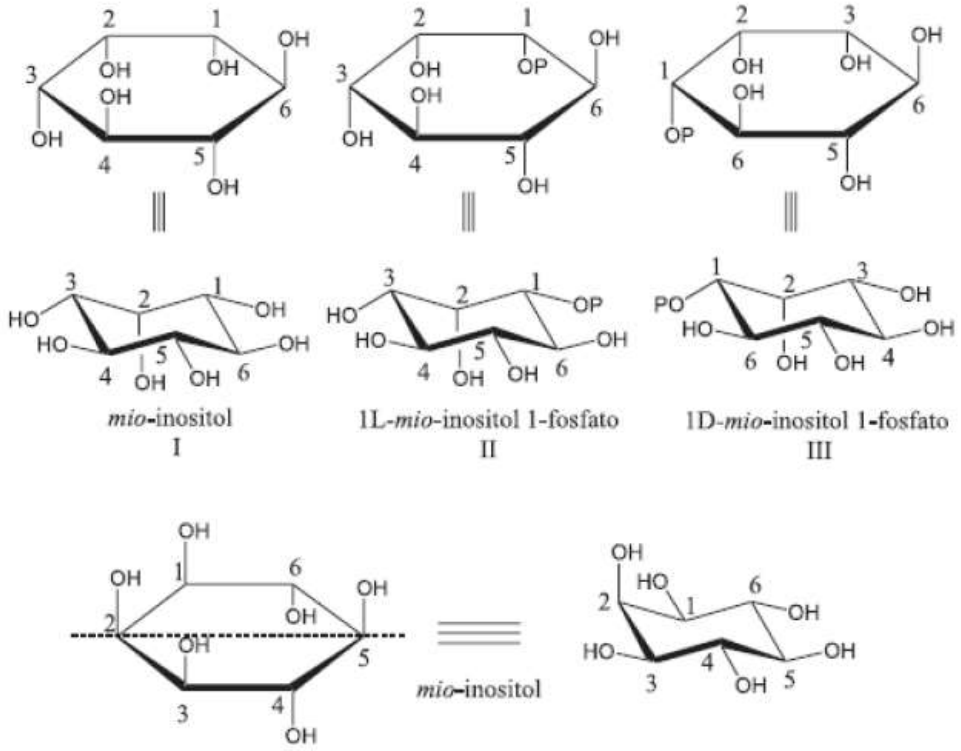


Figura 14: Nomenclatura e plano de simetria do mio-*inositol (Reproduzido por ALMEIDA* et al.*, 2003).*

4.0 Materiais e Métodos

As lipases utilizadas neste trabalho foram de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM), de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM) e *de Candida antarctica* B (Novozym 435), obtidas pela Novozymes®. Também utilizaram-se as lipases de *Pseudomonas* sp.(PS Amano, PSC Amano II e PS-IM), *Pseudomonas fluorescens* (AK Amano), *Candida rugosa* (AY-30 Amano), *Penicillium camemberti* (lipase G Amano) e *Rhizopus oryzae* (lipase D Amano), obtidas pela Amano®. Além disso, utilizou-se a Lipomod 34P, obtida pela Biocatalysts®.

4.1 Síntese química do substrato a ser estudado

Neste trabalho utilizou-se o substrato 1,3-di-O-benzil-*mio*-inositol. A síntese química desse substrato foi desenvolvida por PAIS (2014). Durante o trabalho atual, o substrato foi sintetizado pela farmacêutica Bárbara de Jesus, do IPPN-UFRJ. A síntese foi feita em apenas uma etapa, obtendo-se 44% de rendimento. Doravante, o substrato será chamado de S1 (Simétrico 1), e é mostrado Figura 15

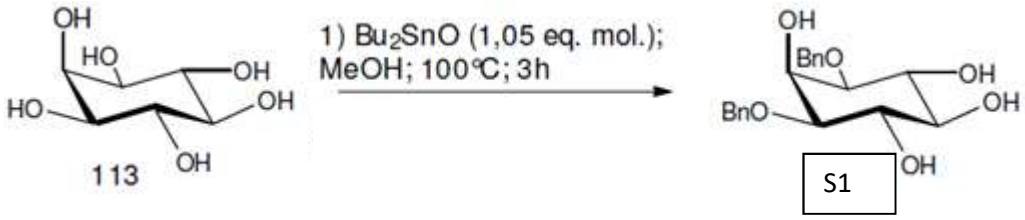


Figura 15: Reação realizada no Laboratório Roderick-Barnes para a síntese do substrato usado na dissertação.

4.2. Seleção das lipases que catalisam a reação de acetilação

As reações enzimáticas foram realizadas em frascos fechados termostatizados e agitados magneticamente. O equipamento utilizado pode ser visto na Figura 16.

Figura 176: Fotografia da aparelhagem real e esquema do sistema experimental empregado nas reações de acetilação enzimática

A reação *era conduzida com* 5mg de substrato dissolvidos em 2 mL de acetato de etila (EtOAc), acetato de vinila ou acetato de vinila: hexano (6:4) e 50mg de enzima imobilizada ou liofilizada a 30°C.

4.3 Efeito do agente acilante na conversão e na enantiosseletividade sobre a dessimetrização de S1.

Diferentes agentes acilantes foram usados com o objetivo de estudar a influência dos mesmos nas reações. As reações enzimáticas foram realizadas em frascos fechados termostatizados contendo 5 mg de substrato dissolvidos em 2 mL de agente acilante (EtOAc, acetato de vinila ou anidrido acético) em sistema livre de solvente, 200 U de enzima (atividade em U/g está representada na Tabela 3) a 30°C. Alíquotas de 50µL foram retiradas nos intervalos de 0, 24, 48, 72, 96 h. As reações foram paralisadas pela remoção do biocatalisador do meio reacional e o solvente foi evaporado em capela. As amostras foram resolubilizadas com 0,5 mL de fase móvel acetronitrila:H2O (60:40) para a análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa e em coluna quiral.

4.4 Efeito do solvente na conversão e na enantiosseletividade sobre a reação de dessimetrização de S1.

Para as reações em que a acetilação resultou em formação de produto assimétrico, seguiu-se com a análise do efeito do solvente. Dada a reconhecida influência do solvente na enantiosseletividade e taxa de conversão, diferentes

solventes orgânicos (grau analítico, Vetec® e Tédia®) foram avaliados, em duplicata, para a reação de dessimetrização dos derivados do *mio*-inositol, catalisada pelas diferentes lipases: terc-metil butil éter, hexano, EtOAc, acetato de vinila e diclorometano. As reações enzimáticas foram realizadas em frascos fechados termostatizados contendo 2,5 mg do substrato selecionado dissolvidos em 1,0 mL de solvente (terc-metil butil éter, hexano, EtOAc, acetato de vinila e diclorometano), 1 mL de acetato de vinila e 200U enzima a 30°C.

Alíquotas de 10µL foram retiradas nos intervalos de 0, 24, 48, 72, 96 . As reações foram paralisadas pela remoção do biocatalisador do meio reacional igualmente como descrito no item 5.2. As amostras foram ressolubilizadas com 500µl de fase móvel acetronitrila: água (60:40) para a análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em fase reversa e em coluna quiral. O volume injetado foi de 25µL na coluna em fase reversa e 50 µL na coluna quiral.

4.5 Métodos Analíticos

4.5.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) das reações de acetilação

4.5.1.1 Análise da conversão

A análise de conversão do substrato em produto acetilado foi feita em CLAE em fase reversa, com coluna Agilent Zorbax -C18, uma bomba Quaternária Agilent 1260 Infinity, fase móvel acetonitrila:água (60:40) com velocidade de fluxo de 0,5mL/min e coluna termostatizada a 40°C com no forno Agilent 1260 Infinity LC. Foi utilizado o detector UV/visível de comprimento de onda variável Agilent 1260 Infinity LC com comprimento de onda 215nm e a integração do cromatograma foi feita utilizando o programa OpenLab. O tr (tempo de retenção) do padrão do substrato foi de 4,5 min. O tr referente ao seu respectivo mono-O-acetilado foi 8,3 min. As Figuras 17 e 18 apresenta os cromatogramas dos padrões mencionados acima.

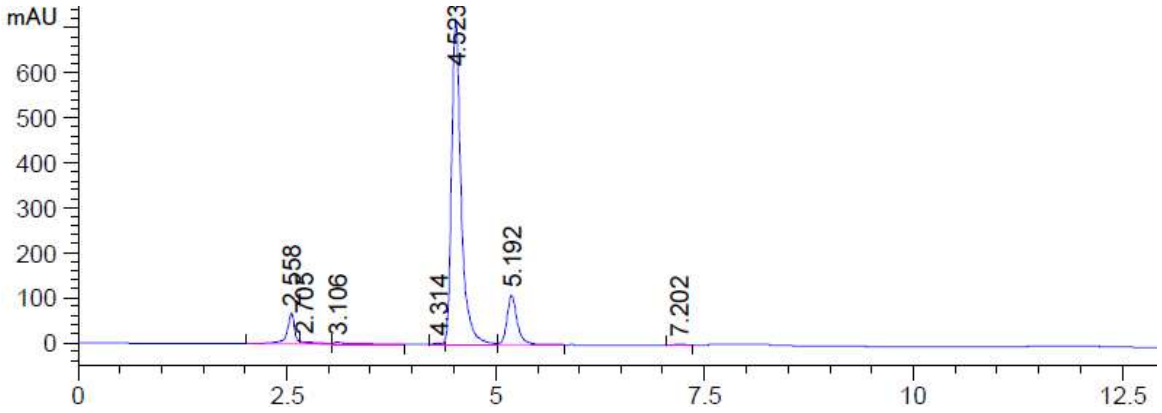


Figura 187: Cromatograma referente ao padrão do substrato por CLAE em fase reversa com tr de 4,7 min.

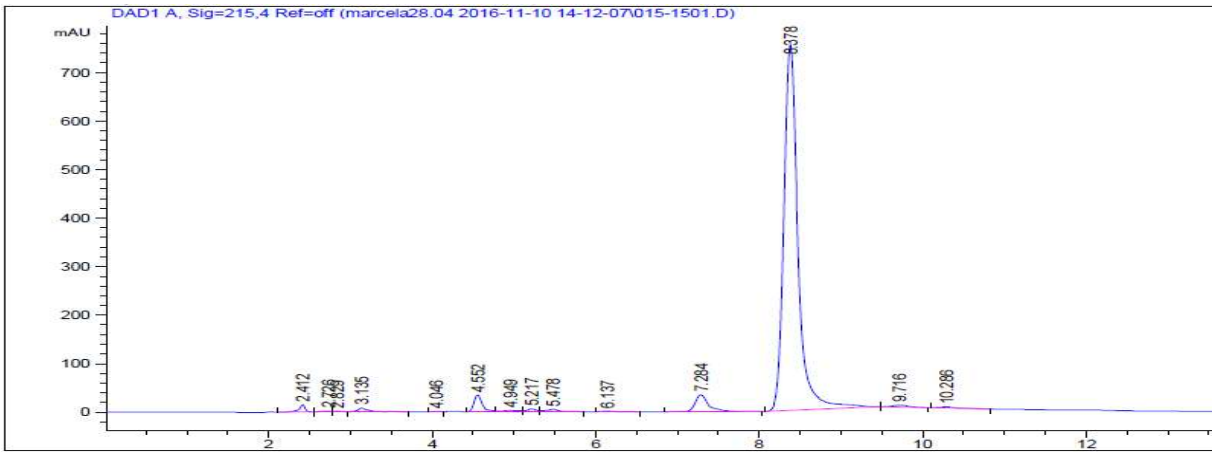


Figura 18 19:Cromatograma referente ao produto por CLAE em fase reversa em diferentes concentrações (mg/mL) com tr de 8,3min .

A quantificação da conversão foi feita segundo Chen *et al*. (1982) após a análise por CLAE. A concentração do substrato *rac*-3 foi comparada com os valores das áreas da curva de calibração (Figura 19) segundo a lei de Lambert- beer.

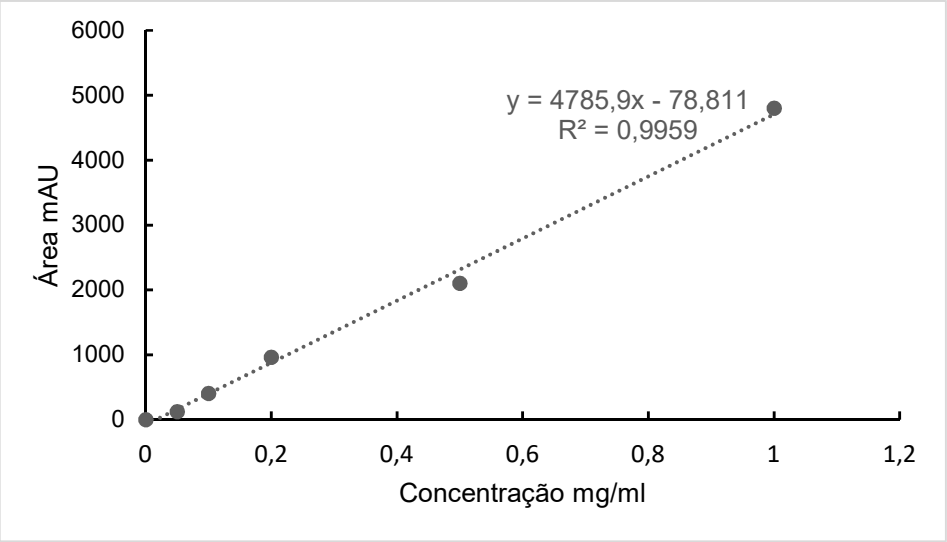
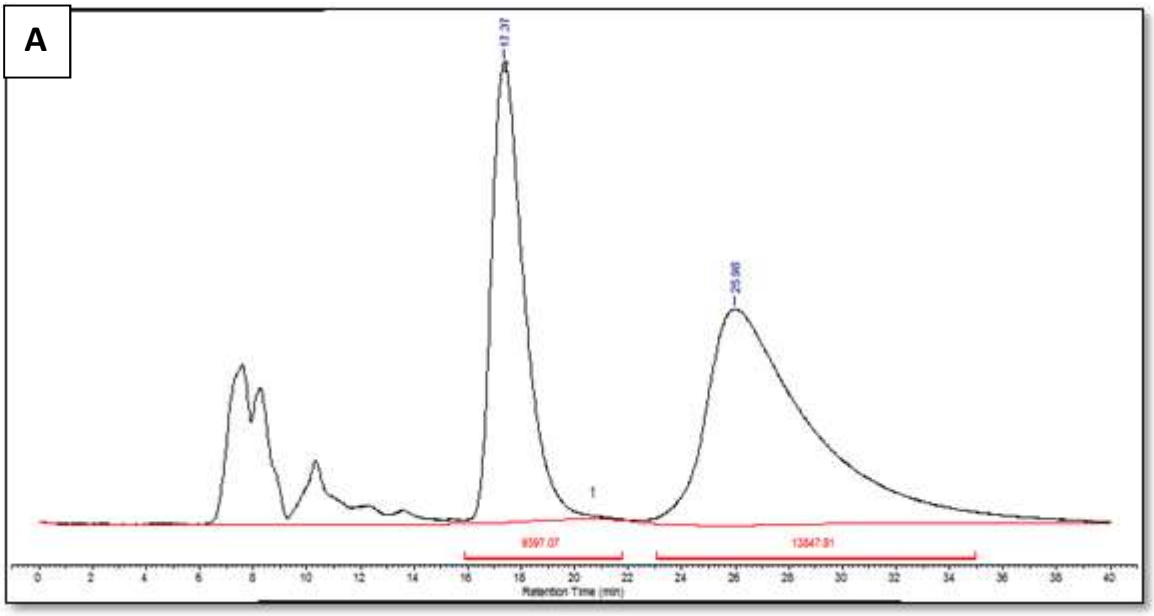


Figura 1920: Cromatograma referente ao padrão do substrato por CLAE em fase reversa em diferentes concentrações (mg/mL)com TR de 4,5 min.

