

Dedicatória

Aos meus amigos, companheiros
que juntos me trouxeram ao mundo...
Aos meus queridos pais, Jorge e Rosa, amo vocês!!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido saúde e perseverança para superar as dificuldades e realizar todo o trabalho.

Aos meus orientadores, Profa. Maria Alice Zarur Coelho e Profa. Denise Maria Guimarães Freire, pela orientação dedicada neste trabalho, pelas oportunidades, idéias e estímulo que me proporcionaram. Por tudo que aprendi, e ainda, pelo que vou aprender sou muito grata a vocês.

Ao Prof. Alessandro Bolis Costa Simas (NPPN) pela colaboração neste trabalho, pela livre entrada e permanência em seu laboratório e, sobretudo, pela livre utilização de seus reagentes e colunas para o HPLC. A sua contribuição foi muito além do que uma simples colaboração.

Aos meus pais, Jorge e Rosa, e irmã, Erika, pelo amor, carinho, compreensão, apoio, paciência incondicionais.

Em especial, a Aline Gomes Cunha pela mão amiga, por ter se tornado uma irmã, pela participação ativa no trabalho, pelas inúmeras horas de experimentos e injeções no HPLC, pela ajuda principalmente no início dos experimentos e pelo carinho e conselhos nas horas vagas. Aprendi muito com você!

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Microbiana e do Laboratório de Microbiologia Molecular e de Proteínas, o “lambim” que além da colaboração, fizeram do ambiente de trabalho um lugar mais divertido e familiar.

Aos meus queridos companheiros Marcelo Holanda, em especial pela paciência, pelo carinho, pelas alegrias nos tempos vagos; Luiz Fernando Tavares, pelo ombro amigo de sempre; Sérgio Cantum, por toda atenção e carinho; a Jaqueline Oliveira, pelo carinho, atenção e pelas caronas à UFRJ, rs; Paty, Rafael Andrade, Joab, Lívia, Mateus Godoy, Carol, Melissa Gutarra, Val, Lu e Bruno por sempre estarem dispostos a me ajudar. E ainda, a Aline Fernandes, pelas ajudas na concessão de materiais e por sempre estar disposta a ajudar.

Aos professores do laboratório Lammp, Rodrigo, Bianca e Marcia pela livre entrada e permanência em seu laboratório durante todo o período do curso.

Aos amigos do laboratório de Enzimologia (EQ), em especial ao amigo Bernardo, pelas dicas no ramo profissional. Aos amigos do curso de mestrado Roberta Giovanini, Tiago, Gisele Costa, Diogo Simas e Erika Aguilheiras, por todo carinho e pela nossa eterna amizade.

Aos amigos Suema Branco, Roberto Abrante, Valéria, amigos de graduação sempre presentes na minha vida. Obrigada por compreender a minha ausência no período do mestrado.

Aos verdadeiros amigos que estiveram presentes nos bons e maus momentos em toda a minha vida e, como não poderia deixar de ser, também nestes últimos dois anos. Àqueles que conheci durante o período do mestrado... Ah! Se não fosse vocês...

A Secretaria da Escola de Química, principalmente Roselee, por sempre estar alegre e pronta a ajudar a nós, alunos da pós-graduação e coordenação do curso de pós-graduação.

A CAPES pela bolsa de mestrado no primeiro ano e a FAPERJ pela bolsa Nota 10 no último ano.

A todas as demais pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!!

