

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LILIAN FERNANDA MARTINS DO AMARAL

RESOLUÇÃO ENZIMÁTICA DO (R,S)-1-FENILETANOL CATALISADA PELA  
LIPASE DE *Pseudomonas cepacia* IMOBILIZADA EM HIDRÓXIDOS DUPLOS  
LAMELARES

CURITIBA

2018

LILIAN FERNANDA MARTINS DO AMARAL

RESOLUÇÃO ENZIMÁTICA DO (R,S)-1-FENILETANOL CATALISADA PELA  
LIPASE DE *Pseudomonas cepacia* IMOBILIZADA EM HIDRÓXIDOS DUPLOS  
LAMELARES

Dissertação de mestrado apresentado como requisito ao  
grau de mestre em Engenharia e Ciências dos Materiais do  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências dos  
Materiais (PIPE) – Setor de Tecnologia, UFPR – *Campus*  
Politécnico.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Wypych.

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Nadia Krieger.

CURITIBA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

---

AM485r      Amaral, Lillian Fernanda Martins do  
Resolução enzimática do (R,S)-1-feniletanol catalisada pela lipase de *Pseudomonas cepacia*  
imobilizada em hidróxidos duplos lamelares / Lillian Fernanda Martins do Amaral. – Curitiba, 2018.  
81 f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia e Ciências dos Materiais, 2018.

Orientador: Fernando Wypych.  
Coorientadora: Nadia Krieger.

1. Hidróxidos duplos lamelares. 2. Lipases. 3. Resolução enzimática. 4. (R,S)-1-feniletanol.  
I. Universidade Federal do Paraná. II. Wypych, Fernando. III. Krieger, Nadia. IV. Título.

CDD: 543

---

Bibliotecária: Romilda Santos - CRB-9/1214



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR CIÊNCIAS EXATAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA E  
CIÊNCIA DOS MATERIAIS

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **LILIAN FERNANDA MARTINS DO AMARAL** intitulada: **Resolução enzimática do (R,S)-1-feniletanol catalisada pela lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada em hidróxidos duplos lamelares**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Fevereiro de 2018.

FERNANDO WYPYCH

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

PAULA CRISTINA RODRIGUES

Avaliador Externo (UTFPR)

CLAUDIA ELIANA BRUNO MARINO

Avaliador Interno (UFPR)

## AGRADECIMENTOS

Ao nosso grande Deus por ter me colocado entre pessoas tão especiais que encontrei durante esses dois anos de mestrado, pelas grandes amizades conquistadas e pelo conhecimento adquirido nesse tempo.

À minha família, que me espera todos os feriados de braços abertos para me acolher e em especial o meu irmão (Luiz Fernando Amaral) que sempre me ajuda e está presente no meu dia-a-dia.

Quero agradecer de forma especial ao meu orientador professor Fernando Wypych pela orientação, por todo o conhecimento transmitido e por confiar em mim me dando a oportunidade de realização deste mestrado nesta linha de pesquisa.

À minha co-orientadora professora Nádia Krieger pela oportunidade de desenvolver parte deste trabalho no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (LTEB) e a Professora Cristiane Pilissão (UTFPR).

Agradeço a todos os colegas do Laboratório de Química dos Materiais (LAQMA): Suélen Crevelim, Kamila Colombo, Roger Borges, Karen Mary e Ravena Maia pelo companheirismo, amizade, risadas, cafés e por terem contribuído para minha formação.

Aos grandes amigos (Roberta dos Santos, Thais Gonçalves e Eliseane Maluf) que tiveram presença marcada nos bons momentos e também nos mais difíceis, vocês estarão sempre no meu coração.

À UFPR e a Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais e a Capes pelo auxílio financeiro.



## RESUMO

O presente trabalho trata da preparação e caracterização de três tipos de materiais, todos envolvendo hidróxidos duplos lamelares (HDL) contendo os íons de zinco e alumínio (na razão molar 2:1) e lipases, com interesse para a produção de um sistema bioinorgânico. A lipase de *Pseudomonas cepacia* (LipPS) foi escolhida como um enzima modelo, sendo imobilizada nos HDL via métodos de adsorção, coprecipitação direta e delaminação. A eficiência da imobilização foi dependente do método de imobilização e do tipo de tampão utilizado (GlyGly e MOPS) e água. O método de adsorção foi o que propiciou os melhores resultados. A caracterização dos materiais e dos derivados imobilizados foi realizada por difração de raios X (DRX), espectroscopia vibracional na região do infra vermelho (FTIR), análise térmica (TGA/DTG), microscopia eletrônica de varredura acoplada à sonda de espectroscopia de energia dispersiva (MEV/EDS), microscopia eletrônica de transmissão (MET), e determinação quantitativa do teor de C,H e N. O desempenho da LipPS livre e imobilizada foi determinada pela reação de transesterificação do (*R,S*)-1-feniletanol e quantificada por cromatografia em fase gasosa, com coluna quiral. Os derivados imobilizados preparados via adsorção apresentaram excelentes conversões ( $c=50\%$ ) com excesso enantiomérico do produto ( $ee_p$ ) maior que 99% e coeficiente de enantiosseletividade ( $E$ ) maior que 200. Com a imobilização via método da coprecipitação direta, observou-se uma variação na conversão ( $5\% < C < 39\%$ ) e seletividade ( $E > 200$ ), dependendo do tipo tampão usado. As menores conversões foram observadas na coprecipitação direta utilizando água no processo de imobilização e as maiores conversões foram verificadas quando foi utilizado o tampão MOPS. Para a imobilização da LipPS via delaminação houve uma conversão de 36% e coeficiente de enantiosseletividade maior que 200.

Palavra chave: Hidróxidos duplos lamelares; Lipases; Imobilização; Resolução enzimática; (*R,S*)-1-feniletanol.

## ABSTRACT

The present work deals with the preparation and characterization of three types of materials, all involving layered double hydroxides (LDH) containing zinc and aluminum ions (in molar ratio 2: 1) and lipases, with interest for the production of a bioinorganic system . A lipase from *Pseudomonas cepacia* (LipPS) was chosen as a model enzyme and was immobilized in HDL by adsorption, direct coprecipitation and delamination methods. The efficiency of immobilization depends on the immobilization method and the type of use used (GlyGly and MOPS) and water. The adsorption method for the best product. A characteristic of the materials and the immobilized derivatives was performed by X-ray diffraction (XRD), Fourier Transform Infrared vibration Spectroscopy (FTIR), thermal analysis (TGA / DTG), scanning electron microscopy coupled to the dispersive energy spectroscopy (SEM) and quantitative determination of the C, H and N. The performance of free and immobilized LipPS was determined by the transesterification reaction of (*R,S*)-1-phenylethanol and quantified by gas chromatography with chiral column. The immobilized derivative products prepared by adsorption presented excellent conversions ( $c = 50\%$ ) with enantiomeric excess of the product (eep) greater than 99% and coefficient of enantioselectivity (E) higher than 200. With an immobilization by direct coprecipitation method, ( $5\% < c < 39\%$ ) and selectivity ( $E > 200$ ), depending on the type of buffer used. The lowest conversions were observed in the direct coprecipitation without the modification and the larger conversions were verified when the MOPS buffer was used. For immobilization of LipPS by delamination, there was a conversion of 36% and an enantioselectivity coefficient greater than 200.

Key words: Layered double hydroxides; Lipases; Immobilization; Enzymatic resolution; (*R, S*)-1-phenylethanol.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Reação de hidrólise catalisada por lipases. ....	15
<b>Figura 2:</b> Reações catalisadas por lipases. ....	15
<b>Figura 3:</b> Estrutura tridimensional da tríade catalítica da lipase pancreática humana (PDB: 1LPB) (GHOLAMHOSE et al., 2010) .....	16
<b>Figura 4:</b> Estruturas tridimensionais da forma fechada (A) e de a forma aberta (B) da lipase de <i>Humicola lanuginosa</i> (HLL). As cadeias carboxílicas laterais Asp-96, Asp-201, Asp-254, Glu-87, Glu-210 (em vermelho) estão na região hidrofóbica externa (amarelo). A tríade catalítica (verde) torna-se acessível depois da abertura da tampa (KAPOOR e GUPTA, 2012). ....	17
<b>Figura 5:</b> Modelo do sítio ativo para as lipases - derivada da regra de Kazlauskas, (a) enantiômero de reação rápida e (b) enantiômero de reação lenta (KAZLAUSKAS et al., 1991). ....	19
<b>Figura 6:</b> Representação esquemática dos métodos de imobilização de enzimas (SILVA, 2012). ....	21
<b>Figura 7:</b> Representação esquemática da estrutura de um hidróxido duplo lamelar genérico: (a) visão lateral e (b) visão superior de uma lamela (MANTOVANI, 2015). ....	25
<b>Figura 8:</b> Representação dos diversos politipos de HDL (COLOMBO, 2017). ....	27
<b>Figura 9:</b> Faixa de pH ótimo para a síntese de alguns HDL (ROY et al., 1992). ....	29
<b>Figura 10:</b> Processo genérico para esfoliação do HDL (YU et al., 2017a) .....	29
<b>Figura 11:</b> Fluxograma das etapas realizadas neste trabalho visando o estudo das reações de resolução enzimática do (R,S)-1-feniletanol. ....	32
<b>Figura 12:</b> Preparação do (R,S)-1-fenietanol a partir da acetofenona. ....	33
<b>Figura 13:</b> Reação de transesterificação do (R,S)-1-feniletanol por via química. ....	34
<b>Figura 14:</b> Representação esquemática do sistema de síntese do HDL (SANTOS, 2016). ....	35
<b>Figura 15:</b> Estrutura do tampão glicililglicina (GlyGly) e ácido 3-morfolino-propano-1-sulfônico (MOPS). Especificações: tampão GlyGly, pKa 3,14-8,17 com pH de 7,5 a 8,9 a 25 °C e 7,2 a 8,6 a 37 °C; tampão MOPS, pKa 7,2 a 25 °C, com pH de 6,5-7,9. ....	36
<b>Figura 16:</b> Representação da reação de hidrólise de um triacilglicerídeo catalisada por lipases. ....	38
<b>Figura 17:</b> Resolução enzimática do (R,S)-1-feniletanol com acetato de vinila catalisada pela LipPS livre e imobilizada em HDL. ....	39



<b>Figura 18:</b> Espectro de FTIR da lipase livre (LipPS).....	46
<b>Figura 19:</b> Padrões de difração de raios X (A) e espectros de FTIR (B) das amostras do HDL preparado em tampão a) GlyGly, b) MOPS e c) Água. ....	47
<b>Figura 20:</b> Micrografias do HDL preparado em água. (A) MET com magnificação de 75 kx, (B) MEV com magnificações de 75 kx do material secado em estufa a vácuo a 25 °C e (C) liofilizado.....	49
<b>Figura 21:</b> Análise de espectroscopia de energia dispersiva do HDL preparado em água. ....	50
<b>Figura 22:</b> Curvas cinética de imobilização da lipase LipPS no HDL em água via processo de adsorção com diferentes cargas de proteínas.....	50
<b>Figura 23:</b> Difratoogramas de raios X do HDL preparado em água (a) e do derivado imobilizado em água pelo método adsorção (HDLadPS) (b). ....	51
<b>Figura 24:</b> Espectros de FTIR da LipPS livre (a), para o derivado imobilizado em água pelo método adsorção (HDLadPS) (b) e o suporte HDL preparado em água (c). ....	52
<b>Figura 25:</b> Imagens de microscopia eletrônica de varredura com magnificação de 30 kx e 100kx dos imobilizado em água pelo método adsorção (HDLadPS). ....	52
<b>Figura 26:</b> Padrões de difração de raios X dos derivados imobilizados em (a) água, (b) tampão GlyGly e (c) tampão MOPS.....	53
<b>Figura 27:</b> Espectros de FTIR da LipPS livre (a) e dos derivados imobilizados em água (b), tampão GlyGly (c) e tampão MOPS (d) via método de coprecipitação. ....	53
<b>Figura 28:</b> Imagens de microscopia eletrônica de varredura com magnificação de 30 kx e 100 kx dos imobilizados em água (A), tampão GlyGly (B) e tampão MOPS (C). ....	55
<b>Figura 29:</b> Curva de análise térmica (TGA/DTG) dos HDL: A– tampão MOPS (HDLM), B– tampão MOPS e enzima (HDLM-PS), C– tampão GlyGly (HDLG), D– tampão GlyGly e enzima (HDLG-PS) e E – TGA de comparação com enzima LipPS.....	57
<b>Figura 30:</b> Difratoograma de raios X do HDL intercalado com o ânion cloreto (a) e do HDL intercalado com o ânion dodecilsulfato (b). ....	58
<b>Figura 31:</b> Espectros de FTIR do HDL intercalado com ânions dodecilsulfato (a) e o HDL intercalado com ânions cloreto (b). ....	59
<b>Figura 32:</b> Imagens de microscopia eletrônica de varredura com magnificação de (a) 30 kx e (b) 100 kx do HDL intercalada com ânions dodecilsulfato. ....	59
<b>Figura 33:</b> Difratoograma de raios X da amostra de HDL intercalado com cloreto (a), HDL intercalado com dodecilsulfato (b), HDL após delaminado em butanol (c) e LipPS imobilizada em HDL via delaminação (d).....	60

- Figura 34:** Espectro de FTIR da LipPS livre (a), imobilizada no suporte HDL (HDLdePS) (b), e suporte HDL delaminado em butanol (c), HDL intercalado com o ânion dodecilsulfato (d) e HDL intercalado com o ânion cloreto (e). .....60
- Figura 35:** Imagens de microscopia eletrônica de varredura com magnificação de 30 kx e 100 kx do derivado imobilizado (HDLdePS) via delaminação.....61
- Figura 36:** Resolução enzimática do (R,S)-1-feniletanol com acetato de vinila catalisada por diferentes massas de LipPS livre. Condições: (R,S) -1-feniletanol (0,5 mmol), acetato de vinila (0,5 mmol), n-hexano (5 mL), 24 h, 35 ° C. [(■) conversão (%) e (●) excesso enantiomérico do substrato (%)]. .....62
- Figura 37:** Curvas cinéticas da reação do (R,S)-1-feniletanol por LipPS imobilizada por adsorção em HDL em diferentes tampões e água. Condições: (R,S) -1-feniletanol (0,5 mmol), acetato de vinila (0,5 mmol), n-hexano (5 mL), 24 h, 35 ° C e 25 mg de LipPS para 50 mg de HDL. [(■) GlyGly e (●) LipPS livre].....63
- Figura 38:** Curvas cinéticas da reação do (R,S)-1-feniletanol por LipPS imobilizada por adsorção em HDL em diferentes tampões e água. Condições: (R,S) -1-feniletanol (0,5 mmol), acetato de vinila (0,5 mmol), n-hexano (5 mL), 24 h, 35 ° C e 25 mg de LipPS para 50 mg de HDL. [(■) água, (●) GlyGly e (▲) MOPS].....64
- Figura 39:** Influência da carga de LipPS imobilizada no HDL pelo método coprecipitação (HDLcoPS) na resolução enzimática do (R,S)-1-feniletanol com acetato de vinila. (A) LipPS imobilizada em HDL na presença de água; (B) LipPS imobilizada em HDL GlyGly e (C) LipPS imobilizada em HDL MOPS.....65
- Figura 40:** Resolução do (R,S)-1-feniletanol por LipPS imobilizada em HDL pelo método de delaminação. ....66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Valores do potencial zeta ( $\zeta$ ), medidos em miliVolts, das amostras de HDL em tampão MOPS (HDLM), tampão GlyGly (HDLG) e em água (HDLA) e a LipPS livre em tampão MOPS (LipPS-M), tampão GlyGly (LipPS-G) e em água (LipPS-A). .....	44
<b>Tabela 2:</b> Atividade de hidrólise e carga de proteínas na lipase LipPS. ....	45
<b>Tabela 3:</b> Análise elementar dos imobilizados em tampão Glicilglicina (HDLG-PS), tampão MOPS (HDLM-PS) e água (HDLA-PS) e do HDL puro preparado em água (HDL-A) no processo de coprecipitação.....	56
<b>Tabela 4:</b> Reuso dos derivados imobilizados na resolução enzimática do (R,S)-1-feniletanol.....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino
<b>DRX</b>	Difração de raios X
<b>DS<sup>-</sup></b>	Ânion dodecilsulfato
<b>DTG</b>	Derivada da curva de análise termogravimétrica
<b>EDS</b>	Espectroscopia de Energia Dispersiva
<b>FTIR</b>	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier
<b>GCQ</b>	Cromatografia gasosa com fase quiral
<b>GlyGly</b>	Glicilglicina
<b>HDLA</b>	HDL em água
<b>HDLG</b>	HDL em tampão glicilglicina
<b>HDLM</b>	HDL em tampão MOPS
<b>HDLA-PS</b>	LipPS imobilizada em HDL em água
<b>HDLG-PS</b>	LipPS imobilizada em HDL em tampão Glicilglicina
<b>HDLM-PS</b>	LipPS imobilizada em HDL em tampão MOPS
<b>HDLadPS</b>	LipPS imobilizada em HDL via adsorção
<b>HDLcoPS</b>	LipPS imobilizada em HDL via coprecipitação
<b>HDLdePS</b>	LipPS imobilizada em HDL via delaminação
<b>LipPS</b>	Lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>
<b>LipPS-A</b>	Lipase em água
<b>LipPS-G</b>	Lipase em tampão Glycilglicina
<b>LipPS-M</b>	Lipase em tampão MOPS
<b>MET</b>	Microscopia Eletrônica de Transmissão
<b>MEV</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura
<b>MOPS</b>	Ácido 3-morfolino-propano-1-sulfônico
<b>PZ</b>	Potencial zeta
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sódio
<b>TGA</b>	Análise Termogravimétrica
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	15
2.1 LIPASES .....	15
2.1.1 Definição e características .....	15
2.1.2 Enantiosseletividade .....	18
2.2 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES .....	21
2.2.1 Métodos de imobilização .....	21
2.2.1.1 Adsorção.....	22
2.2.1.2 Ligação covalente .....	23
2.2.1.3 Aprisionamento .....	23
2.3 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS .....	24
2.3.1 Hidróxidos duplos lamelares (HDL) .....	25
3 OBJETIVOS .....	31
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 MATERIAIS.....	33
4.2 PREPARAÇÃO DOS PADRÕES.....	33
4.2.1 Síntese do ( <i>R,S</i> )-1-feniletanol via química.....	33
4.2.2 Síntese do acetato de ( <i>R,S</i> )-1-feniletila via química .....	34
4.3 PREPARAÇÃO DOS SUPORTES.....	34
4.3.1 Síntese do HDL.....	34
4.3.2 Ensaio de imobilização da lipase PS em HDL .....	36
4.3.2.1 Imobilização da lipase PS em HDL via adsorção (HDLadPS) .....	36
4.3.2.2 Imobilização da lipase PS em HDL via coprecipitação (HDLcoPS) .....	36
4.3.2.3 Imobilização da lipase PS em HDL via delaminação (HDLdePS).....	37
4.4 CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE LipPS .....	37
4.4.1 Determinação de proteínas.....	37
4.4.2 Determinação da atividade de hidrólise .....	38
4.5 RESOLUÇÃO ENZIMÁTICA DO ( <i>R,S</i> )-1-FENILETANOL .....	39
4.6 METODOLOGIA ANALÍTICA .....	40
4.6.1 Análise cromatográfica .....	40
4.6.2 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....	40

4.6.3 Difractometria de raios X (DRX) .....	41
4.6.4 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de <sup>1</sup> H.....	41
4.6.5 Microscopia eletrônica de varredura acoplada à sonda de EDS (MEV) ...	41
4.6.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) .....	42
4.6.7 Análise térmica (termogravimetria – TGA/DTG) .....	42
4.6.8 Análise elementar (CHN) .....	42
4.6.9 Potencial Zeta (ζ).....	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS .....	44
5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS PREPARADOS IMOBILIZADOS .....	45
5.2.1 Caracterização da lipase .....	45
5.2.1.1 Atividade e concentração de proteínas.....	45
5.2.1.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier - FTIR .....	46
5.2.2 Caracterização dos suportes HDL .....	46
5.2.3 Imobilização de LipPS em HDL .....	50
5.2.3.1 Caracterização do imobilizado HDLadPS via adsorção.....	51
5.2.3.2 Caracterização do imobilizado HDLcoPS via coprecipitação.....	52
5.2.3.3 Caracterização do imobilizado HDLdePS via delaminação .....	58
5.3 RESOLUÇÃO ENZIMÁTICA DO (R,S)-1-FENILETANOL .....	61
5.3.1 Carga de lipase.....	61
5.3.2 Efeito do tampão na imobilização da lipase em HDL.....	62
5.3.2.1 Derivados imobilizados via adsorção (HDLadPS).....	63
5.3.2.2 Derivados imobilizados via coprecipitação (HDLcoPS) .....	64
5.3.2.3 Derivados imobilizados via delaminação (HDLdePS).....	66
5.3.3 Reuso dos derivados imobilizados.....	67
6 CONCLUSÕES .....	69
7 PERSPECTIVAS .....	70
8 REFERÊNCIAS.....	71
APÊNDICES.....	78



## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a biocatálise vem se tornando uma ferramenta essencial para a síntese de uma ampla variedade de compostos enantiomericamente puros para aplicações em escala industrial. No contexto da química para o desenvolvimento sustentável, as propriedades das enzimas em condições brandas de operação e seletividade, fazem desses biocatalisadores uma alternativa frente à catálise química (AHMED *et al.*, 2012; GHANEM *et al.*, 2010; KAPOOR e GUPTA, 2012).

As enzimas hidrolíticas, como as lipases, estão entre as classes mais estudadas atualmente, pois são capazes de reconhecer seletivamente compostos quirais, o que faz com que sejam particularmente adequadas na obtenção de compostos enantiomericamente puros, largamente usados como intermediários na indústria farmacêutica, agroquímica e química fina (GHANEM *et al.*, 2010; SUAN e SARMIDI, 2004).

Existem vários métodos para a obtenção de compostos opticamente ativos, sendo que a maioria é através de processos químicos que envolvem várias etapas, gerando grande quantidade de resíduos, o que torna o processo oneroso e ambientalmente inadequado. Contudo, a resolução enzimática é uma ótima estratégia para obtenção destes compostos a partir dos seus racematos, como por exemplo, a resolução de álcoois, pois estes compostos podem atuar como intermediários em várias rotas sintéticas (BENAISSI *et al.*, 2011a; DATTA *et al.*, 2013).

As lipases utilizadas na sua forma livre são sensíveis às alterações bruscas nos parâmetros operacionais e podem apresentar baixa estabilidade em solventes orgânicos, levando à desnaturação e inativação, diminuindo a sua atividade catalítica, além de impossibilitar a sua reutilização em um novo ciclo reacional. Entretanto, estas desvantagens têm sido minimizadas pelo uso de técnicas de imobilização, pois estas técnicas podem fornecer uma maior estabilidade para as enzimas, facilitando sua recuperação e reutilização (BENAISSI *et al.*, 2011b; FORANO *et al.*, 2015; RAHMANA *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2015).

Vários materiais podem ser usados como suportes para imobilização, sendo que o uso de materiais lamelares, como os hidróxidos duplos lamelares (HDL), tem sido foco de muitas pesquisas, pois estes materiais oferecem as características

ideais para equilibrar os principais fatores que determinam a eficiência dos biocatalisadores. Além da facilidade de preparação, controle da composição química e da morfologia, os HDL possuem uma elevada área superficial e menor resistência à transferência de massa.

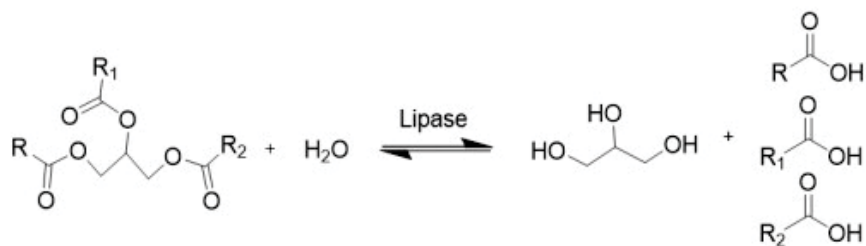
A partir destas considerações, destaca-se a importância de encontrar novas rotas para a obtenção de compostos enantiomericamente puros, aliando-se um processo ambientalmente correto com uso de matérias-primas de baixo custo. Portanto, o objetivo deste trabalho é aplicar a catálise enzimática utilizando a lipase de *Pseudomonas cepacia* (LipPS) imobilizada em HDL para a obtenção de álcoois quirais através da resolução do (*R,S*)-1-feniletanol.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 LIPASES

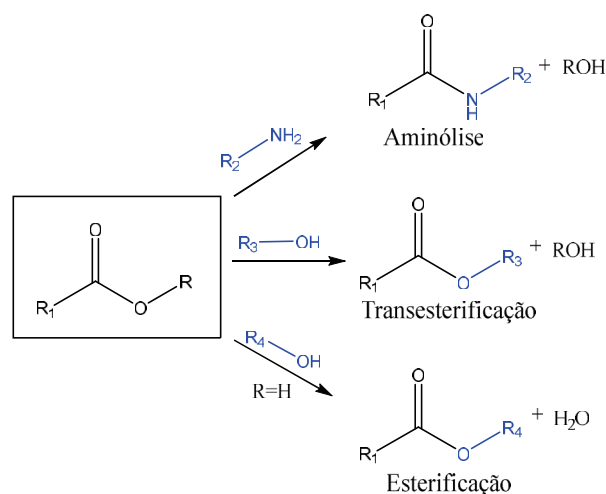
#### 2.1.1 Definição e características

As lipases (triacilglicerol acil hidrolases EC 3.1.1.3) são enzimas que, em seu meio natural, hidrolisam triacilgliceróis de cadeia longa, liberando di- ou monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol (**Figura 1**).



