UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ESCOLA DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E
BIOQUÍMICOS

Clara Anhel Ferraz

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE CATALISADORES MAGNÉTICOS HÍBRIDOS CONTENDO LIPASE E PALÁDIO PARA A RESOLUÇÃO DINÂMICA DE AMINAS QUIRAIS

Orientador: Prof. Dr. Ivaldo Itabaiana Jr, EQ/UFRJ
Co-Orientador: Prof. Dr. Rodrigo O. M. A. de Souza, IQ/UFRJ

Dissertação de Mestrado

EQ/UFRJ

2019

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE CATALISADORES MAGNÉTICOS HÍBRIDOS CONTENDO LIPASE E PALÁDIO PARA A RESOLUÇÃO DINÂMICA DE AMINAS QUIRAIS

CLARA ANHEL FERRAZ

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Rio de Janeiro, 14 de Janeiro de 2019.

Orientada por:

Prof. Ivaldo Itabaiana Jr., D.Sc.

Prof. Rodrigo O. M. A. de Souza, D. Sc.

Aprovada por:

Prof. Melissa Gutarra, D.Sc.

Prof. Evelin Andrade Manoel, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

CIP - Catalogação na Publicação

AF379s
s

Anhel Ferraz, Clara
Síntese e caracterização de catalisadores magnéticos híbridos contendo Lipase e Paládio para a resolução dinâmica de aminas quirais / Clara Anhel Ferraz. -- Rio de Janeiro, 2019.
254 f.

Orientador: Ivaldo Itabaiana Jr..
Coorientador: Rodrigo Octavio Mendonça Alves de Souza.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2019.

1. Lipases. 2. Resolução cinética dinâmica. 3. Aminas quirais. 4. Partículas magnéticas. 5. Catalisadores híbridos. I. Itabaiana Jr., Ivaldo, orient. II. Mendonça Alves de Souza, Rodrigo Octavio, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

AGRADECIMENTOS

Aos professores Ivaldo Itabaiana Jr. e Rodrigo Souza por toda a orientação e por ter me guiado nesse trabalho, estando sempre disponíveis para tirar dúvidas, ajudar a solucionar problemas e apoiar minhas decisões.

Aos colegas e amigos do Boss Group e agregados, em especial Gabriella, Marcelo, Mauro, Alexandre, Raquel, Marco, Marcus, Vivi, Renata, Larissa, Bárbara, Bruna e Anderson, por terem me acolhido, me ensinado e por todas as discussões técnicas e pessoais, entre tantas outras.

Aos professores e laboratórios que trabalharam em colaboração com o projeto, por nos auxiliarem no desenvolvimento das metodologias e nos auxiliarem nas análises.

Aos meus pais, irmão e marido, por todo o suporte, apoio e exemplo.

RESUMO

Anhel Ferraz, Clara. **Síntese e caracterização de catalisadores magnéticos híbridos contendo Lipase e Paládio para a resolução dinâmica de aminas quirais.** Orientador: Ivaldo Itabaian Jr., D. Sc.; Co-orientador: Rodrigo O. M. A. Souza, d. Sc., EQ/UFRJ. Rio de Janeiro, 2019. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos). Lipases, Resolução Cinética Dinâmica, Aminas Quirais, Partículas Magnéticas, Catalisadores Híbridos.

Estudos recentes estimam que cerca de 40% dos fármacos possuam uma amina quiral em sua estrutura, e sua síntese de forma sustentável e com custo competitivo ainda é um desafio para a indústria. A resolução cinética tem sido a principal rota de produção desses compostos e o uso de lipases como catalisador é uma boa alternativa, uma vez que essas enzimas são capazes de trabalhar em condições reacionais brandas mantendo elevada quimio-, regio- e enantiosseletividade. Entretanto, o rendimento máximo nesses processos atinge apenas 50%. Para aumentar essa conversão, pode ser realizada a resolução cinética dinâmica, onde o enantiômero não reconhecido pela enzima é racemizado através de um agente de racemização, alcançando assim um rendimento máximo teórico de 100 %.

Esse trabalho teve como objetivo sintetizar e caracterizar um catalisador híbrido magnético composto pela lipase B de *Candida antarctica* (CALB) e paládio imobilizados em um mesmo suporte magnético nanométrico, a fim de separar a enzima e o metal através da aplicação de um campo magnético. Os biocatalisadores produzidos foram então aplicados na resolução cinética dinâmica usando a (*rac*)-1-feniletilamina como molécula padrão.

Como resultados, foram obtidas partículas magnéticas de magnetita e maghemita com tamanhos entre 10 e 20 nm, as quais foram revestidas com sílica através da reação com o tetraetoxissilano, funcionalizadas com (3-aminopropil)trietoxissilano e posteriormente acopladas com nanopartículas Pd com tamanhos entre 5 a 10 nm em suas superfícies a diferentes concentrações. Através do ensaio de racemização da (*S*)-1-feniletilamina, constatou-se que as nanopartículas sintetizadas através da metodologia de co-precipitação com as etapas de sonicação e recobrimento com ácido oleico (com o objetivo de obter nanopartículas com tamanhos menores) apresentaram os melhores resultados de racemização (57 % de conversão, 96 % de seletividade e 4 % de excesso enantiomérico) com apenas 4,5 % de paládio (p/p) após 1 h de reação. Esse catalisador tinha entre 50 a 100 nm de diâmetro e uma magnetização de saturação de 22 emu/g. Essa nanopartícula foi usada como suporte para a imobilização da CALB usando dois agentes de ativação, (epicloridrina e o glutaraldeído), onde os imobilizados no glutaraldeído apresentaram melhores resultados na resolução cinética dinâmica da (*rac*)-1-feniletilamina (88 % de conversão, 75 % de seletividade e 4 % de excesso enantiomérico do produto) após 12 h de reação. Foram realizadas otimizações com relação à quantidade de enzima no suporte, doador de hidrogênio e temperatura de reação, atingindo 99 % de conversão da (*rac*)-1-feniletilamina com 95 % de seletividade e 93 % de excesso enantiomérico do produto após 12 h de reação. Esses valores foram superiores aos encontrados na literatura.

ABSTRACT

Anhel Ferraz, Clara. **Synthesis and characterization of magnetic hybrid catalysts containing Lipase and Palladium for the dynamic resolution of chiral amines.** Supervisor: Ivaldo Itabaian Jr., D. Sc.; Co-supervisor: Rodrigo O. M. A. Souza, d. Sc., EQ/UFRJ. Rio de Janeiro, 2019. Dissertation (Master Degree in Chemical and Biochemical Processes Engineering). Lipases, Dynamic Kinetic Resolution, Chiral Amines, Magnetic Particles, Hybrid Catalysts.

Recent studies estimate that about 40 % of drugs have a chiral amine in their structure and their synthesis in a sustainable and cost-competitive way is still a challenge for the industry. Kinetic resolution is still the most used path to produce these compounds, and the use of lipase as a catalyst is a good alternative, since these enzymes are able to work under mild reaction conditions maintaining a good chemo-, regio- and enantioselectivity. The main drawback of this process is the maximum theoretical yield of 50 %. To increase this conversion, dynamic kinetic resolution is performed, and the non-reactive enantiomer is racemized through the association of a racemization agent, thereby achieving a maximum theoretical yield of 100 %.

This work aimed to synthesize and characterize a hybrid magnetic catalyst composed by lipase B of *Candida antarctica* (CALB) and Pd immobilized on the same nanometric magnetic support, in order to separate the enzyme and metal from the reaction medium with a magnetic field. The produced biocatalysts were then applied in the dynamic kinetic resolution using (*rac*)-1-phenylethylamine as a standard molecule. As result, magnetite and maghemite magnetic nanoparticles with sizes between 10 to 20 nm were obtained, which were coated with silica using tetraethoxysilane, functionalized with (3-aminopropyl)triethoxysilane and subsequently coupled with Pd nanoparticles of sizes between 5 to 10 nm on their surfaces at different concentrations. The racemization of (*S*)-1-phenylethylamine showed that the nanoparticles synthesized throught the co-precipitation methodology using sonication and oleic acid coating steps (in order to reduce the nanoparticle size) presented the best results (57 % of conversion, 96 % of selectivity and 4 % of enantiomeric excess), with only 4,5 % palladium (w/w) after 1 h of reaction. This catalyst had between 50 to 100 nm of diameter and a saturation magnetization of 22 emu/g.

This nanoparticle was used in the immobilization of CALB using two activating agents (epichlorohydrin and glutaraldehyde) and, immobilization with glutaraldehyde achieved better results in the dynamic resolution of (*rac*)-1-phenylethylamine (88 % conversion, 75 % selectivity and 4 % enantiomeric excess of the product) after 12 h. Optimizations were performed with respect to the amount of enzyme in the support, hydrogen donor and temperature, reaching 99 % of conversion with 95 % of selectivity and 93 % of enantiomeric excess after 12 h. These values are higher than those found in the literature.

SUMÁRIO

Agradecimento 4

Resumo 5

Abstract 6

Índice de figuras 10

Índice de tabelas 13

Índice de esquemas 14

Lista de siglas e abreviaturas 15

1. Introdução 16

2. Revisão Bibliográfica 18

2.1. Importância da quiralidade 18

2.1.1. Isomerismo 18

2.1.2. Fármacos quirais 20

2.1.3. Síntese de fármacos quirais 23

2.2. Aminas quirais 25

2.2.1. Obtenção de aminas por via biotecnológica 27

2.2.2. Resolução cinética de aminas 29

2.2.3. Resolução cinética dinâmica de aminas 31

2.3. Lipases 34

2.3.1 Principais reações 34

2.3.2. Estrutura e mecanismo de reação das lipases 37

2.3.3. Classificação das lipases 41

2.3.4. Mercado e aplicações 43

2.3.5. Lipase B de *Candida antarctica* (CALB) 44

2.4. Imobilização de enzimas 46

2.4.1. Métodos de imobilização de enzimas 48

2.4.2. Suportes nanométricos 51

2.4.3. Suportes magnéticos 52
2.4.4. Catalisadores híbridos 58
3. Objetivos 61
3.1. Objetivo geral 61
3.2. Objetivos específicos 61
4. Materiais e métodos 62
4.1. Materiais 62
4.1.1. Reagentes e enzimas 62
4.1.2. Equipamentos 63
4.2. Síntese das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro 64
4.3. Revestimento das nanopartículas com tetraetoxissilano 66
4.4. Funcionalização com (3-aminopropil) trietoxissilano 67
4.5. Síntese de paládio suportado nas nanopartículas 68
4.6. Reação de racemização da (*S*)-1-feniletilamina 69
4.7. Imobilização da CALB 72
4.7.1. Imobilização com glutaraldeído 72
4.7.2. Metodologia de quantificação de proteína de Bradford 73
4.7.3. Imobilização com epicloridrina 76
4.8. Atividade hidrolítica 77
4.9. Potencial de conversão de esterificação 78
4.10. Resolução cinética dinâmica da (*rac*)-1-feniletilamina 80
4.11. Reciclo do catalisador híbrido 82
4.12. Caracterização dos catalisadores híbridos 82
4.12.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier 82
4.12.2. Difratometria de raios X (DRX) 82
4.12.3. Microscopia eletrônica de transmissão 83
4.12.4. Magnetometria 84

5. Resultados e Discussão 85
5.1. Obtenção dos suportes magnéticos 85
5.1.1. Síntese das nanopartículas 85
5.2. Reação de racemização da (*S*)-1-feniletilamina 96
5.2.1. Cromatogramas padrões 96
5.2.2. Racemização usando nanopartículas sintetizadas sem ultrassom e sem ácido oleico (NP) 97
5.2.3. Racemização usando nanopartículas sintetizadas com as etapas de ultrassom e sem recobrimento com ácido oleico (NPUS) 99
5.2.4. Racemização usando nanopartículas sintetizadas com as etapas de ultrassom e com recobrimento com ácido oleico (NPUSAO) 102
5.2.5. Racemização usando nanopartículas de sílica (Sílica) 103
5.3. Imobilização da CALB no suporte com paládio 106
5.3.1. Comparação dos protocolos de imobilização usando glutaraldeído e epicloridrina 107
5.3.2. Otimização do protocolo de imobilização com glutaraldeído 112
5.3.3. Estudo do potencial de esterificação do ácido palmítico 114
5.4. Resolução cinética dinâmica da (*rac*)-1-feniletilamina 116
5.5. Reciclo do catalisador híbrido 119
6. Conclusões 121
7. Perspectivas futuras 123
8. Referências bibliográficas 124
Apêndice I 137
Apêndice II 180
Apêndice III 182

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Um sistema quiral com configuração R. 19
Figura 2: Enantiômeros e diastereoisômeros. 20
Figura 3: Número de novas moléculas aprovada pelo FDA entre os anos 2002 a 2016. . 21
Figura 4: Enantiômeros da talidomida. 23
Figura 5: Exemplos de fármacos contendo aminas quirais. 26
Figura 6: Estratégias para a síntese de aminas quirais. 27
Figura 7: Reações catalisadas por enzimas para a obtenção de aminas quirais. 28
Figura 8: Resolução cinética 29
Figura 9: Enantiômero *R* mais reativo. 30
Figura 10: Resolução cinética dinâmica. 31
Figura 11: Complexo de rutênio usado para a racemização de aminas (PAETZOLD; BACKVALL, 2005). 32
Figura 12: Doadores de acila ativados Bornscheuer e Kazlauskas (2006). 37
Figura 13: Modelo de α/β-hidrolase, com β-folhas representada em setas e α-hélices em retângulos. Oxiânion é onde estão os resíduos que estabilizam os oxiânions e o resíduo nucleofílico (Nu) é uma serina. 39
Figura 14: Lipase CALB. 45
Figura 15: Sítio catalítico da CALB contendo a tríade catalítica (Ser105, His224 d Asp187 em azul e os quatro resíduos hidrofóbicos (Ile189, Leu278, Ala282 e Ile 285) localizados na entrada do sítio catalítico em preto. 46
Figura 16: Metodologias de imobilização enzimática. 48
Figura 17: Formação de CLEA. 49
Figura 18: Ligações covalentes unipontuais e multipontuais. 51
Figura 19: Estrutura cristalina da magnetita e da maguemita (OLIVEIRA; FABRIS; PEREIRA, 2013). 53
Figura 20: Ordenamento magnético dos spins. 54
Figura 21: Domínios magnéticos de um material (TEJA; KOH, 2009). 55
Figura 22: Magnetização *M* em função de um campo magnético *H*. 56
Figura 23: Obtenção de catalisador metálico. 59
Figura 24: Nanopartículas de óxido de ferro revestidas com ácido oleico. 65
Figura 25: Fluxograma dos protocolos de síntese das nanopartículas. 66
Figura 26: Revestimento da nanopartícula com TEOS. 67

Figura 27: Funcionalização na nanopartícula com APTES.....68
Figura 28: Fluxograma das etapas de síntese das nanopartículas com Paládio.....69
Figura 29: Curva de calibração da *rac*-1-feniletilamina.....71
Figura 30: Ativação do suporte com glutaraldeído. 72
Figura 31: Reação de imobilização da CALB. 73
Figura 32: Curva padrão da solução de Bradford.....75
Figura 33: Ativação da nanopartícula com epicloridrina. 76
Figura 34: Imobilização da nanopartícula com a enzima (CALB). 77
Figura 35: Curva de calibração do ácido palmítico.....80
Figura 36: Nanopartículas. a) Nanopartícula atraída por um ímã, b) NP, c) NPUS, d) NPUSAO 85
Figura 37: Difratogramas das nanopartículas sintetizadas através das diferentes metodologias.....86
Figura 38: Imagens da microscopia eletrônica de transmissão. Imagens a e b correspondem às nanopartículas sintetizadas sem as etapas de ultrassom e sem o revestimento com ácido oleico, as imagens c e d correspondem às nanopartículas sintetizadas com as etapas de ultrassom, e as imagens e e f correspondem às nanopartículas sintetizadas com as etapas de ultrassom e revestidas com ácido oleico.....89
Figura 39: Espectro de infravermelho para as nanopartículas sintetizadas com ultrassom com e sem o recobrimento com ácido oleico. 90
Figura 40: Nanopartículas revestidas com TEOS. A imagem a corresponde às nanopartículas sintetizadas sem as etapas de ultrassom e sem o revestimento com ácido oleico, a imagem b corresponde às nanopartículas sintetizadas com as etapas de ultrassom, e a imagem c corresponde às nanopartículas sintetizadas com as etapas de ultrassom e revestidas com ácido oleico.....91
Figura 41: Difratogramas da NPUSAO recoberta com TEOS.....92
Figura 42: Nanopartículas revestidas com TEOS e com paládio em suas superfícies. A imagem a imagem a) corresponde às nanopartículas sintetizadas com as etapas de ultrassom, e a imagem b) corresponde às nanopartículas sintetizadas com as etapas de ultrassom e revestidas com ácido oleico. 92
Figura 43: EDS da NPUSAO com 4,5% de paládio. 93
Figura 44: Difratogramas das nanopartículas com paládio. 94
Figura 45: Magnetização em função do campo aplicado. 95

Figura 46: Cromatograma da (*R*)-1-feniletilamina sem e com derivatização com anidrido trifluoroacético (tempos de retenção 4,020 min e 11,164 min, respectivamente). 96
Figura 47: Cromatograma da (*S*)-1-feniletilamina sem e com derivatização com anidrido trifluoroacético (tempos de retenção 4,123 min e 11,412 min, respectivamente). 97
Figura 48: Cromatograma da (*rac*)-1-feniletilamina sem e com derivatização com anidrido trifluoroacético (tempos de retenção 4,063 e 4,223 min, e 11,223 e 11,537 min, respectivamente) 97
Figura 49: Cromatograma da racemização usando NP@3%Pd após 24 h de reação 98
Figura 50: Cromatograma da racemização com a NP@4,5%Pd após 18 h de reação 98
Figura 51: Cromatograma da racemização com a NP@6%Pd após 24 h de reação 99
Figura 52: Cromatograma da reação de racemização com a NPUS@3%Pd após 3 h de reação 100
Figura 53: Cromatograma da reação de racemização com a NPUS@4,5%Pd após 3 h de reação 100
Figura 54: Cromatograma da reação de racemização com a NPUS@6%Pd após 3 h de reação 100
Figura 55: Gráficos de conversão, seletividade e excesso enantiomérico para a racemização da NPUS nas três concentrações de paládio. 101
Figura 56: Gráficos de conversão, seletividade e excesso enantiomérico para a racemização da NPUSAO nas três concentrações de paládio. 103
Figura 57: Gráficos de conversão, seletividade e excesso enantiomérico para a racemização das nanopartículas de sílica nas três concentrações de paládio. 104
Figura 58: Espectro de infravermelho da NPUSAO, da CALB, e da CALB imobilizada com glutaraldeído e com epicloridrina 108
Figura 59: Cromatograma da (*rac*)-2-metóxi-N-(1-feniletil)acetamida (tempos de retenção 17,761 min e 17,822 min) 110
Figura 60: Cromatograma da resolução cinética dinâmica com a enzima imobilizada no suporte NPUSAO@4,5%Pd com glutaraldeído. Tempo de retenção do substrato: 4,577 min e da amida-R: 17,821 min). 111
Figura 61: Cromatograma da resolução cinética dinâmica com a enzima imobilizada no suporte NPUSAO@4,5%Pd com epicloridrina. Tempo de retenção do substrato: 4,447 min e da amida-R: 17,821 min). 111
Figura 62: Cinética da reação de esterificação do ácido palmítico com etanol 114
Figura 63: Conversão de esterificação com linhas de tendência. 115

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Principais indústrias onde as lipases são usadas. 44
Tabela 2:Exemplos de enzimas imobilizadas em materiais magnéticos. 58
Tabela 3: Imobilização com glutaraldeído 73
Tabela 4: Diluições para o preparo da curva padrão de Bradford 74
Tabela 5: Picos de DRX da magnetita, maguemita, NP, NPUS e NPUSAO. 86
Tabela 6: Diâmetros médios dos cristalitos calculados e parâmetros da equação de Scherrer. 87
Tabela 7: Diâmetro médio calculado e parâmetros da equação de Scherrer para o paládio 94
Tabela 8: Magnetização de saturação das nanopartículas 95
Tabela 9: Racemização da (S)-1-feniletilamina 105
Tabela 10: Resultados imobilização com glutaraldeído e com epicloridrina 109
Tabela 11: Resultados da resolução cinética dinâmica da (rac)-1-feniletilamina usando biocatalisadores híbridos imobilizados com glutaraldeído e epicloridrina 111
Tabela 12: Otimizações feitas na imobilização com glutaraldeído 112
Tabela 13: Resultados das imobilizações otimizadas 113
Tabela 14: Velocidade inicial e conversão após 3 h. 115
Tabela 15: Resultados da resolução cinética dinâmica a 70 °C e com formiato de amônio como doador de hidrogênio após 12 h de reação. 116
Tabela 16: Resultados da resolução cinética dinâmica a 70 °C e com H_2 como doador de hidrogênio após 12 h de reação 117
Tabela 17: Resultados da resolução cinética dinâmica a 60 °C e com H_2 como doador de hidrogênio após 12 h de reação. 118
Tabela 18: Reciclo dos catalisadores híbridos na resolução cinética dinâmica a 60 °C e com H_2 como doador de hidrogênio após 12 h de reação. 119

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1: Abordagens para a obtenção de compostos enantiomericamente puros.....24
Esquema 2: Mecanismo da racemização da (*S*)-1-feniletilamina catalisada com paládio e os principais subprodutos formados. 33
Esquema 3: Reação de hidrólise de triacilglicerol catalisada pela lipase.....35
Esquema 4: Reações de esterificação. 35
Esquema 5: Reações de transesterificação. 36
Esquema 6: Mecanismo de reação da hidrólise catalisada pela lipase. 40
Esquema 7: Reação de obtenção da magnetita. 53
Esquema 8: Reação de obtenção da magnetita. 64
Esquema 9: Reação de obtenção do H_2PdCl_4. 68
Esquema 10: Reação de racemização da (*S*)-1-feniletilamina. 70
Esquema 11: Reação de hidrólise de triacilgliceróis do azeite catalisado pela enzima. ..77
Esquema 12: Reação de esterificação do ácido palmítico. 78
Esquema 13: Reação de racemização da (*rac*)-1-feniletilamina catalisada pelo catalisador híbrido. Adaptado de Miranda e colaboradores (2014). 81
Esquema 14: Reação de esterificação do ácido palmítico com etanol gerando palmitato de etila e água. 114

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

FDA – *Food and Drug Administration*

CALB – lipase B de *Candida antarctica*

N435 – Novozymes 435, Novozymes ®

CLEA – *Cross linked enzyme aggregate*

APTES – (3-aminopropil) trietoxisilano

TEOS – tetraetoxissilano

MSTFA – N-metil-N-trimetilsilil) trifluoroacetamida

FTIR – espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

DRX – difração de raios X

MET – microscopia eletrônica de transmissão

EDS – espectroscopia de raios X por dispersão de energia

GLU – glutaraldeído

EPI – epicloridrina

NP – nanopartículas sintetizadas sem ultrassom e sem o recobrimento com o ácido oleico

NPUS – nanopartículas sintetizadas com as etapas de ultrassom

NPUSAO – nanopartículas sintetizadas com as etapas de ultrassom e recobertas com ácido oleico

NP@3%Pd – NP revestida com TEOS, funcionalizada com APTES e com 3 % de paládio

NP@4,5%Pd – NP revestida com TEOS, funcionalizada com APTES e com 4,5 % de paládio

NP@6%Pd – NP revestida com TEOS, funcionalizada com APTES e com 6 % de paládio

NPUS@3%Pd – NPUS revestida com TEOS, funcionalizada com APTES e com 3 % de paládio

NPUS@4,5%Pd – NPUS revestida com TEOS, funcionalizada com APTES e com 4,5 % de paládio

NPUS@6%Pd – NPUS revestida com TEOS, funcionalizada com APTES e com 6 % de paládio

NPUSAO@3%Pd – NPUSAO revestida com TEOS, funcionalizada com APTES e com 3 % de paládio

NPUSAO@4,5%Pd – NP revestida com TEOS, funcionalizada com APTES e com 4,5 % de paládio

NPUSAO@6%Pd – NP revestida com TEOS, funcionalizada com APTES e com 6 % de paládio

1. INTRODUÇÃO

A quiralidade de moléculas foi descoberta no século XIX, porém, somente no século seguinte que esse fenômeno foi visto com a devida relevância no desenvolvimento da vida de seres humanos, animais e plantas (NGUYEN; HE; PHAM-HUY, 2006). Atualmente, os compostos quirais são de grande importância para diversas indústrias, entre elas a farmacêutica. A atividade farmacológica dos medicamentos depende principalmente da sua interação com os receptores no corpo humano, que por sua vez, são capazes de reconhecer a estereoquímica de uma molécula bioativa, determinando assim sua afinidade e forma de ligação (LIN; YOU; CHENG, 2011).

É estimado que cerca de 95 % dos medicamentos serão compostos por moléculas quirais em 2020 e é de se esperar que a maioria delas sejam enantiomericamente puras, uma vez que as agências de regulamentação têm lançado diretrizes cada vez mais restritas com relação a formulações racêmicas, além de proporcionarem incentivos, como a extensão de proteção de patentes que abordem o desenvolvimento de enantiômeros puros de medicamentos (CALCATERRA; ACQUARICA, 2018; CHALLENER, 2018).

Várias metodologias podem ser usadas para a produção de compostos enantiomericamente puros, sendo a resolução de racematos a abordagem mais utilizada industrialmente, principalmente para a produção de blocos de construção de aminas quirais (AHMED; KELLY; GHANEM, 2012; PIAZZOLLA; TEMPERINI, 2018). Essas moléculas são de grande interesse e há esforços para o desenvolvimento de processos de produção mais simples, eficientes e baratos (PIAZZOLLA; TEMPERINI, 2018; XU, SEN *et al.*, 2018).

Nesse contexto, a biocatálise apresenta diversas vantagens pela possibilidade de trabalho em condições de reação brandas, e pela possibilidade de ser empregado diversos biocatalisadores (MUÑOZ SOLANO *et al.*, 2012). Entre as diversas enzimas usadas na síntese orgânica, as lipases vêm ganhando grande importância ao longo dos últimos anos por ter uma grande especificidade ao substrato, por não precisar do uso de cofatores, por ser ativa em solventes orgânicos e por catalisar reações com grande enantio-, estereo- e quimiosseletividade (DE MIRANDA; MIRANDA; DE SOUZA, 2015).

Em uma resolução cinética enzimática, as lipases reagem com o substrato racêmico através de uma reação de esterificação ou transesterificaçao com um dos enantiômeros do substrato e o doador de acila, resultando em dois compostos enantiômericamente puros

(SEDDIGI *et al.*, 2017). Para que o enantiômero não-reativo do substrato seja convertido, é necessário que seja feita a sua racemização *in-situ*, geralmente através de um catalisador metálico, gerando uma resolução cinética dinâmica. A combinação da resolução enzimática com a racemização metálica em um único meio reacional, aumenta a eficiência do processo químico através da redução de custo, tempo e esforço de trabalho (LÅNGVIK *et al.*, 2015), atingindo rendimentos teóricos de 100%.

Uma vez conduzida a reação catalítica, a separação e regeneração do catalisador do meio reacional também são cruciais para a obtenção de processos com custo competitivo. Além disso, na indústria farmacêutica, por exemplo, é essencial a remoção de qualquer traço de catalisador que possa interferir com reações subsequentes e com a contaminação do produto final. A imobilização de catalisadores em suportes sólidos facilita a manipulação durante o processo de produção e a sua recuperação e regeneração após o término do processo. Entretanto, muitos processos ainda utilizam mais de um catalisador em fases diferentes, o que limita sua separação (LIM; LEE, 2010).

A aplicação de um campo magnético é uma forma eficaz de separação e recuperação de um catalisador, e diversos suportes magnéticos já foram usados para a imobilização de enzimas (ANSARI; HUSAIN, 2012). Além do superparamagnetismo, nanopartículas magnéticas apresentam outras vantagens, como o pequeno tamanho de partícula, que resulta em uma grande área específica de superfície (ZHANG; YUWEN; PENG, 2013). Outro aspecto importante é a possibilidade de trabalho em sistemas suspensos, onde a filtração não é eficiente para a separação dos catalisadores sólidos comuns.

O desenvolvimento de sistemas catalíticos utilizados para a resolução cinética dinâmica continua atraindo grande atenção por parte da comunidade científica, e uma alternativa encontrada é a incorporação do metal e da enzima em um único suporte, através da construção de um catalisador híbrido. Isso deve ser feito de forma que os catalisadores não interajam um com o outro perdendo atividade, mas que estejam acessíveis às moléculas de substrato e de produto (GANAI *et al.*, 2013; LÅNGVIK *et al.*, 2015).

Até então, poucos grupos trabalharam no desenvolvimento, aplicação e caracterização de catalisadores híbridos para a resolução cinética dinâmica de aminas, sendo esses os objetivos do presente trabalho.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. IMPORTÂNCIA DA QUIRALIDADE

2.1.1. ISOMERISMO

Isômeros são classificados como espécies químicas que possuem a mesma fórmula molecular, mas diferentes fórmulas estruturais. Existem duas grandes formas de isomerismo: o isomerismo estrutural e o estereoisomerismo. Os isômeros estruturais possuem os mesmos átomos e grupos funcionais, porém ligados de forma diferente, enquanto que os estereoisômeros, têm os mesmos átomos ligados na mesma ordem, mas se diferenciam pela maneira como são orientados no espaço. Dentre esses últimos, estão inclusos os enantiômeros e os diastereoisômeros (LIN; YOU; CHENG, 2011).

Enantiômeros são isômeros que possuem um átomo (geralmente um carbono) com 4 ligantes diferentes que é chamado de centro quiral. Uma molécula com um centro quiral possui dois enantiômeros que são imagens especulares um do outro e cuja imagem no espelho não pode ser sobreposta (CHALLENER, 2018). Eles apresentam as mesmas propriedades físicas e químicas, porém possuem comportamentos diferentes sob algumas condições. O sistema de nomenclatura R/S é usado para diferenciar os enantiômeros entre si e definir a configuração absoluta (LIN; YOU; CHENG, 2011). Para isso, é utilizada a regra de prioridade dos ligantes de acordo com o critério de Cahn-Ingold-Prelog, onde os principais pontos são (CAHN; INGOLD; PRELOG, 1966):

(i) quanto maior o número atômico ou massa atômica substituinte direto, maior a prioridade;

(ii) quando os átomos substituintes forem iguais, o número atômico do átomo seguinte determina a prioridade;

(iii) ligações duplas ou triplas são contadas como se fossem dividas em duas ou três ligações simples.

Usando a molécula da figura 1 como exemplo, o carbono é um centro quiral quando os 4 substituintes (X, W, Y, Z) são diferentes. Se a molécula estiver orientada de forma que o grupo de menor prioridade W esteja para trás, e a sequência de prioridade dos outros grupos for no sentido horário, ou seja X > Y > Z, o centro quiral tem configuração R. Caso contrário, tem a configuração S (LIN; YOU; CHENG, 2011).

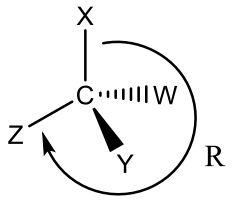


Figura 1: Um sistema quiral com configuração R.

Outra propriedade apresentada por enantiômeros é a atividade óptica. Quando uma luz polarizada passa por uma amostra pura de cada enantiômero, o plano é desviado em direções opostas por cada enantiômero. O isômero que desvia o plano de luz para o lado esquerdo é chamado de *levo* e tem a notação (-), enquanto que o isômero que desvia o plano de luz para o lado direito é chamado de *dextro* e tem a notação (+). Uma mistura racêmica contendo quantidades iguais de cada enantiômero não desvia o plano da luz polarizada, pois as rotações individuais dos enantiômeros se anulam. Sendo assim, a mistura racêmica é opticamente inativa (CHALLENER, 2018). É importante ressaltar que a convenção de rotação óptica (+/-) não tem relação direta com o sistema R/S (LIN; YOU; CHENG, 2011).

Muitos compostos possuem mais de um centro quiral em sua molécula. De forma geral, um composto com *n* centros quirais terá 2^n estereoisômeros possíveis. No caso de um composto com dois carbonos quirais, por exemplo, existe um total de 4 estereoisômeros possíveis. Os dois isômeros que são imagens especulares entre si são enantiômeros e os outros dois são chamados de diastereoisômeros, pois são estereoisômeros mas não enantiômeros (CHALLENER, 2018). Diferentemente dos enantiômeros, os diastereoisômeros têm propriedades físicas e químicas diferentes entre si, e podem ser separados usando técnicas analíticas convencionais. A figura 2 mostra a diferença entre enantiômeros e diastereoisômeros.

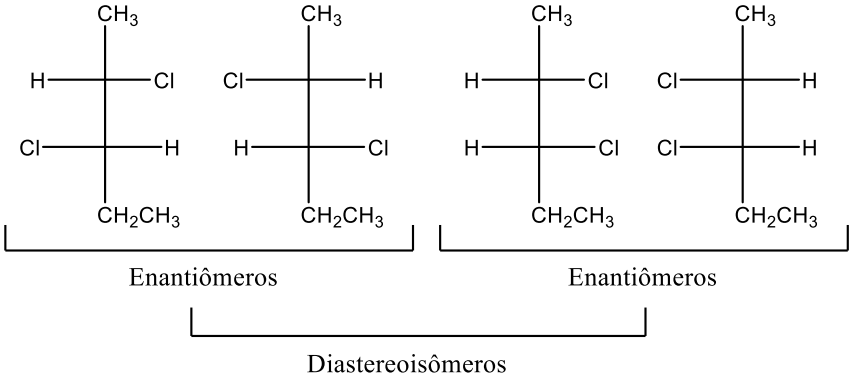


Figura 2: Enantiômeros e diastereoisômeros.
Adaptado de Lin *et al.* (2011).

2.1.2. FÁRMACOS QUIRAIS

Compostos opticamente puros estão presentes na indústria farmacêutica, alimentícia, agroquímica, eletrônica e de fragrâncias, e o mercado desses produtos tem a projeção de alcançar o valor de 7,6 bilhões de dólares em 2022 (CHALLENER, 2018; SEDDIGI *et al.*, 2017). Esse crescimento é impulsionado principalmente pelas indústrias farmacêutica e agroquímica, tendo como base o crescimento populacional associado ao aumento da demanda de melhores serviços de saúde e à necessidade do desenvolvimento de novos pesticidas (RESEARCH AND MARKETS, 2017).

O isomerismo também está presente nas moléculas de carboidratos, uma vez que o segundo carbono do gliceraldeído presente nas estruturas dos monossacarídeos é quiral, sendo a notação D e L mais usada para esses compostos. Por eles serem constituídos por diversos outros carbonos assimétricos, suas atividades ópticas é o resultado de todos os centros quirais, não seguindo necessariamente o plano indicado pelas letras D e L. Organismos maiores sintetizam e metabolizam apenas carboidratos D, sendo esses presentes em maior quantidade na natureza (BLANCO; BLANCO, 2017).

A indústria farmacêutica sozinha foi responsável por 72,5 % do mercado de compostos quirais em 2015, e empresas como BASF, Dow Chemicals e Rhodia são os principais produtores dessas moléculas, uma vez que elas estão envolvidas na produção de diversos intermediários para medicamentos (GRAND VIEW RESEARCH, 2015). Atualmente, os medicamentos que são misturas racêmicas correspondem a somente 12 % do total vendido no mercado. No entanto, esse número pode ser muito maior dependendo da classe, como por exemplo antiepiléticos e anticoagulantes, em que até 90 % dos

compostos são misturas racêmicas e anti-histamínicos e anestésicos, que têm cerca de 50 % de formulações opticamente inativas (WERMUTH, 2015).

Na maior parte das vezes, os compostos quirais foram introduzidos na forma racêmica, dada a limitação de metodologias para a obtenção dos compostos enantiomericamente puros na época (WERMUTH, 2015). No entanto, a criação de novas políticas e o aumento da rigidez das agências regulatórias com relação às diretrizes envolvendo formulações enantiomérica têm levado ao desenvolvimento de novas tecnologias para a síntese, análise e separação desses compostos. Apesar de não ser exigido o desenvolvimento de drogas enantiomericamente puras, a busca por esses princípios ativos tem se tornado o padrão em companhias farmacêuticas (CALCATERRA; ACQUARICA, 2018).

A maior parte das novas moléculas inseridas no mercado nos últimos anos são enantiômeros puros, conforme evidenciado na figura 3, que mostra a quantidade de novas moléculas aprovadas pela agência regulamentadora americana, (*Food and Drug Administration*, FDA) (ROSSI, DANIELA *et al.*, 2017). Isso corrobora o fato de que a indústria farmacêutica vem concentrando esforços na conversão do enantiômero não ativo ao enantiômero ativo, ou no desenvolvimento de novas rotas para a obtenção de compostos opticamente puros (CALCATERRA; ACQUARICA, 2018).

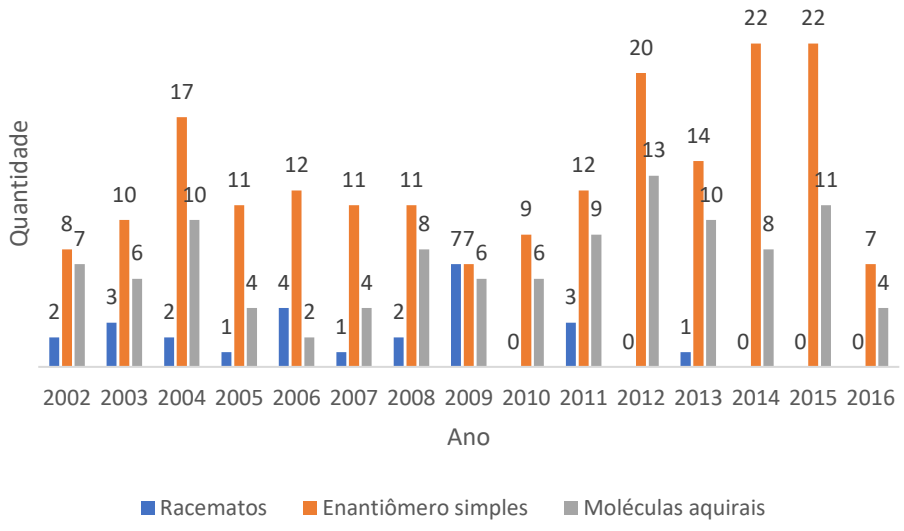


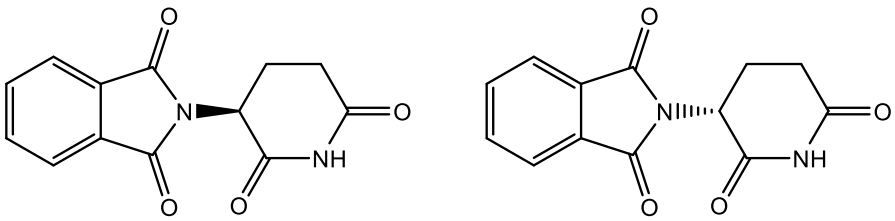
Figura 3: Número de novas moléculas aprovada pelo FDA entre os anos 2002 a 2016.
Adaptado de Rossi *et al*. (2017)

A atividade farmacológica de um medicamento depende principalmente de sua interação com os alvos, como receptores, proteínas, ácidos nucleicos e membranas, que

possuem estruturas 3D complexas e capazes de reconhecer as mínimas diferenças entre os arranjos espaciais possíveis de uma molécula bioativa, resultando em diferentes ligações e afinidades (LIN; YOU; CHENG, 2011). Desse modo, a atividade biológica de um enantiômero pode ser diferente do outro, podendo ser superior, nula ou, no pior dos casos, apresentar uma atividade biológica indesejável (CHALLENER, 2018). Portanto, o uso de biomoléculas enantiomericamente puras apresenta diversas vantagens, como o aumento da eficiência terapêutica, devido à melhoria da potência e seletividade, diminuição de possíveis efeitos adversos, a redução nas possibilidades de interação entre drogas (no caso do paciente consumir mais de um medicamento) e uma exposição do paciente a dosagens mais baixas do fármaco (CALCATERRA; ACQUARICA, 2018).

O exemplo mais conhecido de fármaco com diferentes efeitos entre enantiômeros é a talidomida (figura 4), um medicamento sedativo que foi comercializado nos anos 50 e 60 e que por possuir efeito anti-emético, foi prescrito para gestantes que sofriam de enjoo matinal. Após o início de suas vendas, foi constatado a ocorrência de defeitos raros e severos em bebês nascidos, como a má-formação de membros, e poucos anos depois foi confirmada a relação entre o consumo da talidomida durante a gestação e os casos de defeitos em recém-nascidos (FRAGA; DIAMOND; VARGESSON, 2011).

Esse composto quiral havia sido administrado em sua forma racêmica, apesar de apenas o enantiômero *R* ser ativo, o que foi descoberto anos mais tarde. O enantiômero *S* é teratogênico e a toxicidade específica em gestantes não era investigada na época. É estimado que por volta de 10000 bebês nasceram com defeitos devido à ingestão do medicamento racêmico. Estudos posteriores mostraram que ambos enantiômeros possuem efeitos desejáveis e indesejáveis, e que o centro quiral é racemizado facilmente no corpo humano (LIN; YOU; CHENG, 2011). No entanto, o caso da talidomida ajudou a alavancar estudos sobre fármacos quirais e o desenvolvimento de fármacos enantiomericamente puros (SEDDIGI *et al.*, 2017).



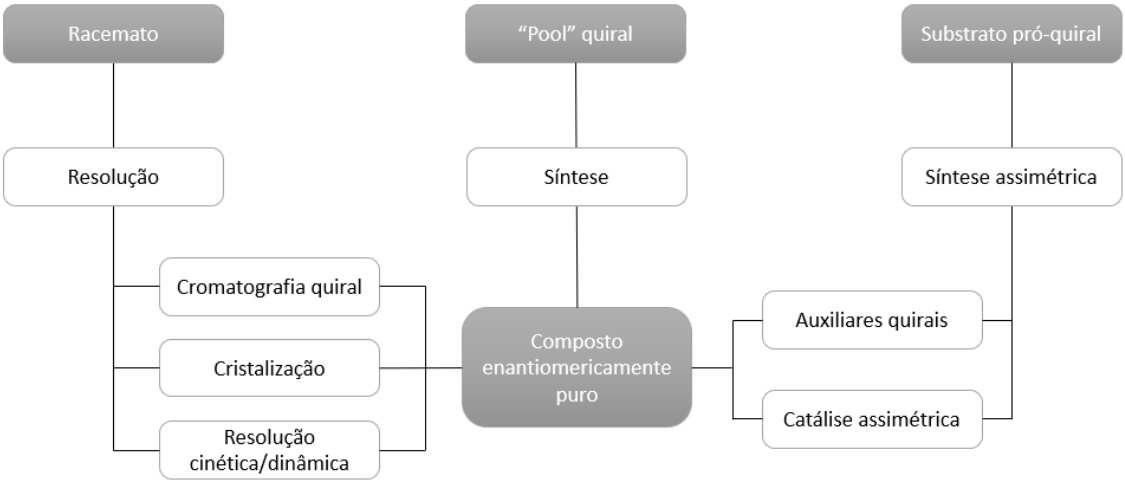
(+)-R-talidomina (-)-S-talidomida

Figura 4: Enantiômeros da talidomida.

2.1.3. SÍNTESE DE FÁRMACOS QUIRAIS

Do ponto de vista econômico, o desenvolvimento de um fármaco racêmico em que um dos enantiômeros não possui atividade é uma desvantagem, pois a produção poderia ser aumentada ao fazer a transição da mistura racêmica a um enantiômero puro. A síntese de compostos quirais complexos muitas vezes envolvem diversas etapas até se chegar ao produto final. De forma geral, é preferível ser feita a inserção do centro quiral no início da rota sintética para se evitar o escalonamento e a sucessão de processos com o enantiômero indesejado. Uma vez o centro quiral introduzido, a síntese deve ser projetada de forma a evitar a perda de quiralidade ao longo das etapas subsequentes (CHALLENER, 2018).

Existem diversas metodologias para se obter compostos enantiomericamente puros e elas podem ser divididas em três categorias, em função da natureza do material de partida. A primeira estratégia é o isolamento e a manipulação de um material opticamente ativo já encontrado na natureza dessa forma, chamado de “pool” quiral. A segunda estratégia é a separação de enantiômeros através da resolução de uma mistura racêmica, e a terceira estratégia é a síntese assimétrica (GHANEM; ABOUL-ENEIN, 2004; ROSSI, DANIELA *et al.*, 2017; ROUF; TANEJA, 2014). O esquema 1 ilustra as estratégias discutidas.



Esquema 1: Abordagens para a obtenção de compostos enantiomericamente puros. Adaptado de Rouf & Taneja (2014).

- Síntese através "pool" quiral: Essa abordagem usa uma molécula encontrada na natureza em sua forma opticamente pura como matéria-prima para a síntese de substratos mais complexos. Geralmente são moléculas relativamente baratas, como carboidratos e aminoácidos e por isso são empregadas na indústria;
- Síntese assimétrica de um substrato pró-quiral: Nesse tipo de reação ou sequência de reações, os centros quirais são formados de forma seletiva a partir de uma molécula não-quiral ou diastereosseletivamente a partir de uma molécula que possui um centro quiral. A síntese assimétrica pode ser induzida por auxiliares quirais ou catalisadores assimétricos, como enzimas, complexos metálicos ou orgânicos, levando à obtenção de compostos enantiomericamente puros;
- Resolução através de racematos: Essa é a metodologia mais usada industrialmente para a obtenção de um único enantiômero e pode ser dividida em 3 principais categorias:
    - Cromatografia quiral: A separação dos enantiômeros é baseada no particionamento diferencial entre as fases móvel e estacionária. A cromatografia direta usa a fase estacionária ou uma fase móvel quiral que que interage de forma diferente com os enantiômeros. A cromatografia indireta envolve o uso de um derivatizante quiral para a formação de diastereoisômeros que irão interagir com uma coluna aquiral;
    - Cristalização: É uma técnica usada para a separação e resolução de racematos através da precipitação de cristais de uma solução. Faz-se a reação da mistura racêmica com um composto opticamente ativo com o

intuito de se obter diastereoisômeros com propriedades físico-químicas diferentes, permitindo sua separação através a cristalização;

- Resolução cinética/dinâmica: Ocorre através da reação de um catalisador ou reagente que possui reatividades diferentes dependendo do enantiômero de um racemato. O catalisador usado pode ser um biocatalisador (enzima ou microrganismo), um catalisador ácido ou básico ou um complexo metálico. Na resolução cinética, apenas um dos enantiômeros será transformado em produto, sendo o rendimento da reação máximo teórico de 50 %. A associação da resolução cinética com uma reação de racemização do enantiômero não-reativo gera a resolução cinética dinâmica, aumentando o rendimento máximo teórico para 100 %.

2.2. AMINAS QUIRAIS

Aminas enantiomericamente puras têm sido usadas como auxiliares quirais, agentes de resolução e como blocos de construção ou, "*building blocks"* para a indústria farmacêutica e agroquímica, sendo um importante segmento do mercado de moléculas quirais (GHISLIERI; TURNER, 2014). Esses blocos de construção são moléculas reagentes básicas usadas na síntese orgânica e, além das aminas, outros compostos como aminoácidos, ésteres, ácidos e amino álcoois são essenciais para essas indústrias (KOHLS; STEFFEN-MUNSBERG; HÖHNE, 2014; LIN; YOU; CHENG, 2011).

É estimado que cerca de 40% dos fármacos possuam uma amina quiral em sua estrutura, e sua síntese de forma sustentável e com custo competitivo ainda é um desafio para a indústria (GHISLIERI; TURNER, 2014). Na figura 5 estão alguns exemplos de fármacos que contêm aminas quirais

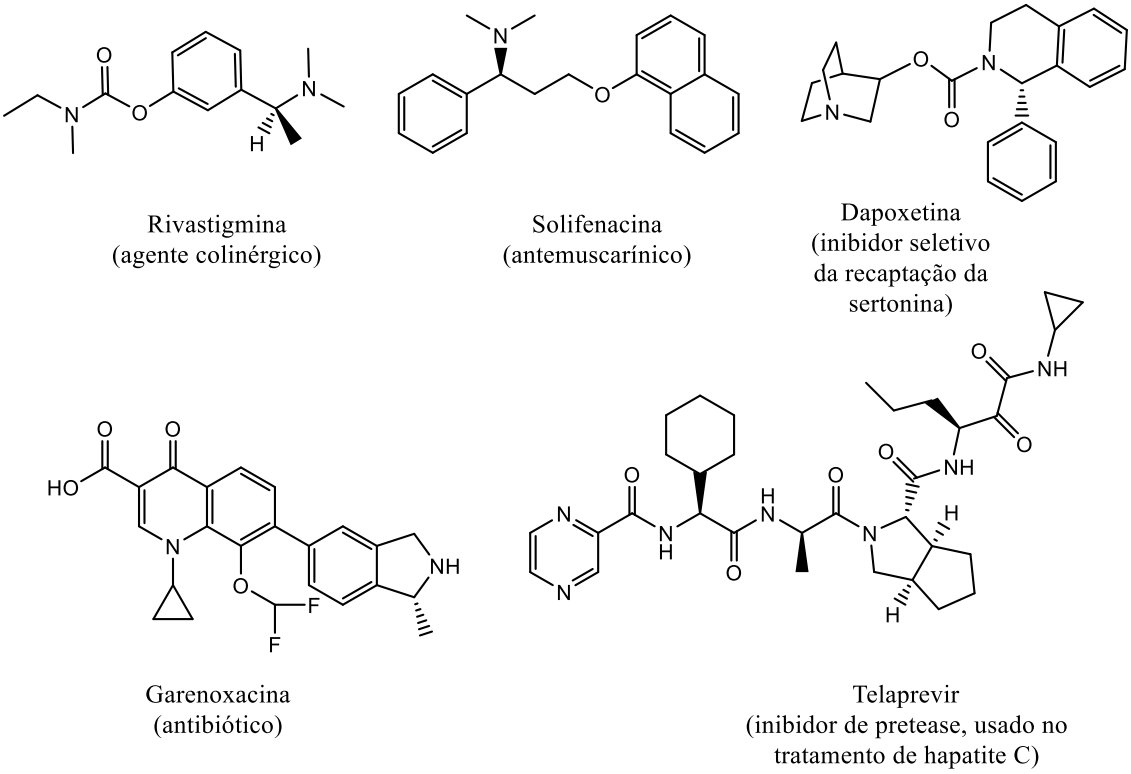


Figura 5: Exemplos de fármacos contendo aminas quirais.
Adaptado de Ghisleri & Turner (2014).

Existem diversas vias para a síntese de aminas quirais conforme apresentado na figura 6. A redução enantiosseletiva de iminas e enaminas, a adição nucleofílica de C-H e a hidrogenação assimétrica de imina ou emina estão entre as metodologias de síntese assimétrica mais usadas (GHISLIERI; TURNER, 2014). Dentre esses, a resolução cinética (onde um dos enantiômeros de uma mistura racêmica reage mais rápido que o outro) ainda é o método mais utilizado para se obter aminas enantiomericamente puras industrialmente (XU, SEN *et al.*, 2018).

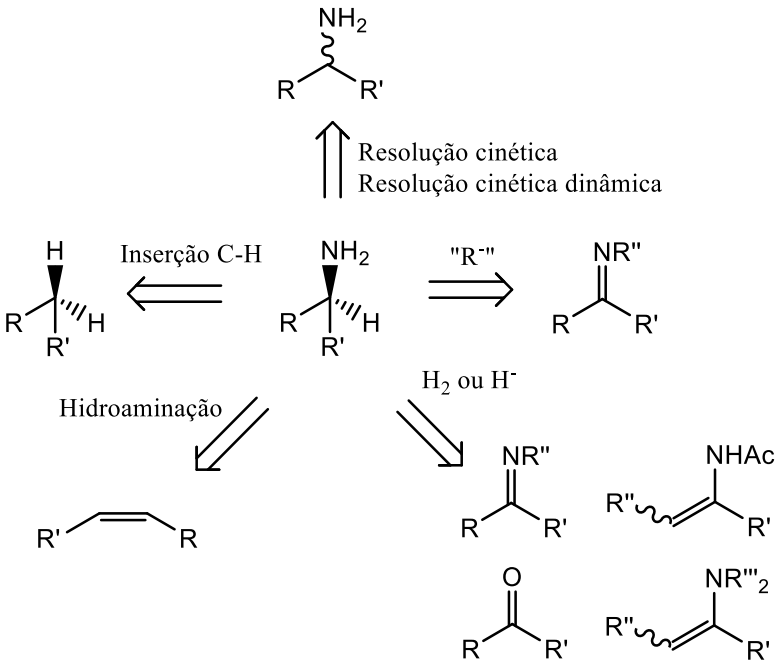


Figura 6: Estratégias para a síntese de aminas quirais.
Adaptado de Ghisleri & Turner (2014) e Nugent & El-Shazly (2010).

2.2.1. OBTENÇÃO DE AMINAS POR VIA BIOTECNOLÓGICA

Devido à importância de aminas em diversos segmentos, diversos trabalhos têm descrito o desenvolvimento de protocolos mais simples e eficientes para a obtenção desses compostos enantiomericamente puros (PIAZZOLLA; TEMPERINI, 2018). O surgimento dos 12 princípios da Química Verde e as novas restrições ambientais em países como Estados Unidos, Japão e da União Europeia vêm impactando a indústria e a pesquisa, impulsionando-os a trazer soluções catalíticas mais sustentáveis (SCHMID *et al.*, 2001).

Nesse contexto, processos catalisados por enzimas são boas alternativas por apresentarem propriedades interessantes, como a possibilidade de se trabalhar em condições reacionais brandas e utilizando solventes orgânicos ou aquosos, além da alta quimio-, regio- e enantiosseletividade apresentada, conjugada com a grande gama de substratos que podem ser usados (MUÑOZ SOLANO *et al.*, 2012; SCHMID *et al.*, 2001).

Para a produção de aminas quirais, os biocatalisadores são interessantes pois são capazes de diferenciar os enantiômeros de um substrato racêmico, sendo possível a produção de compostos opticamente puros. Dentre as principais enzimas usadas para a obtenção de aminas estão as lipases, amino-oxidases, imina redutases, amina desidrogenase e transaminases, como mostra a figura 7 (GHISLIERI; TURNER, 2014).

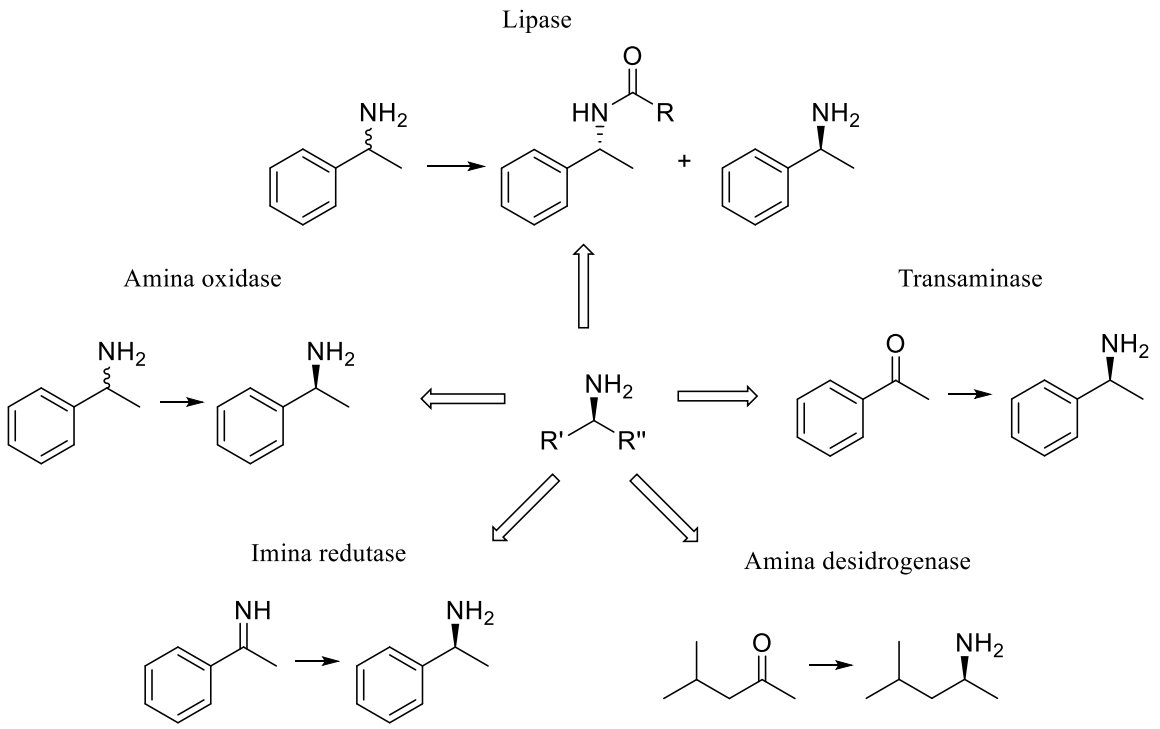


Figura 7: Reações catalisadas por enzimas para a obtenção de aminas quirais.
Adaptado de Ghislieri & Turner (2014)

As transaminases têm recebido grande interesse devido à sua capacidade de catalisar a transferência reversível entre um grupamento amino e um grupamento carbonila (GOMM; O'REILLY, 2018). Já foram identificadas (*S*)- e (*R*)-transaminases e elas são altamente estereoespecíficas, sendo capaz de sintetizar aminas com altos valores de excesso enantiomérico e usando doadores de amino baratos (FESKO *et al.*, 2013). No entanto, alguns desafios encontrados ainda limitam o uso dessa enzima, como a sua inibição ao produto e ao substrato, e a dificuldade de deslocar o equilíbrio da reação (GOMM; O'REILLY, 2018).

As amina oxidases catalisam a oxidação de aminas em iminas. Para a obtenção de enantiômeros puros a partir de uma amina racêmica, a enzima é usada em conjunto com um agente redutor para se formar um ciclo catalítico. Dessa forma, o enantiômero desfavorável para a reação da enzima é enriquecido em uma série de ciclos de oxidação e redução (GROGAN, 2018)

As imina redutases agem na ligação dupla de C=N, gerando aminas enantiomericamente puras. Essas enzimas nativas são restritas a poucos substratos, fazendo seu uso em síntese orgânica ser ainda limitado (MITSUKURA; YOSHIDA, 2017). O uso de amina desidrogenases também é limitado, e somente um trabalho existe sobre o uso dessa enzima nativa. Nos últimos anos, uma pequena quantidade de trabalhos foi feita para

a produção de amina desidrogenases recombinantes, com o intuito de otimizar a reação de aminação redutiva de cetonas para a produção de aminas quirais. Até o momento não se tem muito conhecimento sobre as condições ideais de reação e especificidade ao substrato (KNAUS; BÖHMER; MUTTI, 2017)

Por último, as lipases são capazes de catalisar reações de resolução cinética para a obtenção de aminas enantiomericamente puras. Esse processo é caracterizado pela diferença de reatividade entre os enantiômeros de um racemato com um doador de grupamento acila. As lipases são seletivas ao enantiômero *R* do substrato e já são usadas industrialmente para a resolução de diversas moléculas. As serina proteases também podem ser usadas para a resolução cinética de aminas, sendo elas *S*-seletivas (VERHO; BÄCKVALL, 2015). Essa reação e o uso de lipases serão discutidos mais em detalhe nos próximos tópicos.

2.2.2. RESOLUÇÃO CINÉTICA DE AMINAS

A resolução cinética é um processo no qual dois enantiômeros de um racemato reagem com um doador de grupamento acila a taxas diferentes. Uma resolução de aminas é considerada eficiente quando um dos enantiômeros é transformado na amida desejada enquanto o enantiômero não reagido é recuperado sem reagir, conforme figura 8 (AHMED; KELLY; GHANEM, 2012). Essa reação é considerada fácil, já bem estabelecida, e apresenta diversas vantagens, como a alta atividade, alta seletividade e condições de operação brandas (SEDDIGI *et al.*, 2017).

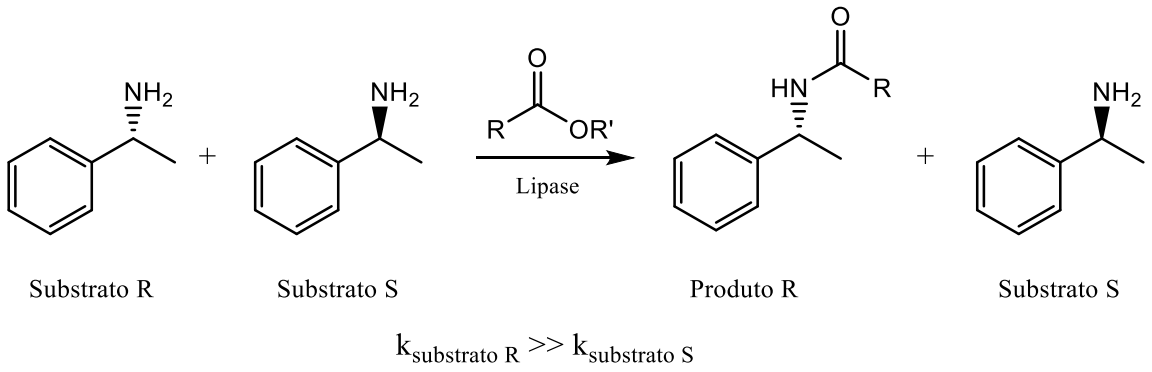


Figura 8: Resolução cinética

Para a maioria das lipases conhecidas, a reatividade do álcool secundário é determinado pela regra de Kazlauskas, que é extensiva para aminas (SEDDIGI *et al.*,

2017). Segundo Kazlauskas e colaboradores, (1991), lipases apresentam uma seletividade maior para o enantiômero *R* de álcoois secundários devido à interação dos substituintes no sítio de ligação do álcool na enzima. Estudos estruturais da lipase mostraram que essa regra é resultante da interação de duas cavidades diferentes localizadas próximas ao sítio de ligação (AHMED; KELLY; GHANEM, 2012). A cavidade maior é localizada na entrada do sítio ativo, e a menor mais no interior da enzima. Com isso, o substituinte maior do álcool encaixa na cavidade maior, resultando na enantiosseletividade da lipase, conforme figura 9 (SEDDIGI *et al.*, 2017).

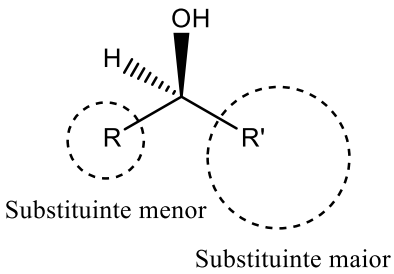


Figura 9: Enantiômero *R* mais reativo.