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto”

Albert Einstein

Resumo da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química/UFRJ como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Evelin Andrade Manoel

Fevereiro/2011

Orientadores : Prof.^a Maria Alice Zarur Coelho, D. Sc. (EQ-UFRJ)

Prof.^a Denise Maria Guimarães Freire, D.Sc (IQ-UFRJ)

Lipases são frequentemente usadas em processos de biotransformação industrial e se destacam, dentre inúmeros fatores, pela estabilidade em solventes orgânicos, não exigência de cofatores na reação e pela capacidade de discriminar entre grupos enantiotópicos e racematos de enantiômeros, revelando uma alta regio-, chemo- e estereosseletividade. Dentro deste contexto, derivados de *mio*-inositol foram utilizados como material de partida (substrato) nas reações visando à resolução racêmica catalisada por lipases. O interesse na obtenção de derivados de *mio*-inositois enantiomericamente puros, deve-se a grande versatilidade em síntese química, principalmente na síntese de novas drogas e na importância da sinalização celular como segundo mensageiro. O presente trabalho empregou 15 diferentes lipases comerciais em um *screening* com vistas à obtenção da resolução cinética dos racematos, de cada um dos três derivados de *mio*-inositois: (\pm)-1,4,5,6-tetra-*O*-benzil-*mio*-inositol (*rac*-1); (\pm)-1,4,5,6-tetra-*O*-alil-*mio*-inositol (*rac*-2) e (\pm)-1,3,4-tri-*O*-benzil-*mio*-inositol (*rac*-3) previamente sintetizados no Lab. Roderick Barnes, NPPN-UFRJ. A resolução de *rac*-3 foi obtida com êxito quando as lipases de *Candida antarctica* (CALB) e a de *Pseudomonas cepacia*, imobilizada em dois diferentes suportes, foram empregadas nas reações. A influência do solvente e do agente acilante mostraram afetar grandemente a enantiosseletividade na reação. Os melhores resultados com a lipase CALB (112h) foram obtidos quando acetato de vinila foi utilizado em sistema livre de solvente, com 43,5% de conversão, 97,7% de ee_p e $E > 200$. Os melhores resultados com PSC amano II (96h) foram obtidos quando TBME foi utilizado como solvente na reação com 49,9% de conversão, ee_p de 99% e $E > 200$. Já para PS-IM (48h), os melhores resultados foram obtidos quando acetato de vinila, em sistema livre de solvente, foi empregado obtendo 48% de conversão, ee_p de 98% e $E > 200$. A técnica de planejamento experimental foi empregada e as condições ótimas obtidas pela equação modelo foram $T = 30^\circ\text{C}$, $S = 2 \text{ mg/mL}$, $\text{H}_2\text{O} = 0\% \text{ m/v}$ e $E = 40 \text{ mg/mL}$. Com o uso do planejamento experimental foi possível reduzir o tempo de reação para 24h, obtendo valores próximos ao máximo de conversão e excesso enantiomérico. Os resultados obtidos com a resolução cinética de *rac*-3 mostraram a formação de um produto inédito, L-1-*O*-acetil-2,3-*O*-ciclohexilideno-*mio*-inositol com 48 % conversão e ee_p de 98%.

Abstract of a Final Project presented to EQ/ UFRJ as partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