**Figura 1:** Reação de hidrólise catalisada por lipases.

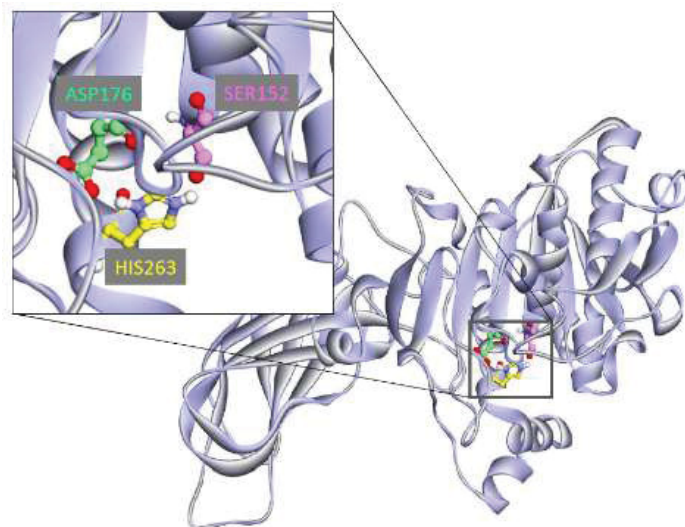
Lipases são cada vez mais requisitadas na biocatálise, pois apresentam alta especificidade e enantiosseletividade frente a diferentes substratos, sendo capazes de catalisar não apenas reações de hidrólise, mas também reações de aminólise, transesterificação e esterificação dependendo dos reagentes de partida empregados e do solvente utilizado (**Figura 2**) (JAVED *et al.*, 2017; KAPOOR e GUPTA, 2012).



**Figura 2:** Reações catalisadas por lípases.

Lipases são encontradas em diversos organismos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias. Os micro-organismos são a fonte preferencial de produção de enzimas, especialmente os fungos, pois as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, favorecendo sua extração, isolamento e purificação. A versatilidade das lipases atende diversas áreas industriais, como no processamento de alimentos, detergentes e formulações de desengordurantes, na indústria de polpa de papel, no tratamento de efluentes ricos em óleos e gorduras (COSTA e MORIM, 1999; MANOEL et al., 2015; MELAIS et al., 2016), e em síntese orgânica, destacando-se a obtenção de compostos opticamente ativos (FABER, 2011).

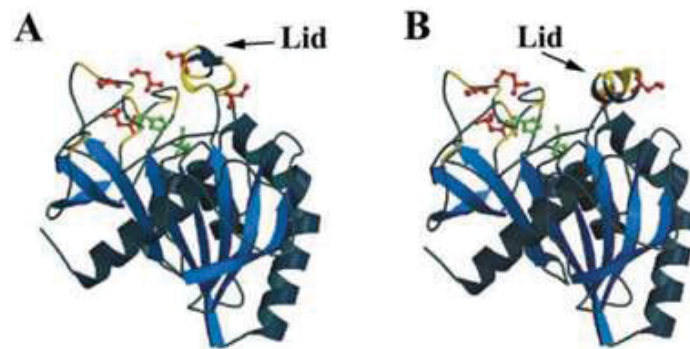
As lipases são classificadas como serina hidrolases e contêm uma tríade catalítica composta pelos resíduos dos aminoácidos serina, aspartato (ou glutamato) e histidina (**Figura 3**) (BRADY et al., 1990). Geralmente, a massa molecular de lipases se encontra na faixa entre 33 a 60 kDa (BORNSCHEUER e KAZLAUSKAS, 2006).



**Figura 3:** Estrutura tridimensional da tríade catalítica da lipase pancreática humana (PDB: 1LPB) (GHOLAMHOSE et al., 2010)

A maior parte das lipases apresenta uma tampa hidrofóbica (*lid*) com  $\alpha$ -hélice encurtada voltada para o sítio catalítico, que controla o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima (**Figura 4**). A tampa hidrofóbica se movimenta na interface lipídio-água, ocasionando o fenômeno de ativação interfacial (FABER, 2011; THOMAS et al., 2005). Este evento caracteriza-se pela ativação de uma lipase na presença de uma interface óleo-água, causada pela mudança conformacional, tornando acessível

o sítio ativo da enzima, e permitindo dessa forma, a catálise da reação. Porém, algumas lipases não possuem a *lid* e não necessitam da interface para desempenhar sua atividade hidrolítica (BRADY et al., 1990, FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013; NING et al., 2015; SECUNDO, 2013)



**Figura 4:** Estruturas tridimensionais da forma fechada (A) e de a forma aberta (B) da lipase de *Humicola lanuginosa* (HLL). As cadeias carboxílicas laterais Asp-96, Asp-201, Asp-254, Glu-87, Glu-210 (em vermelho) estão na região hidrofóbica externa (amarelo). A tríade catalítica (verde) torna-se acessível depois da abertura da tampa (KAPOOR e GUPTA, 2012).

Lipases são usadas muitas vezes na forma de extrato bruto livre de célula, ou seja, sem purificação, por duas razões: (1) são menos dispendiosas, pois a remoção das células é simples, porém o extrato bruto pode conter outras proteínas, e (2) muitas vezes enzimas em extratos brutos são mais estáveis do que enzimas purificadas.

Os preparados brutos contêm açúcares e outros transportadores inertes que estabilizam as lipases, especialmente para reações em solventes orgânicos. Como exemplo, a lipase LipPS (comercialmente conhecida com PS, P ou PCL) contém sais de cálcio adicionados no seu preparado, no qual o íon de cálcio estabiliza sua estrutura tridimensional (BORNSCHEUER e KAZLAUSKAS, 2006).

A lipase comercial LipPS usada nesse trabalho é fornecida na forma de pó liofilizado, com um teor de proteínas variando 1 a 25% (BORNSCHEUER e KAZLAUSKAS, 2006). LipPS apresenta uma estrutura com 320 aminoácidos, um peso molecular de 33 kDa e ponto isoelétrico (pI) de 6,3 (SHOW et al., 2012, TASNÁDI et al., 2009).

### 2.1.2 Enantiosseletividade

A partir do momento que um substrato racêmico é submetido a uma reação enzimática, a discriminação quiral dos enantiômeros acontece (SIH e WU, 1989). Devido à quiralidade existente no sítio ativo da enzima, um enantiômero se encaixa melhor no local ativo do que o outro e, portanto, é convertido em uma velocidade maior. Como consequência, cada um dos enantiômeros a partir de uma resolução cinética de um racemato pode ser obtido apenas com 50% de rendimento. Para garantir uma alta seletividade para ambos os enantiômeros, a diferença nas velocidades de reação dos enantiômeros individuais deve ser tão grande quanto possível. Em casos ideais, um enantiômero é transformado rapidamente e o outro não é convertido. A reação enzimática cessará quando a conversão atingir 50%, não restando mais nada do enantiômero mais reativo (FABER, 2011; SIH e WU, 1989).

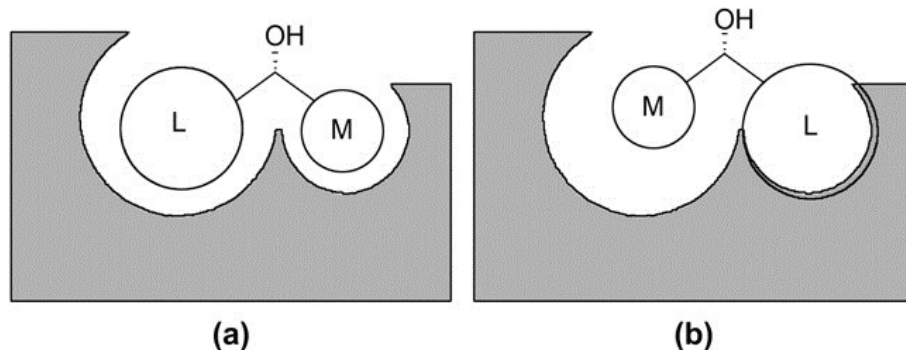
Nos casos reais de resolução enzimática de um substrato racêmico, a proporção das velocidades de reação dos enantiômeros não será infinita, mas mensurável. Observa-se nestes casos, que não há uma paralisação completa da reação a 50% de conversão, mas uma diminuição na taxa de reação em torno deste ponto (FABER e KROUTIL, 2012).

A velocidade da transformação de cada enantiômero varia com o grau de conversão, uma vez que a proporção dos dois enantiômeros não permanece constante durante a reação. E conseqüentemente, a pureza óptica do substrato ( $ee_s$ ) e do produto ( $ee_p$ ) torna-se uma função da extensão da conversão.

Um modelo usado para explicar a enantiopreferência das enzimas, principalmente das lipases, é a regra de *Kazlauskas* (FABER, 2011). O estudo de *Kazlauskas* (1991) mostrou que a enantiosseletividade das lipases de *Pseudomonas cepacia* e *Candida rugosa* frente à álcoois secundários varia de acordo com o tamanho e forma dessas moléculas quando estão no sítio ativo da enzima. Segundo *Kazlauskas* (1991), o sítio ativo da enzima é formado por duas cavidades, uma grande e outra pequena (**Figura 5**). Na resolução cinética de um álcool secundário quando catalisada por uma lipase, um dos seus enantiômeros se liga ao sítio ativo da enzima com maior eficiência do que o outro (**Figura 5a**). Assim, quando o outro enantiômero reage com a enzima, ele é forçado a acomodar seu substituinte grande na cavidade pequena (**Figura 5b**). Dessa forma, ocorrem repulsões estéricas que



afetam a tríade catalítica, fazendo diminuir a velocidade de reação para este enantiômero.



**Figura 5:** Modelo do sítio ativo para as lipases - derivada da regra de Kazlauskas, (a) enantiômero de reação rápida e (b) enantiômero de reação lenta (KAZLAUSKAS et al., 1991).

A medida de enantiosseletividade de uma lipase é geralmente dada pelo seu coeficiente enantiomérico ( $E$ ), que leva em conta a velocidade de conversão de cada enantiômero.

Em 1982 Chen *et al.* desenvolveram uma equação muito útil para a resolução cinética enzimática, que pode ser utilizada para calcular o valor do coeficiente enantiomérico ( $E$ ), utilizando os dados experimentais. Essa equação é dependente da conversão ( $c$ ), dos excessos enantioméricos de substrato ( $ee_s$ ) e produto ( $ee_p$ ), conforme as **Equações 1 e 2** (FABER, 2011).

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \quad (1)$$

$$E = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_s)]}{\ln[(1-c)(1+ee_s)]} = \frac{\ln[(1-c)(1+ee_p)]}{\ln[(1-c)(1-ee_p)]} \quad (2)$$

Em 1993, Rakels e col. simplificaram a **Equação 2**, para obter a **Equação 3**, em termos de  $ee_s$  e  $ee_p$ .

$$E = \frac{\ln\left[\frac{1-ee_s}{1+(ee_s/ee_p)}\right]}{\ln\left[\frac{1+ee_s}{1+(ee_s/ee_p)}\right]} \quad (3)$$

Com base nas equações acima, para valores de coeficiente enantiomérico menores que 15 as reações são consideradas como reações não-seletivas. Para uma resolução cinética ser considerada aceitável, os valores de  $E$  devem estar na faixa de 15-30, e acima desses valores são excelentes. Entretanto, valores de  $E$  maiores que 200 não podem ser determinados com precisão, pois nesta faixa uma pequena variação do excesso enantiomérico do substrato ( $ee_s$ ) ou produto ( $ee_p$ ) causa uma mudança significativa no valor numérico de  $E$  (DING et al., 2009).

A resolução cinética pode ser realizada por lipases, devido a sua natureza enantiosseletiva e regioseletiva, o que permite que essas enzimas sejam aplicadas em reações altamente estereosseletivas. Como exemplo, Ghanem e Schurig (2001) reportaram um trabalho sobre a reação de transesterificação do ( $R,S$ )-1-(2-furil) etanol usando o acetato de isopropenila como agente acilante, mediado pela lipase de *P. cepacia*, onde notou-se que, o ( $R$ )-álcool foi o enantiômero que reagiu mais rapidamente, formando o ( $R$ )-acetato em alto excesso enantiomérico comparado ao ( $S$ )-álcool. A melhor condição reacional foi em 21 h, usando como solvente o isoctano, apresentando conversão de 48%.

Gotor-Fernandez et al. (2006) reportaram que a lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) é uma das enzimas mais eficientes na resolução de álcoois e aminas, possibilitando a preparação de uma grande variedade de compostos opticamente ativos. Além disso, segundo esses autores, a resolução de aminas primárias via CAL-B é uma das melhores estratégias para a obtenção do composto enantiomérico puro, devido à simplicidade e alta estereosseletividade do processo.

Li et al. (2012) reportaram a resolução do ( $R,S$ )-2-nitro-1-feniletanol por transesterificação enantiosseletiva usando a lipase PS de *Burkholderia cepacia* e mostraram que a enzima exibiu excelente enantiosseletividade para o composto enantiopuro ( $R$ )-2-nitroálcool.

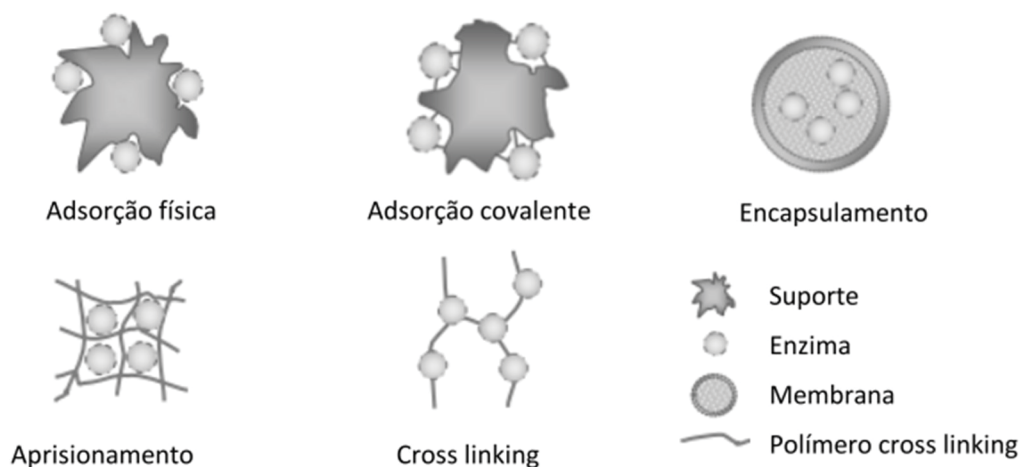
Visando um maior desempenho de lipases na síntese orgânica, técnicas de imobilização vêm sendo empregadas com o intuito de aumentar a atividade catalítica, a estabilidade e facilitar o manuseio e recuperação da enzima do meio reacional (NOINVILLE et al., 2002).

## 2.2 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

### 2.2.1 Métodos de imobilização

Um dos principais desafios para as aplicações industriais das enzimas é a sua reutilização ao longo de vários ciclos de reação. A imobilização de enzimas tem se tornado um processo capaz de resolver problemas usualmente encontrados, como a baixa estabilidade e a inibição por altas concentrações de substratos e produtos, por variação brusca de pH e temperatura, apresentando uma baixa atividade e seletividade nessas condições (BENAISSI et al., 2011a).

A imobilização de enzimas também pode levar a aumentos na sua atividade, seletividade e especificidade, desde que a ligação com o suporte seja rigorosamente controlada (FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2017; GUPTA et al., 2013; HANEFELD et al., 2009a). Existem vários métodos de imobilização, podendo ser divididos em duas categorias: o método químico, no qual a enzima é fixada através de ligações covalentes em um único ponto ou formando ligações multipontuais, e o método físico, no qual forças físicas promovem a adsorção da enzima (MATEO et al., 2007). Além destes tipos de métodos, também existe o método de encapsulamento, com a inclusão da enzima em espaços confinados, aos quais ela fica aprisionada, mas continua cataliticamente ativa (ADLERCREUTZ, 2013) e o de ligações cruzadas entre as próprias moléculas de enzima (*cross linking*), que dispensa o uso de suporte (**Figura 6**).



**Figura 6:** Representação esquemática dos métodos de imobilização de enzimas (SILVA, 2012).

A escolha do método para a imobilização dependerá do tipo de enzima, suporte e sua aplicação. Assim, a catálise do tipo homogênea utilizando uma enzima na sua forma nativa transforma-se em catálise do tipo heterogênea quando biocatalisadores imobilizados são utilizados (FABER, 2011; HANEFELD *et al.*, 2009a).

Dependendo da técnica de imobilização, as propriedades do biocatalisador, tais como, estabilidade, seletividade, pH e temperatura podem ser alterados significativamente, muitas vezes obtendo-se um maior desempenho do catalisador (JESIONOWSKI *et al.*, 2014). No entanto, a imobilização também pode causar a desativação da enzima e, como em todos os casos da catálise heterogênea, as limitações de transferência de massa podem causar uma diminuição na atividade da enzima.

Um requisito importante na imobilização de enzimas é que o suporte deve fornecer um ambiente biocompatível, isto é, não deve interferir negativamente na estrutura nativa da enzima. Algumas características são desejáveis para um bom suporte, tais como: ser inerte, possuir uma boa área superficial, estabilidade química, mecânica e térmica, resistência ao ataque microbiológico, possuir grupos químicos que possam ser ativados ou modificados de modo a permitir a ligação com a enzima e ser insolúvel no meio reacional (CIPOLATTI *et al.*, 2014; PURI *et al.*, 2013).

#### 2.2.1.1 Adsorção

O processo via adsorção consiste na ligação da enzima em um suporte inerte, através de interações iônicas, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e forças de van der Waals. É uma técnica simples, de baixo custo, sem necessidade de alteração química no suporte ou na enzima. Porém, deve-se levar em consideração a lixiviação da enzima no suporte quando a enzima imobilizada for utilizada em ambientes aquosos (HANEFELD *et al.*, 2009b).

A adsorção por interação hidrofóbica envolve áreas hidrofóbicas em torno do sítio ativo da enzima, que no caso das lipases, podem ser imobilizadas com a “lid” na sua conformação aberta (MATEO *et al.*, 2007), não ocorrendo esse fenômeno em enzimas que possuem resíduos hidrofílicos na superfície.

Um fator importante no processo de adsorção enzima no suporte é o pH do meio, que pode favorecer uma máxima adsorção nos valores próximos ao ponto isoelétrico (pI) da enzima, pois nesse ponto ocorre uma baixa repulsão eletrostática entre as moléculas da proteína, facilitando a imobilização (VINU et al., 2005). Além de resíduos hidrofóbicos, as lipases também possuem resíduos hidrofílicos em sua estrutura, podendo facilmente formar ligações de hidrogênio com suportes hidrofílicos (MATEO et al., 2007).

#### 2.2.1.2 Ligação covalente

Esse método de imobilização ocorre pela formação de ligações covalentes entre grupos reativos do suporte e alguns grupos de resíduos de aminoácidos na superfície da enzima (MURTY et al., 2002). A vantagem deste processo se deve à ligação forte entre a enzima e o suporte, o que por consequência, evita a lixiviação da enzima para o meio aquoso, tornando possível o uso do derivado imobilizado tanto em meios aquosos como em meios orgânicos.

Entre as desvantagens do método de ligações covalentes, podem-se citar os custos mais elevados em comparação aos métodos de adsorção e o efeito negativo da ligação covalente na conformação cataliticamente ativa da enzima (HANEFELD et al., 2009a; MATEO et al., 2007).

#### 2.2.1.3 Aprisionamento

O método do aprisionamento (*entrapment*) é definido como uma retenção física de enzimas na rede tridimensional de um sólido insolúvel, e normalmente envolve a síntese *in situ* de uma matriz porosa em torno dos biocatalisadores (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012). Para Sheldon (2007), a diferença entre método de *entrapment* e a ligação em um suporte, muitas vezes, não é suficientemente clara. Contudo, esse pesquisador afirma que o método de *entrapment* requer a síntese de uma rede polimérica na presença da enzima. Geralmente, neste tipo de procedimento de imobilização, a biomolécula é primeiramente dispersa em uma solução monomérica, e depois segue um processo de polimerização que mantém a enzima confinada e protegida de possíveis efeitos

deletérios do ambiente externo (BRADY e JORDAAN, 2009; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012).

A principal vantagem do método de aprisionamento é que ele praticamente não induz a alterações conformacionais na enzima, prevenindo a inativação catalítica durante a imobilização e no processo de catálise. No entanto, esse método possui a desvantagem de ocasionar limitações de transferência de massa e pode comprometer o desempenho catalítico da enzima imobilizada (BRADY e JORDAAN, 2009; SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012).

### 2.3 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Estudos recentes têm demonstrado que a atividade e estabilidade das enzimas imobilizadas em várias reações podem ser aumentadas através da utilização de materiais nanoestruturados como suportes (CIPOLATTI et al., 2014; VERMA et al., 2016).

Nanomateriais são materiais em escala nanométrica (normalmente com uma dimensão abaixo de 100 nm), que podem apresentar propriedades diferenciadas daquelas do sólido estendido, por se encontrarem abaixo do seu tamanho crítico (SHRIVER e ATKINS, 2008).

Atualmente, existe um interesse considerável no uso de materiais em nanoescala, que visa explorar os fenômenos únicos associados a estes materiais. Os avanços na fabricação desses materiais deram aos pesquisadores acesso a uma variedade de nanomateriais, que possuem propriedades únicas, tais como eletrônicas, magnéticas, mecânicas, químicas, ópticas, entre outras (HANEFELD et al., 2009a; VERMA et al., 2016).

Alguns nanomateriais podem servir como excelentes materiais para a imobilização de enzimas, porque oferecem as características ideais para equilibrar os principais fatores que determinam a eficiência dos biocatalisadores, incluindo a elevada área superficial e menor resistência à transferência de massa. Vários nanomateriais como os hidróxidos duplos lamelares (HDL), nanopartículas magnéticas, matrizes nanoporosas, nanofibras, têm sido relatados como grande potencial para revolucionar a preparação e utilização de biocatalisadores (WYPYCH e SATYANARAYANA, 2004).

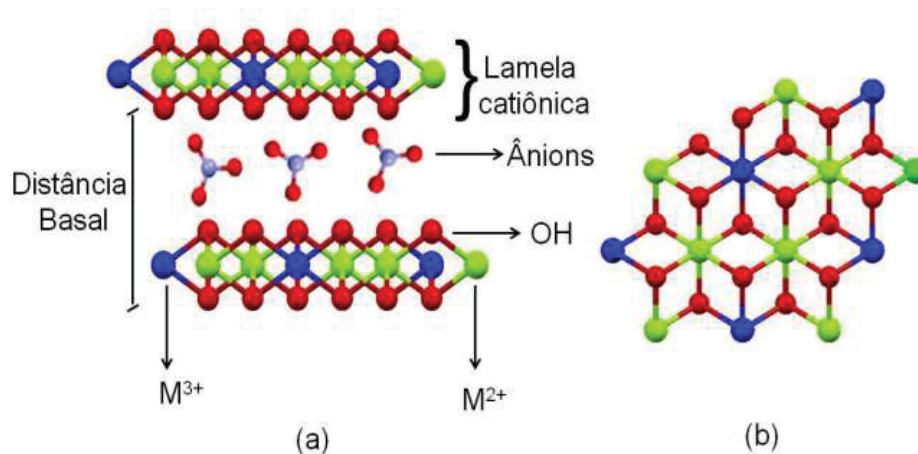


### 2.3.1 Hidróxidos duplos lamelares (HDL)

Nos últimos anos, entre a grande variedade de suportes estudados, os hidróxidos duplos lamelares (HDL) demonstram-se altamente eficazes como suportes para biomoléculas (TOUISNI et al., 2013), DNA (BALCOMB et al., 2015) aminoácidos e peptídeos (NAKAYAMA et al., 2004) proteínas e enzimas, (BENAÏSSI et al., 2011b; BRUNA et al., 2015; CHARRADI et al., 2010; DJEBBI et al., 2016; ZHANG et al., 2015) principalmente devido a suas propriedades versáteis em termos de composição química, basicidade, densidade de carga, hidrofiliabilidade e morfologia.