Para se obter uma alta enantiosseletividade durante a resolução cinética, a reação deve ser rápida e irreversível. Como a pureza enantiomérica do produto e do substrato não reativo diminui com o aumento da reação inversa, diversas estratégias são usadas para reduzir a reversibilidade da reação e garantir uma alta pureza enantiomérica, como o uso de doadores de acila ativados, como enol ésteres, e a supressão de água presente no meio (AHMED; KELLY; GHANEM, 2012).

Chen e colaboradores (1982) desenvolveram parâmetros quantitativos para a avaliação de resoluções cinéticas bioquímicas. Usando o excesso enantiomérico do substrato (ee_s) e do produto (ee_p), foi proposto o cálculo da conversão (C) e da razão enantiomérica (E), que é um parâmetro de seletividade relacionado às constantes de velocidade de reação de cada enantiômero. O cálculo dessas variáveis pode ser feito de acordo com as equações 1, 2 e 3.

(Eq. 1) $$C = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p}$$

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

(Eq. 3) $E = \frac{\ln[(1-C)(1-ee_s)]}{\ln[(1-C)(1+ee_s)]} = \frac{\ln[1-C(1+ee_p)]}{\ln[1-C(1-ee_p)]}$

Uma reação com razão enantiomérica de 1 (E=1), é aquela em que ambos enantiômeros reagem a uma mesma velocidade. Uma reação com E=100, é aquela que um enantiômero reage 100 vezes mais rápido do que o outro, ou seja, é mais enantiosseletiva. Segundo Faber (2018), reações com uma razão enantiomérica abaixo de 15 são inaceitáveis do ponto de vista prático. Reações com E entre 15 e 30 podem ser consideradas como moderadas ou boas, e acima desse valor são consideradas excelentes. No entanto, reações com conversões com muito baixas ou muito altas não podem ter a razão enantiomérica calculada devido a erros na manipulação de amostras, logo, E > 200 não podem ser calculados de forma acurada.

A maior desvantagem da resolução cinética é o rendimento máximo teórico de 50%, uma vez que a enzima só reage com um dos enantiômeros da mistura. Para contornar esse problema, é feita a combinação da resolução cinética com a racemização *in situ* do enantiômero restante, resultando em um processo de resolução cinética dinâmica que tem o rendimento máximo teórico de 100%, como mostra a figura 10 (XU, SEN *et al.*, 2018).

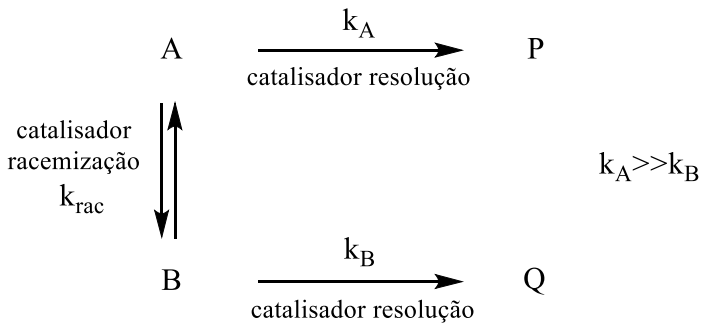


Figura 10: Resolução cinética dinâmica.
Adaptado de Xu *et al.* (2018)

2.2.3. Resolução cinética dinâmica de aminas

Em uma resolução cinética dinâmica, a racemização é na maioria das vezes a etapa limitante na resolução cinética dinâmica (XU, SEN *et al.*, 2018). Existem 4 mecanismos mais comuns para a reação: a catálise ácido-básica, a catálise enzimática, a indução de radical e a catálise usando metais de transição. A racemização através das catálises ácido-básica e enzimática são raras e geralmente não são aplicadas na resolução cinética dinâmica, sendo a mais comum a catálise metálica (LÅNGVIK *et al.*, 2015).

No caso das aminas, a racemização é difícil de ser feita, pois há muito menos catalisadores disponíveis do que para a racemização de álcoois. Isso é decorrente do fato das aminas poderem agir como fortes ligantes de coordenação, o que pode levar à inibição ou desativação completa do catalisador metálico. Nesse caso, a alta temperatura é necessária para perturbar esse ligante indesejado e promover a reação de racemização (VERHO; BÄCKVALL, 2015).

A racemização de aminas catalisada por paládio foi introduzida por Murahashi em 1983 (MURAHASHI *et al.*, 1983). A primeira resolução cinética dinâmica de amina foi reportada em 1996 por Reetz e Schimossek, em que a resolução da 1-feniletilamina foi catalisada pela Lipase B de *Candida antarctica* (CALB) comercial, a Novozym 435® (N435), paládio suportado em carbono usando acetato de etila como doador de acila, e trietilamina como solvente a 50 °C. Após 8 dias de reação, foi obtido 64% de conversão, 75% de seletividade e 99% de excesso enantiomérico (REETZ; SCHIMOSSEK, 1996).

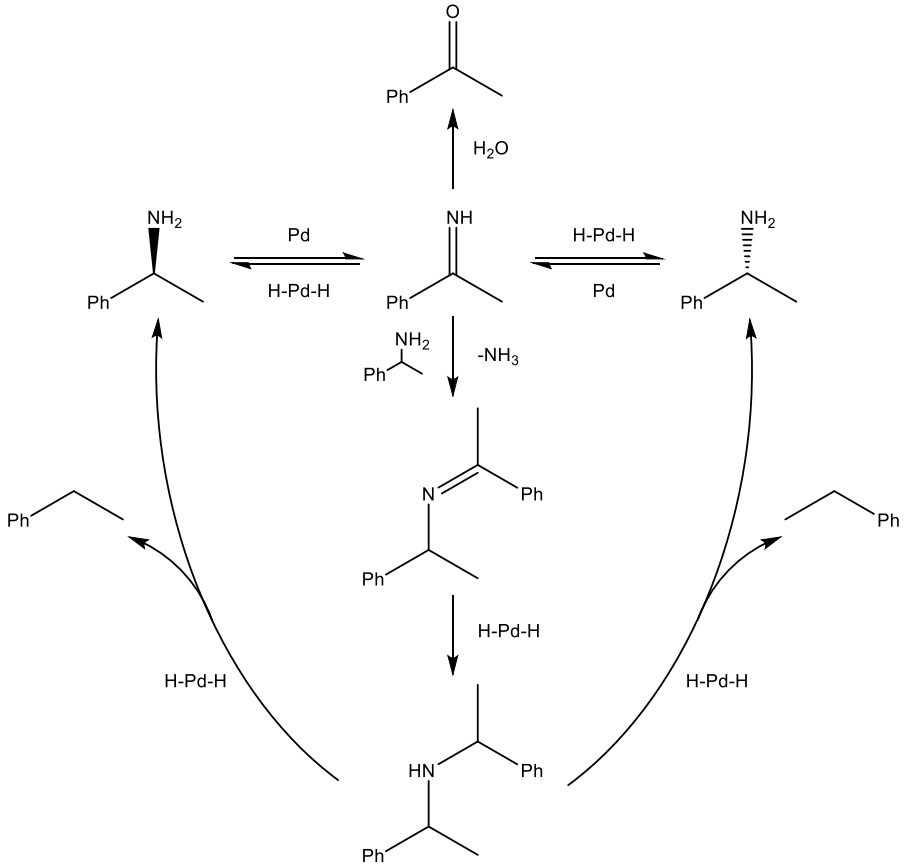
Depois disso, o desenvolvimento de catalisadores de complexos de rutênio do tipo Shvo para a aplicação na resolução cinética dinâmica de aminas pelo grupo de Backväll foram chaves para a obtenção de conversões e seletividades melhores e com tempos mais curtos de reações (PÀMIES *et al.*, 2002; XU, SEN *et al.*, 2018). Primeiramente, foi demonstrado que o complexo de rutênio (figura 11) poderia ser usado para a racemização de diversas aminas a 110 °C.

Figura 11: Complexo de rutênio usado para a racemização de aminas (PAETZOLD; BACKVALL, 2005).

Devido à alta temperatura, a resolução enzimática foi feita separadamente a 40 °C usando a N435 como catalisador. Mais tarde, um complexo similar capaz de racemizar aminas a 90 °C foi desenvolvido e a resolução cinética dinâmica *one-pot* , ou seja, no mesmo meio reacional, foi feita usando a N435 e aminas primárias alifáticas e benzílicas como substrato (PAETZOLD; BACKVALL, 2005).

A racemização de aminas ocorre através da desidrogenação da amina e a posterior hidrogenação da imina intermediária (AHN *et al.*, 2008). Ao longo da reação, a imina intermediária pode se condensar com outra amina, formando uma amina secundária, que

pode se quebrar resultando na amina inicial e no etilbenzeno na presença de hidrogênio. A imina intermediária também é sensível à umidade, podendo se hidrolisar rapidamente formando uma cetona. Por isso, é recomendado o uso de peneira molecular e de solventes secos no meio reacional (KIM, YUNWOONG; PARK; KIM, 2011). O esquema 2 mostra essa reação.



Esquema 2: Mecanismo da racemização da (*S*)-1-feniletilamina catalisada com paládio e os principais subprodutos formados.
Adaptado de Xu *et al.* (2018).

Acredita-se que a racemização ocorra na superfície do metal em temperaturas mais altas e, por isso, sua eficiência depende da dispersão do paládio em seu suporte (LÅNGVIK *et al.*, 2015). Diversas nanopartículas de paládio já foram sintetizadas com o objetivo de se obter uma melhor dispersão e consequentemente o aumento da eficiência de racemização e da resolução cinética dinâmica (CHEN, ZHOU *et al.*, 2018; KIM, MAHN-JOO *et al.*, 2007; PARVULESCU; JACOBS; VOS, 2009; XU, SEN *et al.*, 2018).

Outra forma de otimizar a reação é com o uso de paládio suportado em sais alcalinos terrosos ou então a adição desses sais básicos no meio reacional. Esses compostos são

capazes de suprimir as reações competitivas e aumentar a seletividade do catalisador, pois alteram as propriedades ácido-básicas em sua superfície (JIN *et al.*, 2014).

A resolução cinética dinâmica *one-pot* geralmente aumenta a rentabilidade e a eficiência do processo através da redução de custo, tempo e esforços de trabalho (XU, SEN *et al.*, 2018). Apesar de ser um processo já bem estabelecido para a preparação de aminas quirais, a obtenção de sistemas de resolução cinética dinâmica que tenham sucesso ainda está longe de ser simples, uma vez que alguns requisitos devem ser satisfeitos. Primeiramente, a enzima e o catalisador de racemização têm que ser compatíveis e o agente de racemização não deve reagir com o produto da resolução. Além disso, a taxa de racemização deve ser pelo menos 10 vezes mais rápida que a reação da enzima com o enantiômero lento, e a resolução cinética tem que ter uma enantiosseletividade suficientemente alta ($E \geq 20$) (LÅNGVIK *et al.*, 2015; VERHO; BÄCKVALL, 2015).

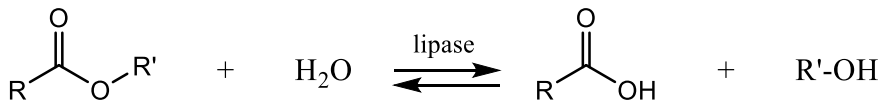
Catalisadores de metais de transição apresentam algumas desvantagens, como o alto custo e a dificuldade de reutilização, o que agrava a poluição causada por íons de metais pesados (XU, YUANFENG *et al.*, 2017). Tendo isso em vista, alternativas que permitam a separação desses catalisadores, a recuperação e o reuso é de extrema importância.

2.3. LIPASES

2.3.1 PRINCIPAIS REAÇÕES

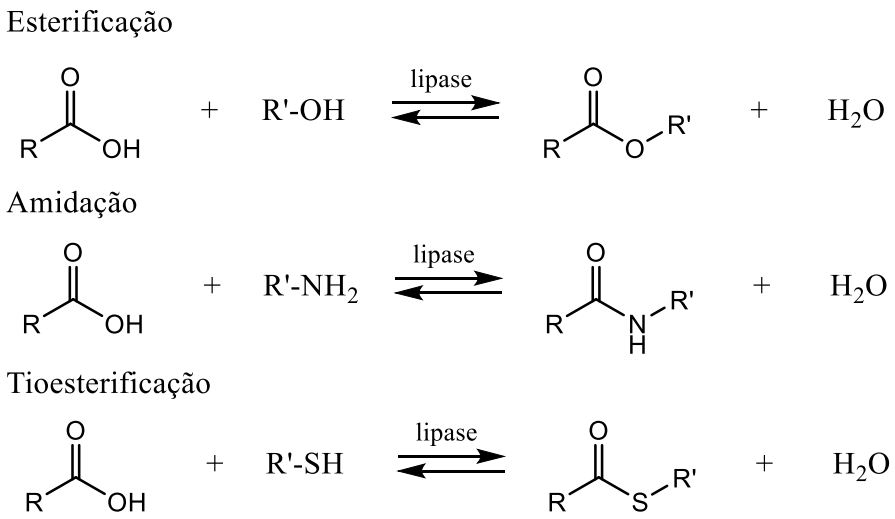
Lipases são enzimas hidrolíticas pertencentes às triacilglicerol acilhidrolases (E.C. 3.1.1.3) (SANDOVAL, 2012). Elas são indispensáveis na natureza para a bioconversão de lipídios em produtos anfipáticos que possam ser metabolizados mais facilmente por animais, vegetais e microrganismos (VAKHLU; KOUR, 2006). O seu uso como biocatalisador apresenta diversas vantagens, como o fato de não necessitar de co-fatores, a possibilidade de ser usada em sua forma livre ou imobilizada, o custo relativamente baixo, a facilidade de obtenção e a grande gama de substratos com os quais ela reage mantendo a alta quimio-, regio- e esteresseletividade (AHMED; KELLY; GHANEM, 2012).

Sua principal reação é a hidrólise da ligação éster de tri-, di- e monoglicerídeos na presença de água, gerando ácidos graxos e glicerol, conforme esquema 3 (SANDOVAL, 2012).



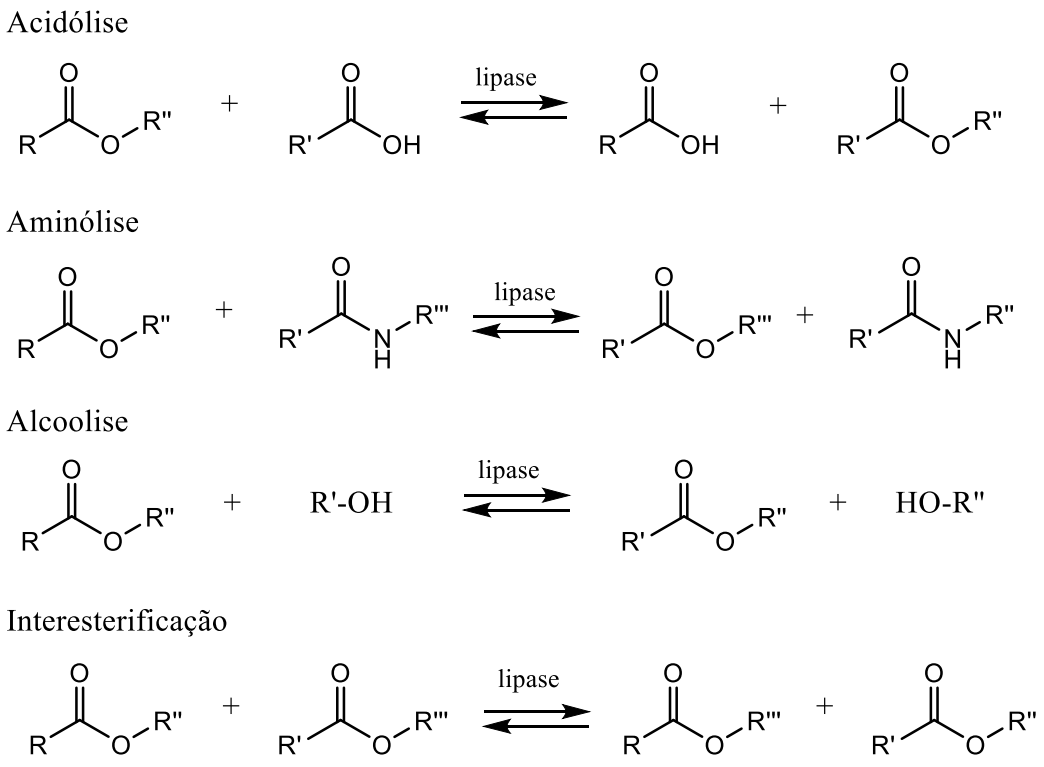
Esquema 3: Reação de hidrólise de triacilglicerol catalisada pela lipase

Além da hidrólise, as lipases também são capazes de catalisar uma grande variedade de reações de síntese mantendo a alta seletividade, como as reações de esterificação e transesterificação em meio orgânico (JONAS *et al.*, 1994; VAKHLU; KOUR, 2006). Ao contrário da hidrólise, essas reações são favorecidas em condições com pouca água (KIM, YUNWOONG; PARK; KIM, 2011). A reação de esterificação é a reação na qual um ácido graxo e um álcool se ligam de forma covalente produzindo um éster e liberando uma molécula de água. Reações similares à esterificação são as de tioesterificação e amidação, nas quais os substratos contém funções tiol e amina e estão ilustradas no esquema (SANDOVAL, 2012).



Esquema 4: Reações de esterificação.

A reação de transesterificação mais comum ocorre entre um éster e um álcool ou ácido carboxílico, gerando um novo éster. Outras reações do tipo incluem reações de aminólise e interesterificação (LAI *et al.*, 2018). O esquema 5 representa as reações de transesterificação catalisadas por lipase.



Esquema 5: Reações de transesterificação.

Tanto a reação de esterificação quanto a reação de transesterificação ocorrem em meio anidro, quando um doador do grupamento acila está presente, e sua eficiência depende da nucleofilicidade do substrato doador (ANSORGE-SCHUMACHER; THUM, 2013). A irreversibilidade das reações de esterificação e transesterificação também é importante para manter a alta eficiência de resoluções bioquímicas, além de ajudar a manter a pureza enantiomérica da reação (BORNSCHEUER; KAZLAUSKAS, 2006). Além de minimizar a presença de água no meio, o substrato doador de acila deve ser escolhido cuidadosamente para direcionar a reação no sentido desejado (ANDERSCH *et al.*, 1997).

Para a resolução de moléculas finas, é comum usar doadores de acila ativados (figura 12), como enol-ésteres, anidridos e vinil carbonatos, que reagem mais rapidamente que ácidos ou ésteres, além de dirigir o equilíbrio da reação a favor da acilação (ANDERSCH *et al.*, 1997; BORNSCHEUER; KAZLAUSKAS, 2006).

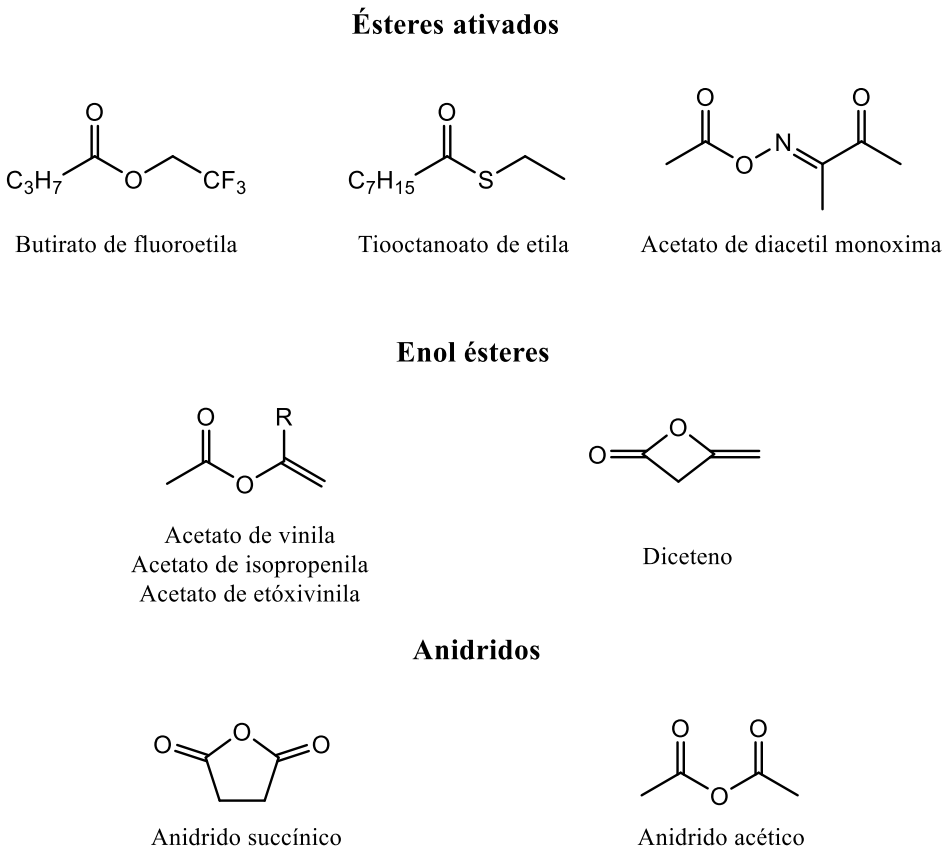


Figura 12: Doadores de acila ativados Bornscheuer e Kazlauskas (2006).

Para evitar a hidrólise, pode-se usar também um excesso do doador de acila ou dividir a reação em duas etapas, retirando o produto e submetendo o substrato a uma segunda esterificação. No caso de acilações de aminas, por estas serem mais nucleofílicas que álcoois, os doadores de acila ativados devem ser evitados por reagirem na ausência da lipase, então são usados ésteres não ativados que reajam mais lentamente. Doadores de acila como etilmetoxiacetato, dialil carbonatos e cianometil 4-pentenoato podem ser empregados, assim como a minimização do tempo de contato entre o doador de acila e a amina (BORNSCHEUER; KAZLAUSKAS, 2006; FABER, 2018).

2.3.2. Estrutura e mecanismo de reação das lipases

Lipases são eficientes catalisadores de substratos insolúveis em água devido à hidrofobicidade de seu substrato natural, os triglicerídeos (BORNSCHEUER; KAZLAUSKAS, 2006). Por elas serem enzimas hidrossolúveis, são operadas para agir na interface entre o meio aquoso e não aquoso (MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012). Os substratos com grupamento éster são mais polares que hidrocarbonetos simples, logo,

eles têm a tendência de se encontrarem entre a fase oleosa e a interface. Da mesma forma, a lipase se posiciona entre a fase aquosa e a interface, o que possibilita a orientação e a concentração de enzima e substrato em uma mesma fase bi-dimensional (BROCKMAN, 2013).

Na presença de interfaces, ocorrem mudanças conformacionais que distorcem a estrutura da lipase, num processo chamado de ativação interfacial, deixando sua região hidrofóbica exposta e preparada para interagir com o substrato (MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012). Essa alteração conformacional é caracterizada pela abertura de uma tampa, ou,"*lid*" composta por uma ou mais α-hélices de comprimentos variáveis, que expõe o sítio catalítico e orienta um dos resíduos oxiânions estabilizantes na posição catalítica (BORNSCHEUER; KAZLAUSKAS, 2006; SARMAH *et al.*, 2018).

Na ausência do meio interfacial, a maioria das lipases têm elementos de estrutura secundários que são capazes de fechar a estrutura central do sítio ativo, deixando-o inacessível ao substrato e com a atividade reduzida (MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012). Algumas lipases não necessitam da ativação interfacial, seja por apresentarem uma tampa anfifílica cobrindo o sítio ativo (HOU; SHIMADA, 2009), por não apresentarem uma tampa, ou por apresentarem uma tampa pequena, como as provenientes de *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida antarctica* (MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012).

A estrutura do sítio catalítico da lipase é uma dobra α/β-hidrolase que consiste em β-folhas conectada a α-hélices. Isso suporta a tríade catalítica composta por serina, histidina e aspartato ou glutamato e diversos resíduos estabilizantes de oxiânions (BORNSCHEUER; KAZLAUSKAS, 2006; BROCKMAN, 2013). O sítio catalítico (figura 13) contém a sequência de aminoácidos composta por Gli-His-Ser-Asp/Glu-Gli (SARMAH *et al.*, 2018).

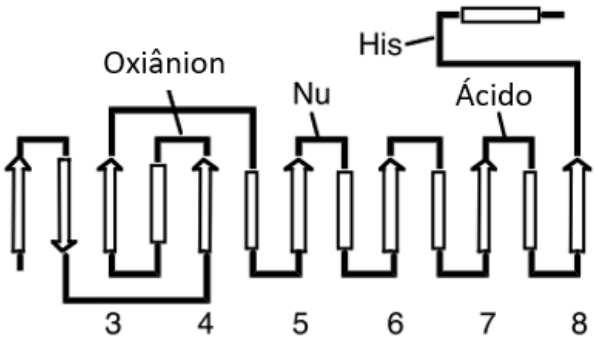
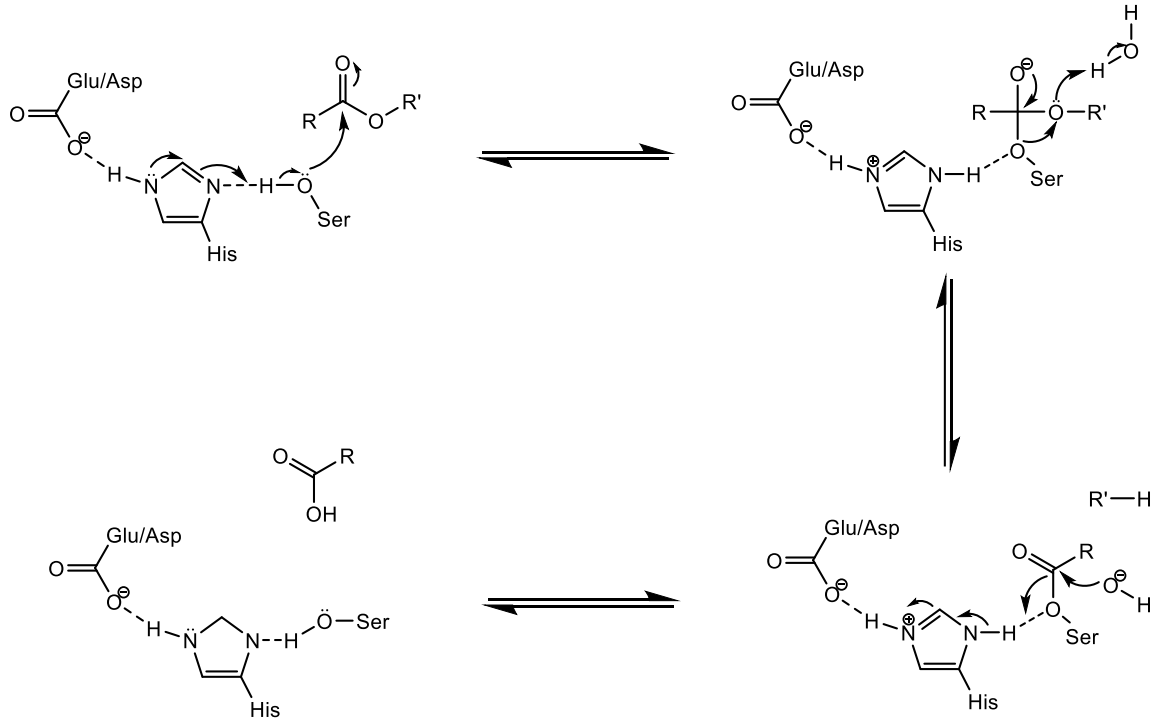


Figura 13: Modelo de α/β-hidrolase, com β-folhas representada em setas e α-hélices em retângulos. Oxiânion é onde estão os resíduos que estabilizam os oxiânions e o resíduo nucleofílico (Nu) é uma serina. Adaptado de Bornscheuer & Kazlauskas (2006).

O mecanismo da hidrólise catalítica das lipases é similar ao das serina proteases e está ilustrado no esquema 6. Num primeiro passo, a interação entre o resíduo carregado negativamente de aspartato ou glutamato permite ao resíduo de histidina agir como uma base e remover um próton no grupamento hidroxila do sítio ativo de serina. Consequentemente, a nucleofobicidade do resíduo hidroxil da serina é aumentado e ataca o grupamento carbonila do acilglicerol, formando um intermediário tetraédrico. O colapso desse intermediário tetraédrico libera um álcool e forma o intermediário acil-enzima. O passo de deacilação é controlado pela nucleofobicidade das moléculas da interface (MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012). Nesse processo, um nucleófilo (por exemplo, a água) ataca a enzima acilada para a formação de um segundo intermediário tetraédrico e o colapso desse intermediário libera um ácido (BORNSCHEUER; KAZLAUSKAS, 2006).



Esquema 6: Mecanismo de reação da hidrólise catalisada pela lipase.
Adaptado de Mendes *et al.* (2012).

Alternativamente, na reação de transesterificação, um álcool ataca o intermediário acil-enzima, liberando um novo éster. Na maior parte dos casos, acredita-se que a formação do intermediário acil-enzima é a etapa rápida, sendo a deacilação a etapa determinante (BORNSCHEUER; KAZLAUSKAS, 2006).

A eficiência da reação é caracterizada pela atividade enzimática, que mede o potencial de uma enzima catalisar uma reação específica. Essa atividade é comumente quantificada como a quantidade de produto produzido por unidade de tempo sob uma condição especificada. O resultado obtido é reportado em termos de atividade específica, que se refere à atividade normalizada pela quantidade de enzima utilizada na reação (DASETTY; BLENNER; SARUPRIA, 2017).

Uma unidade de atividade de hidrólise (U) é definida pela quantidade de enzima que libera 1 µmol de ácido graxo por minuto, e não existe ainda um protocolo padrão, já que cada grupo de pesquisa ou fornecedor de enzima usa um procedimento diferente (alterando parâmetros como temperatura, tempo e volume reacional). A forma mais comum de determinar essa atividade lipases é através da reação de hidrólise de um triglicerídeo em um sistema de emulsão através da titulação dos ácidos graxos com uma solução de hidróxido de sódio. Outro método comumente utilizado é o método colorimétrico, que

envolve a hidrólise de *p*-nitrofenil ésteres gerando o *p*-nitrofenol. A medida da absorbância é feita usando um espectrofotômetro (BORNSCHEUER; KAZLAUSKAS, 2006).

A atividade de esterificação também pode ser medida para as lipases, e geralmente é feita através da titulação do ácido residual da reação de esterificação entre ele e um álcool. A unidade de atividade de esterificação (U) é definida pela quantidade de enzima necessária para consumir 1 µol de ácido por minuto (CENI *et al.*, 2010; CIPOLATTI, ELIANE PEREIRA *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2011).

2.3.3. CLASSIFICAÇÃO DAS LIPASES

As lipases podem ser classificadas de acordo com a especificidade ao substrato, com a regiosseletividade e com a enantiosseletividade (SARMAH *et al.*, 2018). A especificidade ao substrato é diferente para cada lipase e pode depender do tamanho da cadeia de carbonos do substrato, do número de ligações duplas, da posição de ligações ésteres no glicerol, entre outros (BROCKMAN, 2013; HOU; SHIMADA, 2009).

A preferência da lipase por um substrato com um determinado tamanho de cadeia está relacionada diretamente ao tamanho do sítio catalítico e da natureza dos aminoácidos presentes. Da mesma forma, a lipase pode apresentar uma quimiosseletividade, tendo maior especificidade a um grupamento químico (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

A regiosseletividade define o ataque preferencial das lipases a uma determinada ligação éster de triglicerídeos. Com isso, as lipases podem ser regiosseletivas com as ligações *sn*-1(3), *sn*-2 ou não serem regiosseletivas (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012). Lipases específicas a ligações *sn*-2 não são comuns, sendo a diferenciação entre elas decorrente da seletividade com ligações *sn*-1(3) ou não (HOU; SHIMADA, 2009). Lipases enantiosseletivas reagem preferencialmente e são capazes de diferenciar um dos isômeros de uma mistura racêmica e essa característica é de grande interesse à indústria farmacêutica (CARVALHO *et al.*, 2015; SARMAH *et al.*, 2018).

Outra forma de se classificar as lipases é com relação à sua origem, uma vez que células de animais, vegetais e microrganismos produzem lipase para a digestão de gorduras e lipídeos. A lipase pancreática suína foi uma das primeiras reconhecidas e ainda é muito estudada devido à sua acessibilidade e ao baixo custo. Atualmente, ela é usada em diversas aplicações biotecnológicas, como no tratamento de água contaminada com resíduo lipídico, na síntese de biodiesel, de fármacos e na resolução de racematos (MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012). No entanto, as lipases provenientes de animais podem conter

resíduos, como hormônios e outras enzimas, o que faz seu uso ser limitado a algumas indústrias (SANDOVAL, 2012; TUVIGNON *et al.*, 2008).

As lipases de fontes vegetais podem ser isoladas de folhas, sementes, látex e óleos de plantas oleaginosas e cereais, podendo ser consideradas atrativas devido ao baixo custo de obtenção, à alta especificidade e à alta aceitabilidade de seu uso (SANTOS, KÁDIMA C. *et al.*, 2013; SARMAH *et al.*, 2018). Lipases com altas atividades podem ser identificadas em sementes devido à alta concentração de triacilgliceróis, que são hidrolisados para a obtenção de energia durante a germinação (SARMAH *et al.*, 2018). No entanto, essas lipases ainda são pouco estudadas e têm sua comercialização limitada devido à dificuldade de purificação, uma vez elas têm baixa expressão nos tecidos e suas atividades são reduzidas ao se empregar os processos tradicionais de separação (SETH *et al.*, 2014).

Microrganismos como fungos, leveduras e bactérias são fontes importantes para a produção de lipases e são usados para a produção em larga escala, devido à grande variedade de lipase disponível, à alta estabilidade em comparação com lipases de outas fontes, à facilidade de manipulação genética, à possibilidade de produção contínua sem sazonalidade e ao seu crescimento rápido em meios baratos (HOU; SHIMADA, 2009; RAY, 2012). A maioria dessas lipases são extracelulares e podem ser obtidas através de processos de fermentação submersa ou fermentação em estado sólido (GUPTA *et al.*, 2015).

Diversos microrganismos foram identificados como produtores de lipase, mas as espécies *Rhizopus*, *Candida* e *Rhizomucor*, entre os fungos, e as espécies *Pseudomonas* e *Chromobacterium*, entre as bactérias, são as mais usadas comercialmente. Lipases de microrganismos aquáticos também já foram reportadas, porém a sua produção fora do ambiente natural é desafiadora (NAVVABI *et al.*, 2018).

Além dessas enzimas nativas, existem diversos trabalhos envolvendo tecnologias de DNA recombinante para melhorar a produção ou síntese, assim como a atividade, especificidade e a estabilidade de lipases. A estrutura das enzimas tem papel fundamental na determinação de suas atividades catalíticas e condições de operação, com isso, muitos estudos são feitos para esclarecer a relação e aprimorar novas enzimas (DASETTY; BLENNER; SARUPRIA, 2017).

2.3.4. MERCADO E APLICAÇÕES

Em 2015, o mercado de lipase era de 100 milhões de dólares com uma taxa de crescimento anual composto de 8,2% (GUPTA *et al.*, 2015). Existem mais de 70 lipases disponíveis comercialmente (BORNSCHEUER; KAZLAUSKAS, 2006) e as principais empresas que comercializam essas enzimas são a Novozymes, DuPont e Roche (GUPTA *et al.*, 2015).

Até as últimas décadas do século XX, o uso industrial da lipase estava limitado aos setores de laticínios e à indústria óleo-química. No entanto, esse uso aumentou drasticamente, tendo novas aplicações na indústria de alimentos e sendo inserida em outros setores, como na indústria médica, papel, couro, farmacêutica, pesticidas, além da inserção em biossensores, na gestão de resíduos, entre outros vastos usos (VAKHLU; KOUR, 2006). As principais aplicações encontram-se na tabela 1.

Tabela 1: Principais indústrias onde as lipases são usadas.

Indústria	Aplicação	Fonte
Laticínios	• Hidrólise da gordura de leite • Flavorizantes de queijos, manteigas e cremes • Emulsificantes e surfactantes para melhorar a consistência de cremes e molhos	(RAY, 2012; SETH *et al.*, 2014)
Cosméticos	• Esfoliação, redução da gordura corporal • Síntese de ésteres, emolientes, surfactantes, ésteres aromáticos e espessantes	(ANSORGE-SCHUMACHER; THUM, 2013)
Combustível	• Produção do biodiesel (processo ainda não industrial)	(GUPTA *et al.*, 2015; MITTELBACH, 1990; OKORO; SUN; BIRCH, 2018)
Farmacêutica	• Intermediários de fármacos e processos que necessitam da régio-, químio- e enantiosseletividade	(CARVALHO *et al.*, 2015)
Detergentes	• Lavanderia industrial • Detergentes domésticos	(SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012)

2.3.5. LIPASE B DE *CANDIDA ANTARCTICA* (CALB)

A lipase B da levedura *Candida antarctica* (figura 14), é uma das lipases mais usadas por ser um biocatalisador versátil, com aplicações em reações de síntese orgânica tanto em escala laboratorial, quanto em escala industrial (STAUCH; FISHER; CIANCI, 2015). Devido à sua grande enantiosseletividade, alta especificidade à diversos substratos, e alta estabilidade térmica e a solventes orgânicos, ela é usada em reações de polimerização, resolução de álcoois e aminas, dessimetrização de intermediários de drogas complexas, entre outros (EOM *et al.*, 2013).

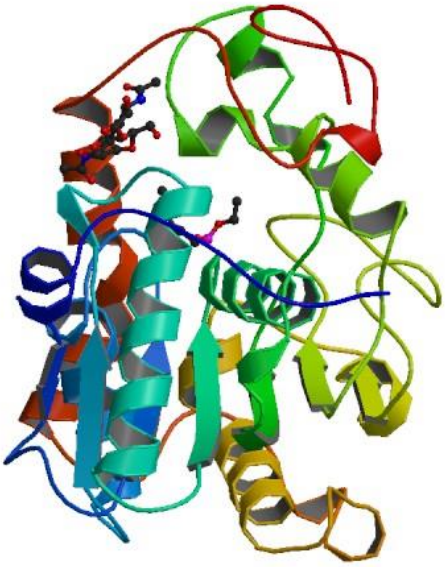


Figura 14: Lipase CALB.
Fonte: RSCB PDB https://www.rcsb.org/structure/1lbs Data de acesso: 16/12/18

Do ponto de vista estrutural, a CALB é uma lipase típica, sendo parte da família de hidrolases com folhas α/β e com a tríade catalítica composta por Ser-Asp-His (ZISIS *et al.*, 2015). É uma enzima globular, constituída por 317 aminoácidos, com peso molecular de 33 kDa, ponto isoelétrico em pH 6 e apresenta atividade ótima em pH 7 e a 45 °C (DASETTY; BLENNER; SARUPRIA, 2017; JONAS *et al.*, 1994). Sua forma comercial é uma proteína recombinante produzida por fungos do gênero *Aspergillus* spp, e a forma livre contem entre 16 a 51 % de proteína no extrato (BORNSCHEUER; KAZLAUSKAS, 2006). Sua forma imobilizada também é encontrada comercialmente, sendo a mais conhecida a Novozym 435® (Novozymes), que corresponde à CALB adsorvida em uma resina acrílica macroporosa (EOM *et al.*, 2013; SHELDON; VAN PELT, 2013).

A ativação interfacial e a presença da tampa característica de lipases é largamente debatida na literatura para a CALB, e a maioria dos autores afirmam que ela não apresenta ativação interfacial, apesar de ter uma pequena tampa que não cobre totalmente o sítio ativo (BORNSCHEUER; KAZLAUSKAS, 2006; DASETTY; BLENNER; SARUPRIA, 2017; PINTO; FREIRE; PINTO, 2014). Sua alta seletividade está relacionada ao espaço disponível em seu sítio catalítico esquematizado na figura 15, que é mais limitado em comparação com outras lipases (ANDERSON; LARSSON; KIRK, 1998).

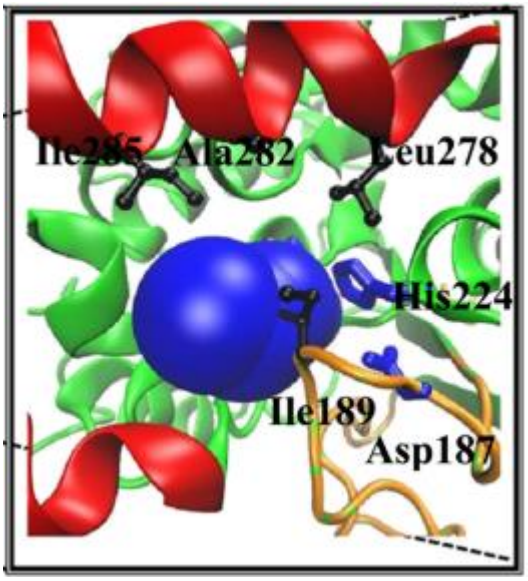


Figura 15: Sítio catalítico da CALB contendo a tríade catalítica (Ser105, His224 d Asp187 em azul e os quatro resíduos hidrofóbicos (Ile189, Leu278, Ala282 e Ile 285) localizados na entrada do sítio catalítico em preto.

A CALB não é capaz de hidrolisar triglicerídeos de forma tão eficiente quanto outras lipases. No entanto, por manter uma alta estereoespecificidade a substratos quirais durante a hidrólise e as reações de síntese, esta possui um grande potencial para diversas aplicações (JONAS *et al.*, 1994). Com isso, a CALB é muito usada na resolução racêmica de álcoois e ácidos, com o objetivo de se obter compostos opticamente puros que são difíceis de serem obtidos através de outras rotas (ANDERSON; LARSSON; KIRK, 1998).

Quando imobilizada, a CALB pode ser estável em temperaturas entre 60-80 °C sem perda significativa de atividade, mesmo após horas de uso e em altas concentrações do substrato (PÀMIES *et al.*, 2002).

2.4. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A baixa estabilidade, a dificuldade de serem reutilizadas e o alto custo associado às enzimas são algumas das razões para esses biocatalisadores ainda serem pouco usados em escala industrial. Algumas metodologias são empregadas para reverter esse cenário, e a imobilização enzimática tem sido ainda a principal solução empregada, por permitir o aumento da atividade catalítica e estabilidade, facilitar o manuseio, a recuperação e o reciclo dos biocatalisadores imobilizados, reduzindo progressivamente e proporcionalmente o custo industrial (ZHANG; YUWEN; PENG, 2013).

A imobilização de enzimas é geralmente caracterizada pela associação das mesmas em uma matriz sólida ou em um meio diferente daquele onde estão os substratos e os produtos. Vários tipos de materiais podem ser usados como suporte, e o sistema ideal deve apresentar algumas características, como ser econômico, inerte, estável, resistente fisicamente, capaz de aumentar a atividade e especificidade da enzima, reduzir a inibição do produto e ser capaz de prevenir a contaminação bacteriana. A maioria dos suportes têm apenas algumas dessas propriedades, logo, sua escolha deve ser feita levando-se em conta a enzima e o processo no qual ela será utilizada (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016).

Polímeros orgânicos sintéticos como poliestireno, policloreto de vinila e poliacrilato são insolúveis e podem imobilizar enzimas fortemente devido à sua superfície porosa (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016). Além disso, eles oferecem uma boa rigidez mecânica, alta área específica de superfície e o potencial de trazer grupamentos funcionais de acordo com as necessidades (ZHANG; YUWEN; PENG, 2013).

Polímeros orgânicos naturais, como amido, celulose, alginato e quitosana também podem ser usados como suporte para a imobilização enzimática. Eles têm a vantagem de serem ativados facilmente devido à sua estrutura e podem ser considerados baratos e estão disponíveis em grandes quantidades (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016).

Materiais inorgânicos, como alumina, vidro, óxidos metálicos e materiais derivados de sílica são muito utilizados por terem boa resistência térmica e mecânica, geralmente não têm o custo muito elevado, além de prevenirem o crescimento microbiano (HETTIARACHCHY *et al.*, 2018). Suportes derivados de sílica, como dióxido de silício ou tetraóxido de silício são muito usados como suporte para imobilização por formarem uma rede polimérica em três dimensões. Por serem quimicamente inertes, esses suportes precisam ser modificados, geralmente com aminoalquil trietoxisilanos, para a introdução de grupamentos aminos que possam ser ativados em seguida para a imobilização (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016).

Existem diferentes metodologias de imobilização enzimática e diversos fatores impactam a performance do sistema (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016). A figura 16 ilustra alguns dos principais métodos utilizados.

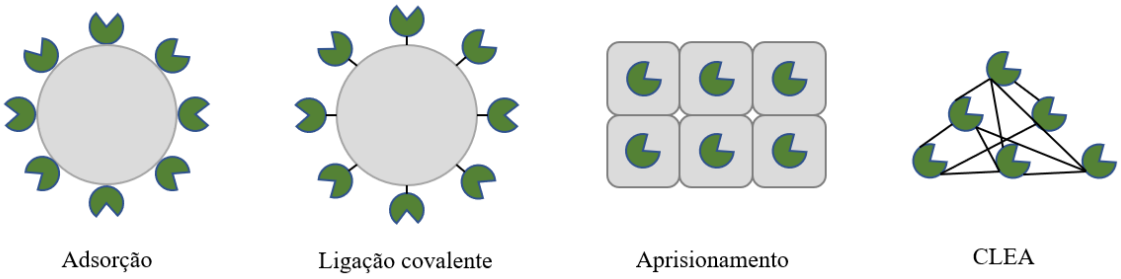


Figura 16: Metodologias de imobilização enzimática.
Adaptado de Gutarra *et al.* (2016)

2.4.1. MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

- Adsorção

A adsorção física permite a ligação entre a enzima e a superfície de um suporte através de forças de ligação fracas, como forças de van der Walls, forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (MOHAMAD *et al.*, 2015). Ela ocorre quando o pH do meio e o ponto isoelétrico da enzima permitem que sua superfície fique carregada, podendo-se ligar a suportes que apresentam cargas complementares (GUTARRA; MIRANDA; SOUZA, 2016; MOHAMAD *et al.*, 2015).

Essa técnica é uma das mais simples, pois pode ser conduzida em condições brandas e possivelmente sem reagentes, resultando em um biocatalisador com alta atividade (ZHANG; YUWEN; PENG, 2013). Destacam-se a adsorção iônica quando as cargas negativas de um suporte atraem as cargas positivas da enzima (e vice-versa), e a adsorção hidrofóbica, quando um suporte com graus diferentes de hidrofobicidade interage com aminoácidos de cadeias laterais. No caso das lipases, esse tipo de ligação pode deixa-las em conformações com a tampa aberta, resultando na sua superativação (GUTARRA; MIRANDA; SOUZA, 2016; RODRIGUES, RAFAEL C *et al.*, 2013). Uma vez que a atividade enzimática decair, é possível fazer a dessorção das enzimas para reutilizar o suporte (MOHAMAD *et al.*, 2015).

A metodologia empregada é a incubação do suporte e da solução enzimática juntos, permitindo a adsorção física ao longo do tempo (MOHAMAD *et al.*, 2015). A área específica de superfície do suporte é o que irá determinar a carga enzimática possível de ser imobilizada e diferentes condições como pH, temperatura e força iônica do tampão influenciam na imobilização (MOHAMAD *et al.*, 2015; ZHANG; YUWEN; PENG, 2013).

A principal desvantagem é a perda de enzimas ao longo do tempo, logo, a adsorção física geralmente é muito fraca para deixar a enzima aderida ao suporte em condições industriais (MOHAMAD *et al.*, 2015; SHELDON, 2007).

- Aprisionamento

O método de imobilização de aprisionamento é o confinamento de enzimas em uma matriz polimérica, como por exemplo polímeros orgânicos ou sílica sol-gel (SHELDON, 2007; SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016). Esse método de imobilização é um dos mais simples e menos agressivos, pois a interação proteína-suporte é fraca e as condições de imobilização são brandas. Materiais formadores de géis orgânicos e inorgânicos como gelatina, agarose, alginato e sílica podem ser usados como suportes (GUTARRA; MIRANDA; SOUZA, 2016).

- Reticulação de enzimas agregadas – "*Cross-linked enzyme aggregates*"(CLEA)

Esse é um tipo de imobilização sem o uso de suportes, em que primeiro é feita a precipitação de agregados a partir de enzimas solúveis, e em seguida a reticulação para a estabilização dos agregados enzimáticos. Na primeira etapa, agentes precipitantes, como sais e solventes orgânicos miscíveis em água, são usados para formar agregados mantidos através de ligações não-covalentes, sem alterar a estrutura terciária das enzimas. Em seguida, esses agregados são reticulados entre si através de reagentes bifuncionais como o glutaraldeído. Após a formação dos reticulados, os agregados se tornam permanentemente insolúveis, mantendo suas estruturas e atividades, conforme figura 17 (MOHAMAD *et al.*, 2015; TALEKAR *et al.*, 2013).

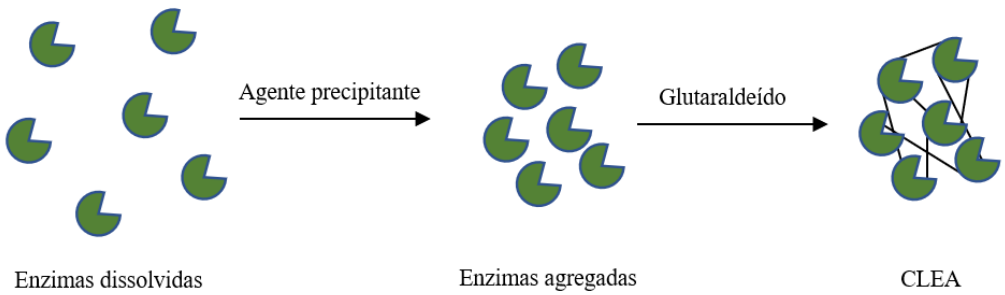


Figura 17: Formação de CLEA.
Adaptado de Talekar (2013)

A formação de CLEAs tem a vantagem de combinar imobilização e concentração em uma única operação (TALEKAR *et al.*, 2013). Além disso, outras principais vantagens do CLEA estão relacionadas à inexistência de um suporte, como por exemplo a alta

atividade por grama de biocatalisador, uma vez que ele é composto apenas por enzimas, a falta de custo extra relacionado ao suporte e a redução de possíveis problemas relacionados à difusão e ao estresse mecânico (GUTARRA; MIRANDA; SOUZA, 2016).

- Ligação covalente

A formação de ligações covalentes é uma das técnicas mais usadas para a imobilização de enzimas. Nela, grupos funcionais enzimáticos como grupamentos amino de lisinas de cadeias laterais, grupamentos tióis de cisteína e grupamentos carboxílicos, fenólicos e imidazólicos de ácido aspártico e glutâmico se ligam a grupamentos eletrofílicos do suporte de forma irreversível (MOHAMAD *et al.*, 2015).

As ligações covalentes geralmente ocorrem em diversos pontos, permitindo à enzima ficar permanentemente fixada, resultando na maioria das vezes em um biocatalisador mais estável e capaz de ser reutilizado diversas vezes. Sua atividade irá depender do tamanho, forma e natureza do material do suporte, além do método de ligação, condições e reagente utilizado (ZHANG; YUWEN; PENG, 2013).

Na maioria das vezes, o suporte ou a enzima tem que ser ativado e a ligação entre aldeídos do suporte e grupamentos amino da enzima é a metodologia mais empregada na ligação covalente. Essa reação envolve a formação de uma base de Schiff entre os grupamentos amino e os aldeídos do suporte e o pH básico pode facilitar a reação através da desprotonação das lisinas. No entanto, a reação também pode acontecer em pH neutro, implicando geralmente em um menor número de ligações entre enzima e suporte. Nesse caso, o glutaraldeído é o reagente mais utilizado para a ativação do suporte, possibilitando a ligação com a base de Schiff da enzima. Grupamentos epóxi também podem ser usados para a ativação da superfície do suporte, porém, eles são considerados menos reativos que aldeídos (LIU, DONG-MEI; CHEN; SHI, 2018).

A direção na qual a enzima ficará após a imobilização é crucial para determinar a sua atividade. No caso de lipases, por exemplo, já foi reportado que os maiores níveis de atividade são obtidos quando os aminoácidos do sítio catalítico não estão envolvidos na ligação com o suporte (MOHAMAD *et al.*, 2015).

A ligação covalente muitas vezes é feita de forma multipontual, em que são feitas diversas ligações entre os grupos ativos do suporte e os resíduos de uma mesma enzima (figura 18). Grupamentos aldeídicos do suporte e amino da enzima são boas escolhas para a ligação multipontual, que geralmente confere maior estabilização à enzima, uma vez que mais ligações contribuirão para o enrijecimento de sua superfície. O número de ligações covalentes possíveis de serem feitas vai depender então do nível de ativação do suporte e

da quantidade de grupamentos amino disponíveis na enzima (RODRIGUES, DASCIANA *et al.*, 2008).

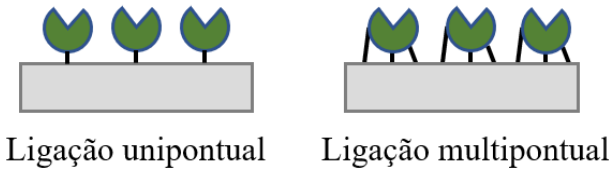


Figura 18: Ligações covalentes unipontuais e multipontuais.

A principal desvantagem da imobilização através de ligações covalentes é que uma vez que a enzima perder a sua atividade, ambos enzima e suporte são inutilizáveis, devendo ser descartados (SHELDON, 2007). Do ponto de vista industrial, o custo extra do suporte e dos agentes de ativação são também impeditivos (GUTARRA; MIRANDA; SOUZA, 2016).

2.4.2. SUPORTES NANOMÉTRICOS

O crescente interesse pela nanotecnologia aumentou o número de nanomateriais usados como suporte para a imobilização de enzimas (ANSARI; HUSAIN, 2012). As nanopartículas podem ter diversas formas, como esferas, tubos, fibras e fios, e geralmente apresentam um tamanho menor do que 100 nanômetros. Até o momento, os biocatalisadores nanométricos já foram estudados nas mais diversas aplicações, como por exemplo como biossensores, na entrega de drogas, na produção de biodiesel e no diagnóstico de doenças (DING *et al.*, 2015).

Seus principais benefícios estão relacionados à alta razão superfície/volume, que permite a incorporação de uma alta carga enzimática por unidade de suporte, uma melhor difusão de massa e uma maior resistência mecânica (CIPOLATTI, ELIANE P *et al.*, 2016). A mobilidade das nanopartículas facilita as interações entre enzima e o substrato devido aos movimentos Brownianos e faz com que a atividade catalítica da enzima seja maior (DING *et al.*, 2015). Além disso, a superfície de nanopartículas pode ser facilmente modificada e funcionalizada com o objetivo de inserir grupamentos que conferem outras características e que possibilitam a ligação covalente com a enzima (MERYAM SARDAR, 2015).

No entanto, como na maioria das vezes os materiais nanométricos não são porosos, as enzimas podem ficar mais expostas, estando mais suscetíveis à fatores externos como

temperatura e pH (CHEN, MING *et al.*, 2017). Outra dificuldade que limita o uso desses suportes na indústria é a difícil recuperação e separação do meio reacional devido ao seu tamanho reduzido (CIPOLATTI, ELIANE P *et al.*, 2016).

2.4.3. SUPORTES MAGNÉTICOS

Nanopartículas magnéticas são estudadas extensivamente e encontram aplicações em diversas áreas, como no tratamento de efluentes, como carreadores de drogas, no tratamento de câncer através da hipertermia, entre outros (CHEN, ZHOU *et al.*, 2018). Essas partículas também podem ser suportes catalíticos interessantes por apresentarem além das vantagens de suportes nanométricos, a facilidade de recuperação do meio reacional, através da aplicação de um campo magnético. (BILAL *et al.*, 2018).

O uso de separação magnética usando nanopartículas superparamagnéticas foi aplicada primeiramente para a triagem celular e para a separação de componentes biologicamente ativos (ROSSI, LIANE; GARCIA; VONO, 2012). A separação magnética tem diversas vantagens em comparação com outras técnicas tradicionais de separação, como a filtração e a centrifugação (MA *et al.*, 2006). Ela é rápida, é altamente eficiente e seletiva, é capaz de reduzir o uso de consumíveis e de solventes, e minimiza a perda de massa, uma vez que a separação pode ser feita sem retirar o material do meio reacional (ROSSI, LIANE; GARCIA; VONO, 2012).

Dentre as diversas nanopartículas magnéticas, as de óxido de ferro como a magnetita (Fe_3O_4) e a maguemita (γ-Fe_2O_3) são as mais estudadas para suportes de catalisadores, devido às propriedades de superparamagnetismo e à rápida resposta ao campo magnético (LIU, DONG-MEI; CHEN; SHI, 2018; NETO *et al.*, 2018). O primeiro sistema catalítico magnético usado data de 1973, em que enzimas foram imobilizadas em um suporte ferromagnético (ROBINSON; DUNNILL; LILLY, 1973). Hoje em dia, a espécie magnética mais usada para a imobilização de biomoléculas e proteínas é a magnetita, devido à sua grande saturação de magnetização e susceptibilidade (BILAL *et al.*, 2018).

A magnetita é um mineral que contém ferro em dois estados de oxidação, Fe^{2+} e Fe^{3+}, e tem uma estrutura cúbica de espinélio invertida. Os íons de oxigênio são coordenados aos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} nos interstícios octaédricos e aos íons Fe^{3+} em interstícios tetraédricos. Como os íons Fe^{3+} estão igualmente distribuídos entre as posições tetraédricas e octaédricas, não existe momento magnético resultante deles. Por causa disso, todos os

íons Fe^{2+} presentes nos interstícios octaédricos são responsáveis pelo comportamento magnético do material (OLIVEIRA; FABRIS; PEREIRA, 2013).

A maguemita geralmente é formada pela transformação do estado sólido de outro óxido de ferro, adotando a forma cristalina do seu precursor (CORNELL; SCHWERTMANN, 2003). No caso da maguemita obtida pela oxidação da magnetita, ela também possui uma estrutura cúbica de espinélio, com a diferença de ter apenas íons Fe^{3+} na estrutura, sendo eles distribuídos em tetraédricos e octaédricos, além de poder apresentar algumas vacâncias (SHOKROLLAHI, 2017). As estruturas dos dois cristais encontram-se na figura 19.

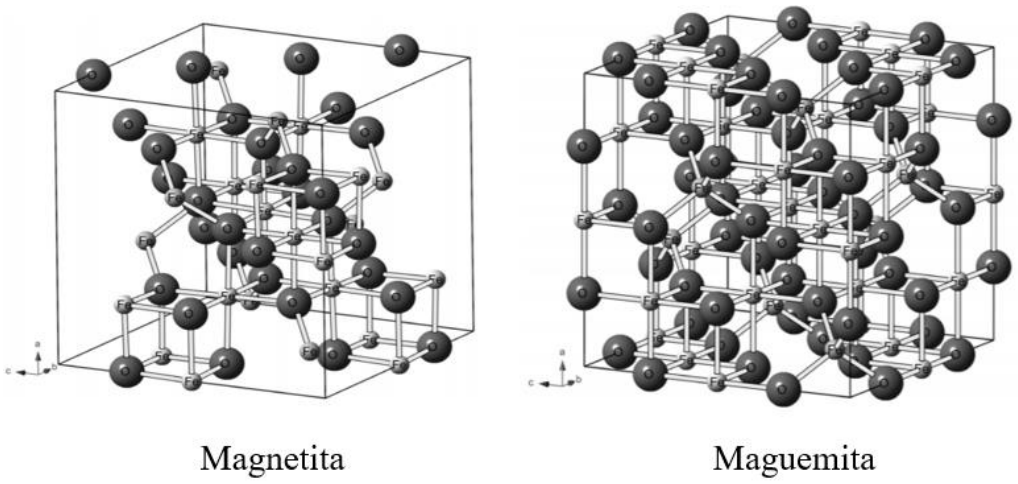


Figura 19: Estrutura cristalina da magnetita e da maguemita (OLIVEIRA; FABRIS; PEREIRA, 2013).

Existem diversas técnicas usadas para a síntese de partículas magnéticas, como a co-precipitação, a microemulsão e a decomposição térmica, e houve um progresso substancial no controle do tamanho e morfologia das partículas magnéticas usando as diferentes metodologias (CIPOLATTI, ELIANE P *et al.*, 2016; LIU, DONG-MEI; CHEN; SHI, 2018). A co-precipitação para a obtenção de magnetita é uma das técnicas mais convenientes e efetivas, devido à facilidade de fabricação e ao grande rendimento obtido (CHEN, ZHOU *et al.*, 2018; MAITY; AGRAWAL, 2007). Ela envolve a precipitação de íons Fe^{2+} e Fe^{3+} em uma solução aquosa na presença de uma base, através da reação ilustrada no esquema 7 (MAITY; AGRAWAL, 2007).

$$Fe^{2+} + 2\,Fe^{3+} + 8\,OH^{-} \rightarrow Fe_3O_4 + 4\,H_2O$$

Esquema 7: Reação de obtenção da magnetita.

Segundo essa reação, a razão necessária de íons de ferro para a obtenção de magnetita é Fe^{3+}:Fe^{2+} = 2:1 , no entanto, diversos fatores como pH, temperatura, tipo da base e sais de ferro influenciam a composição e a dimensão das nanopartículas obtidas (CHEN, ZHOU *et al.*, 2018). Há uma grande discussão na literatura sobre o cristal obtido, uma vez a magnetita sobre oxidação fácil em contato com o ar e os picos de difração de raios X característicos da magnetita e da maguemita são muito próximos, sendo difícil a caracterização exata do cristal obtido (MAITY; AGRAWAL, 2007).

As propriedades magnéticas dos compostos são caracterizadas pela influência do campo magnético, sendo os principais fenômenos a indução magnética e a magnetização remanescente. A indução magnética é resultante quando um campo magnético é aplicado a um material com susceptibilidade magnética, e a magnetização remanescente, que existe em substâncias ferrimagnéticas ou ferromagéticas, é independente da presença de um campo aplicado e é decorrente do alinhamento natural dos momentos magnéticos (SCHÖN, 2011).

Os átomos de ferro têm um forte momento magnético devido aos seus 4 elétrons desemparelhados nos orbitais 3*d*. Quando cristais contendo esse átomo são formados, diferentes estados magnéticos são obtidos, conforme mostra a figura 20 (CORNELL; SCHWERTMANN, 2003).