4.5.1.2 Análise do excesso enantiomérico do produto obtido na reação de dessimetrização de S1

Após a reação e a análise por CLAE, as amostras foram analisadas em coluna quiral a fim de calcular o excesso enantiomérico dos materiais. Foi utilizada a coluna quiral Chiralcel OD-H (fase móvel hexano: 2-propanol(5:5), fluxo 0,5 ml/min e comprimento de onda de 215 nm). Foram utilizados a mesma bomba, detector e integrador que os da análise em fase reversa. A Figura 20 apresenta o cromatograma dos isômeros do produto. O tempos de retenção do padrão do produto racêmico foram de 17 e 25 minutos.



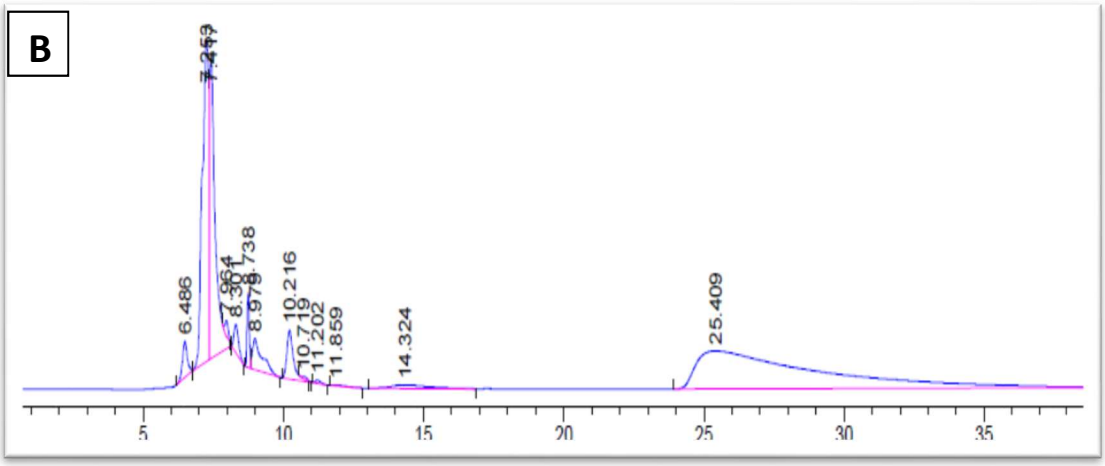


Figura 20 A) Cromatograma da coluna quiral do Padrão racêmico obtido por síntese química, (D)-isômero e (L)-isômero do 1,3-O-benzil 4-O-acetil-*mio*-inositol (S1) B) Cromatograma do produto enantiopuro obtido por síntese enzimática

4.6 Cinética enzimática das reações

As reações que apresentaram maiores conversões em menores tempos tiveram a sua cinética estudada. Para tal, foram utilizados 100 U de enzima/ml de solução e 2,5mg de substrato por ml. Para o cálculo da Velocidade inicial (Vi), foram considerados apenas os pontos que estavam abaixo de 10% de conversão. As alíquotas retiradas eram de 10µl, sendo evaporadas e ressuspensas em 0,5mL de fase móvel e analisadas em cromatografia liquida de alta eficiência.

4.7 Estudo do reuso do biocatalizador

A fim de se estudar a viabilidade do biocatalisador ao longo das reações, o estudo do reuso foi realizado. Após cada ciclo de reação, o experimento foi

interrompido. Alíquotas de 100 µL de fase líquida foram recolhidas para análise cromatográfica de conversão e excesso enantiomérico, enquanto o biocatalisador foi separado e cuidadosamente lavado com EtOAc ou hexano para possível retirada do produto e substrato remanescentes da reação anterior. Posteriormente, a lipase foi conduzida para a próxima reação, nas condições ótimas encontradas. O restante do sobrenadante foi evaporado, ressuspenso em 70 µL de água Mili-Q para dosagem de proteína pelo método de Bradford. O reuso do biocatalisador foi feito em sistema de batelada simples por 7 ciclos consecutivos.

4.8 Dosagem de atividade de esterificação por método titulométrico

A atividade de esterificação da enzima imobilizada foi quantificada pelo consumo de ácido oleico na reação de esterificação com etanol na razão molar de ácido: álcool de 1:1. A reação foi conduzida à temperatura de 40°C utilizando-se 3% (m/m) de enzima imobilizada sob agitação constante (CUNHA, 2011). A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional, em um reator fechado provido de agitação magnética. Alíquotas de 200 µL foram retiradas do meio reacional (volume reacional de 5 mL) em triplicata no tempo zero e em tempos de reação determinados, até um limite máximo de 10%, a fim de garantir que a reação estivesse em velocidade inicial (usados tempo 0, 10, 20, 30 min). A cada amostra foram adicionados 20 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v). A quantidade de ácido consumido foi determinada por titulação com NaOH 0,02 M. Uma unidade de atividade enzimática de esterificação foi definida como a quantidade de enzima que esterifica 1,0 µmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio. A atividade enzimática foi calculada segundo a Equação 2.

$$A = \frac{(Va - Vb) \times 1000 \times M \times \mathrm{Vfinal}}{T \times Ve \times \mathrm{m}}$$

Equação 2: onde A é a atividade de esterificação (µmol/ min. $g_{suporte}$ ou UE/$g_{suporte}$); Va é o volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo zero (mL); Vb é o volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após o tempo t (mL); *M* é a molaridade da solução de NaOH (mmol/mL); V_{final} é o volume final de meio reacional (mL); m é a massa da enzima imobilizada utilizada na reação (g); Ve é o volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL) e t é o tempo (min).

*Tabela 3: Atividades dos biocatalizadores que foram usados na reação de esterificação do 1,3-di-O-benzil-*mio*inositol. As atividades de esterificação foram determinadas por método titulométrico.*

Enzima	Atividade esterásica
Novozyme 435	4775 U/g
TL-IM	1539 U/g
RM-IM	1676 U/g

4.9 Quantificação de Proteína por método de espectrofotométrico de Bradford

Ao final de cada ciclo, o sobrenadante da reação foi analisado para quantificar a proteína. Essa análise teve como finalidade detectar se houve dessorção de proteína no interior do suporte do biocatalizador para o meio externo. O método utilizado foi Bradford (1976). Após cada ciclo o sobrenadante foi evaporado, ressuspenso em 70 µL de água Milli-Q. Para criação da curva padrão foi utilizada a albumina de soro bovino (BSA) como padrão em concentrações de 0, 200, 400, 600, 800, 1000 ppm de proteína por ml. A curva padrão pode ser encontrada abaixo na Figura 21. A solução de Bradford era comercial da Bio-Rad®. Para a dosagem de proteínas foi utilizada placa de 96 poços, 190 µL da solução de Bradford e mais 10 µL da amostra diluída, sendo a leitura feita no leitor de Elisa a 595 nm. Todas as análises de proteína foram realizadas com triplicatas.

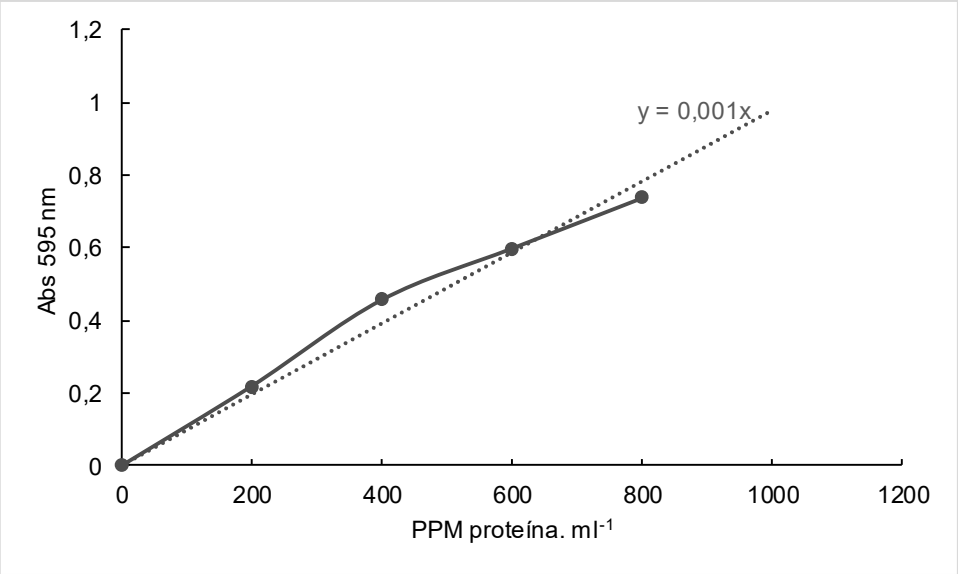


Figura 2122 : Gráfico da curva padrão usado na dosagem de proteína por método de Bradford

5.Resultados e discussão

A dessimetrização do intermediário aquiral do *mio*-inositol (S1), aqui estudado, foi realizada por lipases por meio da reação de esterificação mostrada abaixo. Doravante o produto acetilado será chamado de Q1 (quiral 1).

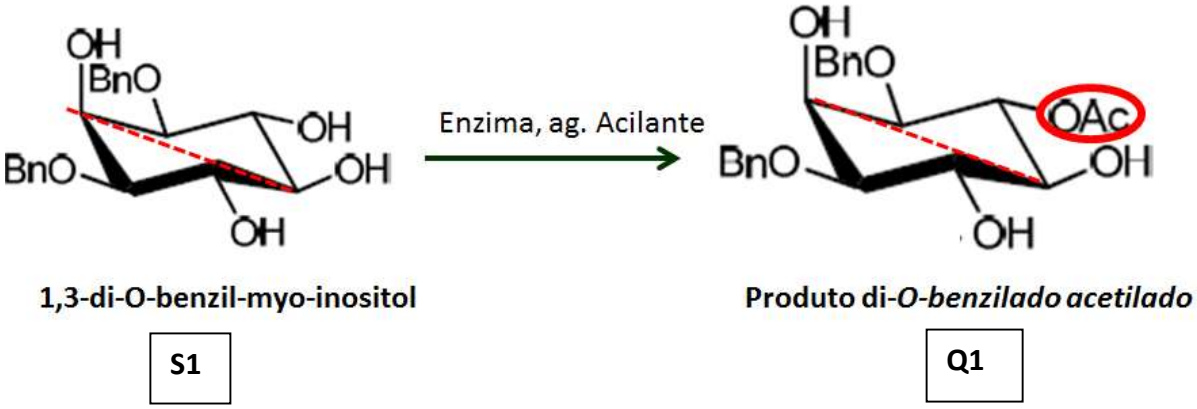


Figura 232: Estratégia reacional adotada para a dessimetrização de S1

5.1. Seleção de lipases

A primeira etapa realizada foi a seleção dos biocatalizadores a partir de uma triagem inicial com 8 lipases comerciais (imobilizadas e livres). As lipases escolhidas para a triagem inicial são biocatalisadores comumente citados na literatura como sendo capazes na resolução de enatiômeros (ANDERSCH & SCHNEIDER,1993; LAUMEN & GHISALBA, 1994; GOTOR *et al*., 2006, KISS *et al*., 2006; TRÄFF, *et al.*, 2011). Como supradescrito na metodologia da Seção 5, as lipases em suspensão ou liofilizadas, comerciais e não imobilizadas utilizadas foram A-Amano® (Lipase de Aspergillus niger), Lipomod 34-P (lipase de *Candida rugosa*) e F-AP15 (Lipase de *Rhizopus orizae*. As lipases imobilizadas utilizadas foram: PS-D Amano® (Lipase de *Pseudomonas Cepacia* imobilizada em diatomite), PS C- Amano® ((Lipase de *Pseudomonas Cepacia* imobilizada em cerânica), Novozyme 435 (Lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em resina acrílica), Lipozyme RM-IM (Lipase se *Rhizomucor miehei* imobilizada em resina de troca iônica), Lipozyme TL-IM (Lipase *Thermomyces lanuginose* imobilizada em grânulos de sílica).

Primeiramente, a acetilação enantiosseletiva foi realizada em acetato de Vinila. Nessa etapa, o acetato de Vinila foi utilizado como solvente e agente acilante. A reação de acetilação foi acompanhada ao longo do tempo por meio de análises em

CLAE. A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos das reações de dessimetrização de S1

Tabela 4: triagem dos Biocatalizadores que dessimetrizaram o 1,3-di-O-benzil-*mio*-inositol

Enzima	Tempo de Reação	Produto Obtido
PS-D Amano	96	-
A-Amano	96	-
PS C- Amano	96	-
Novozyme 435	24	Simétrico
Lipozyme RM-IM	72	Assimétrico
Lipozyme TL-IM	48	Assimétrico
Lipomod 34-P	24	Simétrico
F-AP 15	96	-

Dentre as 8 lipases utilizadas, quatro geraram produtos. As lipases PS-D, A-Amano, PS C-Amano e F-AB15 não produziram qualquer modificação no diester *mio*-inositol nas condições utilizadas. No entanto, a Lipozyme TL-IM, Lipozyme RM-IM, Novozyme 435 e Lipomod 34P catalisaram uma reação de transesterificação. Novozyme 435 e Lipomod 34P catalisaram a formação de um composto meso, doravante chamado de S2 (Figura 22 b). Esses dois biocatalizadores realizaram uma transesterificação regioseletiva em C-5. Por outro lado, as lipases Lipozyme TL-IM e Lipozyme RM-IM produziram o produto quiral mais polar, 1,3-di-O-benzil-6-O-acetil D - (+) – 2. Dessa maneira apenas essas duas enzimas foram capazes de catalisar a reação de dessimetrização realizando uma orto- acilação (D-2).