Os hidróxidos duplos lamelares (HDL), também conhecidos como argilas aniônicas, possuem uma estrutura do tipo do mineral brucita ( $Mg(OH)_2$ ), o qual tem lamelas neutras. Na estrutura dos HDL, as lamelas são carregadas positivamente, devido à substituição isomórfica parcial dos metais  $M^{2+}$  em sítios octaédricos coordenados às hidroxilas, por metais  $M^{3+}$  (**Figura 7**). Os HDL resultantes possuem lamelas separadas por uma distância interlamelar e para manter a eletroneutralidade, o domínio interlamelar deve ser ocupado por ânions, geralmente hidratados, que possuem uma relação estequiométrica direta com o número de  $M^{3+}$  na lamela.

Estes compostos são representados pela fórmula geral  $[M_{1-x}^{2+}M_x^{3+}(OH)_2]^{x+}[(A^{n-})_{x/n}yH_2O]$ , onde  $M^{2+}$  (Mg, Ni, Co, Zn ou Cu) e o  $M^{3+}$  (Al, Cr ou Fe). Na fórmula representativa, "A" é o ânion interlamelar com carga (n-) (HE et al., 2006).



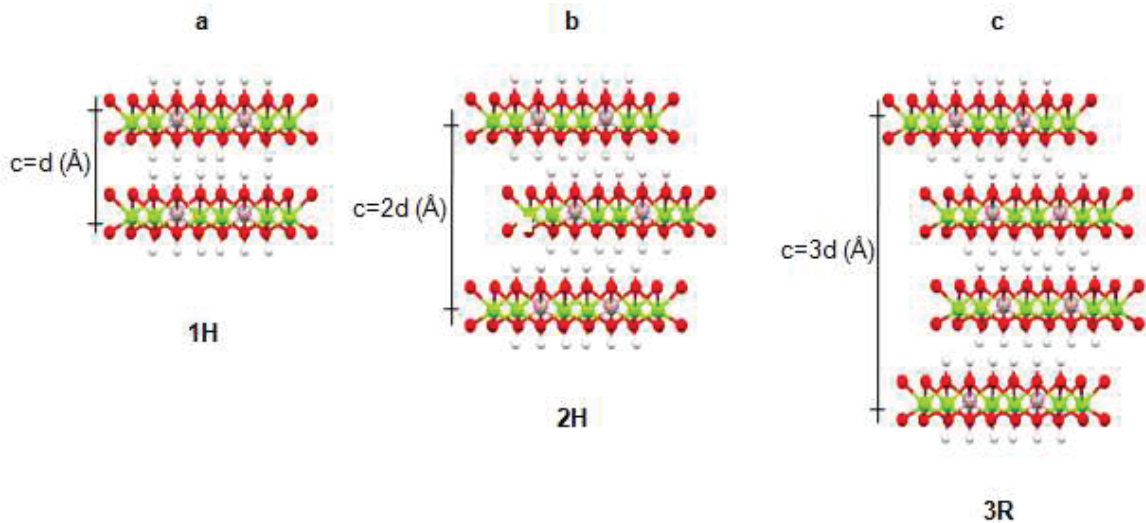
**Figura 7:** Representação esquemática da estrutura de um hidróxido duplo lamelar genérico: (a) visão lateral e (b) visão superior de uma lamela (MANTOVANI, 2015).

A variação da razão molar entre os cátions di e tri valentes nos HDL ( $M^{2+}/M^{3+}$ ) ocorre em uma faixa de 1 a 6, na fórmula geral, o que corresponde à valores de  $x$  na faixa de 0,14 a 0,5. Entretanto, estudos recomendam que a faixa ideal para se obter um material puro e cristalino seria entre 2 e 4 (ou seja, valores de  $x$  na faixa de 0,2 a 0,34) (RIVES, 2001).

A variação é um fator determinante na densidade de carga na lamela do HDL, uma vez que a substituição de alguns cátions bivalentes por cátions trivalentes na preparação do HDL dá origem ao excesso de carga positiva presente nas lamelas. Alterando-se a razão entre  $M^{2+}/M^{3+}$ , muda-se o grau em que a lamela está positivamente carregada, visto que uma baixa razão  $M^{2+}/M^{3+}$  implicará em lamelas altamente carregadas positivamente (CAVANI et al., 1991; CREPALDI e VALIM, 1998).

As células unitárias dos HDL são normalmente de simetria hexagonal, com exceção da razão  $M^{2+}/M^{3+} = 1$  (célula unitária é ortorrômbica). Ao ser analisado pela técnica de difração de raios X de pó, é observado para o HDL um padrão típico nos planos de difração para esta família de sólido. Os planos basais ( $00l$ ) estão relacionados ao empilhamento das lamelas, as reflexões ( $hk0$ ) estão relacionadas a organização da estrutura no interior das lamelas e as reflexões ( $0kl$ ) são relacionadas com a ordenação de uma lamela em relação à outra (CREPALDI e VALIM, 1998; OCCELLI e ROBSON, 1992). Pela ordem de empilhamento no sistema hexagonal é possível obter três politipos que se diferem no parâmetro de rede basal ( $c$ ) (**Figura 8**), a saber:

- 1H: distância basal igual a  $c$ ; difícil de ser encontrado e está associado a HDL altamente hidratados, frequentemente intercalados com ânions sulfato (**Figura 8a**);
- 2H: distância basal igual a  $c/2$ ; raro de ser encontrado e geralmente está associado à formação em altas temperaturas e pressões (**Figura 8b**);
- 3R: distância basal igual a  $c/3$ ; encontrado na grande maioria dos HDL naturais ou sintéticos (**Figura 8c**).



**Figura 8:** Representação dos diversos polítipos de HDL (COLOMBO, 2017).

Os ânions intercalantes dos HDL mais comumente preparados são aqueles divalentes (carbonato ou sulfato) ou monovalentes (hidróxido, cloreto ou nitrato). A natureza desses íons intercalantes, como por exemplo sua carga e o seu tamanho, irá influenciar na formação de um HDL quanto a ele ser mais ou menos estável com relação aos processos de troca iônica. Por exemplo, um HDL intercalado com íons  $\text{NO}_3^-$  será mais susceptível à troca iônica que um HDL intercalado com íons  $\text{CO}_3^{2-}$  (OCCELLI e ROBSON, 1992).

Existem diferentes métodos de síntese para a preparação do HDL como: troca aniônica de um HDL precursor; síntese por coprecipitação direta; sal óxido e processo hidrotermal. Um problema rotineiramente encontrado em todos os métodos é uma possível contaminação por ânions carbonato na estrutura interlamelar do HDL. Conseqüentemente, é utilizada água descarbonatada e deionizada, de forma que o material não fique exposto à atmosfera, reduzindo ao mínimo essa contaminação (HE et al., 2006).

O método de coprecipitação é o mais utilizado na preparação de HDL (NEWMAN e JONES, 1998). Essa síntese pode ocorrer por três metodologias diferentes: pH decrescente, crescente e constante.

A síntese em pH decrescente consiste na adição de uma solução dos cátions di e trivalentes sobre uma solução em pH alcalino contendo o ânion a ser intercalado. O processo de síntese também pode ser realizado em pH crescente, conhecido como método de titulação, que consiste na precipitação simultânea, onde

se adiciona uma solução alcalina contendo o ânion a ser intercalado sobre uma solução contendo os cátions. Como os cátions trivalentes tendem a precipitar em valores de pH mais baixos que os bivalentes, dificilmente serão obtidos materiais puros por esse método (CAVANI et al., 1991b).

A coprecipitação também pode ser realizada em pH constante, normalmente apresentando vantagens sobre os demais métodos, como uma maior homogeneidade, pureza de fase e cristalinidade dos materiais obtidos. A síntese por este método é normalmente realizada pela adição da solução dos cátions sobre a solução do ânion a ser intercalado, concomitante à adição de uma solução de hidróxido de sódio ou potássio, para manter o pH constante (NEWMAN e JONES, 1998).

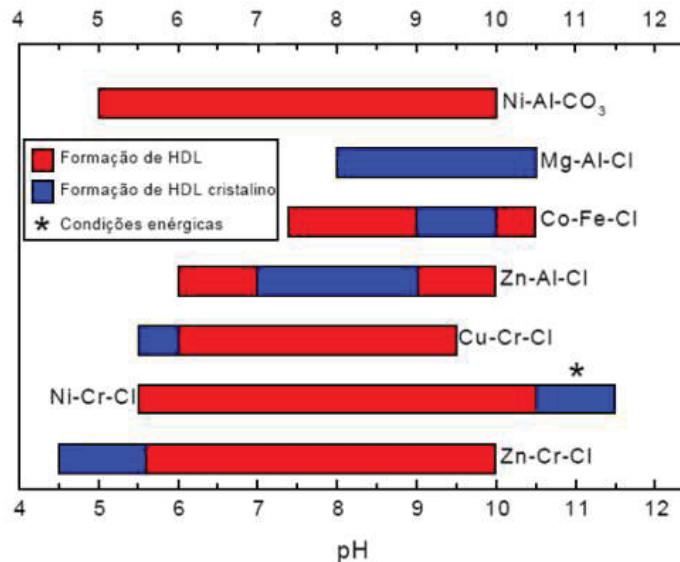
A síntese via coprecipitação na maioria dos casos é realizada em temperatura ambiente, mas também existem estudos utilizando temperaturas elevadas, porém, sempre abaixo da temperatura de ebulição da água (NEWMAN e JONES, 1998). A concentração das soluções pode variar entre 0,1-0,5 mol L<sup>-1</sup> e a adição das soluções dos cátions metálicos deve ocorrer lentamente (1 mL min<sup>-1</sup>) para obter-se uma baixa saturação, ou seja, materiais mais cristalinos. A velocidade de adição acarreta em uma maior velocidade de nucleação e, conseqüentemente, em um grande número de partículas de tamanho reduzido.

Pesquisas envolvendo o controle de pH foram realizadas a fim de se mostrar a dependência do pH com a formação dos HDL (**Figura 9**). Determinadas faixas de pH apresentam cristais de HDL bem ordenados para uma determinada composição. Este estudo foi realizado envolvendo vários valores de pH, obtendo-se faixas de valores onde ocorre a formação do HDL (FAN *et al.*, 2014). Apesar de não serem facilmente encontrados na natureza, em laboratório os HDL são facilmente obtidos e a sua síntese em geral é de baixo custo.

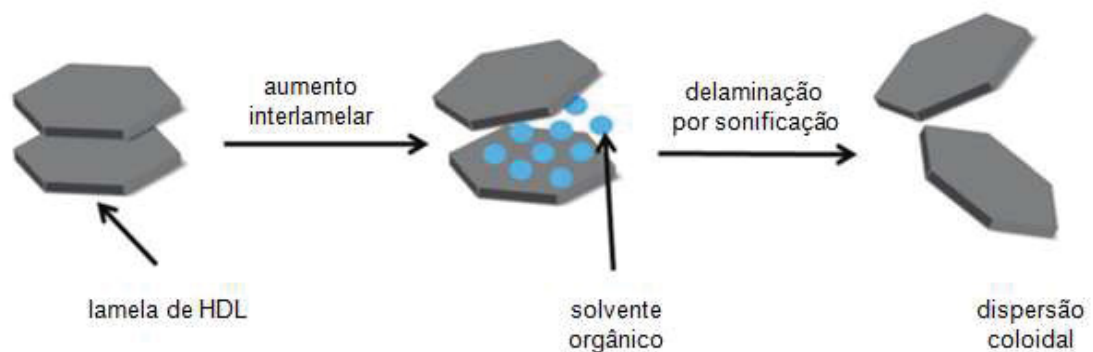
Devido à composição química e as propriedades físicas altamente flexíveis e ajustáveis dos HDL uma possibilidade de esfoliação desse material em lamelas únicas pode elevar a sua área superficial. A capacidade de esfoliação do HDL em lamelas nanométricas permite uma variedade de novas oportunidades para materiais multifuncionais (YU et al., 2017a).

Geralmente, o processo de esfoliação ou delaminação (**Figura 10**) constitui na intercalação de ânions orgânicos (como aminoácidos ou surfactantes) para aumentar o espaço interlamelar do HDL e posterior dispersão em certos solventes

orgânicos (ADACHI-PAGANO et al., 2000) ou solução aquosa (HIBINO e KOBAYASHI, 2005) na maioria das vezes com o auxílio de um ultrassom. Mais recentemente, a esfoliação de HDL foi conseguida usando formamida como solvente (HIBINO e JONES, 2001).



**Figura 9:** Faixa de pH ótimo para a síntese de alguns HDL (ROY et al., 1992).



**Figura 10:** Processo genérico para esfoliação do HDL (YU et al., 2017a)

A aplicação dos HDL é bastante abrangente na química, por exemplo, como catalisadores (FAN *et al.*, 2014), em aplicações biológicas e medicinais (KURA *et al.*, 2014), como retardantes de chamas (GAO *et al.*, 2014), além de muitas outras aplicações. Recentemente, a utilização de enzimas imobilizadas em HDL tem sido descrita em diversos trabalhos. Touisni et al. (2013) estudaram a imobilização da

transketolase (TK) em um HDL de magnésio e alumínio intercalado com ânions carbonato. O processo de imobilização foi realizado através de adsorção e coprecipitação em soluções tamponadas. A determinação da atividade enzimática da TK livre e imobilizada foi investigada por ensaios de UV-vis, usando um substrato D-xilulose-5-fosfato. A menor atividade enzimática foi observada para o derivado imobilizado na presença de água e a maior atividade observada em tampão GlyGly. Em outro estudo realizado por Benaissi et al. (2011a) também foi imobilizada a TK em HDL, sendo a enzima imobilizada na síntese de cetoses.

Halma et al. (2015) investigaram células de *Pseudomonas sp.* (ADP), uma bactéria bem conhecida por degradar a atrazina (herbicida), aprisionadas em HDL de magnésio e alumínio. Esta abordagem baseia-se em uma coprecipitação rápida dos sais metálicos na presença das células bacterianas em água, sendo esta estratégia comparada com o processo de adsorção. As células ADP imobilizadas foram testadas como catalisadores para a biodegradação da atrazina e se mostraram viáveis e com melhor atividade após a imobilização.

O trabalho mais atual sobre imobilização de enzimas em HDL foi descrito por Djebbi et al. (2016), que desenvolveram um sistema bioinorgânico. A enzima lactato desidrogenase (Lac Deh) foi imobilizada em HDL de MgAl e ZnAl através de métodos de troca iônica (adsorção) e coprecipitação. As medidas de atividade e o estudo cinético do Lac Deh livre e imobilizada foram medidos na conversão da oxidação do lactato em piruvato. A maior conversão obteve-se com o derivado imobilizado via adsorção com 75% para o HDL de MgAl-Cl e 78% para o HDL de ZnAl-Cl. O derivado imobilizado através do método de coprecipitação apresentou uma conversão de 44% para o HDL de Mg<sub>2</sub>Al-Cl.

A utilização de biocatalisadores, especialmente as lipases, imobilizados em HDL para a obtenção de compostos enantiomericamente puros, é o foco do presente estudo, uma vez que a quiralidade de vários compostos é de extrema importância, como no desenvolvimento de novos fármacos, onde geralmente apenas um dos enantiômeros é responsável pela ação terapêutica, enquanto o segundo pode ser inativo ou até mesmo tóxico (FABER, 2011). Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar a imobilização da lipase de *Pseudomonas cepacia* (LipPS) no suporte HDL através do processo clássico de adsorção e também por coprecipitação direta e delaminação, com aplicação na resolução de (*R,S*)-1-feniletanol com acetato de vinila.

### 3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi sintetizar hidróxidos duplos lamelares de zinco e alumínio e imobilizar a lipase de *Pseudomonas cepacia*, visando obter sistemas bioinorgânicos com alta atividade e estabilidade para a utilização na resolução do (*R,S*)-1-feniletanol.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

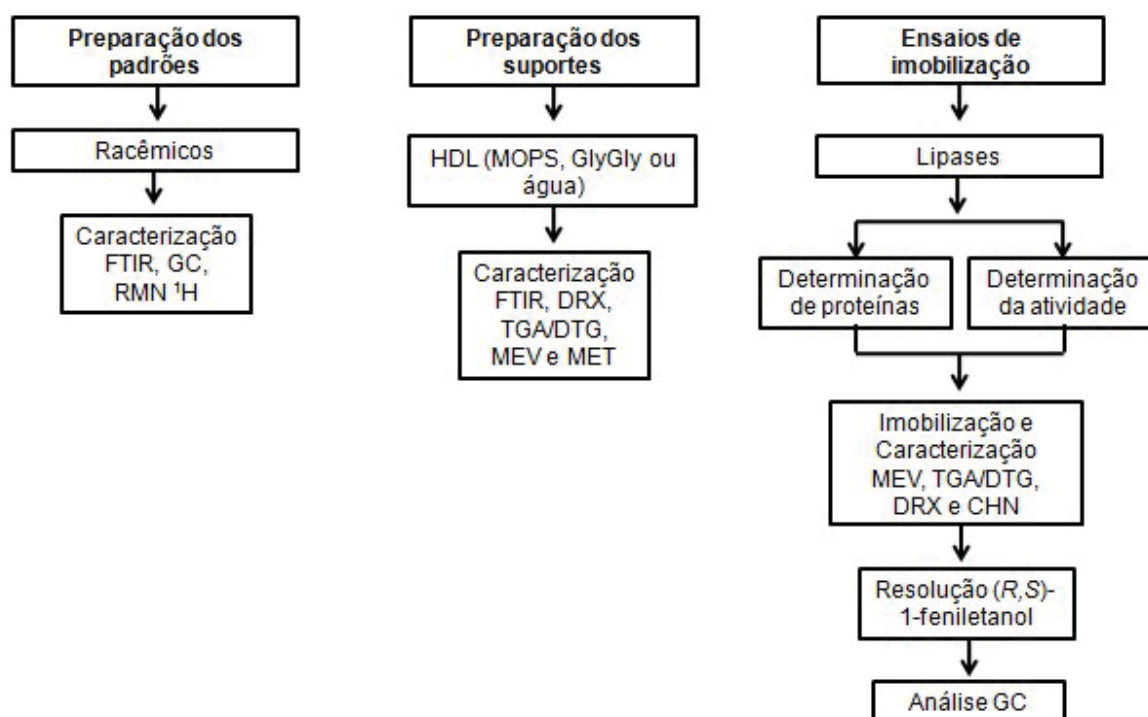
1. Sintetizar os hidróxidos duplos lamelares de zinco e alumínio na proporção 2:1 intercalados com ânions cloreto (HDL Zn<sub>2</sub>Al-Cl).
2. Imobilizar a lipase *Pseudomonas cepacia* no suporte HDL Zn<sub>2</sub>Al-Cl por três processos distintos: adsorção, coprecipitação e delaminação.
3. Caracterizar os compostos lamelares e os derivados imobilizados utilizando difração de raios X (DRX), espectroscopia vibracional na região do infra vermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura acoplada a sonda de EDS (MEV/EDS), microscopia eletrônica de transmissão (MET), análise térmica (TGA/DTG), teor de C,H e N e medidas do potencial zeta.
4. Comparar as eficiências dos derivados imobilizados via processo adsorção, coprecipitação e delaminação através da reação transesterificação do (*R,S*)-1-feniletanol com acetato de vinila.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia utilizada durante o desenvolvimento do trabalho foi adaptada com base em referências da literatura (BENAISSI et al., 2011a; CHO et al., 2006).

A **Figura 11** representa em forma de fluxograma as etapas desenvolvidas neste trabalho. O procedimento utilizado em cada etapa está descrito nas próximas subseções.



**Figura 11:** Fluxograma das etapas realizadas neste trabalho visando o estudo das reações de resolução enzimática do (R,S)-1-feniletanol.

Inicialmente, foram realizados estudos da dosagem da atividade de hidrólise da LipPS, através do método titulométrico utilizando um pHstat, bem como, a determinação de proteínas totais através do método Bradford (BRADFORD, 1976). Em seguida, a LipPS foi imobilizada e posteriormente utilizada na resolução do (R,S)-1-feniletanol.

Em paralelo, foi realizada a síntese do suporte HDL em três métodos distintos: adsorção, coprecipitação e delaminação. Posteriormente, foi realizada a preparação dos padrões racêmicos e puros através de síntese química e enzimática.



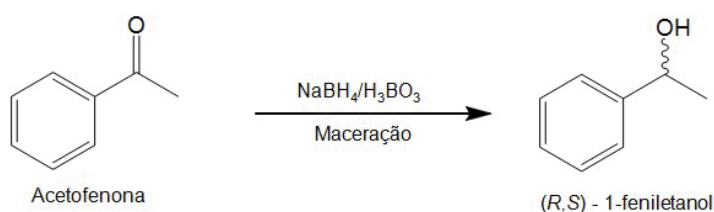
## 4.1 MATERIAIS

Cloreto de alumínio hexahidratado ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), cloreto de zinco anidro ( $\text{ZnCl}_2$ ), hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) foram adquiridos da Vetec. O reagente Bradford, albumina de soro bovino (BSA) e os tampões, ácido 3-morfolino-propano-1-sulfônico (MOPS) e glicilglicina (GlyGly) foram adquiridos da Sigma Aldrich. A lipase *Pseudomonas cepacia* (LipPS), 1-feniletanol e acetato de vinila foram adquiridos da Sigma Aldrich (Saint Louis, USA). Os reagentes foram utilizados sem purificação adicional. Todas as soluções aquosas foram preparadas em água milli-Q.

## 4.2 PREPARAÇÃO DOS PADRÕES

### 4.2.1 Síntese do (R,S)-1-feniletanol via química

Para a obtenção do (R,S)-1-feniletanol realizou-se a redução da acetofenona com o agente redutor borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), usando o método em fase sólida proposto por Cho *et al.* (2006) (**Figura 12**). Em um almofariz foram adicionados a acetofenona (50 mmol; 5,8 mL), borohidreto de sódio (50 mmol; 1,85 g) e ácido bórico (50 mmol; 3,09 g). Posteriormente, realizou-se a maceração desses compostos, com o auxílio de um pistilo, até a completa redução da acetofenona. Para analisar a formação do álcool racêmico, foi utilizada a cromatografia de camada delgada (CCD), tendo como eluente hexano/acetato de etila (6:4).



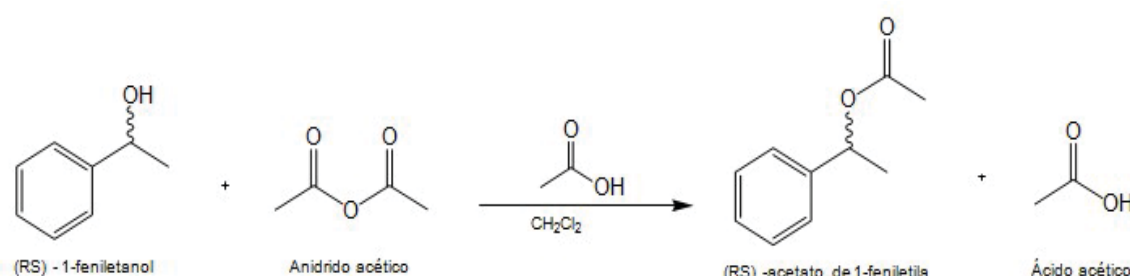
**Figura 12:** Preparação do (R,S)-1-fenietanol a partir da acetofenona.

Logo após, a mistura foi lavada com diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) para a precipitação total dos boranos e filtrada em um papel filtro. O filtrado foi adicionado em um funil de separação e lavado com a água (3 x 25 mL) e solução de

bicarbonato de sódio (3 x 25 mL), para a purificação do álcool. Após a extração, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e posteriormente filtrada e rotaevaporada. Os produtos obtidos foram analisados por FTIR e RMN <sup>1</sup>H.

#### 4.2.2 Síntese do acetato de (R,S)-1-feniletila via química

Em um balão de 250 mL foram adicionados o álcool racêmico (5 mmol; 0,6 mL) obtido na etapa 5.1.1, anidrido acético (25 mmol, 2,3 mL), 30 mL de diclorometano e 3 gotas de ácido acético (**Figura 13**).



**Figura 13:** Reação de transesterificação do (R,S)-1-feniletanol por via química.

Esse sistema foi colocado em refluxo, e a reação foi acompanhada por CCD, utilizando como eluente hexano:acetato de etila (6:4). Ao término da reação, a solução foi transferida para um funil de separação e lavada com água (3 x 25 mL) e solução de bicarbonato de sódio (3 x 25 mL) até a remoção do ácido acético. Em seguida, secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), que posteriormente foi filtrada e rotaevaporada. Os produtos obtidos foram analisados por FTIR e RMN <sup>1</sup>H e GCQ.