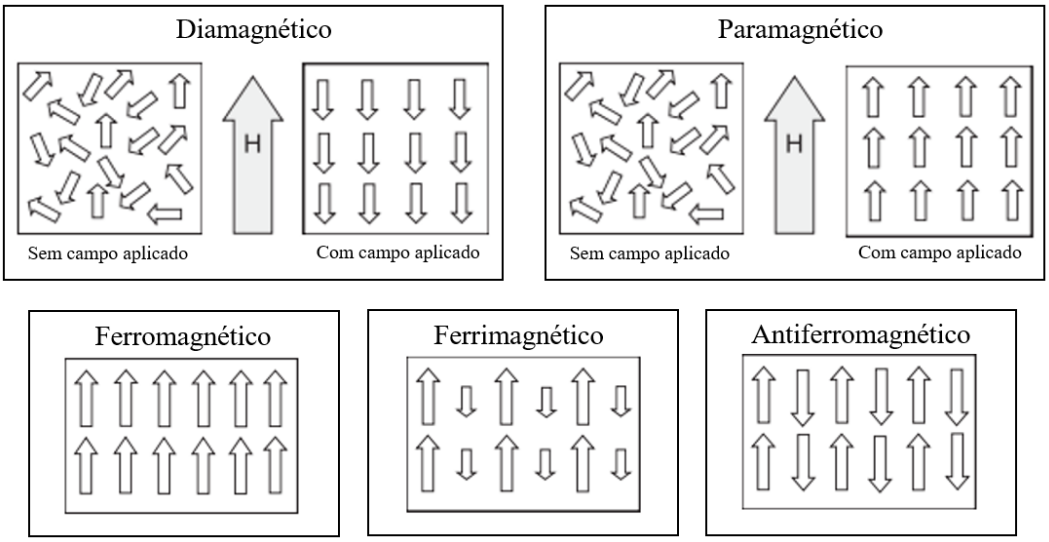


Figura 20: Ordenamento magnético dos spins.
Adaptado de Schön (2011)

- Paramagnéticos e diamagnéticos: Esses materiais têm os momentos magnéticos atômicos individuais alinhados de forma desordenada e o cristal tem um momento

magnético resultante igual a zero. Sob a aplicação de um campo magnético externo, alguns desses momentos vão se alinhar e o cristal alcançará um pequeno momento magnético. Por causa disso, eles têm a susceptibilidade magnética menor do que materiais ferro, ferri e antiferromagnéticos. A diferença entre materiais paramagnéticos e diamagnéticos é a direção do alinhamento dos momentos magnéticos quando o campo é aplicado;

- Ferromagnéticos: Em um cristal ferromagnético, todos os momentos individuais estão alinhados paralelamente, mesmo sem a presença de um campo externo;
- Ferrimagnetismo: O cristal ferrimagnético tem momentos arranjados de forma antiparalela e com magnitudes diferentes;
- Antiferromagnético: Se os momentos magnéticos antiparalelos do cristal ferrimagnético forem da mesma magnitude, o cristal é considerado antiferromagnético, não possuindo assim um momento magnético resultante.

Em um material, a magnetização *M* é a soma dos vetores de todos os momentos magnéticos presentes por unidade de volume. A magnitude de *M* é geralmente menor do que o valor que poderia ser alcançado se todos os momentos atômicos estivessem perfeitamente alinhados, uma vez que um material é constituído por diversos domínios magnéticos, conforme mostra a figura 21. Quanto menor o tamanho de um material, menor o número de domínios por unidade de partícula, podendo assim alcançar um tamanho crítico no qual existe apenas um único domínio por partícula do material (TEJA; KOH, 2009).

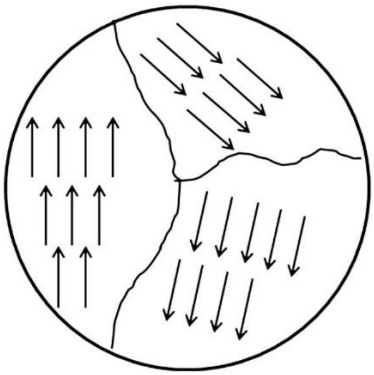


Figura 21: Domínios magnéticos de um material (TEJA; KOH, 2009).

Quando um campo magnético de força *H* é aplicado em um material com magnetização *M*, a curva de magnetização *H* x *M* mostra que *M* aumenta com o aumento

de *H*. Esse aumento ocorre até a magnetização alcançar um valor máximo, chamada de magnetização de saturação, M_s. A magnetização geralmente apresenta uma curva de histerese, uma vez que nem todos os domínios irão retornar às suas orientações originais quando H é reduzido. Com isso, quando *H* retorna ao valor zero, existe uma magnetização remanescente M_R, que pode ser removida com a aplicação de um campo coercitivo H_C, na direção oposta ao campo aplicado inicialmente (TEJA; KOH, 2009). Essas etapas estão ilustradas na figura 22.

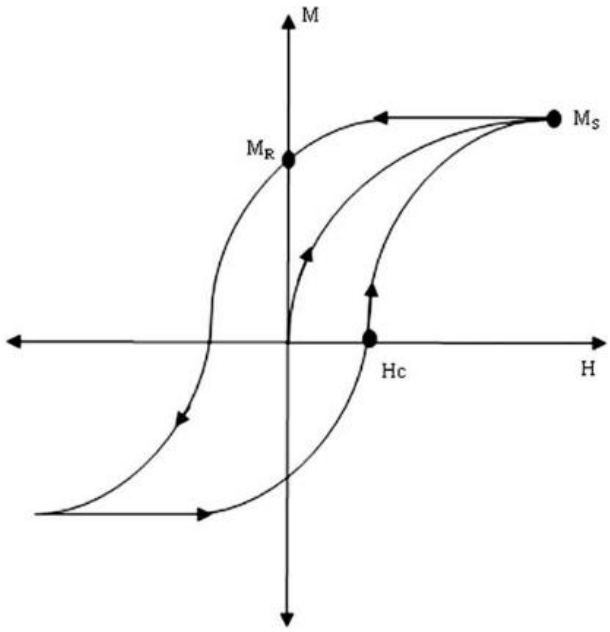


Figura 22: Magnetização *M* em função de um campo magnético *H*.

Um material com um único domínio magnético não apresenta a curva de histerese, tendo assim propriedades superparamagnéticas. As magnetitas e maguemitas são ferrimagnéticos por apresentarem spins antiparalelos e com magnitudes desiguais, no entanto, elas podem apresentar comportamento superparamagnético quando em formato de nanopartícula. (LIM; LEE, 2010).

Nanopartículas superparamagnéticas são atraídas por um campo magnético, mas não apresentam magnetização remanescente nem histerese magnética após a remoção do campo magnético (MAITY; AGRAWAL, 2007). Isso faz com que elas possam se dispersar melhor em meios reacionais, podendo acessar facilmente as moléculas de substrato (LIM; LEE, 2010).

As partículas magnéticas tem grupos hidroxila em sua superfície que facilita a sua funcionalização, e os métodos de recobrimento foram introduzidos como abordagens

simples para estabilizar e funcionalizar essas partículas (BILAL *et al.*, 2018). No caso da imobilização de enzimas, o recobrimento também se faz necessário, uma vez que as nanopartículas magnéticas puras não interagem de forma eficaz com enzimas (CIPOLATTI, ELIANE P *et al.*, 2016).

Os recobrimentos e funcionalizações podem ser feitos tanto *in-situ*, ou seja, ao longo da síntese das nanopartículas magnéticas, quanto *ex-situ*, que são modificações feitas com o recobrimento dos núcleos das nanopartículas já formados (LIU, DONG-MEI; CHEN; SHI, 2018). As modificações *in-situ* podem ser feitas com surfactantes e polímeros, e os agentes de recobrimento são adsorvidos na superfície das partículas magnéticas, reduzindo o número de sítios acessíveis para o crescimento dos cristais. Além de prevenir contra a degradação em contato com o ar, essa metodologia ajuda a reduzir o tamanho da partícula obtida e diminui a agregação das partículas magnéticas (MAITY; AGRAWAL, 2007).

Para o recobrimento *ex-situ*, diversos materiais podem ser utilizados, como sílica, polímeros orgânicos como quitosana, e materiais mesoporosos como SBA-15, MCM-41, MCF e MSU. Esse recobrimento é indispensável para a imobilização com enzimas, uma vez que ele melhora a biocompatibilidade do suporte e insere grupamentos que serão funcionalizados para a etapa de imobilização (LIU, DONG-MEI; CHEN; SHI, 2018).

Uma forma típica de recobrir partículas de magnetita é com sílica, que insere grupamentos silanol (Si-OH) em sua superfície e tem se tornado uma abordagem importante, por ser quimicamente mais compatível com sistemas biológicos. Essa técnica pode ser feita de diversas maneiras e o processo sol-gel oferece diversas vantagens, como uma boa homogeneidade, o baixo custo e a alta pureza (ANDRADE *et al.*, 2009). Ele é caracterizado pela hidrólise e a condensação de um precursor de sol-gel, como o ortossilicato de tetraetila em um meio de água, amônia e etanol (MA *et al.*, 2006).

Para posterior imobilização com enzimas, as nanopartículas recobertas com sílica devem ser funcionalizadas com agentes de acoplamento aminossilanos como o (3-aminopropil) trietoxissilano, para a introdução de grupamentos amino (LIU, DONG-MEI; CHEN; SHI, 2018). Muitas enzimas, como glicose oxidase, peroxidase, celulase, lacase e lipases já foram imobilizadas de forma covalente em nanopartículas magnéticas e algumas pesquisas mostram a melhora da estabilidade de diferentes lipases após a imobilização em partículas magnéticas de óxido de ferro (ANSARI; HUSAIN, 2012). Alguns exemplos podem ser vistos na tabela 2.

Tabela 2:Exemplos de enzimas imobilizadas em materiais magnéticos.
Adaptado de Bilal *et al.* (2018).

Suporte magnético	Enzima	Funcionalização	Método de imobilização
Fe_3O_4 recoberta com sílica	Catalase	APTES	Reticulação com glutaraldeído
Fe_3O_4 com sílica mesoporosa	Lipase	APTES	Ligação covalente
Fe_3O_4 com MCM-41	Lipase	APTES	Adsorção
Fe_3O_4 com polietilimina	Lacase	Polietilimina	Ligação covalente
Fe_3O_4 com polivinil álcool	Peroxidade	Quitosana	Ligação covalente
Fe_3O_4 modificado com aminossilano	Esterase	APTES	Ligação covalente
Fe_3O_4	Decarboxilase	(3-Glicidiloxipropil)trimetoxissilano	Ligação covalente

2.4.4. CATALISADORES HÍBRIDOS

Reações em sequência são feitas naturalmente em metabolismos através de sistemas multienzimáticos, em que um produto de uma reação serve como substrato para a reação seguinte sem a necessidade de se isolar e purificar os intermediários. Imitar a complexa rede de reações de um metabólito continua sendo um grande desafio, no entanto, diversos pesquisadores vêm desenvolvendo sistemas catalíticos que permitam a realização de duas ou mais reações em cascata em um mesmo meio (GANAI *et al.*, 2013).

Catalisadores híbridos podem permitir essas reações em cascatas e o uso de catalisadores heterogêneos que combinem passos de reações individuais em reações em sequência aumentam a eficiência dos processos químicos através da redução de custos, de tempo e de trabalho (LÅNGVIK *et al.*, 2015). Complexos organometálicos, moléculas organocatalíticas e enzimas são catalisadores usados com sucesso para esse tipo de sistema,

e podem ser combinados entre si gerando catalisadores híbridos (FILICE; PALOMO, 2014).

Uma nova frente de pesquisa no desenvolvimento da resolução cinética dinâmica é a co-imobilização do catalisador de racemização (metal) e da resolução cinética (enzima) em um mesmo suporte (LÅNGVIK *et al.*, 2015). Nesse sistema, o catalisador metálico e a enzima devem estar suportados em uma matriz de forma que o metal não interaja com a proteína de forma a desnaturá-la ou levando-a a perder a sua atividade. Outra preocupação que se deve ter é com relação à recuperação da enzima e do metal, logo, ambos devem estar imobilizados no suporte sem que ocorra a sua lixiviação no meio. Por último, tanto a enzima quanto o catalisador metálico devem estar acessíveis ao substrato (GANAI *et al.*, 2013).

Ganai e colaboradores (2013) também desenvolveram um sistema híbrido composto por nanopartículas de ouro recobertas com sílica mesoporosa para a imobilização de glucosidade. Esse catalisador foi aplicado na reação em cascata do 4-nitrofenil-beta-glucopiranosídeo gerando o 4-nitrofenol após a reação da glucosidade, e a subsequente redução catalisada pelo metal para a obtenção do 4-aminofenol.

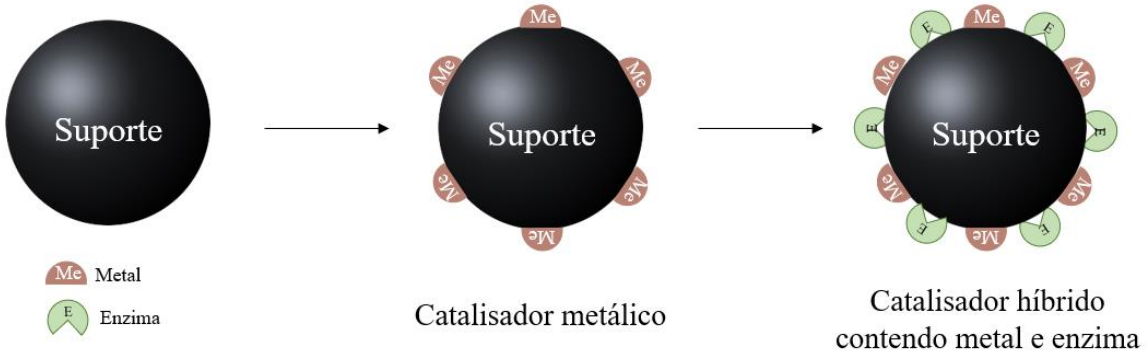


Figura 23: Obtenção de catalisador metálico.

Recentemente, alguns catalisadores híbridos contendo lipase e paládio foram desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa e por outro grupo visando a aplicação na resolução cinética dinâmica da 1-feniletilamina (ENGSTRÖM *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2017). Em ambos os trabalhos, foi verificado que a imobilização da enzima e do metal em um só suporte permitiu a realização de reações em cascatas, em que a enzima e o metal trabalham em cooperação. No trabalho realizado pelo nosso grupo, foi verificado que essa abordagem permitiu a separação e reciclagem mais fácil dos catalisadores, uma vez que ambos enzima e metal encontram-se no mesmo suporte (SOUZA *et al.*, 2017). No entanto,

no outro trabalho, a enzima foi provavelmente desativada, sendo esse um risco associado ao desenvolvimento de catalisadores híbridos (ENGSTRÖM *et al.*, 2013).

Não há registros na literatura do desenvolvimento de um catalisador híbrido em um suporte nanométrico magnético, sendo essa uma abordagem inovadora. Além da facilidade associada à separação magnética de nanopartículas, esse catalisador possibilitará a otimização da resolução dinâmica através da cooperação catalítica entre lipase e paládio ao longo da resolução dinâmica.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo principal desse trabalho é a síntese e caracterização de um catalisador híbrido, nanométrico e magnético contendo CALB e paládio, com posterior aplicação na resolução cinética dinâmica da (*rac*)-1-feniletilamina e a otimização das condições da reação.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- O desenvolvimento e otimização de um protocolo de síntese de partículas magnéticas de Fe_3O_4 por co-precipitação, assim como dos suportes nanométricos magnéticos derivados;
- O revestimento e funcionalização do suporte para posterior imobilização da enzima e adsorção do Pd;
- A síntese de Pd^0 nanoestruturado para adsorção no suporte magnético revestido e funcionalizado;
- Investigação da capacidade de racemização (*S*)-1-feniletilamina pelo catalisador de Pd^0 nanoestruturado e a otimização dos parâmetros reacionais
- A comparação entre dois agentes de ativação (glutaraldeído e epicloridrina) dos suportes magnéticos funcionalizados para a imobilização da lipase CALB;
- A caracterização da eficiência catalítica da CALB imobilizada através da atividade hidrolítica e do potencial de conversão de esterificação do ácido palmítico;
- A aplicação do catalisador híbrido na reação de resolução cinética dinâmica da (*rac*)-1-feniletilamina;
- Otimização dos parâmetros da resolução cinética dinâmica;
- Caracterização morfológica e físico-química dos catalisadores híbridos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. REAGENTES E ENZIMAS

- Sulfato ferroso heptahidratado $FeSO_4$ 7 H_2O (Vetec);
- Cloreto férrico (Vetec);
- Hidróxido de amônio (Isofar);
- Acetona (Tedia);
- Metanol (Sky Chemicals);
- Ácido oleico (Scielab);
- Etanol (Tedia);
- Tetraetoxissilano (Sigma-Aldrich);
- (3-aminopropil) trietoxissilano (Sigma-Aldrich);
- Ácido Clorídrico (Tedia);
- Cloreto de paládio (Sigma-Aldrich);
- Borohidreto de sódio (Vetec);
- (*S*)-1-feniletilamina (Sigma-Aldrich);
- (*R*)-1-feniletilamina (Sigma-Aldrich);
- (*rac*)-1-feniletilamina (Sigma-Aldrich);
- Formiato de amônio (Sigma-Aldrich);
- Carbonato de sódio (Vetec);
- Peneira molecular de 4 A (Sigma-Aldrich);
- Glutaraldeído (Sigma-Aldrich);
- Fosfato de sódio monobásico (Vetec);
- Fosfato de sódio dibásico (Vetec);
- Lipase B de *Candida antarctica* (Sigma-Aldrich);
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich);
- Ácido fosfórico (Vetec);
- Epicloridrina (Sigma-Aldrich);
- Hexano (Tedia);

- Azeite extra virgem (O-LIVE);
- Goma arábica (Vetec);
- Hidróxido de sódio (Vetec);
- Ácido palmítico (Vetec);
- Heptano (Isofar);
- N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (Kar Bucher);
- Anidrido trifluoroacético (Sigma-Aldrich);
- Trietilamina (Sigma-Aldrich);
- Tolueno (Tedia);
- 2-metoxiacetato de metila (Sigma-Aldrich);
- Lipase Novozym 435® (Novozymes).

Todos os reagentes e solventes foram obtidos em grau analítico, e a lipase Novozym 435 foi adquirida da Novozymes® através da LNF latino americana.

4.1.2. EQUIPAMENTOS

- Placa de aquecimento e agitação com termômetro Ika C-MAG HS7;
- Balança analítica Mettler Toledo;
- Rota evaporador Fisatom;
- Ultrassom de banho Branson 1510;
- Agitador mecânico Fisatom 710;
- Cromatógrafo Shimadzu GC-2010 equipado com detector de ionização de chama e injetor automático AOC20i e;
- Coluna cromatográfica de fase quiral CP-Chirasil-Dex CB 25x0,25 Agilent Technologies;
- Coluna cromatográfica HP-5MS 30x0,25 Agilent Technologies;
- Incubadora orbital shaker Novatecnica;
- Incubadora orbital shaker com banho da Innova 310;
- Espectrofotômetro SP-22 da Bioscpetro;
- Agitador Ika Ultra-turrax;
- Titulador automático da Mettler Toledo;
- pHmetro da Quimis;

- Espectrômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier Nicolet Magna FTIR-760;
- Difratômetro de raios X Rigaku Miniflex II com anodo de cobre (radiação Cu Kα, 30 kV e 15 mA);
- Microscópio de transmissão eletrônica JEOL 2100F 200kV;
- Sistema de medição de propriedade física PPMS Dynacool da Quantum Design equipado com um magnetômetro de amostra vibrante.

4.2. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE ÓXIDO DE FERRO

As nanopartículas de óxido de ferro foram sintetizadas usando o método de co-precipitação dos íons Fe^{3+} e Fe^{2+} em meio básico. Essa metodologia é vantajosa por ser simples e capaz de prover altos rendimentos, no entanto, ela não permite um grande controle da distribuição de tamanho das nanopartículas. Com isso, algumas técnicas como o revestimento com surfactantes e polímeros e o uso de ultrassom são usadas em conjunto para obter-se partículas de tamanhos reduzidos e desagregadas (BANG; SUSLICK, 2010; DOLORES; RAQUEL; ADIANEZ, 2015).

As nanopartículas de óxido de ferro foram sintetizadas segundo protocolo de Maity & Agrawal (2007). Primeiramente, 0,02 mol de $FeSO_4.7H_2O$ e 0,04 mol de $FeCl_3$ foram dissolvidos em 40 mL de água destilada em um balão de fundo chato e aquecidos a 80 °C com agitação magnética por 1 h. Uma quantidade estequiométrica de NH_4OH (conforme esquema 8) foi adicionado no balão e manteve-se a homogeneização por 15 minutos. O meio foi resfriado a temperatura ambiente com agitação e, por fim, foram recuperadas com um ímã e foram feitas 5 lavagens com 40 mL de uma solução de acetona e metanol (1:1) antes de secar a vácuo.

$$Fe^{2+} + 2\,Fe^{3+} + 8\,OH^{-} \rightarrow Fe_3O_4 + 4\,H_2O$$

Esquema 8: Reação de obtenção da magnetita.

Com o objetivo de se obter nanopartículas de tamanhos menores e menos agregadas, foram inseridas duas etapas ao longo da co-precipitação, o uso do ultrassom e o revestimento das nanopartículas com ácido oleico *in-situ*. As etapas de sonificação foram

feitas após a adição da base e o revestimento com ácido oleico foi feito segundo o protocolo de Maity & Agrawal (2007).

Após a dissolução dos sais de ferro e antes da adição da base, 5 mL de uma solução de acetona contendo 0,1 mL de ácido oleico foi inserida no meio e manteve-se a agitação por 15 minutos. Em seguida, após a adição da base, cinco adições de 0,2 mL de ácido oleico foram feitas com intervalos de 5 minutos cada. A figura 24 mostra a reação do ácido oleico com a nanopartícula de óxido de ferro.

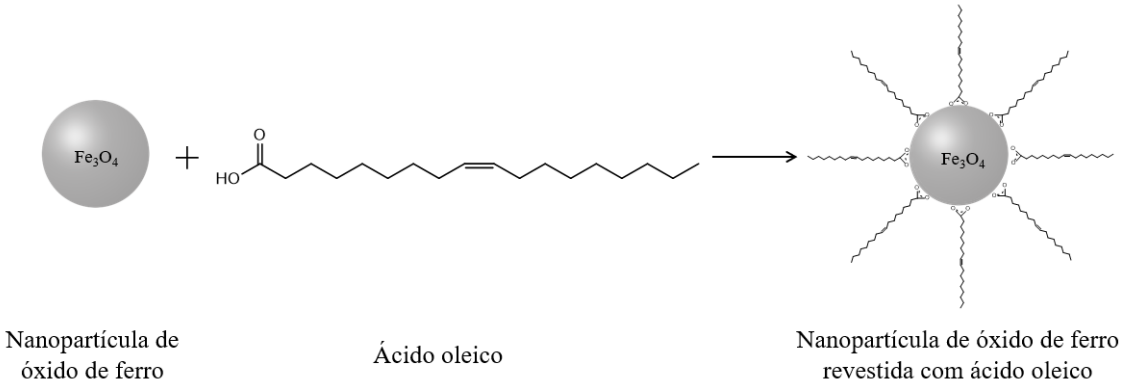


Figura 24: Nanopartículas de óxido de ferro revestidas com ácido oleico.
Adaptado de Mahdavi e colaboradores (2013).

O fluxograma com o protocolo de síntese utilizado encontra-se na figura 25. As etapas em cinza correspondem ao protocolo para a síntese das nanopartículas sem ultrassom e sem o recobrimento com o ácido oleico (NP), a adição das etapas em laranja ao protocolo em cinza corresponde ao protocolo usado para a síntese das nanopartículas com as etapas de ultrassom (NPUS) e o a junção das etapas em cinza, laranja e azul corresponde ao protocolo usado para a síntese das nanopartículas com as etapas de ultrassom e recobertas com ácido oleico (NPUSAO).

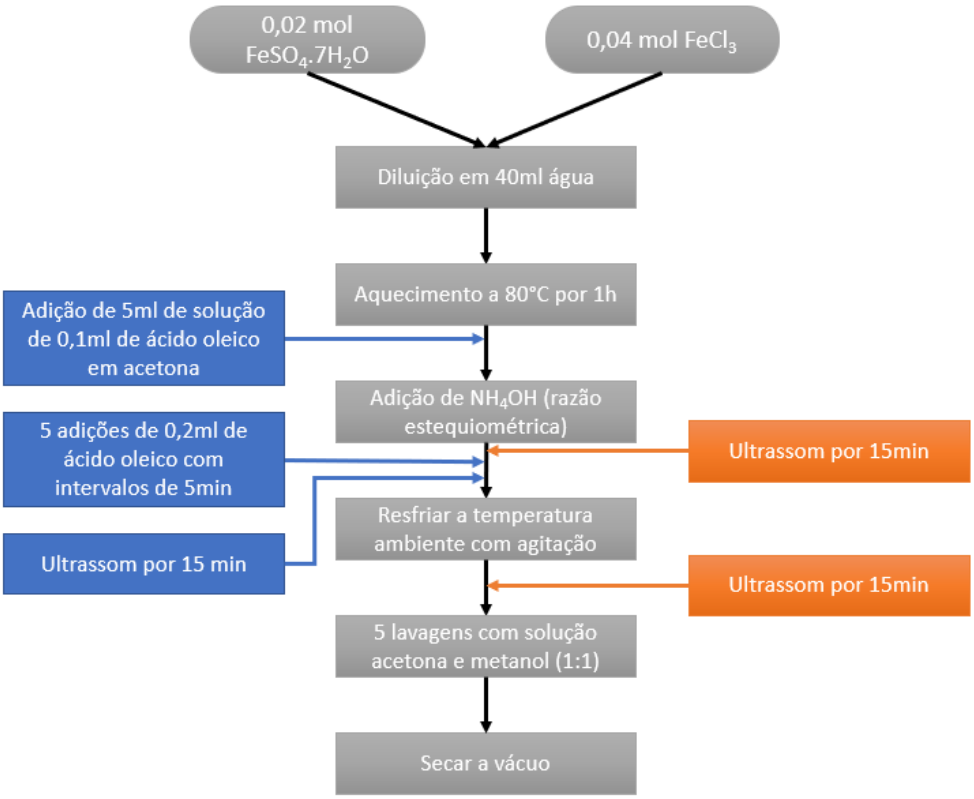


Figura 25: Fluxograma dos protocolos de síntese das nanopartículas.

4.3. REVESTIMENTO DAS NANOPARTÍCULAS COM TETRAETOXISSILANO

O revestimento das nanopartículas magnéticas com uma camada de sílica é feito para aumentar a sua biocompatibilidade, permitir a sua funcionalização e proteger as nanopartículas contra degradações externas (SANTRA *et al.*, 2001). As partículas magnéticas foram revestidas com sílica usando tetraetoxissilano (TEOS) segundo o protocolo adaptado de Souza e colaboradores (2017).

Em 300 mL de álcool foram adicionados 2 g de nanopartículas de óxido de ferro, 25 mL de água e 9 mL de NH_4OH e homogeneizados com agitador mecânico a 700 rpm por 10 minutos. Em seguida, 45 mL de TEOS foram adicionados e o meio foi agitado a 700 rpm por 24 h, sendo as 3 primeiras horas a 40 °C e o restante a temperatura ambiente. As nanopartículas revestidas com sílica foram recuperadas com ímã e lavadas 5 vezes com 40 mL de álcool. A figura 26 ilustra o revestimento feito.

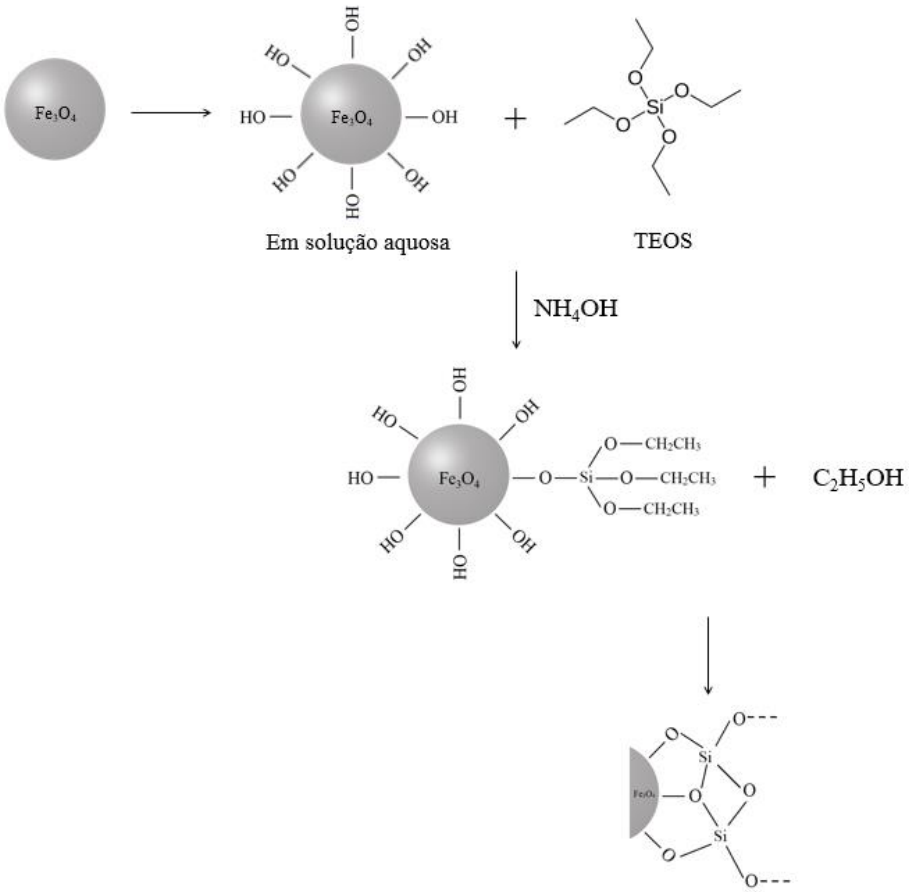


Figura 26: Revestimento da nanopartícula com TEOS.
Adaptado de Chia & Leong (2016).

As nanopartículas que foram sintetizadas com as etapas de ultrassom foram dispersas por 30 min no ultrassom com o álcool do meio antes do revestimento.

4.4. FUNCIONALIZAÇÃO COM (3-AMINOPROPIL) TRIETOXISSILANO

Como a camada de sílica obtida através do revestimento com TEOS é quimicamente inerte, é necessária a sua funcionalização para a introdução de grupamentos aminos (figura 27), que possam ser ativados posteriormente para a ligação enzimática (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016). As partículas magnéticas revestidas com TEOS foram então funcionalizadas com (3-aminopropil) trietoxissilano (APTES) segundo o protocolo adaptado de Souza e colaboradores (2017).

0,5 g das nanopartículas revestidas com sílica foram adicionadas em 200 mL de etanol. Em seguida, 550 µL de APTES foram adicionados ao meio e a agitação mecânica

foi mantida a 700 rpm por 16 h. As nanopartículas foram recuperadas com ímã e lavadas 3 vezes com 40 mL de álcool.

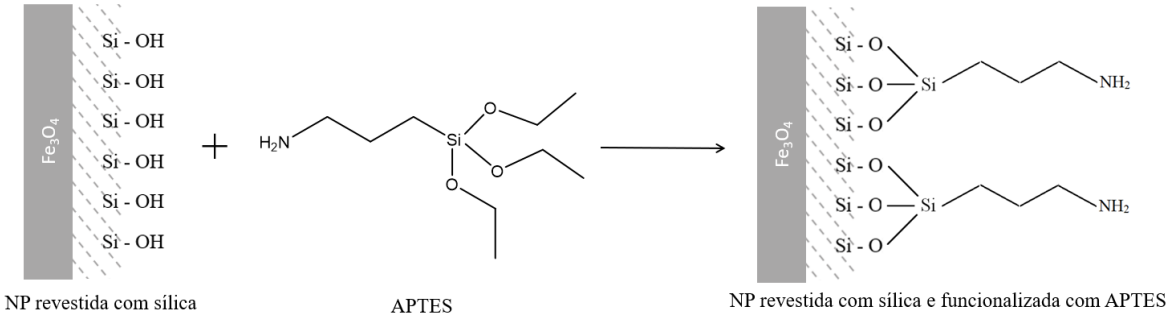


Figura 27: Funcionalização na nanopartícula com APTES.
Adaptado de Liu e colaboradores (2004).

As nanopartículas que foram sintetizadas com as etapas de ultrassom foram dispersas por 30 min no ultrassom com o álcool do meio antes da funcionalização.

4.5. SÍNTESE DE PALÁDIO SUPORTADO NAS NANOPARTÍCULAS

O paládio foi suportado nas nanopartículas de ferro revestidas com TEOS e funcionalizadas com APTES segundo protocolo de Souza e colaboradores (2017). Uma solução de 0,15 M de H_2PdCl_4 foi preparada segundo a razão estequimétrica do esquema 9. O cloreto de paládio e o ácido clorídrico foram adicionados em meio aquoso e mantidos a 50 °C por 30 minutos.

$$PdCl_2 + 2HCl \rightarrow H_2PdCl_4$$

Esquema 9: Reação de obtenção do H_2PdCl_4.

Em seguida, 500 mg das nanopartículas foram homogeneizados em 200 mL de água com agitador mecânico a 700 rpm e a solução de H_2PdCl_4 foi adicionada sob agitação. Para estudar o efeito da concentração de paládio nas nanopartículas na reação de racemização, foram produzidas nanopartículas com concentrações de paládio de 3 %, 4,5 % e 6 % (p/p), alterando o volume da solução de H_2PdCl_4.

Em seguida, 400 µL de uma solução $NaBH_4$ a 10 % foi adicionado ao meio para a redução do Pd^{2+} a Pd^0 e o meio foi homogeneizado por 10 minutos. Por fim, 2 mL de

NH_4OH foi adicionado e o meio foi agitado por 1 h. As nanopartículas foram recuperadas com um ímã e lavadas 3 vezes com 20 mL de álcool.

As nanopartículas que foram sintetizadas com as etapas de ultrassom foram dispersas por 30 minutos no ultrassom com a água do meio reacional antes da reação com o paládio. A figura 28 mostra o fluxograma resumido de todas as etapas da síntese das nanopartículas.

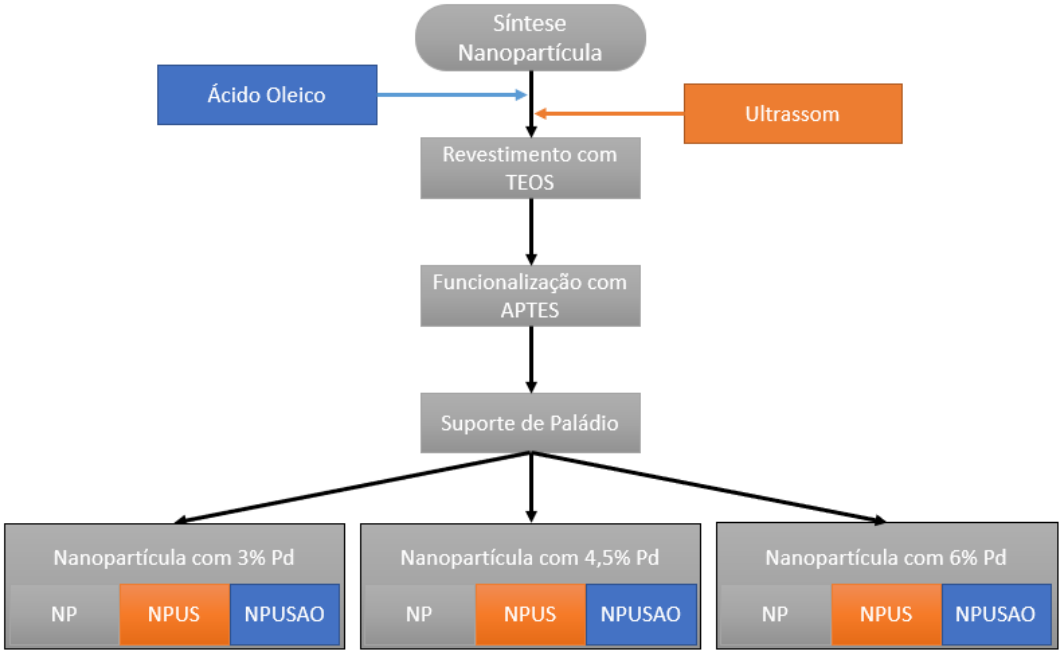


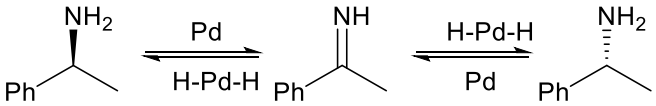
Figura 28: Fluxograma das etapas de síntese das nanopartículas com Paládio

4.6. REAÇÃO DE RACEMIZAÇÃO DA (*S*)-1-FENILETILAMINA

A reação de racemização da (*S*)-1-feniletilamina foi conduzida segundo procedimento de Miranda e colaboradores (2014). Em um vial de 4 mL foram adicionados 3 mL de tolueno previamente destilado e seco com sódio sólido, 0,1 M de (*S*)-1-feniletilamina, 1,5 equivalentes de formiato de amônio como doador de hidrogênio, 12 mg Na_2CO_3 e 375 mg de peneira molecular de 4 Å. O uso de formiato de amônio apresenta diversas vantagens em comparação com hidrogênio gasoso, como o baixo custo e a fácil obtenção, além de maior segurança de operação em laboratório (MIRANDA; SOUZA; MIRANDA, 2014).

A reação foi mantida a 70 °C em placa de carbeto de silício com agitação magnética e atmosfera de argônio. A quantidade de nanopartículas suportadas com paládio utilizada

variou de acordo com a concentração de paládio em cada uma delas, com o objetivo de manter 30 mol% de paládio no meio. O esquema 10 mostra a reação de racemização.



Esquema 10: Reação de racemização da (*S*)-1-feniletilamina.
Adaptado de Miranda e colaboradores (2014)

As alíquotas para análise (100 µL) foram derivatizadas com 5 µL anidrido trifluoroacético e 5 µL de trietilamina e analisados por cromatografia gasosa com fase quiral em um cromatógrafo do modelo Shimadzu GC-2010 equipado com detector de ionização de chama (CG-DIC), injetor automático AOC20i e coluna de fase quiral CP-Chirasil-Dex CB. Foi utilizado hélio como gás carreador e hidrogênio e ar comprimido para ionização. A temperatura do injetor e do detector foi mantida em 220 °C e o fluxo de "split" foi de 59,8 mL/min. A análise foi iniciada com a coluna a 90 °C e mantida por 15 min. Em seguida foi aquecida a 190 °C com uma taxa 40 °C/min e mantida nessa temperatura por 5 min.

A bifenila foi usada como padrão interno e a conversão, seletividade e o excesso enantiomérico foram calculados segundo as equações 4, 5 e 6.

(Eq. 4) $$Conv\ (\%) = 100 - \frac{A_{S_n}/A_{B_n}}{A_{S_0}/A_{B_0}}$$

(Eq. 5) $$Sel\ (\%) = 100 - \frac{A_{Sub_n}}{A_{S_n}+A_{R_n}+A_{Sub_n}} \times 100$$

(Eq. 6) $$ee\ (\%) = \left(\frac{A_{S_n}}{A_{S_n}+A_{R_n}} - \frac{A_{R_n}}{A_{S_n}+A_{R_n}}\right) \times 100$$

Em que A_{S_0} é a área correspondente ao pico da (*S*)-1-feniletilamina antes da reação, A_{B_0} é a área correspondente ao pico da bifenila antes da reação, A_{S_n} é a área correspondente ao pico da (*S*)-1-feniletilamina no tempo *n*, A_{R_n} é a área correspondente ao pico da (*R*)-1-feniletilamina no tempo *n*, A_{B_n} é a área correspondente ao pico da bifenila no tempo *n* e A_{Sub_n} é o somatório das áreas correspondentes aos picos dos subprodutos no tempo *n*.

Levando em conta esses parâmetros, pode-se dizer que o catalisador ideal é aquele que apresenta 50 % de conversão do enantiômero de partida com 100 % de seletividade ao isômero oposto, o que resultaria em um excesso enantiomérico de 0 % (PARVULESCU; JACOBS; DE VOS, 2007).

Para verificar o impacto das nanopartículas magnéticas na reação de racemização, foi feita a síntese do paládio em partículas de sílica sintetizadas através do TEOS nas mesmas concentrações que as partículas magnéticas. A reação de racemização foi conduzida da mesma forma e os cálculos de conversão seletividade e excesso enantiomérico também foram feitos para comparação.

A (*S*)-1-feniletilamina, (*R*)-1-feniletilamina e a (*rac)*-1-feniletilamina obtidas comercialmente foram analisadas por CG-DIC utilizando a mesma metodologia para identificar o pico correspondente a cada enantiômero. A curva de calibração foi feita com a *rac*-feniletilamina comercial (figura 29) fazendo a injeção no cromatógrafo de amostras contendo 0,05 M, 0,075 M, 0,01 M, 0,0125 M e 0,015 M com o mesmo protocolo. Foi traçada uma reta correlacionando a área do pico e concentração de amina para verificar que essas as variáveis estão relacionadas linearmente.

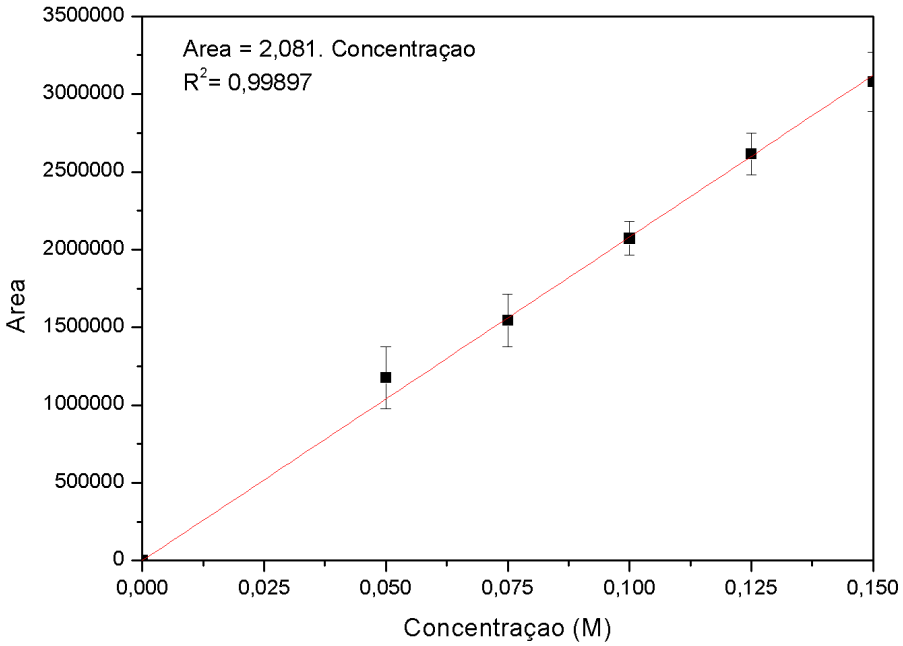


Figura 29: Curva de calibração da *rac*-1-feniletilamina.

4.7. IMOBILIZAÇÃO DA CALB

Uma vez escolhidos o protocolo de síntese da partícula magnética e a concentração de paládio na nanopartícula magnética para a reação de racemização, as nanopartículas suportadas com paládio foram usadas como suporte para a imobilização enzimática. Com o objetivo de se comparar duas metodologias de imobilização, foram usados dois reagentes diferentes para a ativação do suporte: o glutaraldeído e a epicloridrina.

4.7.1. IMOBILIZAÇÃO COM GLUTARALDEÍDO

O glutaraldeído é usado na imobilização enzimática pois um dos seus aldeídos reage com o grupamento amino do suporte ativado com APTES e o outro reage com o grupamento amino da enzima, conforme figura 30 (LIU, DONG-MEI; CHEN; SHI, 2018). Primeiramente, a ativação dos suportes foi feita segundo o protocolo de de Souza e colaboradores (2016). 500 mg de suporte foram dispersos em 10 mL de tampão fosfato de sódio pH 7 e 50mM e foram adicionados 2 mL de glutaraldeído. O meio foi agitado a 150 rpm em um shaker a temperatura ambiente por 24 horas. Após esse tempo, o suporte foi recuperado usando um ímã e lavado 4 vezes com água destilada.

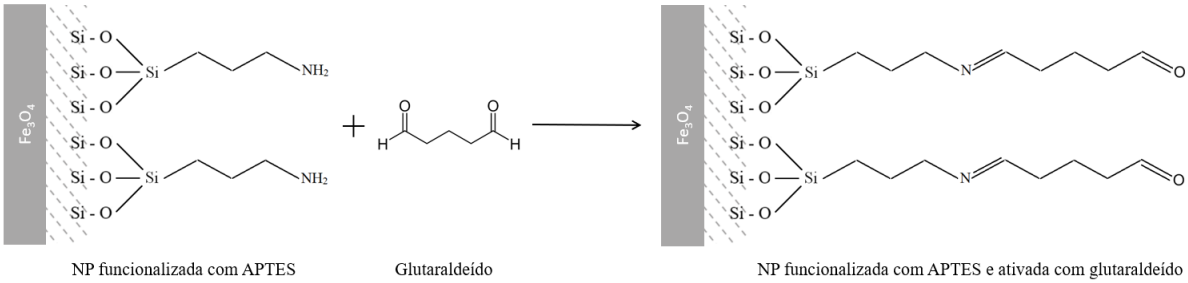


Figura 30: Ativação do suporte com glutaraldeído.
Adaptado de Liu *et al.* (2018)

Em seguida, a imobilização enzimática foi feita segundo o de Souza e colaboradores (2016). Uma solução enzimática contendo 1 mL de solução da CALB e 5 mL de tampão fosfato pH 7 e 25 mM foram usadas para a imobilização de 1 g de suporte. A imobilização foi em feita em shaker a 150 rpm e 40 °C por 24 h. A imobilização está ilustrada na figura 31.

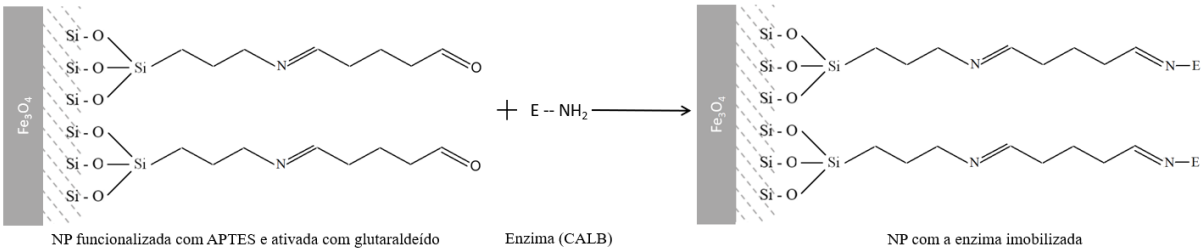


Figura 31: Reação de imobilização da CALB.
Adaptado de Liu e colaboradores (2018).

Por fim, com o objetivo de se aumentar a carga enzimática do suporte para melhorar a eficiência da reação, foi feita a imobilização enzimática aumentando a quantidade de enzima de duas formas: aumentando o volume da solução enzimática inicial (tampão + solução de CALB) e aumentando a concentração da solução enzimática inicial. A tabela 3 resume as diferentes concentrações e volumes utilizados nas imobilizações que foram feitas.

Tabela 3: Imobilização com glutaraldeído

Quantidade de suporte (g)	Quantidade enzima (mL)	Volume de tampão (mL)	Razão suporte/ solução inicial ($g_{suporte}$/mL)	Razão vol enzima/vol final (mL_{CALB}/mL_{sol})
1	1	5	1/6	2/6
1	2	10	1/12	2/10
1	4	20	1/24	4/24
1	1,5	5	1/6,5	1,5/6,5
1	2	5	1/7	2/7

4.7.2. METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA DE BRADFORD

A imobilização com glutaraldeído foi avaliada através da metodologia de quantificação de proteína de Bradford e a carga enzimática no suporte foi calculada através da mesma técnica. Em 1976, Bradford observou que o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 existia em 2 formas de cores, avermelhado e azulado, e que a forma avermelhada era convertida na forma azulada após a ligação do corante com uma proteína. Essa ligação altera a absorbância da solução de corante de 465 a 595 nm, sendo possível quantificar proteínas nesse comprimento de onda usando um espectrofotômetro. (BRADFORD, 1976).

A solução de Bradford foi preparada diluindo 40 mg do corante Coomassie Brilliant Blue G-250, 20 mL de etanol e 40 mL de ácido fosfórico em água em um balão de 400 mL.

A solução foi deixada sob agitação magnética por 30 minutos e em seguida filtrada com papel de filtro 3 vezes.

Em seguida, foi preparada a curva padrão para relacionar a absorbância medida com a concentração de proteína usando albumina de soro bovino. Foi preparada uma solução mãe contendo 1 mg de proteína por mL de solução e foram feitas diferentes diluições (tabela 4) para se obter concentrações diferentes para a medida da absorbância a 595 nm.

Tabela 4: Diluições para o preparo da curva padrão de Bradford

Concentração proteica calculada (mg/mL)	Volume da solução mãe (µL)	Volume de água a ser adicionado (µL)	Fator de diluição
0,500	200	200	2
0,333	200	400	3
0,200	200	800	5
0,100	100	900	10
0,050	50	950	20

As medidas de absorbância foram feitas em uma cubeta de quartzo de 3 mL com 10 µL da solução contendo proteína, 200 µL da solução de Bradford preparada e 2790 µL de água. Todas as medidas foram feitas em triplicata e uma medida em branco foi feita com 10 µL de uma solução sem proteína. No final, foi obtida a reta de Concentração de proteína (mg/mL) X Absorbância a 595 nm (figura 32).

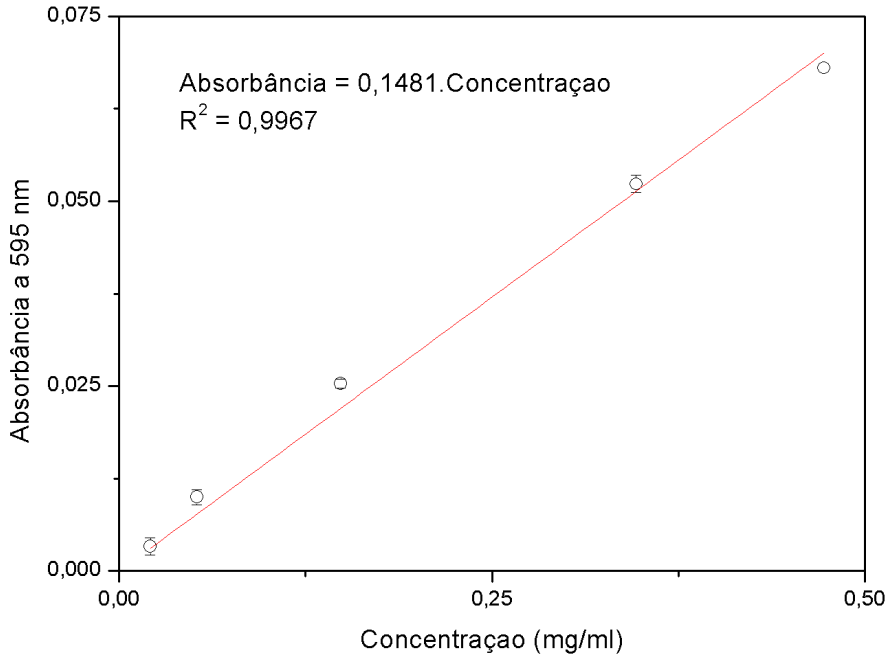


Figura 32: Curva padrão da solução de Bradford

Essa curva padrão para a solução de Bradford foi utilizada para quantificar a solução inicial de CALB usada e para avaliar a imobilização com glutaraldeído. Em primeiro lugar, a quantidade de suporte a ser utilizada foi dispersa no volume de tampão da imobilização. 10 µL dessa solução foram usados para fazer a leitura do branco da imobilização com o objetivo de eliminar qualquer interferência que o suporte possa ter na medida do Bradford. Em seguida, a solução de CALB foi adicionada e 10 µL do meio da imobilização foram utilizados para o ensaio de Bradford e o cálculo da concentração enzimática no tempo t ($Conc_t$), o cálculo da eficiência de imobilização ($Efic$) e o cálculo da quantidade de enzima no suporte ($Qtd_{enz\ sup}$) foram feitos segundo as equações 7, 8 e 9.

(Eq. 7) $$Conc_t\ (mg/ml) = \frac{(Abs_t - Abs_b) \times Fd}{Cof}$$

(Eq. 8) $$Efic\ (\%) = \frac{(Conc_{t0} - Conc_{tf})}{Conc_{t0}}$$

(Eq. 9) $$Qtd_{enz\ sup}(mg/g) = \frac{Conc_{t0} \times Efic \times Vol_{sol\ mãe}}{m_{sup}}$$

Em que, Abs_t é a absorbância medida no tempo t, Abs_b é a absorbância medida do branco, Fd o fator de diluição usado caso necessário, Cof o coeficiente angular da curva padrão da solução de Bradford, $Conc_{t0}$ a concentração no tempo inicial da imobilização em mg/mL, $Conc_{tf}$ a concentração no tempo final da imobilização em mg/mL, $Vol_{sol\ mãe}$ o volume da solução mãe utilizado na imobilização em mL e m_{sup} a massa do suporte usado na imobilização em g.

4.7.3. IMOBILIZAÇÃO COM EPICLORIDRINA

Com o objetivo de comparar a imobilização por ligação covalente com aldeído com a ligação covalente com um grupamento epóxi, a epicloridrina foi utilizada para a ativação do suporte e a imobilização foi feita segundo protocolo de Martin *et al* (2018) e Cubides-Roman *et al.* (2017). Em primeiro lugar, 1 g do suporte foi ativado em um shaker por 1 hora a 120 rpm e 25 °C com 10 mL de solução de 2,5 % de epicloridrina (v/v) em tampão fosfato (0,1 M e pH 7,5). O suporte foi recuperado com separação magnética e lavado 4 vezes com 10 mL de água destilada. A representação da ativação encontra-se na figura 33.

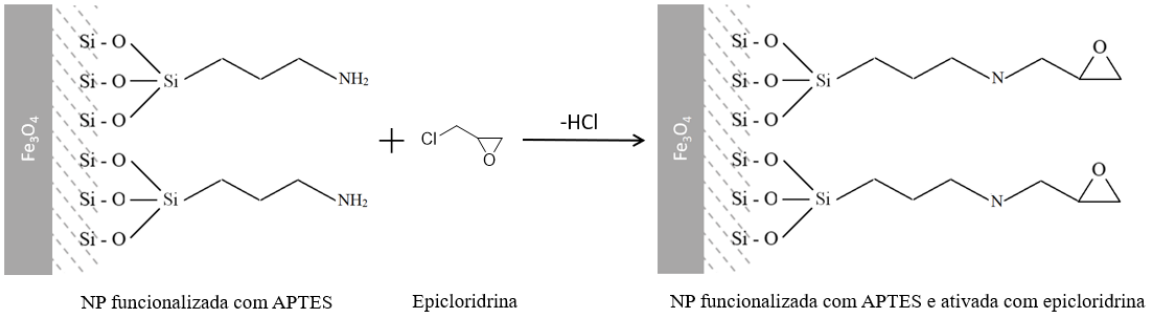


Figura 33: Ativação da nanopartícula com epicloridrina.
Adaptado de Zhang e colaboradores (2015).

Em seguida, o suporte foi embebido com 10 mL de hexano e agitado a 120 rpm por 2 horas a 25 °C. O excesso de hexano foi retirado e 1 mL de CALB e 5 mg de PEG-1500 foram adicionados ao suporte. A imobilização foi conduzida a 4 °C por 16 horas em condição estática e no final, o suporte foi lavado 4 vezes com 10 mL de hexano. A imobilização está ilustrada na figura 34.

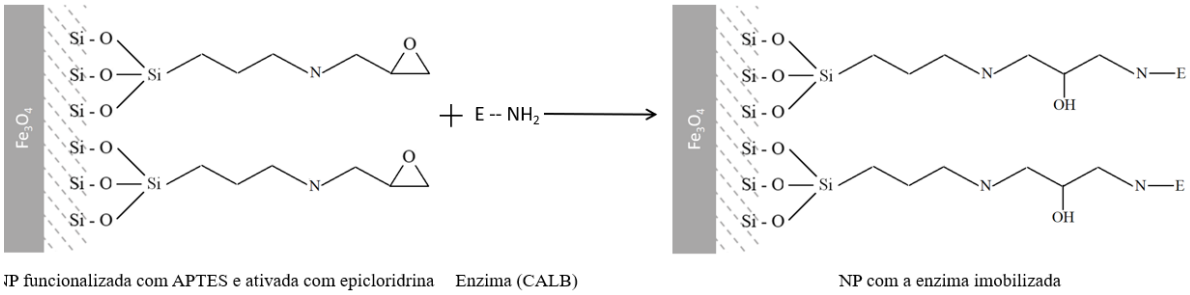
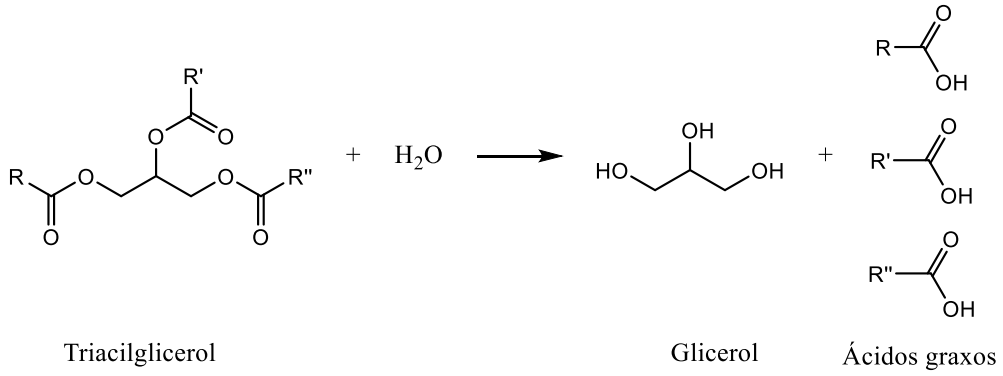


Figura 34: Imobilização da nanopartícula com a enzima (CALB).
Adaptado de Zhang e colaboradores (ZHANG *et al.*, 2015).

Os cálculos de eficiência de imobilização e quantidade de enzima no suporte não foram feitos, uma vez que o solvente usado na imobilização influencia na absorbância da solução de Bradford.

4.8. ATIVIDADE HIDROLÍTICA

A atividade hidrolítica da enzima imobilizada nos suportes foi feita através do método de titulação da emulsão com azeite de oliva, segundo o protocolo de Freire *et al.* (1997) sendo uma unidade de atividade enzimática (U) definida como a quantidade de enzima em g usada para liberar 1 µmol de ácido graxo por minuto nas condições experimentais (esquema 11) (SILVA *et al.*, 2011).



Esquema 11: Reação de hidrólise de triacilgliceróis do azeite catalisado pela enzima.
Adaptado de Sandoval (2012)

Para a dispersão do azeite no tampão fosfato pH 7 e 100 mM, foi preparada uma emulsão contendo 5 % de azeite de oliva extra virgem e 5 % de goma arábica usando um agitador Ika Ultra-turrax a 12000 rpm por 5 minutos. 19 mL dessa emulsão foram adicionados nos copos de titulação junto com 10 mg do catalisador imobilizado e 1 mL de tampão fosfato pH 7 e 100 mM. Os copos foram incubados em um shaker com banho a

120 rpm e 37 °C por 30 minutos. Após esse tempo, a reação foi interrompida com a adição de 20 mL de uma solução de acetona/etanol (1:1) e a titulação dos ácidos graxos produzidos foi feita usando NaOH 0,04 M até o pH 11,0 usando um titulador automático.

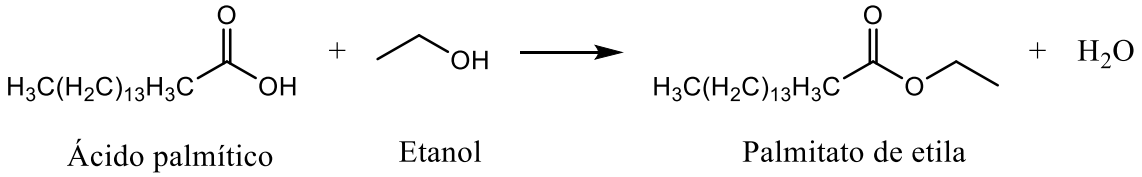
Amostras controles foram feitas nas mesmas condições, porém com a incubação sem o catalisador. Nesse caso, a enzima imobilizada foi adicionada logo antes da titulação para que seja desconsiderado qualquer influência que o suporte possa ter na titulação. Todos os ensaios foram feitos em triplicata e a atividade enzimática ($Ativ$) foi calculada segundo a equação 10.

(Eq. 10) $$Ativ\ (U/g) = \frac{(V_e - V_b) \times M \times 1000000}{t \times m_e}$$

Sendo V_e o volume usado na titulação da enzima em litros, V_b o volume usado na titulação do ensaio branco em litros, M a molaridade da base em mol/L, t o tempo de incubação em minutos e m_e a massa de enzima utilizada em gramas.

4.9. POTENCIAL DE CONVERSÃO DE ESTERIFICAÇÃO

O potencial de conversão de esterificação da enzima imobilizada foi feito com ácido palmítico e etanol (esquema 12) também com o objetivo de se caracterizar os biocatalizadores. A reação foi conduzida segundo protocolo de de Souza e colaboradores (2016). Em um vial de 3 mL, foi adicionado 100 mM de ácido palmítico, 100 mM de etanol, 30 mg do catalisador e heptano foi usado como solvente. A reação foi conduzida em um shaker a 50 °C agitado a 120 rpm.



Esquema 12: Reação de esterificação do ácido palmítico.
Adaptado de Sandoval (SANDOVAL, 2012).

Primeiramente, a conversão de esterificação foi analisada após 1 h, 3 h e 6 h de reação para comparar as duas metodologias de imobilização, com glutaraldeído e com epicloridrina. Uma vez definido o protocolo de imobilização, a conversão foi avaliada de

forma a se obter a cinética de conversão, logo, foram tiradas alíquotas após 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min, 180 min e 240 min de reação.

As alíquotas para análise (20 µL) foram derivatizadas com 20 µL N-metil-N-trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) e analisados por cromatografia gasosa em um cromatógrafo do modelo Shimadzu GC-2010 equipado com detector de ionização de chama (CG-DIC), injetor automático AOC20i e coluna HP-5MS. Foi utilizado hélio como gás carreador e hidrogênio e ar comprimido para ionização. A temperatura do injetor e do detector foi mantida em 250 °C e o fluxo de "split" foi de 49,1 mL/min. A análise foi iniciada com a coluna a 100 °C e mantida por 1 min. Em seguida foi aquecida a 180 °C com uma taxa 15 °C/min e mantida nessa temperatura por 1 min.

A conversão ($Conv$) foi calculada usando a equação 11 e foi traçada uma curva de Conversão (%) X Tempo de reação (min).