ABSTRACT

Lipases are frequently used in industrial biotransformation processes and are distinguished, amongst several factors, for the stability in organic solvents, no requirement for cofactors in the reaction, for the ability of distinguish between enantiotopic group and racemates of enantiomers, revealing high regio-chemo stereoselectivity, and also presenting high specificity on different substrates. In this context, *mio*-inositol derivatives were used as starting material (substrate) in racemic resolution catalyzed by lipases. The interest in the attainment of enantiomerically pure *mio*-inositol derivatives comes from their versatility in chemical synthesis, primarily in the synthesis of new drugs and in the cellular signalization as second messenger. The present work used 15 different commercial lipases in a screening to each one of the three *mio*-inositol derivatives (\pm)-1,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*mio*-inositol (*rac*-1); (\pm)-1,4,5,6-tetra-*O*-allyl-*mio*-inositol (*rac*-2) e (\pm)-1,3,4-tri-*O*-benzyl-*mio*-inositol (*rac*-3) previously synthesized in Lab. Roderick Barnes, NPPN-UFRJ. The resolution of *rac*-3 was successfully achieved when *Candida antarctica* Lipase B (CALB) and *Pseudomonas cepacia* lipase, immobilized in two different supports, were used in the reaction. The influence of both the solvent and the acyl donor strongly affected the reaction's enantioselectivity. The best results obtained with CALB (112h) were when vinyl acetate was used in a solvent free system, with 43,5% conversion and 97,7% ee_p e $E > 200$. The best results with PSC amano II (96h) were when TBME was used as solvent in the reaction with 49,9% conversion and ee_p de 99% e $E > 200$. Finally for PS-IM (48h), the best results were obtained when vinyl acetate was used in solvent free system, obtaining 48% conversion, ee_p de 98% and $E > 200$. The Experimental design was used and the optimal conditions obtained for the model equation were $T = 30^\circ\text{C}$, $S = 2 \text{ mg/mL}$, $\text{H}_2\text{O} = 0\% \text{ m/v}$ and $E = 40 \text{ mg/mL}$. With the use of the Experimental design was possible to reduce the time of reaction to 24h, obtaining values similar to the highest conversion and enantiomeric excess. The results obtained with the kinetic resolution of *rac*-3 showed the formation of an unreported product, L-1-*O*-acetyl-2,3-*O*-cyclohexylyden-*mio*-inositol with 48 % conversion and ee_p de 98%.

Sumário

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Rotas para a obtenção de compostos enantiomericamente puros | 2 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 3 |
| 3. OBJETIVOS | 5 |
| 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 6 |
| 4.1. Lipases | 6 |
| 4.1.1. Estrutura proteica de Lipases | 8 |
| 4.1.2. Fenômeno da ativação interfacial em Lipases | 9 |
| 4.1.3. Aplicação de lipases em síntese orgânica | 14 |
| 4.1.4. Principais microrganismos utilizados para lipases | 15 |
| 4.2. Aplicação de lipases na síntese de fármacos | 16 |
| 4.3. Lipases de <i>Pseudomonas</i> sp. e <i>Candida</i> sp | 17 |
| 4.4. Mecanismo Cinético de lipases | 20 |
| 4.4.1. Resolução de racematos catalisada por lipases | 23 |
| 4.5. Influência do solvente a da atividade de água | 24 |
| 4.6. Quiralidade e Resolução Cinética de enantiômeros | 30 |
| 4.7. Inositóis | 33 |
| 4.8. Síntese de (±)-1,3,4-tri- <i>O</i> -benzil- <i>mio</i> -inositol (<i>rac</i> -3) | 36 |
| 4.9. Otimização do processo utilizando derivados do <i>mio</i> -inositol pela técnica de planejamento experimental | 36 |
| 4.9.1. Testes estatísticos para a verificação da adequação do modelo | 38 |
| 5.0. MATERIAIS E MÉTODOS | 41 |
| 5.1. Síntese dos substratos | 42 |
| 5.2. Acetilação dos substratos sintetizados <i>rac</i> -1, <i>rac</i> -2 e <i>rac</i> -3 | 42 |
| 5.3. Efeito do agente acilante na conversão e na enantiosseletividade | 43 |
| 5.4. Efeito do solvente na conversão e na enantiosseletividade | 44 |
| 5.5. Métodos Analíticos | 44 |
| 5.5.1. Análise por CCF | 44 |
| 5.5.2. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) das reações de acetilação | 45 |
| 5.5.2.1 Análise da conversão | 45 |
| 5.5.2.2 Análise do excesso enantiomérico pelo produto | 47 |
| 5.5.3 Dosagem de atividade hidrolítica por método espectrofotométrico | 48 |
| 5.5.4 Determinação da conversão e do excesso enantiomérico | 49 |
| 5.6. Metodologia do Planejamento Experimental | 49 |
| 5.6.1. Preparação dos solventes | 49 |
| 5.6.2. Reações feitas no Planejamento experimental | 50 |
| 5.6.3. Composto Central | 50 |
| 5.6.4. Análise de Dados | 51 |
| 6.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 52 |
| 6.1. Seleção de biocatalisadores e dos substratos | 52 |
| 6.2. Resolução cinética da acetilação de <i>rac</i> -3 utilizando Novozym 435 | 55 |
| 6.3. Efeito do agente acilante na reação de acetilação de <i>rac</i> -3 catalisado pela Novozym 435 | 59 |
| 6.4. Efeito de diferentes solventes na reação de acetilação de <i>rac</i> -3 catalisados pela Novozym 435 | 61 |
| 6.5. Cinética de acetilação de <i>rac</i> -3 catalisado pelas lipases PSC Amano II e PS-IM | 63 |