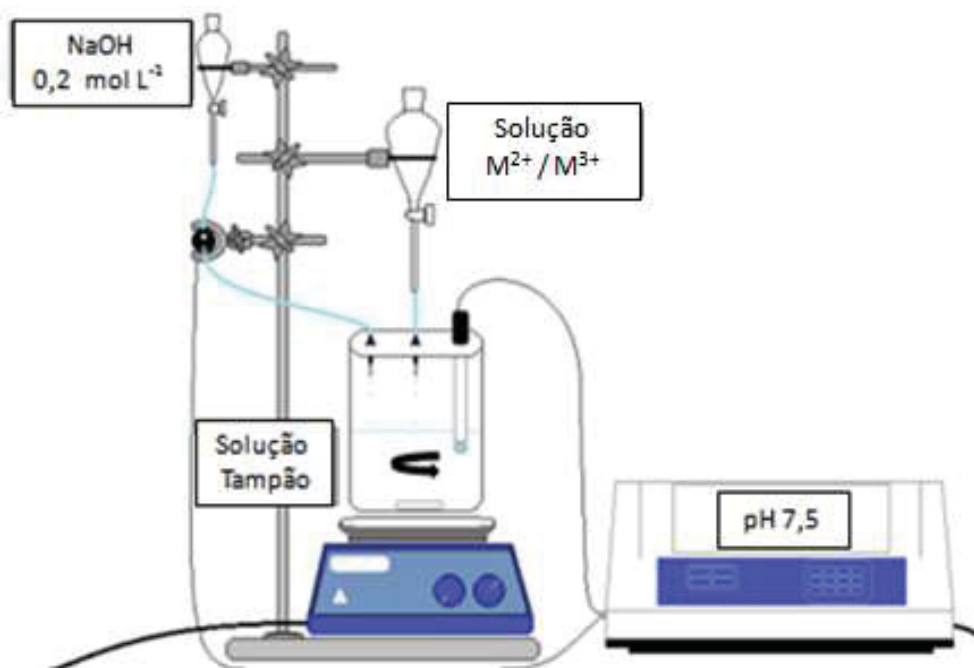
### 4.3 PREPARAÇÃO DOS SUPORTES

#### 4.3.1 Síntese do HDL

A síntese do HDL contendo os íons cloreto como íons intercalantes foi realizada seguindo o método descrito por Djebbi (2016) via coprecipitação direta em pH constante. Tipicamente, foram preparados 5 mL do sal de zinco (ZnCl<sub>2</sub>) e sal de

alumínio ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) numa concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , mantendo uma relação constante de  $\text{M}^{2+}/\text{M}^{3+}$  igual 2.

Essa solução foi adicionada gota à gota a um reator contendo 30 mL de água milli-Q (quantidade mínima para a imersão do eletrodo de pH) com um fluxo constante e sob atmosfera de  $\text{N}_2$  para evitar a contaminação por carbonato. Ao longo desta adição, o pH da solução foi mantido próximo de 7,5 usando uma solução de  $\text{NaOH}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , o que causou a coprecipitação desses metais. A adição dos sais foi completa dentro de 30 minutos e mantida sob agitação por 24 h, a fim de favorecer o crescimento dos cristais. No término desse tempo, as dispersões foram centrifugadas a 8000 rpm e os sólidos recuperados foram lavados várias vezes com água ultrapura até não existir cloreto de sódio no meio. O sólido branco foi liofilizado em 24 h. Na **Figura 14** está representado o sistema de síntese do HDL.



**Figura 14:** Representação esquemática do sistema de síntese do HDL (SANTOS, 2016).

O mesmo sistema de síntese foi realizado na presença dos tampões (MOPS e GlyGly), ambos  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ . Todos os sólidos obtidos – HDLM (HDL-MOPS), HDLG (HDL-GlyGly) e HDLA (HDL-Água) – foram lavados e liofilizados (24 h). Logo após, os sólidos obtidos foram caracterizados por FTIR, DRX, TGA/DTG, MEV e EDS.

Na **Figura 15** estão representadas a estrutura dos tampões usados nesse trabalho.



**Figura 15:** Estrutura do tampão glicililglicina (GlyGly) e ácido 3-morfolino-propano-1-sulfônico (MOPS). Especificações: tampão GlyGly, pKa 3,14-8,17 com pH de 7,5 a 8,9 a 25 °C e 7,2 a 8,6 a 37 °C; tampão MOPS, pKa 7,2 a 25 °C, com pH de 6,5-7,9.

#### 4.3.2 Ensaio de imobilização da lipPS em HDL

A imobilização da lipase LipPS no suporte HDL foi realizada por três processos distintos: adsorção, coprecipitação e delaminação.

##### 4.3.2.1 Imobilização da lipase PS em HDL via adsorção (HDLadPS)

O processo via adsorção da LipPS via adsorção em HDL ocorreu através da dispersão de 50 mg de HDL em 10 mL em água e nos diferentes tampões (MOPS, GlyGly). A quantidade da LipPS utilizada foi na faixa de 25 -100 mg do pó da enzima para 50 mg de HDL. Esse sistema foi mantido sob agitação magnética a 25 °C por 24 h. Alíquotas de 200 µL foram tiradas em 3, 6, 9 e 24 h. Logo após, o produto (HDLadPS) foi isolado por centrifugação a 8000 rpm por 8 min, lavado diversas vezes com água ultra pura e liofilizado por 24 h. A quantidade de proteína no sobrenadante foi quantificada através o método do Bradford (seção 4.4.1).

##### 4.3.2.2 Imobilização da lipase PS em HDL via coprecipitação (HDLcoPS)

O processo de imobilização via coprecipitação foi adaptado para a preparação de uma pequena quantidade do derivado imobilizado (HDLcoPS). O método de síntese do HDL foi o mesmo descrito na seção 4.3.1, com dispersão conjunta da

LipPS em pó no reator contendo 30 mL das soluções (água, tampão GlyGly e tampão MOPS). Para cada síntese foram utilizadas quantidades de 25-100 mg do pó da enzima.

#### 4.3.2.3 Imobilização da lipase PS em HDL via delaminação (HDLdePS)

O processo via delaminação seguiu a metodologia descrita por Roy *et al.* (1992). Nesse processo foi realizada a substituição dos ânions cloreto por dodecilsulfato utilizando-se dodecilsulfato de sódio (SDS).

Tipicamente, 1 g do HDL preparado na seção 4.3.1 foi dispersado em 400 mL de água ultra pura. Logo após, adicionou-se 1,36g de SDS na dispersão que foi mantida sob agitação por 24 h a 25 °C. Finalmente, o precipitado formado (HDL intercalado com dodecilsulfato) foi centrifugado a 8000 rpm, lavado diversas vezes com etanol anidro e água ultra pura, e secado em estufa a vácuo a 25 °C.

A delaminação do HDL foi realizada de acordo com Wang *et al.* (2014), onde 1 g do HDL intercalado com dodecilsulfato foi dispersado em 400mL de butanol. Essa dispersão foi refluxada a 120 °C por 72 h. Logo após, esperou-se o resfriamento da solução, e em seguida centrifugou-se a 4000 rpm por 5 min, afim de remover os cristais não delaminados. Em seguida, adicionou-se 500 mg da LipPS em pó na solução dos cristais delaminados. Essa mistura foi mantida sob agitação magnética a 25 °C por 24 h, centrifugada, lavada com água e liofilizada por 24 h.

## 4.4 CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE LipPS

### 4.4.1 Determinação de proteínas

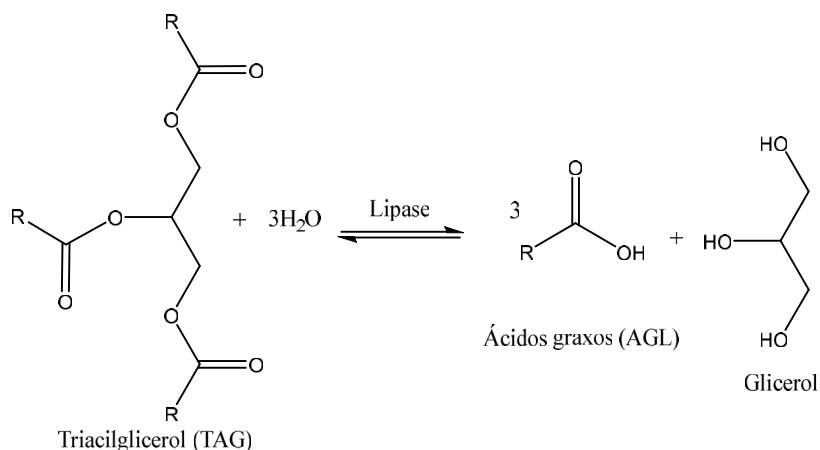
O teor de proteína presente na LipPS comercial foi determinado usando o método de Bradford (1976). Foram dispersos 10 mg da lipase em solução tampão (tampão fosfato, pH 7,0, 50 mmol L<sup>-1</sup>), e uma alíquota de 100 µL foi adicionada ao reagente de Bradford (1 mL). A absorbância da amostra foi medida a 595 nm após 2 min. A concentração de proteína nas amostras foi determinada usando uma curva padrão plotada contra a albumina de soro bovino (BSA) em concentrações variando de 10 a 100 µg mL<sup>-1</sup>.

#### 4.4.2 Determinação da atividade de hidrólise

A determinação da atividade de hidrólise foi realizada pelo método titulométrico em titulador automático pHStat. O método consiste na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da lipase sobre triacilglicerídeos (**Figura 16**).

O substrato utilizado foi o azeite de oliva comercial marca Gallo. Inicialmente foi preparada uma emulsão contendo goma arábica (3%, m/v), solução tampão Tris-HCl (0,25 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,0), CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (2 mmol L<sup>-1</sup>), NaCl (150 mmol L<sup>-1</sup>), e o substrato (67 mmol). Em seguida estes componentes foram misturados por 15min em um agitador mecânico até a formação de uma emulsão. A lipase em pó (LipPS) foi dissolvida em tampão fosfato pH 7,0 (50 mmol L<sup>-1</sup>).

Para cada ensaio enzimático adicionou-se 200µL de lipase e 20 mL da emulsão no vaso de reação do pHStat termostatizado (35 °C), sob agitação magnética (300 rpm), onde o pH foi mantido constante (7,0) pela titulação com NaOH (0,05 mol L<sup>-1</sup>) dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima. A reação foi acompanhada por 300 s, sendo que uma unidade (U) de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que promove a liberação de 1 µmol de ácido graxo por min.



**Figura 16:** Representação da reação de hidrólise de um triacilglicerídeo catalisada por lipases.

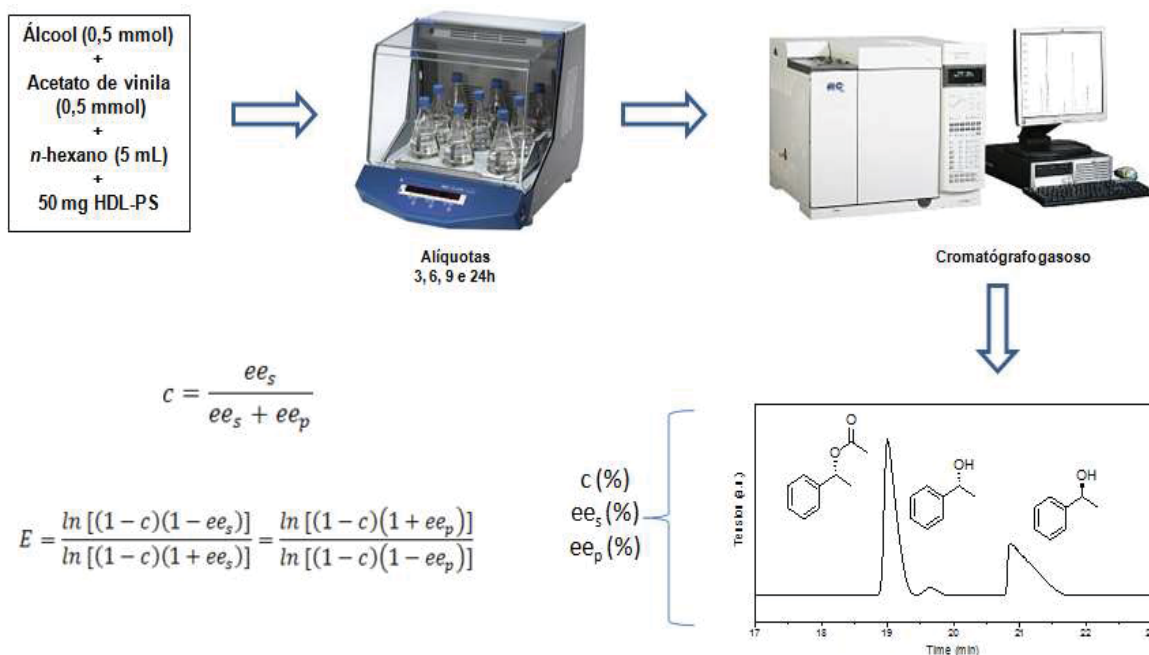
Para o cálculo da atividade enzimática (A) foi utilizada a **Equação 4**.

$$A = \frac{V \cdot [\text{NaOH}] \cdot F_{\text{NaOH}} \cdot F_{\text{pH}}}{X} \quad (4)$$

onde:  $V$  = volume de NaOH consumido (mL/min);  $[\text{NaOH}]$  = concentração de NaOH ( $\mu\text{mol/mL}$ );  $F_{\text{NaOH}}$  = fator de correção da solução de NaOH (adimensional);  $F_{\text{pH}}$  = fator de correção relacionado ao  $\text{pKa}$  do substrato no pH do ensaio (adimensional);  $X$  = quantidade de enzima adicionada (mg de pó de LipPS ou mgP).

#### 4.5 RESOLUÇÃO ENZIMÁTICA DO (*R,S*)-1-FENILETANOL

As reações foram realizadas em 5 mL de hexano contendo 0,5mmol de (*R,S*)-1-feniletanol, 0,5 mmol de acetato de vinila e 25-100 mg de LipPS livre ou imobilizada. As reações foram realizadas em Erlenmeyers de 25 mL a 35 °C, 150 rpm por até 24 h (**Figura 17**).



**Figura 17:** Resolução enzimática do (*R,S*)-1-feniletanol com acetato de vinila catalisada pela LipPS livre e imobilizada em HDL.

Amostras de 200  $\mu\text{L}$  foram removidas em tempos determinados e analisadas por cromatografia quiral. A configuração espacial (*R* ou *S*) do produto formado foi determinada por comparação com o padrão do álcool quiral (*S*) em análise por

cromatografia gasosa (OMORI et al., 2012). A conversão e os excessos enantioméricos dos produtos formados foram determinados com um cromatógrafo de gás (GC-14B Shimadzu) equipado com uma coluna quiral (RT – BetaDex - SM, 30 m × 0,32 mm × 0,25 µm, Agilent). O H<sub>2</sub> foi utilizado como gás de arraste com uma pressão de 120 kPa e um fluxo de 1,40 mL min<sup>-1</sup>. A temperatura do injetor e do detector foi de 230 °C. A temperatura da coluna era uma isoterma de 100 °C por 30 min. A razão ou coeficiente enantiomérico (E) foi calculado a partir do excesso enantiomérico do produto (ee<sub>p</sub>), excesso enantiomérico do substrato (ee<sub>s</sub>) e da conversão (C) de acordo com a equação descrita por Chen *et al* (1982).

#### 4.6 METODOLOGIA ANALÍTICA

As amostras sólidas do HDL puro (HDLA, HDLM, HDLG) e dos derivados imobilizados nos diferentes métodos (HDLadPS, HDLcoPS e HDLdePS) foram analisadas pelas técnicas descritas nas seções seguintes.

##### 4.6.1 Análise cromatográfica

A quantificação dos produtos das reações de resolução cinética do (*R,S*)-1-feniletanol foi realizada por cromatografia em fase gasosa com coluna quiral no equipamento GC-14B da marca Shimadzu, disponível no Laboratório de Multiusuários de Análises Químicas (LAMAQ) da UTFPR – Sede Ecoville. A coluna utilizada foi RT-BetaDex-SM com dimensões 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm, marca Agilent. Amostras de cerca de 1 µL foram injetadas no cromatógrafo. O H<sub>2</sub> foi utilizado como gás de arraste com uma pressão de 120 kPa e um fluxo de 1,40 mL min<sup>-1</sup>. A temperatura do injetor e do detector foi de 230 °C. A temperatura da coluna era uma isoterma de 100 °C por 30 min.

##### 4.6.2 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Amostras de HDL puro e dos derivados foram analisadas por espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR) realizadas em pastilhas de KBr (1% de amostra) em um espectrofotômetro BIO-RAD, 3500 GX, na região de 4000 cm<sup>-1</sup> a



400  $\text{cm}^{-1}$ , disponível no Departamento de Química da UFPR. A amostra a ser analisada foi preparada a partir dos sólidos secos, juntamente com o KBr, utilizando um almofariz e um pistilo, no qual os dois sólidos foram triturados até a mistura tornar-se homogênea. A mistura foi comprimida e empastilhada para posterior coleta do espectro, que foi adquirido com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e acumulação de 32 ciclos.

#### 4.6.3 Difratoimetria de raios X (DRX)

Amostras de HDL puro e dos derivados imobilizados foram analisadas por difratometria de raios X (DRX) realizadas no difratômetro Shimadzu XRD-6000 operando a 30 kV e 40 mA (radiação Cu-K $\alpha$ ,  $\lambda=1,5418 \text{ \AA}$ ) com uma velocidade de varredura de 2°  $\text{min}^{-1}$ , na geometria Bragg-Bretano de  $\Theta/2\Theta$ , disponível no Departamento de Química da UFPR. As amostras foram depositadas sobre placas de vidro planas.

#### 4.6.4 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de $^1\text{H}$

Os espectros de RMN das amostras padrões (*R,S*)-1-feniletanol e acetato de (*R,S*)-1-feniletila foram obtidos no espectrofotômetro BRUKER Modelo DPX 200 MHz; 4,7 Tesla NMR, disponível no Departamento de Química da UFPR. A amostra para a análise foi preparada em um tubo específico para RMN. Foram pesadas aproximadamente 3,0 mg da amostra seca dissolvida em aproximadamente 500  $\mu\text{L}$  de clorofórmio deuterado, com posterior coleta do espectro. Os deslocamentos químicos (em ppm) foram determinados em relação ao tetrametilsilano (TMS).

#### 4.6.5 Microscopia eletrônica de varredura acoplada à sonda de EDS (MEV)

As amostras do HDL puro e dos derivados imobilizados foram caracterizados no Centro de Microscopia Eletrônica CME-UFPR em um equipamento JEOL (JSM-6360LV), com uma tensão de 15 kV. Os sólidos foram depositados em portas-

amostra de metal, utilizando uma fita de cobre que posteriormente às medidas de EDS, foram metalizadas com ouro para aquisição das imagens.

#### 4.6.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As amostras do HDL puro e dos derivados imobilizados foram caracterizados no Centro de Microscopia Eletrônica CME-UFPR em um equipamento JEOL JEM 1200EX-II com o microscópio operando em 120 ou 80 kV. Previamente, os materiais foram postos em suspensão em água ultra pura e recolhidos com a ajuda de uma pinça metálica e então depositados sobre grades específicas para a análise.

#### 4.6.7 Análise térmica (termogravimetria – TGA/DTG)

As medidas de TGA foram realizadas para as amostras de HDL e dos derivados imobilizados, utilizando-se um equipamento NETZSCH modelo STA 449F3, disponível no Departamento de Química da UFPR. As amostras foram colocadas em cadinhos de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , sob fluxo de ar sintético, com vazão de  $50 \text{ mL min}^{-1}$  no intervalo de temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C} - 1000 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 4.6.8 Análise elementar (CHN)

As amostras de HDL puro e dos derivados imobilizados foram pesadas em cápsulas (cadinhos) de estanho em uma balança de precisão (AD6000 Perkin Elmer) e posteriormente inseridas no analisador orgânico elementar (Series II 2400 Perkin Elmer CHN) no Centro de Estudo do Mar (CEM) da UFPR. Utilizou-se a acetanilida como padrão para calibração do equipamento. A cada doze análises realizadas no equipamento, uma amostra de padrão era analisada para verificação e validação dos resultados.

#### 4.6.9 Potencial Zeta ( $\zeta$ )

As medidas do Potencial Zeta ( $\zeta$ ) foram feitas no equipamento Stabino® Control 20023 em temperatura ambiente, disponível no Laboratório de Polímeros da UFPR. Foi realizada uma dispersão das partículas do HDL puro e dos derivados

imobilizados em água purificada (MilliQ System Millipore) e nos tampões (GlyGly e MOPS) em uma concentração de  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ . As leituras foram realizadas em triplicata após cinco minutos de equilíbrio. Partindo-se do pH inicial da amostra, variou-se o pH até 10 através da titulação com uma solução de hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$ . A titulação ácida até pH 3 foi realizada através da adição de uma solução de ácido clorídrico  $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Considerando o ponto isoelétrico de LipPS ( $pI=6,3$ ), em valores de pH superiores a 6,3 as interações eletrostáticas entre a proteína e as cargas positivas existentes nas lamelas do HDL são favoráveis, uma vez que a carga da proteína será majoritariamente negativa. Assim sendo, o processo de imobilização foi realizado em pH 7,5 nos tampões MOPS, GlyGly e também em água. Na **Tabela 1** são apresentados os valores atribuídos ao potencial zeta ( $\zeta$ ) das amostras, que avalia a dissociação dos grupos iônicos na superfície das partículas e a adsorção diferencial de íons da solução na região da superfície, ou seja, a carga que se desenvolve na interface entre uma superfície sólida e seu meio líquido.

**Tabela 1:** Valores do potencial zeta ( $\zeta$ ), medidos em milivolts, das amostras de HDL em tampão MOPS (HDLM), tampão GlyGly (HDLG) e em água (HDLA) e a LipPS livre em tampão MOPS (LipPS-M), tampão GlyGly (LipPS-G) e em água (LipPS-A).

Amostra	$\zeta$ (mV)	pH
HDLA	25,7	5,3
HDLG	18,2	7,5
HDLM	20,8	7,5
LipPS-A	-15,1	7,5
LipPS-G	-14,1	7,5
LipPS-M	-10,1	7,5

Observa-se (**Tabela 1**) que todos os HDL exibiram cargas altamente positivas nas condições de imobilização (pH 7,5) enquanto que LipPS apresentou uma carga global negativa. As atrações coulombianas existentes entre a enzima e o suporte podem garantir uma alta estabilidade e rendimento ao preparado imobilizado. Outro ponto que se destaca nesse estudo é o comportamento que o suporte exibe em relação ao tampão GlyGly e MOPS, devido a sua basicidade superficial, permitindo a estabilização ou melhoria na atividade da lipase.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS PREPARADOS IMOBILIZADOS

A influência do processo de imobilização (adsorção, coprecipitação ou delaminação) sobre as propriedades estruturais dos biomateriais foi investigada através de análises de DRX, FTIR, MEV, MET e GC e em paralelo com a determinação da atividade da LipPS livre e imobilizada na resolução do (*R,S*)-1-feniletanol, que estão discutidos na sequência.

### 5.2.1 Caracterização da lipase

#### 5.2.1.1 Atividade e concentração de proteínas

A caracterização da lipase LipPS utilizada neste trabalho foi realizada com ênfase em algumas propriedades que são importantes para seu emprego na biocatálise, tais como a determinação da quantidade de proteínas no sólido liofilizado fornecido pelo fabricante e determinação da atividade de hidrólise realizada utilizando o método titulométrico (**Tabela 2**).

**Tabela 2:** Atividade de hidrólise e carga de proteínas na lipase LipPS.

Proteína do pó		Atividade de hidrólise	
$\mu\text{gP}/\text{mg}^{(1)}$	%	$\text{U}/\text{mg}^{(2)}$	$\text{U}/\text{mgP}^{(3)}$
$10 \pm 1$	1,0	$13,3 \pm 0,1$	$1333,4 \pm 0,1$

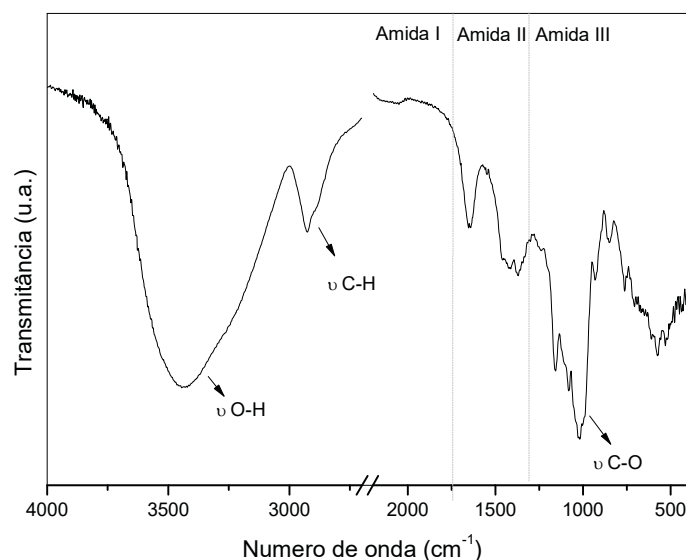
<sup>(1)</sup> Quantidade de proteína (P) por mg de pó de LipPS. <sup>(2)</sup> Atividade de hidrólise (U) por mg de pó de LipPS. <sup>(3)</sup> U por mg de proteína contida na amostra (atividade específica da LipPS na reação de hidrólise). A atividade de hidrólise (azeite de oliva) foi medida em pH 7,0 a 35 °C com 200  $\mu\text{L}$  de solução de enzima ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) preparada em tampão fosfato ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,0).