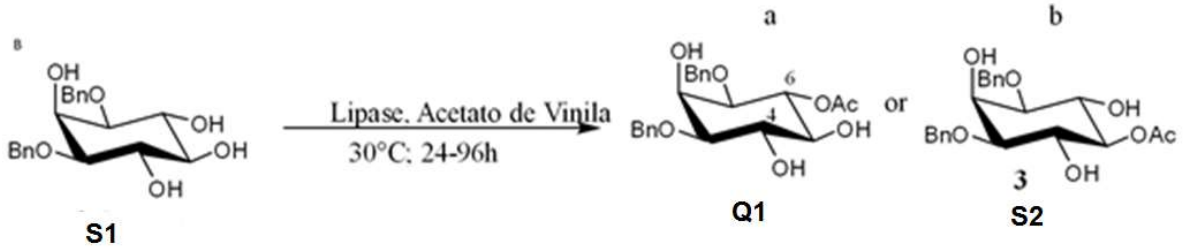
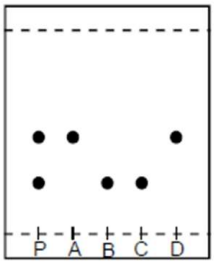


Figura 243: Esquema reacional da resolução cinética de S1 catalisada pelas Lipases em acetato de vinila A mono-O-acetilação do substrato 1,3-di-O-mio-inositol catalisada pelas lipases a) Lipozyme TL-IM e Lipozyme RM-IM b) Novozyme 435 e Lipomod 34P

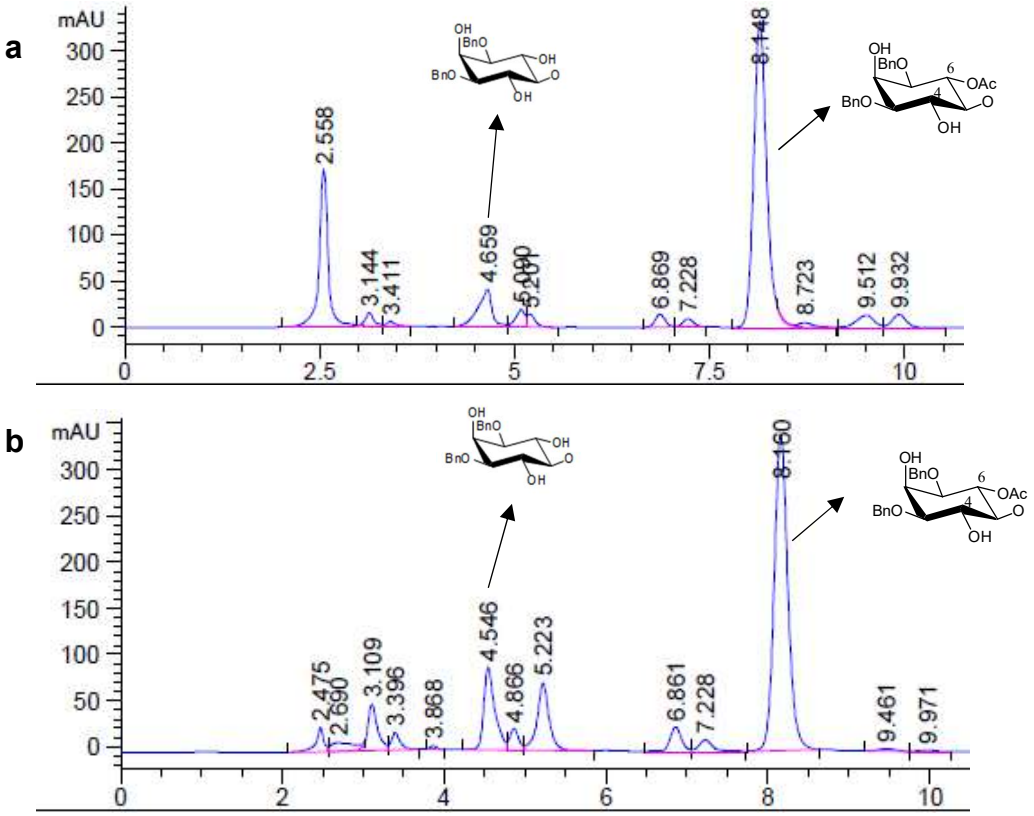
Primeiramente foi determinado por cromatografia de camada delgada (TLC para *Tight Layer Chromatography*) (Figura 23) e posteriormente confirmado por CLAE que a formação do monoéster assimétrico foi completamente regioseletiva, como pode ser confirmado nos cromatogramas abaixo (a. Lipozyme TL-IM b. Lipozyme RM-IM).



P – Padrão - Mistura dos produtos acetilados
A - Novozyme 435
B - Lypozyme RM-IM
C - Lypozyme TL-IM
D - Lipomod 34P

Eluente: 60% Acetato de Etila:Hexano
Revelador: Solução básica de permanganato de potássio

Figura 253: TCL das reações de o-acetilação do 1,3-di-O-benzil-*mio*-inositol (imagem adaptada de Pais, 2014)



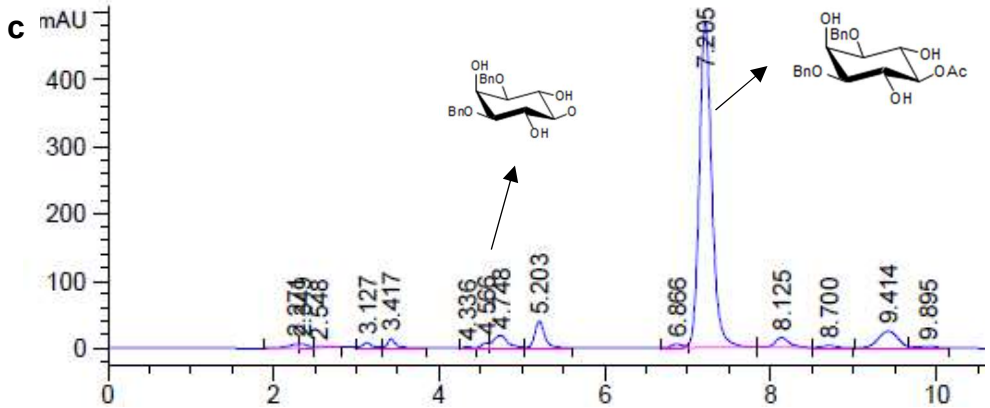


Figura 26: Cromatogramas dos produtos obtidos nas reações de seleção dos agentes acilantes a) usando como biocatalizador a Lipozyme TL-IM b) Usando como biocatalizador a enzima Lipozyme RM-IM c) usando como biocatalizador a enzima Novozyme 435

A regiosseletividade apresentada pela lipase Novozyme 435 foi confirmada por CLAE (cromatograma c), na qual o produto simétrico foi identificado. Dados preliminares também mostraram a formação do produto simétrico S2 catalisado pela Lipomod 34P, de forma igualmente regiosseletiva para o C-5F. Entretanto esse dado não foi confirmado em CLAE, apenas em TLC pelo grupo do laboratório Roderick Barnes, IPPN (dados não apresentados).

A confirmação da estrutura dos produtos gerados pelas quatro enzimas foi feita por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e a determinação da configuração absoluta do produto gerada pelas enzimas Lipozyme TL-IM, Lipozyme RM-IM foram feitas pela equipe do Laboratório Roderick Barnes. Esse grupo determinou que a conformação absoluta do produto simétrico era o isômero *L*. O estabelecimento da configuração do produto assimético como “L” foi feito por conversão para o derivado conhecido.

A determinação da conformação absoluta, ou seja, qual enantiômero está presente em uma amostra enantiopura, é algo complexo, uma vez que somente a técnica utilizando RMN é incapaz de determiná-la. Dentre as possibilidades de determinação da conformação dos isômeros é possivel destacar o uso de agentes de derivação quiral (reagentes quirais ou solventes quirais) conjuntamente com espectroscopia de RMN ou por comparação com espécie quimicas similares, cuja conformação absoluta já seja conhecida. Os agentes de derivação quiral reagem com substrato para formar uma ligação covalente. Os agentes solvatantes quirais, agentes de emparelhamento iónico interagem com o substrato através de interações não covalentes (WENZEL & CHISHOLM, 2011).

Para alguns reagentes, o mecanismo responsável pela discriminação entre as duas configurações é entendido. Com os reagentes quirais, os derivados adotam uma conformação preferencial. Com o emprego destes reagentes é possível determinar a diferença nos deslocamentos químicos dos núcleos do substrato no derivado com os isómeros (R) e (S) do reagente quiral. Os sinais dos valores dos deslocamentos para os diferentes grupos substituintes do substrato são então utilizados para atribuir a conformação estereoquímica absoluta. Com o uso dos agentes de solvatação, o complexo associado tem um alinhamento das porções das duas espécies (WENZEL & CHISHOLM, 2011).

Neste trabalho optou-se por utilizar o método de comparação para determinação da conformação absoluta. Os produtos utilizados podem ser vistos na Figura 28. Primeiramente tentou-se transformar o composto assimétrico em 2,4,6-tri-O-benzoil-*mio*-inositol, cuja conformação já era conhecida. Entretanto, a transformação não foi possível, uma vez que o produto da tri-O-benzoilação C sofreu desacetilação seletiva nos experimentos preliminares. Em seguida, a atenção foi voltada para a possibilidade de conversão do acetato A no diéter C. Assim, o éster A foi regioseletivamente di-O-metilado para proporcionar o composto B. O éster foi submetido à hidrólise com LiOH, seguido por hidrogenólise, levando a um alvo conhecido, o L-5,6-di-O-metil-*mio*-inositol, L - (+) - 5.

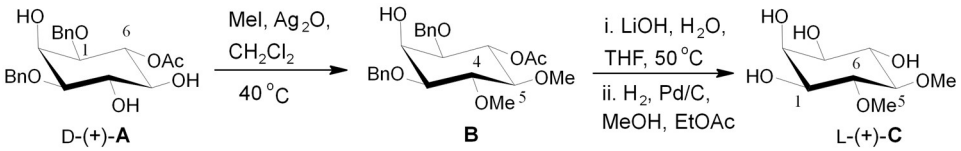


Figura 275 Esquema das reações e produtos usados pelo grupo do Laboratório Roderick Barnes para a atribuição da configuração do produto quiral (+) - 2 através da conversão para (+) - 5

5.2. Seleção do agente Acilante

Após detectar quais lipases foram capazes de gerar produtos, deu-se prosseguimento ao estudo de qual ou quais agentes acilantes seriam mais adequados para cada lipase e qual dos pares agente acilante-lipase geraria maiores taxas de conversão e excesso enantiomérico. Apesar de quatro lipases terem apresentado produtos na etapa anterior, prosseguiu-se com apenas três lipases para esta etapa: Novozyme 435, Lipozyme TL-IM e Lipozyme RM-IM. A Lipomod 34P não seguiu no estudo pois gerou produto simétrico, que não é alvo deste trabalho. Além disso trata-

se de uma enzima livre e, como será explicado adiante, optou-se por utilizar enzimas imobilizadas.

Um dos objetivos deste trabalho é o de criar uma síntese eficiente para precursores de fármacos derivados do *mio*-inositol. Tendo isso em foco, a possibilidade de reuso do biocatalizador passa a ser um parâmetro importante, uma vez que uma das principais vantagens da imobilização é a possibilidade de reuso da enzima. A imobilização aumenta tanto a estabilidade do biocatalizador que essa pode passar a ser quantificada na escala de meses. Como a estabilidade fica muito elevada, é possível separar fisicamente o suporte do meio reacional, por simples filtração ou decantação, e reutiliza-lo em diversas reações consecutivas (ASGHER *et al.,* 2014 RUEDA *et al*., 2016). Todos esses fatores fazem com que a possibilidade do reuso seja um fator que diminua muito o custo das reações. Dessa maneira, optou-se por prosseguir o estudo apenas com as lipases imobilizadas.

A literatura já mostrou a forte influência dos doadores de acila na atividade enzimática, uma vez que as acilações catalisadas por lipases envolvem a formação do intermediário acil-enzima, já discutido neste trabalho na Seção 4.3. Vários trabalhos têm relatado o uso de diferentes agentes acilantes no efeito sobre a enantiosseletividade da enzima (ANTHONSEN e HOFF, 1998; STOKES e OEHLSCHLAGER, 1987; HOF e KELLOGG, 1996; HOFF *et al*., 1996b, CUNHA *et al*., 2010, MANOEL, 2012). A natureza e a concentração do agente acilante na reação de acetilação são fatores importantes. O uso de ésteres vinílicos como solventes tem vantagens por formarem subprodutos carbonílicos, ao invés de álcoois, tornando as reações irreversíveis, aumentando também a velocidade inicial de reação (CUNHA *et al*., 2010). Portanto, nesta pesquisa, estudou-se o efeito de diferentes agentes acilantes na reação de acetilação de S1.

Neste trabalho foram utilizados diferentes agentes acilantes como Anidrido Acético, Acetato de Vinila e Acetato de Etila (EtOAc). As reações ocorreram a 30 ºC e foram tomados pontos em 0, 24, 48, 72 h e 96h. A análise da conversão foi determinada por CLAE.

Para as três enzimas estudadas, o melhor agente acilante foi o Acetato de vinila (Figuras 26 e 27). O gráfico de barras da Figura 26 representa as conversões

encontradas em 96h para o EtOAc e acetato de vinila com as enzimas TL-IM e RM-IM.

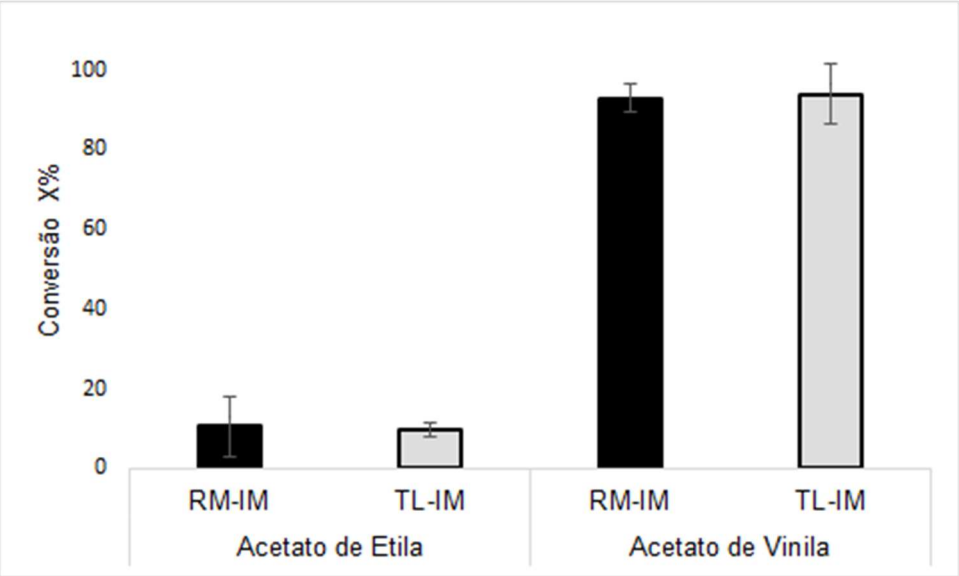


Figura 28: Conversões encontradas com os agentes acilantes EtOAc e acetato de vinila após 96h com as enzimas Lipozyme RM-IM e Lipozyme TL-IM. As condições da reação foram 5 mg de substrato, 200 U/ml de biocatalizador, 2ml do respectivo agente acilante, 30 oC, 300 RPM, com agitação magnética

O produto gerado por ambas as enzimas foi o assimétrico, que tem o TR de 8,1 min. Quando o EtOAc foi usado como agente acilante, ele gerou alguma acetilação após 96 h (10,6% de conversão quando a Lipozyme RM-IM foi usada com agente acilante e 9,8 % quando a Lipozyme TL-IM foi usada). Entretanto, as conversões geradas quando o EtOAc foi usado como agente acilante foram muito baixas se comparadas com as encontradas quando o meio era composto por acetato de vinila. Quando o Biocatalizador utilizado foi a Lipozyme TL-IM as conversões geradas foram de 93,9 % e para a Lipozyme RM-IM de 92,9% em 96 h.

Como era esperado, a enzima Novozyme 435 gerou o produto simétrico (Figura 27), para os dois agentes acilantes aqui discutidos a reação de *O*-acetilação foi totalmente regiosseletiva para as três enzimas.