| | |
|--|----|
| 6.6. Efeito do agente acilante sobre a reação de acetilação de <i>rac</i> -3 catalisado pelas lipases PS-IM e PSC Amano II | 68 |
| 6.7. Efeito de diferentes solventes na reação de acetilação de <i>rac</i> -3 pelas lipases PS-IM e PSC Amano II | 71 |
| 6.8. Planejamento experimental da reação de acetilação de <i>rac</i> -3 utilizando a lipase PS-IM | 75 |
| 6.8.1. Desenho experimental composto central rotacional (DCCR) | 76 |
| 6.8.1.1. Análise Estatística dos Dados e Validação do modelo sobre a variável de resposta conversão | 77 |
| 6.8.1.1.1. Estudo da conversão na análise da Superfície de Resposta | 83 |
| 6.8.1.2. A Análise da variável de resposta: excesso enantiomérico pelo produto (ee_p) | 84 |
| 6.8.1.2.1. Estudo da da razão enantiomérica (E) na análise da Superfície de Resposta | 89 |
| 6.8.1.3. Obtenção dos valores ótimos para o planejamento | 91 |
| 7.0 CONCLUSÃO | 94 |
| 8.0 PERSPECTIVAS FUTURAS | 95 |
| 9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 96 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Métodos para obtenção de compostos enantiomericamente puros (Modificado de GHANEM et al., 2004). | 2 |
| Figura 2. Reação de hidrólise catalisada por lipases. | 6 |
| Figura 3. Reações catalisadas por lipase. (Modificado de GOTOR et al., 2006 por CUNHA, 2009). | 8 |
| Figura 4. Modelo estrutural de α/β hidrolases (POUDEROYEN et al., 2001). | 9 |
| Figura 5. Conformações tampa fechada (azul) e tampa aberta (amarelo) em várias lipases. Reproduzido de ALOULOU et al., (2006). | 10 |
| Figura 6. Representação esquemática do sítio de ligação em diferentes lipases. Observa-se que nos exemplos (b) a (f) apenas um modelo do ácido graxo é mostrado, a espécie álcool foi omitida para maior clareza da representação (Reproduzido de PLEISS et al., 1998). | 13 |
| Figura 7. Enantiomero rápido (a) e enantiomero lento (b)- modelo de sítio ativo por lipases (Reproduzido por KAZLAUSKAS et al. 1991). | 17 |
| Figura 8. Representação da estrutura tridimensional da conformação aberta da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> . As fitas β estão representadas como setas (verde) e as hélices em azul. A posição do íon Ca^{2+} está indicada em amarelo e os resíduos da tríade catalítica estão mostrados em vermelho (SCHRAG et al., 1997). | 18 |
| Figura 9. Estrutura tridimensional da lipase B de <i>Candida antarctica</i> (CALB)- (Reproduzido por Martins 2008). | 19 |
| Figura 10. Esquema mecanístico de reação de lipases. A tríade catalítica e a água são mostradas em preto, os resíduos do buraco do oxianion em azul e o substrato em vermelho. Modificado de JAEGER et al. (1994) por ALMEIDA (2005). | 20 |
| Figura 11. Mecanismo cinético (Ping Pong Bi Bi) de reações com múltiplos produtos e substratos catalisadas por lipases (E: enzima; Es: éster; Al: álcool; Ac: ácido; W: água; i = 1,2,...,I; j=1,2,...,J) (Reproduzido de PAIVA et al., 2000). | 21 |