LipPS apresentou uma alta atividade específica ( $1333,4 \text{ U}/\text{mgP}$ ) e o pó liofilizado apresentou 1% de proteína (**Tabela 2**). Segundo Bornscheuer e Kazlauskas (2006), a lipase comercial LipPS contém de 1-25% de proteína na sua composição, assim como outros compostos, como terra diatomácea, dextrina,  $\text{CaCl}_2$  e glicina.

### 5.2.1.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier - FTIR

A espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier – FTIR foi usada para verificar a presença de grupos funcionais na enzima livre para posterior comparação de espectros e detecção da presença de enzima nos derivados imobilizados (**Figura 18**). Para realizar este ensaio a LipPS em pó foi diluída em KBr.

A lipase livre apresenta um espectro típico de proteínas com bandas de absorção associadas ao grupo amino (CONH). Nessa análise foi possível identificar três bandas características de amida I, II, III na faixa de 1750-1300  $\text{cm}^{-1}$  da região espectral. A banda de amida I foi observada a 1600-1750  $\text{cm}^{-1}$ , que é uma banda característica das vibrações de estiramento de C = O. A banda de amida II foi observada a 1500-1600  $\text{cm}^{-1}$  devido a curvatura de N – H e vibrações de alongamento do C – N. A banda amida III é atribuída a 1300-1450  $\text{cm}^{-1}$  devido a estiramento de C – C, C – N e vibrações de flexão de N – H. Também foi observado uma banda em 1865-1962  $\text{cm}^{-1}$  referente ao C-H presente na estrutura da lipase.

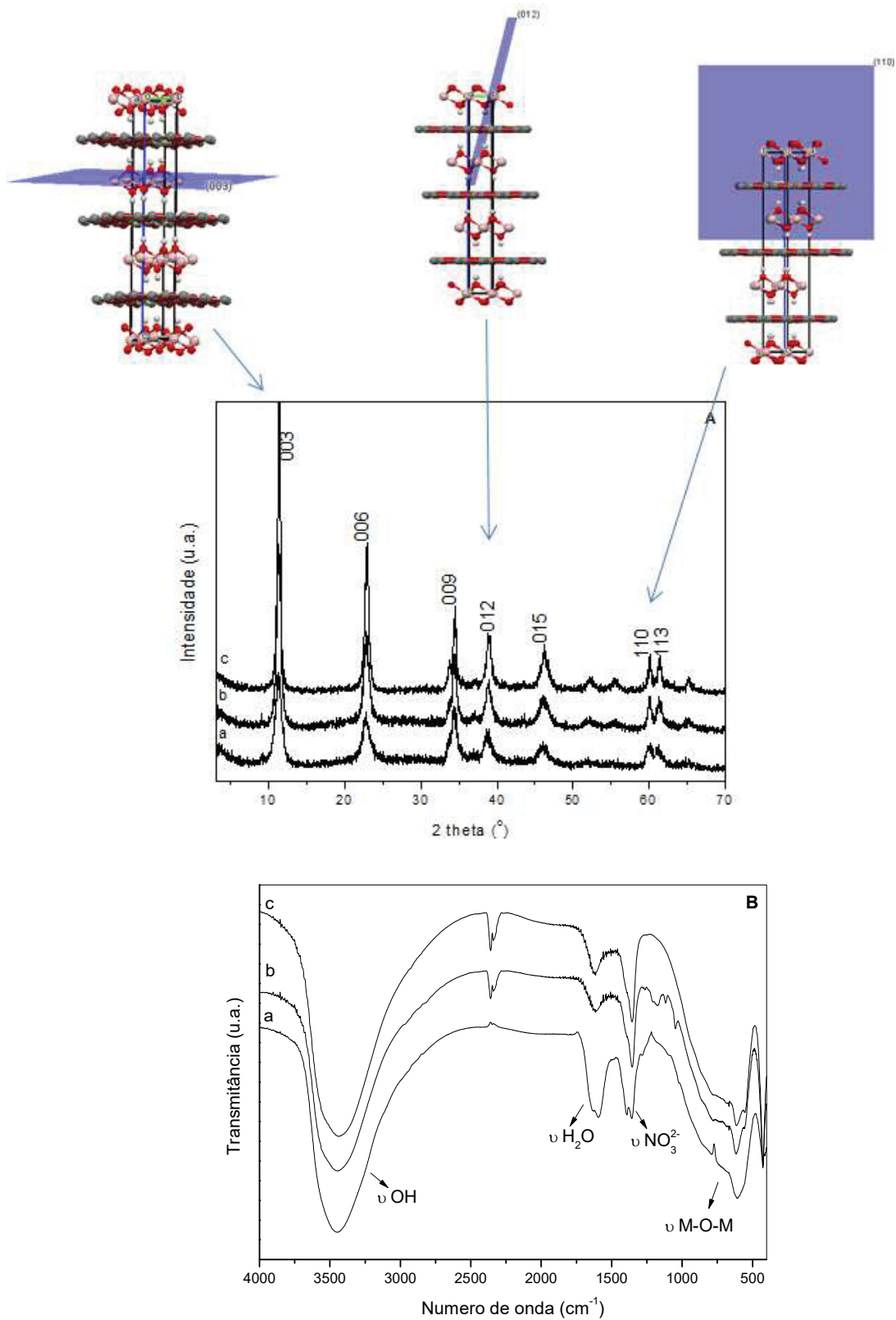


**Figura 18:** Espectro de FTIR da lipase livre (LipPS).

### 5.2.2 Caracterização dos suportes HDL

Os padrões de difração de raios X e os espectros de FTIR das amostras dos suportes preparados por coprecipitação são comparados na **Figura 19**. Os

difratogramas (**Figura 19A**) dos HDL preparado com água e nos diferentes tampões (GlyGly e MOPS) foram plotados para comparação.



**Figura 19:** Padrões de difração de raios X (A) e espectros de FTIR (B) das amostras do HDL preparado em tampão a) GlyGly, b) MOPS e c) Água.

Em todas as estruturas mostra-se uma característica de compostos do tipo hidrotalcita puro (REICHLE, 1986) com picos basais (00 $\ell$ ), (003), (006) e (009) relacionados com o plano de empilhamento das lamelas, característicos da formação de HDL. O espaçamento basal calculado através da equação de Bragg ( $n\lambda = 2d_{hkl} \cdot \sin \theta$ ) utilizando os valores de  $\theta$  do pico (009) foi de 7,78 Å, que é típica da intercalação do ânion cloreto ou carbonato nas lamelas do hidróxido duplo. A presença do pico de reflexão para o plano (012) indica o polítipo do HDL formado (R-3m) com uma configuração hexagonal com simetria romboédrica. Os picos (110) estão relacionados com a organização da estrutura no interior das lamelas e desta forma, pode-se calcular o parâmetro de rede “a”, relativo à distância entre os metais na lamela de 3,077 Å.

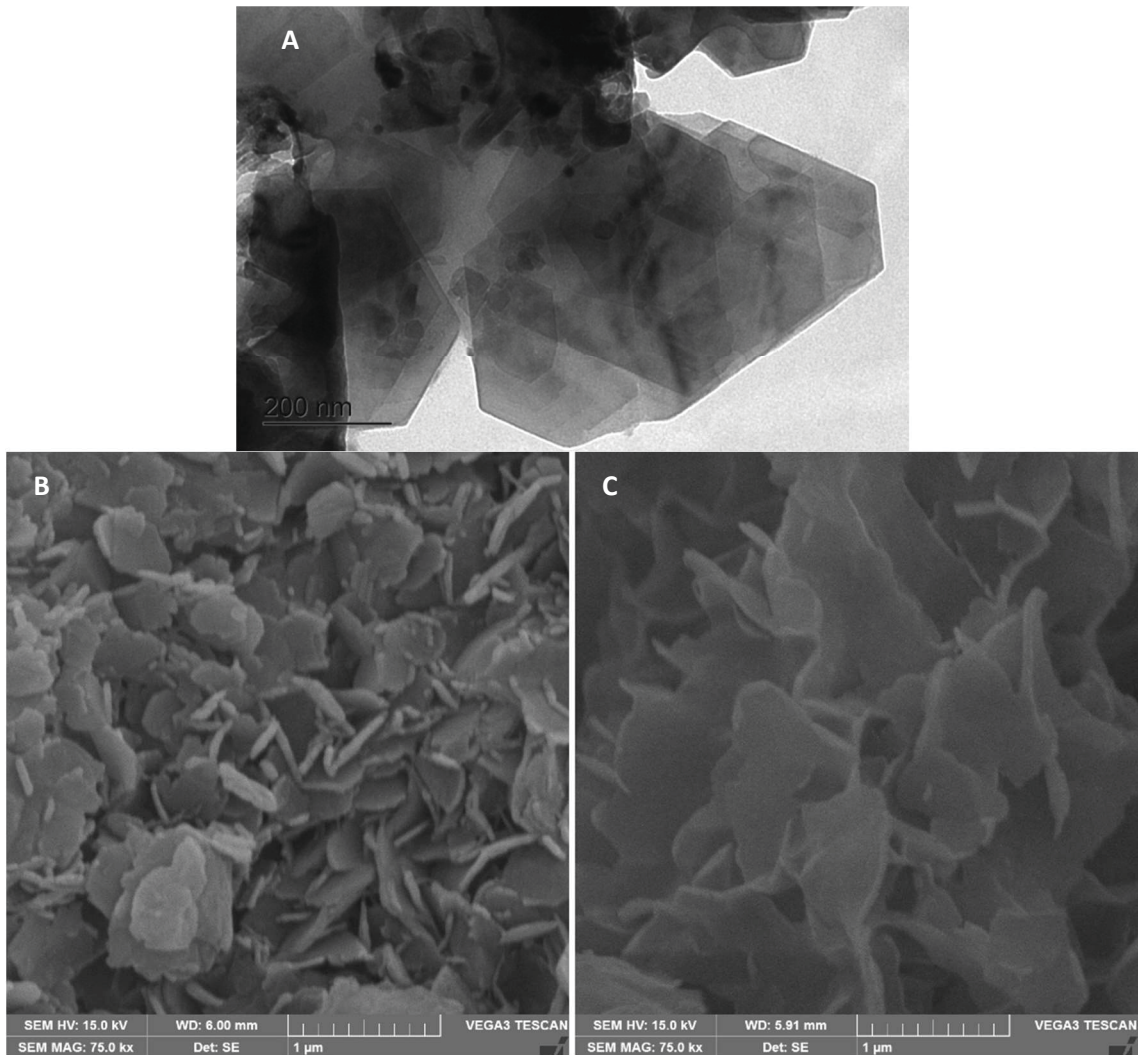
Observa-se ainda (**Figura 19A**) que para o conjunto de difratogramas referentes aos sólidos intercalados com cloreto ou carbonato na presença dos tampões, os picos de difração são mais alargados na base quando comparados aos picos do difratograma dos sólidos na presença de água, sugerindo que os tampões influenciam levemente na organização estrutural do HDL.

Nos espectros de FTIR (**Figura 19B**), as bandas de vibração típicas do HDL foram observadas, sem a presença de eventuais contaminantes. As bandas alargadas em 3000 – 3700 cm<sup>-1</sup> podem ser atribuídas as vibrações dos grupos OH presentes nas lamelas e também às moléculas de água adsorvidas. As bandas próximas de 1630 cm<sup>-1</sup> indicam as deformações angulares das moléculas de água. A banda dupla na região de 1300-1400 corresponde ao estiramento N-O e C-O dos íons nitrato e carbonato, respectivamente, ambos co-intercalados.

Também foram observadas bandas na faixa de 400 – 800 cm<sup>-1</sup> que correspondem às vibrações da rede M–O e O–M–O (SILVERSTEIN *et al.*, 2010).

Na **Figura 20** são mostradas micrografias típicas de MET (A) e MEV (B,C) dos sólidos de HDL preparados em água. A imagem de microscopia eletrônica de transmissão do HDL preparado em água (**Figura 20A**) exhibe uma morfologia típica referente à formação de plaquetas sobrepostas umas às outras, característica dos HDL. Esse empilhamento dos microcristais tem geralmente a forma de plaquetas devido ao crescimento preferencial da estrutura lamelar ao longo do plano (00 $\ell$ ).



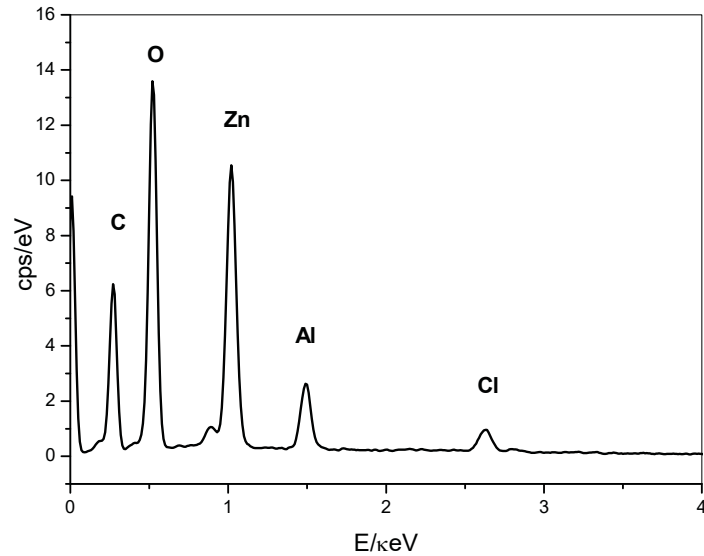


**Figura 20:** Micrografias do HDL preparado em água. (A) MET com magnificação de 75 kx, (B) MEV com magnificações de 75 kx do material secado em estufa a vácuo a 25 °C e (C) liofilizado.

Nas imagens de MEV do HDL seco à temperatura ambiente (**Figura 20B**) nota-se uma morfologia de aglomerados de cristais com uma superfície lisa e arestas levemente arredondadas, diferentes das imagens mostradas na **Figura 20C**, onde se observa uma superfície mais rugosa, do tipo microporosa para o HDL liofilizado.

Através dessas imagens foi possível observar que o processo de secagem do HDL influenciou na morfologia da organização dos cristais do HDL.

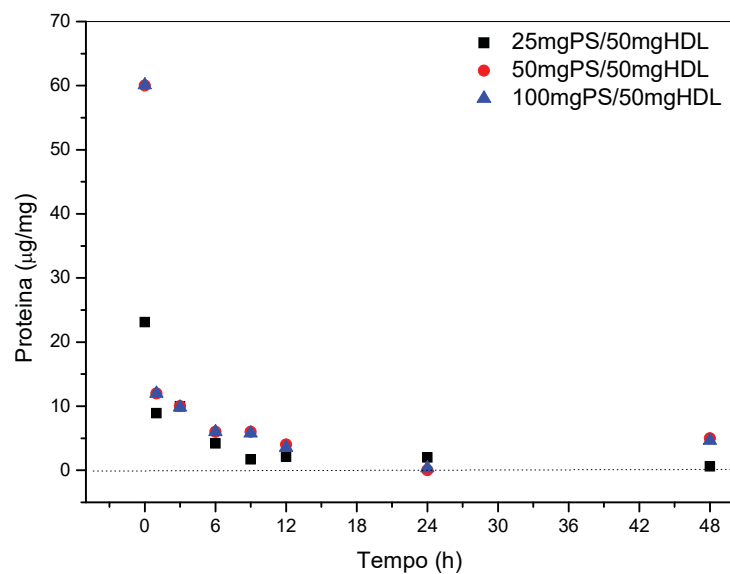
A análise de espectroscopia de energia dispersiva (EDS, **Figura 21**) foi realizada para o HDL preparado em água e liofilizado, confirmando a presença dos elementos oxigênio, alumínio, zinco e cloreto na estrutura do HDL.



**Figura 21:** Análise de espectroscopia de energia dispersiva do HDL preparado em água.

### 5.2.3 Imobilização de LipPS em HDL

LipPS foi imobilizada por adsorção, utilizando água, tampão GlyGly e tampão MOPS. Durante o processo de imobilização, foram coletadas amostras do sobrenadante para determinação de atividade e teor de proteínas residual, o que propiciou o cálculo da eficiência de imobilização (**Figura 22**). Diferentes cargas de proteína foram estudadas com a finalidade de determinar-se a saturação do suporte pela proteína.

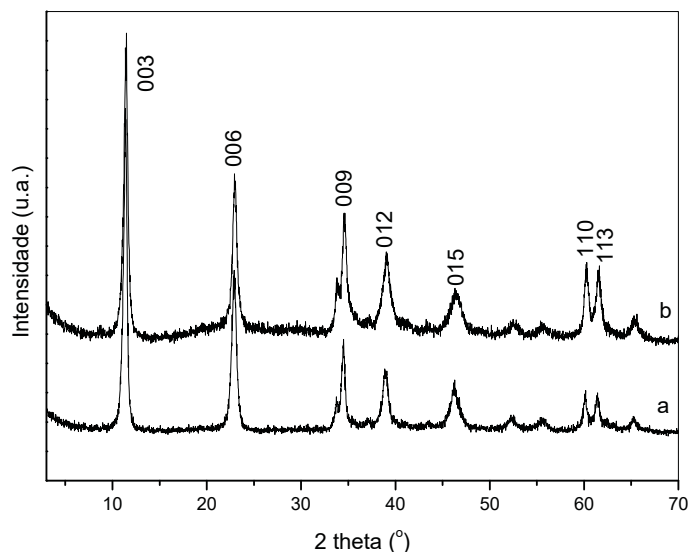


**Figura 22:** Curvas cinética de imobilização da lipase LipPS no HDL em água via processo de adsorção com diferentes cargas de proteínas.

Na **Figura 22** foi possível observar que o tempo de imobilização ideal para as cargas de proteínas – 25, 50 e 100 mg de lipase para 50 mg do suporte HDL – foi de 12 h. Para todas as cargas de proteína, em 12 h foi obtida uma alta eficiência de imobilização (97%). Nos processos de imobilização por coprecipitação e por delaminação não foi possível a detecção de proteína no sobrenadante após 24 h de incubação. Nestes casos, a eficiência de imobilização foi considerada de 100%.

### 5.2.3.1 Caracterização do imobilizado HDLadPS via adsorção

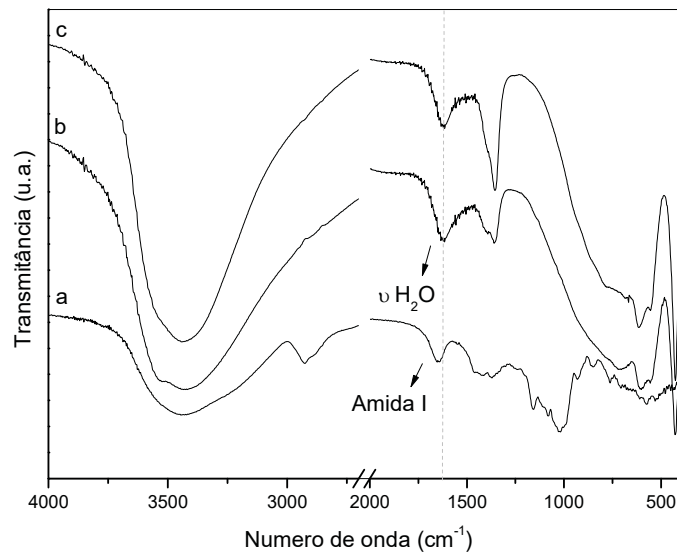
Os padrões de raios X para o imobilizado HDLadPS (**Figura 23**) mostram que o processo de imobilização da enzima no suporte não influenciou as propriedades estruturais do HDL, pois este permaneceu intacto e bem cristalino. Os espectros de FTIR (**Figura 24**) apresentaram bandas típicas do HDL puro. Para os imobilizados (HDLG-PS e HDLM-PS) não foram realizadas as análises de DRX e FTIR.



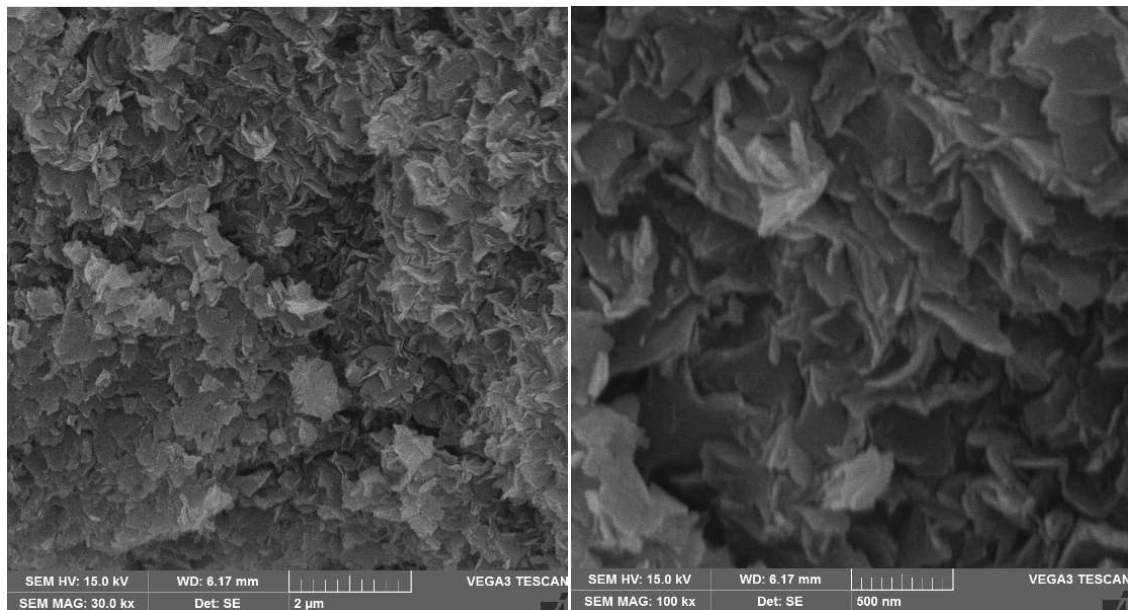
**Figura 23:** Difratogramas de raios X do HDL preparado em água (a) e do derivado imobilizado em água pelo método adsorção (HDLadPS) (b).

Na **Figura 25** são mostradas micrografias eletrônicas de varredura para o imobilizado via adsorção preparado em água. Através do método de adsorção da LipPS no suporte HDL, são observados agregados grandes e densos provavelmente formados pela interação de cargas, se assemelhando as lamelas do HDL puro. Essa

morfologia indica que a adsorção de proteínas pelo suporte não influenciou na sua morfologia.



**Figura 24:** Espectros de FTIR da LipPS livre (a), para o derivado immobilizado em água pelo método adsorção (HDLadPS) (b) e o suporte HDL preparado em água (c).

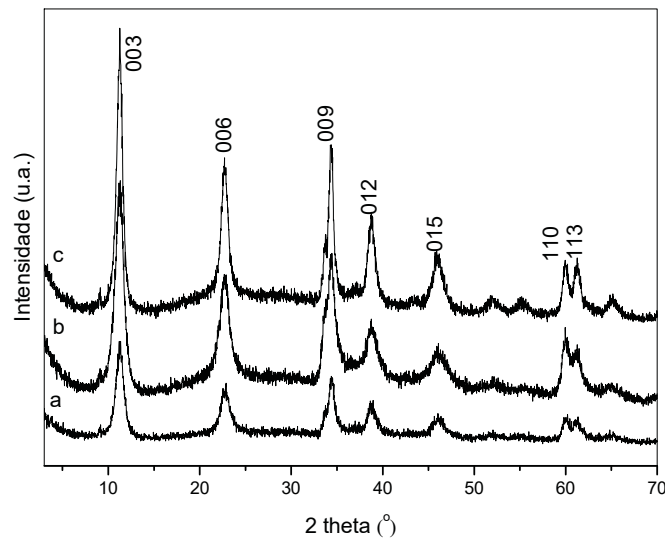


**Figura 25:** Imagens de microscopia eletrônica de varredura com magnificação de 30 kx e 100kx dos immobilizado em água pelo método adsorção (HDLadPS).