(Eq. 11) $$Conv\ (\%) = 1 - \frac{A_{aci}}{A_{aci} + A_{est}}$$

Sendo A_{aci} a área correspondente ao pico do ácido palmítico e A_{est} a área correspondendo ao pico do palmitato de etila. A curva de calibração foi feita com o ácido palmítico (figura 35) fazendo a injeção no cromatógrafo de amostras contendo 0,05 M, 0,075 M, 0,01 M, 0,0125 M e 0,015 M com o mesmo protocolo. Foi traçada uma reta correlacionando a área do pico e concentração de ácido palmítico para verificar que essas as variáveis estão relacionadas linearmente.

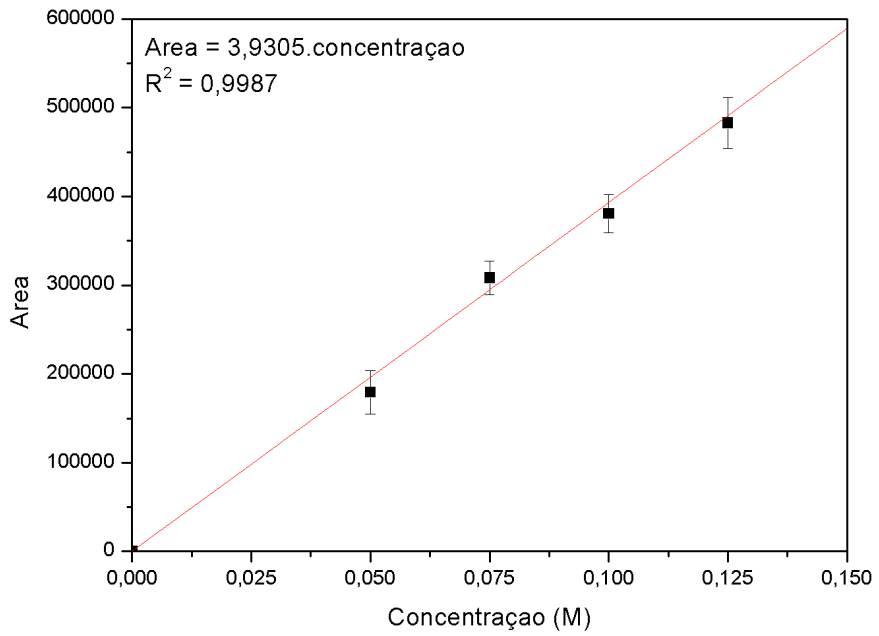
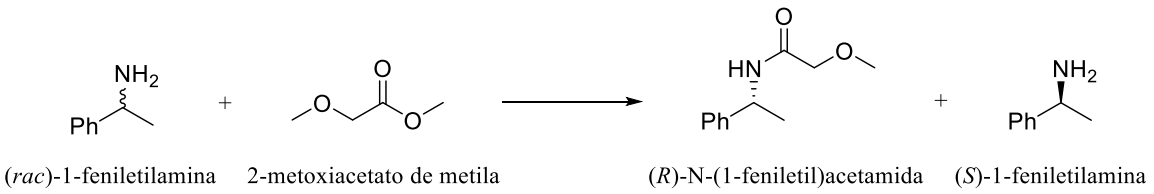


Figura 35: Curva de calibração do ácido palmítico.

Uma vez obtida a cinética de reação, foi feito o cálculo da taxa inicial de conversão do ácido palmítico em mmol/Lmin, através da aproximação por uma reta dos pontos iniciais da cinética de reação.

4.10. RESOLUÇÃO CINÉTICA DINÂMICA DA (*RAC*)-1-FENILETILAMINA

A reação de resolução cinética dinâmica da (*rac*)-1-feniletilamina (esquema13) foi conduzida segundo Miranda e colaboradores (2014). Em um vial de 4 mL foram adicionados 3 mL de tolueno previamente destilado e seco com sódio sólido, 0,1 M de (*rac*)-1-feniletilamina, 0,2 M de 2-metoxiacetato de metila, 12 mg Na_2CO_3 e 375 mg de peneira molecular. Como doador de hidrogênio foi usado o formiato de amônio a 1,5 equivalentes (nesse caso foi acoplado ao frasco um borbulhador para a saída dos gases formados e reduzir a pressão do meio), ou H_2 gasoso. A reação foi aquecida em placa de carbeto de silício com agitação magnética. A quantidade de nanopartículas com CALB imobilizada e suportadas com paládio (catalisador híbrido) foi calculada com o objetivo de manter 30 mol% de paládio no meio.



Esquema 13: Reação de racemização da (*rac*)-1-feniletilamina catalisada pelo catalisador híbrido. Adaptado de Miranda e colaboradores (2014).

As alíquotas retiradas do meio (100 µL) foram analisados sem derivatização por cromatografia gasosa com fase quiral em um cromatógrafo do modelo Shimadzu GC-2010 equipado com detector de ionização de chama (CG-DIC), injetor automático AOC20i e coluna de fase quiral CP-Chirasil-Dex CB. Foi utilizado hélio como gás carreador e hidrogênio e ar comprimido para ionização. A temperatura do injetor e do detector foi mantida em 220 °C e o fluxo de "split" foi de 59,8 mL/min. A análise foi iniciada com a coluna a 90 °C e mantida por 15 min. Em seguida foi aquecida a 190 °C com uma taxa 40 °C/min e mantida nessa temperatura por 5 min.

A conversão ($Conv$), seletividade (Sel) e o excesso enantiomérico do produto (ee_p) foram calculados segundo as equações 12, 13 e 14 abaixo.

(Eq. 12) $$Conv\ (\%) = \frac{A_{P_R}+A_{P_S}+A_{Sub}}{A_S+A_{P_R}+A_{P_S}+A_{Sub}}$$

(Eq. 13) $$Sel\ (\%) = 1 - \frac{A_{Sub}}{A_{P_R}+A_{P_S}+A_{Sub}}$$

(Eq. 14) $$ee_p = \left(\frac{A_{P_R}}{A_{P_R}+A_{P_S}} - \frac{A_{P_S}}{A_{P_R}+A_{P_S}}\right) \times 100$$

Em que A_{P_R} é a área correspondente ao pico da (*R*)-2-metóxi-N-(1-feniletil)acetamida, A_{P_S} é a área correspondente ao pico da (*S*)-2-metóxi-N-(1-feniletil)acetamida, A_S a área correspondente ao substrato ((*rac*)-1-feniletilamina) e A_{Sub} o somatório das áreas correspondentes aos subprodutos.

A (*rac*)-2-metóxi-N-(1-feniletil)acetamida foi sintetizada quimicamente segundo protocolo de Miranda e colaboradores (MIRANDA; SOUZA; MIRANDA, 2014) para a obtenção do padrão no CG-DIC utilizando a mesma metodologia. 0,24 mmol da (*rac*)-1-feniletilamina e 0,96 mmol do 2-metoxiacetato de metila foram adicionados em 3 mL de tolueno em um balão volumétrico a 70 °C por 24 h. O meio reacional foi lavado 3 vezes

com uma solução de HCl 10 % e a fase aquosa e orgânica foram separadas com um funil de separação. O solvente da fase orgânica foi evaporado em um rota-evaporador e o sal da (*rac*)-2-metóxi-N-(1-feniletil)acetamida foi recuperado.

4.11. RECICLO DO CATALISADOR HÍBRIDO

O reciclo foi feito aplicando o catalisador híbrido na mesma reação de resolução cinética dinâmica. Ao fim do primeiro ciclo, as nanopartículas foram separadas com um ímã e lavadas 4 vezes com 2 mL de tolueno. Elas foram deixadas para secar de um dia para o outro e em seguida usadas na resolução cinética dinâmica da (*rac*)-1-feniletilamina. Os cálculos de conversão, seletividade e excesso enantiomérico foram feitos usando as mesmas equações 12, 13 e 14.

4.12. CARACTERIZAÇÃO DOS CATALISADORES HÍBRIDOS

4.12.1. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é feita irradiando um raio infravermelho na amostra, sendo uma parte absorvida e outra transmitida por ela. O espectro resultante representa a absorção e transmissão molecular e é único para cada amostra (DUTTA, 2017). Essa técnica é uma metodologia clássica para a determinação de moléculas pequenas, tem a habilidade de obter informações principais de sistemas biológicos e é usada para verificar se a enzima está presente no suporte (CIPOLATTI, ELIANE PEREIRA *et al.*, 2017). A análise FTIR foi feita com o objetivo de verificar a eficácia do revestimento do ácido oleico na nanopartícula e para confirmar a imobilização enzimática. As amostras foram avaliadas em um Nicolet Magna FTIR-760 (foram preparadas pastilhas de KBr para as amostras sólidas) e o espectro foi avaliado na faixa de 4000 a 400 cm^{-1}.

4.12.2. DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX)

A difração de raios X (DRX) é baseada na habilidade de cristais difratarem raios X de forma característica, o que permite o estudo da cristalinidade de fases e fornece informações sobre as propriedades macro e microestruturais. Com a posição e intensidade

dos picos obtidos, é possível investigar parâmetros da rede cristalina, grupo espacial, composição química e análise de fase, entre outros (EPP, 2016).

As análises de DRX foram feitas com o objetivo de investigar a estrutura química e física das nanopartículas de óxido de ferro sintetizadas e as alterações após os revestimento, funcionalizações e imobilizações. As caracterizações foram conduzidas no Laboratório de Tecnologia do Hidrogênio (LabTecH) da Escola de Química, UFRJ. As amostras foram depositadas em um suporte de vidro próprio e em seguida inseridas no difratômetro de raios X Rigaku Miniflex II com anodo de cobre (radiação Cu Kα, 30 kV e 15 mA). A análise foi feita com passo de 0,05 ° e tempo de contagem de 1 s por passo na faixa 2Θ de 5 a 90 °.

Foi feita a estimação do diâmetro médio dos cristalitos através da equação de Scherrer em função do pico de maior intensidade do DRX (PATTERSON, 1939). Na equação 15, L_c é o diâmetro médio do cristalito, k é uma constante de proporcionalidade em função, tendo o valor de 0,94 para partículas esféricas, λ é o comprimento de onda da radiação (0,1542 nm para Cu Kα), Θ é o ângulo de difração pico e β é a largura a meia altura do pico usado.

(Eq. 15) $$L_c = \frac{k\,\lambda}{\beta\cos(\theta)}$$

4.12.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi feita com o objetivo de se investigar a morfologia e composição química do suporte e dos catalisadores. As imagens foram feitas no Laboratório Multiusuário de Nanociência e Nanotecnologia do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF). O microscópio eletrônico de transmissão possui uma fonte emissora de elétrons e um sistema de múltiplas lentes eletromagnéticas capazes de filtrar o feixe de elétrons. O feixe transmitido incide sobre a amostra e permite a formação de imagens (TANG; YANG, 2017).

Para a análise, 10 mg de amostra foram dispersadas em 10 mL de água destilada e sonicadas por 5 minutos. A solução foi gotejada em uma grade de cobre recoberta com carbono específica para a microscopia e, após a secagem das amostras, a grade foi inserida no microscópio eletrônico de transmissão de alta resolução JEOL 2100F 200kV. As imagens foram feitas em diferentes aumentos e foi feita a espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) em um sistema Noran Seven.

4.12.4. MAGNETOMETRIA

As propriedades magnéticas foram estudadas com o auxílio do equipamento PPMS Dynacool da Quantum Design equipado com um magnetômetro de amostra vibrante no Laboratório de Magnetometria da Infraestrutura Multiusuária para Materiais Avançados do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF). Foi feita a magnetização isotérmica através da aplicação de um campo magnético para avaliar a curva de magnetização, a magnetização de saturação e as propriedades de superparamagnetismo das nanopartículas. Durante o experimento, 10 mg da amostra foram inseridas no equipamento e as medidas foram feitas sob campo variável de -50000 a 50000 Oe (-5 a 5 T) a uma temperatura de 27 °C e sob purga de gás hélio.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. OBTENÇÃO DOS SUPORTES MAGNÉTICOS

5.1.1. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS

Nanopartículas Magnéticas

As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro sintetizadas a partir da metodologia de co-precipitação se assemelharam à magnetita, uma vez que apresentaram uma coloração preta, em forma de pó fino e que são facilmente atraídas por um ímã de Neodímio. As partículas sintetizadas através das diferentes metodologias não apresentaram diferenças visuais, conforme figura 36.

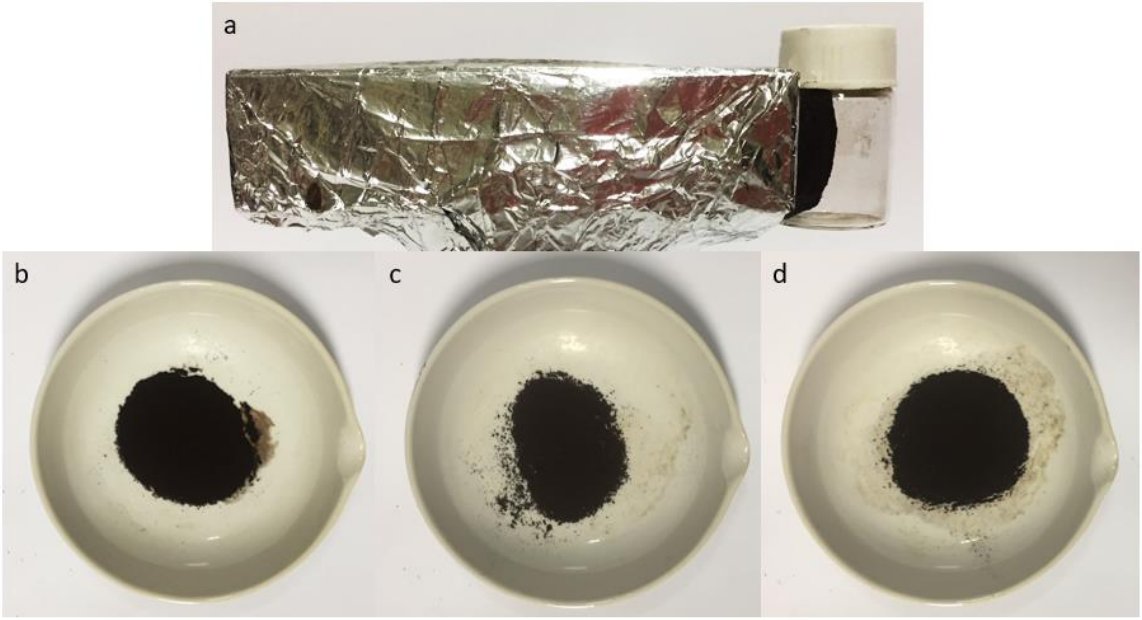


Figura 36: Nanopartículas. a) Nanopartícula atraída por um ímã, b) NP, c) NPUS, d) NPUSAO

Foi feita a análise de DRX com o objetivo de caracterizar a fase e a estrutura química dos cristais em função dos picos característicos, assim como calcular o diâmetro médio através da equação de Scherrer. Os difratogramas obtidos encontram-se na figura 37.

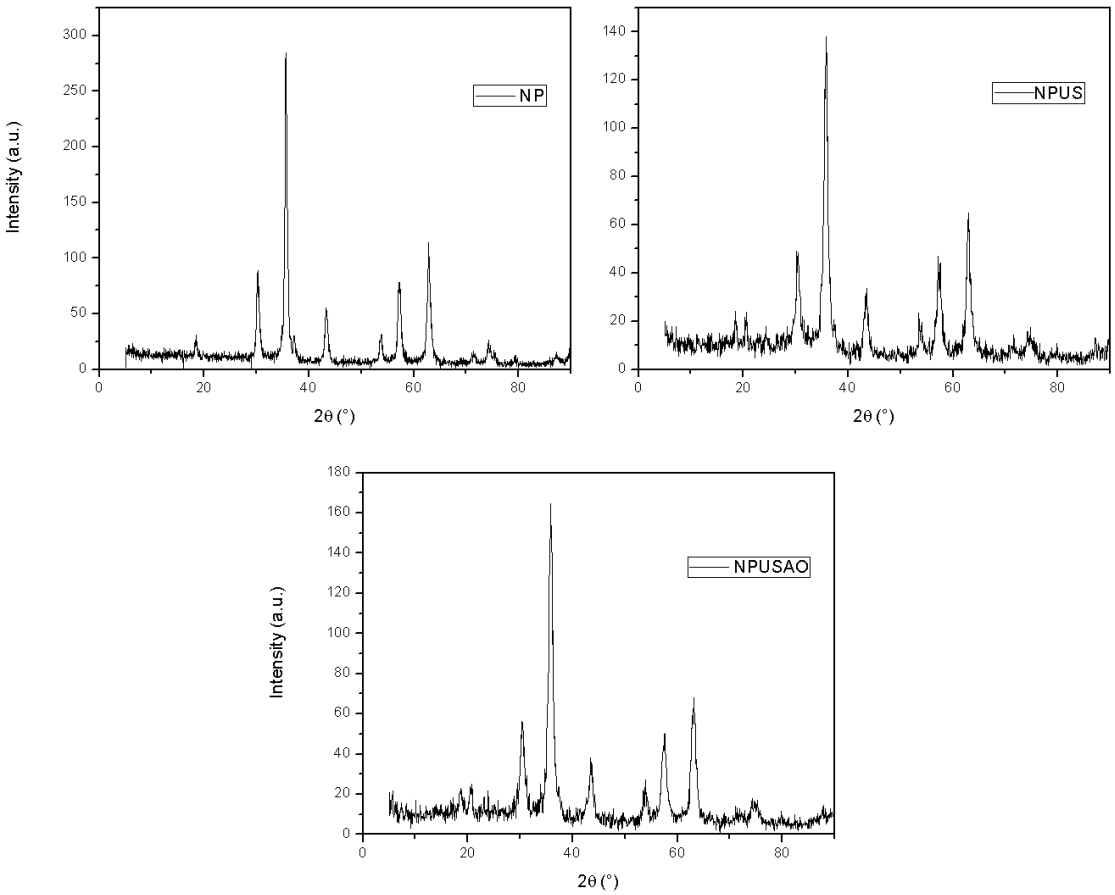


Figura 37: Difratogramas das nanopartículas sintetizadas através das diferentes metodologias.

É possível ver que os gráficos foram muito semelhantes para as três nanopartículas. Os picos obtidos são característicos de cristais de óxidos de ferro e a tabela 5 mostra a comparação mais em detalhe entre eles e os picos característicos de magnetita e maguemita (KASSAEE; MASROURI; MOVAHEDI, 2011; MAITY; AGRAWAL, 2007).

Tabela 5: Picos de DRX da magnetita, maguemita, NP, NPUS e NPUSAO.

Magnetita	Maguemita	NP	NPUS	NPUSAO
2Θ (°)	2Θ (°)	2Θ (°)	2Θ (°)	2Θ (°)
30,10	30,28	30,30	30,20	30,35
35,43	35,69	35,60	35,90	35,80
43,06	43,35	43,25	43,35	43,50
53,41	53,87	53,90	53,90	53,90
56,96	57,42	57,15	57,15	57,35
62,53	63,03	62,85	63,05	63,10
73,97	74,56	74,10	74,10	74,25

Os picos característicos da magnetita e da maguemita são muito próximos, o que dificulta a caracterização precisa do cristal. Pelos valores obtidos, é provável que as nanopartículas sintetizadas sejam compostas pela mistura dos dois cristais, sendo uma fase transitória entre a magnetita e a maguemita. Outros grupos realizaram a síntese de magnetita através da coprecipitação e identificaram resultados similares, e constataram a possível presença de cristais de maghemita (DE MENDONÇA *et al.*, 2018; HAMMICHE-BELLAL *et al.*, 2018)

Além disso, não foi possível concluir se a etapa de recobrimento com ácido oleico ajudou ou não na prevenção da oxidação da magnetita em maguemita. Outros trabalhos que realizaram a síntese de nanopartículas magnéticas com recobrimento de ácido oleico também tiveram resultados similares, o que mostra que a oxidação provavelmente ocorre de forma muito rápida, e que a preparação de nanopartículas contendo apenas magnetita é muito difícil (MAITY; AGRAWAL, 2007; SOARES *et al.*, 2016).

Os diâmetros médios dos cristalitos foram calculados através da equação de Scherrer em referência ao pico de maior intensidade e encontram-se junto com os parâmetros usados para o cálculo na tabela 6. Houve uma diferença significativa no diâmetro dos cristalitos entre as metodologias em que foram usadas as etapas de ultrassom e a metodologia sem a etapa de ultrassom.

Tabela 6: Diâmetros médios dos cristalitos calculados e parâmetros da equação de Scherrer.

Parâmetro	NP	NPUS	NPUSAO
2Θ (°)	35,60	35,90	35,80
β (°)	0,55	1,00	0,95
Diâmetro médio calculado (nm)	16	9	9

Através desses resultados, é possível ver que a etapa de ultrassom contribuiu para a diminuição do tamanho das nanopartículas, fenômeno também observado na literatura (CHATTERJEE; HAIK; CHEN, 2003; TANGWATANAKUL *et al.*, 2017). Segundo Gedanken (2004), o uso do ultrassom a permite a criação, crescimento e colapso de bolhas que se formam no líquido. Esse efeito gera pontos de alta pressão, que leva a uma cristalização de nanopartículas de forma mais rápida, controlada e com tamanhos menores.

Com relação à adição de ácido oleico, não foi observado diferença de tamanho das amostras com e sem o recobrimento realizado *in-situ*. Neto *et al.* (2018) viram que o

recobrimento com ácido oleico aumentou o tamanho dos cristais de 9 para 10 nm, porém o mesmo não foi observado neste trabalho.

As imagens obtidas com a microscopia eletrônica de transmissão também ajudaram a estimar o tamanho das nanopartículas, conforme mostra a figura 38. É possível ver que as nanopartículas têm entre 10 e 20 nm de diâmetro, têm formas arredondadas, porém não uniformes. As nanopartículas produzidas sem as etapas de ultrassom e ácido oleico parecem ter um diâmetro médio um pouco maior que do que as nanopartículas obtidas com essas outras etapas, corroborando com o diâmetro do cristalito medido usando a equação de Scherrer.

Outros trabalhos também comparam o tamanho de nanopartículas obtidas através da MET e através da equação de Scherrer. Nesses trabalhos, também foi avaliado que o tamanho observado na microscopia era maior do que o diâmetro médio calculado pela equação (ALIBEIGI; VAEZI, 2008; DE MENDONÇA *et al.*, 2018; TANGWATANAKUL *et al.*, 2017).

Borchert e colaboradores (2005) discutem que diversas técnicas tem vantagens e desvantagens em serem usadas para o cálculo do tamanho de nanopartículas. Apesar da microscopia ser a metodologia mais direto, a falta de contraste e a sobreposição de partículas dificultam a definição dos limites e faz com que a avaliação do tamanho não possa ser feita de forma precisa. No caso do DRX, o uso da equação de Scherrer possibilita a estimativa do tamanho de forma simples, no entanto, as aproximações feitas, como o valor do coeficiente k e as condições de medição, como o tempo de contagem e o passo usado, podem aproximar ou afastar o valor obtido do tamanho real.

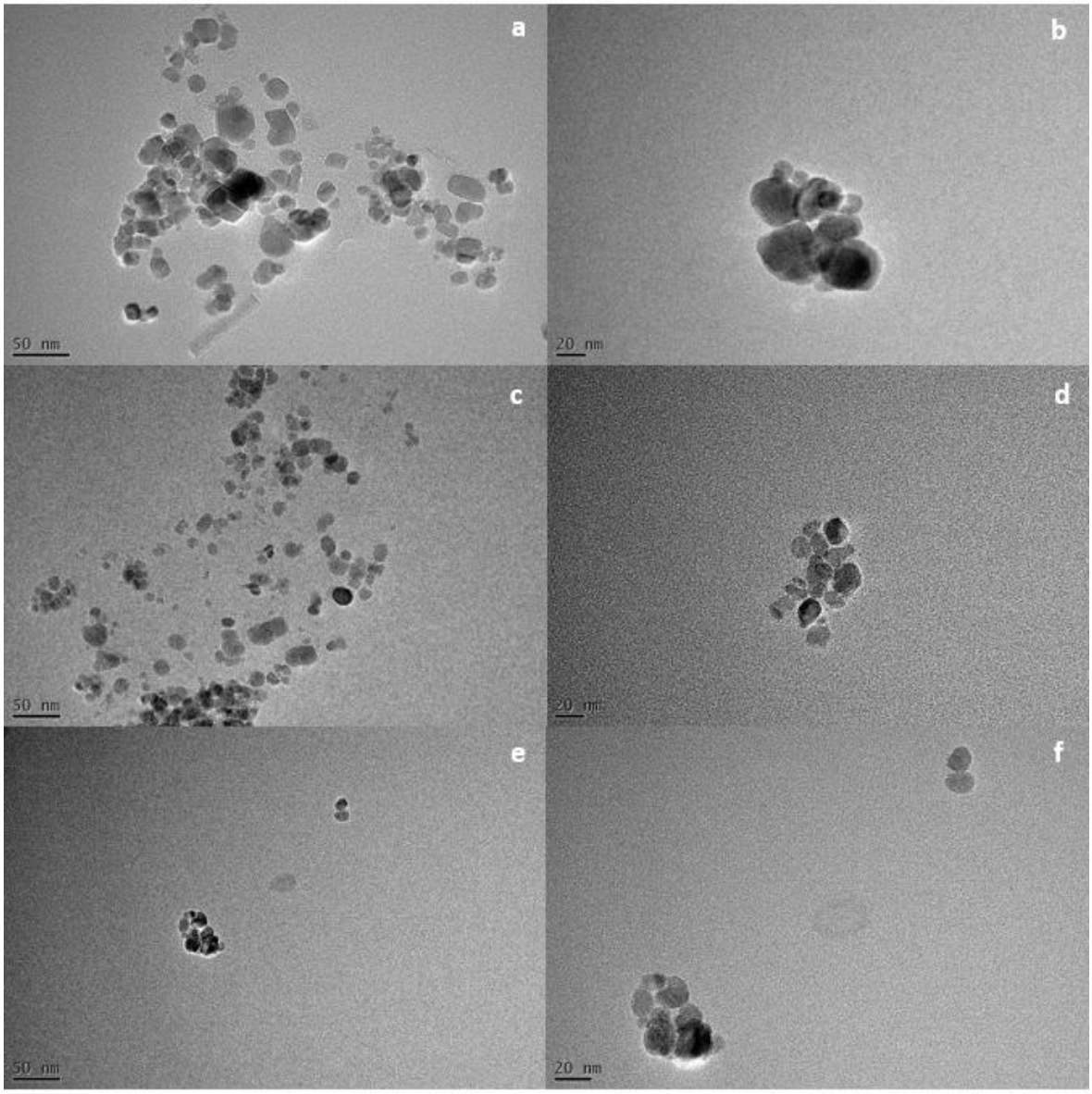


Figura 38: Imagens da microscopia eletrônica de transmissão. Imagens a e b correspondem às nanopartículas sintetizadas sem as etapas de ultrassom e sem o revestimento com ácido oleico, as imagens c e d correspondem às nanopartículas sintetizadas com as etapas de ultrassom, e as imagens e e f correspondem às nanopartículas sintetizadas com as etapas de ultrassom e revestidas com ácido oleico.

A espectroscopia de infravermelho foi feita para confirmar a presença de ácido oleico na superfície das nanopartículas e a figura 39 mostra os espectros obtidos pelas nanopartículas com e sem o recobrimento. A grande banda em 3141 cm^{-1} é correspondente às vibrações axiais de hidroxilas presentes na superfície das nanopartículas. Os dois pequenos picos em 2923 e 2852 cm^{-1} que aparecem para as nanopartículas recobertas com ácido oleico são característicos do estiramento assimétrico e simétrico de ligações CH_2 (HARNCHANA *et al.*, 2018). Isso evidencia o revestimento com ácido oleico.

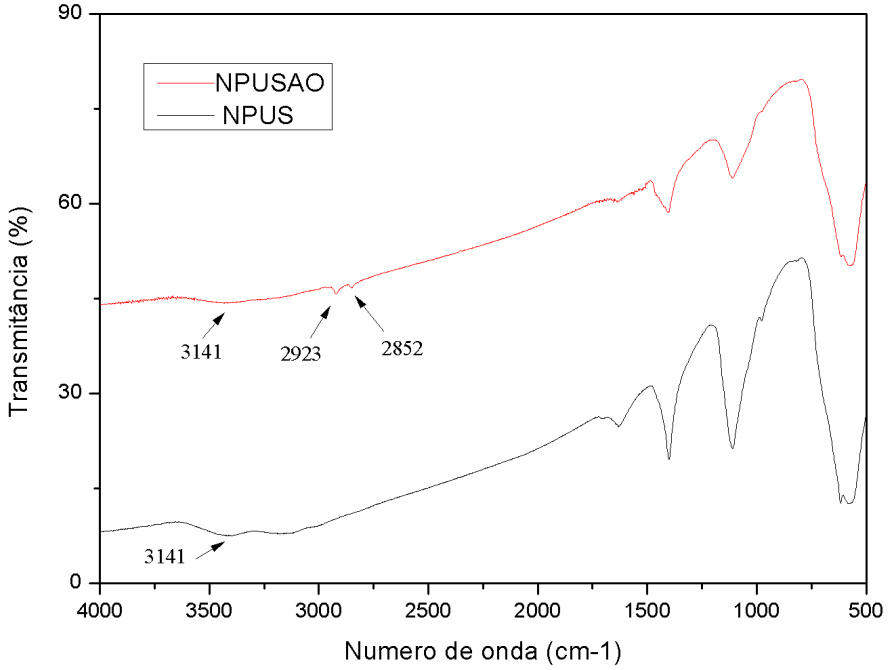


Figura 39: Espectro de infravermelho para as nanopartículas sintetizadas com ultrassom com e sem o recobrimento com ácido oleico.

Recobrimento com TEOS

Uma vez feito o recobrimento com TEOS, foi possível ver nas microscopias que uma camada de sílica foi depositada em volta de núcleos magnéticos. O tamanho das partículas aumentou para aproximadamente 50 a 100 nm, e elas ficaram com uma morfologia mais arredondada e mais uniforme. Também foi possível ver a formação de alguns aglomerados, conforme mostra a figura 40.

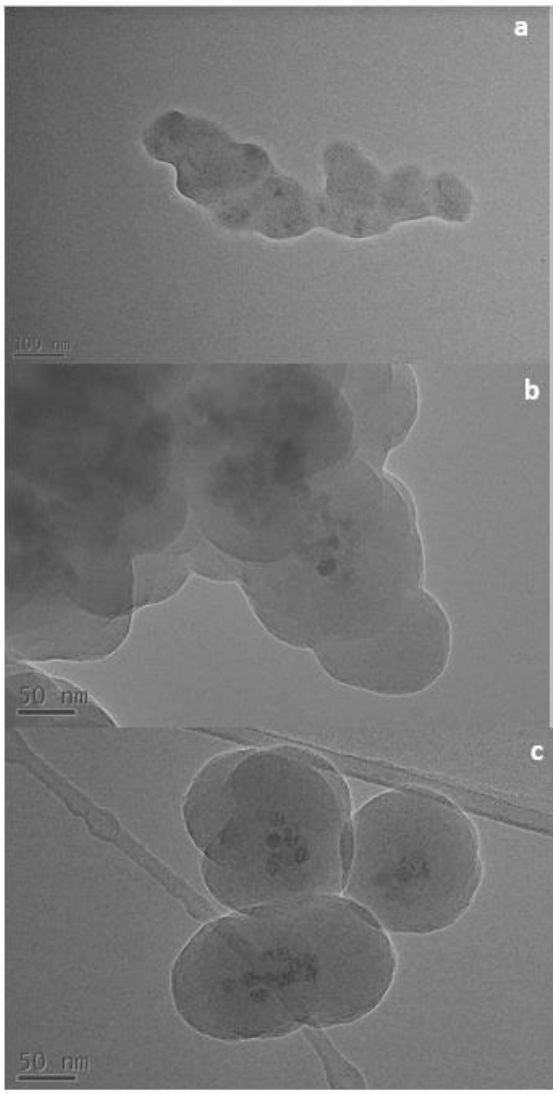


Figura 40: Nanopartículas revestidas com TEOS. A imagem a corresponde às nanopartículas sintetizadas sem as etapas de ultrassom e sem o revestimento com ácido oleico, a imagem b corresponde às nanopartículas sintetizadas com as etapas de ultrassom, e a imagem c corresponde às nanopartículas sintetizadas com as etapas de ultrassom e revestidas com ácido oleico.

No DRX, a presença da sílica alterou a cristalinidade observada para as nanopartículas de óxido de ferro, e foi possível ver uma faixa característica à fase amorfa da sílica recoberta, conforme mostra o difratograma da NPUSAO na figura 41.

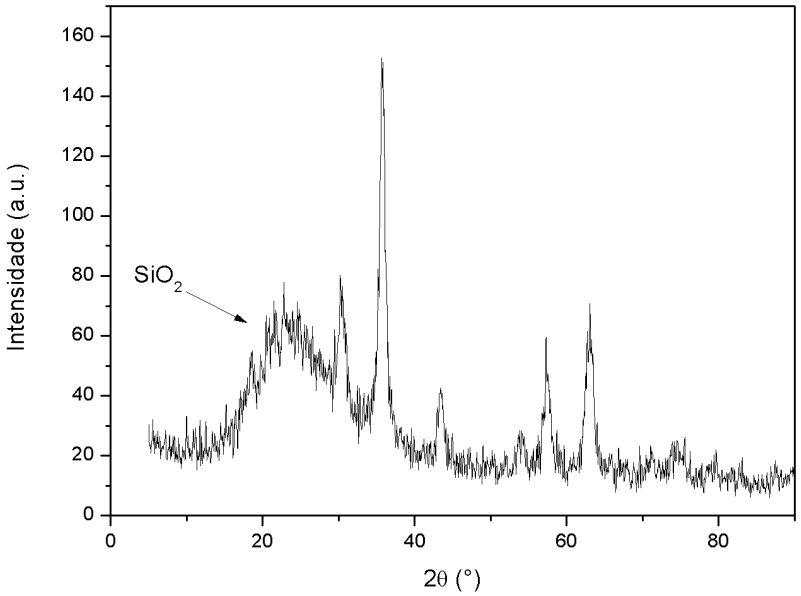


Figura 41: Difratogramas da NPUSAO recoberta com TEOS

Síntese de Paládio

A etapa de síntese de Pd também alterou a morfologia das nanopartículas e foi possível observar nanopartículas com tamanhos entre 5 a 10 nm de paládio aderidas na superfície da sílica, conforme mostra a figura 42. Imagens similares de microscopia são encontradas na literatura em catalisadores de paládio de suportados em sílica ou em partículas magnéticas revestidas com sílica (CHNG; ERATHODIYIL; YING, 2012; XU, SEN *et al.*, 2018; YI; LEE; YING, 2006).

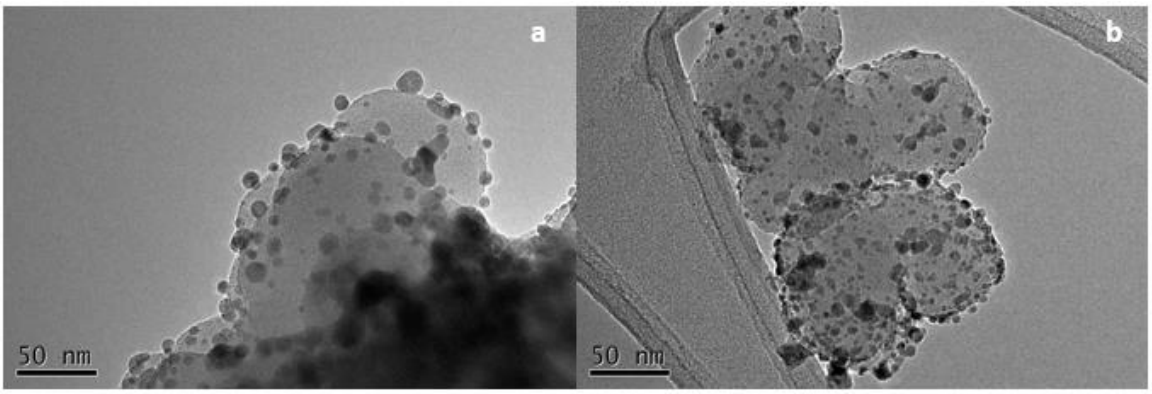


Figura 42: Nanopartículas revestidas com TEOS e com paládio em suas superfícies. A imagem a imagem a) corresponde às nanopartículas sintetizadas com as etapas de ultrassom, e a imagem b) corresponde às nanopartículas sintetizadas com as etapas de ultrassom e revestidas com ácido oleico.

Foi possível confirmar que essas nanopartículas na superfície da sílica eram de paládio através da técnica de EDS, conforme mostra a figura 43, em que cada cor representa um elemento químico. Tanto o ferro quanto a silício (vermelho e azul, respectivamente)

estão presentes na imagem de maneira uniforme, e o paládio (em verde) está presente apenas em alguns pontos.

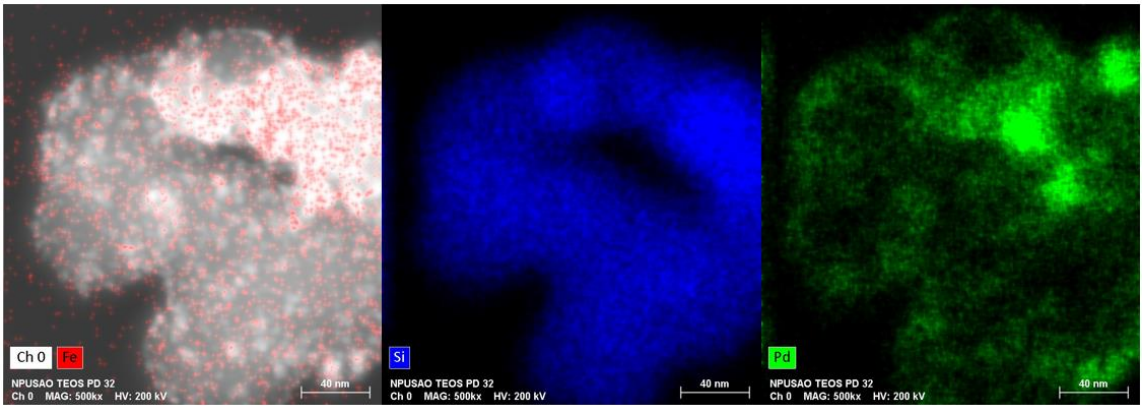


Figura 43: EDS da NPUSAO com 4,5% de paládio.

O DRX da NPUSAO e da NPUS contendo 4,5% de paládio também foi feito (figura 44) e foi possível identificar um pico largo a 40°, que é característico do paládio sem valência em uma estrutura cúbica de face centrada (GANESAN; FREEMANTLE; OBARE, 2007). Foi possível utilizar a equação de Scherrer para o cálculo do tamanho médio dos cristalitos de paládio e foi verificado um tamanho médio de 3 nm, conforme mostra a tabela 7.

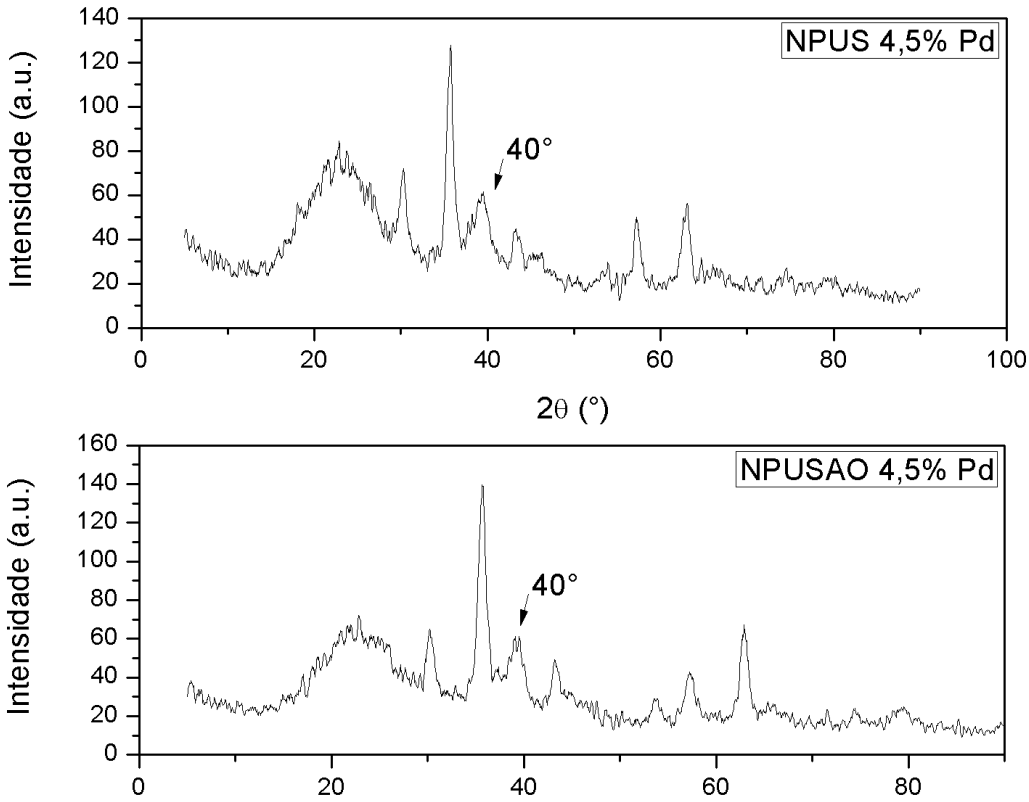


Figura 44: Difratogramas das nanopartículas com paládio.

Tabela 7: Diâmetro médio calculado e parâmetros da equação de Scherrer para o paládio

Parâmetro	NPUSAO 4,5% Pd	NPUS 4,5% Pd
2Θ (°)	39,60	39,60
β (°)	2,8	2,7
Diâmetro médio calculado (nm)	3	3

Por fim, foi feito o estudo da magnetização da NP e da NPUSAO antes e após o recobrimento com sílica e paládio. A figura 45 corresponde ao gráfico que correlaciona a magnetização com o campo aplicado e a tabela 8 mostra a magnetização de saturação para cada uma das nanopartículas.

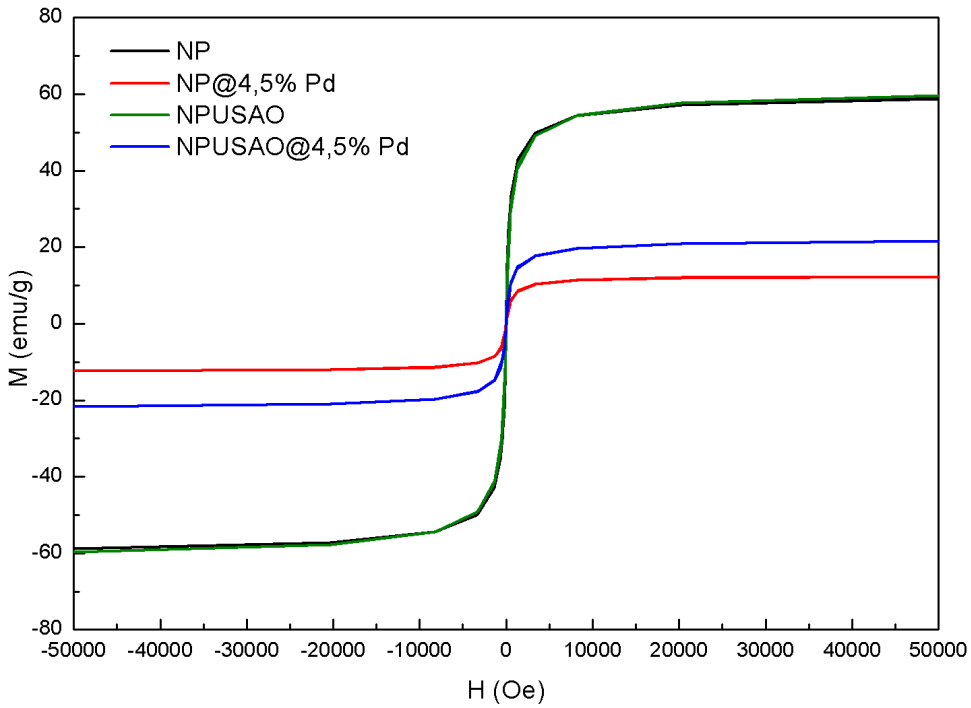


Figura 45: Magnetização em função do campo aplicado.

Tabela 8: Magnetização de saturação das nanopartículas

Nanopartícula	NP	NPUSAO	NP@4,5%Pd	NPUSAO@4,5%Pd
Magnetização de saturação (emu/g)	60	60	12	22

É possível ver que a adição das etapas de ultrassom e de recobrimento com o ácido oleico não interferiu na magnetização das nanopartículas de óxido de ferro. No entanto, após o revestimento com sílica e paládio, houve diferença na magnetização da NP e NPUSAO. Também é possível ver pelo gráfico que não houve histerese, que significa que as nanopartículas têm um comportamento superparamagnético. Esse comportamento é característico de nanopartículas de magnetita e maguemita e é caracterizado pela ausência de magnetização remanescente uma vez que o campo magnético é removido (LEE *et al.*, 2008).

É provável que as etapas de ultrassom e ácido oleico tenham contribuído para uma melhor dispersão e menor tamanho das nanopartículas, fazendo com que os núcleos magnéticos estejam mais bem distribuídos após o recobrimento da sílica, gerando uma magnetização maior. Outra explicação possível é o fato da NP ter um tamanho maior que a NPUSAO, gerando uma camada maior de sílica recoberta, diminuindo a magnetização

de saturação. Thangaraj *et al.* (2016) avaliaram a influência do recobrimento com TEOS na magnetização de nanopartículas e verificaram que, apesar das propriedades superparamagnéticas se manterem após o recobrimento, quanto maior a carga de sílica, menor a magnetização de saturação obtida.

Neto e colaboradores (2018) sintetizaram nanopartículas de óxido de ferro através da metodologia de co-precipitação e obtiveram nanopartículas com tamanhos e morfologias similares. A magnetização de saturação encontrada por esse grupo também foi da ordem de 60 emu/g. Maity e Agrawal (2007) avaliaram a influência do recobrimento com o ácido oleico das nanopartículas sintetizadas com o mesmo protocolo e avaliaram que o recobrimento com ácido oleico teve pouco interferência no magnetismo das nanopartículas.

5.2. REAÇÃO DE RACEMIZAÇÃO DA (*S*)-1-FENILETILAMINA

5.2.1. CROMATOGRAMAS PADRÕES

Para a análise da reação de racemização da (*S*)-1-feniletilamina, foi feita a injeção no CG-DIC dos enantiômeros *S* e *R* puros, e da mistura racêmica obtidos comercialmente com o objetivo de identificar o pico de cada composto no protocolo usado. As figuras 46, 47 e 48 correspondem aos cromatogramas padrões das aminas puras com e sem a derivatização.

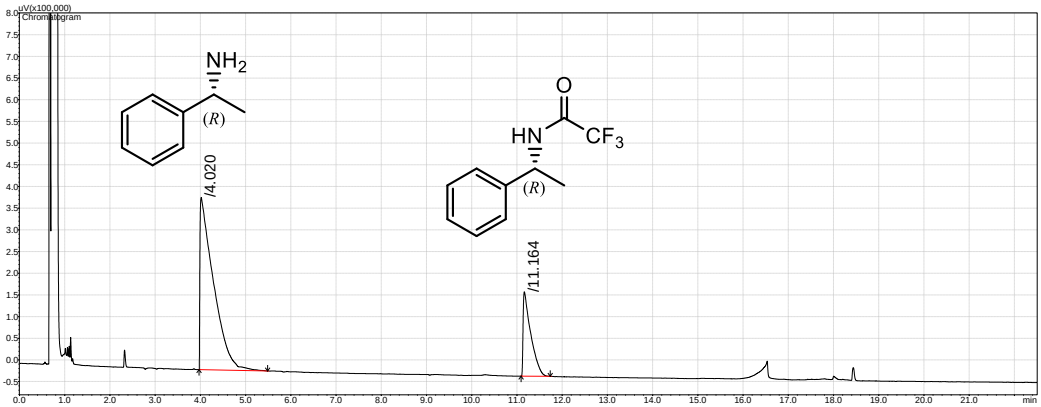


Figura 46: Cromatograma da (*R*)-1-feniletilamina sem e com derivatização com anidrido trifluoroacético (tempos de retenção 4,020 min e 11,164 min, respectivamente).

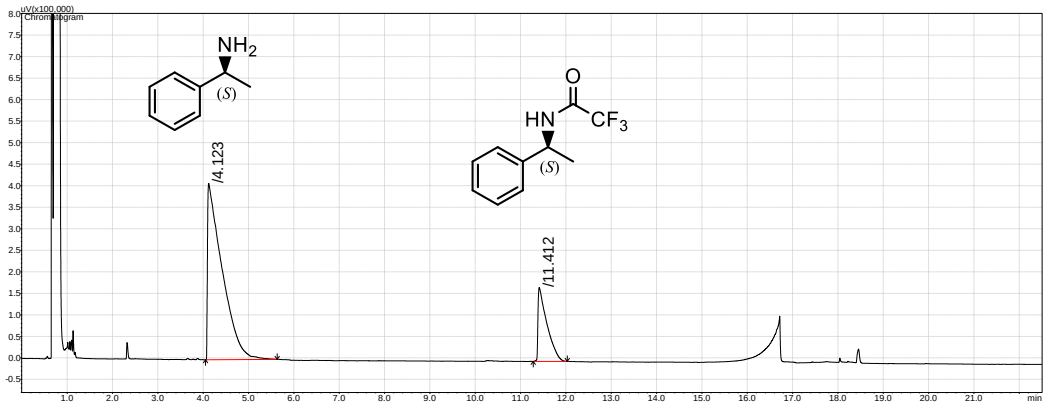


Figura 47: Cromatograma da (*S*)-1-feniletilamina sem e com derivatização com anidrido trifluoroacético (tempos de retenção 4,123 min e 11,412 min, respectivamente).

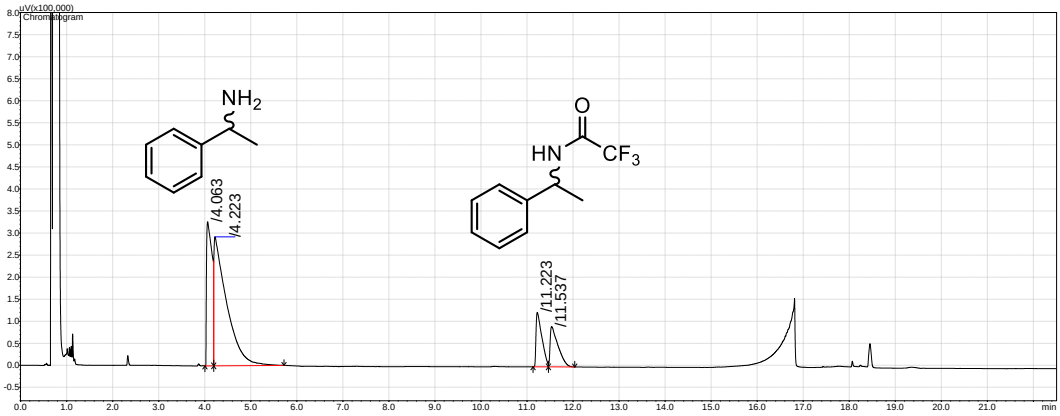


Figura 48: Cromatograma da (*rac*)-1-feniletilamina sem e com derivatização com anidrido trifluoroacético (tempos de retenção 4,063 e 4,223 min, e 11,223 e 11,537 min, respectivamente)

Uma vez que a derivatização ajudou a separa os enantiômeros, as análises cromatográficas foram feitas após essa etapa.

5.2.2. Racemização usando nanopartículas sintetizadas sem ultrassom e sem ácido oleico (NP)

As nanopartículas sintetizadas sem ultrassom e sem ácido oleico contendo 3 %, 4,5 % e 6 % de paládio foram utilizadas na racemização da (*S*)-1-feniletilamina. Conforme dito anteriormente, a quantidade de paládio foi mantida igual em todas as reações (30 mol%) com o intuito de avaliar o impacto da concentração do paládio na nanopartícula.

Para a nanopartícula contendo 3 % de paládio (NP@3%Pd), após 24 h de reação apenas 7 % da (*S*)-1-feniletilamina tinha se convertido em (*R*)-1-feniletilamina e 24 % tinha se convertido em subprodutos, conforme cromatograma apresentado na figura 49. Após 48

h de reação, tanto a (*S*)-1-feniletilamina quanto a (*R*)-1-feniletilamina tinham se convertido em subprodutos.

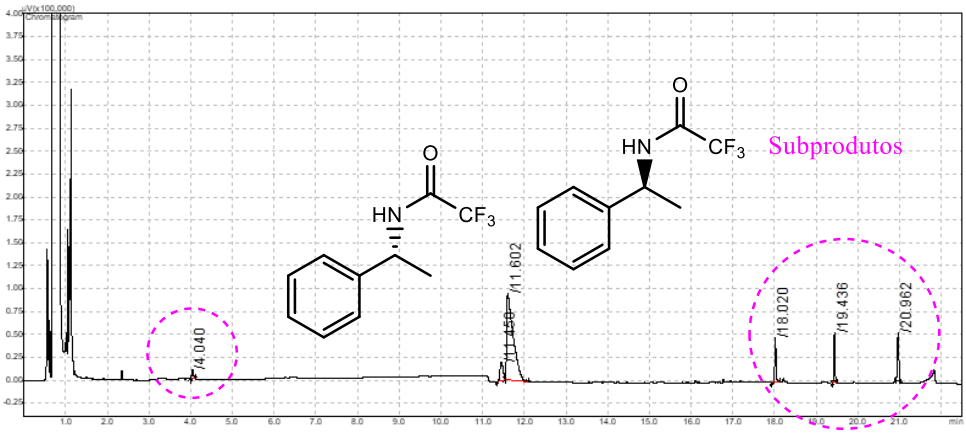


Figura 49: Cromatograma da racemização usando NP@3%Pd após 24 h de reação

Para a nanopartícula contendo 4,5 % de paládio (NP@4,5%Pd), a racemização completa ocorreu após 18 h de reação, porém quase 77 % da (*S*)-1-feniletilamina e da (*R*)-1-feniletilamina haviam se convertido em subprodutos, mostrando uma baixa seletividade, conforme figura 50. Após 24 h de reação, ambas haviam se convertido totalmente em subprodutos.

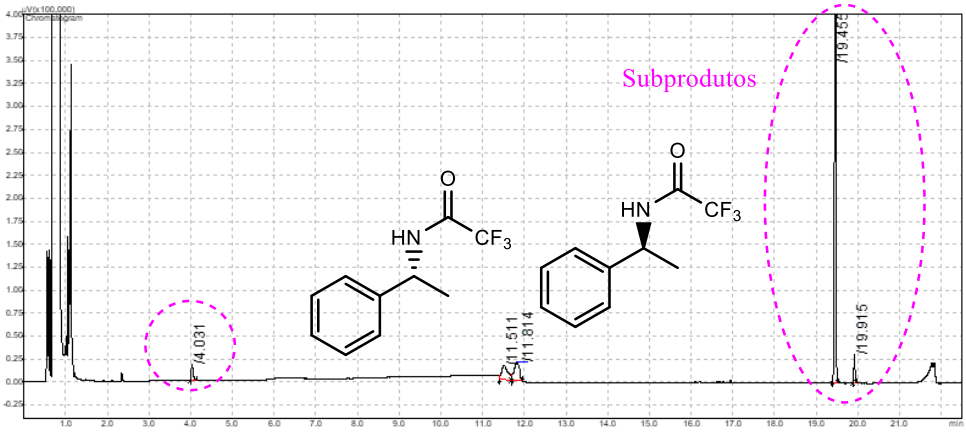


Figura 50: Cromatograma da racemização com a NP@4,5%Pd após 18 h de reação

A nanopartícula contendo 6 % de paládio (NP@6%Pd) apresentou uma conversão de 11 % da (*S*)-1-feniletilamina em (*R*)-1-feniletilamina após 18 h de reação com uma alta seletividade. Após 24 h de reação, aproximadamente 30 % da (*S*)-1-feniletilamina havia se

convertido em (*R*)-1-feniletilamina, porém com um aumento significativo de subprodutos, conforme mostra a figura 51.

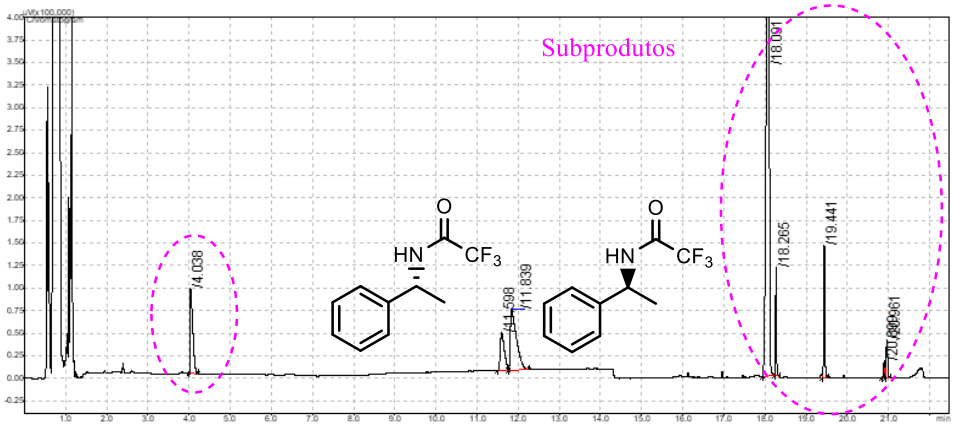


Figura 51: Cromatograma da racemização com a NP@6%Pd após 24 h de reação

Os resultados da racemização com as nanopartículas de ferro suportadas com paládio sintetizadas sem as etapas de ultrassom e sem ácido oleico não foram satisfatórios, pois apresentaram um tempo longo de reação e uma baixa seletividade. Também foi possível observar que mesmo aumentando a quantidade de paládio no suporte magnético não há melhoras significativas na racemização acima de uma certa concentração.

5.2.3. Racemização usando nanopartículas sintetizadas com as etapas de ultrassom e sem recobrimento com ácido oleico (NPUS)

Com o objetivo de se obter partículas de tamanhos menores e mais homogêneas, a etapa de dispersão no ultrassom foi incorporada durante a síntese das nanopartículas. Em seguida, as nanopartículas sintetizadas com ultrassom e sem ácido oleico contendo 3, 4,5 e 6 % de paládio (NPUS@3%Pd, NPUS@4,5%Pd e NPUS@6%Pd, respectivamente) foram utilizadas na racemização da (*S*)-1-feniletilamina.

Após 3 horas de reação, foi verificado que a racemização já havia se completado para as três nanopartículas contendo as diferentes concentrações de paládio e que subprodutos da reação já haviam sido formados, conforme figuras 52, 53 e 54.

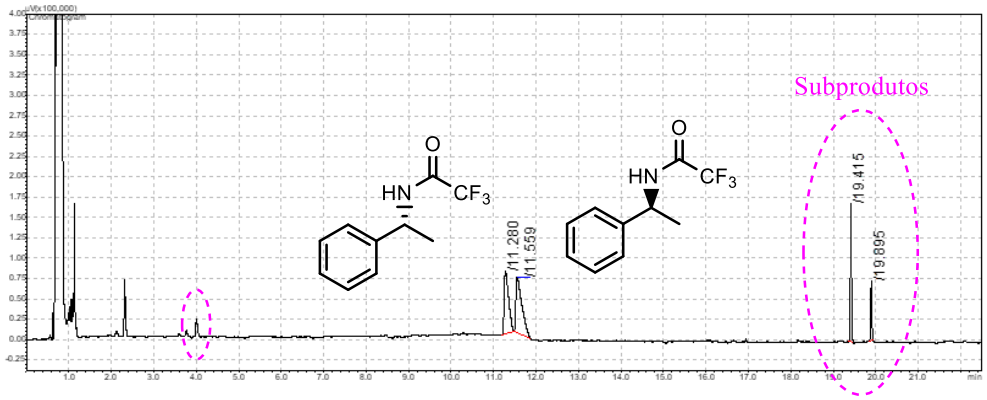


Figura 52: Cromatograma da reação de racemização com a NPUS@3%Pd após 3 h de reação

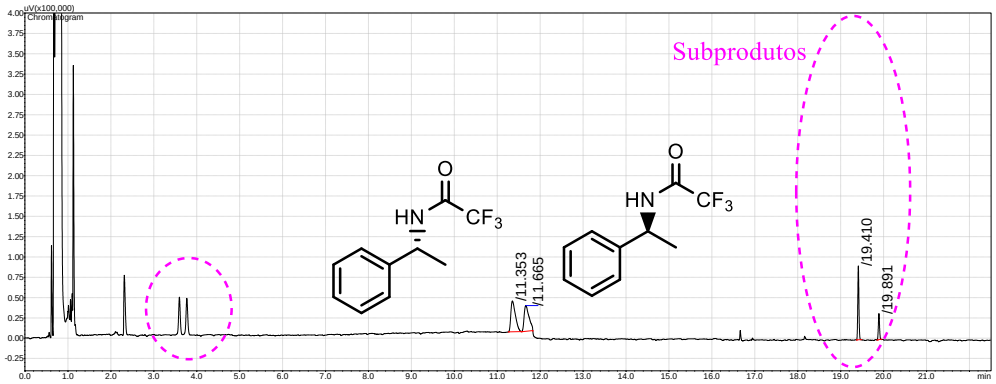


Figura 53: Cromatograma da reação de racemização com a NPUS@4,5%Pd após 3 h de reação

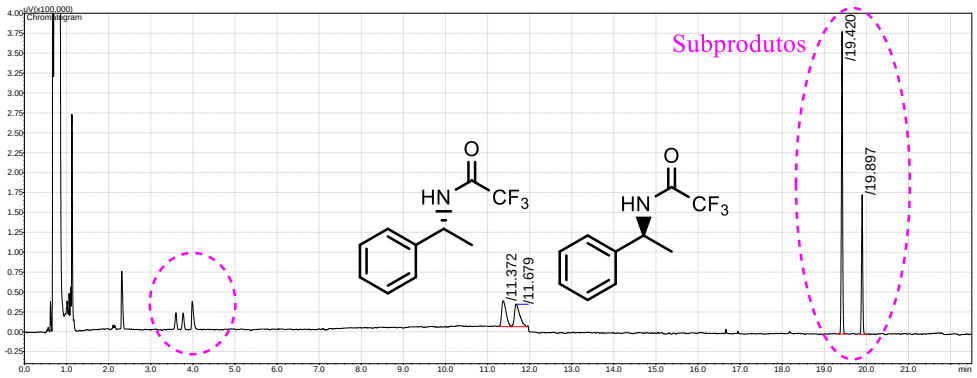


Figura 54: Cromatograma da reação de racemização com a NPUS@6%Pd após 3 h de reação

Esses resultados mostram que o ultrassom teve um impacto positivo na dispersão das nanopartículas para deixá-las com um tamanho menor e menos agregadas, o que permitiu provavelmente a melhor dispersão do paládio em suas superfícies. Isso possibilitou o aumento da conversão e a diminuição do tempo de racemização. Segundo

Xu e colaboradores, a atividade catalítica de racemização do paládio é determinada principalmente pela sua dispersão, logo, controlar o tamanho das nanopartículas é fundamental (XU *et al.*, 2017).