| Figura 12. Alternativas biossintéticas que podem ser empregadas na resolução enantiomérica de um álcool racêmico através de hidrolases (Reproduzido de ZIMMERMANN, A. 2005). | 23 |
| Figura 13. Representação esquemática da reação de transesterificação entre um álcool e um éster vinílico catalisada por lipase (Baseado em HOLMQUIST et al. 1995). | 23 |
| Figura 14. Efeito da atividade de água na atividade enzimática de lipases de origens diversas: <i>Rhizopus arrhizus</i> (■); <i>Candida rugosa</i> (○); <i>Pseudomonas sp.</i> (□) (WEHTJE e ADLERCREUTZ, 1997). | 30 |
| Figura 15. Esquema considerado para sistemas do tipo Michaeliano, assumindo que a reação é irreversível e que os produtos gerados não interferem na reação. | 31 |
| Figura 16. Mecanismo de transdução celular (Reproduzido por ALMEIDA et al. 2003). | 33 |
| Figura 17. Estereoisômeros do inositol (Reproduzido por ALMEIDA et al. 2003). | 34 |
| Figura 18. Nomenclatura e plano de simetria do mio-inositol (Reproduzido por ALMEIDA et al., 2003). | 35 |
| Figura 19. Modelo do Gráfico da probabilidade normal dos resíduos (Reproduzido por CALADO e MONTGOMERY, 2003). | 39 |
| Figura 20 - Padrões de comportamento dos gráficos dos resíduos (Reproduzido por MONTGOMERY, 2001). | 40 |
| Figura 21. Foto da aparelhagem real e esquema do sistema experimental empregado nas reações de acetilação de rac-1, rac-2 e rac-3 (Reproduzido por BEVILAQUA, 2005). | 42 |
| Figura 22. Cromatograma referente ao padrão do substrato (rac-3) por CLAE em fase reversa com t_r de 8,178min. | 45 |
| Figura 23. Cromatograma referente ao padrão do substrato (rac-3) por CLAE em fase reversa em diferentes concentrações (mg/mL) com t_r de 8,178min. | 46 |
| Figura 24. Cromatograma referente a mistura do padrão racêmico do produto analisados por CLAE em fase reversa. O t_r de 12,456min é referente ao primeiro monoacetilado, o t_r =13,296min é referente ao segundo. O t_r =21,797min é referente ao diacetilado e o t_r = 38,745min ao triacetilado. O t_r de 8,325min é referente ao substrato. | 46 |
| Figura 25. Cromatograma do (D)-isômero e (L)-isômero do (\pm)- 1,3,4-tri-O-benzil-mio-inositol (rac-3). | 47 |
| Figura 26. Curva de progresso da resolução enzimática do rac-3 catalisada pela Novozym 435 em acetato de vinila. | 56 |
| Figura 27. Cromatograma referente ao produto de reação de acetilação de rac-3 catalisado por Novozym 435 por CLAE em fase reversa em 112h de tempo de reação. | 56 |
| Figura 28. Cromatograma do substrato não reagido obtido na reação de acetilação do rac-3 no período de 112h, utilizando Novozym 435 como catalisador em acetato de vinila. | 57 |
| Figura 29. Cromatograma do produto após reação de metanólise obtido na reação de acetilação do rac-3 no período de 120h, utilizando Novozym 435 como catalisador em acetato de vinila | 57 |