### 5.2.3.2 Caracterização do immobilizado HDLcoPS via coprecipitação

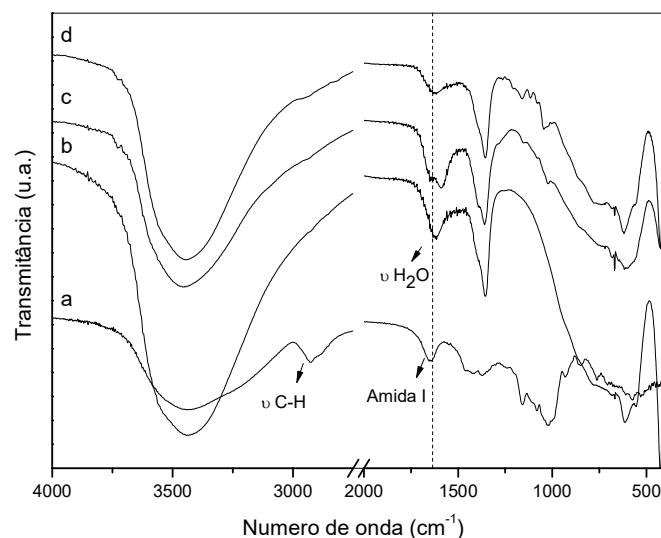
Os padrões de raios X para os derivados immobilizados via coprecipitação (HDLcoPS) evidenciaram baixa influência de LipPS nas propriedades estruturais do

suporte, uma vez que os difratogramas de raios X mostraram apenas um leve alargamento nos picos de difração (**Figura 26**). Para todos os preparados, os picos de difração foram semelhantes às do suporte sem enzima, o que pode ser justificando pela baixa carga de proteína utilizada na imobilização (1%). A não ocorrência do deslocamento dos picos de difração raios X confirma que a enzima está imobilizada na superfície das lamelas e não intercalada entre as lamelas.



**Figura 26:** Padrões de difração de raios X dos derivados imobilizados em (a) água, (b) tampão GlyGly e (c) tampão MOPS.

Os espectros de FTIR (**Figura 27**), mostraram as bandas típicas de HDL, similares àsquelas observadas para o HDL sem a presença de LipPS.



**Figura 27:** Espectros de FTIR da LipPS livre (a) e dos derivados imobilizados em água (b), tampão GlyGly (c) e tampão MOPS (d) via método de coprecipitação.

Não foi possível a identificação das bandas das amidas I e II (entre 1750-1500  $\text{cm}^{-1}$ ), pois estas coincidem com as bandas de deformação angular das moléculas de água presente na estrutura do suporte.

As imagens de MEV dos derivados imobilizados pelo método coprecipitação são mostradas em diferentes ampliações (**Figura 28**). Podem ser observadas a partir dessas imagens com maiores ampliações (100kx) nanopartículas que exibem estruturas do tipo “nanoflores” (WANG et al., 2014), constituídas por nanoplacas finas e retorcidas.

O método de imobilização de enzimas no suporte HDL por coprecipitação direta pode apresentar alguns pontos positivos (YU et al., 2017):

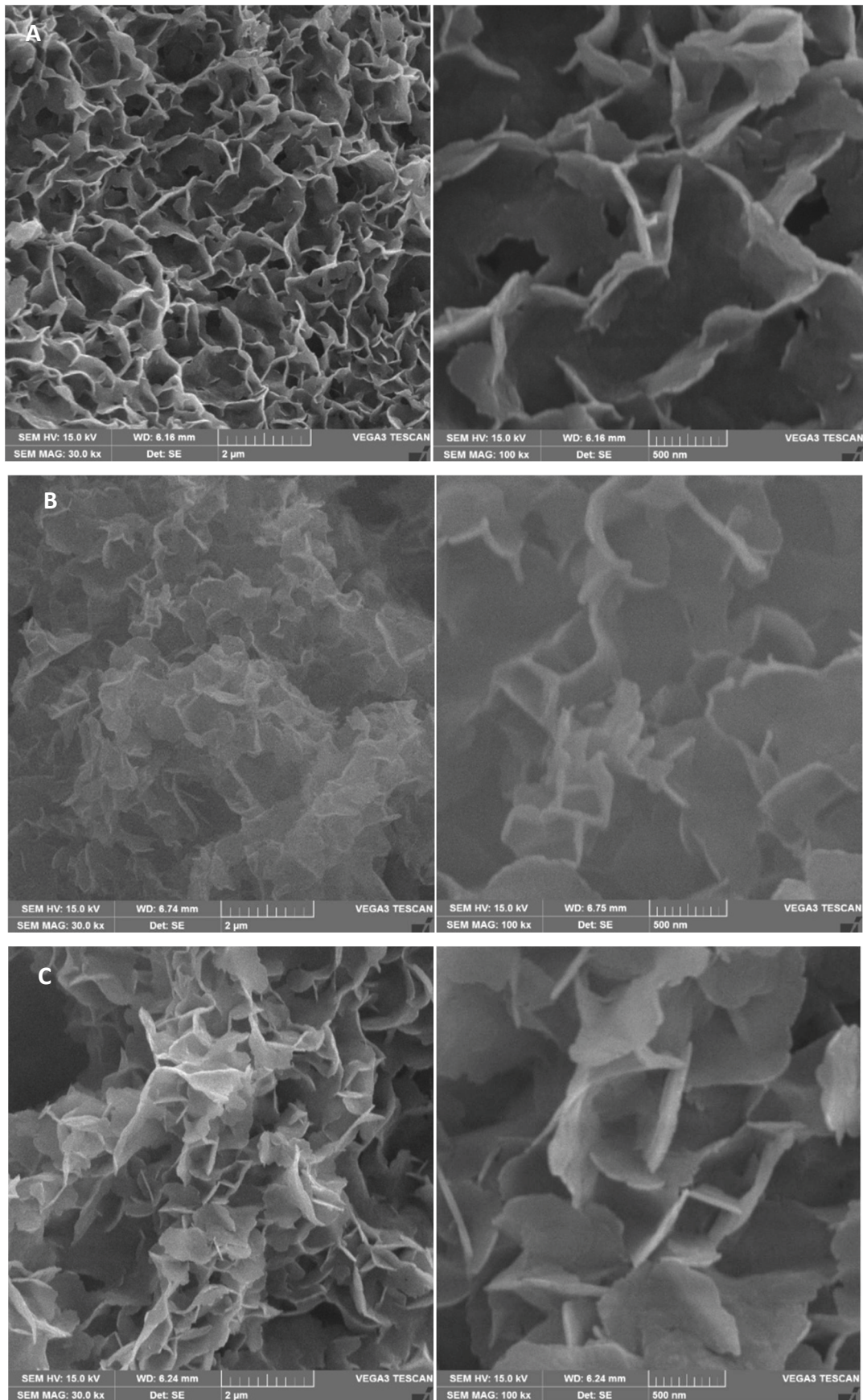
- (i) A imobilização pode ocorrer em diferentes pontos do suporte, uma vez que existe uma troca de ânions cloreto (ou carbonato) presentes na superfície do suporte por grupos carboxilados (Asp e Glu) presentes na estrutura da enzima. Essa interação é reforçada pela presença de uma rede de hidroxilas na superfície do HDL, o que torna a região altamente hidrofílica;
- (ii) A existência de uma rede porosa e flexível de nanoplaquetas de HDL construídas em torno da enzima, permitem que estas estejam retidas nos microporos (encapsuladas).

Essas razões promovem o interesse nesse processo de imobilização de enzima-HDL, pois não é necessário estabelecer estratégias de fixação de ponto único que aumentam custos e consomem materiais. Para uma melhor avaliação da quantidade de enzima imobilizada no suporte via coprecipitação, foi realizada a análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN) (**Tabela 3**).

Com os valores obtidos através da análise CHN (**Tabela 3**), observa-se que uma grande quantidade de carbono existia no HDL formado, provavelmente por intercalação não somente de ânions cloreto, mas também por uma contaminação com carbonato e carbono oriundo da estrutura da enzima.

O nitrogênio seria o único elemento proveniente da enzima, dessa forma, quando se descontam os valores obtidos do HDL produzidos por água (HDLA) sem presença de enzima, observa-se teores de nitrogênio próximos de 1% (base seca) nos imobilizados.





**Figura 28:** Imagens de microscopia eletrônica de varredura com magnificação de 30 kx e 100 kx dos imobilizados em água (A), tampão GlyGly (B) e tampão MOPS (C).

**Tabela 3:** Análise elementar dos imobilizados em tampão Glicilglicina (HDLG-PS), tampão MOPS (HDLM-PS) e água (HDLA-PS) e do HDL puro preparado em água (HDLA) no processo de coprecipitação.

Amostra	C (%)	H (%)	N (%)
HDLA	1,05 ± 0,00	2,59 ± 0,11	0,44 ± 0,00
HDLA-PS	6,55 ± 0,05	3,33 ± 0,09	0,99 ± 0,10
HDLG-PS	4,57 ± 0,05	2,92 ± 0,09	1,21 ± 0,04
HDLM-PS	4,82 ± 0,16	2,79 ± 0,21	1,26 ± 0,20

Para obter uma melhor noção da quantidade de proteínas imobilizadas no suporte HDL, foram realizadas medidas de análise termogravimétrica nos imobilizados na presença de tampão MOPS (HDLMcoPS) e no tampão GlyGly (HDLGcoPS) e comparados com os suportes sem enzima (HDLG e HDLM) e a com a LipPS livre (**Figura 29**).

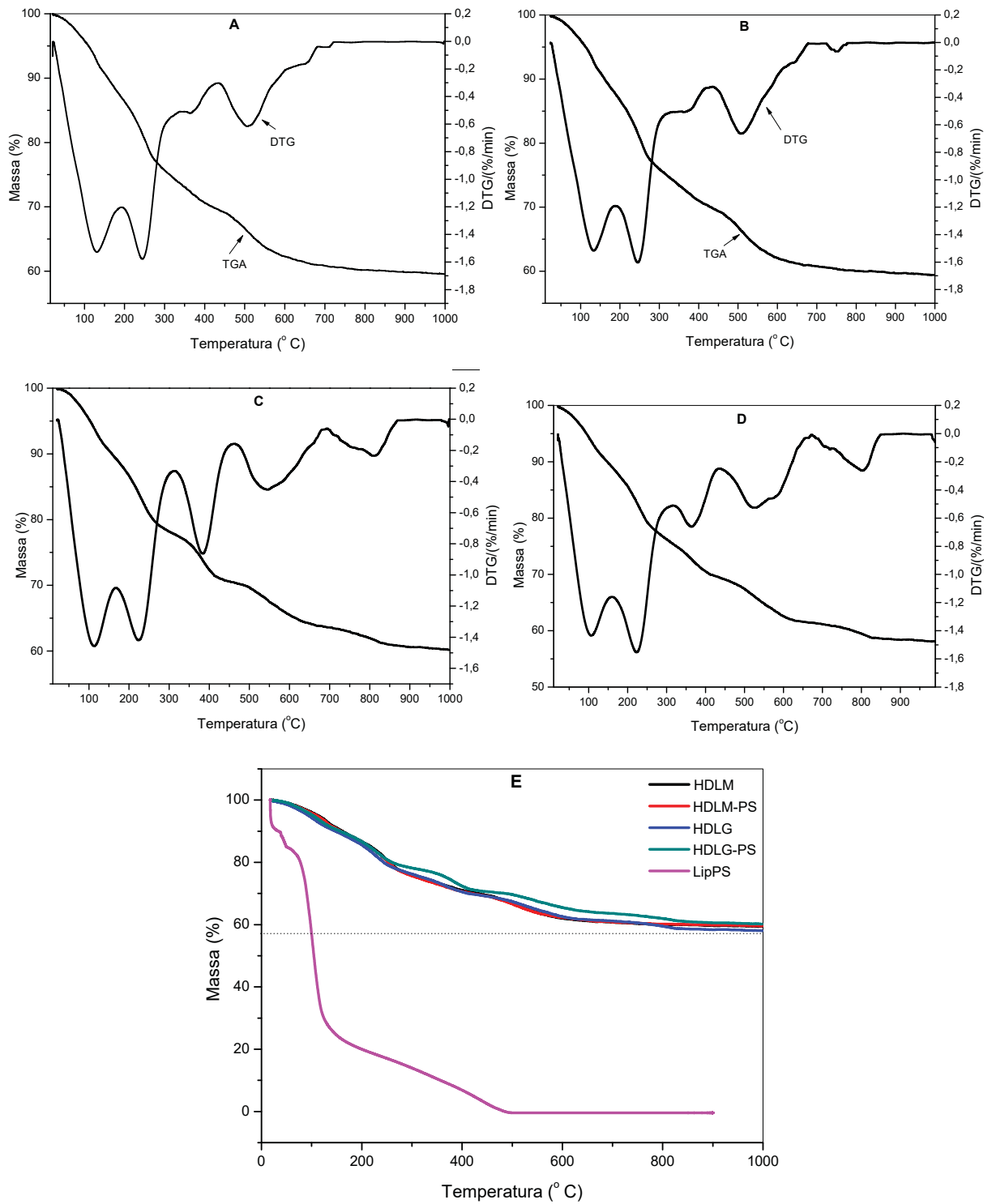
As amostras exibiram um comportamento térmico típico dos materiais de HDL com duas regiões de perda de massa característica. O primeiro evento corresponde à remoção de água adsorvida ou intercalada, entre 20 e 220 °C (18 % de perda de massa) e à desidroxilação e decomposição do ânion cloreto acima de 220 °C (próximo de 26 % de perda de massa), resultando na formação de óxidos mistos de ZnO e Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Os demais eventos ocorridos acima de 220 °C deve-se à decomposição do tampão utilizado na síntese do HDL (MOPS e GlyGly) ou dos contaminantes presentes na lipase comercial.

A análise termogravimétrica da LipPS livre mostrou uma perda de massa total, com três perdas de massa principais nas faixas de temperatura 25-140 °C, 140-450 °C e acima de 450 °C.

Para os imobilizados, observou-se um comportamento similar ao do HDL puro, com uma decomposição quase completa próxima de 600 °C, não sendo possível obter diferentes perdas de massa, o que sugere a baixa carga de proteína no suporte, com manutenção da composição química original do HDL.

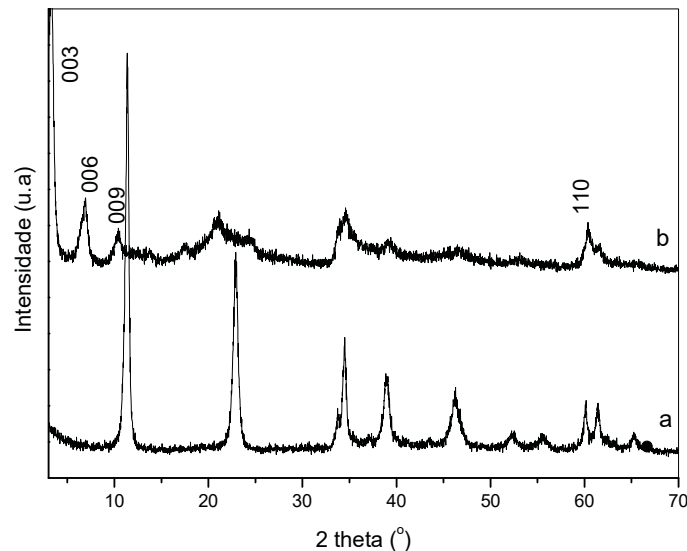




**Figura 29:** Curva de análise térmica (TGA/DTG) dos HDL: A– tampão MOPS (HDLM), B– tampão MOPS e enzima (HDLM-PS), C– tampão GlyGly (HDLG), D– tampão GlyGly e enzima (HDLG-PS) e E – TGA de comparação com enzima LipPS.

### 5.2.3.3 Caracterização do imobilizado HDLdePS via delaminação

O difratograma de raios X dos HDL intercalado com ânion cloreto e ânion dodecilsulfato são mostradas na **Figura 30**.

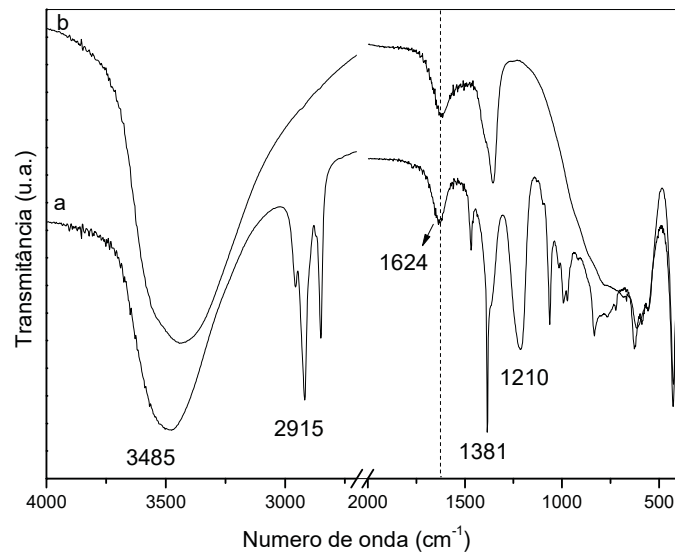


**Figura 30:** Difratograma de raios X do HDL intercalado com o ânion cloreto (a) e do HDL intercalado com o ânion dodecilsulfato (b).

Através dessa análise foi possível afirmar que, mesmo fazendo a troca de ânions ( $\text{Cl}^-$  –  $\text{DS}^-$ ), o composto continuou apresentando uma estrutura lamelar, pela observação de picos de difração referentes aos planos de reflexão basal na direção do empilhamento das lamelas ( $00l$ ). A intercalação do ânion  $\text{DS}^-$  foi comprovada pelo deslocamento das reflexões basais na direção de menores ângulos em  $2\theta$ , o que ocasionou um aumento da distância interlamelar para 25,61 Å, que é consistente com a intercalação desse ânion.

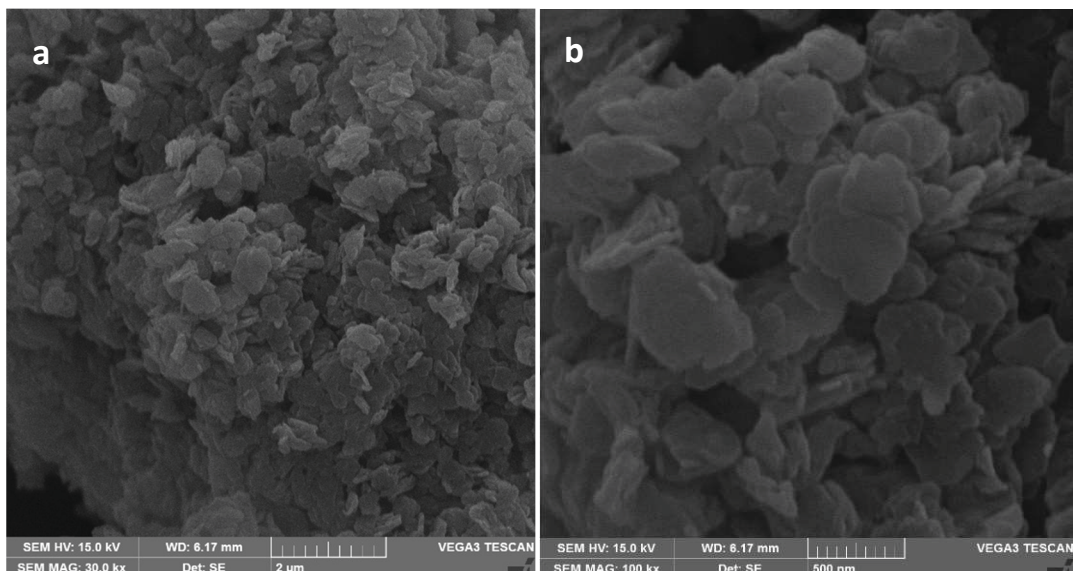
Na **Figura 31** estão apresentadas as medidas de espectroscopia de FTIR do HDL intercalado com o ânion  $\text{DS}^-$ . Observa-se uma banda larga na região de  $3485\text{ cm}^{-1}$ , geralmente atribuída às vibrações de grupamentos hidroxila provenientes da matriz lamelar. As bandas na região abaixo  $580\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídas às vibrações das ligações O-M-O, M-O-M e M-OH da lamela, e a banda em  $1624\text{ cm}^{-1}$  é característica das moléculas de água interlamelar. Foi possível observar bandas próximas  $2915\text{ cm}^{-1}$ , referentes à deformação axial dos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  e em  $1381\text{ cm}^{-1}$ , referente à deformação angular de ligação C-O, oriundo do ânion carbonato contaminante do HDL inicial. Em regiões próximas de  $1210\text{ cm}^{-1}$

encontraram-se bandas característica dos modos vibracionais do grupo sulfato (SILVER,STEIN *et al.*, 2010).



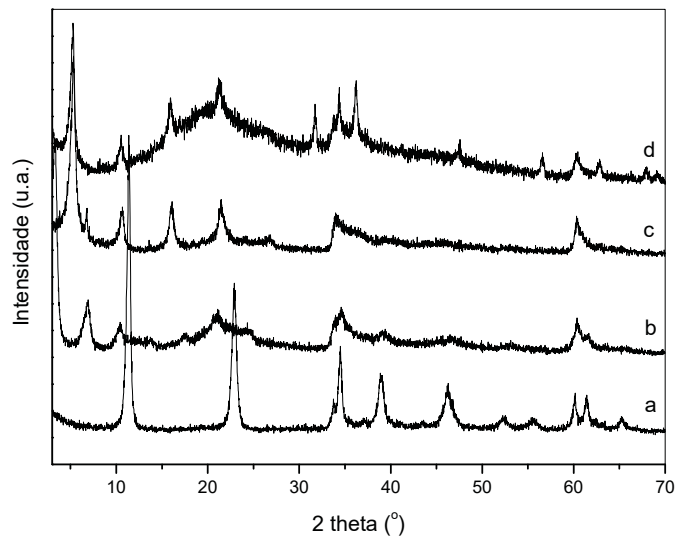
**Figura 31:** Espectros de FTIR do HDL intercalado com ânions dodecilsulfato (a) e o HDL intercalado com ânions cloreto (b).

Na **Figura 32** são observadas micrografias eletrônicas de varredura dos sólidos de HDL intercalado com ânions  $DS^-$ . A morfologia do sólido HDL intercalado com o ânion  $DS^-$  apresentou uma superfície levemente desorganizada em relação ao HDL intercalado com cloreto ou carbonato.

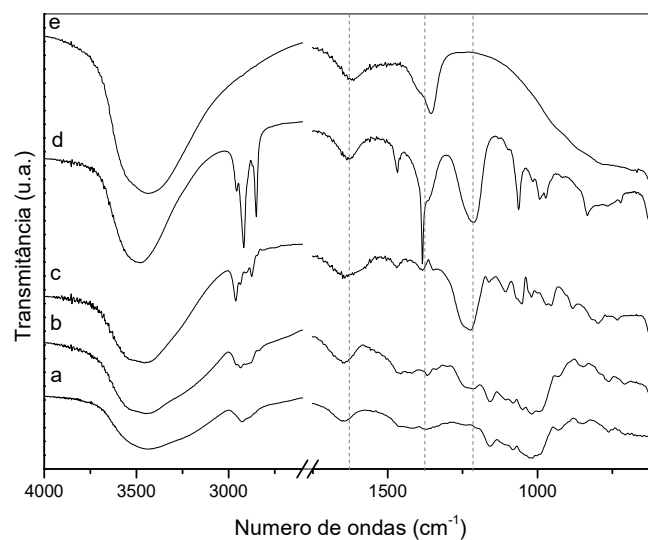


**Figura 32:** Imagens de microscopia eletrônica de varredura com magnificação de (a) 30 kx e (b) 100 kx do HDL intercalada com ânions dodecilsulfato.

Após a delaminação do HDL-DDS em butanol ocorreu uma diminuição na distância interlamelar de 25,61 Å para 16,65 Å, um detalhe que será averiguado em estudos futuros. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 4000 rpm para a separação do material delaminado e não delaminado, obtendo-se 48% do material delaminado. O difratograma de raios X (**Figura 33**) mostra um material supostamente delaminado na presença da enzima onde se observa um halo amorfo, contribuição do HDL delaminado e/ou enzima. A **Figura 34** mostra o espectro de FTIR do derivado imobilizado via processo de delaminação (HDLdePS).