Para verificar o tempo ótimo de racemização e a cinética da reação, alíquotas foram retiradas do meio reacional de 30 em 30 minutos até 3 h de reação e foi feito o cálculo de conversão, seletividade e excesso enantiomérico em função dos picos obtidos por CG-DIC. A figura 55 mostra a variação desses parâmetros para as nanopartículas contendo as três concentrações diferentes de paládio.

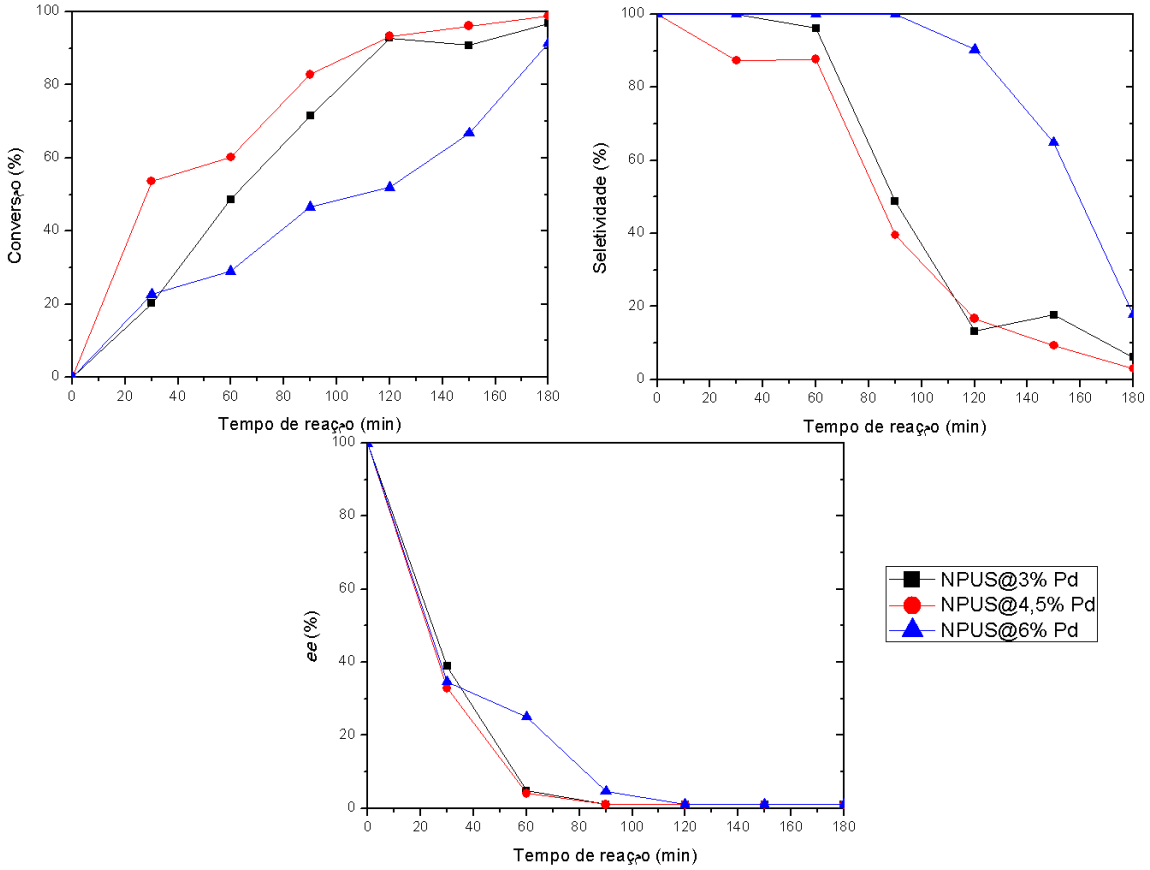


Figura 55: Gráficos de conversão, seletividade e excesso enantiomérico para a racemização da NPUS nas três concentrações de paládio.

A NPUS@4,5%Pd foi a que apresentou a conversão mais rápida ao longo do tempo, mesmo em comparação com a nanopartícula contendo mais paládio, a NPUS@6%Pd. É importante ressaltar que no caso da racemização, valores ideais de conversão são da ordem de 50 %, já que o objetivo é ter um produto que seja um racemato, contendo 50 % do enantiômero de partida e 50 % do outro enantiômero. Valores acima de 50 % indicam formação de subproduto, logo, não são desejáveis.

A seletividade da NPUS@6%Pd é mais alta do que a das partículas contendo 3% e 4,5% de paládio. Isso se deve ao fato da conversão ter sido mais rápida para essas duas partículas, o que faz com que a seletividade caia mais rapidamente. Com relação ao excesso enantiomérico, a NPUS@3% e NPUS@4,5% foram as nanopartículas que apresentaram um melhor valor em um tempo de reação menor.

Analisando os três gráficos, é possível concluir que a NPUS@3%Pd foi a que apresentou os melhores resultados em um tempo de reação menor (49 % de conversão, 96 % de seletividade e 5 % de excesso enantiomérico em 60 min de reação).

5.2.4. Racemização usando nanopartículas sintetizadas com as etapas de ultrassom e com recobrimento com ácido oleico (NPUSAO)

Assim como para os outros suportes, a reação de racemização da (*S*)-1-feniletilamina foi conduzida usando 3, 4,5 e 6 % de paládio nas nanopartículas sintetizadas com ultrassom e com ácido oleico (NPUSAO@3%Pd, NPUSAO@4,5%Pd e NPUSAO@6%Pd, respectivamente). Alíquotas foram retiradas de 30 em 30 minutos do meio reacional ao longo de 3 horas com o objetivo de avaliar o melhor tempo e a cinética da reação. Em seguida, os gráficos de conversão, seletividade e excesso enantiomérico foram traçados em função dos picos obtidos por CG-DIC.

A figura 56 mostra que a conversão da NPUSAO@4,5% foi melhor e, assim como para a NPUS, a NPUSAO que apresentou os valores de conversão mais baixos foi aquela contendo 6% de paládio. Com relação à seletividade, os valores foram inversamente proporcionais à conversão, sendo a seletividade da NPUS@6%Pd mais alta ao longo do tempo, uma vez que sua conversão foi mais lenta. Por fim, o excesso enantiomérico se correlacionou com os outros parâmetros, e o catalisador que apresentou os melhores resultados foi a NPUSAO@4,5%Pd, com o *ee* de 4 % após apenas 60 minutos de reação.

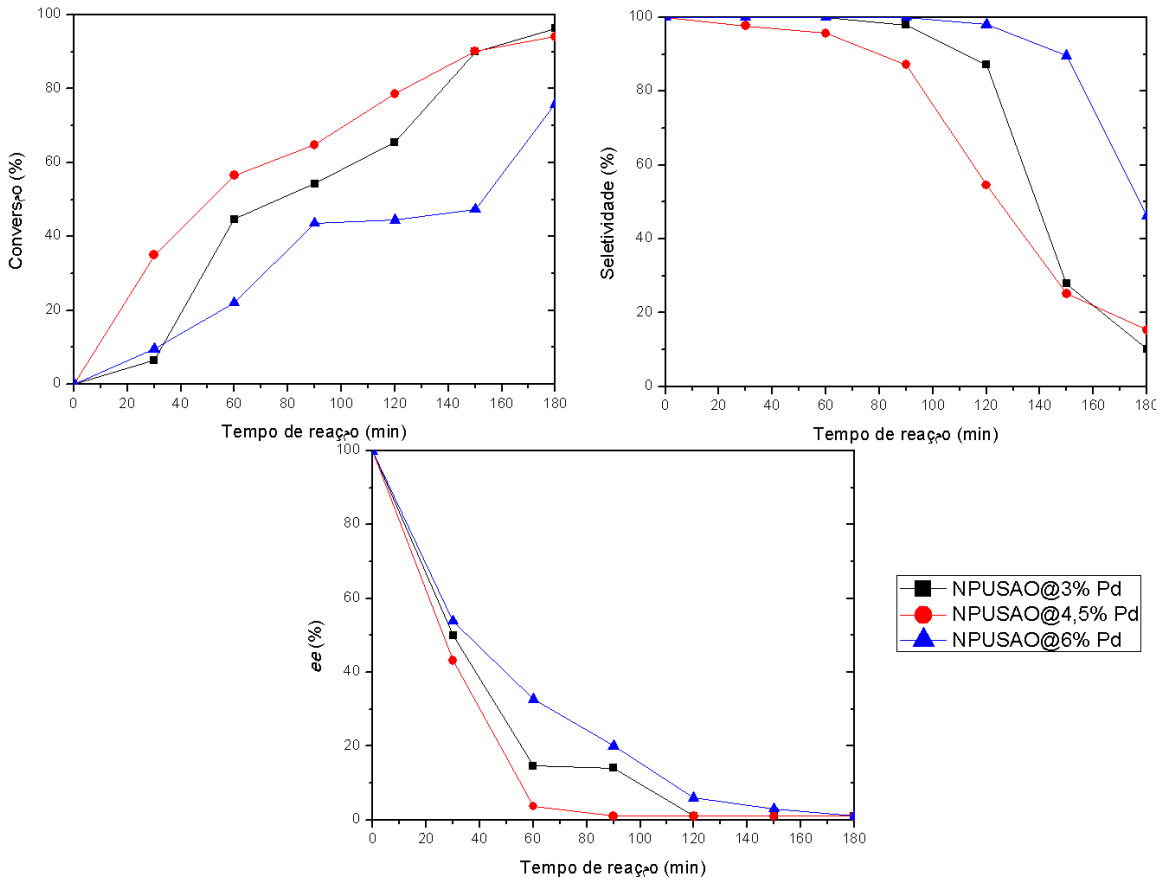


Figura 56: Gráficos de conversão, seletividade e excesso enantiomérico para a racemização da NPUSAO nas três concentrações de paládio.

Com base nesses resultados, é possível concluir que a NPUSAO que apresentou o melhor resultado na reação de racemização foi a contendo 4,5 % de paládio, tendo alcançado 56 % de conversão, 96 % de seletividade e 4 % de excesso enantiomérico. Esses resultados foram muito similares aos obtidos com a NPUS, o que corrobora o fato que a adição do ácido oleico provavelmente não teve um papel significativo adicional na redução do tamanho das nanopartículas.

5.2.5. Racemização usando nanopartículas de sílica (Sílica)

Para comparar a influência da partícula de óxido de ferro na reação de racemização com o paládio, um catalisador equivalente de sílica foi produzido a partir do TEOS, funcionalizado com o APTES e suportado com as três concentrações diferentes de paládio utilizadas (Sílica@3%Pd, Sílica@4,5%Pd e Sílica@6%Pd). A mesma reação foi conduzida com essa partícula e alíquotas foram analisadas de 30 em 30 minutos até 3 h de reação, com o objetivo de se obter os gráficos de conversão, seletividade e excesso enantiomérico.

A figura 57 mostra os resultados de conversão para as nanopartículas de sílica contendo as diferentes concentrações de paládio. Em comparação com o catalisador magnético, os valores de conversão para essas partículas foram mais elevados nos primeiros 90 minutos de reação e depois teve um aumento menor. Além disso, diferentemente das nanopartículas magnéticas, a conversão variou pouco em função das diferentes concentrações de paládio. A principal diferença observada foi com as partículas contendo 6 % de paládio, que apresentaram uma conversão mais baixa ao longo do tempo em comparação com as outras.

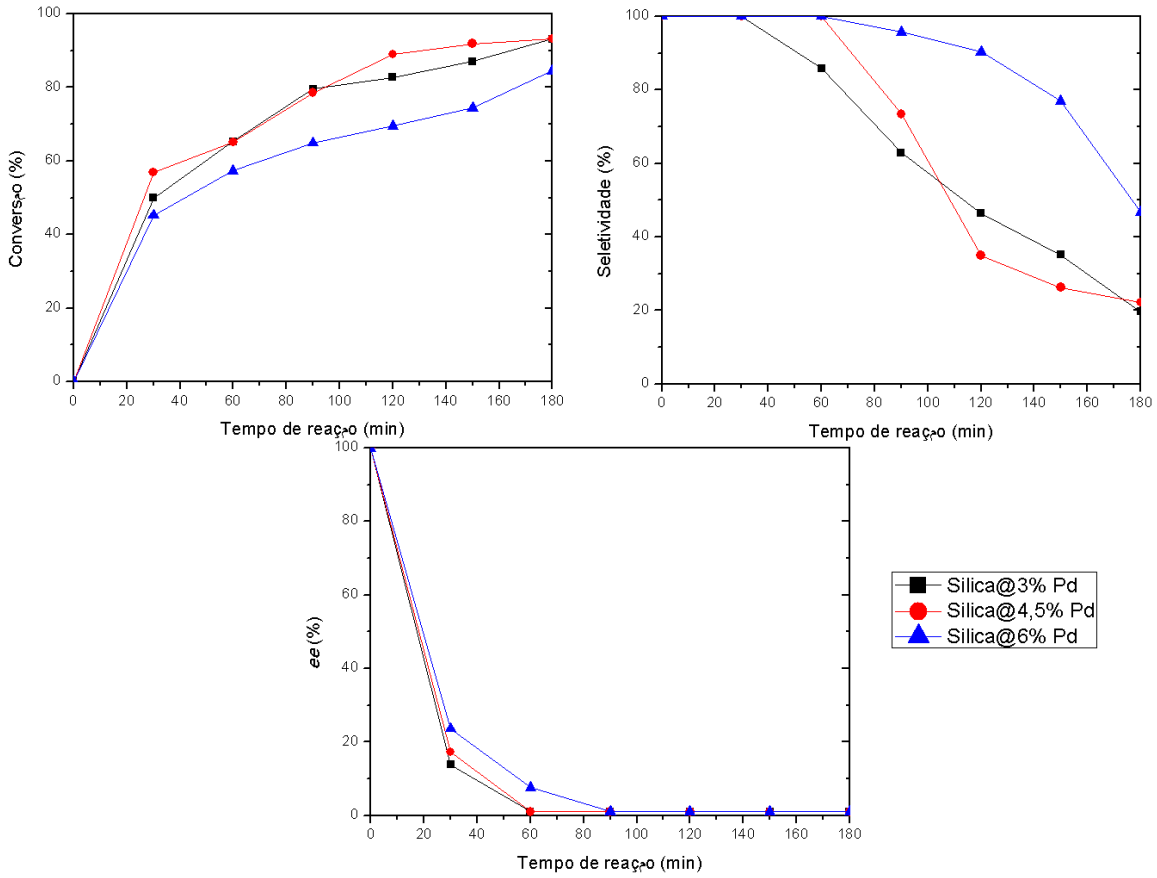


Figura 57: Gráficos de conversão, seletividade e excesso enantiomérico para a racemização das nanopartículas de sílica nas três concentrações de paládio.

Em comparação com a partícula magnética, os resultados de seletividade foram um pouco mais altos, o que faz sentindo uma vez que após um período a conversão diminuiu a taxa de crescimento, indicando que houve menos subprodutos sendo formado. Assim como para o catalisador magnético, as partículas de sílica contendo 6 % de paládio manteve a seletividade mais alta ao longo do tempo.

Com relação ao excesso enantiomérico, os valores obtidos com o suporte de sílica foram melhores do que para a partícula magnética, com valores abaixo de 30 % mesmo após apenas 30 minutos de reação. Além disso, após 90 minutos de reação, todas as partículas de sílica já tinham valores de *ee* abaixo de 1, o que só foi observado após 120 minutos de reação para a NPUS e após 180 minutos para a NPUSAO.

Em função desses resultados, é possível concluir que a partícula que sílica que apresentou os melhores resultados na reação de racemização foi também aquela contendo 4,5 % de paládio, apresentando uma conversão de 65 %, com 86 % de seletividade e excesso enantiomérico < 1 %.

Os melhores valores para cada uma das partículas foram inseridos na tabela 9 para facilitar a comparação entre eles e com referências da literatura.

Tabela 9: Racemização da (S)-1-feniletilamina

Entrada	Suporte	Conc. de Pd (%)	Tempo (min)	Conversão (%)	Seletividade (%)	*ee* (%)
1	NPUS	3	60	49	96	5
2	NPUS	4,5	60	60	88	4
3	NPUS	6	90	47	100	5
4	NPUSAO	3	90	65	87	<1
5	NPUSAO	4,5	60	57	96	4
6	NPUSAO	6	120	44	98	6
7	Sílica	3	60	65	86	<1
8	Sílica	4,5	60	65	100	<1
9	Sílica	6	90	65	96	<1

Comparando os 3 diferentes tipos de nanopartículas utilizadas, é possível concluir que as nanopartículas de sílica apresentaram um resultado um pouco melhor em comparação com as partículas magnéticas. É possível que o núcleo magnético cause uma alteração no tamanho e na morfologia das nanopartículas uma vez estas recobertas com sílica, e que posteriormente acabe modificando a dispersão do paládio em sua superfície.

Com relação à concentração de paládio suportado, é possível concluir que 4,5 % foi a concentração que apresentou os melhores resultados para a NPUSAO e para a sílica, e 3 % para a NPUS. Conforme dito anteriormente, a atividade catalítica do paládio está diretamente relacionada à sua uniformidade e dispersão nos suportes, logo, essas

concentrações são provavelmente as que contribuíram com a melhor dispersão desse metal, obtendo-se assim os melhores resultados de racemização.

Xu e colaboradores (2018) sintetizaram um catalisador de paládio em uma rede metalorgânica e também verificaram que o aumento da quantidade de paládio de 1,5 % para 3 % na superfície do suporte não melhorou sua eficiência catalítica na racemização da 1-feniletilamina. Os melhores resultados de racemização obtidos com esse catalisador foram de 46 % de conversão, 76 % de seletividade e 15 % de excesso enantiomérico após 18 horas de reação.

Segundo Shakeri e colaboradores (2011), a alteração da atividade catalítica em função do tamanho e a quantidade dos catalisadores de paládio nanométricos é controversa e que os melhores resultados são obtidos caso a caso. Esse grupo conduziu a reação de racemização usando paládio suportado a 3 % em espuma mesocelular de sílica. Após 4 h de reação, foi alcançada a racemização total com uma seletividade superior a 96 %.
Miranda e co-autores (2014). testaram diferentes catalisadores de paládio comerciais e obtiveram os melhores resultados após 2,5 horas de reação com paládio comercial suportado em sulfato com 96 % de seletividade e 3 % de excesso enantiomérico. Já o grupo de Engström (2013) alcançaram 1 % de excesso enantiomérico após 4 horas de reação com um catalisador de paládio suportado em sílica mesoporosa.

Com base nesses resultados, é possível concluir que os tempos de racemização obtidos foram superiores aos encontrados na literatura buscada. Também foi possível verificar que o recobrimento de ácido oleico não interferiu na morfologia das nanopartículas nem na reação de racemização com o paládio. Por esse recobrimento ser citado na literatura por apresentar benefícios de prevenção de oxidação do óxido de ferro (MAITY; AGRAWAL, 2007), foi decidido seguir para a etapa de imobilização com o suporte magnético recoberto com ácido oleico e com a concentração de paládio que apresentou os melhores resultados, o NPUSAO@4,5%Pd.

5.3. IMOBILIZAÇÃO DA CALB NO SUPORTE COM PALÁDIO

Foi feita a imobilização da CALB no suporte que apresentou os melhores resultados para a racemização (NPUSAO@4,5%Pd), e foram comparados dois reagentes de ativação de suporte diferentes, o glutaraldeído e a epicloridrina. Em seguida, foi feita a avaliação da atividade hidrolítica, o potencial de conversão de esterificação e a eficiência dos catalisadores híbridos na resolução cinética dinâmica da (*rac*)-1-feniletilamina. Uma vez

decidido o ativador, foi feita a otimização da imobilização com o intuito de melhorar a atividade e os resultados da resolução cinética dinâmica.

5.3.1. COMPARAÇÃO DOS PROTOCOLOS DE IMOBILIZAÇÃO USANDO GLUTARALDEÍDO E EPICLORIDRINA

A imobilização da CALB no suporte através dos dois ativadores foi comprovada através da espectroscopia de infravermelho. Na figura 58 encontram-se os espectros da NPUSAO, da enzima e do suporte com a enzima imobilizada através dos dois reagentes, glutaraldeído (GLU) e epicloridrina (EPI). É possível ver que os espectros dos biocatalisadores imobilizados é intermediário aos outros dois. O pico em 1640 cm^{-1} corresponde à vibração de ligação de uma amida secundária (CO=N-H), que é correspondente às enzimas imobilizadas (CHEN, GUAN-JIE *et al.*, 2012; THANGARAJ *et al.*, 2016). Não houve diferença entre os espectros da enzima imobilizada com o glutaraldeído e com a epicloridrina.

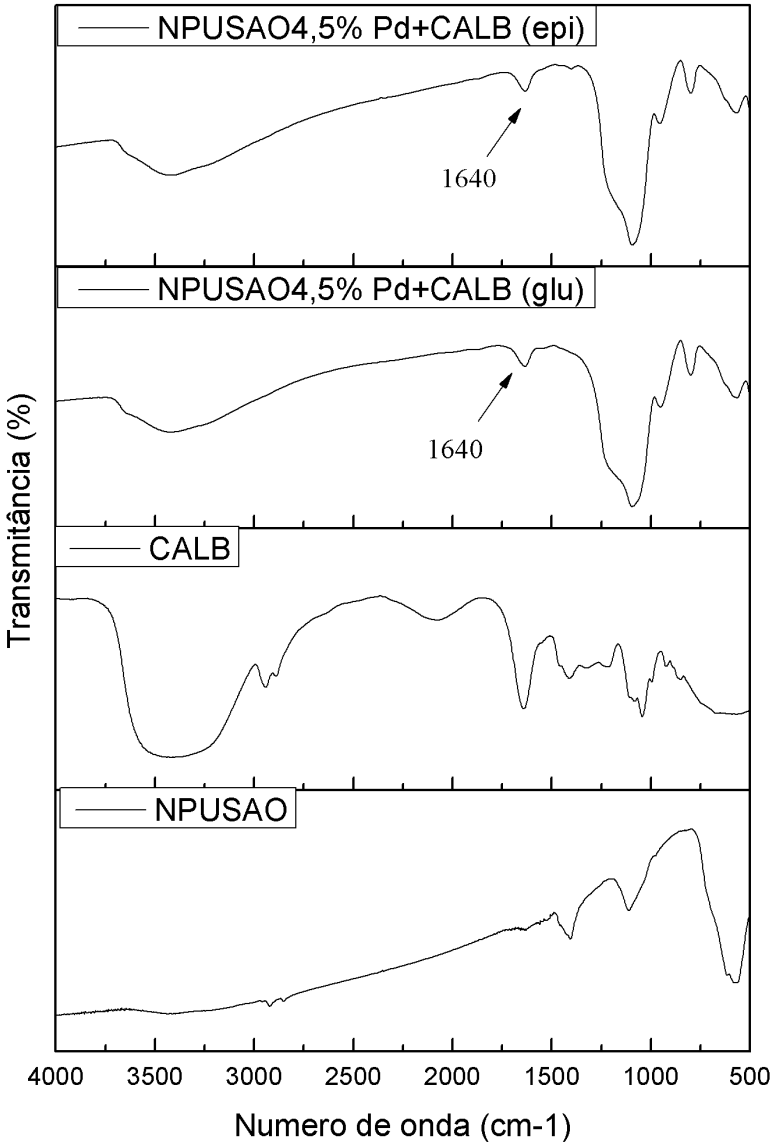


Figura 58: Espectro de infravermelho da NPUSAO, da CALB, e da CALB imobilizada com glutaraldeído e com epicloridrina

A tabela 10 reúne os resultados encontrados com os catalisadores imobilizados, a quantidade de enzima no suporte medida através do Bradford, a atividade hidrolítica e o potencial de conversão da esterificação do ácido palmítico após 1 hora, 3 horas e 6 horas de reação. Também foram feitas as mesmas análises para a N435 para comparação.

Tabela 10: Resultados imobilização com glutaraldeído e com epicloridrina

Suporte	Ativador	Quantidade de enzima (mg/g)	Atividade hidrolítica (U/g)	Conversão de Esterificação (%)		
				1 h	3 h	6 h
NPUSAO@4,5% Pd	GLU	2,96	5	63	86	84
NPUSAO@4,5% Pd	EPI	-	8	13	33	64
N435	-	30 *	80	80	80	79

* obtido por de Souza et al. (2016)

Pelos resultados obtidos, é possível ver que a atividade hidrolítica das enzimas imobilizadas foi muito baixa e muito similar para as duas imobilizações. Isso pode ser explicado pelo fato da CALB ser uma enzima que hidrolisa triglicerídeos de forma lenta (BORNSCHEUER; KAZLAUSKAS, 2006) e pelo fato da quantidade de enzima no suporte ter sido baixa, uma vez que a enzima imobilizada comercial, N435, apresentou atividade hidrolítica mais alta.

Comparando a conversão de esterificação após 1 h, 3 h e 6 h de reação, é possível ver que a imobilização com o glutaraldeído apresentou resultados muito melhores em comparação com a imobilização com epicloridrina. Essa imobilização inclusive apresentou uma conversão próxima à enzima comercial N435 após 1 h de reação e conversões superiores após 3 h e 6 h de reação.

Segundo Rodrigues e co-autores (2013), na maioria dos casos, a imobilização enzimática distorce levemente as estruturas das enzimas, o que altera suas propriedades finais, podendo tanto aumentar quanto diminuir a sua atividade e conversão em diversas reações. São poucos os trabalhos encontrados na literatura que comparam a eficiência de enzimas imobilizadas usando glutaraldeído e epicloridrina. Rodrigues et al. (2008) compararam a atividade hidrolítica de suportes de agarose e quitosana ativados com glutaraldeído e epicloridrina na imobilização da CALB. Foi verificado que as enzimas imobilizadas com glutaraldeído apresentaram uma atividade hidrolítica muito superior comparado com as enzimas imobilizadas com epicloridrina. No caso do suporte com quitosana, foi verificado modificações físicas que acarretaram em um aumento na hidrofobicidade após a ativação com a epicloridrina, o que acabou desfavorecendo a imobilização.

Já Santos e colaboradores (2008), ao compararem a atividade da lipase de *Pseudomonas fluorescence* imobilizada em suportes de polissiloxano e polivinil álcool usando glutaraldeído e epicloridrina, foi verificado que a atividade do biocatalisador ativado com epicloridrina foi o dobro da atividade do catalisador imobilizado com glutaraldeído. No entanto, esse resultado foi explicado ao fato de seu suporte não ter sido funcionalizado com grupamentos amino. Segundo eles, a baixa atividade da enzima ativada com glutaraldeído se deve então ao fato do glutaraldeído necessitar de duas hidroxilas do suporte para a ligação de um aldeído, enquanto que a epicloridrina forma grupamentos epóxi com apenas uma hidroxila do suporte.

Os dois catalisadores híbridos foram então usados na resolução cinética dinâmica da (*rac*)-1-feniletilamina usando formiato de amônio como doador de hidrogênio. Para a análise da reação, foi feita a injeção no CG-DIC da (*rac*)-2-metóxi-N-(1-feniletil)acetamida sintetizada por via química com o objetivo de identificar o pico do produto com o protocolo usado. A figura 59 corresponde ao cromatograma obtido.

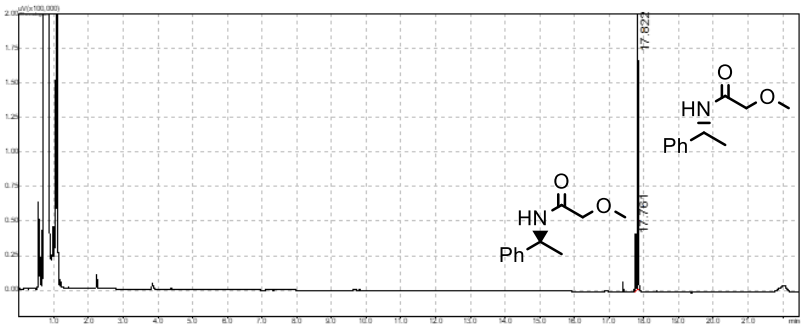


Figura 59: Cromatograma da (*rac*)-2-metóxi-N-(1-feniletil)acetamida (tempos de retenção 17,761 min e 17,822 min)

Os cromatogramas obtidos da resolução cinética dinâmica com os catalisadores híbridos encontram-se nas figuras 60 e 61.

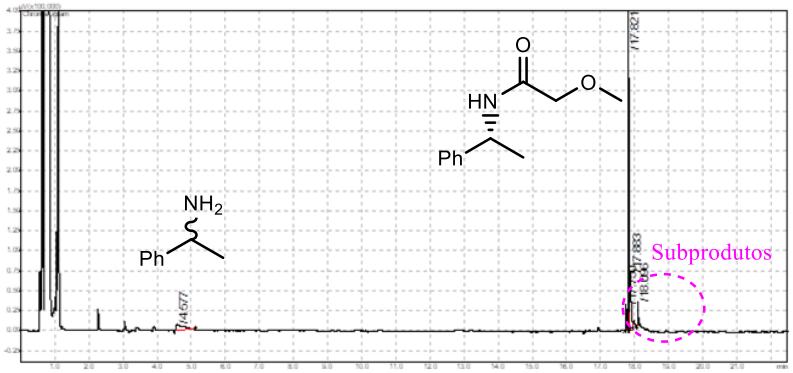


Figura 60: Cromatograma da resolução cinética dinâmica com a enzima imobilizada no suporte NPUSAO@4,5%Pd com glutaraldeído. Tempo de retenção do substrato: 4,577 min e da amida-R: 17,821 min).

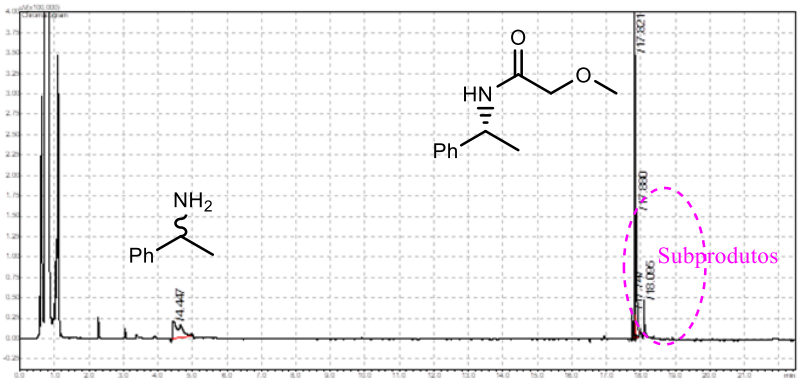
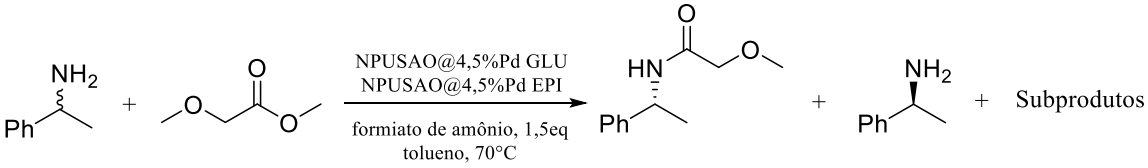


Figura 61: Cromatograma da resolução cinética dinâmica com a enzima imobilizada no suporte NPUSAO@4,5%Pd com epicloridrina. Tempo de retenção do substrato: 4,447 min e da amida-R: 17,821 min).

Os resultados de conversão, seletividade e excesso enantiomérico do produto após 12 horas de reação encontram-se na tabela 11.

Tabela 11: Resultados da resolução cinética dinâmica da (rac)-1-feniletilamina usando biocatalisadores híbridos imobilizados com glutaraldeído e epicloridrina



Suporte	Ativador	Conversão (%)	Seletividade (%)	ee_p (%)
NPUSAO@4,5% Pd	GLU	88	75	86
NPUSAO@4,5% Pd	EPI	78	66	86

Após 12 horas de reação, a conversão não foi completa e muitos subprodutos já haviam começado a se formar, tendo uma seletividade insatisfatória. Além disso, a resolução também apresentou uma baixa seletividade com o enantiômero (*R*). O biocatalisador ativado com glutaraldeído apresentou resultados melhores de conversão e seletividade. Em função desses resultados, foi decidido seguir adiante com a imobilização com glutaraldeído e otimizar a reação com esse biocatalisador

Diversos parâmetros podem alterar a atividade da enzima imobilizada além do ativador do suporte usado. O tempo de imobilização, por exemplo, influencia no número de ligações enzima-suporte que são feitas, promovendo uma mudança de conformação mais ou menos significativa, enrijecendo a estrutura da enzima e podendo favorecer ou desfavorecer a atividade catalítica (RODRIGUES, DASCIANA *et al.*, 2008).

A quantidade e a concentração da enzima no suporte também é um parâmetro de influência, uma vez que aumentar a carga enzimática no suporte pode oferecer mais sítios de catálise da reação. No entanto, uma grande quantidade de enzima no suporte pode formar uma barreira, diminuindo a difusão de produtos e substratos, além de aumentar o impedimento histérico do biocatalisador (RODRIGUES, DASCIANA *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2015). Com o intuito de aumentar a atividade enzimática, foi feita então a otimização da imobilização da CALB com o intuito de aumentar a carga enzimática no suporte.

5.3.2. OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE IMOBILIZAÇÃO COM GLUTARALDEÍDO

A otimização do protocolo de imobilização com glutaraldeído foi feita aumentando o volume ou a concentração enzimática da solução enzimática inicial (tampão + solução de enzima) usada na imobilização. As diferentes otimizações feitas estão na tabela 12, assim como os valores de concentração inicial da solução medidas por Bradford.

Tabela 12: Otimizações feitas na imobilização com glutaraldeído

Otimização	Quantidade de suporte (g)	Quantidade enzima (mL)	Volume de tampão (mL)	Concentração da solução inicial (mg_{CALB}/mL)
Inicial	1	1,0	5	0,648
1	1	2,0	10	0,648
2	1	4,0	20	0,648
3	1	1,5	5	0,689
4	1	2,0	5	0,871

Após 24 horas de imobilização, os seguintes resultados de eficiência de imobilização e concentração enzimática no suporte foram obtidos e encontram-se na tabela 13.

Tabela 13: Resultados das imobilizações otimizadas

Otimização	Eficiência de imobilização (%)	Quantidade de enzima no suporte (mg_{CALB}/g)	Atividade hidrolítica (U/g)
Inicial	76,0	2,96	5
1	50,0	3,89	10
2	35,4	5,51	63
3	53,9	2,41	0
4	45,7	2,79	17

A variação do volume da solução enzimática inicial (Otimizações 1 e 2) provocou um aumento considerável na quantidade de enzima no suporte final, aumentando também a atividade hidrolítica do biocatalisador. A otimização 2, por exemplo, alcançou um valor de atividade hidrolítica próxima da atividade calculada para a N435. É possível que o aumento da carga enzimática através do aumento do volume da solução tenha melhorado as chances de contato entre as enzimas e o suporte, permitindo assim um aumento no número de enzimas imobilizadas em conformações ideais. No entanto, é possível observar que a eficiência de imobilização diminui com o aumento sucessivo dos volumes, o que mostra que provavelmente o número de sítios disponíveis para a imobilização enzimática diminui, e que mesmo aumentando a carga enzimática, a partir de um momento não é mais possível aumentar o número de enzimas imobilizadas.

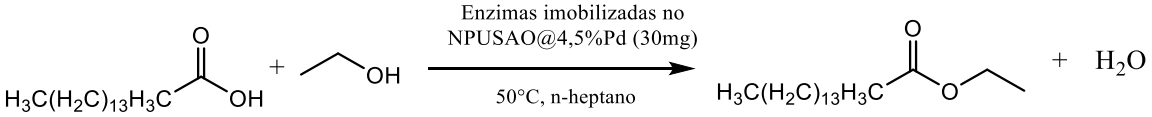
Por outro lado, o aumento da concentração da solução enzimática inicial (Otimizações 3 e 4), provavelmente não levou ao aumento da quantidade de enzima no suporte e da atividade de hidrólise. Além disso, essas imobilizações tiveram eficiências similares e baixas, portanto, nesse caso, o aumento da concentração de enzima na solução não é a melhor forma de aumentar a carga proteica no suporte.

Karimi (2016) e os grupos de Pashangeh (2017) e Zhang (2015) estudaram o efeito da concentração enzimática na eficiência de imobilizadação de lipases em nanopartículas magnéticas e suportes de poli(vinil acetato-acrilamida) usando glutaraldeído. A comparação desses resultados mostra que um aumento da concentração enzimática não necessariamente aumenta a eficiência de imobilização ou a atividade do catalisador. Isso

foi explicado pelo fato da sobrecarga de enzimas causar um aumento nas interações indesejáveis proteína-proteína, criando obstáculos estéricos intermoleculares e restringindo a difusão de substrato e produto no meio.

5.3.3. ESTUDO DO POTENCIAL DE ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO PALMÍTICO

As enzimas imobilizadas no suporte NPUSAO@4,5% Pd foram usadas no estudo do potencial de conversão de esterificação do ácido palmítico através da cinética de conversão da reação representada no esquema 14. O resultado encontra-se na figura 62.



Esquema 14: Reação de esterificação do ácido palmítico com etanol gerando palmitato de etila e água. Adaptado de de Souza (2018):

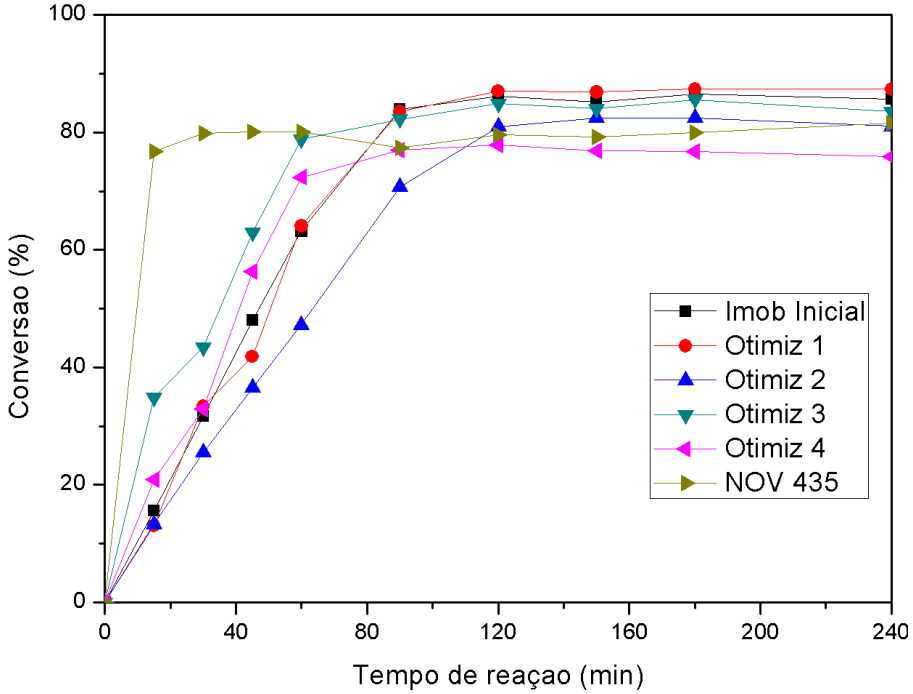


Figura 62: Cinética da reação de esterificação do ácido palmítico com etanol

É possível ver que a N435 tem uma conversão muito mais rápida do que as enzimas imobilizadas, alcançando quase 77 % de conversão nos primeiros 15 minutos de reação e a conversão máxima (aproximadamente 80 %) após 30 minutos de reação. As enzimas imobilizadas alcançam a conversão máxima mais lentamente, entre 90 e 120 minutos. Após

esse tempo, a maioria das enzimas mantém uma conversão mais alta que a N435, atingindo por volta de 85 % de conversão.

Com o objetivo de se obter a taxa inicial dos biocatalisadores, foi feito o gráfico de conversão da faixa linear e foram traçadas as linhas de tendência (figura 63) e a velocidade calculada (tabela 14).

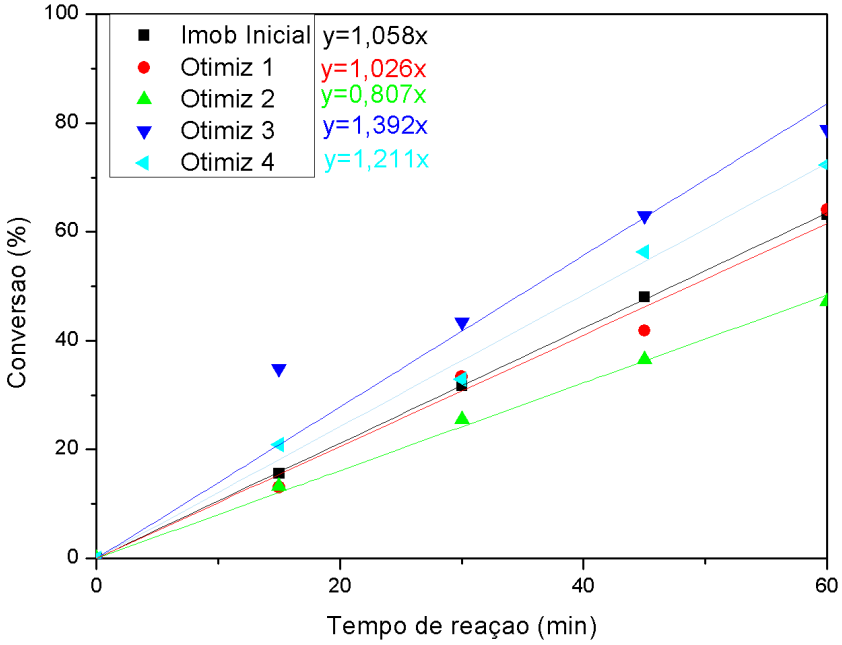


Figura 63: Conversão de esterificação com linhas de tendência.

Tabela 14: Velocidade inicial e conversão após 3 h.

Otimizações	Velocidade inicial (mmol/Lmin)	Conversão após 3 h (%)
Inicial	1,06	86,5
1	1,03	87,4
2	0,81	82,5
3	1,39	85,6
4	1,21	76,8
N435	-	80,0

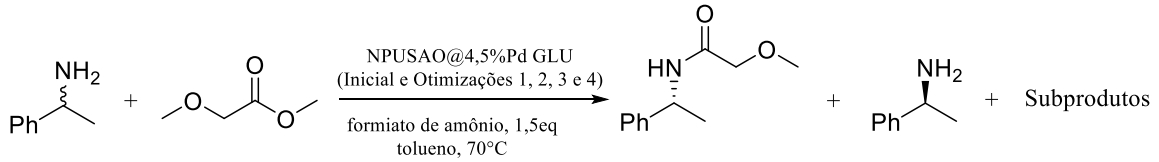
É possível ver que esses resultados não se correlacionaram com a atividade de hidrólise e com a quantidade de enzima imobilizada por suporte, uma vez que as Otimizações 1 e 2 têm carga enzimática e atividade de hidrólise superiores à imobilização inicial, e, no entanto, tiveram velocidade de esterificação menores. Já as enzimas que foram

imobilizadas em soluções mais concentradas (Imobilizações 3 e 4) tiveram velocidades iniciais melhores, apesar de terem baixa carga enzimática e baixa atividade de hidrólise. Pode-se supor que a imobilização com uma solução mais concentrada de enzima favoreça a imobilização da CALB em uma conformação que favoreça a reação de esterificação.

5.4. RESOLUÇÃO CINÉTICA DINÂMICA DA (*RAC*)-1-FENILETILAMINA

Após a imobilização das enzimas no suporte NPUSAO@4,5%Pd e a obtenção dos catalisadores híbridos com diferentes concentrações de enzima, foi feita a resolução cinética dinâmica da (*rac*)-1-feniletilamina. Primeiramente, foi feita a resolução cinética dinâmica a 70 °C e usando o formiato de amônio como doador de hidrogênio, seguindo o protocolo anterior. Os resultados obtidos após 12 horas de reação encontram-se na tabela 15.

Tabela 15: Resultados da resolução cinética dinâmica a 70 °C e com formiato de amônio como doador de hidrogênio após 12 h de reação.



Imobilização	Conversão (%)	Seletividade (%)	ee_p(%)
Inicial	88	75	86
1	89	55	87
2	94	63	86
3	>99	64	88
4	92	48	81

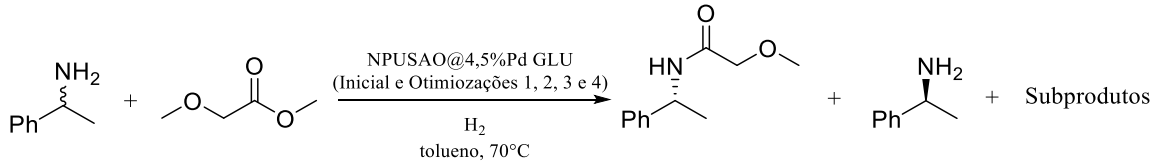
Apesar da conversão ter sido alta e satisfatória para a maioria das imobilizações, a seletividade foi mais baixa, o excesso enantiomérico do produto também não melhorou. A baixa seletividade da resolução cinética dinâmica também está ligada à fonte de hidrogênio utilizada, uma vez que, na maioria dos casos, a racemização é a etapa limitante da resolução (MIRANDA; SOUZA; MIRANDA, 2014).

No caso do catalisador híbrido utilizado, vimos que o catalisador da racemização, o paládio, tem uma alta atividade, então pode-se supor que a reação enzimática é a etapa

limitante da resolução. Conforme foi visto no estudo da racemização, uma vez obtida a amina racêmica, sua exposição ao catalisador gera subprodutos, diminuindo a seletividade. Como a enzima está presente no meio, é possível que ela reaja com esses subprodutos, gerando outros subprodutos. Com isso, foi considerado fazer alterações na etapa de racemização para melhorar a seletividade.

A primeira alteração feita foi o doador de hidrogênio, substituindo o formiato de amônio por hidrogênio gasoso. Os resultados encontram-se na tabela 16.

Tabela 16: Resultados da resolução cinética dinâmica a 70 °C e com H_2 como doador de hidrogênio após 12 h de reação

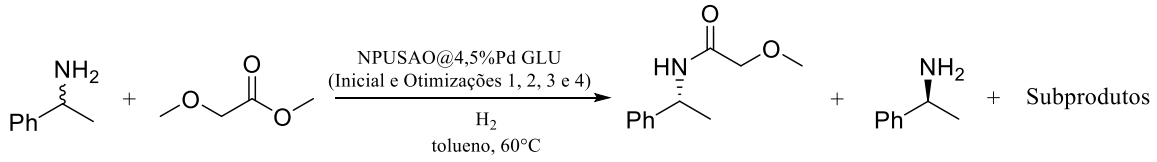


Imobilização	Conversão (%)	Seletividade (%)	ee_p(%)
Inicial	61	72	85
1	87	94	86
2	>99	94	91
3	67	77	90
4	43	98	87

A mudança da fonte de hidrogênio melhorou a seletividade, no entanto, alterou significativamente a conversão para a maioria das imobilizações. Comparando esses resultados com a carga enzimática em cada suporte, é possível ver que as melhores conversões ocorreram para aqueles catalisadores com mais enzima, o que está relacionado com a atividade hidrolítica obtida anteriormente.

A alta temperatura favorece a reação de racemização, porém pode comprometer a resolução enzimática, uma vez que a temperatura ideal para a CALB é de 45 °C (JONAS *et al.*, 1994; MIRANDA; SOUZA; MIRANDA, 2014). Foi então decidido diminuir a temperatura da reação, com o objetivo de melhorar a atividade enzimática e consequentemente a conversão. Os resultados da resolução nessas condições encontram-se na tabela 17.

Tabela 17: Resultados da resolução cinética dinâmica a 60 °C e com H_2 como doador de hidrogênio após 12 h de reação.



Imobilização	Conversão (%)	Seletividade (%)	ee_p(%)
Inicial	78	96	95
1	90	97	95
2	>99	95	92
3	89	94	94
4	88	100	96

Após 12 horas de reação, é possível ver que a diminuição da temperatura contribuiu para a melhora da conversão, seletividade e excesso enantiomérico corroborando a hipótese que a conversão enzimática era a etapa lenta da resolução cinética dinâmica. Com isso, é possível concluir que os catalisadores magnéticos híbridos de paládio e CALB tiveram sucesso na resolução cinética dinâmica da (*rac*)-1-feniletilamina.

Os resultados obtidos foram similares ou superiores aos encontrados na literatura usando catalisadores comerciais e/ou não-comerciais. Miranda *et al.* (2014), alcançou 94 % de conversão e 99 % de excesso enantiomérico na mesma reação usando catalisadores comerciais (30 mol % Pd\$BaSO_4$ e 30 mg Novozym 435) a 70 °C e usando formiato de amônio como doador de hidrogênio. Xu e colaboradores (2018) desenvolveram catalisadores de paládio em uma rede metalorgânica (MIL-101) para a aplicação na resolução cinética dinâmica da (*rac*)-1-feniletilamina usando a Novozym 435. Após 18 horas de reação, foi obtida a amida com 99 % de conversão, 93 % de seletividade e >99 % de excesso enantiomérico.

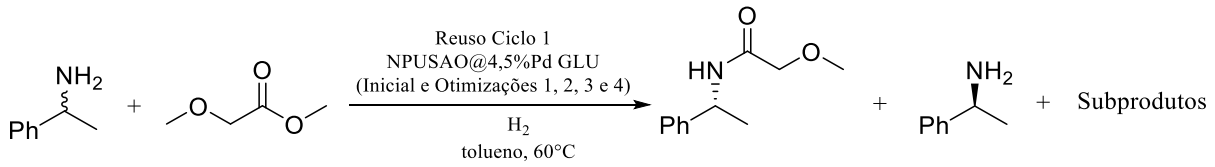
Em comparação com outros catalisadores híbridos encontrados na literatura que foram aplicados nessa reação, Souza e colaboradores (2017) obtiveram 84 % de conversão e >99 % de excesso enantiomérico após 17 horas de reação usando um catalisador híbrido contendo 1 % de paládio e 1,9 mg/g de CALB suportados em sílica. Engstrom *et al.* (2013) alcançaram 99 % de conversão da (*rac*)-1-feniletilamina com 99 % de excesso enantiomérico do produto após 16 horas usando um catalisador híbrido contendo 15,6 % de paládio e 4,8 % de CALB em sílica mesoporosa.

Os bons resultados obtidos por catalisadores híbridos podem ser explicados pelo fato da enzima e do paládio estarem muito próximos um do outro, trabalhando em colaboração. Uma vez que o substrato *R* é convertido pela enzima, o substrato *S* é rapidamente racemizado pelo paládio vizinho à enzima, fornecendo mais substrato para a enzima e assim sucessivamente (ENGSTRÖM *et al.*, 2013).

5.5. RECICLO DO CATALISADOR HÍBRIDO

Uma vez determinadas as melhores condições de reação, foi investigada a eficiência de reuso do catalisador na mesma reação. Após as lavagens com tolueno, os catalisadores foram aplicados na mesma reação e os resultados obtidos encontram-se na tabela 18.

Tabela 18: Reciclo dos catalisadores híbridos na resolução cinética dinâmica a 60 °C e com H_2 como doador de hidrogênio após 12 h de reação.



Imobilização	Conversão (%)	Seletividade (%)	ee_P(%)
Inicial	13	52	73
1	13	64	78
2	8	76	78
3	7	89	79
4	11	61	72

O reciclo usando o mesmo catalisador híbrido não teve sucesso e diversos fatores podem explicar esse resultado, como a perda de atividade da enzima ou a desativação ou lixiviação do paládio. No trabalho de Engström e colaboradores (2013), só foi possível reciclar o catalisador híbrido de paládio e CALB duas vezes, e mesmo assim aumentando o tempo de reação para se obter melhores rendimentos. Segundo eles, a desativação da enzima foi o principal motivo, uma vez que não foi constatado uma lixiviação significativa dos catalisadores e que o material de partida continuava racêmico, o que mostra que o paládio continuava ativo.

No caso da reação com o catalisador híbrido magnético, o material de partida também continuava racêmico, indicando que provavelmente o motivo da falha no reciclo se deve à perda de atividade da enzima. Mais estudos e caracterizações são necessários para confirmar essa hipótese.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos de síntese, caracterização, e aplicação dos catalisadores híbridos magnéticos contendo lipase e paládio tem-se que:

- Foi possível desenvolver um protocolo de síntese de partículas magnéticas de magnetita e maghemita com tamanho entre 10 e 20 nm, e magnetização de saturação de aproximadamente 60 emu/g.
- Foi possível fazer o seu revestimento com sílica, funcionalização com APTES e síntese de paládio, obtendo-se assim nanopartículas com 50 a 100 nm de diâmetro com nanopartículas de paládio acopladas em sua superfície e magnetização de saturação de 22 emu/g;
- Ao aplicar essas nanopartículas na reação de racemização da (*S*)-1-feniletilamina, foi possível ver que a etapa de ultrassom foi determinante para garantir a boa dispersão das nanopartículas, impactando nos resultados de racemização. Foi possível avaliar que a quantidade ideal de paládio no suporte para se obter os melhores resultados de racemização foi de 4,5 %, tendo-se assim 57 % de conversão com 96 % de seletividade e 4 % de excesso enantiomérico após apenas 1 hora de reação;
- Foi feita a imobilização da CALB na NPUSAO@4,5%Pd comparando o glutaraldeído e a epicloridrina como agentes de ativação e foi constatado que apesar de ambos terem a mesma atividade hidrolítica, o biocatalisador com glutaraldeído performou melhor na conversão de esterificação e na resolução cinética dinâmica;
- Foram feitas tentativas para aumentar a carga enzimática do catalisador híbrido com o objetivo de se obter melhores resultados na resolução cinética dinâmica. Não foi em todos os casos que os melhores resultados se correlacionaram com os suportes com as maiores cargas enzimáticas, explicado pelo fato de que a conformação na qual a lipase se adere ao suporte é mais importante do que a quantidade enzimática no suporte;
- Ao mudar o doador de hidrogênio da resolução do formiato para o hidrogênio gasoso, foi possível alcançar melhores valores de seletividade;
- A diminuição da temperatura da resolução também contribuiu para melhorar a seletividade da resolução, contribuindo para a hipótese de que o catalisador

metálico presente no suporte estava super ativado e que nesse caso, a etapa lenta da resolução dinâmica era a resolução enzimática e não a racemização;

- Foi possível alcançar aproximadamente 99 % de conversão, 95 % de seletividade e 93 % de excesso enantiomérico do produto com duas imobilizações após 12 horas de resolução. Esses valores foram superiores aos encontrados na literatura;
- O reciclo do catalisador híbrido não foi satisfatório, sendo a possivelmente devido à desativação da enzima no suporte.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliação do potencial do catalisador híbrido para outras aminas quirais;
- Novas caracterizações como microscopia e espectroscopia de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP) no catalisador híbrido após feito o reciclo para avaliar o motivo da sua desativação e encontrar soluções;
- Aplicação do catalisador na reação em fluxo contínuo, com o objetivo de reduzir o tempo de reação com uma melhor eficiência de reação;
- Estudo com o suporte de outros catalisadores metálicos e enzimáticos para a aplicação em outras reações.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, Marwa; KELLY, Tamsin; GHANEM, Ashraf. Applications of enzymatic and non-enzymatic methods to access enantiomerically pure compounds using kinetic resolution and racemisation. *Tetrahedron*, v. 68, n. 34, p. 6781–6802, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2012.05.049>.

AHN, Yangsoo *et al.* Racemization catalysts for the dynamic kinetic resolution of alcohols and amines. v. 252, p. 647–658, 2008.

ALIBEIGI, Samaneh; VAEZI, Mohammad Reza. Phase transformation of iron oxide nanoparticles by varying the molar ratio of Fe2+:Fe3+. *Chemical Engineering and Technology*, v. 31, n. 11, p. 1591–1596, 2008.

ANDERSCH, P. *et al.* Ester Synthesis via Acyl Transfer (Transesterification). *Methods in Enzymology*, v. 5, p. 406–443, 1997.

ANDERSON, Emily M.; LARSSON, Karin M.; KIRK, Ole. One biocatalyst - many applications: The use of Candida antarctica B-lipase in organic synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 16, n. 3, p. 181–204, 1998.

ANDRADE, A L *et al.* Synthesis and characterization of magnetic nanoparticles coated with silica through a sol-gel approach (Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas revestidas com sílica através de um processo sol-gel). *Nano*, v. 55, p. 420–424, 2009.

ANSARI, Shakeel A; HUSAIN, Qayyum. Potential applications of enzymes immobilized on / in nano materials : A review. *Biotechnology Advances*, v. 30, n. 3, p. 512–523, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.005>.

ANSORGE-SCHUMACHER, Marion B.; THUM, Oliver. Immobilised lipases in the cosmetics industry. *Chemical Society Reviews*, v. 42, n. 15, p. 6475, 2013. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3cs35484a>.

BANG, Jin Ho; SUSLICK, Kenneth S. Applications of ultrasound to the synthesis of nanostructured materials. *Advanced Materials*, v. 22, n. 10, p. 1039–1059, 2010.

BILAL, Muhammad *et al.* Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization : A review. v. 120, p. 2530–2544, 2018.

BLANCO, Antonio; BLANCO, Gustavo. 4 - Carbohydrates. *Medical Biochemistry*. [S.l.]: Academic Press, 2017. p. 73–97.

BORCHERT, Holger *et al.* Determination of Nanocrystal Sizes : A Comparison of TEM , SAXS , and XRD Studies of Highly Monodisperse CoPt 3 Particles. n. 8, p. 1931–1936,

2005.

BORNSCHEUER, Uwe T.; KAZLAUSKAS, Romas J. *Lipases and Esterases: Sections 5.1 - 5.2*. [S.l: s.n.], 2006. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/3527607544.ch5b>.

BRADFORD, Marion M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analythical Biochemistry*, v. 254, n. 72, p. 248–254, 1976. Disponível em: <http://www.rotoplast.com.co/sistema-septico-domiciliario/>.

BROCKMAN, H. L. Lipases. *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition*, v. 2, p. 729–732, 2013.

CAHN, R. S.; INGOLD, Christopher; PRELOG, V. Specification of Molecular Chirality. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 5, n. 4, p. 385–415, 1966.

CALCATERRA, Andrea; ACQUARICA, Ilaria D. The market of chiral drugs : Chiral switches versus de novo enantiomerically pure compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 147, p. 323–340, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.008>.

CARVALHO, Ana Caroline Lustosa De Melo *et al.* Recent advances in lipase-mediated preparation of pharmaceuticals and their intermediates. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, n. 12, p. 29682–29716, 2015.

CENI, Giovana *et al.* Optimization of 1-glyceryl benzoate production by enzymatic transesterification in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, n. 2, p. 107–112, 2010.

CHALLENER, Cynthia A. *Chiral Drugs*. 2018. ed. New York: Taylor & Francis, 2018.

CHATTERJEE, Jhunu; HAIK, Yousef; CHEN, Ching-jen. Size dependent magnetic properties of iron oxide nanoparticles. v. 257, p. 113–118, 2003.

CHEN, Ching-shih *et al.* Quantitative Analyses of Biochemical Kinetic Resolutions od Enantiomers. *Journal of the American Chemical Society*, n. 104, p. 7294–7299, 1982.

CHEN, Guan-jie *et al.* Effect of membranes with various hydrophobic / hydrophilic properties on lipase immobilized activity and stability. *JBIOSC*, v. 113, n. 2, p. 166–172, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.09.023>.

CHEN, Ming *et al.* How Do Enzymes ‘ Meet ’ Nanoparticles and Nanomaterials ? *Trends in Biochemical Sciences*, v. xx, p. 1–17, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2017.08.008>.

CHEN, Zhou *et al.* Synthesis, functionalization, and nanomedical applications of

functional magnetic nanoparticles. *Chinese Chemical Letters*, v. 29, n. 11, p. 1601–1608, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2018.08.007>.

CHIA, Sing Ling; LEONG, David Tai. Reducing ZnO nanoparticles toxicity through silica coating. *HLY*, n. July, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00177>.

CHNG, Leng Leng; ERATHODIYIL, Nandanan; YING, Jackie Y. Nanostructured Catalysts for Organic Transformations. v. XXX, n. Xx, 2012.

CIPOLATTI, Eliane P *et al.* Nanomaterials for biocatalyst immobilization – state of the art and future trends. *RSC Advances*, v. 6, p. 104675–104692, 2016.

CIPOLATTI, Eliane Pereira *et al.* Support engineering: relation between development of new supports for immobilization of lipases and their applications. *Biotechnology Research and Innovation*, v. 1, n. 1, p. 26–34, 2017. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452072117300059>.

CUBIDES-ROMAN, Diana C *et al.* Ethyl esters (biodiesel) production by Pseudomonas fluorescens lipase immobilized on chitosan with magnetic properties in a bioreactor assisted by electromagnetic field. *Fuel*, v. 196, p. 481–487, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2017.02.014>.

DASETTY, Siva; BLENNER, Mark A.; SARUPRIA, Sapna. Engineering Lipases: Walking the Fine Line Between Activity and Stability. *Advanced Powder Technology*, v. 28, n. 11, p. 2812–2819, 2017. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921883117303217>.

DE MENDONÇA, Estelle Silva Diorato Teixeira *et al. Effects of silica coating on the magnetic properties of magnetite nanoparticles*. [S.l: s.n.], 2018. Disponível em: <https://www-sciencedirect-com.dcu.idm.oclc.org/science/article/pii/S2468023018303407>.

DE MIRANDA, Amanda S.; MIRANDA, Leandro S.M.; DE SOUZA, Rodrigo O.M.A. Lipases: Valuable catalysts for dynamic kinetic resolutions. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 5, p. 372–393, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.015>.

DE SOUZA, Stefânia P. *et al.* Cellulose as an efficient matrix for lipase and transaminase immobilization. *RSC Advances*, v. 6, n. 10, p. 6665–6671, 2016.

DE SOUZA, Stefânia P. *et al.* Immobilization of lipase B from Candida antarctica on epoxy-functionalized silica: characterization and improving biocatalytic parameters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 93, n. 1, p. 105–111, 2018.

DING, Shaowei *et al.* Increasing the activity of immobilized enzymes with nanoparticle conjugation. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 34, p. 242–250, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2015.04.005>.

DOLORES, Reyman; RAQUEL, Serrano; ADIANEZ, Garcia-Leis. *Sonochemical synthesis of iron oxide nanoparticles loaded with folate and cisplatin: Effect of ultrasonic frequency*. *Ultrasonics Sonochemistry*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350417714002648>. , 2015

DUTTA, Aastha. *Chapter 4 - Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. [S.l.]: Elsevier Inc., 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-46140-5.00004-2>.