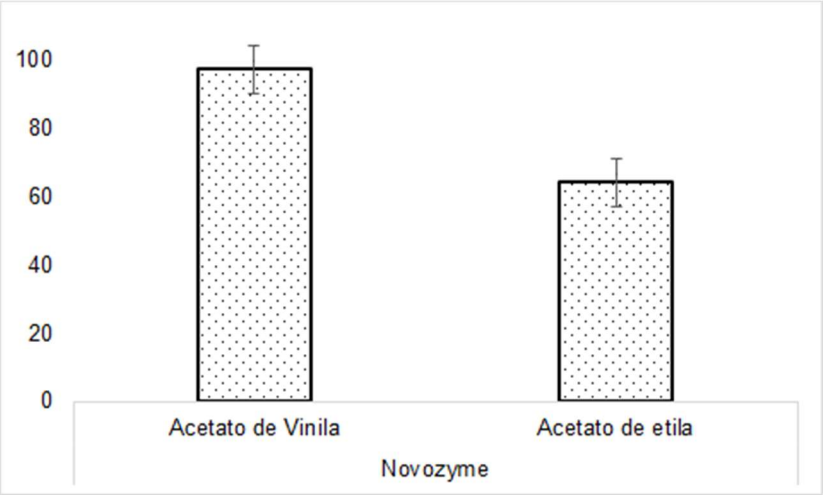
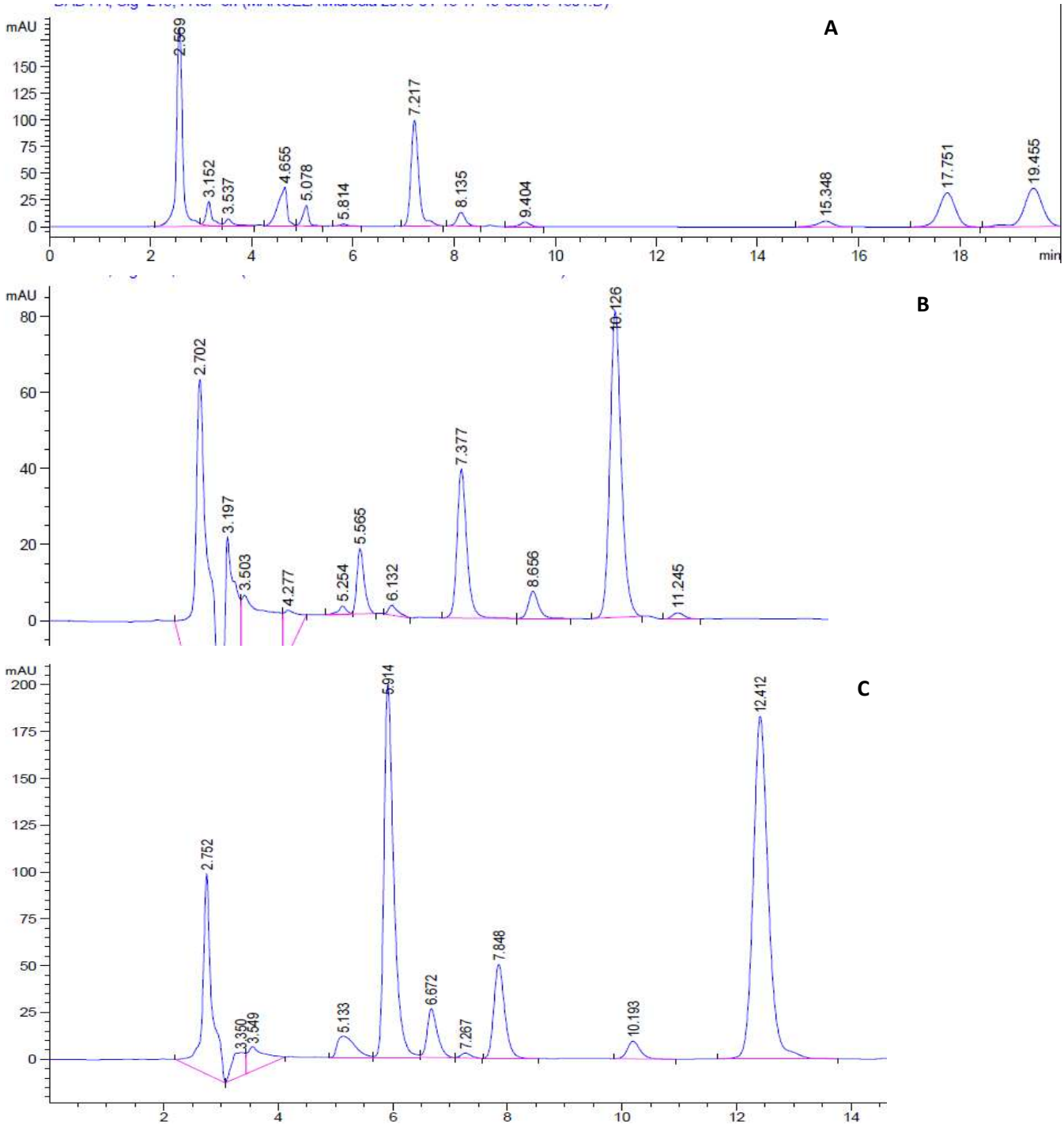


Figura 2729: Conversões encontradas com os agentes acilantes EtOAc e acetato de vinila após 96h de reação com a enzima Novozyme 435 As condições da reação foram 5 mg de substrato, 200 U/ml de biocatalizador, 2ml do respectivo agente acilante, 30 oC, 300 RPM, com agitação magnética

O branco das reações, ou seja, a reação controle na qual estava ausente a enzima, não gerou nenhum produto mesmo após 96h para as três enzimas, quando os agentes acilantes empregados foram o acetato de vinila e EtOAc. Isso demonstra que a reação não ocorreu na ausência do biocatalizador, ou seja, quando o biocatalizador não está presente a energia livre de Gibbs (ΔG) é muito alta e a reação não corre (LENINGHER & COX, 2011).

Entretanto, quando o anidrido acético foi utilizado como agente acilante, foram gerados múltiplos produtos a partir de 24h, o que pode ser visto no cromatograma abaixo, Figura 28 A, no qual foi utilizada a enzima Novozyme 435 . Um comportamento semelhante foi encontrado para as enzimas Lipozyme TL-IM e Lipozyme RM-IM.


A
mAU
2.569
3.152
3.537
4.655
5.078
5.814
7.217
8.135
9.404
15.348
17.751
19.455
min
B
mAU
2.702
3.197
3.503
4.277
5.254
5.565
6.132
7.377
8.656
10.126
11.245
C
mAU
2.752
3.350
3.549
5.133
5.914
6.672
7.267
7.848
10.193
12.412

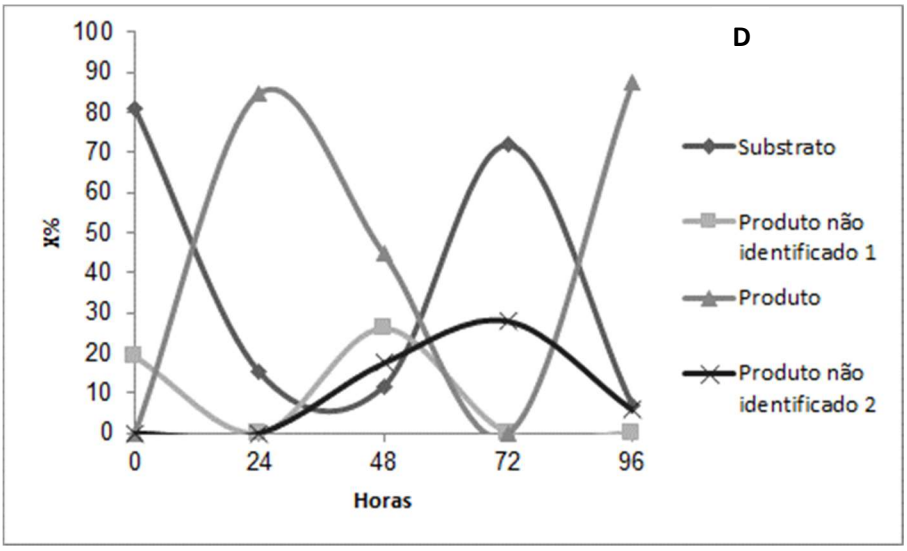


Figura 28: O anidrido acético não é um bom agente acilante, cromatogramas e gráficos gerados com o emprego deste reagente.A) Cromatograma gerado de uma das duplicatas da reação com a enzima Novozyme 435 após 24h. B e C brancos de reação após 24 e 48, pode-se notar que o perfil dos cromatogramas mudou de forma aleatória. C) Gráfico gerado com uma das duplicatas mostrando o perfil aleatório da acilação com anidrido acético D) Gráfico gerado após a utilização do anidrido acético como agente acilante

Ao comparar com o branco pode-se confirmar a presença de muitos outros produtos (Figura 28 B, C e D). A formação desses produtos não é mantida linear ao longo do tempo e é irreprodutível. Dessa forma, pode-se afirmar que o anidrido acético não foi um bom agente acilante, já que ele produziu acetilações erráticas e aleatórias mesmo na ausência de enzima.

Dessa forma, apenas Lipozyme TL- IM e Lipozyme RM-IM trabalharam na dessimetrização de S1. A utilização de acetato de vinila apresentou-se melhor do que o EtOAc nas reações isentas de solvente, conduzindo a uma conversão mais elevada (92,7%) do que na reação que continha apenas EtOAc (6,9 % de conversão). Esses resultados já eram esperados uma vez que a utilização de ésteres vinílicos como reagentes tem a vantagem de formar subprodutos com carbonila, ao invés de álcoois, o que faz com que essas reações não possam ser revertidas pelas lipases, resultando em taxas de conversão mais elevadas (Cunha *et al.*,2010; Manoel, 2012).

5.3. Efeito do Solvente

O efeito dos solventes na reação também foi estudado usando, em todos os casos, o melhor agente acilante encontrado na seção 5.2., o acetato de vinila. Mesmo utilizando o acetato de vinila, a Novozyme 435 gerou o produto simétrico. Assim, o

estudo da influência do solvente nas reações catalizadas por essa enzima não será continuado neste trabalho.

Como já foi discutido na Seção 3.5., sabe-se que os solventes afetam a atividade enzimática, a seletividade e a enantiosseletividade no complexo mecanismo que envolve interações entre a enzima, o substrato e o meio reacional (Manoel *et al*., 2012; Liu *et al*., 2000). De fato, a literatura mostrou a forte influência do solvente na enantiosseletividade (Sawyer & Potter, 1992; Manoel, *et al*., 2010, 2012). Além disso, o solvente desempenha múltiplos papéis no sistema reacional como a melhoria da homogeneidade e estabilidade do sistema, bem como aumentar a transferência de massa por meio da redução da viscosidade do sistema (ZHONG *et al*., 2009).

Neste trabalho, a escolha do solvente nas reações se deu devido à solubilidade e à estabilidade tanto da enzima comercial quanto do substrato. Os solventes utilizados para todas as lipases acima descritas foram: Acetato de vinila, Acetato de Etila, Hexano, Diclorometano e Terc-Butil-Metil-éter (TBME).

Na dessimetrização de S1 catalisada pela Lipozyme TL-IM, em comparação com a reação em acetato de vinila (meio livre de solvente), a utilização de EtOAc, diclorometano e TBME melhorou as conversões do produto quiral D. Já foi mostrado em outros artigos que hexano como solvente melhora significativamente a transformação de outros derivados de *mio*-inositóis (Manoel *et al*., 2010; 2012). Entretanto, neste trabalho, o uso do Hexano não alterou significativamente o valor da conversão na reação de dessimetrização catalisada pela Lipozyme TL-IM. Esse fato pode ser explicado pela diferença de polaridade entre os derivados de *mio*-inositol publicados anteriormente (VASCONCELOS, *et al.,* 2014; CUNHA *et al.,* 2013; MANOEL *et al.,* 2012, 2013, 2015). Esses outros estão representados na Figura 29.

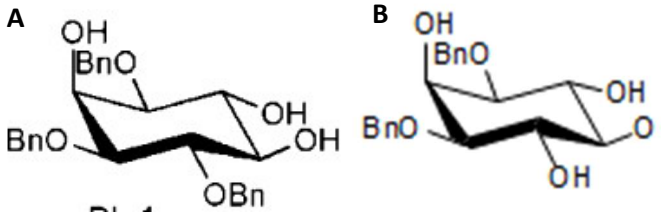


Figura 29 A) substrato tribenzilado utilizado por Manoel *et al,* 2012, a benzila adicional confere maior hidrofobicidade ao substreto. B) Substrato di-benzilado usado neste trabalho

O substrato que foi utilizado na resolução cinética por Manoel *et al*. (2012) possuía três radicais benzila, o que lhe conferia uma maior hidrossolubilidade. Neste trabalho o substrato utilizado foi mais polar, já que ele possui apenas duas benzilas.

A diferença de polaridade pode ser uma razão para a reação não ter apresentado altas taxas de conversão quando o hexano foi empregado como solvente.

O excesso enantiomérico das reações foi analisado e apenas um enantiômero foi detectado para todos. Assim sendo, na reação estudada, os solventes não foram capazes de altera a enantiosseletividade. Dessa maneira, os solventes que mostraram as maiores taxas de conversão foram os escolhidos para a continuação do estudo. Nas reações catalisadas pela enzima Lipozyme TL-IM, no meio contendo solvente, as maiores taxas de conversão foram apresentadas pelo EtOAc (99,3% em 96 horas) e pelo TBME (98,5% em 96 horas). Dentre as reações catalisadas pela Lipozyme RM-IM o EtOAc foi o melhor solvente encontrado (99,7% em 96 horas) (Tabela 5.)

Tabela 5 Conversões encontradas nas reações com os respectivos solventes usando com agente acilante acetato de vinila após. A tabela representa as conversões encontradas após 96h de reação com as enzimas Lipozyme RM-IM e Lipozyme TL-IM. As condições das reações foram 5 mg de substrato, 200 U/ml de biocatalizador, 1ml de acetato de vinila, 1 ml do respectivo solvente, 30 oC, 300 RPM, com agitação magnética

Enzima	Solvente	C_{HPLC} (%)*	ee_p (%)	E
Lipozyme TL-IM	Acetato de Vinila	92,7	>99	>100
	Hexano	60,5	>99	>100
	Acetato de Etila	99,3	>99	>100
	Dicloro metano	97,6	>99	>100
	TBME	98,5	>99	>100
Lipozyme RM-IM	Acetato de Vinila	92,9	>99	>100
	Hexano	60,5	>99	>100
	Acetato de Etila	99,7	>99	>100
	Dicloro metano	68,4	>99	>100
	TBME	96,7	>99	>100

5.4. Estudo da Cinética da reação de dessimetrização de S1

5.4.1.Estudo da velocidade inicial

A fim de compreender melhor como os solventes interferem na atividade da Lipozyme TL-IM e auxiliar no estudo da melhor condição reacional, foi realizado o estudo da velocidade inicial. Para a maioria das reações enzimáticas, a velocidade inicial é igual à velocidade do estado estacionário. Algo muito importante nos ensaios

que visam calcular a velocidade inicial é que só podem ser utilizados no cálculo da velocidade inicial os pontos cujas conversões de substrato em produto estejam abaixo de 10%. Caso não seja observada esta regra, o resultado será uma velocidade inicial falsamente mais baixa que a real, causada pela depleção do substrato (STEIN, 2011). A Figura 30 representa o gráfico da cinética que foi utilizada para calcular a velocidade inicial da reação catalisada pela Lipozyme TL-IM com o acetato de vinila como agente acilante e o TBME com solvente. A reta cinza clara foi confeccionada com a regressão linear dos pontos de até 15 minutos (7,0% de conversão). O coeficiente linear desta reta é 0,44. Já a reta cinza chumbo foi confeccionada levando em conta todos os pontos que haviam sido coletados, incluindo o ponto de 30 minutos, cuja conversão foi 11,6%, logo, acima de 10% de conversão. O coeficiente linear desta reta foi de 0,39, sendo assim, menor que o da reta que não considerou o ponto cuja conversão estava acima de 10%. Assim, é possível notar que o ponto do tempo de 30 minutos não pode ser utilizado para traçar a reta que representa a velocidade inicial. Uma vez traçada a reta a velocidade inicial, a taxa de conversão de substrato em produto é dada pela inclinação desta reta.