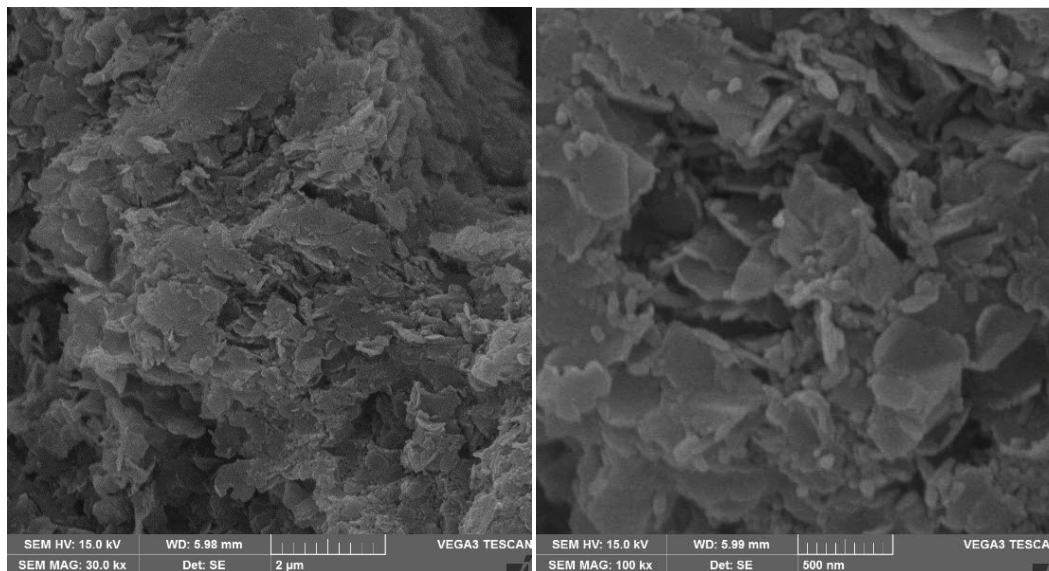
**Figura 33:** Difratograma de raios X da amostra de HDL intercalado com cloreto (a), HDL intercalado com dodecilsulfato (b), HDL após delaminado em butanol (c) e LipPS imobilizada em HDL via delaminação (d).



**Figura 34:** Espectro de FTIR da LipPS livre (a), imobilizada no suporte HDL (HDLdePS) (b), e suporte HDL delaminado em butanol (c), HDL intercalado com o ânion dodecilsulfato (d) e HDL intercalado com o ânion cloreto (e).

Pode-se observar um espectro bem semelhante da enzima livre, evidenciando a presença da enzima na matriz HDL.

As imagens de MEV para o imobilizado HDLdePS (**Figura 35**) mostraram uma morfologia mais desorganizada dos cristais, provavelmente devido à remontagem dos materiais delaminados na presença da enzima.



**Figura 35:** Imagens de microscopia eletrônica de varredura com magnificação de 30 kx e 100 kx do derivado imobilizado (HDLdePS) via delaminação.

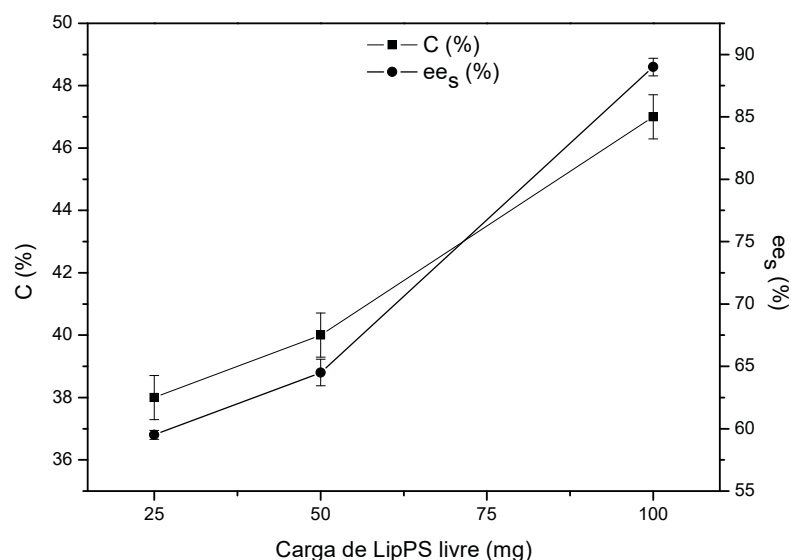
### 5.3 RESOLUÇÃO ENZIMÁTICA DO (*R,S*)-1-FENILETANOL

A influência da quantidade de LipPS livre ou imobilizada no HDL, o método de imobilização e o efeito do tampão foram avaliados na resolução do (*R,S*)-1-feniletanol com acetato de vinila usando *n*-hexano a 35 °C por 24 h a pH de imobilização de 7,5 (tampão GlyGly ou tampão MOPS) e água. A quantidade de LipPS utilizada variou na faixa de 25 a 100 mg para 50 mg de HDL.

#### 5.3.1 Carga de lipase

Inicialmente, foi estudado o comportamento da LipPS na sua forma livre frente a sua atividade na reação de transesterificação do (*R,S*)-1-feniletanol (**Figura 36**). Foi avaliado o efeito da carga de enzima (25-100 mg) em 24 h de reação. A taxa de conversão variou de 37-48% com excesso enantiomérico do substrato ( $ee_s$ ) variando

de 60-89%. Todos as cargas apresentaram um excesso enantiomérico do produto ( $ee_p$ ) maior que 99% e alta enantiosseletividade. Esses resultados serão posteriormente comparados com os derivados imobilizados de LipPS. Um experimento foi realizado com o suporte HDL na ausência da lipase, e nenhum produto foi detectado.



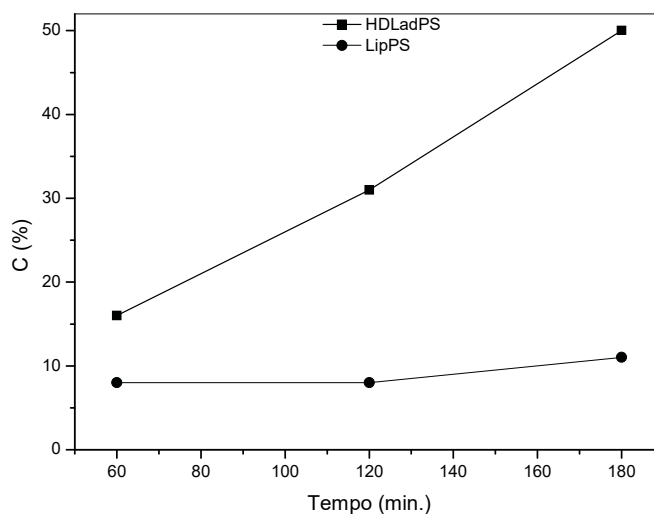
**Figura 36:** Resolução enzimática do (*R,S*)-1-feniletanol com acetato de vinila catalisada por diferentes massas de LipPS livre. Condições: (*R,S*)-1-feniletanol (0,5 mmol), acetato de vinila (0,5 mmol), n-hexano (5 mL), 24 h, 35 ° C. [(■) conversão (%) e (●) excesso enantiomérico do substrato (%)].

### 5.3.2 Efeito do tampão na imobilização da lipase em HDL

O pH de uma solução aquosa pode influenciar diretamente no grau de ionização dos resíduos de aminoácidos presente no sítio ativo da lipase (YANG et al., 2013). Quando uma enzima é liofilizada no seu pH ótimo e em seguida depositada em solventes orgânicos, ela pode manter seu grau de ionização e apresentar o seu melhor desempenho catalítico. Este fenômeno é conhecido como "memória de pH" (COSTANTINO et al., 1997; YANG et al., 2013). Dessa forma, o desempenho da enzima pode ser melhorado quando esta for liofilizada em tampões cujo pH esteja próximo ao valor ótimo para a atividade da enzima.

### 5.3.2.1 Derivados imobilizados via adsorção (HDLadPS)

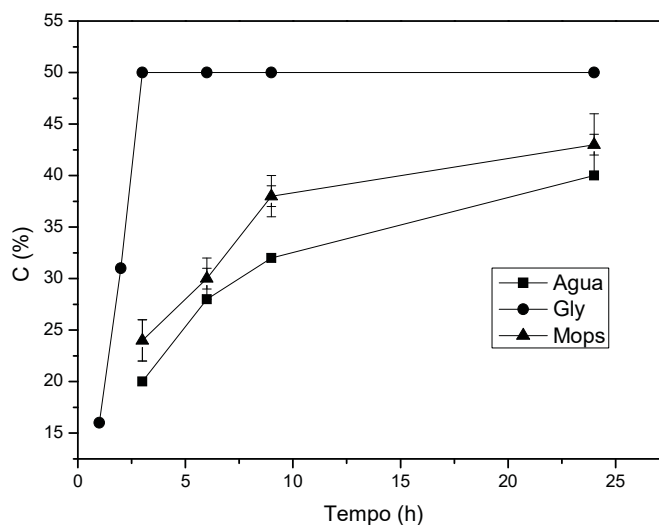
Nestes experimentos, LipPS foi dissolvida nos tampões GlyGly e MOPS e em água e em seguida, foi incubada em presença do suporte HDL. Utilizou-se cargas de LipPS variando de 25 a 100 mg para 50 mg de HDL. Na **Figura 37** observou-se para o derivado imobilizado em presença do tampão GlyGly, a máxima conversão (50%) já foi atingida em 3 h de reação, tempo mínimo avaliado com carga de 25 mg de LipPS.



**Figura 37:** Curvas cinéticas da reação do (*R,S*)-1-feniletanol por LipPS imobilizada por adsorção em HDL em diferentes tampões e água. Condições: (*R,S*)-1-feniletanol (0,5 mmol), acetato de vinila (0,5 mmol), *n*-hexano (5 mL), 24 h, 35 ° C e 25 mg de LipPS para 50 mg de HDL. (■) GlyGly e (●) LipPS livre

Após 24 h de reação, para todos os imobilizados obteve-se 50% de conversão, com  $ee_p$  maiores que 99% e valores de  $E$  superiores a 200 (**Figura 38**). As máximas conversões para os derivados imobilizados com a enzima dissolvida em MOPS e em água foram de 43% e 37%, respectivamente, em 24 h de reação, com carga de 25 mg de LipPS. Para todos os derivados imobilizados, os valores de  $E$  foram superiores a 200 e os excessos enantioméricos do produto ( $ee_p$ ) foram superiores a 99%.

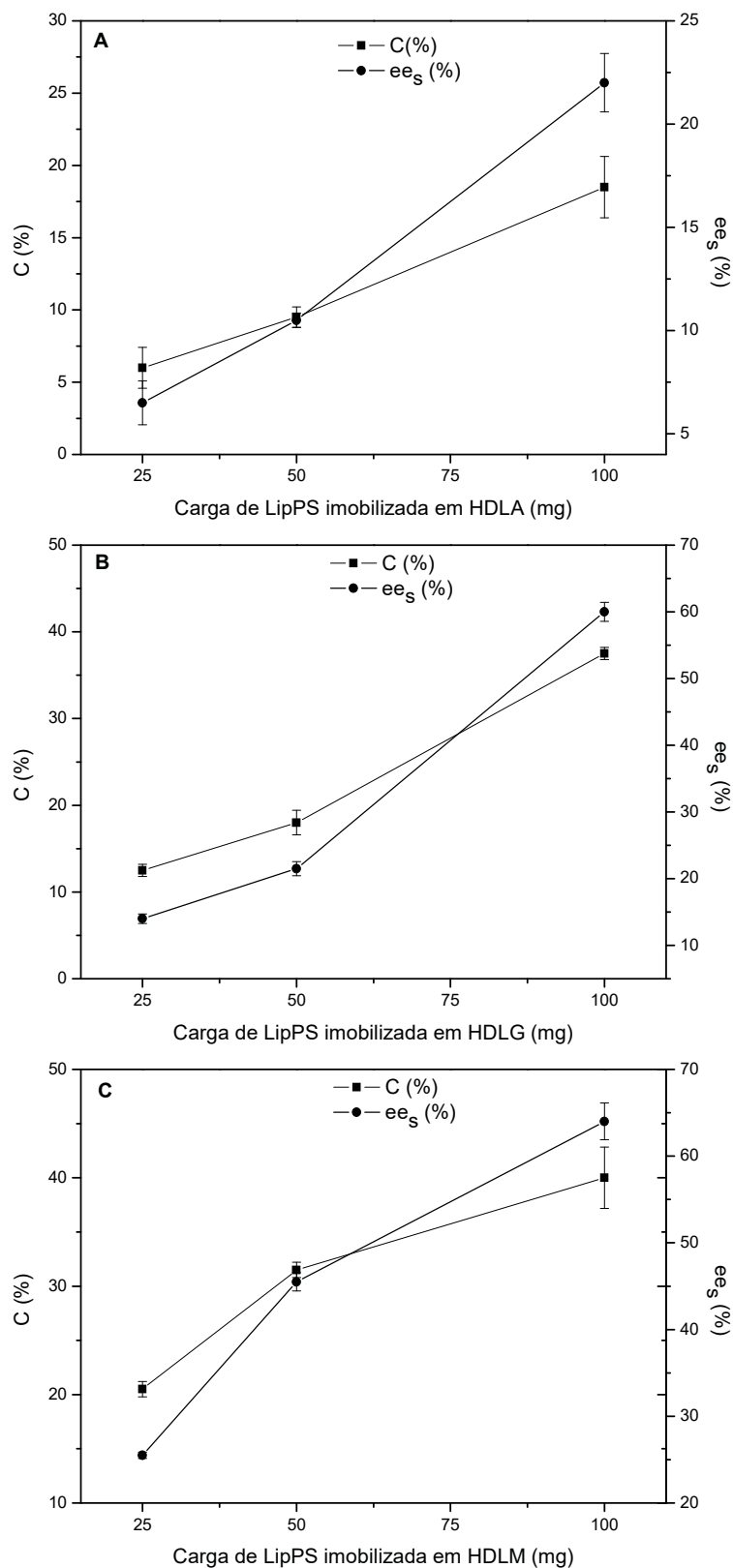




**Figura 38:** Curvas cinéticas da reação do (R,S)-1-feniletanol por LipPS imobilizada por adsorção em HDL em diferentes tampões e água. Condições: (R,S) -1-feniletanol (0,5 mmol), acetato de vinila (0,5 mmol), *n*-hexano (5 mL), 24 h, 35 ° C e 25 mg de LipPS para 50 mg de HDL. [(■) água, (●) GlyGly e (▲) MOPS].

#### 5.3.2.2 Derivados imobilizados via coprecipitação (HDLcoPS)

Na **Figura 39** pode-se observar que a conversão e o excesso enantiomérico do substrato foram influenciados pela presença dos tampões de preparação da solução enzimática oferecida para a imobilização via coprecipitação. As menores conversões foram observadas no preparado utilizando água no processo de imobilização (6-18%) com  $ee_s$  variando de 6-22% e as maiores conversões foram obtidas para o tampão MOPS (21-39%) com  $ee_s$  variando de 25-64%. As conversões do imobilizado em tampão GlyGly variou de 12-37% com  $ee_s$  de 14-60%. As conversões aumentaram à medida que a carga de LipPS também aumentou (**Figura 39**).

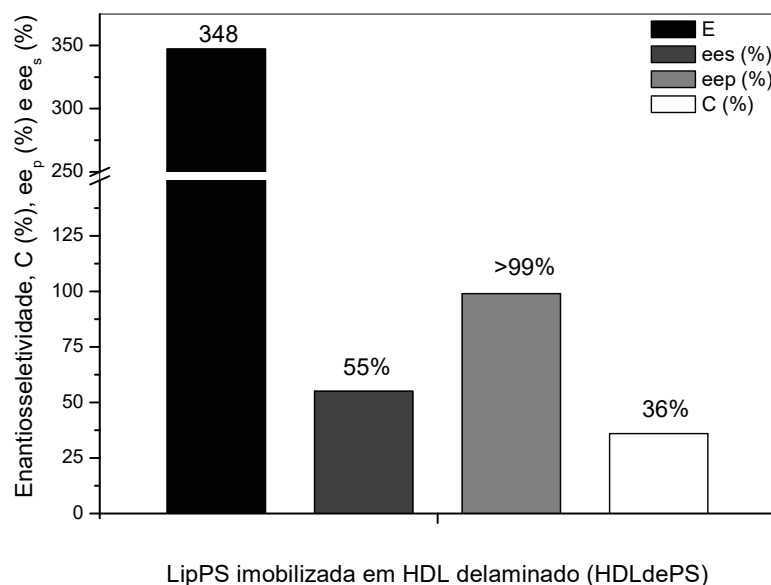


**Figura 39:** Influência da carga de LipPS immobilizada no HDL pelo método coprecipitação (HDLcoPS) na resolução enzimática do (*R,S*)-1-feniletanol com acetato de vinila. (A) LipPS immobilizada em HDL na presença de água; (B) LipPS immobilizada em HDL GlyGly e (C) LipPS immobilizada em HDL MOPS. Condições: (*R,S*)-1-feniletanol (0,5 mmol), acetato de vinila (0,5 mmol), *n*-hexano (5 mL), 24 h, 35 ° C. [(■) conversão (%) e (●) excesso enantiomérico do substrato (%)].

Todos os derivados imobilizados apresentaram um  $ee_p > 99\%$ , resultando em valores de coeficiente de enantiosseletividade superiores a 200, sendo a enantiopreferência da enzima para o (*R*)-álcool.

### 5.3.2.3 Derivados imobilizados via delaminação (HDLdePS)

O processo de imobilização da LipPS no HDL delaminado ocorreu na presença do solvente butanol. Para tanto, 500 mg de LipPS foram adicionados a solução de butanol contendo 500 mg do HDL delaminado. Em seguida, a mistura foi incubada por 24 h. A **Figura 40** mostra os resultados obtidos na resolução do (*R,S*)-1-feniletanol com 50 mg do derivado imobilizado.



**Figura 40:** Resolução do (*R,S*)-1-feniletanol por LipPS imobilizada em HDL pelo método de delaminação.

Dados: (*R,S*)-1-feniletanol (0,5 mmol), acetato de vinila (0,5 mmol), *n*-hexano (5 mL), 24 h, 35 ° C e 50 mg do derivado imobilizado.

Obteve-se uma conversão de 36%, com excesso enantiomérico do substrato ( $ee_s$ ) de 55 % e excesso enantiomérico do produto ( $ee_p$ ) maior que 99 % e enantiosseletividade E maiores que 200 (**Figura 40**).

### 5.3.3 Reuso dos derivados imobilizados

O processo de reuso foi realizado utilizando os derivados imobilizados recuperados após um ciclo de reação para resolução do álcool racêmico descritos. Após o primeiro ciclo de reação, os imobilizados foram lavados diversas vezes com *n*-hexano e separados por centrifugação a 8000 rpm por 5 min. Em seguida, foram liofilizados por 24 h e reutilizados em um novo ciclo de reação para a resolução do (*R,S*)-1-feniletanol (**Tabela 4**).

**Tabela 4:** Reuso dos derivados imobilizados na resolução enzimática do (*R,S*)-1-feniletanol.

Derivados Imobilizados	1º ciclo		2º ciclo	
	C (%)	ee <sub>s</sub> (%)	C (%)	ee <sub>s</sub> (%)
*HDLadPS em água	50	100	nd	nd
*HDLadPS em GlyGly	50	100	50	100
*HDLadPS em MOPS	50	100	30	43
*HDLadPS em água	50	100	nd	nd
*HDLcoPS em Gly-Gy	37	61	13	12
*HDLcoPS em MOPS	39	72	20	25
**HDLdePS em butabol	36	55	30	45

Condições: (*R,S*)-1-feniletanol (0,5 mmol), acetato de vinila (0,5 mmol), *n*-hexano (5 mL), 24 h, 35 °C e 50 mg do imobilizado. \* 100 mg de LipPS para 50 mg HDL. \*\* 50 mg de LipPS para 50 mg HDL. nd = não detectado

Conforme mostrado na **Tabela 4**, a conversão obtida no segundo ciclo de reação do (*R,S*)-1-feniletanol catalisada pelo derivado imobilizado (HDLadPS) em tampão GlyGly permaneceu 50% em 24 h de reação. Para o derivado imobilizado em tampão MOPS a conversão diminuiu para 30% no segundo ciclo.

Para os derivados imobilizados via coprecipitação (HDLcoPS), a conversão em *R*-éster diminuiu ligeiramente para os imobilizados no tampão GlyGly (C=13%), sendo que para os imobilizados em tampão MOPS obteve-se uma conversão de 20% no segundo ciclo de reação. Neste caso, a imobilização pelo método de coprecipitação direta da LipPS na síntese do HDL causou diminuição da atividade com a reutilização sucessiva. Por tanto, deve-se levar em consideração a lixiviação da lipase no suporte ou uma provável mudança orientacional e conformacional

(imobilização realizada durante a síntese do suporte), podendo dificultar o acesso do substrato ao centro catalítico da enzima, ocasionando a diminuição da sua atividade.

A conversão obtida do derivado imobilizado pelo método de delaminação (HDLdePS) no segundo ciclo da reação foi de 30%, porém não foi possível sua comparação com os demais imobilizados, uma vez que o seu processo de imobilização não ocorreu em solução tampão, mas em meio orgânico (butanol). Dessa forma, ao reutilizar esse derivado imobilizado observou-se uma leve diminuição na conversão (36% para 30%) em relação aos outros imobilizados, mesmo sabendo que as lipases podem ser altamente afetadas pelo solvente orgânico, tanto durante a imobilização quanto ao longo de todo o processo.

Em todos os sistemas (coprecipitação, adsorção e delaminação) foi alcançado um  $e_p > 99$  e enantiosseletividade (E) maiores que 200 no segundo ciclo de utilização dos derivados.

Os derivados imobilizados preparados em água não apresentaram atividade frente a resolução do álcool racêmico no segundo ciclo de reuso.

## 6 CONCLUSÕES

Neste estudo, foram sintetizados os suportes HDL para a imobilização da lipase de *Pseudomonas cepacia* (LipPS). A lipase foi imobilizada por três métodos diferentes (coprecipitação, adsorção e delaminação) e aplicada na resolução do (*R,S*)-1-feniletanol com acetato de vinila.

Observou-se o sucesso no preparo do suporte HDL Zn<sub>2</sub>Al-Cl sintetizado por coprecipitação direta e dos derivados imobilizados (HDLadPS, HDLcoPS e HDLdePS), via análise de DRX, cujos valores de espaçamento foram condizentes com a literatura. As demais técnicas (FTIR, TGA/DTG e MEV/EDS) confirmaram que a presença da enzima e os tampões (GlyGly e MOPS) não ocasionaram mudança na morfologia e estrutura do suporte. A análise elementar de CHN nos imobilizados comprovou quantitativamente uma baixa quantidade de nitrogênio nas amostras.

A intercalação do ânion DS<sup>-</sup> foi comprovada pela análise de DRX com um aumento da distância interlamelar de 7,78 Å para 25,61 Å que comprovou a intercalação desse ânion. Foi obtido um índice de delaminação de 48% do em butanol e a imobilização da LipPS nesse material apresentou uma boa conversão em (*R*)-éster de 36% em 24 h de reação.

Dentre as três possibilidades de imobilização, um melhor desempenho foi obtido com o derivado imobilizado em tampão GlyGly via adsorção, com 25 mg de lipase imobilizada em HDL alcançou uma conversão de 50% em apenas 3 h de reação. Para os imobilizados via coprecipitação, observou-se uma melhora na conversão para o imobilizado em tampão MOPS, com 100 mg de lipase alcançou uma conversão de 39%, em 24 h de reação.

No segundo ciclo de reação a maior conversão foi obtida com o imobilizado (HDLadPS) em tampão GlyGly que permaneceu 50% em 24 h de reação. O imobilizado via coprecipitação (HDLcoPS) em tampão MOPS apresentou uma conversão de 20% e o imobilizado via delaminação (HDLdePS) uma conversão de 30% no segundo reuso.

Em resumo, os HDL apresentam grandes vantagens como suporte para a imobilização da LipPS e oferecem um potencial industrial para a aplicação na resolução do (*R,S*)-1-feniletanol.

## 7 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho abrem perspectivas de utilização da lipase PS imobilizada em HDL em diferentes métodos de imobilização. Portanto, sugerem-se como estudos futuros:

- Otimização das proporções dos derivados imobilizados nos diferentes métodos de imobilização (HDLadPS, HDLcoPS e HDLdePS) para aplicar na resolução de outros álcoois secundários;
- Preparação de um suporte HDL delaminado em água (natureza hidrofílica), com o intuito de aumentar a estabilidade da lipase;
- Otimização do meio reacional: relação álcool racêmico e doador acila, temperatura, solvente, massa do derivado imobilizado.



## 8 REFERÊNCIAS

ADACHI-PAGANO, M.; FORANO, C.; BESSE, J.P. Delamination of layered double hydroxides by use of surfactants. **Chemical Communications**, p. 91–92, 2000.

ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6406, 2013.

AHMED, M.; KELLY, T.; GHANEM, A. Applications of enzymatic and non-enzymatic methods to access enantiomerically pure compounds using kinetic resolution and racemisation. **Tetrahedron**, v. 68, p. 6781–802, 2012.