ENGSTRÖM, Karin *et al.* Co-immobilization of an enzyme and a metal into the compartments of mesoporous silica for cooperative tandem catalysis: An artificial metalloenzyme. *Angewandte Chemie - International Edition*, v. 52, n. 52, p. 14006–14010, 2013.

EOM, Gyeong Tae *et al.* High-level extracellular production and characterization of Candida antarctica lipase B in Pichia pastoris. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 116, n. 2, p. 165–170, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.02.016>.

EPP, J. *Chapter 4 - X-ray diffraction (XRD) techniques for materials characterization*. [S.l.]: Elsevier Ltd, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100040-3.00004-3>.

FABER, Kurt. *Biotransformations in Organic Chemistry*. 7th. ed. Graz: Springer, 2018.

FESKO, Kateryna *et al.* Investigation of one-enzyme systems in the ω-transaminase-catalyzed synthesis of chiral amines. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 96, p. 103–110, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.06.015>.

FILICE, Marco; PALOMO, Jose M. Cascade reactions catalyzed by bionanostructures. *ACS Catalysis*, v. 4, n. 5, p. 1588–1598, 2014.

FRAGA, Lucas; DIAMOND, Alex; VARGESSON, Neil. *Thalidomide and birth defects*. [S.l: s.n.], 2011. Disponível em: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&amp%5CnCSC=Y&amp%5CnNEWS=N&amp%5CnPAGE=fulltext&amp%5CnD=emed10&amp%5CnAN=70615971>.

FREIRE, Denise M. *et al.* Lipase production byPenicillium restrictum in a bench-scale fermenter. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 63–65, n. 1, p. 409–421, 1997. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF02920442>.

GANAI, Anal Kr. *et al.* Development of a multifunctional catalyst for a ‘“relay”’ reaction.

RSC Advances, v. 3, p. 2186–2191, 2013.

GANESAN, Mani; FREEMANTLE, Ruel G.; OBARE, Sherine O. Monodisperse Thioether-Stabilized Palladium Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Reactivity. *Chem. Mater.*, v. 19, p. 3464–3471, 2007.

GEDANKEN, Aharon. Using sonochemistry for the fabrication of nanomaterials. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 11, n. 2, p. 47–55, 2004.

GHANEM, Ashraf; ABOUL-ENEIN, Hassan Y. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. *Tetrahedron Asymmetry*, v. 15, n. 21, p. 3331–3351, 2004.

GHISLIERI, Diego; TURNER, Nicholas J. Biocatalytic Approaches to the Synthesis of Enantiomerically Pure Chiral Amines. p. 284–300, 2014.

GOMM, Andrew; O'REILLY, Elaine. Transaminases for chiral amine synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 43, n. Figure 1, p. 106–112, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.12.007>.

GROGAN, Gideon. Synthesis of chiral amines using redox biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 43, p. 15–22, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.09.008>.

GUPTA, Rani *et al.* Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. *Progress in Lipid Research*, v. 57, n. January, p. 40–54, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2014.12.001>.

GUTARRA, Melissa L E; MIRANDA, Leandro S M; SOUZA, Rodrigo O M A De. *Enzyme Immobilization for Organic Synthesis*. [S.l.]: Elsevier Inc., 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-411518-7/00004-4>.

HAMMICHE-BELLAL, Yasmina *et al.* Efficiency of magnetite as nanocrystalline bulk catalyst for the reduction of 4-nitrophenol. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 6, n. 2, p. 2355–2362, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.03.042>.

HARNCHANA, Viyada *et al.* Facile and economical synthesis of superparamagnetic magnetite nanoparticles coated with oleic acid using sonochemical route. *Materials Today: Proceedings*, v. 5, n. 6, p. 13995–14001, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214785318302360>.

HETTIARACHCHY, N S *et al. The use of immobilized enzymes to improve functionality*. Second Edi ed. [S.l.]: Elsevier Ltd., 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00022-X>.

HOU, C.T.; SHIMADA, Y. Lipases. *Encyclopedia of Microbiology*, p. 385–392, 2009.

JIN, Qianru *et al.* Modification of supported Pd catalysts by alkalic salts in the selective racemization and dynamic kinetic resolution of primary amines. *Catalysis Science and Technology*, v. 4, n. 2, p. 464–471, 2014.

JONAS, Uppenberg *et al.* The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from Candida antarctica. *Structure*, v. 2, n. 4, p. 293–308, 1994.

KARIMI, Mahmoud. Immobilization of lipase onto mesoporous magnetic nanoparticles for enzymatic synthesis of biodiesel. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 8, p. 182–188, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2016.09.009>.

KASSAEE, M Z; MASROURI, Hassan; MOVAHEDI, Farnaz. Applied Catalysis A : General Sulfamic acid-functionalized magnetic Fe 3 O 4 nanoparticles as an efficient and reusable catalyst for one-pot synthesis of ␣ -amino nitriles in water. *"Applied Catalysis A, General"*, v. 395, n. 1–2, p. 28–33, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apcata.2011.01.018>.

KAZLAUSKAS, Romas J *et al.* A Rule To Predict Which Enantiomer of a Secondary Alcohol Reacts Faster in Reactions Catalyzed by Cholesterol Esterase , Lipase from Pseudomonas. *Journal of Organic Chemistry*, v. 56, n. 11, p. 2656–2665, 1991.

KIM, Mahn-joo *et al.* Dynamic Kinetic Resolution of Primary Amines with a Recyclable Pd Nanocatalyst for Racemization. n. 4, p. 5307–5309, 2007.

KIM, Yunwoong; PARK, Jaiwook; KIM, Mahn-joo. Dynamic Kinetic Resolution of Amines and Amino Acids by Enzyme – Metal Cocatalysis. v. 784, p. 271–277, 2011.

KNAUS, Tanja; BÖHMER, Wesley; MUTTI, Francesco G. Amine dehydrogenases: Efficient biocatalysts for the reductive amination of carbonyl compounds. *Green Chemistry*, v. 19, n. 2, p. 453–463, 2017.

KOHLS, Hannes; STEFFEN-MUNSBERG, Fabian; HÖHNE, Matthias. Recent achievements in developing the biocatalytic toolbox for chiral amine synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 19, p. 180–192, 2014.

LAI, Oi-ming *et al. Lipase / Esterase : Properties and Industrial Applications*. *Encyclopedia of Food Chemistry*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21640-5>. , 2018

LÅNGVIK, Otto *et al.* Heterogeneous Chemoenzymatic Catalyst Combinations for One-Pot Dynamic Kinetic Resolution Applications. *ChemCatChem*, v. 7, n. 24, p. 4004–4015,

2015.

LEE, Jinwoo *et al.* Simple Synthesis of Functionalized Superparamagnetic Magnetite / Silica Core / Shell Nanoparticles and their Application as Magnetically Separable High-Performance Biocatalysts **. p. 143–152, 2008.

LIM, Choon Woo; LEE, In Su. Magnetically recyclable nanocatalyst systems for the organic reactions. *Nano Today*, v. 5, n. 5, p. 412–434, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nantod.2010.08.008>.

LIN, Guo-Qiang; YOU, Qi-Dong; CHENG, Jie-Fei. *Chiral Drugs: Chemistry and Biological Action*. 2011. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc, 2011.

LIU, Dong-mei; CHEN, Juan; SHI, Yan-ping. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 102, p. 332–342, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.03.011>.

LIU, Xianqiao *et al.* Preparation and characterization of amino-silane modified superparamagnetic silica nanospheres. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 270, n. 1–2, p. 1–6, 2004.

MA, Zhi Ya *et al.* Synthesis of magnetic silica nanospheres with metal ligands and application in affinity separation of proteins. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 275, n. 1–3, p. 87–91, 2006.

MAHDAVI, Mahnaz *et al.* Synthesis, surface modification and characterisation of biocompatible magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Molecules*, v. 18, n. 7, p. 7533–7548, 2013.

MAITY, D.; AGRAWAL, D. C. Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 308, n. 1, p. 46–55, 2007.

MARTIN, Lucas S. *et al.* Different organic components on silica hybrid matrices modulate the lipase inhibition by the glycerol formed in continuous transesterification reactions. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 62, p. 462–470, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.01.029>.

MENDES, Adriano A.; OLIVEIRA, Pedro C.; DE CASTRO, Heizir F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 78, p. 119–134, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.03.004>.

MERYAM SARDAR, Razi Ahmad. Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, v. 04,

n. 02, 2015. Disponível em: <https://www.omicsonline.org/open-access/enzyme-immobilization-an-overview-on-nanoparticles-as-immobilizationmatrix-2161-1009-1000178.php?aid=54441>.

MIRANDA, Amanda S De; SOUZA, Rodrigo O M A De; MIRANDA, Leandro S M. Ammonium formate as a green hydrogen source for clean semi-continuous enzymatic dynamic kinetic resolution of (+/-)-a-methylbenzylamine. *RSC Advances*, v. 4, p. 13620–13625, 2014.

MITSUKURA, Koichi; YOSHIDA, Toyokazu. *Imine Reductases for Chiral Amine Synthesis*. [S.l.]: Elsevier B.V., 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444637437000056>.

MITTELBACH, Martin. Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 67, n. 3, p. 168–170, 1990.

MOHAMAD, Nur Royhaila *et al.* An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, v. 29, n. 2, p. 205–220, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>.

MUÑOZ SOLANO, D. *et al.* Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. *Bioresource Technology*, v. 115, p. 196–207, 2012.

MURAHASHI, Shun-Ichi *et al.* Catalytic Alkyl Group Exchange Reaction. *Journal of the American Chemical Society*, v. 105, n. 15, p. 5002–5011, 1983.

NAVVABI, Azita *et al.* Novel lipases discovery specifically from marine organisms for industrial production and practical applications. *Process Biochemistry*, n. March, p. 0–1, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.04.018>.

NETO, Weslany Silvério *et al.* Superparamagnetic nanoparticles stabilized with free-radical polymerizable oleic acid-based coating. *Journal of Alloys and Compounds*, v. 739, p. 1025–1036, 2018.

NGUYEN, Lien Ai; HE, Hua; PHAM-HUY, Chuong. Chiral Drugs: An Overview. *International Journal of Biomedial Science*, p. 85–100, 2006.

NUGENT, Thomas C.; EL-SHAZLY, Mohamed. Chiral amine synthesis - Recent developments and trends for enamide reduction, reductive amination, and imine reduction. *Advanced Synthesis and Catalysis*, v. 352, n. 5, p. 753–819, 2010.

OKORO, Oseweuba Valentine; SUN, Zhifa; BIRCH, John. *Lipases for Biofuel Production*. *Reference Module in Food Science*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081005965216508>. , 2018

PAETZOLD, Jens; BACKVALL, Jan E. Chemoenzymatic Dynamic Kinetic Resolution of Primary Amines. *Journal of the American Chemical Society*, v. 127, n. 50, p. 17620–17621, 2005.

PÀMIES, Oscar *et al.* An efficient and mild ruthenium-catalyzed racemization of amines: Application to the synthesis of enantiomerically pure amines. *Tetrahedron Letters*, v. 43, n. 26, p. 4699–4702, 2002.

PARVULESCU, Andrei N.; JACOBS, Pierre A.; DE VOS, Dirk E. Palladium catalysts on alkaline-earth supports for racemization and dynamic kinetic resolution of benzylic amines. *Chemistry - A European Journal*, v. 13, n. 7, p. 2034–2043, 2007.

PARVULESCU, Andrei N; JACOBS, Pierre A; VOS, Dirk E De. Support influences in the Pd-catalyzed racemization and dynamic kinetic resolution of chiral benzylic amines. *Applied Catalysis A: General*, v. 368, p. 9–16, 2009.

PASHANGEH, Kh *et al.* Biochemical characterization and stability assessment of Rhizopus oryzae lipase covalently immobilized on amino-functionalized magnetic nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 105, p. 300–307, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.035>.

PATTERSON, A. L. The scherrer formula for X-ray particle size determination. *Physical Review*, v. 56, n. 10, p. 978–982, 1939.

PELLIS, Alessandro *et al.* Evolving biocatalysis to meet bioeconomy challenges and opportunities. *New Biotechnology*, v. 40, n. 16, p. 154–169, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2017.07.005>.

PIAZZOLLA, Francesca; TEMPERINI, Andrea. Recent advances in chemoselective acylation of amines. *Tetrahedron Letters*, v. 59, n. 27, p. 2615–2621, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.05.065>.

PINTO, Martina C C; FREIRE, Denise M G; PINTO, José Carlos. Influence of the morphology of core-shell supports on the immobilization of lipase B from Candida antarctica. *Molecules*, v. 19, n. 8, p. 12509–12530, 2014.

RAY, Abhijit. Application of Lipase in Industry. *Asian Journal of Pharmaceutical Technology*, v. 2, n. 2, p. 33–37, 2012.

REETZ, Manfred T; SCHIMOSSEK, Klaus. Lipase-Catalyzed Dynamic Kinetic Resolution of Chiral Amines: Use of Palladium as the Racemization Catalyst. v. 50, n. 12, p. 668–669, 1996.

ROBINSON, P. J.; DUNNILL, P.; LILLY, M. D. The Properties of Magnetic Supports in Relation to Immobilized Enzyme Reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, v. XV, p.

603–606, 1973.

RODRIGUES, Dasciana *et al.* Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. v. 51, p. 100–109, 2008.

RODRIGUES, Rafael C *et al.* Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews*, v. 42, p. 6290–6307, 2013.

ROSSI, Daniela *et al.* Approaches for multi-gram scale isolation of enantiomers for drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 12, n. 12, p. 1253–1269, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1383981>.

ROSSI, Liane; GARCIA, Marco; VONO, Lucas. Recent Advances in the Development of Magnetically Recoverable Metal Nanoparticle Catalysts. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 23, n. November, p. 1959–1971, 2012.

ROUF, Abdul; TANEJA, S. C. Synthesis of Single-enantiomer Bioactive Molecules: A Brief Overview. *Chirality*, v. 26, p. 63–78, 2014.

SANDOVAL, Georgina. *Lipases and Phospolipases: Methods and Protocols*. [S.l: s.n.], 2012. v. 531. Disponível em: <http://books.google.com/books?id=Ku2wPAAACAAJ>.

SANTOS, J C *et al.* Pseudomonas fluorescens lipase immobilization on polysiloxane – polyvinyl alcohol composite chemically modified with epichlorohydrin. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 53, p. 49–57, 2008.

SANTOS, Kádima C. *et al.* Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. *Industrial Crops and Products*, v. 49, p. 462–470, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.05.035>.

SANTRA, Swadeshmukul *et al.* Synthesis and characterization of silica-coated iron oxide nanoparticles in microemulsion: The effect of nonionic surfactants. *Langmuir*, v. 17, n. 10, p. 2900–2906, 2001.

SARMAH, Nipon *et al.* Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnology Progress*, v. 34, n. 1, p. 5–28, 2018.

SCHMID, A *et al.* Industrial Biocatalysis and Tomorrow. *Nature*, v. 409, n. January, p. 258–268, 2001.

SCHÖN, S.J. Magnetic Properties. v. 65, p. 373–391, 2011. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567803211080104>.

SEDDIGI, Zaki S. *et al.* Lipases in asymmetric transformations: Recent advances in classical kinetic resolution and lipase–metal combinations for dynamic processes. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 348, p. 54–70, 2017. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2017.08.008>.

SETH, Sonali *et al.* An insight into plant lipase research - Challenges encountered. *Protein Expression and Purification*, v. 95, p. 13–21, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2013.11.006>.

SHAKERI, Mozaffar *et al.* Small Pd Nanoparticles Supported in Large Pores of Mesocellular Foam : An Excellent Catalyst for Racemization of Amines. p. 13269–13273, 2011.

SHELDON, Roger A. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Advanced Synthesis and Catalysis*, v. 349, n. 8–9, p. 1289–1307, 2007.

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

SHOKROLLAHI, H. A review of the magnetic properties, synthesis methods and applications of maghemite. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 426, n. July 2016, p. 74–81, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2016.11.033>.

SILVA, Marceli Fernandes *et al.* Production of multifunctional lipases by Penicillium verrucosum and Penicillium brevicompactum under solid state fermentation of babassu cake and castor meal. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 34, n. 2, p. 145–152, 2011.

SINGH, Abhishek Kumar; MUKHOPADHYAY, Mausumi. Overview of Fungal Lipase : A Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 166, n. October 2011, p. 486–520, 2012.

SIRISHA, V L; JAIN, Ankita; JAIN, Amita. *Enzyme Immobilization : An Overview on Methods , Support Material , and Applications of Immobilized Enzymes*. 1. ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.07.004>.

SOARES, Paula P. *et al.* Iron oxide nanoparticles modified with oleic acid: Vibrational and phase determination. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, v. 99, p. 111–118, 2016.

SOUZA, Stefânia P De *et al.* New Biosilified Pd-lipase hybrid biocatalysts for dynamic resolution of amines. v. 58, p. 4849–4854, 2017.

STAUCH, Benjamin; FISHER, Stuart J.; CIANCI, Michele. Open and closed states of Candida antarctica Lipase B: protonation and the mechanism of interfacial activation. *Journal of Lipid Research*, p. 1–34, 2015.

TALEKAR, Sachin *et al.* Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs). *RSC Advances*, v. 3, n. 31, p. 12485–12511, 2013.

TANG, C Y; YANG, Z. *Transmission Electron Microscopy (TEM)*. [S.l.]: Elsevier B.V.,

2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63776-5.00008-5>.

TANGWATANAKUL, Witoon *et al.* Synchrotron X-ray absorption of iron oxide (Fe2O3) nanoparticles: Effects of reagent concentration and sonication in co-precipitation synthesis. *Chinese Journal of Physics*, v. 55, n. 3, p. 845–852, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cjph.2017.02.012>.

TEJA, Amyn S.; KOH, Pei Yoong. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, v. 55, n. 1–2, p. 22–45, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pcrysgrow.2008.08.003>.

THANGARAJ, Baskar *et al.* Effect of silica coating on Fe 3 O 4 magnetic nanoparticles for lipase immobilization and their application for biodiesel production. *Arabian Journal of Chemistry*, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.09.004>.

TUVIGNON, N *et al.* Development of an indirect method for measuring porcine pancreatic lipase in human duodenal fluid. *Analytical Biochemistry*, v. 383, n. 2, p. 289–295, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2008.08.036>.

VAKHLU, Jyoti; KOUR, Avneet. Yeast lipases: Enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 9, n. 1, p. 69–85, 2006.

VERHO, Oscar; BÄCKVALL, Jan E. Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution: A powerful tool for the preparation of enantiomerically pure alcohols and amines. *Journal of the American Chemical Society*, v. 137, n. 12, p. 3996–4009, 2015.

WERMUTH, Camille G. *Optical Isomerism in Drugs*. [S.l.]: Elsevier Ltd, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-417205-0.00018-3>.

XU, Sen *et al.* Dynamic kinetic resolution of amines by using palladium nanoparticles confined inside the cages of amine-modified MIL-101 and lipase. *Journal of Catalysis*, v. 363, p. 9–17, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcat.2018.04.006>.

XU, Yuanfeng *et al.* Dynamic kinetic resolution of aromatic: Sec -alcohols by using a heterogeneous palladium racemization catalyst and lipase. *Catalysis Science and Technology*, v. 7, n. 24, p. 5838–5842, 2017.

YI, Dong Kee; LEE, Su Seong; YING, Jackie Y. Synthesis and Applications of Magnetic Nanocomposite Catalysts. v. 18, n. 10, p. 2004–2006, 2006.

ZHANG, Dong-hao *et al.* Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Lipase immobilization on epoxy-activated poly (vinyl acetate-acrylamide) microspheres. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 129, p. 206–210, 2015. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.03.056>.

ZHANG, Dong-hao; YUWEN, Li-xia; PENG, Li-juan. Parameters Affecting the Performance of Immobilized Enzyme. v. 2013, 2013.

ZISIS, Themistoklis *et al.* Interfacial activation of Candida antarctica lipase B : combined evidence from experiment and simulation. *Biochemistry*, 2015.

APÊNDICE I

Primeira versão de artigo a ser submetido.

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF A MAGNETIC HYBRID CATALYST CONTAINING LIPASE AND PALLADIUM AND ITS APPLICATION ON THE DYNAMIC KINETIC RESOLUTION OF AMINES

Clara A. Ferraz[a], Gabriella Sergio[a], Gisele Dalmônico[b], Richard Caraballo[b], Priscilla Finotelli[c], Rodrigo O. M. A. Souza[d], Robert Wojcieszak[e], Ivaldo Iatabaiana Jr.[a]

[a] School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Av. Athos da Silveira Ramos, 149, bloco E, sala E203, Rio de Janeiro, RJ, 21941-909, Brazil

[b] CBPF, Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, Rua Dr. Xavier Sigaud, 150, Botafogo, Rio de Janeiro, RJ, 22290-180, Brazil

[c] Pharmacy Faculty, Federal University of Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas Filho, 373, Rio de Janeiro, RJ, 21941-170, Brazil

[d] Biocatalysis and Organic Synthesis Group, Chemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Av. Athos da Silveira Ramos, 149, Rio de Janeiro, RJ, 21941-909, Brazil

[e] CNRS – Centre National de la Recherche Scientifique, Ecole Centrale de Lille, France

ABSTRACT

Recent studies estimate that about 40 % of drugs have a chiral amine in their structure and their synthesis in a sustainable and cost-competitive way is still a challenge for the industry. Kinetic resolution is still the most used path to produce these compounds, and the use of lipase as a catalyst is a good alternative. This work aimed to synthesize and characterize a hybrid magnetic catalyst composed by lipase B of *Candida antarctica* (CALB) and Pd immobilized on the same nanometric magnetic support, in order to selectively separate the enzyme and metal from the reaction medium. The produced biocatalysts were then applied in the dynamic kinetic resolution using (*rac*)-1-phenylethylamine as a standard molecule. It was possible to achieve 99 % of conversion, with 95 % of selectivity and 93 % of enantiomeric excess after 12 h. The hybrid catalyst had around 50-100 nm with nanoparticulated Pd (5-10 nm) on its surface, presented a superparamagnetic behavior without remaining magnetization and 22 emu/g of saturation magnetization.

INTRODUCTION

Enantiomerically pure amines have been used as chiral auxiliaries, resolving agents and building blocks for the pharmaceutical and agrochemical industries, being an important segment of the chiral molecule market (GHISLIERI; TURNER, 2014). Among the different production routes for these molecules, the kinetic resolution is still the most widely used method to obtain optically pure amines industrially (XU, SEN *et al.*, 2018).

In the context of green chemistry and new environmental restrictions being applied in several countries (SCHMID *et al.*, 2001), the use of enzyme catalysts has many advantages, like the mild reaction conditions, and their good chemo, regio and stereoselectivity (MUÑOZ SOLANO *et al.*, 2012). Among the enzymes used in organic

synthesis, lipase (triacylglycerol acylhydrolases, (E.C. 3.1.1.3)) has gained great importance in the last years, since it does not require the use of cofactors, it has high specificity to substrates, good stability in organic media and it is able to catalyze a number of reactions with great selectivity (DE MIRANDA; MIRANDA; DE SOUZA, 2015).

In an enzymatic kinetic resolution, lipase reacts with one of the enantiomers of a racemic substrate through an esterification or transesterification reaction with an acyl donor, having a maximum theoretical yield of 50 % (SEDDIGI *et al.*, 2017). In order increase this yield and convert the non-reactive enantiomer, a racemization is performed, usually through a metal catalyst, generating a dynamic kinetic resolution (DKR). The combination of enzymatic resolution and metal racemization in a one-pot reaction increases the efficiency of the process, reduces costs, time and labor effort (LÅNGVIK *et al.*, 2015).

Even though some lipase-catalyzed DKR may be considered well stablished, the development of catalytic systems for the DKR of amines continues to attract great attention, and several papers were published recently on this topic (SEDDIGI *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2017; XU, SEN *et al.*, 2018).

A new catalytic approach developed by our group (SOUZA *et al.*, 2017) and by a few others (ENGSTRÖM *et al.*, 2013; GANAI *et al.*, 2013) involves the co-immobilization of a metal and an enzyme in one single support. These hybrid catalysts allow cascade reactions to occur with an increased efficiency, since enzyme and metal are able to work in cooperation.

Once the catalytic reaction is conduced, the possibility to recycle biocatalysts is also determinant for the success of enzyme applications in industry (PELLIS *et al.*, 2018). Furthermore, in the pharmaceutical industry for example, it is essential to remove any traces of catalyst which may interfere in subsequent reactions and contaminate the final product (LIM; LEE, 2010). The application of a magnetic field is an efficient way to

separate and recover a catalyst and it has several advantages compared to other traditional techniques, since it is highly selective, it reduces the use of consumables and solvents, and it minimizes mass loss, since the separation can be done without removing the material from the reaction medium (MA *et al.*, 2006; ROSSI, LIANE; GARCIA; VONO, 2012). Several magnetic supports have already been developed for the immobilization of enzymes (ANSARI; HUSAIN, 2012; BILAL *et al.*, 2018), however, to the best of our knowledge, this is the first time a magnetic nanoparticle is used as support for a hybrid catalyst.

In the present work, we synthesized and characterized a hybrid magnetic catalyst containing lipase and palladium and we demonstrate its application in the DKR of (*rac*)-1-phenylethylamine.

RESULTS AND DISCUSSION

- Synthesis and characterization of the magnetic support with palladium

The magnetic nanoparticles (MN) were synthetized using the co-precipitation method, which involves the precipitation of Fe^{2+} and Fe^{3+} ions in an aqueous solution under basic conditions. In order to obtain small and well dispersed nanoparticles, sonication steps and surface coating with oleic acid were also added to the methodology. Once the magnetic nanoparticles were obtained, they were covered with tetraethyl orthosilicate (TEOS) for the introduction of silanol groups and functionalized with (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES). After these steps, palladium was supported on the surface of the nanoparticles at different concentrations, 3 %, 4.5 % and 6 % (w/w) (MN@3%Pd, MN@4.5%Pd and MN@6%Pd, respectively). The ideal concentration was evaluated with the racemization reaction with (*S*)-phenylethylamine, performed at 70 °C and using toluene as solvent. After

only 3 hours, we already had an enantiomeric excess of less than 1 % for all nanoparticles and we had more than 50 % of byproducts for the three MN.

In order to determine the best reaction time, we did a kinetic evaluation of the racemization reaction, taking samples every 30 minutes until 3 hours and evaluating the conversion, enantiomeric excess and selectivity. The results are shown in figure 1.

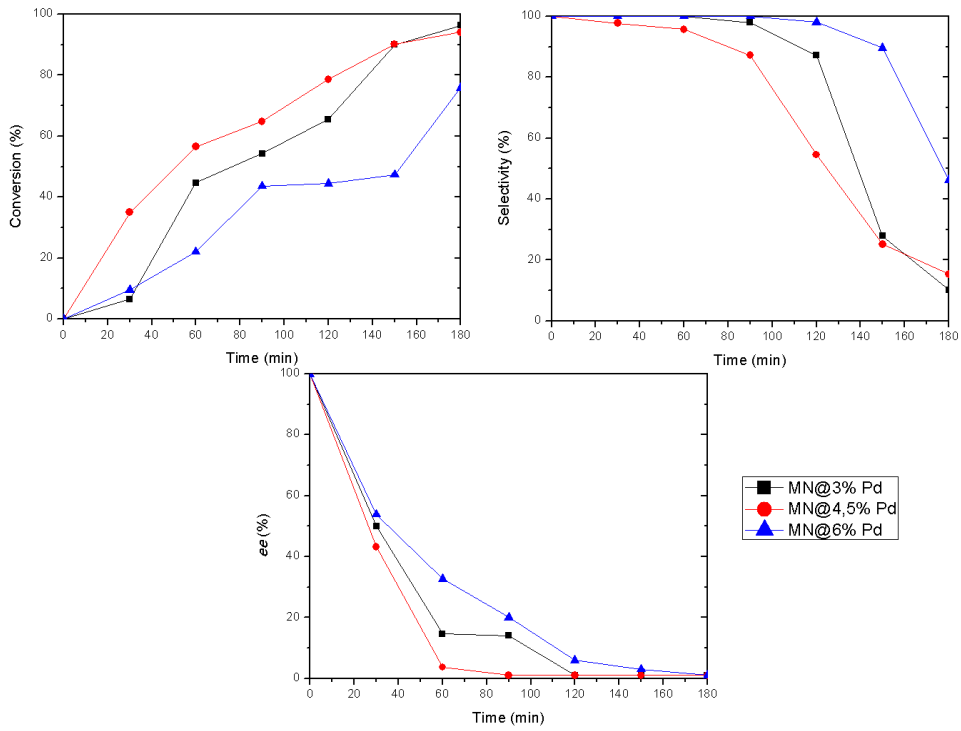


Figure 1: Conversion, Selectivity and ee of MN with palladium in the racemization reaction.

It is important to note that the ideal catalyst is the one that converts 50 % of the starting enantiomer with 100 % of selectivity with the lowest enantiomeric excess value possible. The palladium supported in the MN were able to racemize the (*S*)-phenylethylamine very satisfactorily. More specifically, MN@4.5%Pd showed the fastest conversion over time, even in comparison with the MN with more palladium. The selectivity of the MN@6%Pd was higher compared to MN@4.5%Pd and MN@3%Pd, and this is due to the fact that their conversion was faster, making their selectivity to decrease

more. Regarding the enantiomeric excess, MN@4.5%Pd achieved good result (4 %) after only 60 minutes of reaction. Based on these results, we concluded that the concentration of 4.5 % of palladium in the MN was ideal, allowing 56 % of conversion of (*S*)-phenylethylamine with 96 % of selectivity and 4 % of enantiomeric excess after only 60 minutes of reaction. The catalytic activity of palladium is directly related to its uniformity and dispersion in the supports, so its concentration at 4.5 % is probably the one that contributes to the better dispersion of the metal.

(XU, SEN *et al.*, 2018) synthesized palladium nanoparticles inside cages of MIL-101 and found that increasing the concentration of palladium from 1,5 % to 3 % in the support did not improve the catalytic efficiency in the racemization of 1-phenylethylamine neither. In this work, the best racemization results (46 % conversion, 76 % selectivity and 15 % enantiomeric excess) where achieved after 18 hours. According to (SHAKERI *et al.*, 2011), the change in the catalytic activity due to size and quantity of nanometric palladium is controversial and the best results are obtained case by case. This group carried out the racemization reaction using 3 % palladium supported on a mesocellular foam and after 4 hours, total racemization was achieved with 96 % of selectivity. Our group also tested different commercial palladium catalysts and obtained the best results after 2,5 hours with commercially available palladium supported on barium sulphate (96% selectivity and 3 % enantiomeric excess) (MIRANDA; SOUZA; MIRANDA, 2014). In the quest for a hybrid catalyst, the Bäckvall group achieved 1 % of enantiomeric excess after 4 hours of reaction with palladium supported on mesoporous silica (ENGSTRÖM *et al.*, 2013). Based on these results, it is possible to conclude that the racemization times and parameters obtained with the palladium supported on the magnetic nanoparticle were superior than those found in literature.

Before the use of MN@4.5%Pd as support for enzyme immobilization, we were interested in the evaluation of its structure, morphology and magnetic properties. Through transmission electron microscopy (figure 2), we saw that the MN synthesized through the co-precipitation method had around 10 to 20 nm and non-uniform rounded shape (figure 2a). After coating with TEOS (figure 2b), we were able to see a silica mass around small magnetic nuclei. At this point, the particles had more than 50 nm of diameter and were evenly rounded. Once palladium was supported in the nanoparticles, we were able to see nanoparticles of approximately 5 to 10 nm of this metal adhered in the surface of the silica, as shown in figure 2c. Similar images of microscopy are found in the literature on palladium catalysts supported on silica (CHNG; ERATHODIYIL; YING, 2012; XU, SEN *et al.*, 2018; YI; LEE; YING, 2006).

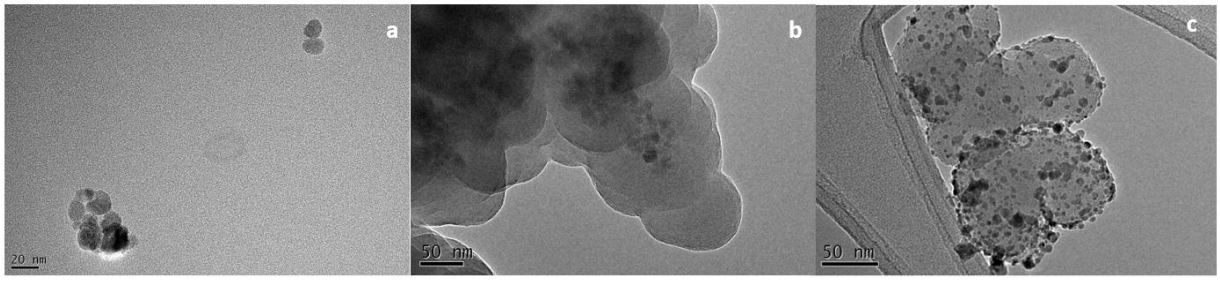


Figure 2: Transmission electron microscopy of the MN@4.5%Pd.

It was possible to confirm that these nanoparticles on the surface of silica were palladium by performing energy-dispersive X-ray spectroscopy to identify the elements, as shown in figure 3. Iron and silicon (red and blue, respectively) are evenly distributed in the nanoparticle, and palladium (green) is present only at some spots.

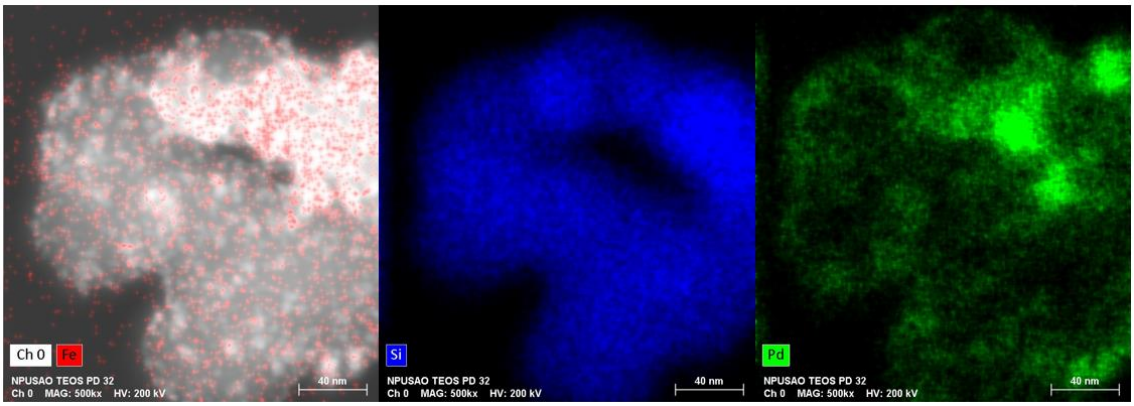


Figure 3: Energy-dispersive X-ray spectroscopy of the MN@4.5%Pd.

We also performed X-ray diffraction to evaluate the iron oxide crystal's phase, the crystallinity and to measure the nanoparticles sizes using Scherrer's equation (figure 4).

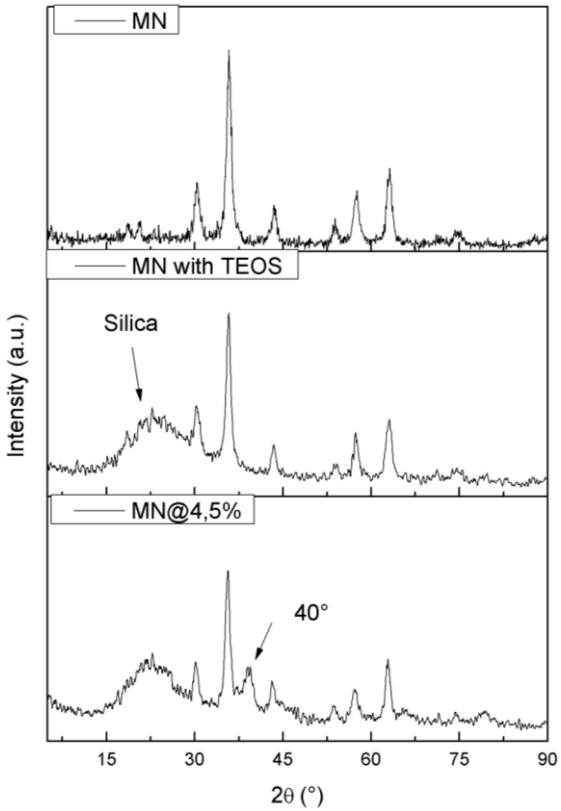


Figure 4: XRD of MN, MN coated with TEOS and MN@4.5%Pd

The peaks obtained in the MN diffractogram are characteristic with the ones obtained for iron oxide crystals and are detailed in table 1, together with the corresponding peaks for magnetite and maghemite crystals (KASSAEE; MASROURI; MOVAHEDI, 2011; MAITY; AGRAWAL, 2007).

Table 1: Magnetite, Maghemite and MN XRD peaks.

Magnetite	Maghemite	MN
2Θ (°)	2Θ (°)	2Θ (°)
30.10	30.28	30.35
35.43	35.69	35.80
43.06	43.35	43.50
53.41	53.87	53.90
56.96	57.42	57.35
62.53	63.03	63.10
73.97	74.56	74.25

Since characteristic peaks of magnetite and maghemite are very close, it is very difficult to characterize the crystal correctly. It is possible that the synthesized nanoparticles are composed by a mixture of both crystals, being a transitory phase between magnetite and maghemite. Other groups performed magnetite synthesis through co-precipitation method and obtained similar transitory phases (DE MENDONÇA *et al.*, 2018; HAMMICHE-BELLAL *et al.*, 2018). An amorphous phase appears in the MN with TEOS and MN@4.5%Pd diffractograms and it corresponds to the amorphous silica coating. In the MN@4.5%Pd appears a new wide peak around 40 °, which is characteristic of non-valent palladium in a cubic face centered structure (GANESAN; FREEMANTLE; OBARE, 2007).

Through Scherrer's equation, the estimated crystallite size for iron oxide nanoparticles was 9 nm and for palladium nanoparticles is 3 nm.

The magnetic properties on MN and MN@4.5%Pd were studied and the relationship between the magnetization (M) and the applied field (H) is in figure 5. Through

this graph, it was possible to confirm the superparamagnetic properties of the nanoparticles, since the curves does not present hysteresis loops nor remaining magnetization after the field is removed. This results is characteristic for nano-sized magnetite and maghemite and it helps prevent the aggregation between the particles (SCHÖN, 2011).

The saturation magnetization is around 60 emu/g and 22 emu/g for MN and MN@4.5%Pd, respectively. (THANGARAJ *et al.*, 2016) evaluated the influence of TEOS coating on magnetic nanoparticles and confirmed that even if the superparamagnetic properties remained the same, the higher the silica loading, the lower the saturation magnetization obtained.

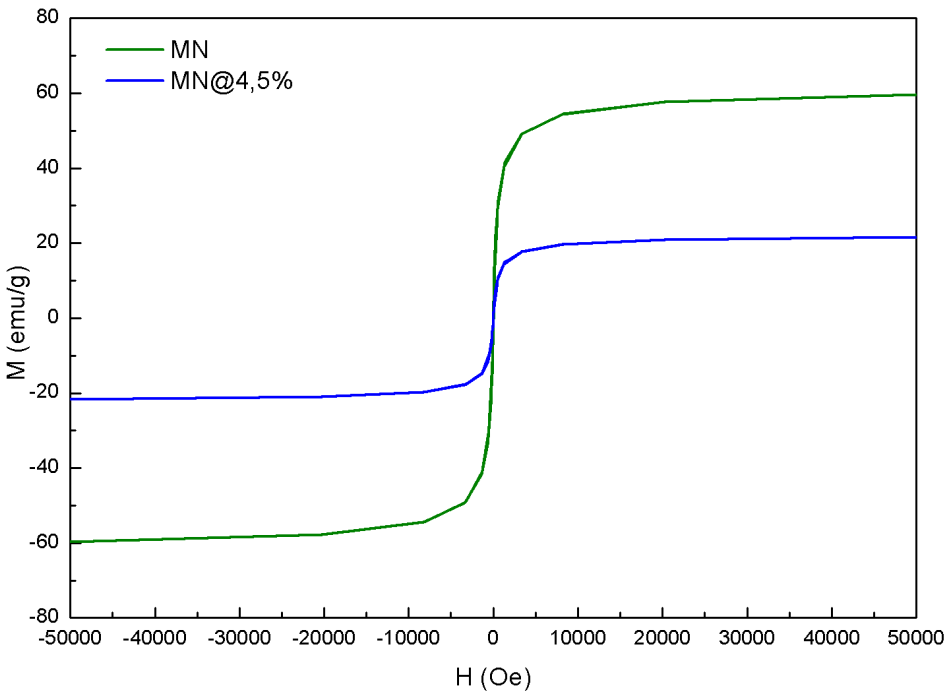


Figure 5: Magnetization as funtion of the applied field.

- Immobilization of lipase B from *Candida Antarctica* (CALB) in the MN@4.5%Pd support

CALB was immobilized in the MN@4.5%Pd support with two different support activating agents, glutaraldehyde (GLU) and epichlorohydrin (EPI). Enzyme immobilization was evaluated with Bradford quantification method (BRADFORD, 1976) and confirmed with Fourier transform infrared spectroscopy (figure 6). The spectra obtained from the immobilized biocatalyst are very similar and intermediate to the other two (MN@4.5%Pd support and CALB). The peak at 1640 cm^{-1} corresponds to the vibration of axial secondary amide binding (CO=N-H), which is due to the immobilized enzymes, confirming its immobilization (CHEN, GUAN-JIE *et al.*, 2012; THANGARAJ *et al.*, 2016).

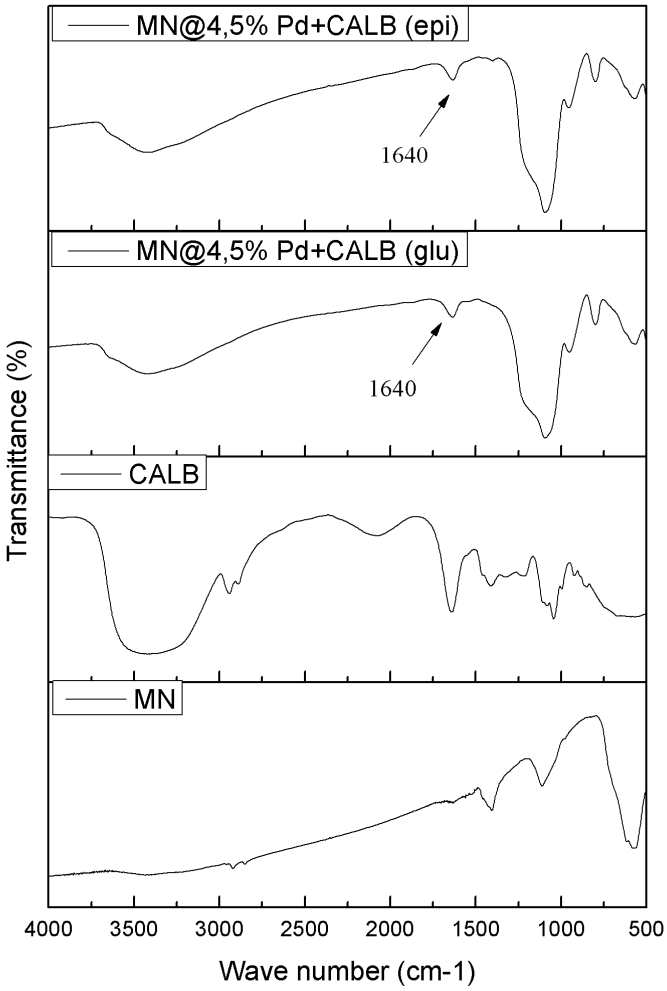


Figure 6: Fourier transform infrared of the MN, CALB and hybrid catalysts using glutaraldehyde and epichlorohydrin.

The best immobilization technique was evaluated using hydrolytic activity essay, palmitic acid esterification conversion potential and the efficiency of the hybrid catalyst in the DKR of (*rac*)-1-phenylethylamine. Table 2 compare the results for hydrolytic activity and esterification conversion after 1 h, 3 h and 6 h. We also compared these results with the ones obtained with commercial Novozym 435® (N435).

Table 2: Immobilization results using glutaraldehyde and epichlorohydrin as activating agents.

Support	Activating agent	Enzyme quantity in the support (mg/g)	Hydrolytic activity (U/g)	Esterification conversion 1 h (%)	Esterification conversion 3 h (%)	Esterification conversion 6 h (%)
MN@4.5%Pd	GLU	2.96	5	63	86	84
MN@4.5%Pd	EPI	-	8	13	33	64
N435	-	30 *	80	80	80	79

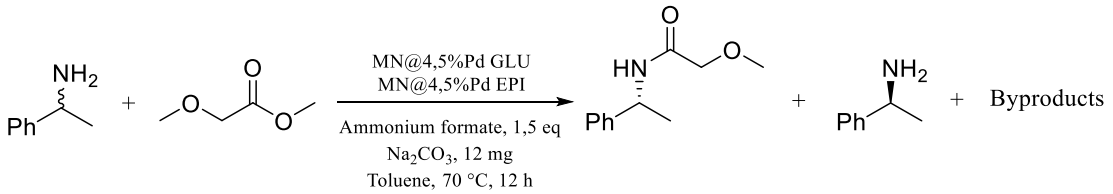
Hydrolytic activities of immobilized enzymes were very low and very similar for the two immobilization techniques. This can be explained by the fact that CALB is an enzyme that hydrolyzes triglyceride slowly, and compared to the commercial immobilized CALB, N435, the biocatalysts have a very small quantity of enzyme. Comparing the esterification conversions after 1 h, 3 h and 6 h, we can conclude that immobilization with glutaraldehyde achieved superior results compared to the immobilization with epichlorohydrin. It also achieved a similar conversion to N435 after 1 h and superior conversions after 3 h and 6 h of reaction.

Enzymatic immobilization slightly distorts enzymes' structures, which changes its activity depending on the reaction (RODRIGUES, RAFAEL C *et al.*, 2013). There are few studies in the literature comparing glutaraldehyde and epichlorohydrin immobilization techniques. (RODRIGUES, DASCIANA *et al.*, 2008) compared the hydrolytic activity of chitosan support activated with these two reactants in the immobilization of CALB. It was found that enzyme immobilized with glutaraldehyde showed a higher hydrolytic activity compared with epichlorohydrin. They verified physical modification in chitosan which

increased its hydrophobicity after activation with epichlorohydrin, which ended up disfavoring the immobilization.

The two hybrid catalysts were then used in the DKR of (*rac*)-1-phenylethylamine and the conversion, selectivity and enantiomeric excess are presented in table 3.

Table 3: DKR of MN@4.5%Pd with CALB immobilized using glutaraldehyde and epichlorohydrin.



Activating agent	Conversion (%)	Selectivity (%)	ee_p (%)
GLU	88	75	86
EPI	78	66	86

Under these conditions, after 12 h of reaction, the conversion was not completed for both biocatalysts and the selectivities were very low. In addition, the biocatalysts showed a poor selectivity to the (*R*) enantiomer, as it can be seen in the ee_P values. Comparing the activating agents, the biocatalyst activated with glutaraldehyde showed better conversion and selectivity results. Because of that, it was decided to proceed with the immobilization with glutaraldehyde and to optimize the immobilization and reaction conditions with this support.

- Optimization

Besides the activating agent, several parameters can change the activity of the immobilized lipase, for example immobilization time and the amount of the enzyme in support (RODRIGUES, DASCIANA *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2015). In this work, in order to increase enzyme activity, we decided to increase the enzymatic load in the support, which was done increasing the enzymatic solution during the immobilization.

Table 4: Immobilization results.

Optimization	Support mass/enzymatic solution (g/mL)	Immobilization effciency (%)	Enzyme load (mg_{CALB}/g)	Hydrolytic activy (U/g)
Inicial	1/6	76.0	2.96	5
1	1/12	50.0	3.89	10
2	1/24	35.5	5.51	63

These optimizations increased considerably the amount of enzyme in the support, which resulted in an increase in the hydrolytic activity of the hybrid catalyst. Optimization 2 for example, reached a value close to the activity obtained for N435, with a much lower enzyme quantity than the commercial biocatalyst. It is possible that the increase in the enzymatic solution during the immobilization increase the chances of contact between the enzymes and the support, allowing more enzymes to attached to the support in ideal confirmations. Nevertheless, the immobilization efficiency decreases with the successive increase of volumes, which probably shows that the number of available sites for lipase immobilization decreases.

For the palmitic acid esterification conversion, we decided to investigate the kinetic of the reaction with these catalysts, in order to obtain their initial rates, as shown in figure 7.

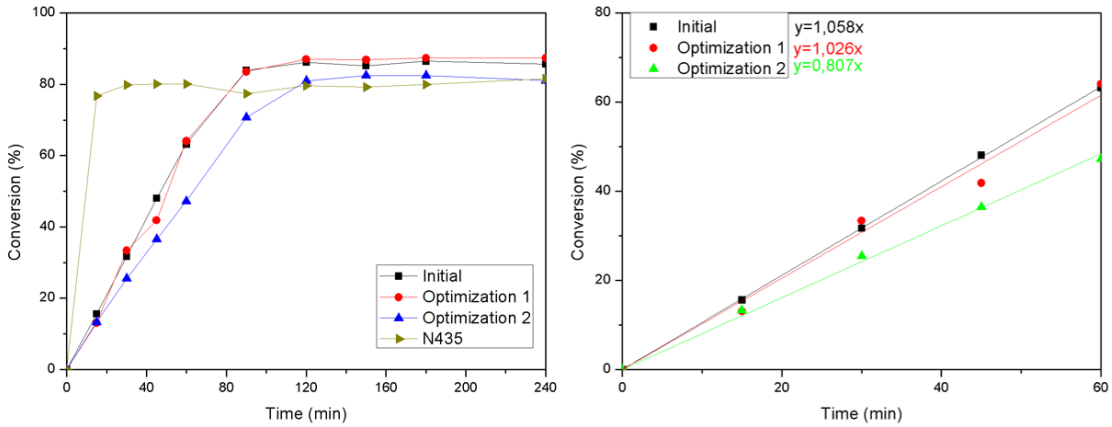


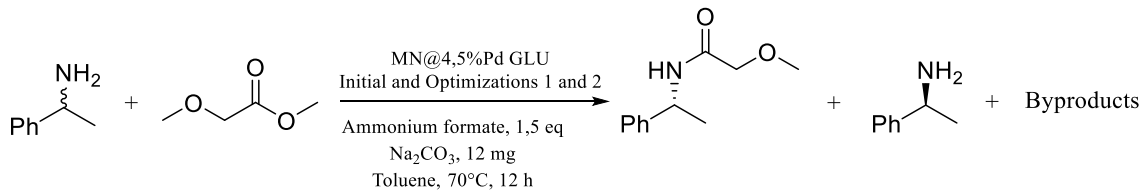
Figure 7: Conversion and initial rates of the esterification reaction.

As seen before, N435 has a faster conversion, achieving almost 77 % of total conversion in the first 15 min of reaction and maximum conversion (around 80 %), after only 30 minutes. Compared to N435, the hybrid catalysts reached a better conversion, 85 %, but slower, after around 90 and 120 minutes. The esterification results did not correlate with the hydrolysis activity and with the amount of enzyme load in the support.

- DKR

After obtaining and evaluating the three hybrid catalysts in the MN@4.5%Pd support, we performed the DKR. First, same reaction conditions were maintained (70 °C, 12h, toluene and ammonium formate as hydrogen donor). The results are in table 4.

Table 5: DKR of MN@4.5%Pd using ammonium formate and at 70 °C

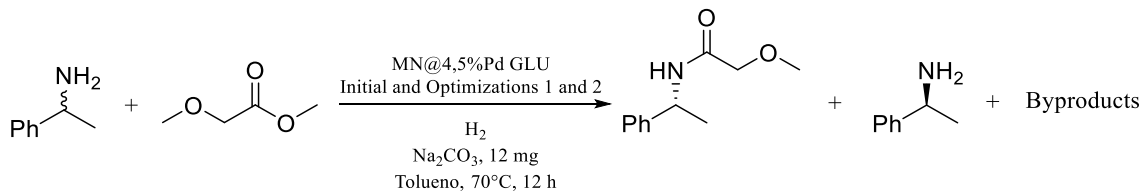


Immob	Conversion (%)	Selectivity (%)	ee_p(%)
Initial	88	75	86
Optimization 1	89	55	87

Optimization 2	94	63	86

Although the conversion was high for most immobilizations, the selectivity was lower and the enantiomeric excess did not improve. According to (MIRANDA; SOUZA; MIRANDA, 2014), the low selectivity in DKR is linked to the hydrogen source used, since in most cases the racemization is the limiting step. In the case of our hybrid catalyst, we saw that the racemization catalyst, palladium, has a very high activity, so it can be assumed that the enzymatic reaction is the limiting step. As seen in the racemization study, once the racemic amide is obtained, its prolonged exposure to the catalyst generates by-products, decreasing the selectivity. As the enzyme is also in the reaction medium, it may react with these by-products generating more by-products. Therefore, it was considered to make changes in the racemization step to improve the selectivity. The first change was the hydrogen donor, and we decided to replace ammonium formate for commonly used hydrogen gaz (table 5). As expected, this change improved the selectivity of the reaction, however, it significantly changed the conversion results for most the immobilizations. Comparing the results with the enzymatic load in the supports, we conclude that the best conversions were obtained for the catalysts with more enzyme. Although the obtained a good conversion and selectivity values for Optimization 2 hybrid catalyst, we still need to improve its enantiomeric excess.

Table 6: DKR of MN@4.5%Pd using H_2 and at 70 °C

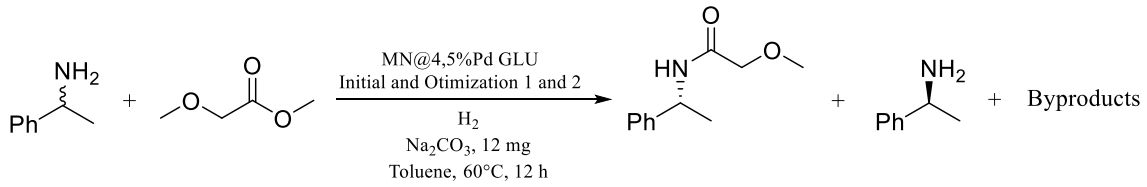


Immobilization	**Conversion (%)**	**Selectivity (%)**	***ee*$_p$(%)**

Initial	61	72	85
1	87	94	86
2	>99	94	91

Using these reaction conditions, we probably reduced the racemization rate, equalizing it to the enzymatic resolution. However, high temperature compromises lipase resolution, since CALB's ideal temperature is 45 °C (JONAS *et al.*, 1994). It was then decided to perform the same reaction at 60 °C (table 6).

Table 7: DKR of MN@4.5%Pd using H_2 and at 60 °C



Immobilization	**Conversion (%)**	**Selectivity (%)**	***ee*$_p$(%)**
Initial	78	96	95
1	90	97	95
2	>99	95	92

The decrease in temperature contributed to the improvement of the conversion, selectivity and enantiomeric excess, and the hybrid catalysts succeeded in the DKR of (*rac*)-1-phenylethylamine. This result corroborates with the hypothesis that the enzymatic resolution was the limiting step of the DKR and that the metal catalyst is super activated.

These results were similar or superior with the ones found in recent literature using commercial or non-commercial catalysts. (MIRANDA; SOUZA; MIRANDA, 2014) achieved 94 % of conversion and 99 % enantiomeric excess using commercial N435 and

Pd\$BaSO_4$ at 70 °C after 12 hours. (XU, SEN *et al.*, 2018) developed an palladium catalyst in MIL-101 and applied it in the reaction with N435. After 18 hours, the (R)-amide was obtained with 99 % conversion, 93 % selectivity and >99 % enantiomeric excess.

Comparing to the hybrid catalysts already developed for this reaction, (SOUZA *et al.*, 2017) achieved 84 % conversion and >99 % enantiomeric excess after 17 h. Their hybrid catalyst contained 1 % palladium and 1,9 mg/g of CALB supported on silica nanoparticles. (ENGSTRÖM *et al.*, 2013), obtained 99 % conversion with 99 % enantiomeric excess after 16 hours using a hybrid catalyst containing 15,6 % palladium and 4,8% of CALB on a mesoporous silica support.

The good results obtained by hybrid catalysts can be explained by the fact that lipase and palladium are very close to each other in the support, allowing them to work in collaboration.

- Recycling

Once the best reaction conditions were determined, the recycling efficiency of the catalyst was investigated. After several washes with toluene, the hybrid catalysts were applied in the same reaction. Unfortunately, the hybrid catalysts were unsuccessful in their reuse, and several factors may explain this result, such as the leaching and the deactivation of wither the enzyme or the palladium.

CONCLUSION

The magnetic hybrid catalyst showed a very good performance in the DKR of (*rac*)-1-phenylethylamine. It showed similar result to the one found in literature using commercial catalysts (N435 and Pd\$BaSO_4$), and superior to the ones obtained with previous biocatalysts in a lower reaction temperature.

The characterization showed that the support used in the hybrid catalyst is composed by magnetite or maghemite, is nanometric, superparamagnetic and that the palladium nanoparticles are supported in the silica-coating surface. The saturation magnetization was reduced when the silica was coated on the surface, however, it was still possible to separate it using a magnetic field.

The recycle of the hybrid catalyst was not satisfactory, and further studies are necessary to evaluate the reason.

EXPERMENTAL SECTION

- Obtention of MN with palladium

Iron oxide nanoparticles were synthesized according to (MAITY; AGRAWAL, 2007). 0.02 mol of $FeSO_4.7H_2O$ and 0.04 mol $FeCl_3$ were dissolved in 40 mL of distilled water and heated to 80 °C for 1 h with magnetic stirring. 5 mL of an acetone solution containing 0.1 mL of oleic acid was added. A stoichiometric amount of NH_4OH was added and the sample was sonicated for 15 min. Five additions of 0.1 mL of oleic acid were made at 5 min intervals each and the sample was sonicated again for 15 min. The medium was cooled at room temperature under stirring, and 5 washes were made with acetone and methanol (1:1) solution.

2 g of iron oxides were sonicated in 300 mL of alcohol and 25 mL of water, 9 mL of NH_4OH were added and stirred at 700 rpm for 10 min. Then, 45 mL of TEOS were added and the medium was stirred for 3 h at 40 °C and 21 h at room temperature. The silica coated nanoparticles were recovered with a magnet and washed 5 tomes with 40 mL of alcohol.

2.5 g of the silica coated nanoparticles were sonicated for 30 min with 200 mL of alcohol. Then, 2.25 mL of APTES were added and the medium was stirred at 700 rpm for 16 h. The nanoparticles were recovered with a magnet and washed 3 times with 40 mL alcohol.

A 0.15 M solution of H_2PdCl_4 was prepared with HCl and $PdCl_2$ in a aqueous solution at 50 °C for 30 min. 500 mg of the nanoparticles coated with TEOS and functionalized with APTES were sonicated in 200 mL of water for 30 min. Then, previously prepared H_2PdCl_4 solution was added under stirring (the concentration of the H_2PdCl_4 solution variated depending on the concentration of Pd in the MN). Then, 400 µLof a 10 % $NaBH_4$ solution was added and the medium was homogenized for 10 min. 2 mL of NH_4OH was added and the medium was stirred for 1 h. The nanoparticles were recovered with a magnet and washed 3 times with 20 mL of alcohol.

- Racemization

Racemization of (S)-1-phenylethylamine was condicted following the procedure of (MIRANDA; SOUZA; MIRANDA, 2014). In 4 mL vial, 3 mL of previously dried and distilled toluene, 0.1 M of (S)-1-phenylethylamine, 1.5 equivalents of ammonium formate, 12 mg Na_2CO_3 and 375 mg of molecular sieves were added. The reaction was kept at 70 °C under inert Argonium atmosphere and the amount of MN added varied according to the palladium concentration in each, in order to have 30 mol% of palladium.100 µL samples were derivatized with 5 µL of trifluoracetic anhydride and 5 µL of triethylamine and analyzed on a Shimadzu GC-2010 gas chromatograph with flame ionization detector and CP-Chirasil-Dex CB (25 m X 0.25 mm ID) chiral column using hydrogen as carrier gas. Injector and detector temperatures were set at 220 °C. The column started at 90 °C and held for 15 min before it was heated to 190 °C at 40 °C/min and held at that temperature for 5

min. Biphenyl was used at internal standard for racemization reactions and conversion, selectivity and enantiomeric excess were calculated according to the equations bellow.

$$Conversion\ (\%) = 100 - \frac{A_{S_n}/A_{B_n}}{A_{S_0}/A_{B_0}}$$

$$Selectivity\ (\%) = 100 - \frac{A_{By_n}}{A_{S_n} + A_{R_n} + A_{Sub_n}} \times 100$$

$$ee\ (\%) = \left(\frac{A_{S_n}}{A_{S_n} + A_{R_n}} - \frac{A_{R_n}}{A_{S_n} + A_{R_n}}\right) \times 100$$

Where, is the area corresponding to (S)-1-phenylethylamine before the reaction, is the area of biphenyl before the reaction and A_{S_n}, A_{R_n}, A_{B_n}, A_{By_n} are the areas of (S)-1-phenylethylamine, (R)-1-phenylethylamine, biphenyl and byproducts at time n.

- Immobilization

The immobilization with glutaraldehyde was done according to (DE SOUZA *et al.*, 2016). 500 mg of the support were dispersed in 10 mL of a phosphate buffer (pH7 and 50 mM) and 2 mL of glutaraldehyde were added. After the activation at room temperature for 24 h, the support was separated with a magnet and washed 4 times with distilled water. Then, 1 mL of CALB solution and 5 mL of a phosphate buffer (pH 7 and 25 mM) were added to 1 g of support and the immobilization was done in shaker at 40 °C and 150 rpm for 24 h. The immobilization efficacy was evaluated using Bradford method (BRADFORD, 1976).

Immobilization using epichlorohydrin was done according to (MARTIN *et al.*, 2018). 1 g of the support was activated in a shaker for 1 h at 120 rpm and 25 °C with 10 mL solution of epichlorohydrin (2.5 %) in phosphate buffer (pH 7.5 and 0.1 M). The support was recovered with magnetic separation and washed 4 times with distilled water. Then, the support was soaked with 10 mL of hexane and stirred at 120 rpm for 2 h at 25 °C. Excess

of hexane was removed and 1 mL of CALB was added to the support. The immobilization was conducted at 4 °C for 16 h and, on the end, the support was washed 4 times with hexane.

- Hydrolytic activity

The hydrolytic activity was made by the titration method with olive oil, according to the protocol of (FREIRE *et al.*, 1997), being an unit of enzyme activity (U) defined as the amount of enzyme in grams used to release 1 µmol of fatty acid per minute under the experimental conditions. An emulsion containing 5 % of extra virgin olive oil and 5 % of arabic gum was prepared in a phosphate buffer (pH 7 and 100 mM) and 20 mL of this emulsion was added to 10 mg of the biocatalyst. The reaction was incubated at 37 °C for 30 minutes and the reaction was stopped with 20 mL of an acetone and ethanol solution (1:1). The titration of the fatty acids produced was done using a 0.04 M NaOH until pH 11 using an Metler Toledo automatic titrator. Control samples were made under the same conditions without the incubation of the catalyst.