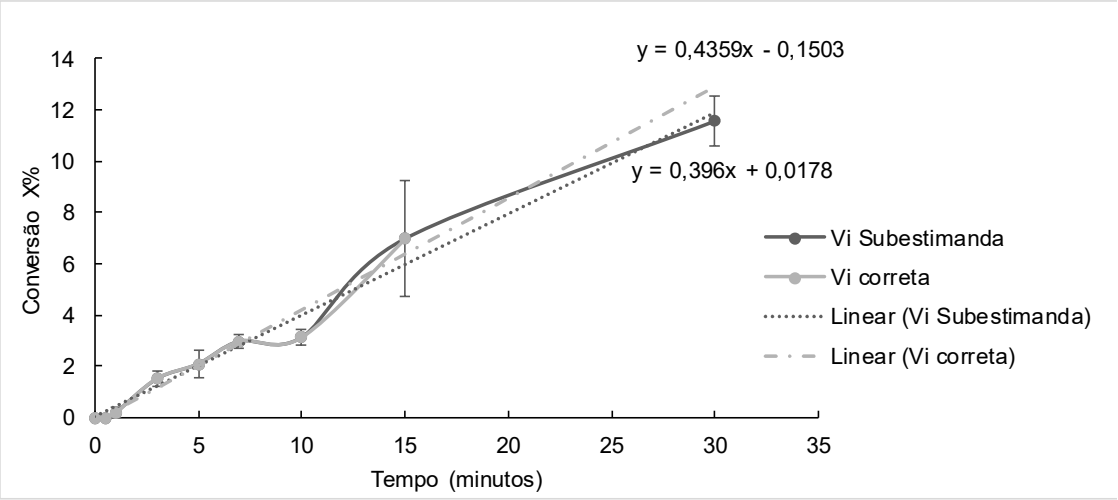


Figura 30: Gráfico utilizado para exemplificar como é calculada a velocidade inicial das reações. Os pontos utilizados para calcular a velocidade inicial da reação catalisada pela Lipozyme TL-IM e TBME como solvente. As condições das reações foram 5 mg de substrato, 20 U/ml de biocatalizador, 1ml de acetato de vinila, 1 ml do respectivo solvente, 30 oC, 300 RPM, com agitação magnética

. Nas primeiras tentativas de cálculo da velocidade inicial foram utilizadas as mesmas condições de todas das reações anteriores. Entretanto, nos primeiros pontos a conversão encontrada já estava acima do limite aceitável para o cálculo da Vi (acima de 10%). Dessa forma, optou-se por fazer novamente a reação com uma concentração de biocatalizador 10 vezes menor, ou seja 20 U (10 U/ml).

Cinéticas semelhantes foram feitas para as reações catalisadas pela Lipozyme TL-IM utilizando apenas acetato de vinila, hexano, acetato de etila, diclorometano e TBME. Esses quatro últimos solventes foram utilizados juntamente com o acetato de vinila como agente doador de acilas na proporção de 1:1. Para todos os solventes, a taxa de O-acetilação foi calculada da mesma forma, como acima mencionado. A Tabela 6 expressa as velocidades iniciais de obtenção de Q1 para os cinco solventes utilizados.

Tabela 6: Representa as velocidades iniciais encontradas nas reação catalisadas pela Lipozyme TL-IM e os respectivos como solventes. As condições das reações foram 5 mg de substrato, 20 U/ml de biocatalizador, 1ml de acetato de vinila, 1 ml do respectivo solvente, 30 oC, 300 RPM, com agitação magnética

Solvente	Vi (µmol.min^-1.g^-1)
Acetato de Vinila	493,1
Hexano	230,4
Acetato de Etila	835,9
Dicloro metano	416,3
TBME	1444,2

As velocidades iniciais mais altas estão em concordância com as maiores conversões encontradas na Tabela 6. O TBME foi o solvente que apresentou a maior velocidade inicial, seguido pelo EtOAc, que apresentou velocidade de reação aproximadamente duas vezes maior que a reação na qual apenas o acetato de vinila estava presente. Dessa forma, as cinéticas com a presença destes dois solventes foram estudas com mais detalhes.

5.4.2. Cinética da reação de dessimetrização

Uma vez que as conversões entre Lipozyme TL-IM e Lipozyme RM-IM em EtOAc foram muito próximas, foi realizado um estudo da cinética de 0 a 23 horas para as duas enzimas utilizando acetato de vinila como agente acilante e EtOAc como solvente, na proporção de 1:1. A Figura 31 ilustra o comportamento cinético das duas enzimas.

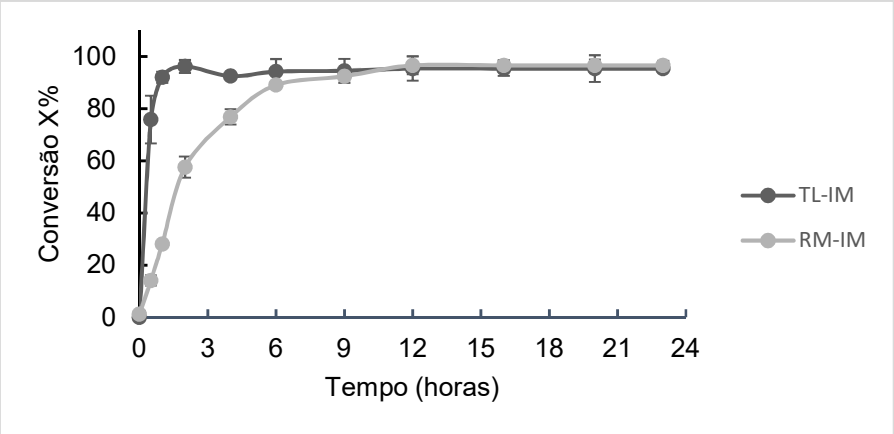


Figura 31: Curva de Progresso da reação de dessimetrização de 200 U (enzimas) com 1 ml de acetato de vinila(ag acilante) e 1 ml de EtAOc (solvente), 30 oC, 300 RPM, com agitação magnética nos tempos de até 24h. das reações catalisadas por Lipozyme TL-IM e Lipozyme RM-IM. Conversões encontradas nas reações com os respectivos solventes usando com agente acilante acetato de vinila.

A utilização da enzima Lipozyme TL levou a obtenção de Q1 em apenas 2h de reação (96,2% de conversão). Por outro lado, quando Lipozyme RM-IM foi utilizada, a conversão máxima foi atingida em 6 horas (89,1 %). A reação catalisada pela RM-IM só atingiu o patamar de 96,2% de conversão após 12 horas de reação. Dessa forma, a taxa de conversão da TL-IM, entre o intervalo de 0 e 2h, foi de 0,83 $\mu mol.min^{-1}.g_{suporte}^{-1}$. Já a taxa de conversão da reação catalisada pela enzima RM-IM entre os intervalos de 0 a 6 horas foi de 0,27681 $\mu mol.min^{-1}.g_{suporte}^{-1}$. Esse resultado já era esperado uma vez que a enzima de *T. lanuginosus* apresentou taxas de conversões maiores em todos os solventes, se comparadas às conversões da lipase de *R. miehei*.

Um dos objetivos deste estudo era a maximização da produtividade da reação de dessimetrização. Quanto mais rápida, menos custosa uma reação se torna, uma vez que consome menos energia (de aquecimento e agitação), menos tempo dos operadores de produção e menos danos serão causados ao suporte do biocatalizador, podendo esse ser reutilizado por um número maior de vezes.

Para detectar com mais precisão qual seria o tempo de maior produtividade do produto dessimetrizado a cinética foi refeita em tempos de reação mais baixos. Para os dois solventes o TBME que apresentou maiores taxas iniciais de reação e o EtOAc que apresenta menor toxicidade que o TBME.

A Figura 32 mostra as curvas da reação catalisada pela enzima Lipozyme TL-IM nos dois solventes. No gráfico pode-se notar que, apesar de uma taxa de reação inicial maior na reação cujo solvente é o TBME, as reações chegam ao patamar de

conversão máxima em tempos muito próximos. A reação de dessimetrização atingiu conversões de 92,4 % de conversão em 60 minutos de tempo reacional para ambos os solventes.

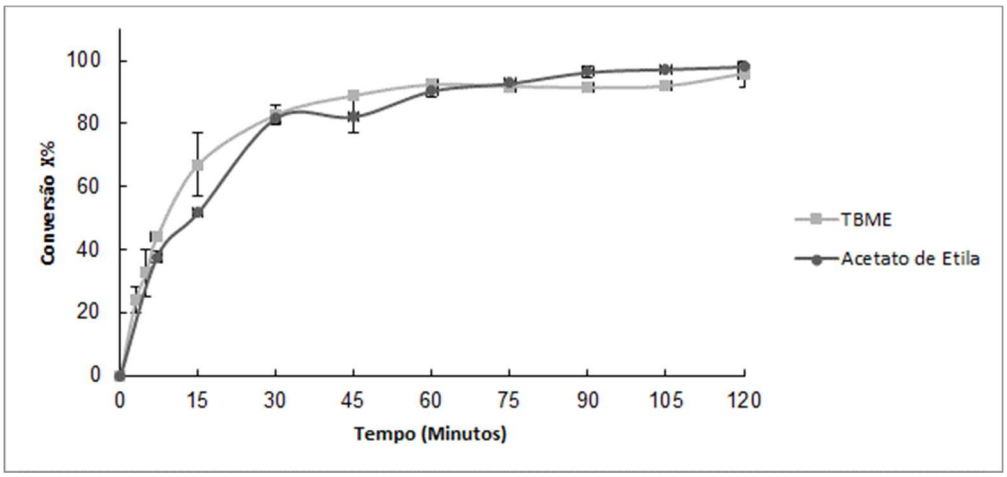


Figura 302 Curva de progresso de 0 a 120 min da reação catalisada pela Lipozyme TL-IM nos solventes TBME e EtOAc. As condições reacionais foram 5 mg de substrato, 200 U/ml de biocatalizador, 1ml de acetato de vinila, 1 ml do respectivo solvente, 30 oC, 300 RPM, com agitação magnética

Estes resultados estão em concordância com o trabalho de Wongsakul, *et al*. (2003). Nesse trabalho, lipases comerciais imobilizadas foram utilizadas para a síntese de 2-monoglicérideos por alcoólise de óleo de palma e de atum com etanol em solventes orgânicos. Foram estudados o tipo de lipases imobilizadas, atividade da água, efeito dos solventes e temperatura. Nesse trabalho quando a reação foi catalisada pela Lipozyme TL-IM, a maior taxa inicial de reação foi encontrada no meio contendo TBME, entretanto o melhor solvente foi a acetona, tomando por base parâmetros de conversão e de velocidade média da reação. ,

Tendo em vista que objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de uma reação eficiente, a toxicidade dos solventes utilizados é um parâmetro importante que deve ser levado em conta na escolha do meio reacional. Entre os dois solventes que apresentaram as maiores taxas de reação (EtOAc e TBME) um deles é mais tóxico, mais poluente e mais caro. Segundo o NIOSH (*National Institute of Occupational Safety*), que é um órgão do CDC (*Center of Dieses and Control*) que regulamenta a saúde no trabalho nos Estados Unidos, o máximo de exposição a que um trabalhador pode ser exposto ao EtOAc é 400 ppm ou 1400 mg/m^3 e o máximo de exposição ao TBME é 50 ppm, 180 mg/m^3 (NIOSH a,b, 2016). Na Tabela 7 pode ser encontrado o

comparativo das informações contidas no ICSC (*International Chemical Safety Card*) dos dois solventes.

Tabela 7: Comparativo das informações contidas no *safety card* do TBME e do acetato de etila

	Acetato de Etila- ICSC: 0367	**TBME- ICSC: 1164**
Inflamabilidade	Altamente	Altamente
Sintomas se inalado	-Sonolência - Tontura - Dor de cabeça - Fraqueza - Inconsciência	-Tosse - Tontura - Sonolência - Dor de cabeça - Náusea - Dor de garganta - Inconsciência - Fraqueza
Pele	-Ressecamento	-Ressecamento - Eritema
Ingestão	Sem efeito	-Dor Abdominal - Náusea - Vomito - Tontura - Sonolência - Náusea - Inconsciência - Fraqueza
Limites de exposição ocupacional	400ppm , 1400 mg/m^3	50 ppm, 180 mg/m^3
Carcinogênese	Sem evidência	3B*
Gravidez	Grupo de risco C**	Grupo de risco C**
Categoria de limitação de pico *(Peak limitation category)*	I- Substâncias com efeitos irritantes locais	II- Substância com efeitos sistêmicos
Danos ao meio ambiente	Nenhuma recomendação	É fortemente aconselhado a não permitir que entre no meio ambiente porque persiste no meio ambiente. ENVIRONMENTAL HAZARD
DL_{50} oral em ratos	11,3 ml/kg***	5,2 ml/kg+

* Substâncias suspeitas de serem mutagênicas a células germinativas devido a efeitos genotóxicos em células somáticas de mamíferos in vivo

** Não há motivos para temer a segurança do feto se os limites de exposição ocupacional forem observados

*** *Food and Drugs administration*

+ Organização Mundial da Saúde

O EtOAc é um dos ésteres mais consumidos em muitos momentos pelos humanos. Em doses moderadas não é mais tóxico que o etanol, a exemplo da DL_{50} (concentração necessária para matar 50% dos indivíduos, quanto menor a DL_{50} mais tóxico é o composto) do EtOAc, que é 11,3 ml/kg, não sendo signficativamente menor

que a do etanol, que é 13,7 ml/kg (FDA, 2016). Já o TBME apresenta uma DL_{50} de 5,2 ml/kg (Organização Mundial da Saúde, 2016). Adicionalmente, o EtOAc é rapidamente hidrolizado em etanol e ácido acético pelas esterases do intestino e do fígado (GREIM, 2006). Dentre as formas de consumo do EtOAc é possível destacar o vinho. O EtOAc é o éster mais abundante no vinho e é responsável pelo sabor ácido de vinhos frutados. Esse composto favorece o aroma do vinho quando presente em concentrações menores que 80 mg/l (Plata *et al.,* 2003).

Além do potencial risco de câncer (toxicidade crônica), o TBME possui uma toxicidade aguda mais de duas vezes maior que o EtOAc, o que não é refletido na velocidade das reações catalisadas pelo dois. A taxa inicial de reação de O-acetilação de S1 na presença do TBME não foi signficativamente mais rápida que na presença de EtOAc., Deste modo a continuidade deste trabalho foi realizada com o solvente EtOAc em detrimento do TBME.

5.5 Estudo do Reuso do biocatalisador

A reutilização da lipase imobilizada é de extrema importância para a viabilidade econômica dos processos enzimáticos, uma vez que o biocatalizador muitas das vezes é o componente que mais onera o custo final do processo produtivo. Assim, nesta seção será investigada a reutilização da Lipozyme TL-IM nas melhores condições encontradas neste trabalho.

Uma vez encontrado o tempo que leva ao valor máximo de conversão utilizando a lipase TL-IM, o estudo do reuso foi realizado. A investigação foi realizada com os dois melhores solventes, TBME e EtOAc.

Foram determinados dois tempos reacionais distintos para o término da reação e reuso do biocatalisador na presença de EtOAc. Escolheu-se o tempo reacional de 2 horas (Figura 33) e 1 Hora (Figura 34) que apresentaram conversões finais de 98% e 90% , respectivamente.