| | |
|--|----|
| Figura 30. Reinjeção da amostra em fase reversa mostrando no cromatograma de confirmação que todo produto foi anteriormente hidrolisado | 58 |
| Figura 31. Resolução cinética enzimática do racemato <i>rac-3</i> catalisada pela Novozym 435 em acetato de vinila. | 59 |
| Figura 32. Curva de progresso da resolução enzimática do <i>rac-3</i> catalisada pela Novozym 435 em diferentes agentes acilantes: 1- Acetato de vinila; 2- Acetato de etila; 3-Acetato de isopropenila. | 60 |
| Figura 33. Curva de progresso da resolução enzimática do <i>rac-3</i> catalisada pela Novozym 435 em diferentes sistemas de solventes: 1- TBME; 2- Hexano; 3-Acetato de etila; 4-Acetato de isopropenila utilizando Acetato de vinila como agente acilante. | 62 |
| Figura 34. Curva de progresso da resolução enzimática do <i>rac-3</i> catalisada pela PS-IM: Reação em acetato de vinila, livre de solvente. | 64 |
| Figura 35. Curva de progresso da resolução enzimática do <i>rac-3</i> catalisada pela PSC Amano II: 1- Reação em acetato de vinila, livre de solvente. | 64 |
| Figura 36. Cromatograma referente ao produto de reação de acetilação de <i>rac-3</i> catalisado por <i>Pseudomonas species</i> imobilizada em terra de diatomácea. A análise por CLAE em fase reversa mostrou em 48h a conversão de 48%. | 65 |
| Figura 37. Cromatograma referente ao produto de reação de acetilação de <i>rac-3</i> catalisado por <i>Pseudomonas species</i> imobilizada em cerâmica. A análise por CLAE em fase reversa mostrou em 96h a conversão de 47,7%. | 65 |
| Figura 38. Cromatograma do substrato não reagido obtido na reação de acetilação do <i>rac-3</i> analisado na coluna quiral, utilizando <i>Pseudomonas species</i> , imobilizada em terra de diatomácea, utilizando acetato de vinila como solvente e agente acilante. | 66 |
| Figura 39 - Cromatograma do produto hidrolisado obtido na reação de acetilação de <i>rac-3</i> analisado por sistema CLAE em coluna quiral, utilizando lipase de <i>Pseudomonas species</i> , imobilizada em terra de diatomácea (PS-IM), utilizando acetato de vinila como solvente e agente acilante, com e_p de 98%. | 66 |
| Figura 40. Cromatograma do produto hidrolisado obtido na reação de acetilação de <i>rac-3</i> analisado por sistema CLAE em coluna quiral, utilizando lipase de <i>Pseudomonas species</i> , imobilizada em cerâmica, utilizando acetato de vinila como solvente e agente acilante, com e_p de 98%. | 67 |
| Figura 41. Resolução cinética enzimática do racemato <i>rac-3</i> catalisada por lipase de <i>Pseudomonas species</i> imobilizada em dois diferentes suportes em acetato de vinila. | 68 |
| Figura 42. Curva de progresso da resolução enzimática do <i>rac-3</i> catalisada pela PS-IM na presença de dois diferentes agentes acilantes: 1- Reação em acetato de vinila; 2- Reação em acetato de isopropenila. As reações foram feitas em sistema livre de solvente. | 68 |
| Figura 43. Curva de progresso da resolução enzimática do <i>rac-3</i> catalisada pela PSC Amano II na presença de dois diferentes agentes acilantes: 1- Reação em acetato de vinila; 2- Reação em acetato de isopropenila. As reações foram feitas em sistema livre de solvente. | 69 |
| Figura 44. Curva de progresso das reações de resolução enzimática do <i>rac-3</i> em diferentes sistemas de solventes catalisada por PSC Amano II: 1- TBME; 2- Hexano e 3-Acetato de etila. Em todas as reações acetato de vinila foi utilizado como agente acilante. | 72 |
| Figura 45. Curva de progresso das reações de resolução enzimática do <i>rac-3</i> catalisada por PS-IM utilizando acetato de vinila como agente acilante, em diferentes sistemas de solventes: 1- TBME; 2- Hexano e 3- Acetato de etila. | 73 |
| Figura 46. Gráfico de Pareto. | 78 |
| Figura 47. Gráfico da probabilidade normal dos resíduos. | 81 |
| Figura 48. Gráfico da homogeneidade da variância-valores observados x Resíduos. | 82 |
| Figura 49. Gráfico de Shapiro e Komogorov com $p=0,969$ e $p>0,20$, respectivamente. | 82 |
| Figura 50. Superfícies de resposta obtidas no planejamento experimental para a resolução cinética de <i>rac-3</i> como resposta para concentração de enzima e substrato: a) Valores fixados de 0% m/v de água e 40°C de Temperatura e b) 0% m/v de água e 30°C de Temperatura c) Valores fixados de 0,4% m/v de água e 40°C de Temperatura d) 0,4 % m/v de água e 30°C de Temperatura. | 83 |
| Figura 51. Superfície de resposta obtida no planejamento experimental para a resolução cinética de <i>rac-3</i> : influência da temperatura e da concentração de enzima sobre a conversão. | 84 |
| Figura 52. Gráfico de Pareto mostrando os fatores que são significativos, em ordem crescente de significância onde fatores significativos estão após a linha na vertical de cor vermelha. | 86 |
| Figura 53. Gráfico da probabilidade normal dos resíduos. | 88 |
| Figura 54. Gráfico da homogeneidade da variância-valores observados x Resíduos. | 88 |
| Figura 55. Gráfico de Shapiro e Komogorov com $p=0,944$ e $p>0,20$, respectivamente. | 89 |
| Figura 56. Superfícies de resposta obtidas no planejamento experimental para a resolução cinética de <i>rac-3</i> como resposta para a razão enantiomérica (E) utilizando concentração de enzima e temperatura como variáveis | |