- Esterification conversion

The esterification conversion was done with palmitic acid and ethanol according to (DE SOUZA *et al.*, 2016). In a 4 mL vial, a solution containing 100 mM of palmitic acid, 100 mM ethanol in heptane was added together with 30 mg of the biocatalyst. The reaction was conducted at 50 °C and the aliquots were derivatized with M-methyl-N-9-trimethylsilyl)trifluoroacetamide and analyzed on a Shimadzu GC-2010 gas chromatograph with flame ionization detector and HP-5MS column using hydrogen as carrier gas. Injector and detector temperatures were set at 250 °C. The column started at 100 °C and held for 1 min before it was heated to 180 °C at 15 °C/min and held at that temperature for 1 min. The conversion was calculated according to the equation bellow,

where A_{aci} is the area of the palmitic acid and A_{est} is the area of the produced ester. A calibration curve was done with the palmitic acid.

$$Conversion\ (\%) = 1 - \frac{A_{aci}}{A_{aci} + A_{est}}$$

- Dynamic kinetic resolution

The dynamic kinetic resolution of the (rac)-1-phenylethylamine was conducted according to (MIRANDA; SOUZA; MIRANDA, 2014). In 4 mL vial, 3 mL of previously dried and distilled toluene, 200 mg of the hybrid catalyst, 0.1 M of (S)-1-phenylethylamine, 0.2 M methyl 2-methoxyacetate, , 12 mg Na_2CO_3 and 375 mg of molecular sieves were added. As hydrogen donor, H_2 gas or 1.5 equivalents of ammonium formate were used (in this case, a bubbler was coupled to the vial to reduce the pressure of the medium). 100 µL samples were analyzed on a Shimadzu GC-2010 gas chromatograph with flame ionization detector and CP-Chirasil-Dex CB (25 m X 0.25 mm ID) chiral column using the same methodology as the one described for racemization. Conversion, selectivity and enantiomeric excess were calculated according to the equations bellow.

$$Conversion\ (\%) = \frac{A_{P_R} + A_{P_S} + A_{By}}{A_S + A_{P_R} + A_{P_S} + A_{By}}$$

$$Selectivity\ (\%) = 1 - \frac{A_{By}}{A_{P_R} + A_{P_S} + A_{By}}$$

$$ee_p = \left(\frac{A_{P_R}}{A_{P_R} + A_{P_S}} - \frac{A_{P_S}}{A_{P_R} + A_{P_S}}\right) \times 100$$

Where, A_{P_R} is the area of the (R)-2-methoxy-N-(1-phenylethyl) acetamide, A_{P_S} is the area of the (S)-2-methoxy-N-(1-phenylethyl) acetamide, A_S is the area of the substrate, and A_{By} is the area of the byproducts.

- Recycle

The catalysts were separated with a magnet after the racemization and the kinetic resolution and washed 4 times with 2 mL of toluene. They were dried overnight and applied again in the same reaction conditions.

- Characterizations
    - Fourier transform infrared spectroscopy: KBr pellets were prepared for the evaluation in a Nicolet Magna FTIR-760 equipment in the range of 4000-400 cm^{-1}.
    - X-ray diffraction: The analysis were performed in the Laboratory of Hydrogen Technology of the School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro in a Rigaku Mminiflex II driffractometer with copper anode (Cu Kα, 30 kV and 15 mA) with 0.05 ° step and 1 s per step in the range of 5 to 90 °. The diameter of the crystallites were estimated using Scherrer's equation as a function of the highest intensity peak (PATTERSON, 1939), where D_c is the diameter in nm, k the proportionality constant (0.94 for spherical particles), λ the wavelength of the radiation (0.1542 nm for Cu Kα), θ the angle of the highest peak, and β the width at half height of the peak.

$$D_c = \frac{k\,\lambda}{\beta\cos(\theta)}$$

    - Transmission electron microscopy: 10 mg of the samples were sonicated in 10 mL of distilled water for 5 min. The images were made in a JEOL 2100 F 200kV microscope and a Noran Seven energy-dispersive X-ray spectroscopy system.
    - Magnetometry: The essay was conducted in a Qauntum Design PPMS Dynacool equipment equipped with a vibrating sample magnetometer at 300 K in the range of -50000 to 50000 Oe.

ACKNOWLEDGEMENTS

REFERENCES

AHMED, Marwa; KELLY, Tamsin; GHANEM, Ashraf. Applications of enzymatic and non-enzymatic methods to access enantiomerically pure compounds using kinetic resolution and racemisation. *Tetrahedron*, v. 68, n. 34, p. 6781–6802, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2012.05.049>.

AHN, Yangsoo *et al.* Racemization catalysts for the dynamic kinetic resolution of alcohols and amines. v. 252, p. 647–658, 2008.

ALIBEIGI, Samaneh; VAEZI, Mohammad Reza. Phase transformation of iron oxide nanoparticles by varying the molar ratio of Fe2+:Fe3+. *Chemical Engineering and Technology*, v. 31, n. 11, p. 1591–1596, 2008.

ANDERSCH, P. *et al.* Ester Synthesis via Acyl Transfer (Transesterification). *Methods in Enzymology*, v. 5, p. 406–443, 1997.

ANDERSON, Emily M.; LARSSON, Karin M.; KIRK, Ole. One biocatalyst - many applications: The use of Candida antarctica B-lipase in organic synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 16, n. 3, p. 181–204, 1998.

ANDRADE, A L *et al.* Synthesis and characterization of magnetic nanoparticles coated with silica through a sol-gel approach (Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas revestidas com sílica através de um processo sol-gel). *Nano*, v. 55, p. 420–424, 2009.

ANSARI, Shakeel A; HUSAIN, Qayyum. Potential applications of enzymes immobilized on / in nano materials : A review. *Biotechnology Advances*, v. 30, n. 3, p. 512–523, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.005>.

ANSORGE-SCHUMACHER, Marion B.; THUM, Oliver. Immobilised lipases in the cosmetics industry. *Chemical Society Reviews*, v. 42, n. 15, p. 6475, 2013. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3cs35484a>.

BANG, Jin Ho; SUSLICK, Kenneth S. Applications of ultrasound to the synthesis of nanostructured materials. *Advanced Materials*, v. 22, n. 10, p. 1039–1059, 2010.

BILAL, Muhammad *et al.* Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization : A review. v. 120, p. 2530–2544, 2018.

BLANCO, Antonio; BLANCO, Gustavo. 4 - Carbohydrates. *Medical Biochemistry*. [S.l.]: Academic Press, 2017. p. 73–97.

BORCHERT, Holger *et al.* Determination of Nanocrystal Sizes : A Comparison of TEM , SAXS , and XRD Studies of Highly Monodisperse CoPt 3 Particles. n. 8, p. 1931–1936, 2005.

BORNSCHEUER, Uwe T.; KAZLAUSKAS, Romas J. *Lipases and Esterases: Sections 5.1 - 5.2*. [S.l: s.n.], 2006. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/3527607544.ch5b>.

BRADFORD, Marion M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analythical Biochemistry*, v. 254, n. 72, p. 248–254, 1976. Disponível em: <http://www.rotoplast.com.co/sistema-septico-domiciliario/>.

BROCKMAN, H. L. Lipases. *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition*, v. 2, p. 729–732, 2013.

CAHN, R. S.; INGOLD, Christopher; PRELOG, V. Specification of Molecular Chirality. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 5, n. 4, p. 385–415, 1966.

CALCATERRA, Andrea; ACQUARICA, Ilaria D. The market of chiral drugs : Chiral switches versus de novo enantiomerically pure compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 147, p. 323–340, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.008>.

CARVALHO, Ana Caroline Lustosa De Melo *et al.* Recent advances in lipase-mediated

preparation of pharmaceuticals and their intermediates. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, n. 12, p. 29682–29716, 2015.

CENI, Giovana *et al.* Optimization of 1-glyceryl benzoate production by enzymatic transesterification in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, n. 2, p. 107–112, 2010.

CHALLENER, Cynthia A. *Chiral Drugs*. 2018. ed. New York: Taylor & Francis, 2018.

CHATTERJEE, Jhunu; HAIK, Yousef; CHEN, Ching-jen. Size dependent magnetic properties of iron oxide nanoparticles. v. 257, p. 113–118, 2003.

CHEN, Ching-shih *et al.* Quantitative Analyses of Biochemical Kinetic Resolutions od Enantiomers. *Journal of the American Chemical Society*, n. 104, p. 7294–7299, 1982.

CHEN, Guan-jie *et al.* Effect of membranes with various hydrophobic / hydrophilic properties on lipase immobilized activity and stability. *JBIOSC*, v. 113, n. 2, p. 166–172, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.09.023>.

CHEN, Ming *et al.* How Do Enzymes ‘ Meet ’ Nanoparticles and Nanomaterials ? *Trends in Biochemical Sciences*, v. xx, p. 1–17, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2017.08.008>.

CHEN, Zhou *et al.* Synthesis, functionalization, and nanomedical applications of functional magnetic nanoparticles. *Chinese Chemical Letters*, v. 29, n. 11, p. 1601–1608, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2018.08.007>.

CHIA, Sing Ling; LEONG, David Tai. Reducing ZnO nanoparticles toxicity through silica coating. *HLY*, n. July, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00177>.

CHNG, Leng Leng; ERATHODIYIL, Nandanan; YING, Jackie Y. Nanostructured Catalysts for Organic Transformations. v. XXX, n. Xx, 2012.

CIPOLATTI, Eliane P *et al.* Nanomaterials for biocatalyst immobilization – state of the art

and future trends. *RSC Advances*, v. 6, p. 104675–104692, 2016.

CIPOLATTI, Eliane Pereira *et al.* Support engineering: relation between development of new supports for immobilization of lipases and their applications. *Biotechnology Research and Innovation*, v. 1, n. 1, p. 26–34, 2017. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452072117300059>.

CUBIDES-ROMAN, Diana C *et al.* Ethyl esters (biodiesel) production by Pseudomonas fluorescens lipase immobilized on chitosan with magnetic properties in a bioreactor assisted by electromagnetic field. *Fuel*, v. 196, p. 481–487, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2017.02.014>.

DASETTY, Siva; BLENNER, Mark A.; SARUPRIA, Sapna. Engineering Lipases: Walking the Fine Line Between Activity and Stability. *Advanced Powder Technology*, v. 28, n. 11, p. 2812–2819, 2017. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921883117303217>.

DE MENDONÇA, Estelle Silva Diorato Teixeira *et al. Effects of silica coating on the magnetic properties of magnetite nanoparticles*. [S.l: s.n.], 2018. Disponível em: <https://www-sciencedirect-com.dcu.idm.oclc.org/science/article/pii/S2468023018303407>.

DE MIRANDA, Amanda S.; MIRANDA, Leandro S.M.; DE SOUZA, Rodrigo O.M.A. Lipases: Valuable catalysts for dynamic kinetic resolutions. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 5, p. 372–393, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.015>.

DE SOUZA, Stefânia P. *et al.* Cellulose as an efficient matrix for lipase and transaminase immobilization. *RSC Advances*, v. 6, n. 10, p. 6665–6671, 2016.

DE SOUZA, Stefânia P. *et al.* Immobilization of lipase B from Candida antarctica on epoxy-functionalized silica: characterization and improving biocatalytic parameters.

Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 93, n. 1, p. 105–111, 2018.

DING, Shaowei *et al.* Increasing the activity of immobilized enzymes with nanoparticle conjugation. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 34, p. 242–250, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2015.04.005>.

DOLORES, Reyman; RAQUEL, Serrano; ADIANEZ, Garcia-Leis. *Sonochemical synthesis of iron oxide nanoparticles loaded with folate and cisplatin: Effect of ultrasonic frequency*. *Ultrasonics Sonochemistry*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350417714002648>. , 2015

DUTTA, Aastha. *Chapter 4 - Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. [S.l.]: Elsevier Inc., 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-46140-5.00004-2>.

ENGSTRÖM, Karin *et al.* Co-immobilization of an enzyme and a metal into the compartments of mesoporous silica for cooperative tandem catalysis: An artificial metalloenzyme. *Angewandte Chemie - International Edition*, v. 52, n. 52, p. 14006–14010, 2013.

EOM, Gyeong Tae *et al.* High-level extracellular production and characterization of Candida antarctica lipase B in Pichia pastoris. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 116, n. 2, p. 165–170, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.02.016>.

EPP, J. *Chapter 4 - X-ray diffraction (XRD) techniques for materials characterization*. [S.l.]: Elsevier Ltd, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100040-3.00004-3>.

FABER, Kurt. *Biotransformations in Organic Chemistry*. 7th. ed. Graz: Springer, 2018.

FESKO, Kateryna *et al.* Investigation of one-enzyme systems in the ω-transaminase-catalyzed synthesis of chiral amines. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 96, p. 103–110, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.06.015>.

FILICE, Marco; PALOMO, Jose M. Cascade reactions catalyzed by bionanostructures. *ACS Catalysis*, v. 4, n. 5, p. 1588–1598, 2014.

FRAGA, Lucas; DIAMOND, Alex; VARGESSON, Neil. *Thalidomide and birth defects*. [S.l: s.n.], 2011. Disponível em: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&amp%5CnCSC=Y&amp%5CnNEWS=N&amp%5CnPAGE=fulltext&amp%5CnD=emed10&amp%5CnAN=70615971>.

FREIRE, Denise M. *et al.* Lipase production byPenicillium restrictum in a bench-scale fermenter. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 63–65, n. 1, p. 409–421, 1997. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF02920442>.

GANAI, Anal Kr. *et al.* Development of a multifunctional catalyst for a '"relay"' reaction. *RSC Advances*, v. 3, p. 2186–2191, 2013.

GANESAN, Mani; FREEMANTLE, Ruel G.; OBARE, Sherine O. Monodisperse Thioether-Stabilized Palladium Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Reactivity. *Chem. Mater.*, v. 19, p. 3464–3471, 2007.

GEDANKEN, Aharon. Using sonochemistry for the fabrication of nanomaterials. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 11, n. 2, p. 47–55, 2004.

GHANEM, Ashraf; ABOUL-ENEIN, Hassan Y. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. *Tetrahedron Asymmetry*, v. 15, n. 21, p. 3331–3351, 2004.

GHISLIERI, Diego; TURNER, Nicholas J. Biocatalytic Approaches to the Synthesis of Enantiomerically Pure Chiral Amines. p. 284–300, 2014.

GOMM, Andrew; O'REILLY, Elaine. Transaminases for chiral amine synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 43, n. Figure 1, p. 106–112, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.12.007>.

GROGAN, Gideon. Synthesis of chiral amines using redox biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 43, p. 15–22, 2018. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.09.008>.

GUPTA, Rani *et al.* Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. *Progress in Lipid Research*, v. 57, n. January, p. 40–54, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2014.12.001>.

GUTARRA, Melissa L E; MIRANDA, Leandro S M; SOUZA, Rodrigo O M A De. *Enzyme Immobilization for Organic Synthesis*. [S.l.]: Elsevier Inc., 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-411518-7/00004-4>.

HAMMICHE-BELLAL, Yasmina *et al.* Efficiency of magnetite as nanocrystalline bulk catalyst for the reduction of 4-nitrophenol. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 6, n. 2, p. 2355–2362, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.03.042>.

HARNCHANA, Viyada *et al.* Facile and economical synthesis of superparamagnetic magnetite nanoparticles coated with oleic acid using sonochemical route. *Materials Today: Proceedings*, v. 5, n. 6, p. 13995–14001, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214785318302360>.

HETTIARACHCHY, N S *et al. The use of immobilized enzymes to improve functionality*. Second Edi ed. [S.l.]: Elsevier Ltd., 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00022-X>.

HOU, C.T.; SHIMADA, Y. Lipases. *Encyclopedia of Microbiology*, p. 385–392, 2009.

JIN, Qianru *et al.* Modification of supported Pd catalysts by alkalic salts in the selective racemization and dynamic kinetic resolution of primary amines. *Catalysis Science and Technology*, v. 4, n. 2, p. 464–471, 2014.

JONAS, Uppenberg *et al.* The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from Candida antarctica. *Structure*, v. 2, n. 4, p. 293–308,

1994.

KARIMI, Mahmoud. Immobilization of lipase onto mesoporous magnetic nanoparticles for enzymatic synthesis of biodiesel. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 8, p. 182–188, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2016.09.009>.

KASSAEE, M Z; MASROURI, Hassan; MOVAHEDI, Farnaz. Applied Catalysis A : General Sulfamic acid-functionalized magnetic Fe 3 O 4 nanoparticles as an efficient and reusable catalyst for one-pot synthesis of ␣ -amino nitriles in water. *"Applied Catalysis A, General"*, v. 395, n. 1–2, p. 28–33, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apcata.2011.01.018>.

KAZLAUSKAS, Romas J *et al.* A Rule To Predict Which Enantiomer of a Secondary Alcohol Reacts Faster in Reactions Catalyzed by Cholesterol Esterase , Lipase from Pseudomonas. *Journal of Organic Chemistry*, v. 56, n. 11, p. 2656–2665, 1991.

KIM, Mahn-joo *et al.* Dynamic Kinetic Resolution of Primary Amines with a Recyclable Pd Nanocatalyst for Racemization. n. 4, p. 5307–5309, 2007.

KIM, Yunwoong; PARK, Jaiwook; KIM, Mahn-joo. Dynamic Kinetic Resolution of Amines and Amino Acids by Enzyme – Metal Cocatalysis. v. 784, p. 271–277, 2011.

KNAUS, Tanja; BÖHMER, Wesley; MUTTI, Francesco G. Amine dehydrogenases: Efficient biocatalysts for the reductive amination of carbonyl compounds. *Green Chemistry*, v. 19, n. 2, p. 453–463, 2017.

KOHLS, Hannes; STEFFEN-MUNSBERG, Fabian; HÖHNE, Matthias. Recent achievements in developing the biocatalytic toolbox for chiral amine synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 19, p. 180–192, 2014.

LAI, Oi-ming *et al. Lipase / Esterase : Properties and Industrial Applications*. *Encyclopedia of Food Chemistry*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21640-5>. , 2018

LÅNGVIK, Otto *et al.* Heterogeneous Chemoenzymatic Catalyst Combinations for One-Pot Dynamic Kinetic Resolution Applications. *ChemCatChem*, v. 7, n. 24, p. 4004–4015, 2015.

LEE, Jinwoo *et al.* Simple Synthesis of Functionalized Superparamagnetic Magnetite / Silica Core / Shell Nanoparticles and their Application as Magnetically Separable High-Performance Biocatalysts **. p. 143–152, 2008.

LIM, Choon Woo; LEE, In Su. Magnetically recyclable nanocatalyst systems for the organic reactions. *Nano Today*, v. 5, n. 5, p. 412–434, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nantod.2010.08.008>.

LIN, Guo-Qiang; YOU, Qi-Dong; CHENG, Jie-Fei. *Chiral Drugs: Chemistry and Biological Action*. 2011. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc, 2011.

LIU, Dong-mei; CHEN, Juan; SHI, Yan-ping. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 102, p. 332–342, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.03.011>.

LIU, Xianqiao *et al.* Preparation and characterization of amino-silane modified superparamagnetic silica nanospheres. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 270, n. 1–2, p. 1–6, 2004.

MA, Zhi Ya *et al.* Synthesis of magnetic silica nanospheres with metal ligands and application in affinity separation of proteins. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 275, n. 1–3, p. 87–91, 2006.

MAHDAVI, Mahnaz *et al.* Synthesis, surface modification and characterisation of biocompatible magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Molecules*, v. 18, n. 7, p. 7533–7548, 2013.

MAITY, D.; AGRAWAL, D. C. Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media. *Journal of*

Magnetism and Magnetic Materials, v. 308, n. 1, p. 46–55, 2007.

MARTIN, Lucas S. *et al.* Different organic components on silica hybrid matrices modulate the lipase inhibition by the glycerol formed in continuous transesterification reactions. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 62, p. 462–470, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.01.029>.

MENDES, Adriano A.; OLIVEIRA, Pedro C.; DE CASTRO, Heizir F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 78, p. 119–134, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.03.004>.

MERYAM SARDAR, Razi Ahmad. Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, v. 04, n. 02, 2015. Disponível em: <https://www.omicsonline.org/open-access/enzyme-immobilization-an-overview-on-nanoparticles-as-immobilizationmatrix-2161-1009-1000178.php?aid=54441>.

MIRANDA, Amanda S De; SOUZA, Rodrigo O M A De; MIRANDA, Leandro S M. Ammonium formate as a green hydrogen source for clean semi-continuous enzymatic dynamic kinetic resolution of (+/-)-a-methylbenzylamine. *RSC Advances*, v. 4, p. 13620–13625, 2014.

MITSUKURA, Koichi; YOSHIDA, Toyokazu. *Imine Reductases for Chiral Amine Synthesis*. [S.l.]: Elsevier B.V., 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444637437000056>.

MITTELBACH, Martin. Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 67, n. 3, p. 168–170, 1990.

MOHAMAD, Nur Royhaila *et al.* An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology and*

Biotechnological Equipment, v. 29, n. 2, p. 205–220, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>.

MUÑOZ SOLANO, D. *et al.* Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. *Bioresource Technology*, v. 115, p. 196–207, 2012.

MURAHASHI, Shun-Ichi *et al.* Catalytic Alkyl Group Exchange Reaction. *Journal of the American Chemical Society*, v. 105, n. 15, p. 5002–5011, 1983.

NAVVABI, Azita *et al.* Novel lipases discovery specifically from marine organisms for industrial production and practical applications. *Process Biochemistry*, n. March, p. 0–1, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.04.018>.

NETO, Weslany Silvério *et al.* Superparamagnetic nanoparticles stabilized with free-radical polymerizable oleic acid-based coating. *Journal of Alloys and Compounds*, v. 739, p. 1025–1036, 2018.

NGUYEN, Lien Ai; HE, Hua; PHAM-HUY, Chuong. Chiral Drugs: An Overview. *International Journal of Biomedial Science*, p. 85–100, 2006.

NUGENT, Thomas C.; EL-SHAZLY, Mohamed. Chiral amine synthesis - Recent developments and trends for enamide reduction, reductive amination, and imine reduction. *Advanced Synthesis and Catalysis*, v. 352, n. 5, p. 753–819, 2010.

OKORO, Oseweuba Valentine; SUN, Zhifa; BIRCH, John. *Lipases for Biofuel Production*. *Reference Module in Food Science*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081005965216508>. , 2018

PAETZOLD, Jens; BACKVALL, Jan E. Chemoenzymatic Dynamic Kinetic Resolution of Primary Amines. *Journal of the American Chemical Society*, v. 127, n. 50, p. 17620–17621, 2005.

PÀMIES, Oscar *et al.* An efficient and mild ruthenium-catalyzed racemization of amines: Application to the synthesis of enantiomerically pure amines. *Tetrahedron Letters*, v. 43,

n. 26, p. 4699–4702, 2002.

PARVULESCU, Andrei N.; JACOBS, Pierre A.; DE VOS, Dirk E. Palladium catalysts on alkaline-earth supports for racemization and dynamic kinetic resolution of benzylic amines. *Chemistry - A European Journal*, v. 13, n. 7, p. 2034–2043, 2007.

PARVULESCU, Andrei N; JACOBS, Pierre A; VOS, Dirk E De. Support influences in the Pd-catalyzed racemization and dynamic kinetic resolution of chiral benzylic amines. *Applied Catalysis A: General*, v. 368, p. 9–16, 2009.

PASHANGEH, Kh *et al.* Biochemical characterization and stability assessment of Rhizopus oryzae lipase covalently immobilized on amino-functionalized magnetic nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 105, p. 300–307, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.035>.

PATTERSON, A. L. The scherrer formula for X-ray particle size determination. *Physical Review*, v. 56, n. 10, p. 978–982, 1939.

PELLIS, Alessandro *et al.* Evolving biocatalysis to meet bioeconomy challenges and opportunities. *New Biotechnology*, v. 40, n. 16, p. 154–169, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2017.07.005>.

PIAZZOLLA, Francesca; TEMPERINI, Andrea. Recent advances in chemoselective acylation of amines. *Tetrahedron Letters*, v. 59, n. 27, p. 2615–2621, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.05.065>.

PINTO, Martina C C; FREIRE, Denise M G; PINTO, José Carlos. Influence of the morphology of core-shell supports on the immobilization of lipase B from Candida antarctica. *Molecules*, v. 19, n. 8, p. 12509–12530, 2014.

RAY, Abhijit. Application of Lipase in Industry. *Asian Journal of Pharmaceutical Technology*, v. 2, n. 2, p. 33–37, 2012.

REETZ, Manfred T; SCHIMOSSEK, Klaus. Lipase-Catalyzed Dynamic Kinetic

Resolution of Chiral Amines: Use of Palladium as the Racemization Catalyst. v. 50, n. 12, p. 668–669, 1996.

ROBINSON, P. J.; DUNNILL, P.; LILLY, M. D. The Properties of Magnetic Supports in Relation to Immobilized Enzyme Reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, v. XV, p. 603–606, 1973.

RODRIGUES, Dasciana *et al.* Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. v. 51, p. 100–109, 2008.

RODRIGUES, Rafael C *et al.* Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews*, v. 42, p. 6290–6307, 2013.

ROSSI, Daniela *et al.* Approaches for multi-gram scale isolation of enantiomers for drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 12, n. 12, p. 1253–1269, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1383981>.

ROSSI, Liane; GARCIA, Marco; VONO, Lucas. Recent Advances in the Development of Magnetically Recoverable Metal Nanoparticle Catalysts. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 23, n. November, p. 1959–1971, 2012.

ROUF, Abdul; TANEJA, S. C. Synthesis of Single-enantiomer Bioactive Molecules: A Brief Overview. *Chirality*, v. 26, p. 63–78, 2014.

SANDOVAL, Georgina. *Lipases and Phospolipases: Methods and Protocols*. [S.l: s.n.], 2012. v. 531. Disponível em: <http://books.google.com/books?id=Ku2wPAAACAAJ>.

SANTOS, J C *et al.* Pseudomonas fluorescens lipase immobilization on polysiloxane – polyvinyl alcohol composite chemically modified with epichlorohydrin. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 53, p. 49–57, 2008.

SANTOS, Kádima C. *et al.* Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. *Industrial Crops and Products*, v. 49, p. 462–470, 2013. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.05.035>.

SANTRA, Swadeshmukul *et al.* Synthesis and characterization of silica-coated iron oxide nanoparticles in microemulsion: The effect of nonionic surfactants. *Langmuir*, v. 17, n. 10, p. 2900–2906, 2001.

SARMAH, Nipon *et al.* Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnology Progress*, v. 34, n. 1, p. 5–28, 2018.

SCHMID, A *et al.* Industrial Biocatalysis and Tomorrow. *Nature*, v. 409, n. January, p. 258–268, 2001.

SCHÖN, S.J. Magnetic Properties. v. 65, p. 373–391, 2011. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567803211080104>.

SEDDIGI, Zaki S. *et al.* Lipases in asymmetric transformations: Recent advances in classical kinetic resolution and lipase–metal combinations for dynamic processes. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 348, p. 54–70, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2017.08.008>.

SETH, Sonali *et al.* An insight into plant lipase research - Challenges encountered. *Protein Expression and Purification*, v. 95, p. 13–21, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2013.11.006>.

SHAKERI, Mozaffar *et al.* Small Pd Nanoparticles Supported in Large Pores of Mesocellular Foam : An Excellent Catalyst for Racemization of Amines. p. 13269–13273, 2011.

SHELDON, Roger A. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Advanced Synthesis and Catalysis*, v. 349, n. 8–9, p. 1289–1307, 2007.

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

SHOKROLLAHI, H. A review of the magnetic properties, synthesis methods and

applications of maghemite. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 426, n. July 2016, p. 74–81, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2016.11.033>.

SILVA, Marceli Fernandes *et al.* Production of multifunctional lipases by Penicillium verrucosum and Penicillium brevicompactum under solid state fermentation of babassu cake and castor meal. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 34, n. 2, p. 145–152, 2011.

SINGH, Abhishek Kumar; MUKHOPADHYAY, Mausumi. Overview of Fungal Lipase : A Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 166, n. October 2011, p. 486–520, 2012.

SIRISHA, V L; JAIN, Ankita; JAIN, Amita. *Enzyme Immobilization : An Overview on Methods , Support Material , and Applications of Immobilized Enzymes*. 1. ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.07.004>.

SOARES, Paula P. *et al.* Iron oxide nanoparticles modified with oleic acid: Vibrational and phase determination. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, v. 99, p. 111–118, 2016.

SOUZA, Stefânia P De *et al.* New Biosilified Pd-lipase hybrid biocatalysts for dynamic resolution of amines. v. 58, p. 4849–4854, 2017.

STAUCH, Benjamin; FISHER, Stuart J.; CIANCI, Michele. Open and closed states of Candida antarctica Lipase B: protonation and the mechanism of interfacial activation. *Journal of Lipid Research*, p. 1–34, 2015.

TALEKAR, Sachin *et al.* Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs). *RSC Advances*, v. 3, n. 31, p. 12485–12511, 2013.

TANG, C Y; YANG, Z. *Transmission Electron Microscopy (TEM)*. [S.l.]: Elsevier B.V., 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63776-5.00008-5>.

TANGWATANAKUL, Witoon *et al.* Synchrotron X-ray absorption of iron oxide (Fe2O3) nanoparticles: Effects of reagent concentration and sonication in co-precipitation synthesis.

Chinese Journal of Physics, v. 55, n. 3, p. 845–852, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cjph.2017.02.012>.

TEJA, Amyn S.; KOH, Pei Yoong. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, v. 55, n. 1–2, p. 22–45, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pcrysgrow.2008.08.003>.

THANGARAJ, Baskar *et al.* Effect of silica coating on Fe 3 O 4 magnetic nanoparticles for lipase immobilization and their application for biodiesel production. *Arabian Journal of Chemistry*, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.09.004>.

TUVIGNON, N *et al.* Development of an indirect method for measuring porcine pancreatic lipase in human duodenal fluid. *Analytical Biochemistry*, v. 383, n. 2, p. 289–295, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2008.08.036>.

VAKHLU, Jyoti; KOUR, Avneet. Yeast lipases: Enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 9, n. 1, p. 69–85, 2006.

VERHO, Oscar; BÄCKVALL, Jan E. Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution: A powerful tool for the preparation of enantiomerically pure alcohols and amines. *Journal of the American Chemical Society*, v. 137, n. 12, p. 3996–4009, 2015.

WERMUTH, Camille G. *Optical Isomerism in Drugs*. [S.l.]: Elsevier Ltd, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-417205-0.00018-3>.

XU, Sen *et al.* Dynamic kinetic resolution of amines by using palladium nanoparticles confined inside the cages of amine-modified MIL-101 and lipase. *Journal of Catalysis*, v. 363, p. 9–17, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcat.2018.04.006>.

XU, Yuanfeng *et al.* Dynamic kinetic resolution of aromatic: Sec -alcohols by using a heterogeneous palladium racemization catalyst and lipase. *Catalysis Science and*

Technology, v. 7, n. 24, p. 5838–5842, 2017.

YI, Dong Kee; LEE, Su Seong; YING, Jackie Y. Synthesis and Applications of Magnetic Nanocomposite Catalysts. v. 18, n. 10, p. 2004–2006, 2006.

ZHANG, Dong-hao *et al.* Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Lipase immobilization on epoxy-activated poly (vinyl acetate-acrylamide) microspheres. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 129, p. 206–210, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.03.056>.

ZHANG, Dong-hao; YUWEN, Li-xia; PENG, Li-juan. Parameters Affecting the Performance of Immobilized Enzyme. v. 2013, 2013.

ZISIS, Themistoklis *et al.* Interfacial activation of Candida antarctica lipase B : combined evidence from experiment and simulation. *Biochemistry*, 2015.

APÊNDICE II

Carta de aceite de trabalhos no XIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática

XIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática

Florianópolis, 16 a 19 de setembro de 2018

Prezado(a) **Clara Anhel Ferraz**,

Temos a satisfação de informar que seu trabalho intitulado "**Hybrid and Superparamagnetic Catalysts of Lipase and Pd Nanoparticles for Dynamic Kinetic Resolution of Amines**" foi aceito para apresentação e publicação nos anais do XIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática – ENZITEC 2018, a se realizar de 16 a 19 de setembro de 2018 em Florianópolis - SC.

A data, horário e forma de apresentação serão encaminhados posteriormente.

A Comissão Organizadora agradece a colaboração e conta com sua presença no ENZITEC 2018.

Atenciosamente,

Comissão Organizadora
XIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática

Oceania Park Hotel & Convention Center - Florianópolis - SC - Brasil
http://www.enzitecfloripa2018.com.br/

XIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática

Florianópolis, 16 a 19 de setembro de 2018

Prezado(a) **Clara Anhel Ferraz**,

Temos a satisfação de informar que seu trabalho intitulado **"Characterization and comparison of magnetic nanoparticles coupled with Palladium as support for lipase immobilization"** foi aceito para apresentação e publicação nos anais do XIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática – ENZITEC 2018, a se realizar de 16 a 19 de setembro de 2018 em Florianópolis - SC.

A data, horário e forma de apresentação serão encaminhados posteriormente.

A Comissão Organizadora agradece a colaboração e conta com sua presença no ENZITEC 2018.

Atenciosamente,

Comissão Organizadora
XIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática

Oceania Park Hotel & Convention Center - Florianópolis - SC - Brasil
http://www.enzitecfloripa2018.com.br/

APÊNDICE III

Nesse apêndice encontram-se os detalhes dos resultados apresentados em tabelas e gráficos nos capítulos 4 e 5.

Valores de absorbância para construção da curva de calibração da solução de Bradford

(Abs branco = 0,113):

Solução	Concentração (mg/mL)	Abs	Abs - Branco	Média	Desvio padrão
		0,117	0,004		
1	0,021	0,115	0,002	0,003	0,0012
		0,117	0,004		
		0,123	0,010		
2	0,052	0,124	0,011	0,010	0,0010
		0,122	0,009		
		0,139	0,026		
3	0,149	0,138	0,025	0,025	0,0006
		0,138	0,025		
		0,166	0,053		
4	0,347	0,166	0,053	0,052	0,0012
		0,164	0,051		
		0,181	0,068		
5	0,473	0,181	0,068	0,068	0,0000
		0,181	0,068		

Valores de área e concentração usados na curva de calibração da (rac)-1-feniletilamina

Concentração (M)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Média	Desvio padrão
0,000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,050	1354874,43	1212332,99	962959,19	1176722,2	198369,6
0,075	1724509,61	1393043,74	1515821,72	1544458,36	167578,2
0,100	2169012,61	1955247,86	2088805,29	2071021,92	107986,2
0,125	2708334,86	2462702,95	2674534,44	2615190,75	133135,3
0,150	3266590,51	2887126,97	3082369,99	3078695,82	189758,4

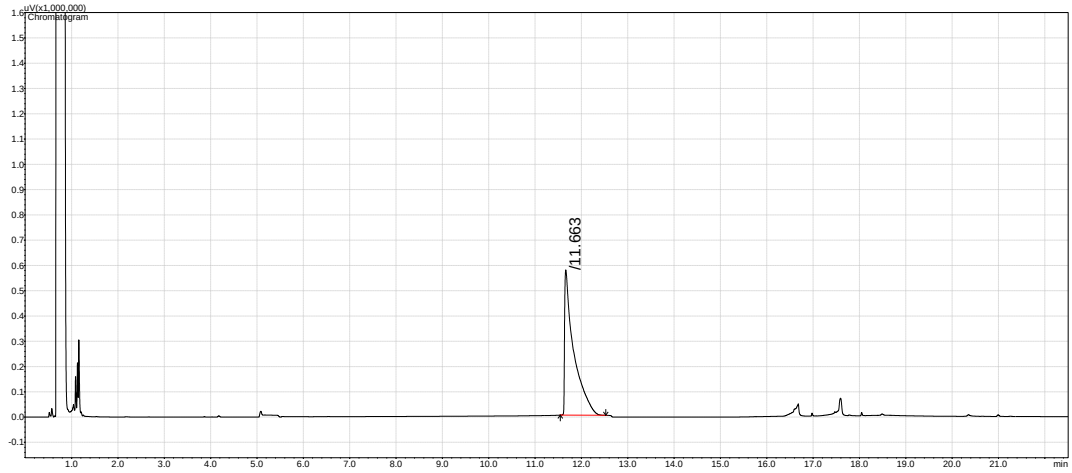
Valores de área e concentração usados na curva de calibração do ácido palmítico

Concentração (M)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 2	Média	Desvio padrão
0,000	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,050	164296,3	165939,4	207334,3	179190,0	24387,5
0,075	291311,3	328303,4	304587,0	308067,2	18740,0

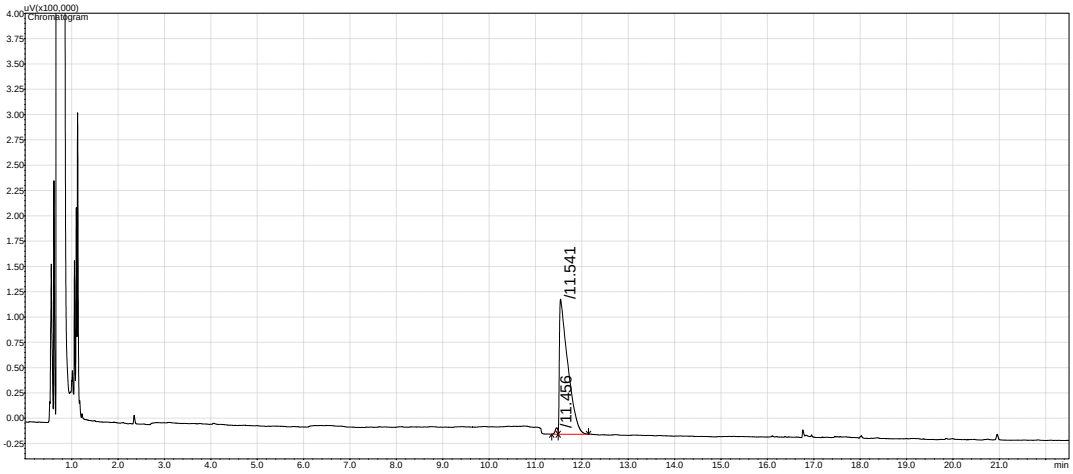
0,100	355997,7	392434,4	393700,0	380710,7	21411,4
0,125	507288,2	489317,6	451749,6	482785,1	28339,7
0,150	594575,9	632322,8	585281,8	604060,2	24913,4

Racemização NP

- NP 3 %; Tempo inicial

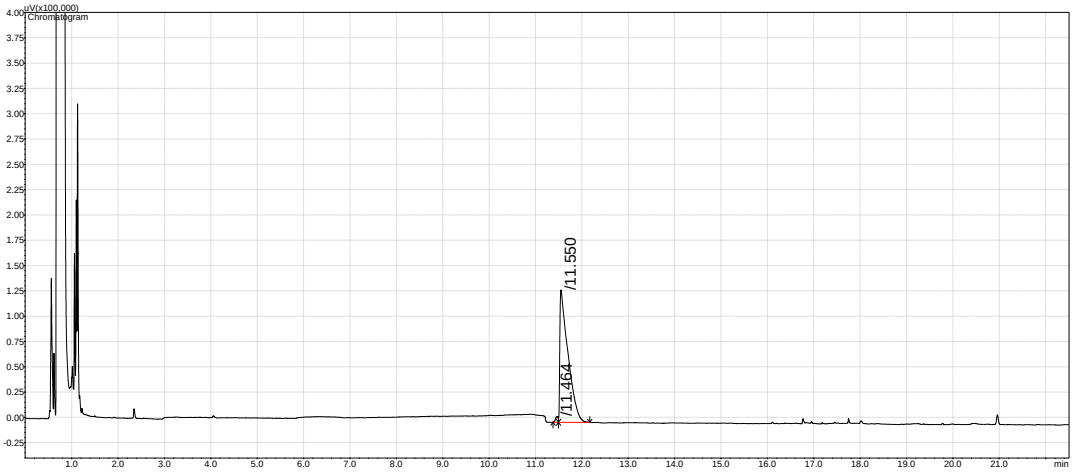


- NP 3 %; Tempo 3 h



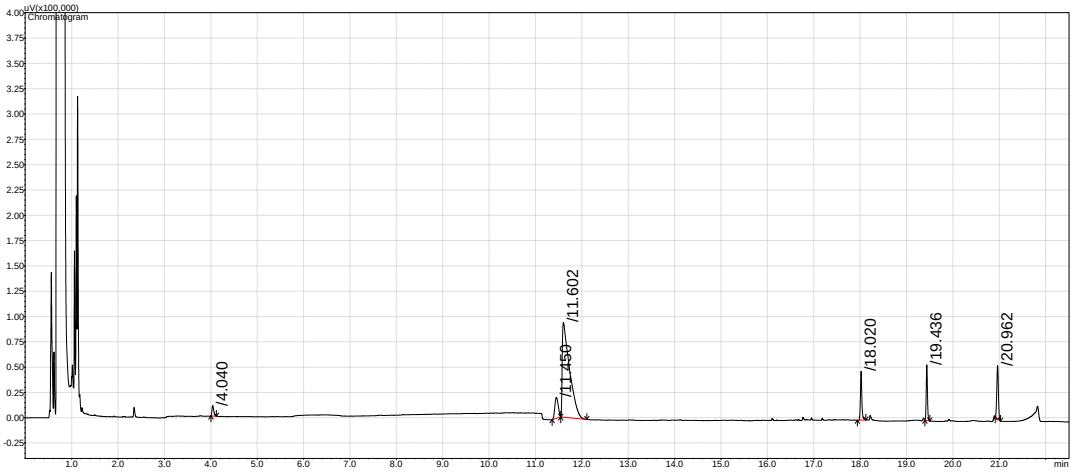
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,456	25467,6	1,49
11,541	1681944,9	98,51

- NP 3 % Pd Tempo 18h



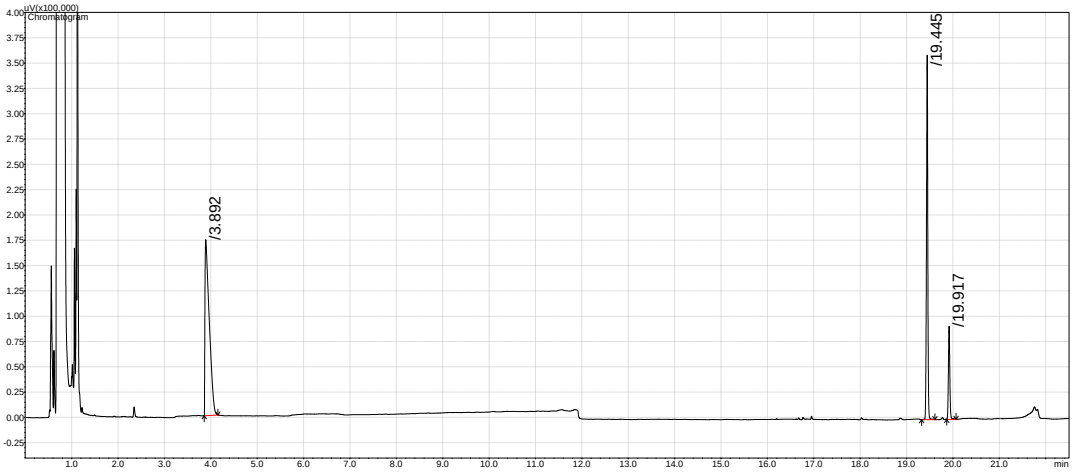
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,464	22312,1	1,37
11,550	1605208,4	98,63

- NP 3 % Pd Tempo 24 h



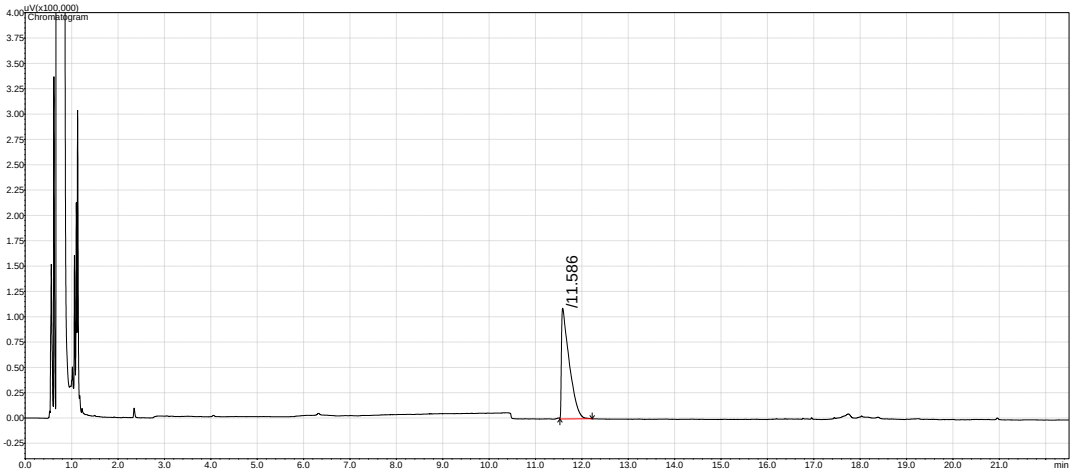
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,450	106604,3	7,16
11,602	1023879,1	68,77
Subprodutos	358465,4	24,07

- NP 3 % Pd Tempo 48 h

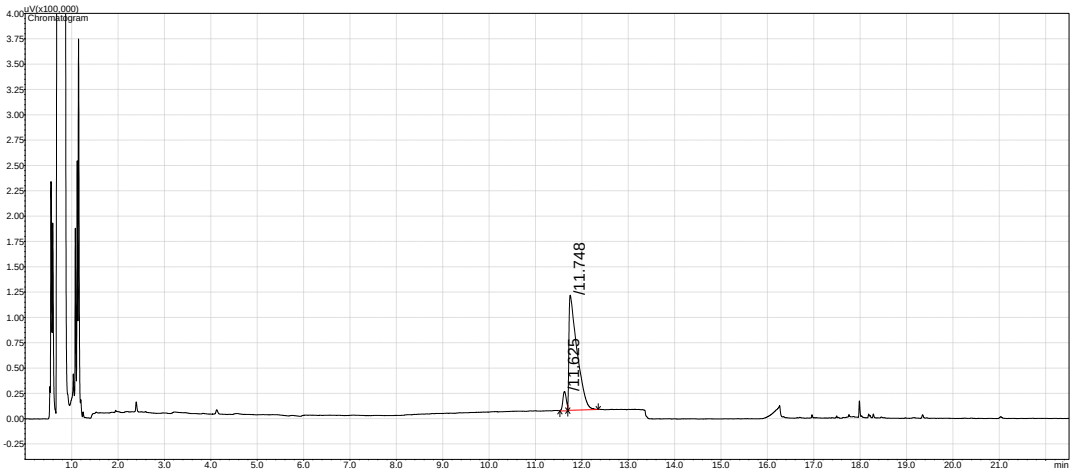


Somente subprodutos

- NP 4,5 % Pd Tempo inicial



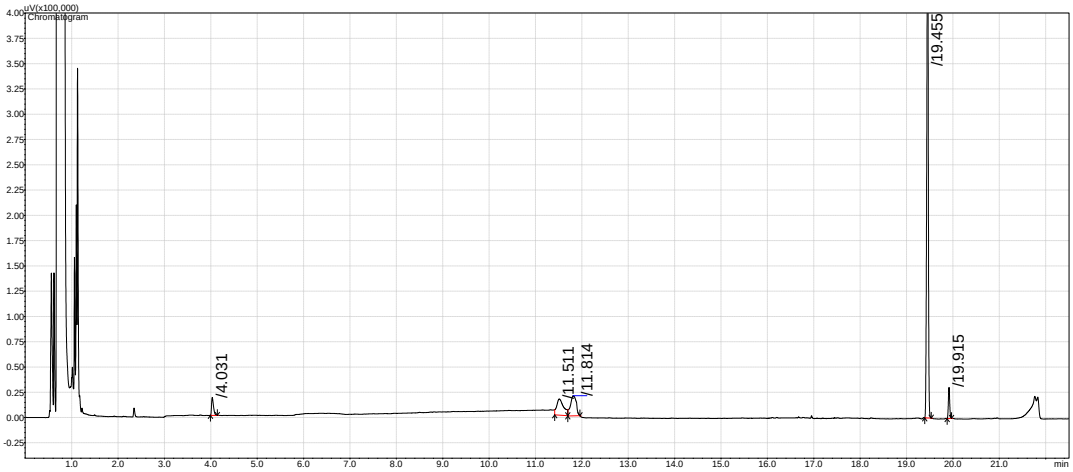
- NP 4,5 % Pd Tempo 3 h



Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,625	98496,1	6,63

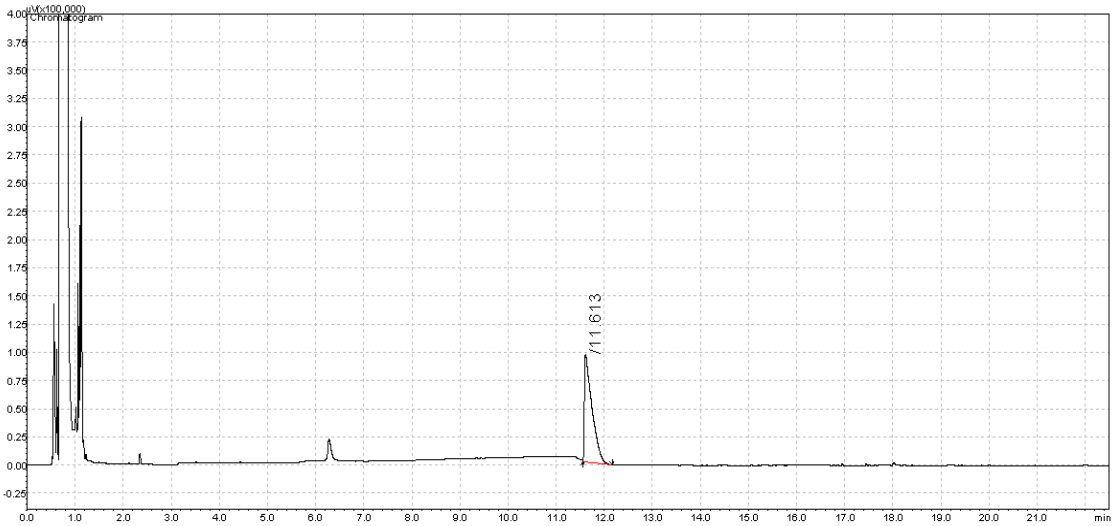
11,748	1385238,6	93,36

- NP 4,5 % Pd Tempo 18 h

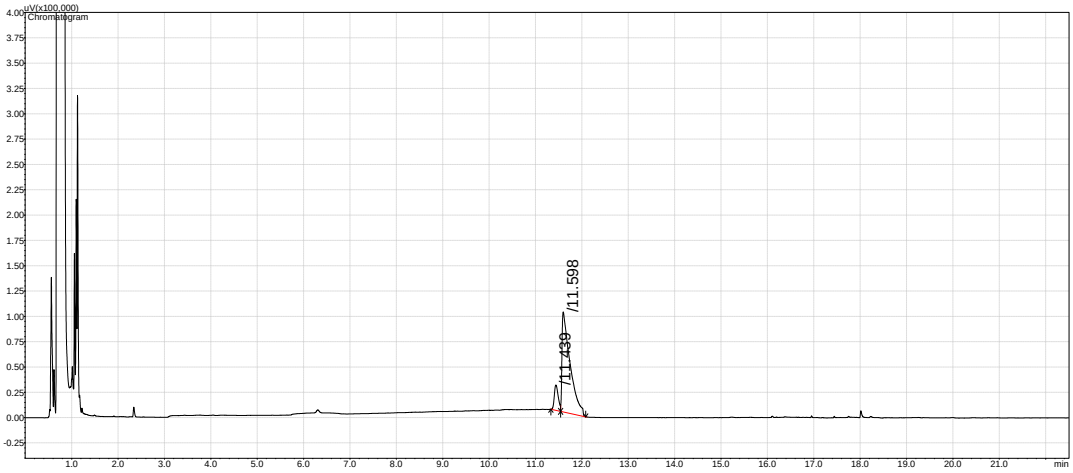


Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,511	166406,9	9,88
11,814	175421,0	10,42
Subprodutos	1342274,4	79,70

- NP 6 % Pd Tempo inicial

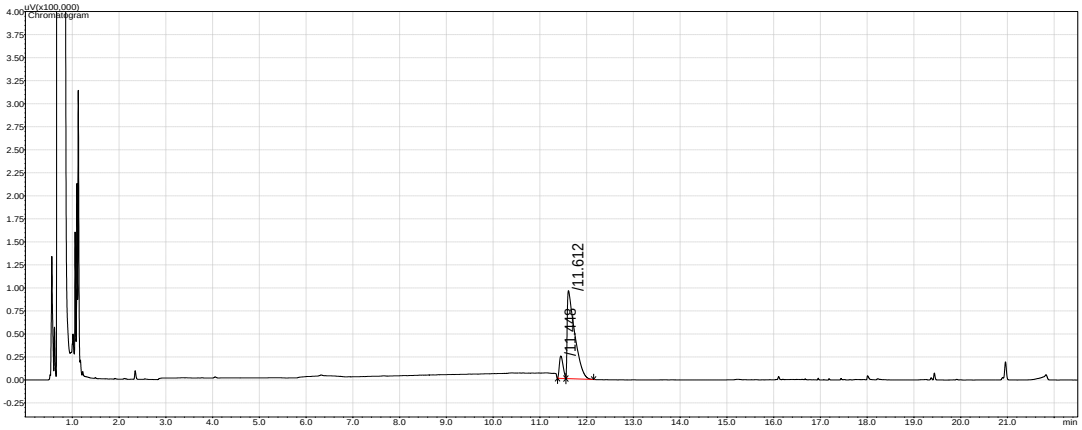


- NP 6 % Pd Tempo 3 h



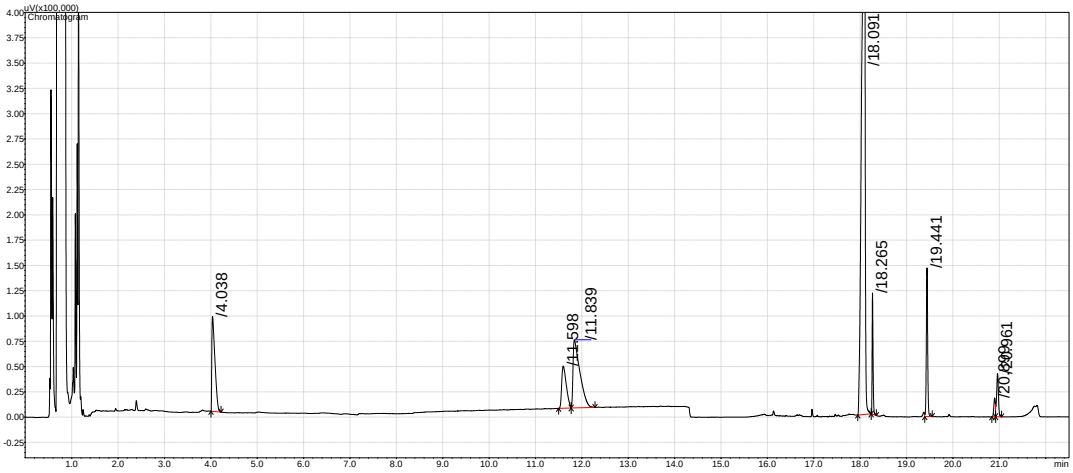
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,439	148576,4	11,00
11,598	1201578,6	89,00

- NP 6 % Pd Tempo 18 h



Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,448	133916,3	11,13
11,612	1068768,9	88,87

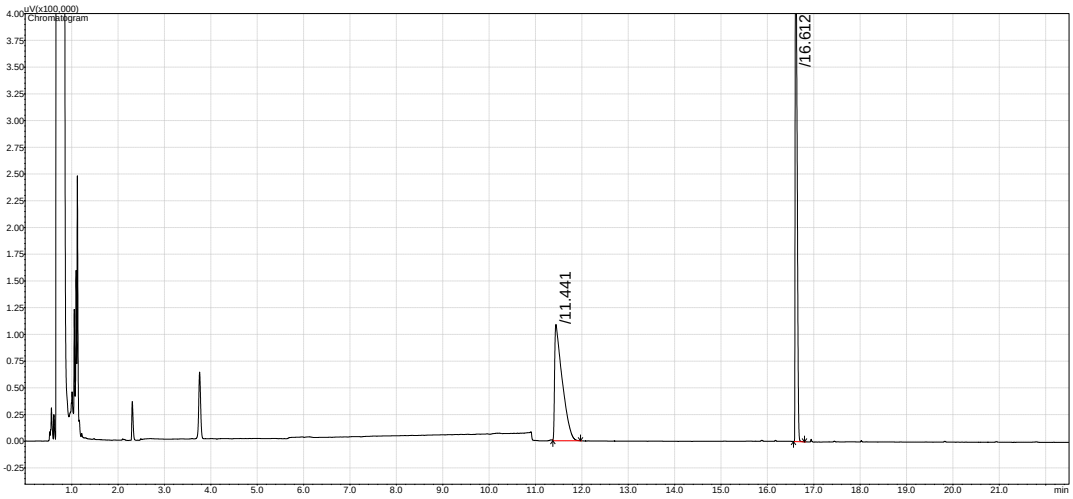
- NP 6 % Pd Tempo 24 h



Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,598	288978,8	5,64
11,839	690657,8	13,52
Subprodutos	4129936,0	80,84

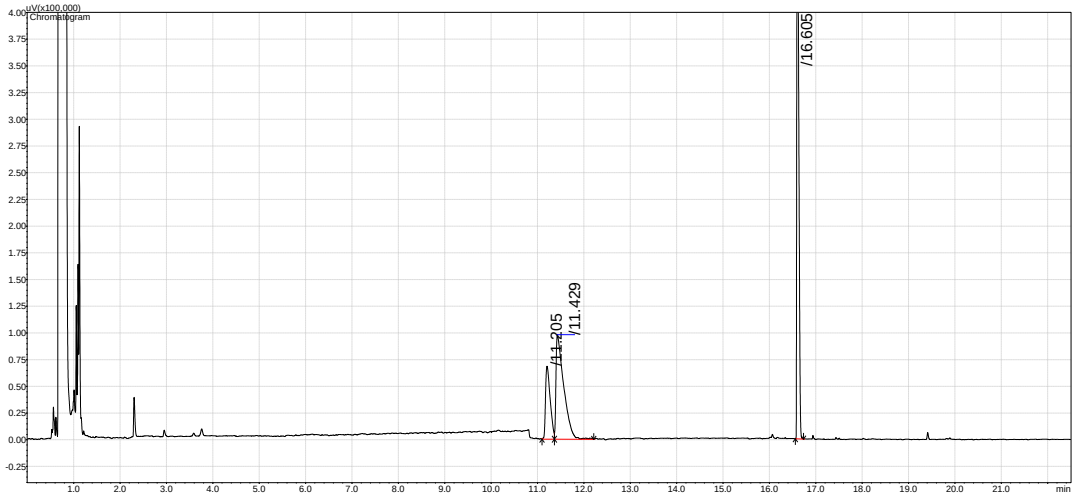
Racemização NPUS

- NPUS 3 % Tempo inicial



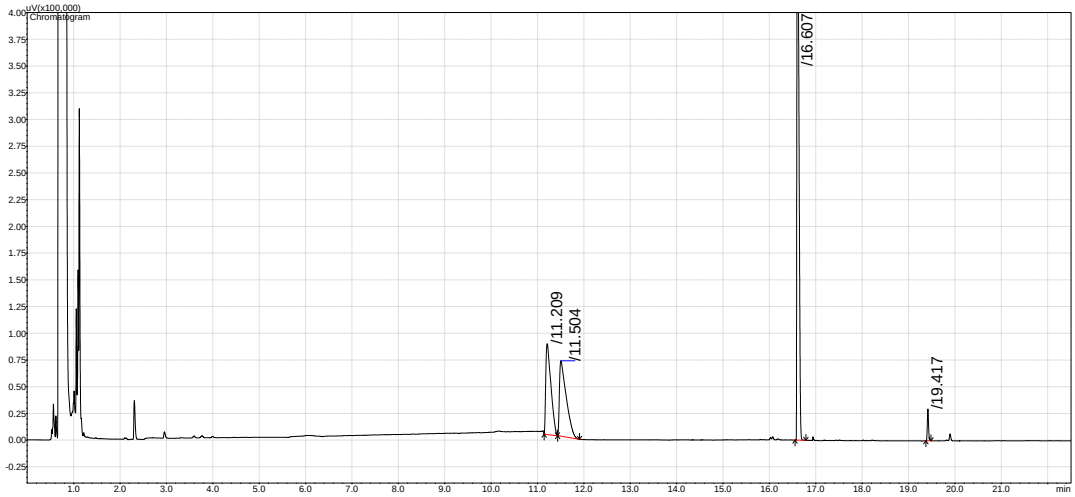
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,441	1238772,0	45,72
16,612 (Bifenila)	1470557,8	54,28

- NPUS 3 % Pd Tempo 30 min



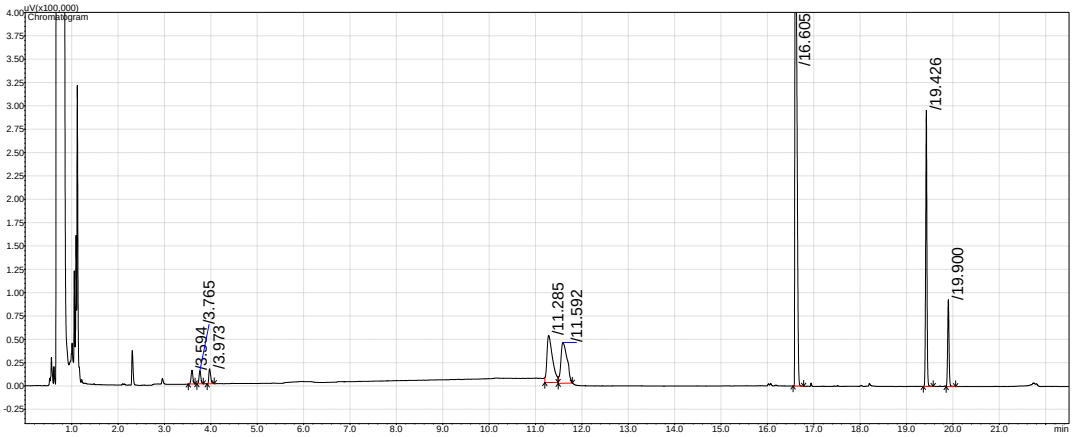
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,204	476941,6	14,86
11,429	1122148,4	34,95
16,605 (Bifenila)	1611293,6	50,19