A quantidade de reusos estudada foi determinada com base na literatura. Em alguns trabalhos foram feitos apenas três reusos dos biocatalisadores (AGUIEIRAS, *et al*., 2016). ZHAO *et al*. (2013) e WANG *et al* (2016) mostraram perda de mais de 10% da atividade após o 7º reuso. Dessa maneira, foram estudados 7 reusos para todas as condições estudadas. Ao final de cada ciclo, o biocatalizador era lavado duas

vezes com EtOAc e reutilizado na reação. Na figura 33 pode-se observar as conversões encontradas após cada reuso em ciclos reacionais de 2h.

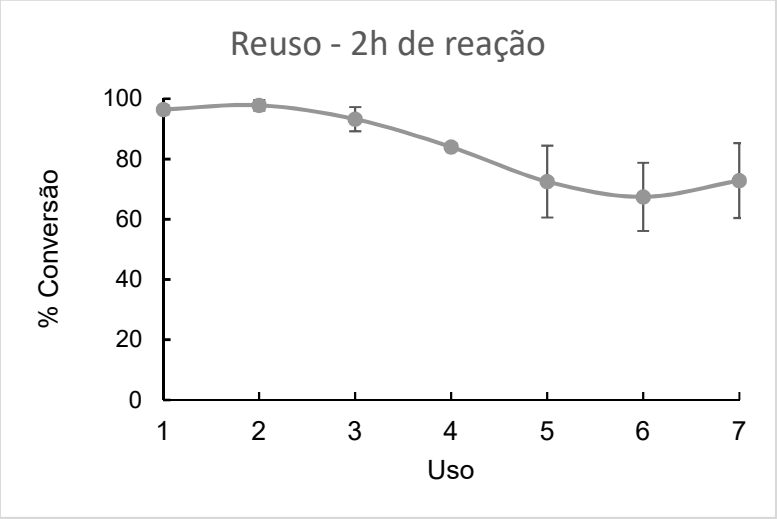


Figura 33: Estudo da viabilidade do biocatalisador através do reuso. Cada ciclo com duração de 2h. As condições reacionais foram 5 mg de substrato, 200 U/ml de biocatalizador, 1ml de acetato de vinila, 1 ml do respectivo solvente, 30 oC, 300 RPM, com agitação magnética

De acordo com os resultados, no quarto ciclo houve uma queda de 10% na conversão. Enquanto no quinto, sexto e sétimo ciclos, a perda de conversão não foi estatisticamente significativa.

Como houve uma pequena queda na conversão, estudou-se o efeito de ciclos mais curtos. Na figura 34 pode-se observar as conversões encontradas após cada reuso em ciclos reacionais de 1h.

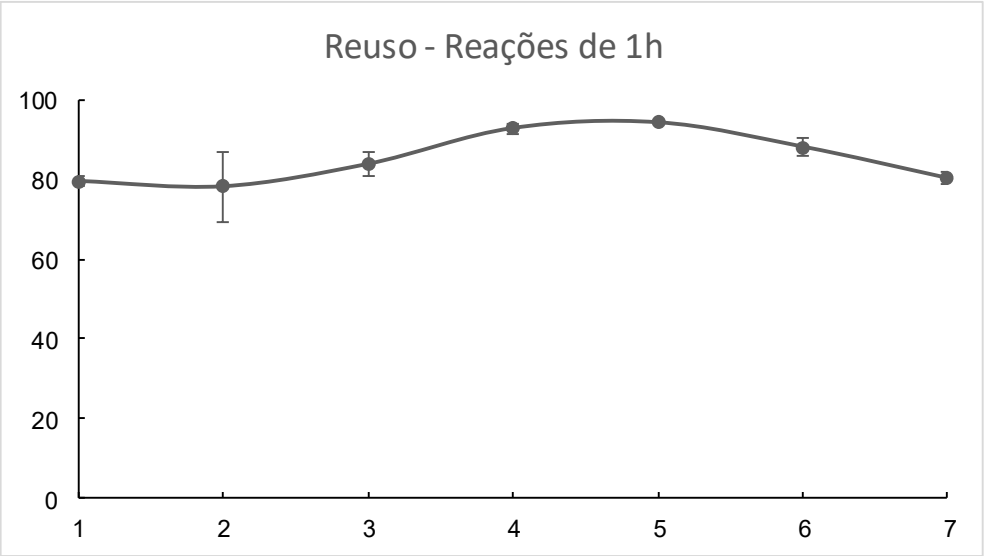


Figura 34: Gráfico que representa os ciclos de reuso com cada ciclo tendo a duração de 1h. As condições reacionais foram 5 mg de substrato, 200 U/ml de biocatalizador, 1ml de acetato de vinila, 1 ml do respectivo solvente, 30 oC, 300 RPM, com agitação magnética

Nos ciclos reacionais mais curtos não foi observado perda significativa na conversão nos primeiros reusos e até um ligeiro aumento na conversão foi observado até o 4º reuso. A conversão máxima atingida nas reações foi a conversão máxima encontrada na cinética de 0 a 2 horas (93%).

Para que o reuso possa ocorrer de forma eficiente, o biocatalizador não pode sofrer danos ao longo dos reusos. Os danos mais comuns são quebra do suporte, dessorsão da enzima e entupimento do poro do suporte (DE VOS *et al.,* 2008.). A quebra do suporte pode levar à redução da massa de suporte e pode levar à queda na atividade por incapacidade de recuperação entre os ciclos. A quebra ocorre principalmente devido a choques entre o suporte e o agitador magnético ou degradação causada pelos solventes (KOBAYASHI *et al.,* 2000). Para garantir que esse fenômeno não ocorreu, o biocatalizador foi pesado antes e depois dos reusos e não houve perda de massa. Isso mostra que a agitação a 300 RPM com agitador magnético de 5 mm x 1,5 mm não danificou o biocatalizador.

A dessorção da enzima pode ser causada pelo rompimento das interações da enzima com o suporte, que pode ser causada pelo solvente. Para detectar se houve ou não dessorção, após cada ciclo de reação de uma hora o sobrenadante foi evaporado, ressuspenso em 70µl de agua mili-Q e a proteína presente foi quantificada por método de Bradford. Nenhuma amostra apresentou perda significativa de proteína. Todas as reações apresentaram perda em torno de 6 ppm de proteína por ml de reação. Essa perda é extremamente baixa e chega ao limite de detecção da

técnica. Dessa maneira, é possível afirmar que não houve perda significativa de proteína, o que pode ser corroborado pela manutenção sa atividade do biocatalizador ao longo dos reciclos.

Assim, pode-se afirmar que em todo o reuso não foi observada perda de atividade enzimática ou dessorção de proteínas. Os biocatalizadores puderam ser reutilizados sete vezes sem que tenha sido detectada perda na atividade.

Na Seção 5.2 (Figura 26) foi possível observar que o EtOAc funcionou como agente acilante, mas gerou apenas 9,8 % de conversão em 96 h. Dessa maneira, foi levantada a hipótese que este solvente poderia estar atuando como agente acilante (substrato) e estar acumulando-se no poro do biocatalisador a cada lavagem.. Para afastar essa possibilidade, foi feito um novo estudo de reuso, mas com lavagens feitas com um solvente mais apolar, o hexano, e que não poderia ser utilizado como agente acilante (substrato) pela enzima. O resultado pode ser observado na Figura 35.

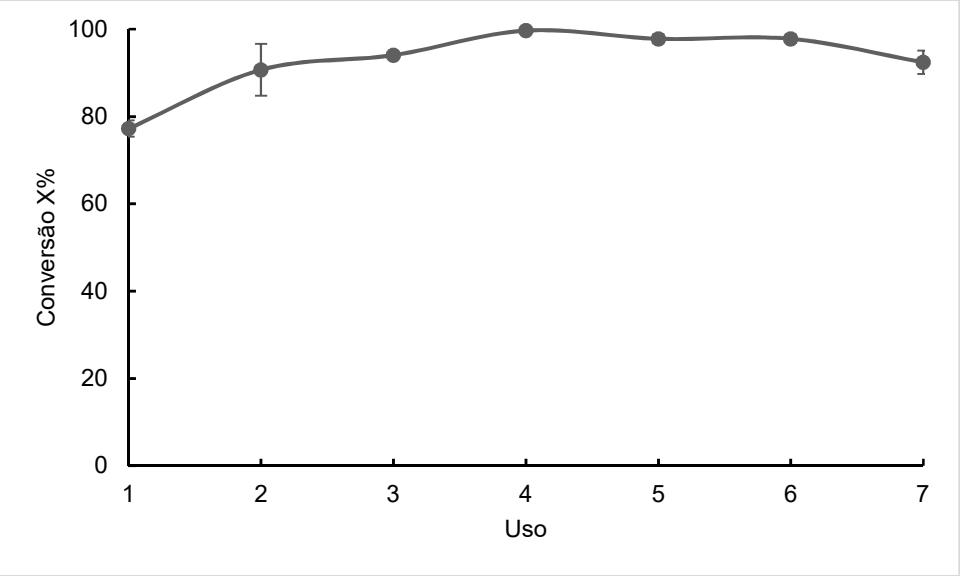


Figura 35:31 Gráfico que representa os ciclos de reuso com cada ciclo tendo a duração de 1h, entre cada ciclo foi realizada uma etapa de lavagem com hexano .As condições reacionais foram 5 mg de substrato, 200 U/ml de biocatalizador, 1ml de acetato de vinila, 1 ml do respectivo solvente, 30 oC, 300 RPM, com agitação magnética

Pode-se observar um ligeiro aumento da conversão no quarto, quinto e sexto reusos . Entretanto, essa conversão ligeiramente maior não justifica o uso do hexano, já que esse solvente é mais tóxico e poluente que o EtOAc. Entreatnto, a hipótese de que o poro do suporte possa estar sendo obstruído pelo substrato e que o EtOAc estaria atuando com substrato não pode ser descartada.

O estudo do reuso do biocatalizador em reações que continham TBME como solvente no tempo reacional de 45 min também foi realizado. Entretanto, o TBME

dissolveu o suporte hidrofóbico da Lipozyme TL-IM após o quinto reciclo. O aspecto do biocatalizador pode ser visto na Figura 36.

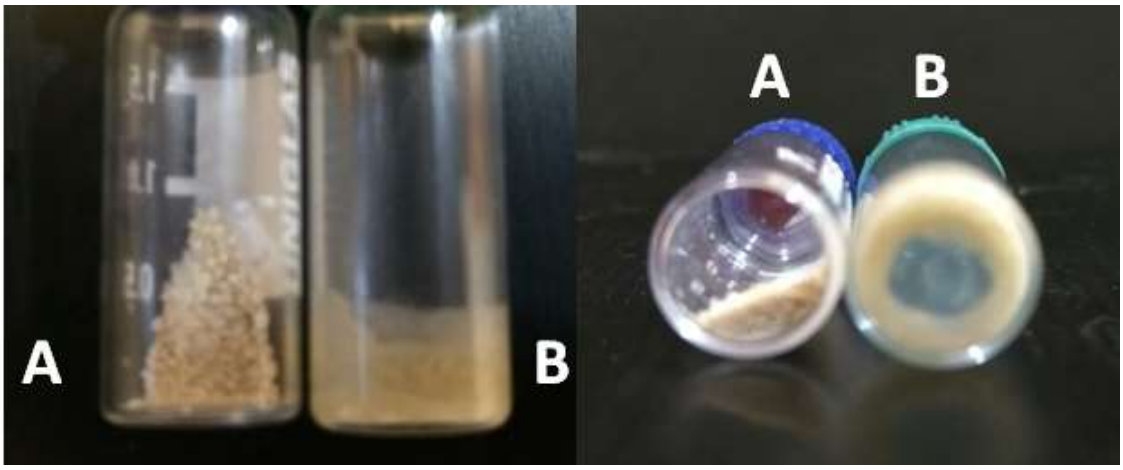


Figura 36: Fotografia mostrando o aspecto macroscópico final do Lipozyme RM-IM ao final dos reciclos. A) Biocatalizador integro, antes de qualquer uso. B) Biocatalizador após os ciclos de reuso. Notar que não é mais possível definir os limites das esferas de suporte

Contrariamente ao observado neste trabalho diversos autores não discutiram a destruição do biocatalisador por este solvente. YAN *et al* (2015) usaram a Lipozyme TL – IM na resolução cinética do mentol em meio contendo TBME, entretanto no artigo não foi descrito o estado final do biocatalisador e tão pouco os autores fizeram o estudo de reuso. MASTIHUBA *et al*. também utilizaram a TL-IM em meio contendo TBME para realizar a síntese de um intermediário quiral de chalcogran, mas nesse trabalho também não é discutido o reuso do biocatalizador ou o estado final desse. Outros trabalhos que utilizaram a Lipozyme TL-IM em meio contendo TBME foram WONGSAKUL *et al*., 2003; XIA *et al*., 2012; ZHONG *et al*., 2009, entretanto nenhum desses descreveu em seus trabalhos o estado que o biocatalizador ficou ao final das reações. Entretanto, AGUEIRAS *et al*., 2016 relataram que durante a reação de transesterificação do ácido oleico, em meio contendo etanol, o suporte da Lipozyme TL-IM também foi dissolvido.

Dado o exposto, pode-se sugerir que alguns solventes não são propícios para a utilização da TL-IM, uma vez que o suporte pode ser dissolvido, impedindo o reuso do biocatalizador. O fato de o suporte da lipase TL-IM se dissolver no meio hidrofóbico pode ajudar a compreensão do porquê a reação no meio contendo TBME apresentou alta velocidade inicial, sendo a maior entre os cinco meios reacionais estudados, mas não manteve a conversão máxima por muito tempo.

7.0 Conclusões e Perspectivas

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- A dessimetrização de 1,3-di-O-benzil-*mio*-inositol (S1) foi obtida com êxito para as lipases comerciais Lipozyme TL-IM e Lipozyme RM-IM. Ambas as enzimas foram régio e enantiosseletivas. Entretanto, as reações catalisadas pela Lipozyme TL-IM apresentaram velocidades maiores que as catalisadas por Lipozyme RM-IM
- A lipase comercial Novozyme 435 não foi capaz de dessimetrizar S1 e gerou o produto simétrico S2. Nos futuros trabalhos pretende-se estudar a possibilidade de um derivado de *mio*-inositol di-acetilado, utilizando conjuntamente Novozyme 435 e TL-IM ou RM-IM.
- Os solventes não afetaram a enantiosseletividade da reação. Dessa maneira, os melhores resultados foram os que apresentaram as maiores conversões.
- O Acetato e vinila foi o agente que gerou melhores conversões para todas as enzimas.
- Os solventes que possibilitaram as maiores velocidades iniciais de reação foram o TBME e o Acetato de etila.
- Apesar de a reação na presença do TBME ser a que apresentou velocidades maiores, não foi possível reutilizar o biocatalisador quando as reações ocorreram na presença desse solvente.
- A utilização do TBME levou à destruição do suporte da Lipozyme RM-IM
- Foi possível reutilizar a Lipozyme RM-IM por 7 vezes sem que fosse percebida diminuição da massa do biocatalizador, dessorção da proteína ou queda na atividade. Futuramente, pode-se estudar mais reusos até que seja detectada perda de atividade do biocalalizador

8. Referências Bibliográficas:

ADLERCREUTZ, P. 1994. Enzyme-catalyzed lipid modification. **Biotechnol. Genet. Eng. Rev.** 12, 231-254.

ALOULOU, A., RODRIGUEZ, J. A., FERNANDEZ, S., OSTERHOUT, D., PUCCINELLI, D. e CARRIÈRE, F. 2006. ―Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies‖, **Biochimica et Biophysica Acta,** v.1761, p. 995–1013.