independentes, em 56a e 56b e concentração de enzima e substrato em 56c e 56d: a) Valores fixados de 2 mg/mL de substrato e 0% m/v H₂O, b) 2 mg/mL de substrato e 0,4 % m/v H₂O. C) Os valores fixados de 0% m/v H₂O e 40°C de Temperatura e d) 0,4% m/v H₂O e 40°C de Temperatura.

90

Figura 57. Obtenção dos pontos ótimos das duas variáveis de resposta, X% (conversão) e ee_p através da função *desirability* para a var1 (concentração de substrato); var2 (concentração de enzima); var3 (concentração de água) e var4 (temperatura em °C). A aproximação da linha tracejada em azul indica os pontos ótimos.

92

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Principais áreas aplicações, produtos e tipos de reações desempenhadas pelas lipases. | 14 |
| Tabela 2. Valor de log P de solventes orgânicos. | 26 |
| Tabela 3. Soluções salinas saturadas adequadas ao controle da atividade de água. | 28 |
| Tabela 4. Derivados de mio-inositol tri e tetra-substituídos com grupamento benzila e tri-substituído com grupamento alila. | 42 |
| Tabela 5. Valores reais referentes aos valores das variáveis escalonadas. | 51 |
| Tabela 6. Resultado dos experimentos preliminares de resolução enantiomérica dos substratos com as lipases. | 53 |
| Tabela 7. Resultados do <i>screening</i> realizado com as diferentes lipases na resolução cinética de <i>rac-3</i> utilizando acetato de vinila como solvente e agente acilante. | 54 |
| Tabela 8. Atividade hidrolítica (AH) entre as lipases imobilizadas e liofilizadas. | 55 |
| Tabela 9. Efeito de diferentes agentes acilantes na resolução de <i>rac-3</i> em 112h apresentando os parâmetros de conversão (X%), excesso enantiomérico pelo substrato (ee_s), excesso enantiomérico pelo produto (ee_p) e razão enantiomérica (E). | 60 |
| Tabela 10. Conversões, valores de excesso enantiomérico (ee) e razão enantiomérica (E) obtidas na resolução cinética de <i>rac-3</i> , catalisada por Novozym 435 no período de 120h. | 63 |
| Tabela 11. Efeito de diferentes agentes acilantes na resolução de <i>rac-3</i> utilizando PS-IM e acetato de vinila como solvente da reação; apresentando os parâmetros de conversão (X%), excesso enantiomérico pelo substrato (ee_s), excesso enantiomérico pelo produto (ee_p) e razão enantiomérica (E). | 69 |
| Tabela 12. Efeito de diferentes agente acilante na resolução de <i>rac-3</i> utilizando PSC amano II e acetato de vinila como solvente apresentando os parâmetros de conversão (X%), excesso enantiomérico pelo substrato (ee_s), excesso enantiomérico pelo produto (ee_p) e razão enantiomérica (E). | 69 |