BALCOMB, B.; SINGH, M.; SINGH, S. Synthesis and Characterization of Layered Double Hydroxides and Their Potential as Nonviral Gene Delivery Vehicles. **Chemistry Open**, v. 4, p. 137–145, 2015.

BENAISSI, K.; HÉLAINE, V.; PRÉVOT, V.; FORANO, C.; HECQUET, L. Efficient immobilization of yeast transketolase on layered double hydroxides and application for ketose synthesis. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, p.1497–1509, 2011.

BORNSCHEUER, T.; KAZLAUSKAS J. **Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations**. 2 ed. Wiley-VCH, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRADY, L.; BRZOZOWSKI, A. M.; DEREWENDA, Z. S.; DODSON, E.; DODSON, G.; TOLLEY, S. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v. 343, p. 767–770, 1990.

BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1639–1650, 2009.

Bruna, F., PEREIRA, M.G., POLIZELI, M.D.L.T.M., Valim, J.B. Starch biocatalyst based on  $\alpha$ -amylase-mg/al-layered double hydroxide nanohybrids. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 7, p. 18832–18842, 2015.

CAVANI, F.; TRIFIRÒ, F.; VACCARI, A. Hydrotalcite-type anionic clays: Preparation, properties and applications. **Catalysis Today**, v. 11, p. 173–301, 1991.

CHARRADI, K.; FORANO, C.; PREVOT, V.; MADERN, D.; AMARA, A.B.H.; MOUSTY, C. Characterization of hemoglobin immobilized in MgAl-layered double hydroxides by the coprecipitation method. **Langmuir**, v. 26, p. 9997–10004, 2010.

CHEN, C.; FUJIMOTO, Y.; GIRDAUKAS, G. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolution of enantiomers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, p. 7294-7299, 1982

CHO, B. T.; KANG, S. K.; KIM, M. S.; RYU, S. R. Solvent-free reduction of aldehydes and ketones using solid acid-activated sodium borohydride. **Tetrahedron**, v. 62, p. 8164–8168, 2006.

CIPOLATTI, E. P.; SILVA, M. J. A.; KLEIN, M.; FEDDERN, V.; FELTES, M. M. C.; OLIVEIRA, J. V. Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 56–67, 2014.

COLOMBO, K. Compostos lamelares com potencial atividade catalítica em reações de transesterificação metílica de óleo de soja. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação de Engenharia e Ciência dos Materiais, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2017.

COSTA, V.; AMORIM, H. L. N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**, v. 22, p. 863–873, 1999.

COSTANTINO, H.R.; GRIEBENOW, K.; LANGER, R.; KLIBANOV, A.M. On the pH memory of lyophilized compounds containing protein functional groups. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 53, p. 345–348, 1997.

CREPALDI, E. L.; VALIM, J. B. Hidróxidos duplos lamelares: síntese, estrutura, propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 21, p. 300–311, 1998.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, v. 3, p. 1–9, 2013.

DING, S.; SHAN, D.; YAO, W.; XUE, H.; SUN, Y.; COSNIER, S. The unmediated choline sensor based on layered double hydroxides in hydrogen peroxide detection mode. **Science China Chemistry**, v. 52, p. 2281–2286, 2009.

DJEBBI, M. A.; BRAIEK, M.; HIDOURI, S.; NAMOUR, P.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; AMARA, A. B. H. Novel biohybrids of layered double hydroxide and lactate dehydrogenase enzyme: Synthesis, characterization and catalytic activity studies. **Journal of Molecular Structure**. v. 1105, p. 381–388, 2016.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. New York, 2011.

FABER, K.; KROUTIL, W. A Computer Program for the Determination of the Enantioselectivity (E-Value) in the Kinetic Resolution of Enantiomers. **Selectivity**. p. 5–7, 2012.

FAN, G.; LI, F.; EVANS, D. G.; DUAN, X. Catalytic applications of layered double hydroxides: recent advances and perspectives. **Chemical Society Reviews**, v. 43, p. 7040–7066, 2014.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. A.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1808–1825, 2013.

FERNANDEZ-LOPEZ, L.; PEDRERO, S. G.; LOPEZ-CARROBLES, N.; GORINES, B. C.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Effect of protein load on stability of immobilized enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 98, p. 18–25, 2017.

FORANO, C.; GUÉRARD-HÉLAINE, C.; BLAISE, U.; BLAISE, U. Biohybrides enzymes / hydroxydes doubles lamellaires de la biocatalyse à la biodétection. **l'actualité chimique**, v. 395, p. 1-6, 2015.

GAO, Y.; WU, J.; WANG, Q.; WILKIE, C. A.; O'HARE, D. Flame retardant polymer/layered double hydroxide nanocomposites. **Journal of Materials Chemistry**, v. 2, p.10996 - 11016, 2014.

GHANEM, A.; ABOUL-ENEIN, M. N.; EL-AZZOUNY, A.; EL-BEHAIRY, M. F. 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. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 1063–1074, 2010.

GHANEM, A.; SCHURIG, V. Lipase-catalyzed irreversible transesterification of 1-(2-furyl)ethanol using isopropenyl acetate. **Chirality**, v. 13, p. 118–123, 2001.

GHOLAMHOSE, A.; SHAHOUEHI, B.; SHARIFI-FA, F. Inhibitory Effect of Some Plant Extracts on Pancreatic Lipase. **International Journal of Pharmacology**, v. 6, p. 18–24, 2010.

GOTOR-FERNANDEZ, V.; BUSTO, E.; GOTOR, V. *Candida antarctica* Lipase B: An Ideal Biocatalyst for the Preparation of Nitrogenated Organic Compounds. **Advanced Synthesis Catalysis**, v. 348, p. 797 – 812, 2006.

GUPTA, S.; BHATTACHARYA, A.; MURTHY, C. N. Tune to immobilize lipases on polymer membranes: Techniques, factors and prospects. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 171–190, 2013.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 453–468, 2009.

HALMA, M.; MOUSTY, C.; FORANO, C.; SANCELME, M.; BESSE-HOGGAN, P.; PREVOT, V. Bacteria encapsulated in layered double hydroxides: Towards an efficient bionanohybrid for pollutant degradation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 126, p. 344–350, 2015.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 453–468, 2009.

HE, J.; WEI, M.; LI, B.; KANG, Y.; EVANS, D.G.; DUAN, X. **Preparation of layered double hydroxides. Layered Double Hydroxides**. v. 119, p. 89–119, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2006.

HIBINO, T.; JONES, W. New approach to the delamination of layered double

hydroxides. **Journal of Materials Chemistry**, v. 11, p. 1321–1323, 2001.

HIBINO, T.; KOBAYASHI, M. Delamination of layered double hydroxides in water. **Journal of Materials Chemistry**, v. 15, p. 653, 2005.

JAVED, S.; AZEEM, F.; HUSSAIN, S.; RASUL, I.; SIDDIQUE, M. H.; RIAZ, M. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, 2017.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Adsorption**. v. 20, p. 801–821, 2014.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**. v. 47, p. 555–569, 2012.

KAZLAUSKAS, R. J.; WEISSFLOCH, A.; RAPPAPORT, A. T.; CUCCIA, L. A. A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*. **Journal of Organic Chemistry**. v. 56, p. 2656–2665, 1991.

KURA, A.U.; HUSSEIN, M.Z.; FAKURAZI, S.; ARULSELVAN, P. Layered double hydroxide nanocomposite for drug delivery systems; bio-distribution, toxicity and drug activity enhancement. **Chemistry Central journal**, v. 8, p. 47, 2014.

LI, N.; HU, S.; FENG, G. Resolution of 2-nitroalcohols by *Burkholderia Cepacia* lipase-catalyzed enantioselective acylation. **Biotechnology Letters**, v. 34, p. 153–158, 2012.

MANOEL, E. A.; RIBEIRO, M. F. P.; SANTOS, J. C. S.; COELHO, M. A. Z.; SIMAS, A. B. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. 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, p. 1557–1564, 2015.

MANTOVANI, K. M. Preparação de sólidos por meio da imobilização de metaloporfirinas em hidróxidos duplos lamelares (HDL): estudo sistemático da influência da composição do HDL nos processos de imobilização e na atividade catalítica. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2015.

MARANGONI, R. Materiais multifuncionais obtidos a partir da intercalação de corantes aniônicos em hidróxidos duplos e hidroxissais lamelares e dispersos em polímeros. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2009.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 40, p. 1451–1463, 2007.

MELAIS, N.; ARIBI-ZOUIOUECHE, L.; Riant, O. The effect of the migrating group structure on enantioselectivity in lipase-catalyzed kinetic resolution of 1-phenylethanol. **Comptes Rendus Chimie**. v. 19, p. 971–977, 2016.

MURTY, V. R.; BHAT, J.; MUNISWARAN, P. K. A. Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: A review. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. v. 7, p. 57–66, 2002.

NAKAYAMA, H.; WADA, N.; TSUHAKO, M. Intercalation of amino acids and peptides into Mg-Al layered double hydroxide by reconstruction method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, p. 469–478, 2004.

NEWMAN, S.P.; JONES, W. Synthesis, characterization and applications of layered double hydroxides containing organic guests. **New Journal of Chemistry**, v. 22, p. 105–115, 1998.

NING, A.; ZHOU, C. H.; ZHUANG, X. Y.; TONG, D. S.; YU, W. H. Immobilization of enzymes on clay minerals for biocatalysts and biosensors. **Applied Clay Science**. v. 114, p. 283–296, 2015.

NOINVILLE, S.; REVAULT, M.; BARON, M. H.; TISS, A.; YAPOUDJIAN, S.; IVANOVA, M. Conformational changes and orientation of Humicola lanuginosa lipase on a solid hydrophobic surface: an in situ interface Fourier transform infrared-attenuated total reflection study. **Biophysical journal**. v. 82, p. 2709–2719, 2002.

OCCELLI, M. L.; ROBSON, H. E. **Expanded Clays and Other Microporous Solids**. Boston, MA: Springer US; 1992.

OMORI, A.T.; PORTAS, V.B.; OLIVEIRA, C. S. Redução enzimática do 4-(dimetilamino)benzaldeído com pedaços de cenoura (*Daucus carota*): um experimento simples na compreensão da biocatálise. **Química Nova**, v. 35, p. 435–437, 2012.

PURI, M.; BARROW, C. J.; VERMA, M. L. Enzyme immobilization on nanomaterials for biofuel production. **Trends in Biotechnology**, v. 31, p. 215–216, 2013.

RAHMANA, M. B. A.; OTHMANB, S. S.; YUNUSB, N. M. Selectivity of candida rugosa lipase onto layered double hydroxides as catalyst in synthesis. **Jurnal Teknologi**, v. 6, p. 111-115, 2016.

REICHLER, W. T. Synthesis of anionic clay minerals (mixed metal hydroxides, hydrotalcite). **Solid State Ionics**, v. 22, p.135–141, 1986.

RIVES, V. Layered double hydroxides: present and future. **Applied Clay Science**, v. 22, p. 75–76, 2002.

ROY, A.; FORANO, C.; MALKI, K. E. L.; BESSE, J. P. **Anionic Clays: Trends in Pillaring Chemistry**. Expand. Clays Other Microporous Solids, Boston, MA: Springer US; p. 108–169, 1992.

SANTOS, R. M. M. Materiais derivados de hidróxidos duplos lamelares: síntese, caracterização e aplicação em adsorção e processos avançados de oxidação. Dissertação de mestrado, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2016.

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 489–511, 2012.

SECUNDO, F. Conformational changes of enzymes upon immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6250, 2013.

SHELDON, R. A. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, p. 1289-1307, 2007.

SHOW, P.L.; TAN, C.P.; SHAMSUL ANUAR, M.; ARIFF, A.; YUSOF, Y.A.; CHEN, S.K.; LING, T.C. Extractive fermentation for improved production and recovery of lipase derived from *Burkholderia cepacia* using a thermoseparating polymer in aqueous two-phase systems. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 226–233, 2012.

SHRIVER, D. F.; DUWARD, F.; ATKINS, P. W.; PETER, W. **Química inorgânica**, Bookman, 2008.

SIH, C.J.; WU, S.H. Resolution of enantiomers via biocatalysis. **Topics in Stereochemistry**, v. 19, p. 63–125, 1989.

SILVA, A. L. P. Preparação de sílicas organofuncionalizadas para a imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia*. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2012.

SILVERMAN, R. B. **Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions**, Revised Edition. Elsevier Science, 2002.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Grupo Gen:LTC; 2010.

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

SUAN, C. L.; SARMIDI, M. R. Immobilised lipase-catalysed resolution of (R,S)-1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 28, p. 111–119, 2004.

TASNÁDI, G.; FORRÓ, E.; FÜLÖP, F. *Burkholderia cepacia* lipase is an excellent enzyme for the enantioselective hydrolysis of  $\beta$ -heteroaryl- $\beta$ -amino esters. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, p. 1771–1777, 2009.

THOMAS, A.; ALLOUCHE, M.; BASYN, F.; BRASSEUR, R.; KERFELEC, B. Role of the lid hydrophobicity pattern in pancreatic lipase activity. **Journal of biological chemistry**, v. 280, p. 40074–40083, 2005.



TOUISNI, N.; CHARMANTRAY, F.; HELAINE, V.; FORANO, C.; HECQUET, L.; MOUSTY, C. Optimized immobilization of transketolase from *E. coli* in MgAl-layered double hydroxides. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 112, p. 452–459, 2013.

VERMA, M. L.; PURI, M.; BARROW, C. J. Recent trends in nanomaterials immobilised enzymes for biofuel production. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.36, p. 108–119, 2016.

VINU, A.; MIYAHARA, M.; ARIGA, K. Biomaterial immobilization in nanoporous carbon molecular sieves: Influence of solution pH, pore volume, and pore diameter. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, p. 6436–6441, 2005.

WANG, M.; BAO, W.; WANG, J.; WANG, K.; XU, J.; CHEN, H. A green approach to the synthesis of novel “Desert rose stone”-like nanobiocatalytic system with excellent enzyme activity and stability. **Scientific reports**, v. 4, p. 1–8, 2014.

WANG, M.; HUANG, S. W.; XU, D.; BAO, W. J.; XIA, X. H. Ultrahigh Enzyme Activity Assembled in Layered Double Hydroxides via Mg<sup>2+</sup>-Allosteric Effector. **Analytical Chemistry**, v. 87, p. 5831–5836, 2015.

WYPYCH, F.; SATYANARAYANA, K. G. **Clay surfaces: fundamentals and applications**. Elsevier Academic Press, 2004.

YANG, Z.; NIU, X.; FANG, X.; CHEN, G.; ZHANG, H.; YUE, H.; WANG, L.; ZHAO, D.; WANG, Z. Enantioselective esterification of ibuprofen under microwave irradiation. **Molecules**. v. 18, p. 5472-5481, 2013.

YU, J.; WANG, Q.; O'HARE, D.; SUN, L. Preparation of two dimensional layered double hydroxide nanosheets and their applications. **Chemical Society Reviews**. v. 46, p. 5950–5974, 2017.

ZHANG, P.; WANG, T.; ZHANG, L.L.; WU, D.; FROST, R.L.; ABELLÓ, S. Immobilization of penicillin G acylase on calcined layered double hydroxides. **Applied Clay Science**, v. 5, p. 257–260, 2015.

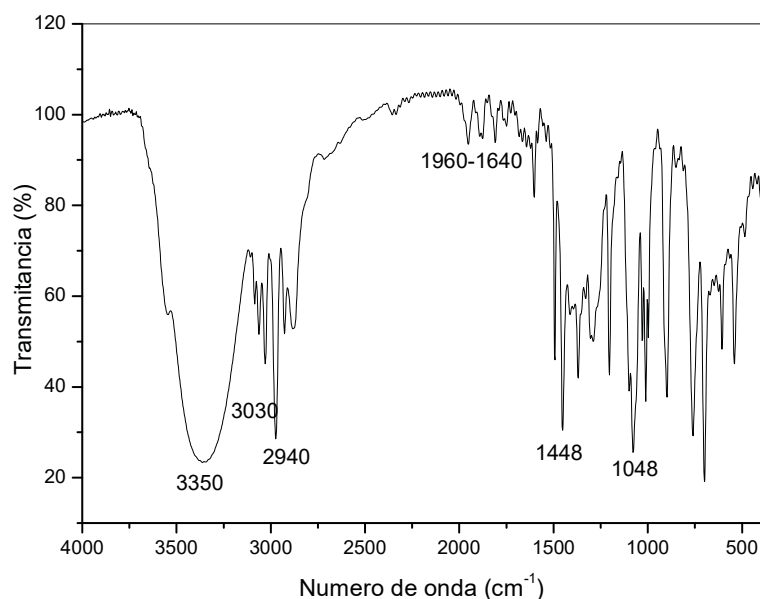


## APÊNDICES

### A. CARACTERIZAÇÃO DO (*R,S*)-1-FENILETANOL: ESPECTROS DE FTIR (a) ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup>H (b).

No espectro de FTIR do do (*R,S*)-1-feniletanol pode-se observar uma banda larga em 3350 cm<sup>-1</sup> característica do grupo O-H de alcoóis e a ausência da banda carbonila em (~1700 cm<sup>-1</sup>) presente em todas as acetofenonas. Essa observação confirma a formação do álcool de interesse. Também foram observadas bandas de deformação axial de C-H de aromáticos em 3030 cm<sup>-1</sup> e de metila em 2940 cm<sup>-1</sup>, bandas harmônicas em 1960 – 1640 cm<sup>-1</sup>, bandas de deformação axial de C-O em 1048 cm<sup>-1</sup> e bandas relacionadas a ligação C = C do anel aromático em 1448 cm<sup>-1</sup>.

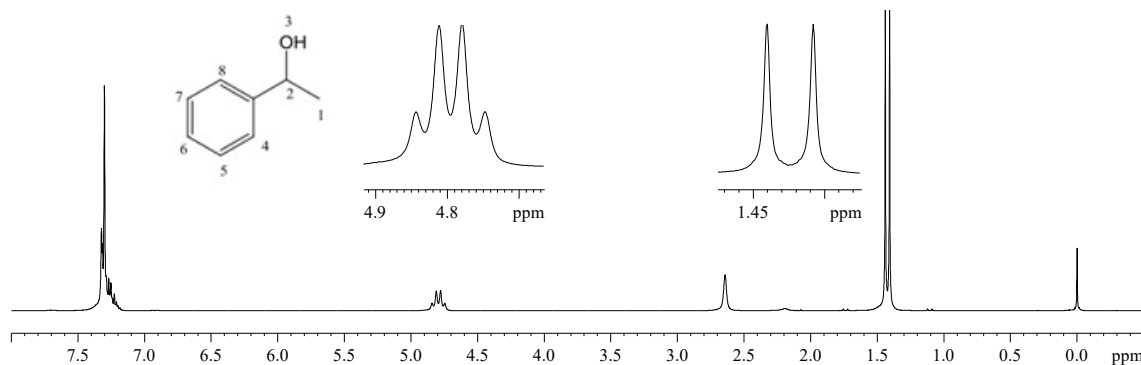
(a)



Uma caracterização mais detalhada do álcool (*R,S*)-1-feniletanol foi obtida através do espectro de RMN de <sup>1</sup>H. Os multipletos na região entre 7,5 – 7,0 ppm (5H) são referentes aos hidrogênios do anel aromático. O quarteto entre 4,9 – 4,7 ppm (H-2) é referente ao hidrogênio ligado ao carbono C-H vizinho à hidroxila. Observa-se também um dubleto entre 1,45 – 1,39 ppm (H -1), referente aos

hidrogênios da metila e também um singlete em 2,7 ppm (H – 3), referente ao H da hidroxila.

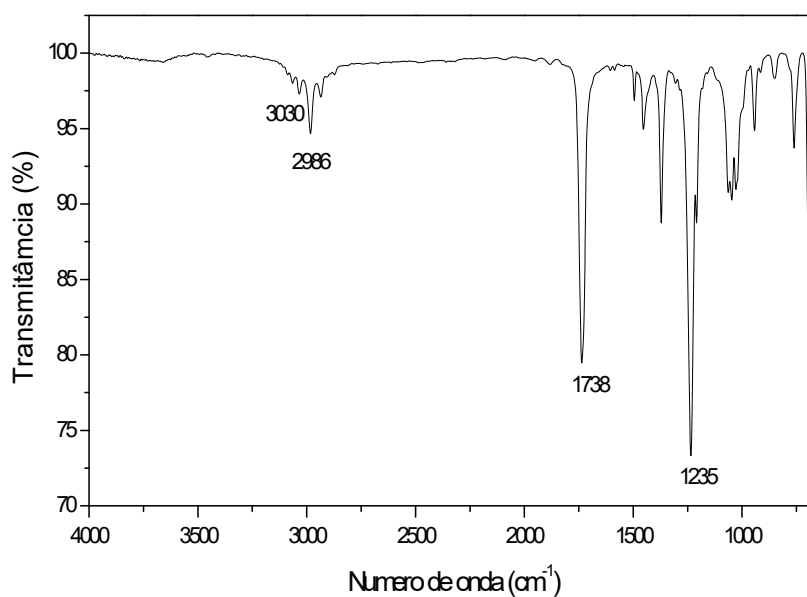
(b)



#### B. CARACTERIZAÇÃO DO (R,S) ACETATO-1-FENILETILA: ESPECTROS DE FTIR (a) ESPECTRO DE RMN $^1\text{H}$ (b).

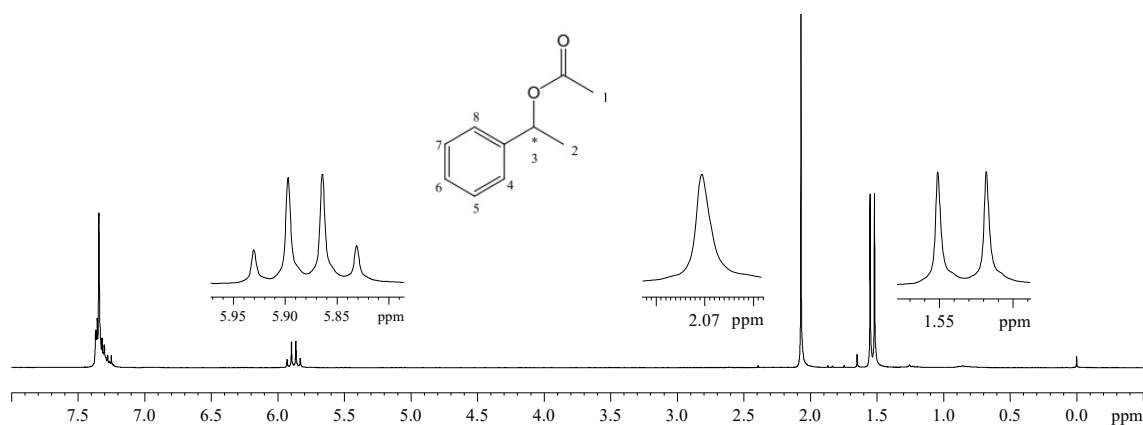
O espectro de FTIR do acetato do (R,S)-1-feniletila, onde se apresentam bandas características para este composto. A banda em  $1728\text{ cm}^{-1}$  refere-se ao grupo carbonila do éster. A ausência de uma banda larga na região de  $3360\text{ cm}^{-1}$  também confirma a formação do éster, pois mostra que não há mais o grupo O–H na molécula. Pode-se observar também bandas próximas a  $2976\text{ cm}^{-1}$ , referentes às vibrações de estiramento das ligações C–H e também uma banda em  $1238\text{ cm}^{-1}$  referente ao grupamento C–O.

(a)



No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do (R,S)-acetato de 1-feniletila todos os picos foram analisados e estão em concordância com a estrutura proposta. Em 7,2 – 7,5 ppm aparece um multipletto referente aos hidrogênios do anel aromático (5H). O quarteto em 5,95 – 5,80 ppm foi atribuído ao H-3 da molécula. Observa-se também um singlete em 2,07 ppm, que é referente aos hidrogênios da metila vizinha à carbonila (H-1) e um dubleto em 1,57 – 1,50 ppm, que corresponde aos hidrogênios do outro grupo metila (H-2).

(b)



### C. CROMATOGRAFIA PARA A IDENTIFICAÇÃO DOS PADRÕES RACÊMICOS

Uma análise em cromatografia gasosa com fase estacionária quiral foi realizada para determinar o tempo de retenção do (*R,S*)-1-feniletanol e acetato do (*R,S*)-1-feniletila. O cromatograma mostra a sobreposição do padrão racêmico do (*R,S*)-1-feniletanol (azul) com o acetato do (*R,S*)-1-fenietila (vermelho).

Observa-se que o tempo de retenção entre 17,65 – 19,23 min é referente ao sinal do éster racêmico e o tempo de retenção entre 19,4 – 20,90 min é referente ao álcool racêmico.

Condições de análises: Injeção = 230 °C, Detector = 230 °C. Programação: isoterma de 100 °C, split 1:60, pressão do H<sub>2</sub> = 120 kPa.