AGUIEIRAS, E. C. G. RIBEIRO, D. S., COUTEIRO, P. P., BASTOS, C. M., DE QUEIROZ, D. S., PARREIRA, J. M., & LANGONE, M. A.. Investigation of the Reuse of Immobilized Lipases in Biodiesel Synthesis: Influence of Different Solvents in Lipase Activity. **Applied biochemistry and biotechnology**, p. 1-12, 2016.

ALI, I., ALAM, S. D., AL-OTHMAN, Z. A., & FAROOQI, J. A. Recent advances in SPE–chiral-HPLC methods for enantiomeric separation of chiral drugs in biological samples. **Journal of chromatographic science**, v. 51, n. 7, p. 645-654, 2013.

ALMEIDA, M.V., SILVA, D.S., SOUZA, M.V.N. e BENÍCIO, A.A.A. 2003. A Cascata dos fosfoinositídeos. ***Quim. Nova***, Vol. 26, No. 1, 105-111.

ANDERSCH, P.; SCHNEIDER, M. P. Enzyme assisted synthesis of enantiomerically pure myo-inositol derivatives-Chiral building blocks for inositol polyphosphates. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 4, n. 10, p. 2135-2138, 1993.

ANOVÁ,C.M. e HUTTA, M. 2003. Role of biological matrices during the analysis of chiral drugs by Liquid Chromatography. ***J. Chromatog***. B, Amsterdam, v. 797, p. 91-109.

ANTHONSEN, T. e HOFF, B.H. 1998. Resolution of derivatives of 1,2 propanediol with lipase B from *Candida Antarctica*, Effect of substrate structure, medium, water activity and acyl donor on enantiomeric ratio. **Chemistry and Physics of lipids** 93, 199-207p.

ASGHER, M., SHAHID, M., KAMAL, S., & IQBAL, H. M. N. Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. **Journal of Molecular** BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. Applied enzyme

BALCÃO, V. M., PAIVA, A. L. e MALCATA, F. X. 1996."Bioreactors with immobilized lipases", **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 392-416.

BARBOSA, Oveimar *et al*. Strategies for the one-step immobilization–purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 5, p. 435-456, 2015.**Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 56-66, 2014.

BARON, A.M. ―Biocatálise em ambientes aquo-restrictos:comparação de diferentes sistemas reacionais‖, tese de mestrado, Universidade federal do Paraná, Curitiba. 2003.

BARRIUSO, Jorge *et al*. Structural traits and catalytic versatility of the lipases from the Candida rugosa-like family: A review. **Biotechnology advances**, 2016.

BEZBORODOV, A. M.; ZAGUSTINA, N. A. Enzymatic biocatalysis in chemical synthesis of pharmaceuticals (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 237-249, 2016

BORNSCHEUER, U.T. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiol. Review.**, v. 733, p. 1-9.

BRADFORD, M.M., 1976, ***Analytical Biochemistry*****,** *72*, 248-254

CAJAL, Y., SVENDSEN, A., GIRONA, V., PATKAR, S. A. and ALSINA, M. A. 2000. Interfacial control of lid opening in *Thermomyces lanuginosa* lipase. **Biochemistry.** 39:413– 423.

CAJAL, Y., SVENDSEN, A., DE BOLÓS, J., PATLAR, S.A. e ALSINA, M.A. 2000b. Effect of the lipid interface on the catalytic activity and spectroscopic of a fungal lipase. **Biochimie.,** 82, 1053-1061

CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource technology**, v. 97, n. 17, p. 2195-2210, 2006.

CAMMAROTA, M. C., TEIXEIRA, G. A. e FREIRE, D. M. G. 2001. *Enzymatic prehydrolysis and anaerobic degradation of wastewater with high fat content*. **Biotechnology Letters,** *71*:44-50.

Ricinus communis L.: Lipase Activity and Presence of Toxic and Allergenic Compounds. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. , v.136, p.57 – 65.

CAREY, F. e SUNDBERG, R. 2007. **Advanced Organic Chemistry: Structure and Mechanisms,** 5 ed., Springer:Virginia, 1212p.

CASTRO, H.F., MENDES, A.A., SANTOS, J.C. e AGUIAR, C.L. 2004. Modificação de oleos e Gorduras por Biotransformação. **Quimica Nova***,* v. 27, p. 146-156.

CASTRO-OCHOA**,** L. D., RODRÍGUEZ-GÓMEZ**,** C., VALERIO-ALFARO**,** G. **e** ROS**,** R.O. 2005. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. ***Enzyme and Microbial Technology***, v. 37 (6), 648-654p.

CAVALCANTI, E.D.C., MACIEL, F.M., VILLENEUVE, P., LAGO, R. C. A., MACHADO, O. L. e FREIRE, D.M.G. 2007. Acetone Powder from Dormant Seeds of *Ricinus communis* L.: Lipase Activity and Presence of Toxic and Allergenic Compounds. Applied Biochemistry and Biotechnology., v.136, p.57 – 65.

CHOJNACKA, A, OBARA, R. e WAWRZENCZY, C. Kinetic resolution of racemic secondary aliphatic allylic alcohols in lipase-catalyzed transesterification. **T*etrahedron*:*Asymmetry*,** v. 18, p. 101–107, 2007.

CDC https://www.cdc.gov/niosh/ipcsneng/neng1164.html, consultado em dezembro de 2016

CHEN, C.S., FUJIMOTO, Y., GIRDAUKAS, G. e SIH, C.J. 1982.—Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enatiomers‖, **Journal Amerian Chemical Society,** v. 104, p. 7294–7299.

CHUA, L. e SARMIDI, M. 2006. Effect of solvent and initial water content on (*R*, *S*)-1-phenylethanol resolution. **Enzyme and Microbial Technology,** v. 38, p. 551–556.

COSTA, V.E.U. e AMORIN, H.L. 1999. —O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiomeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influencia do solvente—, **Química Nova,** v. 22, n. 6, p. 863-873.

CUNHA, A.G., DA SILVA, A.A.T, DA SILVA, A.J.R., TINOCO, L.W., ALMEIDA, R.V., DE ALENCASTRO, R.B., SIMAS, A.B.C. e FREIRE, D.M.G. Efficient kinetic resolution of (±)-1,2-*O*-isopropylidene-3,6-di-*O*-benzyl-*myo*-inositol with the lipase B of *Candida antarctica*. 2010. **Tetrahedron: *Asymmetry***, vol 21 issue 24, p. 2899-2903.

CUNHA, R. LOR *et al*. Biocatalysis for desymmetrization and resolution of stereocenters beyond the reactive center: How far is far enough?. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 5, p. 614-623, 2015.

CUNHA, A. G., DA SILVA, A. A., GODOY, M. G., ALMEIDA, R. V., SIMAS, A. B., & FREIRE, D. M. Experimental design of the kinetic resolution of a key precursor of high-value bioactive myo-inositols by an immobilized lipase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, n. 2, p. 205-211, 2013.

CUNHA, R. L.O.R, FERREIRA, E. A., OLIVEIRA, C. S., & OMORI, Á. T. Biocatalysis for desymmetrization and resolution of stereocenters beyond the reactive center: How far is far enough?. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 5, p. 614-623, 2015.

CYGLER, M. e SCHRAG, J. D. 1997. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. **Methods Enzymol,** 284, part A, p. 3-27

DE SOUSA, J. S., CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D. A., ARANDA, D. A. G., & FREIRE, D. M. G. Application of lipase from the physic nut (Jatropha curcas L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, n. 1, p. 133-137, 2010.

DE VOS, Dirk; VANKELECOM, Ivo FJ; JACOBS, Pierre A. (Ed.). **Chiral catalyst immobilization and recycling**. John Wiley & Sons, 2008.

DEREWENDA, Z. S., DEREWENDA, U. , DODSON, G. O. 1992. The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1.9 A resolution. **J. Mol. Biol. 227**:818-839.

EGLOFF, .P., RANSAC, S., MARGUET, F., ROGALSKA, E., VAN TILBEURGH, H.,BUONO, G., CAMBILLAU, C. e BERGER, R. 1995. Les lipases: cinétiques, spécificités et aspects structuraux. In Malcata, F.X. (Ed). Engineering of/with lipases.. **Dordrecht: Kluwer Academic Publishers**

ELIEL, E. L., WILEN, S. H. **Stereochemistry of organic compounds**. John Wiley & Sons, 2008

ERIKSSON, T., BJÖURKMAN, S., ROTH, B., FYGE, Å., & HÖUGLUND, P. Stereospecific determination, chiral inversion in vitro and pharmacokinetics in humans of the enantiomers of thalidomide. **Chirality**, v. 7, n. 1, p. 44-52, 1995.

EMA, T., MAENO, S., TAKAYA, Y., TAKASHI, S. e UTAKA, M. 1996. Significant effect of acyl groups on enantioselectivity in lipase-catalyzed transesterifications. *Tetrahedron Asym.* v.7 (3), p. 625-628.

ETAYO, Pablo; VIDAL-FERRAN, Anton. Rhodium-catalysed asymmetric hydrogenation as a valuable synthetic tool for the preparation of chiral drugs. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 2, p. 728-754, 2013.

FDA http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm073403.pdf, consultado em dezembro de 2016

FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Lipase from Thermomyces lanuginosus: uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 3, p. 197-212, 2010.

FERNANDEZ-MAYORALAS, A.; BERNABE, M.; MARTIN-LOMAS, M. *Tetrahedron*, **1988**,*44*, 4877-4882

FERRABOSCHI, P., GRISENTI, P. e SANTANIELLO, E. 1990. New hemoenzymic synthesis of (R)- and (S)-4-(phenylsulfonyl)-2-methyl-1-butanol: a chiral C5 isoprenoid synthon. *J. Org. Chem*. v. *55* (25).

FERRARIO, V. EBERT, C., NITTI, P., PITACCO, G., & GARDOSSI, L.. Modelling and predicting enzyme enantioselectivity: The aid of computational methods for the rational use of lipase B from Candida antarctica. **Current Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 87-99, 2015.

FOX, Richard J.; HUISMAN, Gjalt W. Enzyme optimization: moving from blind evolution to statistical exploration of sequence–function space. **Trends in biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 132-138, 2008.

FREIRE, D.M.G. e CASTILHO L. R. 2010. ENZIMAS EM BIOTECNOLOGIA: PRODUÇÃO, APLICAÇÕES E MERCADO. 1 prova, p. 367-383.

GHANEM, A. e ABOUL-ENEIN, H. Y. 2004. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. Tetrahedron: Asymmetry, v. 15, p. 3331–3351.

GHANEM, A. 2007. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pureenriched compounds. Tetrahedron, v. 63 , p. 1721–1754.

GHANEM, A., ABOUL-ENEIN, M.N., EL-AZZOUNY, A. e EL-BEHAIRY, M.F. 2010. Lipase-mediated enantioselective kinetic resolution of racemic acidic drugs in non-standard organic solvents: Direct chiral liquid chromatography monitoring and accurate determination of the enantiomeric excesses. *J. Chromatogr.* A 1217, 1063–1074.

GRÖGER, Harald; HUMMEL, Werner. Combining the 'two worlds' of chemocatalysis and biocatalysis towards multi-step one-pot processes in aqueous media. **Current opinion in chemical biology**, v. 19, p. 171-179, 2014GHANEM, A. e ABOUL-ENEIN, H. Y. 2004. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. Tetrahedron: Asymmetry, v. 15, p. 3331–3351

GUERCIOLINI, R. Mode of action of orlistat. **International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 21, p. S12-23, 1997

GREIM, Helmut. The MAK-Collection for Occupational Health and Safety. **DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft. doi**, v. 10, n. 1002, p. 3527600418, 2006.

HANEFELD, Ulf; GARDOSSI, Lucia; MAGNER, Edmond. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 453-468, 2009.

HANESSIAN, Stephen; GIROUX, Simon; MERNER, Bradley L. **Design and strategy in organic synthesis: from the Chiron approach to catalysis**. 2013.

HELLYER, S. A., CHANDLER, I. C. e BOSLEY, J. A., Can the Fatty Acid Selectivity of Plant Lipases be Predicted from the Composition of the Seed Triglyceride? Biochemica et Biophysica Acta, 1440, No. 2-3, 215 (1999).

HOF, R.P. e KELLOGG, R.M. 1996. Lipase AKG mediated resolutions of a,a-disubstituted 1,2-diols in organic solvents: Remarkably high regio- and enantio-selectivity. Perkin Trans. 1, 2051–2060.

HOFF, B.H., ANTHONSEN, H.W. e ANTHONSEN, T., 1996b. The enantiomer ratio

strongly depends on the alkyl part of the acyl donor in transesterification with lipase B from Candida antarctica. *Tetrahedron: Asymmetry* 7, 3187–3192.

HOUDE, Alain; KADEMI, Ali; LEBLANC, Danielle. Lipases and their industrial applications. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 118, n. 1-3, p. 155-170, 2004.

IJIRO, K., HATANO, A. e OKAHATA, Y. 1995. Enhancing enantioselectivity of a lipidcoated lipase via imprinting methods for esterification in organic solvents Tetrahedron Asym.v 6 (6), 1311-1322.

JAEGER, K .E.; DIJKSTRA, B. W., REETZ, M. T. 1999. Bacterial Biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications on lipases. Annual Review of Microbiology, v. 53, p. 315-351.

JAEGER, K. E. e EGGERT, T. 2002. Lipases for biotechnology. Curr. Opin. Biotechnol., 13, 390-397.

JAEGER, K. E. e REETZ, M. T. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology,** v. 16, p. 396-403.

JEGANATHAN, Jeganaesan; NAKHLA, George; BASSI, Amarjeet. Hydrolytic pretreatment of oily wastewater by immobilized lipase. **Journal of hazardous materials**, v. 145, n. 1, p. 127-135, 2007.

KAPOOR, M.; MAJUMDER, A. B.; GUPTA, M. N. Promiscuous Lipase-Catalyzed C–C Bond Formation Reactions Between 4 Nitrobenzaldehyde and 2-Cyclohexen-1-one

in Biphasic Medium: Aldol and Morita–Baylis–Hillman Adduct Formations. **Catalysis Letters**, v. 145, n. 2, p. 527-532, 2015.

KAPOOR, Manali; GUPTA, Munishwar Nath. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555-569, 2012.

KOZIKOVSKI, A. P., FAUQ, A. H., POWIS, G. e MELDER, D. C. 1990. *J.* ***Am. Chem.*** **Soc.v.** 112, p. 4528-4531.

KLIBANOV, Alexander M. Improving enzymes by using them in organic solvents. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 241-246, 2001.

KOELLER, K. M.; WONG, C. H. Enzymes for chemical synthesis. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 232-240, 2001.

KRIEGER, N., BHATNAGAR, T., BARATTI, J.C., BARON, A.M., LIMA, V.M.G. e MITCHELL, D. 2004. Non-Aqueous Biocatalysis in Heterogeneous Solvent Systems. Food **Technol. Biotechnol.,** v. 42 (4), p.279–286

LAUMEN, Kurt; GHISALBA, Oreste. Preparative-scale Chemo-enzymatic Synthesis of Optically Pure d-myo–Inositol-1-phosphate. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 58, n. 11, p. 2046-2049, 1994.

LEACH, Andrew R.; SHOICHET, Brian K.; PEISHOFF, Catherine E. Prediction of protein-ligand interactions. Docking and scoring: successes and gaps. **Journal of medicinal chemistry**, v. 49, n. 20, p. 5851-5855, 2006.

LEAL, M. C., FREIRE, D. M., CAMMAROTA, M. C., & SANT'ANNA, G. L. Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1173-1178, 2006.

LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W. e SCHMIDELL, W. 2001. —**Biotecnologia Industrialll**, v. 1, 1ª ed.