| Tabela 13. Resultado obtido da reação de <i>rac-3</i> catalisada por lipase de <i>Pseudomonas species</i> na forma imobilizada e liofilizada utilizando acetato de vinila como agente acilante e solvente da reação, apresentando os parâmetros de conversão (X%), excesso enantiomérico pelo substrato (ee_s), excesso enantiomérico pelo produto (ee_p) e razão enantiomérica (E). | 71 |
| Tabela 14. Parâmetros de conversão (X%), de excesso enantiomérico do produto (ee) e a razão enantiomérica (E) obtidos com PSC Amano II na acetilação enantiosseletiva do <i>rac-3</i> em diferentes solventes. | 73 |
| Tabela 15. Parâmetros de conversão (X%), de excesso enantiomérico do produto (ee) e a razão enantiomérica (E) obtidos com PS-IM na acetilação enantiosseletiva do <i>rac-3</i> em diferentes solventes. | 74 |
| Tabela 16. Planejamento Composto Central em termos das variáveis não escalonadas e escalonadas (entre parêntesis) dos respectivos resultados experimentais, no período de 24h, utilizando a lipase PS-IM e como agente acilante e solvente o acetato de vinila. | 76 |
| Tabela 17. ANOVA sem os efeitos não-significativos. | 77 |
| Tabela 18. Análise de variância para desenvolvimento experimental. | 78 |
| Tabela 19. Efeitos estimados e coeficientes das variáveis escalonadas. | 79 |
| Tabela 20. Efeitos estimados e coeficientes das variáveis escalonadas sem as variáveis não significativas. | 80 |
| Tabela 21. Tabela Anova gerada para a variável de resposta ee_p | 85 |
| Tabela 22. Análise de variância para desenvolvimento experimental. | 85 |
| Tabela 23. Efeitos estimados e coeficientes das variáveis escalonadas. | 86 |
| Tabela 24. Efeitos estimados e coeficientes das variáveis escalonadas sem as variáveis não significativas | 87 |

ÍNDICE DE ABREVIACÕES

| | |
|-----------------|---|
| Ac | Grupo acila |
| Alil | Grupo alila |
| Bn | Grupo benzila |
| Bn | Grupo benzila |
| CCF | Cromatografia em Camada Fina |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| CALB | lipase B de <i>Candida antarctica</i> |
| E | razão enantiomérica |
| ee _s | excesso enantiomérico obtido pelo substrato |
| ee _p | excesso enantiomérico obtido pelo produto |
| p-NFL | p-nitro fenil laurato |
| TBME | Éter terc-metil butílico |
| TLC | <i>Thin Layer Chromatograph</i> (Cromatografia em Camada Delgada) |
| <i>rac</i> -1 | (±)-1,4,5,6-tetra- <i>O</i> -benzil- <i>mio</i> -inositol |
| <i>rac</i> -2 | (±)-1,4,5,6-tetra- <i>O</i> -alil- <i>mio</i> -inositol |
| <i>rac</i> -3 | (±)-1,3,4-tri- <i>O</i> -benzil- <i>mio</i> -inositol |