MANOEL, E. A. *et al*. Kinetic resolution of 1, 3, 6-tri-O-benzyl-myo-inositol by Novozym 435: Optimization and enzyme reuse. **Organic Process Research & Development**, v. 16, n. 8, p. 1378-1384, 2012NIOSH[a] –

LIU Y, WANG F, TAN T. 2009. Cyclic resolution of racemic ibuprofen via coupled efficient lipase and acid-base catalysis. **Chirality** 21 (3):349–353.

MANOEL, E. A., PAIS, K. C., FLORES, M. C., E MIRANDA, L. S. D. M., COELHO, M. A. Z., SIMAS, A. B., FREIRE, D. M. G. & DE SOUZA, R. O. M. Kinetic resolution of a precursor for myo-inositol phosphates under continuous flow conditions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 87, p. 139-143, 2013.

MANOEL, E. A., Pais, K. C., Cunha, A. G., Coelho, M. A. Z., Freire, D. M., & Simas, A. B.. On the kinetic resolution of sterically hindered myo-inositol derivatives in organic media by lipases. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 23, n. 1, p. 47-52, 2012

MANOEL, E. A. RIBEIRO, M. F., DOS SANTOS, J. C., COELHO, M. A. Z., SIMAS, A. B., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., & FREIRE, D. M.. Accurel MP 1000 as a support for the immobilization of lipase from Burkholderia cepacia: Application to the kinetic resolution of myo-inositol derivatives. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 10, p. 1557-1564, 2015.

MARCHOT, Pascale; CHATONNET, Arnaud. Enzymatic activity and protein interactions in alpha/beta hydrolase fold proteins: moonlighting versus promiscuity. **Protein and peptide letters**, v. 19, n. 2, p. 132-143, 2012.

MASTIHUBA, Vladimír *et al*. Enzymatic synthesis of a chiral chalcogran intermediate. **Chemical Papers**, v. 68, n. 6, p. 745-750, 2014.

MOSBACH, Klaus; RAMSTRÖM, Olof. The emerging technique of molecular imprinting and its future impact of biotechnology. **Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 163-170, 1996.

MOSKOWITZ, GERARD J. G. J., CASSAIGNE, R., WEST, I. R., SHEN, T., & FELDMAN, L. I. Hydrolysis of animal fat and vegetable oil with Mucor miehei esterase. Properties of the enzyme. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 25, n. 5, p. 1146-1150, 1977.

MUKHERJEE, Manjari. Human digestive and metabolic lipases—a brief review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, n. 5, p. 369-376, 2003.

MUTTER, Manfred. The Construction of New Proteins and Enzymes-a Prospect for the Future?. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 24, n. 8, p. 639-653, 1985.

NAKAMURA, K., TAKEBE, Y., KITAYAMA, T. e OHNO. 1991. A. Effect of solvent

structure on enantioselectivity of lipase-catalyzed transesterfication. **Tetrahedron**, 32, 4941- 4944

NINI, L., SARDA, L., LOUIS-CLAUDE, C., BOITARD, E., JEAN-PAUL, DD. E CHAHINIAN. 2001. H. Lipase-catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a Kinetic study. **Biochim. Biophys. Acta**., 1534, 34-44.

NELSON, D. L.; COX, M. M. LEHNINGER princípios de bioquímica. **Lehninger princípios de bioquímica**, 2002.

NIOSH[b] - https://www.cdc.gov/niosh/ipcsneng/neng0367.html, consultado em dezembro de 2016

OLIVEIRA, M.M. e EINICKER-LAMAS, M., 2000. Inositol metabolism in Trypanosoma cruzi: potential target for chemotherapy against Chagas' disease. **Annals of the Brazilian Academy of Science** 72, 413–419.

OMS http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/MTBE200605.pdf, consultado em dezembro de 2016

PAIVA, A. L., BALCÃO, V. M. e MALCATA, F. X. 2000. "Kinetics and mechanics of reactions catalyzed by immobilized lipases", **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 187-204.

PANDEY, A., BENJAMIN, S., SOCCOL, C.R., NIGAM, P., KRIEGER, N., SOCCOL, V. T. 1999. —The realm of microbial lipases in biotechnology‖, **Applied Biotechnology Biochemistry,** v. 29, p. 119-131.

PALOCCI, C., FIORILLO, F. e MONACHE, D. 2003. Lipolytic isoenzymes from Euphorbia latex**. Plant Sci**., v. 165, p. 577– 582.

PLATA, C., MILLAN, C., MAURICIO, J. C., & ORTEGA, J. M. Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. **Food Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 217-224, 2003

PENCREACH, G. e BARATTI, J. C. 1997. Activity of Pseudomonas cepacia lipase in organic media is greatly enhanced after immobilization on a polypropylene support. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.47, p. 630-635.

PLEISS, Jürgen; FISCHER, Markus; SCHMID, Rolf D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. **Chemistry and physics of lipids**, v. 93, n. 1, p. 67-80, 1998.

. POTDAR, M. K. L., K., KELSO, G. F., SCHWARZ, L., ZHANG, C., & HEARN, M. T. Recent developments in chemical synthesis with biocatalysts in ionic liquids. **Molecules**, v. 20, n. 9, p. 16788-16816, 2015.

POTTER, B. V. L. e LAMPE, D. 1995. Chemistry of Inositol Lipid Mediated Cellular **Signaling. Angew. Chem., Int.** Ed. v. 34 (18), p. 1933–1972.

PUVANAKRISHNAN, Rangarajulu; DHAR, Susil C. **Enzyme technology in beamhouse practice**. Central Leather Research Institute, 1988.

RAMARETHINAM, S.; LATHA, K.; RAJALAKSHMI, N. Use of a Fungal Lipase for Enhancement of Aroma in Black Tea. **Food Science and Technology Research**, v. 8, n. 4, p. 328-332, 2002.

RASOR, J. Peter; VOSS, Edgar. Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry. **Applied Catalysis A: General**, v. 221, n. 1, p. 145-158, 2001.

REETZ, Manfred. **Organotitanium reagents in organic synthesis**. Springer Science & Business Media, 2013.

REIS, Pedro *et al*. Lipases at interfaces: a review. **Advances in colloid and interface science**, v. 147, p. 237-250, 2009.

RIBEIRO, B. D., CASTRO, A. M. D., COELHO, M. A. Z., & FREIRE, D. M. G. (2011). Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. **Enzyme research**, v. 2011, 2011.

RODRIGUES, R. C., ORTIZ, C., BERENGUER-MURCIA, Á., TORRES, R., & FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6290-6307, 2013.

RÚA, M.L., DIAZMAURINO, T., FERNANDEZ, V.M., OTERO, C. e BALLESTEROS, A. 1993. Purification na characterization of 2 distinct lipases from *Candida cylindracea*. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1156, p. 181-189.

RUEDA, N., DOS SANTOS, J., ORTIZ, C., TORRES, R., BARBOSA, O., RODRIGUES, R. C., & FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Chemical Modification in the Design of Immobilized Enzyme Biocatalysts: Drawbacks and Opportunities. **The Chemical Record**, 2016.

SALEM, Jamila Hadj *et al*. Effect of acyl donor chain length on isoquercitrin acylation and biological activities of corresponding esters. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 3, p. 382-389, 2010.

SAKURAI, T., MARGOLIN, A. L., RUSSEL, A. J. e KLIBANOV, A. M. 1988. Control of enzyme enatioselectivity by the reaction medium. **J. Am. Chem. Soc.,** 110, 7236-7237.

SALIHU, Aliyu; ALAM, Md Zahangir. Solvent tolerant lipases: a review. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 1, p. 86-96, 2015.

SCHEDLER D.J.A e BAKER D.C. 2004. Fluorinated cyclitols as useful biological probes of phosphatidyeinositol metabolism. **Carbohyd. Res.** *339*: 1585-1595.

SCHRAG, J. D.; LI, Y.; WU, S.; CYGLER, M. Ser-His-Glul triad form the catalytic site of the lipase from the catalytic site of the lipase from Geotrichum candidum. **Nature,** 351, 761-764, 1991

SCHRAG, J. D., Li Y., CYGLER, M., LANG, D., BURGDORF, T., HECHT H.J., SCHMID, R., SCHOMBURG, D., RYDEL, T.J., OLIVER, J.D., STRICKLAND, L.C., DUNAWAY, C.M., LARSON, S.B., DAY, J., MCPHERSON, A. 1997. The open conformation of a Pseudomonas lipase**. Structure**, v. 5: 2, p. 187–202.

SECUNDO, F.; CARREA, G.; TARABIONO, C.; GATTI-LAFRANCONI, P.; BROCCA, S.; LOTTI, M.; JAEGER, K.E.; PULS, M. e EGGERT, T. 2006.The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,** v. 39, p. 166–170.

SHARMA, R., CHISTI, Y. e BANERJEE, U.C. 2001. ―Production, purification, characterization and applications of lipases‖, **Biotechnology Advanced**, v. 19, p. 627– 662.

SAXENA, R. K., GHOSH, P. K. e GUPTA, R. 1999. ―Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry‖, **Current Science**, v. 77, p. 101-115.

SIH, C.J. e CHEN, C.S. 1989. Aspects and optimization of enantioselective biocatalysis in organic solvents: the use of lipases. **Angew. Chem. Int.** Ed. Engl., v. 28, p. 695-707.

SIMAS, A.B.C., DA SILVA, A.A.T., CUNHA, A.G., ASSUMPÇÃO, R., HOELZ, L., NEVES, B., GALVÃO, T.C., ALMEIDA, R.V., ALBUQUERQUE, M.G., FREIRE, D.M.G. e DE ALENCASTRO, R.B. 2011. Kinetic Resolution of (±)-1,2-O-isopropylidene-3,6-di-Obenzyl-*myo*-inositol by Lipases: An Experimental and Theoretical Study on the Reaction of a Key Precursor of Chiral Inositols. **Journal of Molecular Catalysis** *B*, v. 21 (24), p. 2899-2903.

SINGH, Abhishek Kumar; MUKHOPADHYAY, Mausumi. Overview of fungal lipase: a review. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 166, n. 2, p. 486-520, 2012.

SINGH, H. K.; COTE, G. L.; HADFIELD, T. M. Manipulation of enzyme regioselectivity by solvent engineering: Enzymatic synthesis of 5′-O-acylribonucleosides. **Tetrahedron letters**, v. 35, n. 9, p. 1353-1356, 1994.

SKJOLD-JØRGENSEN, J., VIND, J., SVENDSEN, A., & BJERRUM, M. J.. Understanding the activation mechanism of Thermomyces lanuginosus lipase using

rational design and tryptophan-induced fluorescence quenching. **European Journal of Lipid Science and Technology**, 2016

STEIN, Ross L. **Kinetics of enzyme action: essential principles for drug hunters**. John Wiley & Sons, 2011.

STOKES, T.M. e OEHLSCHLAGER, A.C., 1987. Enzyme reactions in apolar solvents: the resolution of (9)-sulcatol with porcine pancreatic lipase. **Tetrahedron Lett.** v. 28, p.2091– 2094.

SURESHAN, K. M., SHASHIDHAR, M. S. e PRAVEEN, T., Das, T. 2003. Regioselective Protection and Deprotection of Inositol Hydroxyl Groups. **Chem. Rev.** v. 103, p. 4477-4503.

TAWAKI, S. e KLIBANOV, A. M. 1992. Inversion of enzyme enantioselectivity mediated by the solvent**. J. Am. Chem. Soc**., v. 114, p. 1882-1884.

THEIL, F. 1995. Lipase-Supported Synthesis of Biologically Active Compounds. **Chem. Rev.,** v. 95, p. 2203-2227.

TRÄFF, Annika; LIHAMMAR, Richard; BÄCKVALL, Jan-E. A chemoenzymatic dynamic kinetic resolution approach to enantiomerically pure (R)-and (S)-duloxetine. **The Journal of organic chemistry**, v. 76, n. 10, p. 3917-3921, 2011.

TROST, B. M.; JIANG, Chunhui. Catalytic enantioselective construction of all-carbon quaternary stereocenters. **Synthesis**, v. 2006, n. 03, p. 369-396, 2006.

VERGER, R. 1997. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. **Trens Biotechnol.,** v. 15, 32-38

WAKABAYASHI, H., WAKABAYASHI, M., EISENREICH,W. e ENGEL, K.H. 2003. Stereoselectivity of the Generation of 3-Mercaptohexanal and 3-Mercaptohexanol by Lipase-

WANG, J., LIU, X., WANG, X. D., DONG, T., ZHAO, X. Y., ZHU, D.,& WU, G. H. Selective synthesis of human milk fat-style structured triglycerides from microalgal oil in a microfluidic reactor packed with immobilized lipase. **Bioresource Technology**, v. 220, p. 132-141, 2016.

WARNER, M. C., SHEVCHENKO, G. A., JOUDA, S., BOGÁR, K., & BÄCKVALL, J. E. DKR of Homoallylic Alcohols Using a Lipase and a Ruthenium Catalyst. **Synfacts**, v. 9, n. 12, p. 1318-1318, 2013.

WELLS, Andy; MEYER, Hans-Peter. Biocatalysis as a strategic green technology for the chemical industry. **ChemCatChem**, v. 6, n. 4, p. 918-920, 2014.

WENZEL, Thomas J.; CHISHOLM, Cora D. Assignment of absolute configuration using chiral reagents and NMR spectroscopy. **Chirality**, v. 23, n. 3, p. 190-214, 2011.

WONGSAKUL, S., PRASERTSAN, P., & BORNSCHEUER, U. T. . Synthesis of 2-monoglycerides by alcoholysis of palm oil and tuna oil using immobilized lipases. **European journal of lipid science and technology**, v. 105, n. 2, p. 68-73, 2003

VASCONCELOS, M G., BRIGGS, R. H., AGUIAR, L. C., FREIRE, D. M., & SIMAS, A. B. Efficient desymmetrization of 4, 6-di-O-benzyl-myo-inositol by Lipozyme TL-IM. **Carbohydrate research**, v. 386, p. 7-11, 2014.

XIA, Shi Wen; LIN, Hui; CHEN, Yong Zheng. Preparation of (R)-2-chloro-1-(m-chlorophenyl) ethanol by Lipozyme TL IM-catalyzed second resolution. **Chinese Chemical Letters**, v. 23, n. 3, p. 289-292, 2012.

YAN, Hong; LI, Qin; WANG, Zhao. Efficient kinetic resolution of (±)-menthol by a lipase from Thermomyces lanuginosus. **Biotechnology and applied biochemistry**, 2015.

YANG e RUSSEL. 1996. ―Fundamentals of non-aqueous enzymology‖ Enzymatic reactions in organic media, Eds: Koskinen e Klibanov, Ed.Blackie academic & professional, Great Britain.

YAO, C. e KOËLLER, W. 1994. Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: Cloning and sequence analysis of a cutinase gene from Alternaria brassicicola. *Physiol*. *Mol. Plant Pathol*. v. 44, p. 81-92.

ZENG, Xing-Ping *et al*. Catalytic Enantioselective Desymmetrization Reactions to All-Carbon Quaternary Stereocenters. **Chemical reviews**, 2016

ZHAO, X. FAN, M., ZENG, J., DU, W., LIU, C., & LIU, D. Kinetics of lipase recovery from the aqueous phase of biodiesel production by macroporous resin adsorption and reuse of the adsorbed lipase for biodiesel preparation. **Enzyme and microbial technology**, v. 52, n. 4, p. 226-233, 2013.

ZHONG, N., LI, L., XU, X., CHEONG, L., LI, B., HU, S., & ZHAO, X. An efficient binary solvent mixture for monoacylglycerol synthesis by enzymatic glycerolysis. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, n. 8, p. 783-789, 2009.

.