- NPUS 3 % Pd Tempo 1 h



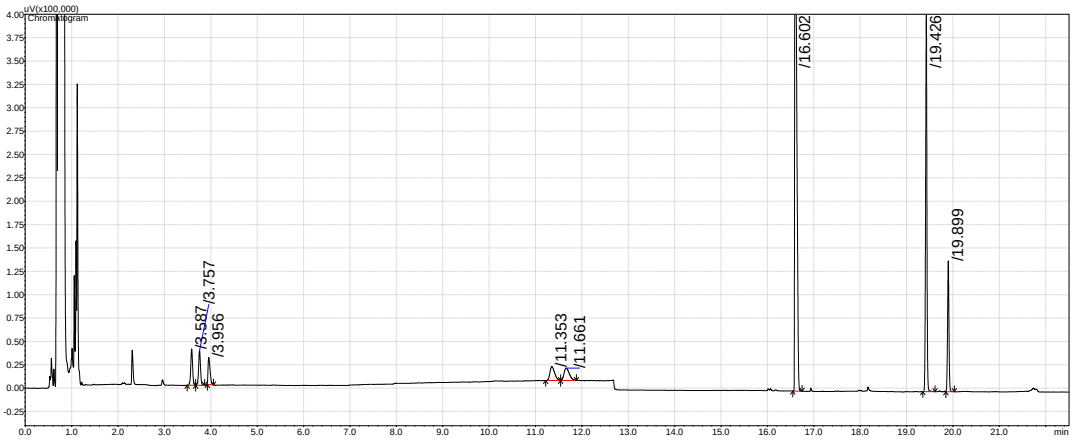
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,209	654160,2	21,15
11,504	719853,9	23,28
16,607 (Bifenila)	1663108,9	53,78
Subproduto	55140,2	1,78

- NPUS 3 % Pd Tempo 1h30



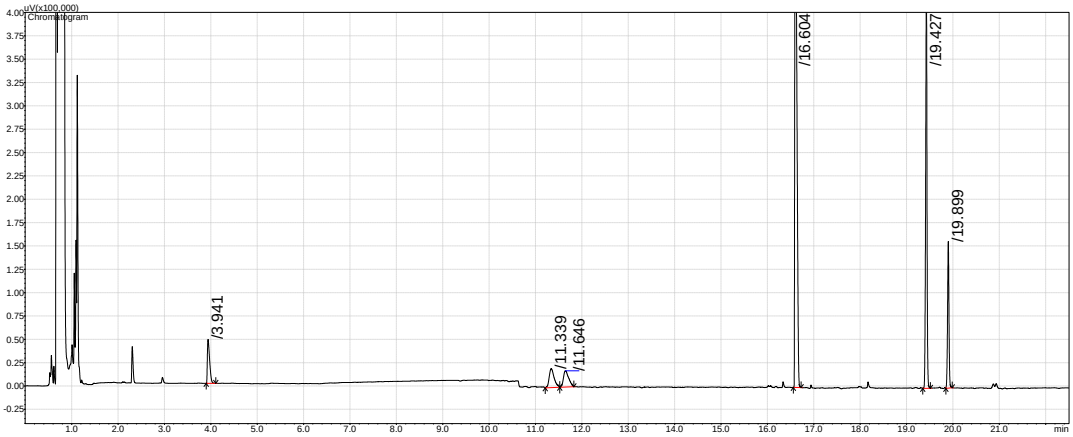
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,285	421821,9	12,38
11,592	4088641,6	11,99
16,605 (Bifenila)	1702070,7	49,95
Subproduto	874975,5	25,68

- NPUS 3 % Pd Tempo 2 h



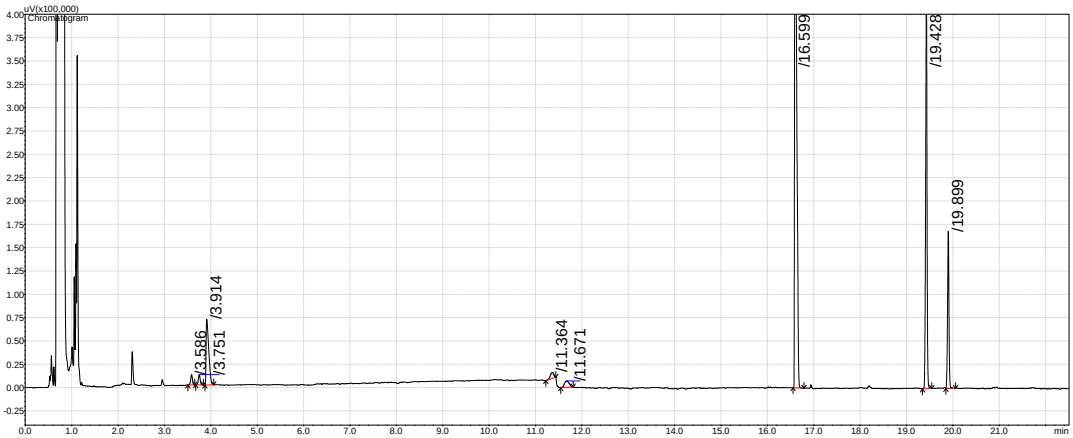
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,353	105965,8	3,16
11,661	105638,9	3,15
16,602 (Bifenila)	1760635,7	52,44
Subproduto	1385294,3	41,25

- NPUS 3 % Pd Tempo 2h30



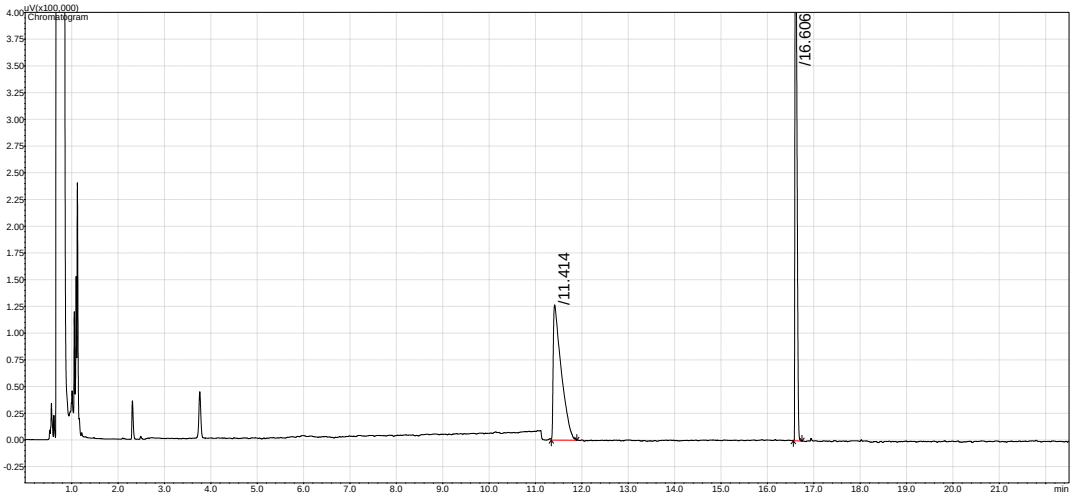
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,339	152412,3	4,43
11,646	138339,6	4,02
16,604 (Bifenila)	1788060,4	52,02
Subproduto	1358501,5	39,52

- NPUS 3 % Pd Tempo 3 h



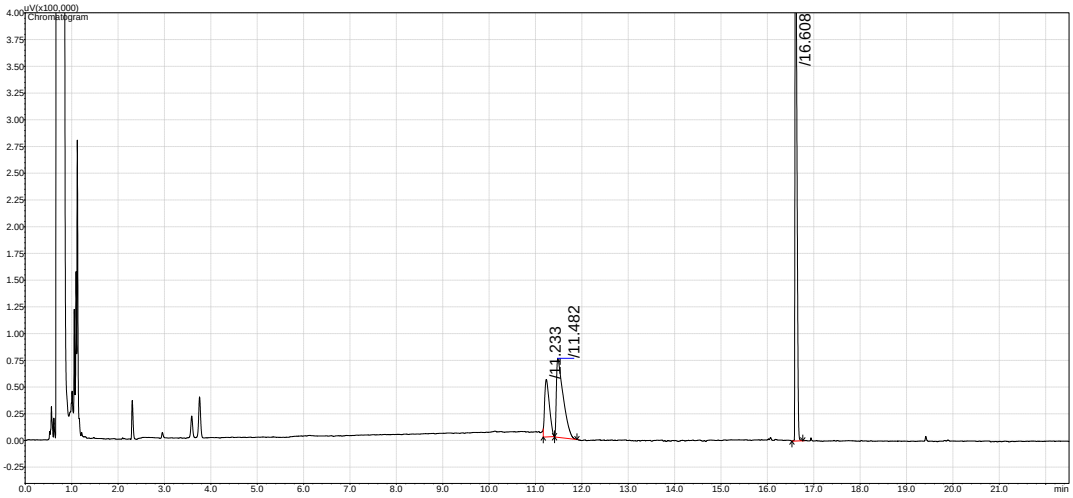
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,364	32581,2	0,92
11,671	4968,6	1,41
16,599 (Bifenila)	1873610,4	53,08
Subproduto	1573623,5	44,58

- NPUS 4,5 % Pd Tempo inicial



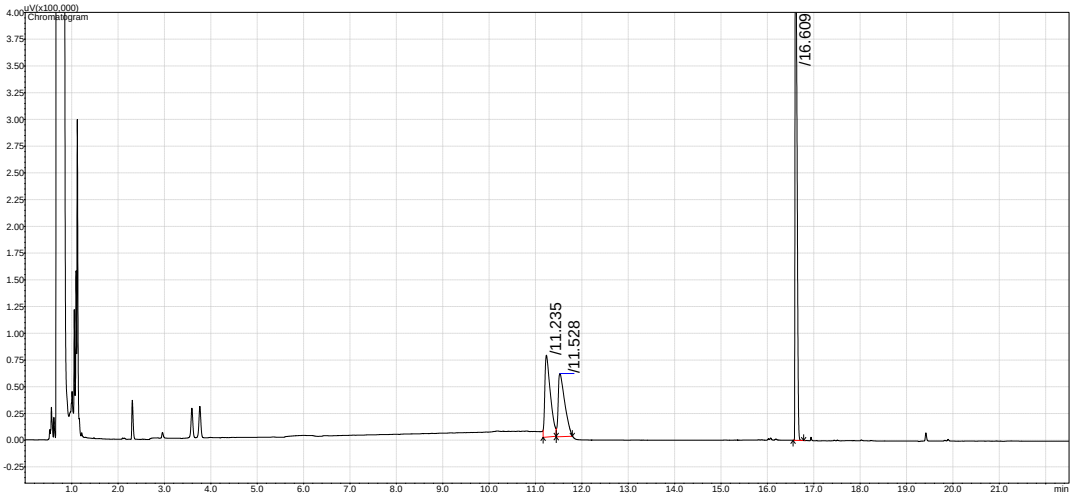
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,414	1526937,3	49,13
16,606 (Bifenila)	1580837,7	50,87

- NPUS 4,5 % Pd Tempo 30 min



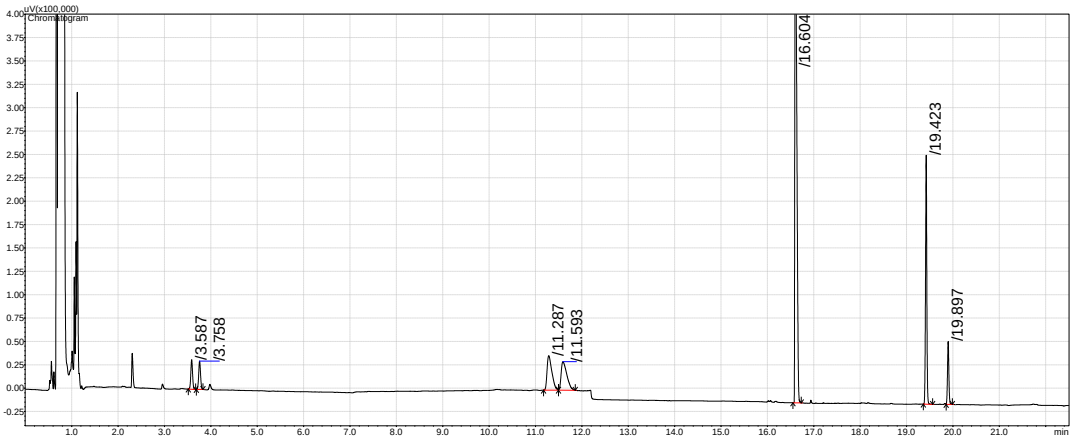
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,233	379676,0	13,64
11,482	751446,5	27,00
16,608 (Bifenila)	1488473,1	53,47
Subprodutos	163955,7	5,89

- NPUS 4,5 % Pd Tempo 1 h



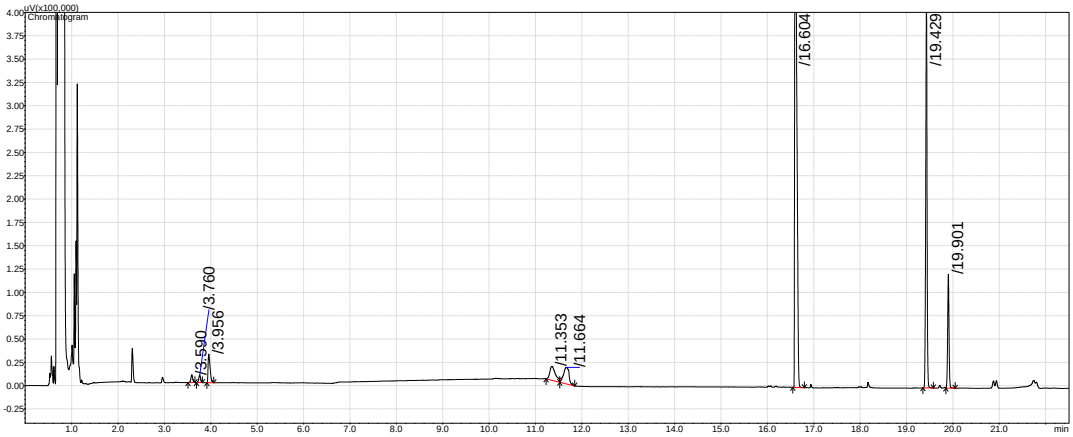
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,235	640780,3	19,22
11,482	751446,5	20,85
16,608 (Bifenila)	1488473,1	54,27
Subprodutos	156968,7	5,66

- NPUS 4,5 % Pd Tempo 1h30



Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,287	266883,1	9,13
11,593	262539,2	8,99
16,604 (Bifenila)	1581769,1	54,14
Subprodutos	810657,3	27,74

- NPUS 4,5 % Pd Tempo 2 h

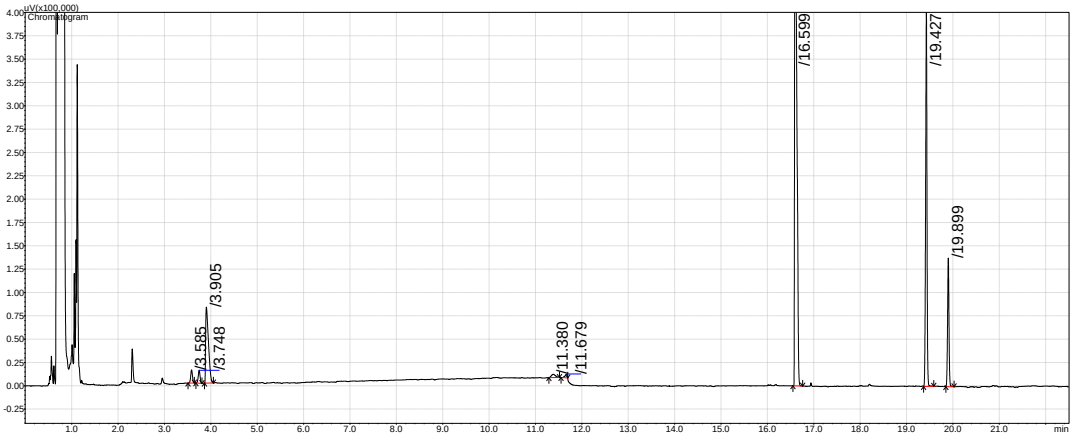


Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,353	128958,8	3,90
11,664	153463,8	4,64
16,604 (Bifenila)	1816395,5	54,91
Subprodutos	1209255,9	36,55

- NPUS 4,5 % Pd Tempo 2h30

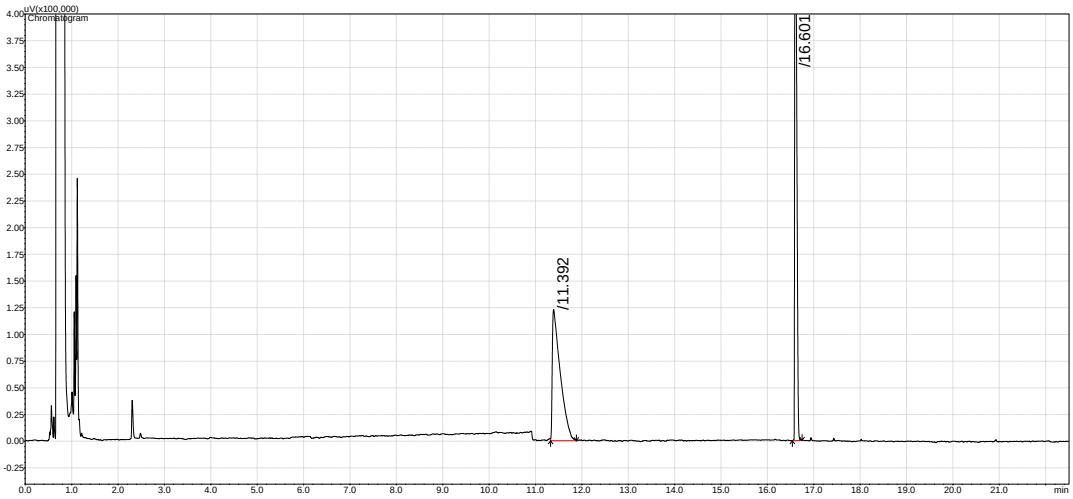
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,367	57565,5	1,72
11,677	68999,7	2,06
16,599 (Bifenila)	1836703,7	54,85
Subprodutos	1385127,2	41,37

- NPUS 4,5 % Pd Tempo 3 h



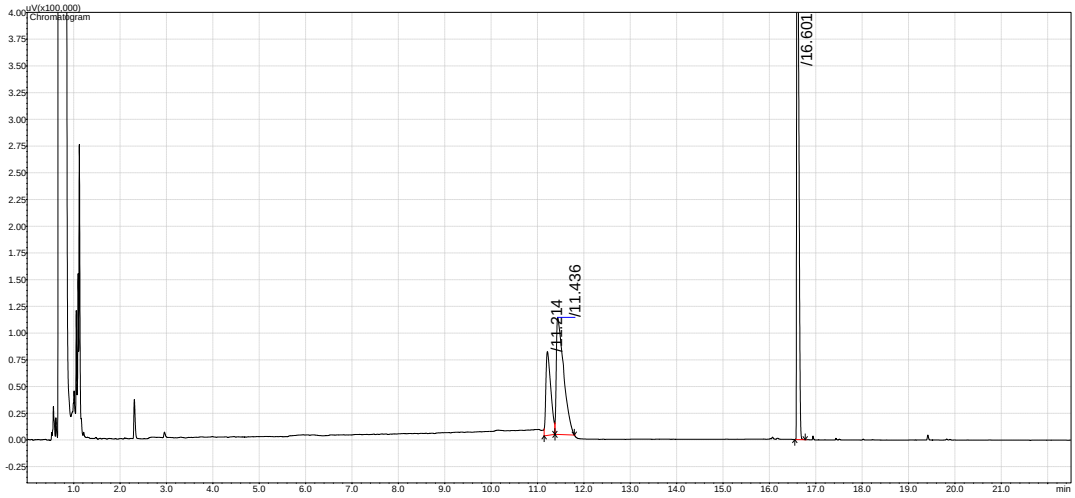
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,380	22053,1	0,64
11,679	13410,4	0,39
16,599 (Bifenila)	1883626,3	54,81
Subprodutos	1517690,1	44,16

- NPUS 6 % Pd Tempo inicial



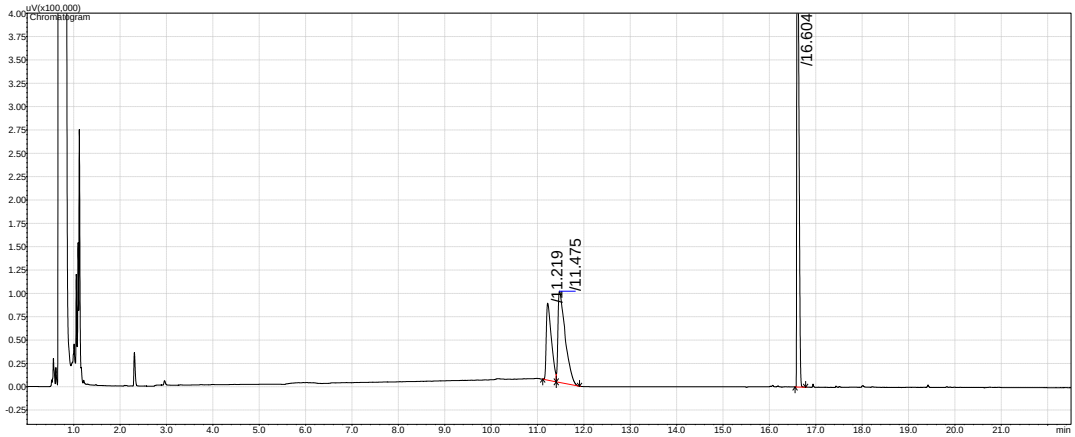
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,392	1467843,6	46,27
16,601 (Bifenila)	1704823,2	53,73

- NPUS 6 % Pd Tempo 30 min



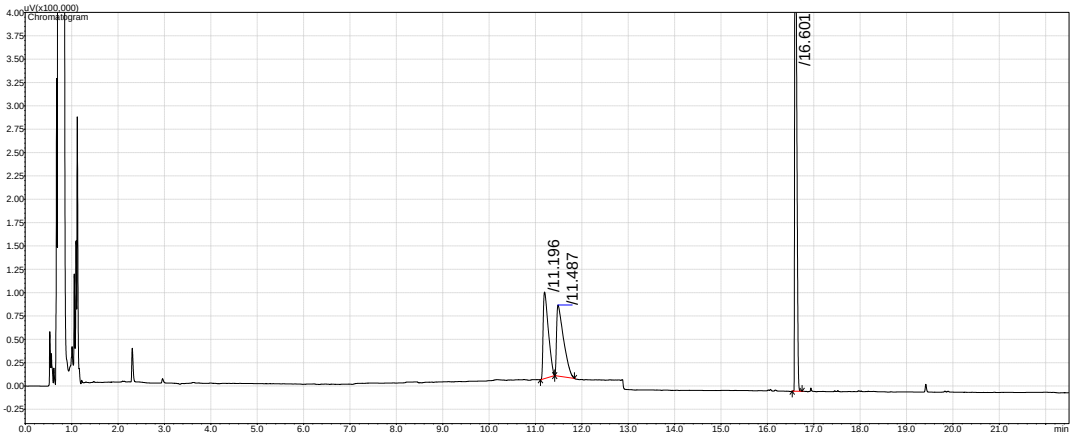
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,214	581350,4	16,24
11,436	1198857,0	33,49
16,601 (Bifenila)	1799176,9	50,27

- NPUS 6 % Pd Tempo 1 h



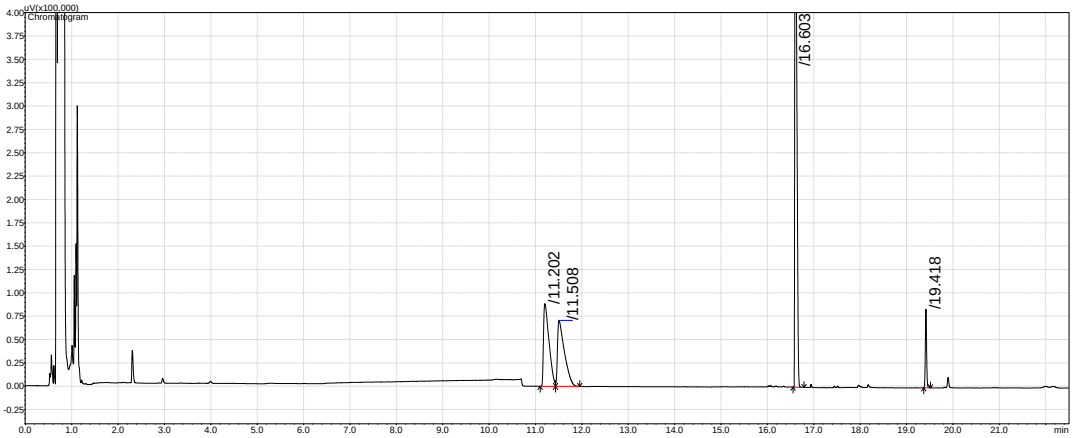
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,219	632884,3	18,51
11,475	1057097,8	30,92
16,604 (Bifenila)	1728566,1	50,56

- NPUS 6 % Pd Tempo 1h30



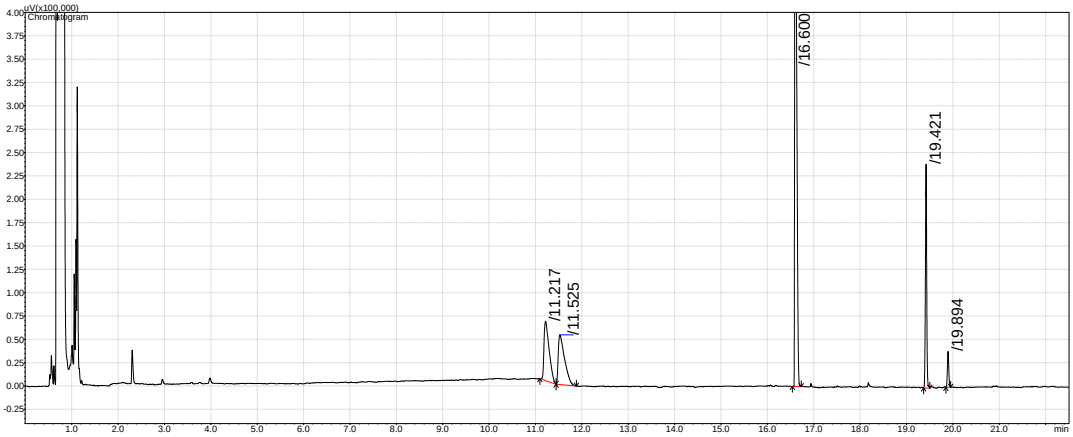
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,196	722616,6	22,33
11,487	792545,1	24,49
16,601 (Bifenila)	1720844,0	53,18

- NPUS 6 % Tempo 2 h



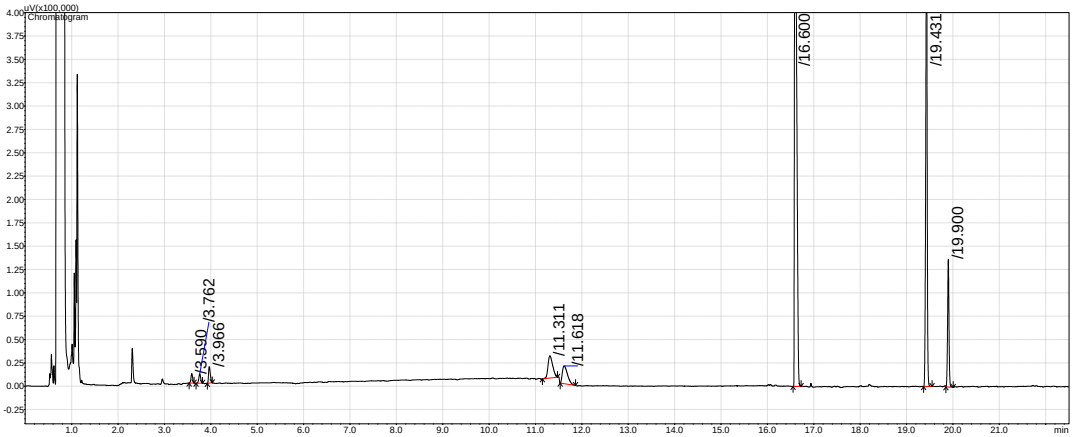
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,202	735534,6	21,53
11,508	738615,0	21,62
16,603 (Bifenila)	1784136,3	52,22
Subprodutos	158537,7	4,64

- NPUS 6 $ Tempo 2h30



Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,217	488385,0	14,75
11,525	507441,3	15,33
16,600 (Bifenila)	1776916,1	53,67
Subprodutos	53792,6	16,25

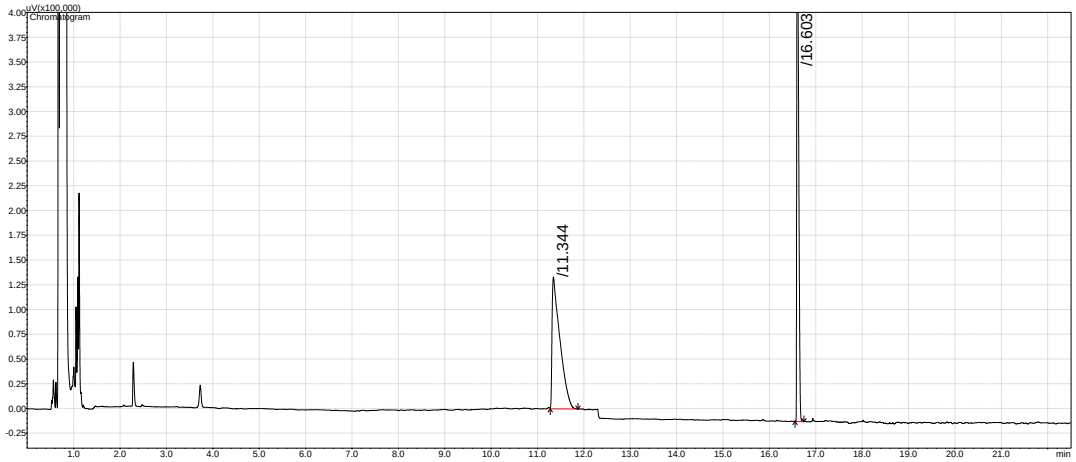
- NPUS 6 % Pd Tempo 3 h



Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,311	167765,2	4,45
11,618	147364,5	3,91
16,600 (Bifenila)	1994475,1	52,96
Subprodutos	1456750	38,68

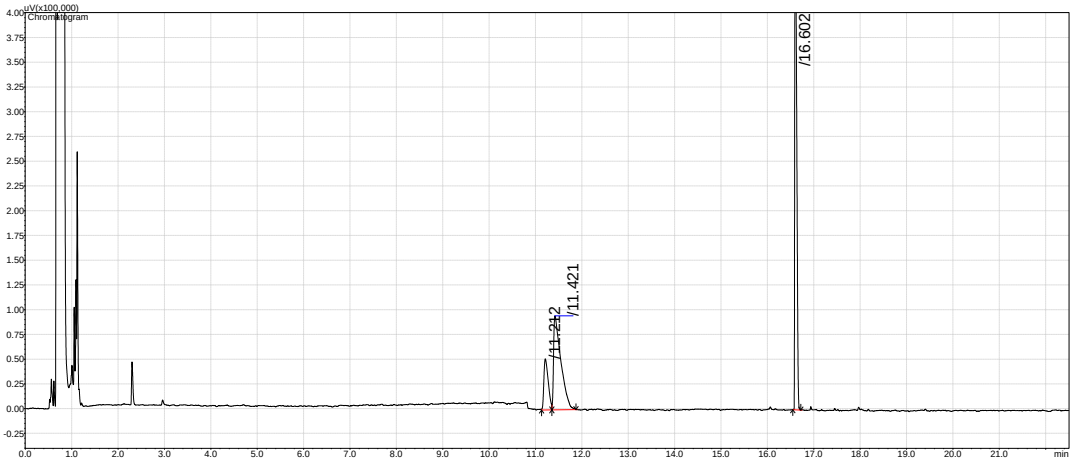
Racemização NPUSAO

- NPUSAO 3 % Pd Tempo inicial



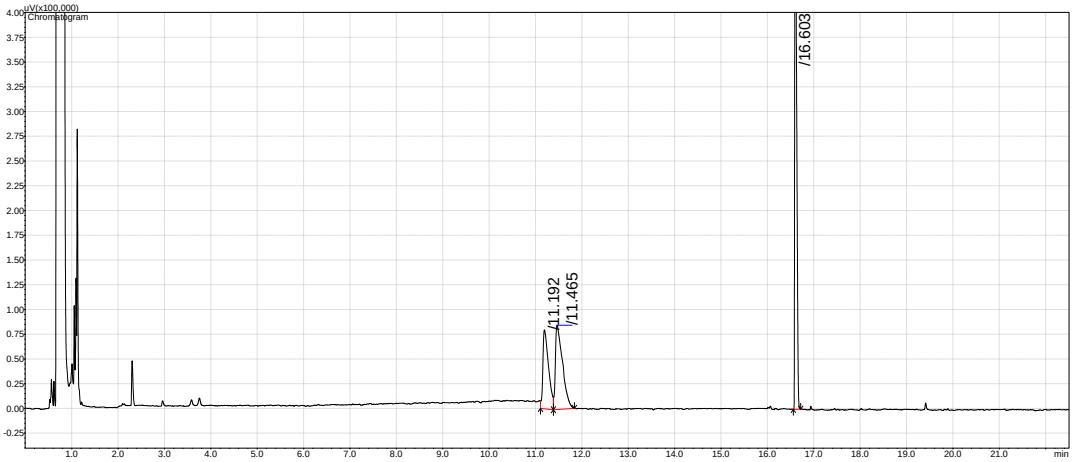
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,344	1584377,7	51,30
16,603 (Bifenila)	1504285,5	48,70

- NPUSAO 3 % Pd Tempo 30 min



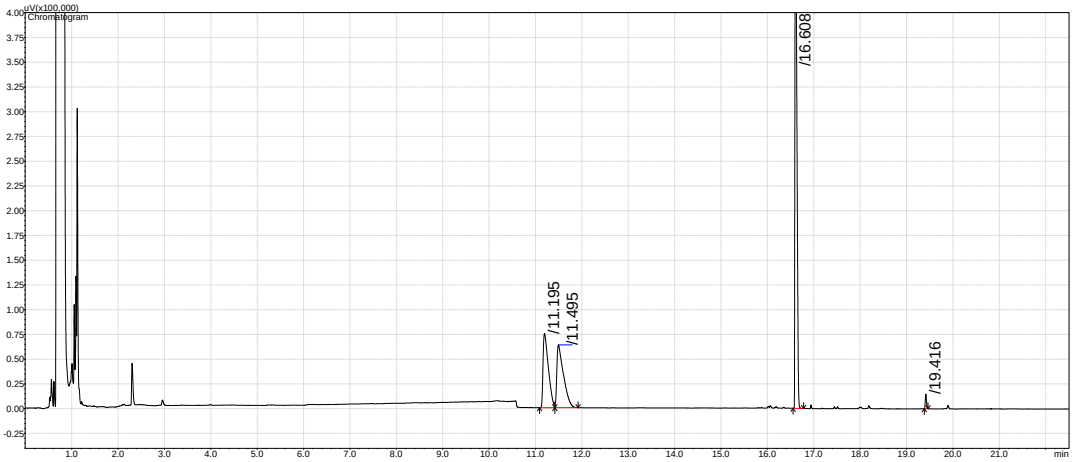
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,212	338875,3	11,61
11,421	1047254,3	35,87
16,602 (Bifenila)	1533350,6	52,52

- NPUSAO 3 % Tempo 1 h



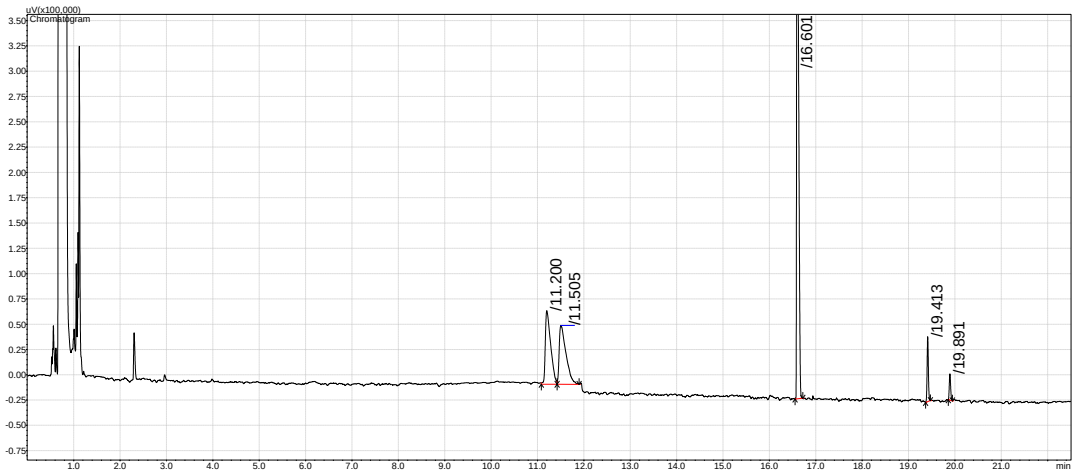
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,192	681774,1	21,22
11,465	916154,5	28,51
16,603 (Bifenila)	1615044,9	50,27

- NPUSAO 3 % Pd Tempo 1h30



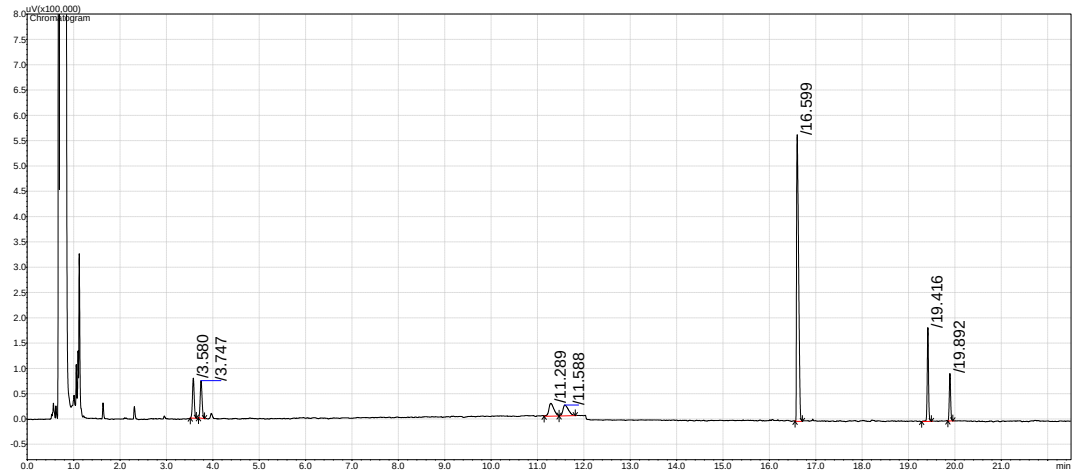
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,195	599562,8	21,36
11,495	633603	22,57
16,608 (Bifenila)	1547010,2	55,11
Subproduto	27123,1	0,97

- NPUSAO 3 % Pd Tempo 2 h



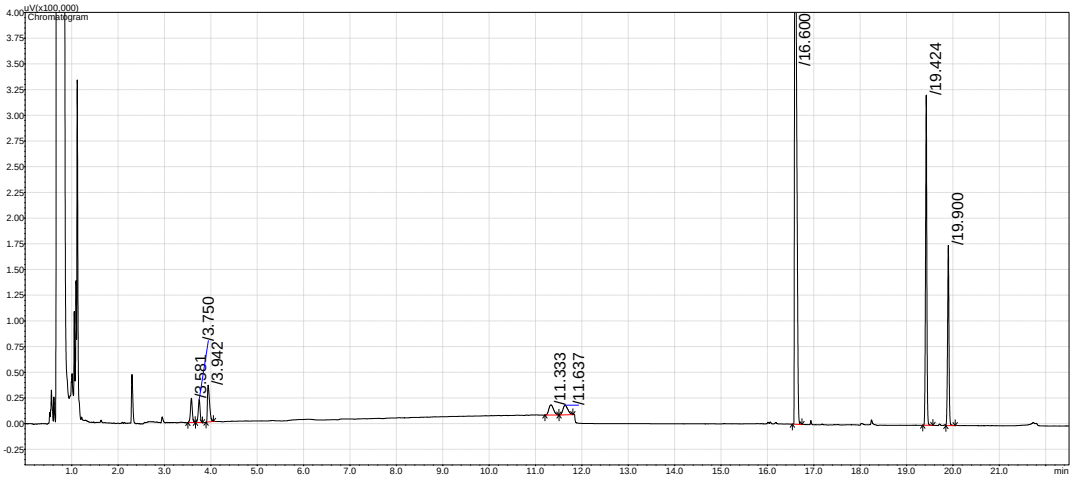
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,200	587165,4	19,31
11,505	596014,0	19,60
16,601 (Bifenila)	1684003,3	55,37
Subproduto	174274,2	5,73

- NPUSAO 3 % Pd Tempo 2h30



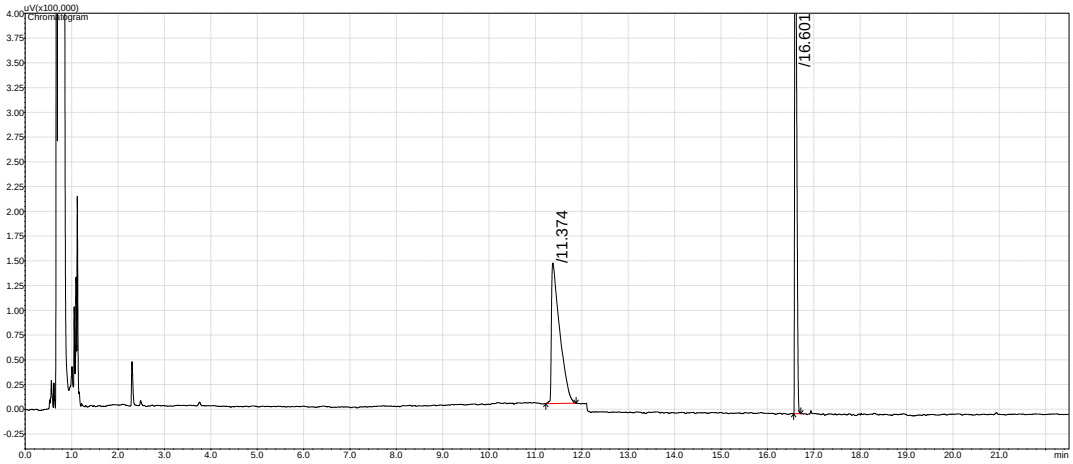
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,289	194216,1	6,33
11,588	176959,1	5,77
16,599 (Bifenila)	1732647,5	56,50
Subproduto	962717,3	31,39

- NPUSAO 3 % Pd Tempo 3 h



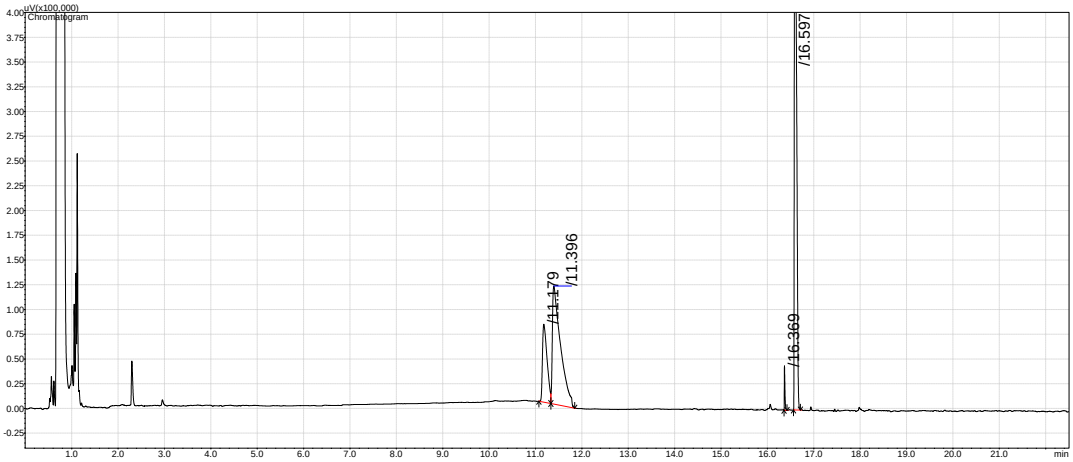
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,333	70227,4	2,22
11,637	68507,0	2,17
16,600 (Bifenila)	1803573,8	57,02
Subproduto	1220891,2	38,60

- NPUSAO 4,5 % Pd Tempo inicial



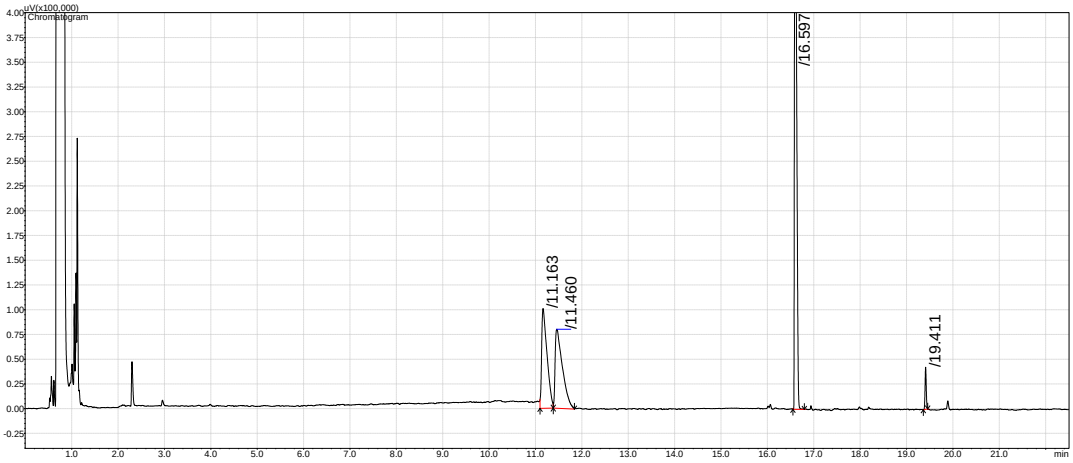
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,374	1763396,4	50,89
16,601 (Bifenila)	1701672,6	49,11

- NPUSAO 4,5 % Pd Tempo 30 min



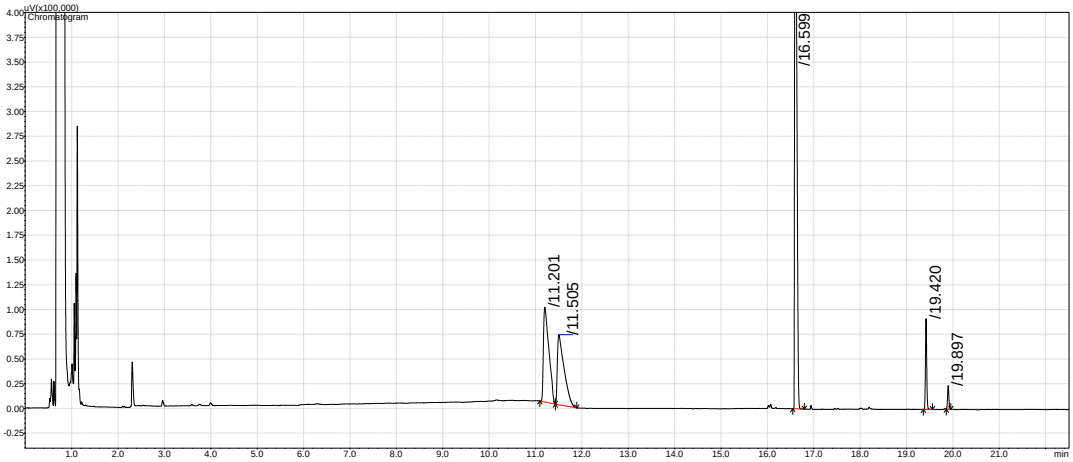
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,179	547502,6	13,60
11,396	1462506,9	36,33
16,597 (Bifenila)	1972061,9	48,99
Subprodutos	43562,0	1,08

- NPUSAO 4,5 % Pd Tempo 1 h



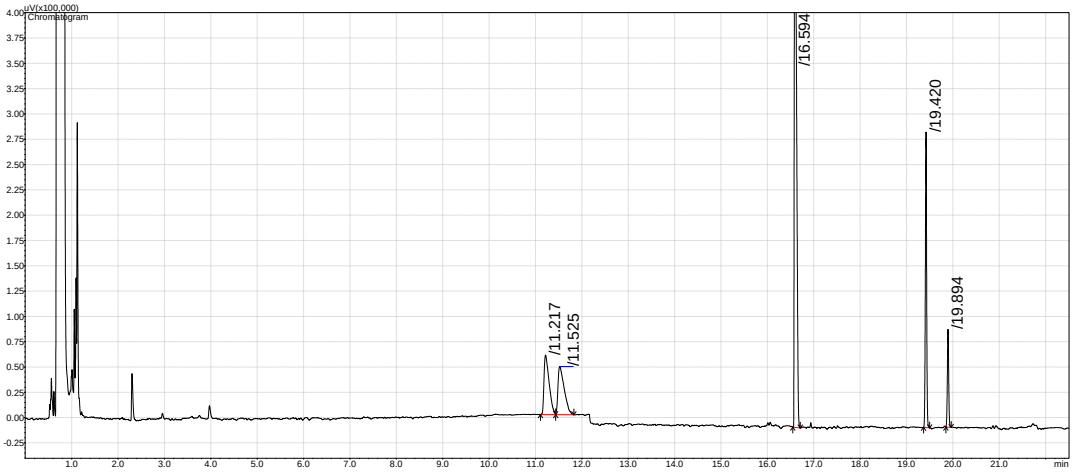
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,163	814037,0	21,92
11,460	876523,5	23.60
16,597 (Bifenila)	1946992,7	52,42
Subprodutos	76661,7	2,06

- NPUSAO 4,5 % Pd Tempo 1h30



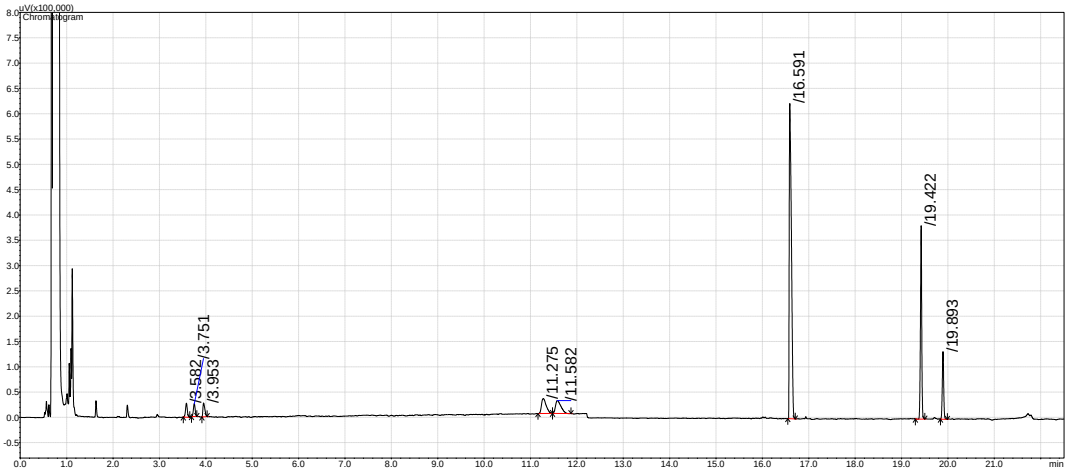
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,201	784916,2	21,35
11,505	713771,4	19,41
16,599 (Bifenila)	1957009,0	53,23
Subprodutos	221129,5	6,01

- NPUSAO 4,5 % Pd Tempo 2 h



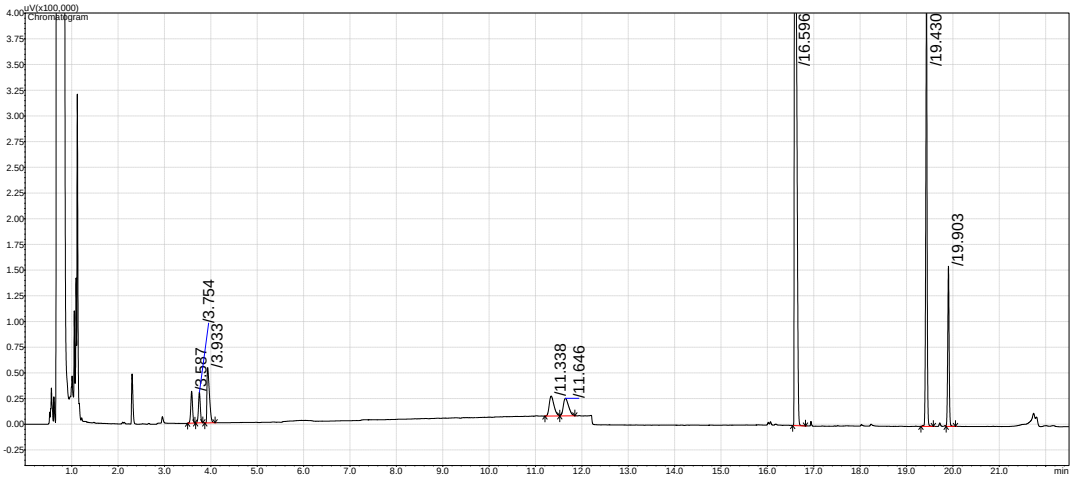
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,217	451456,5	12,36
11,525	445207,6	12,19
16,594 (Bifenila)	2007305,0	54,94
Subprodutos	749484,2	20,51

- NPUSAO 4,5 % Pd Tempo 2h30



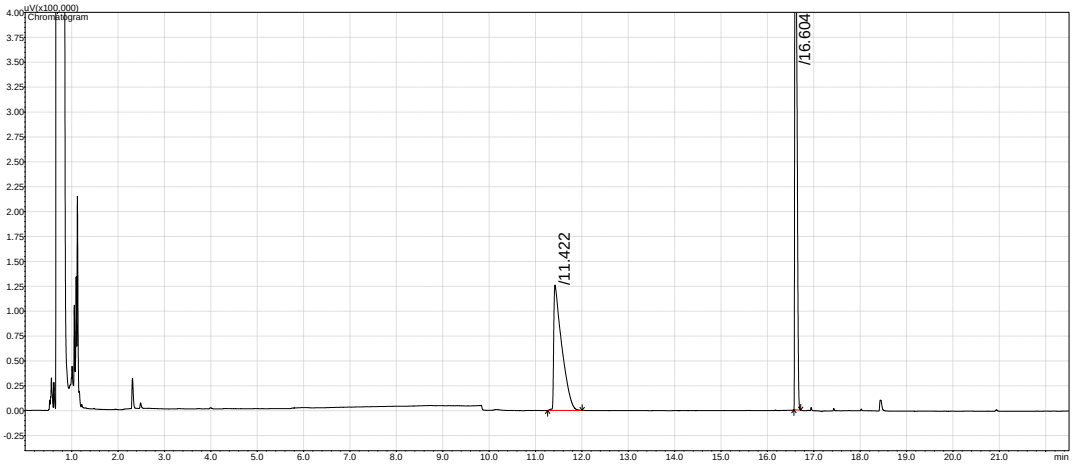
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,275	208161,6	5,67
11,582	206452,3	5,62
16,591 (Bifenila)	2025580,4	55,13
Subprodutos	1234084,3	33,59

- NPUSAO 4,5 % Pd Tempo 3 h



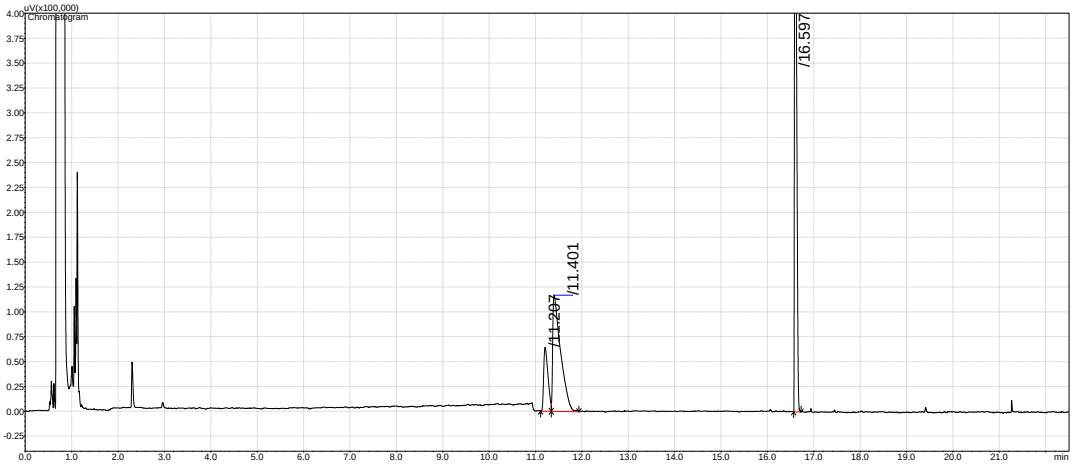
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,338	138722,1	3,46
11,646	136054,4	3,39
16,596 (Bifenila)	2216292,4	55,22
Subprodutos	1522785,6	37,94

- NPUSAO 6 % Pd Tempo inicial



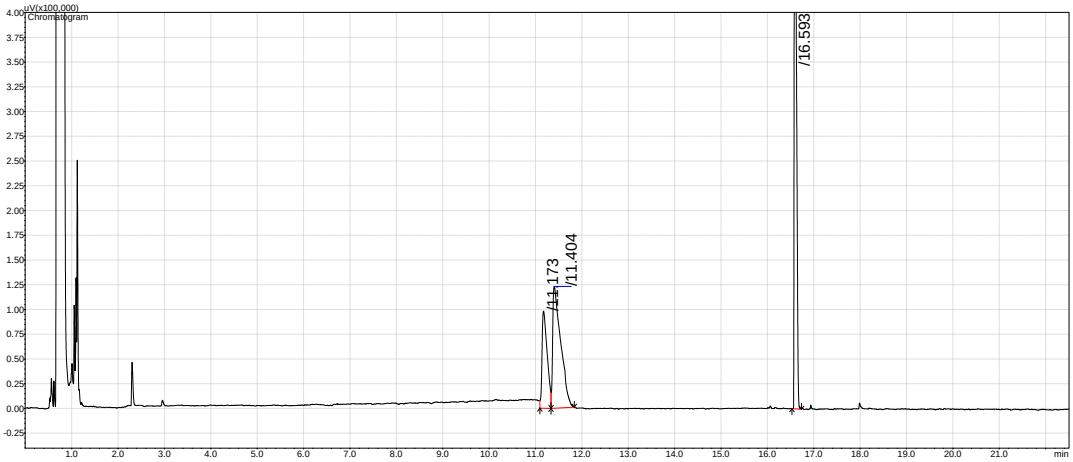
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,422	1520668,8	43,91
16,604 (Bifenila)	1942836,9	56,09

- NPUSAO 6 % Pd Tempo 30 min



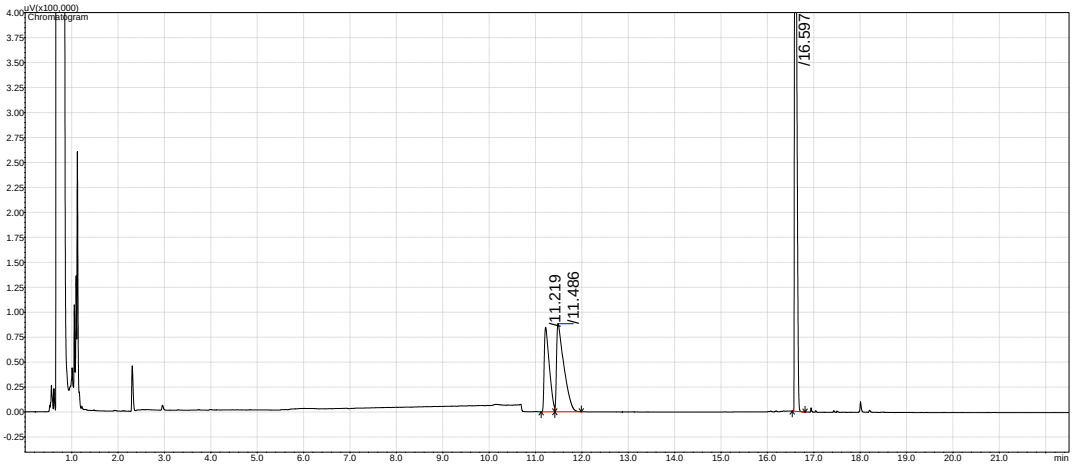
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,207	413060,6	11,06
11,401	1377064,9	36,87
16,597 (Bifenila)	1944371,9	52,07

- NPUSAO 6 % Pd Tempo 1 h



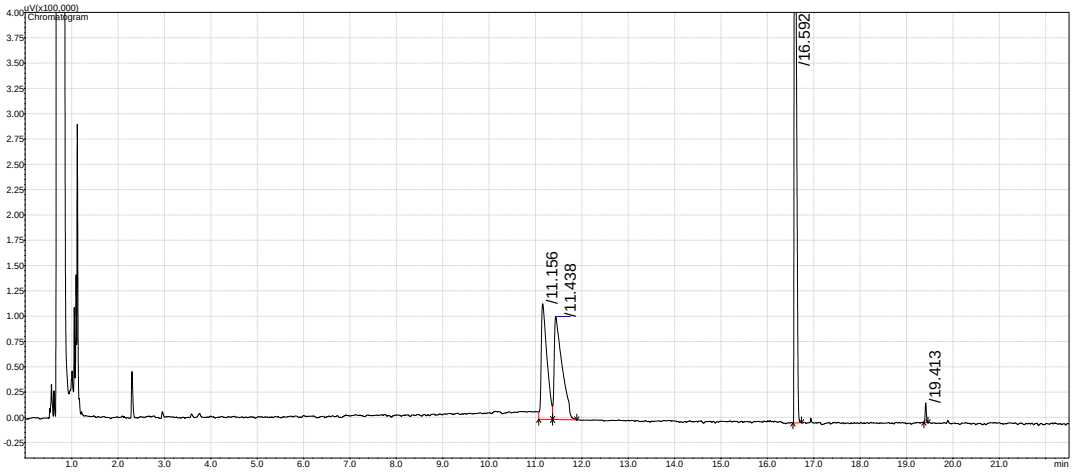
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,219	681776,4	16,13
11,486	1343720,2	31,78
16,597 (Bifenila)	2200911,9	52,08

- NPUSAO 6 % Pd Tempo 1h30



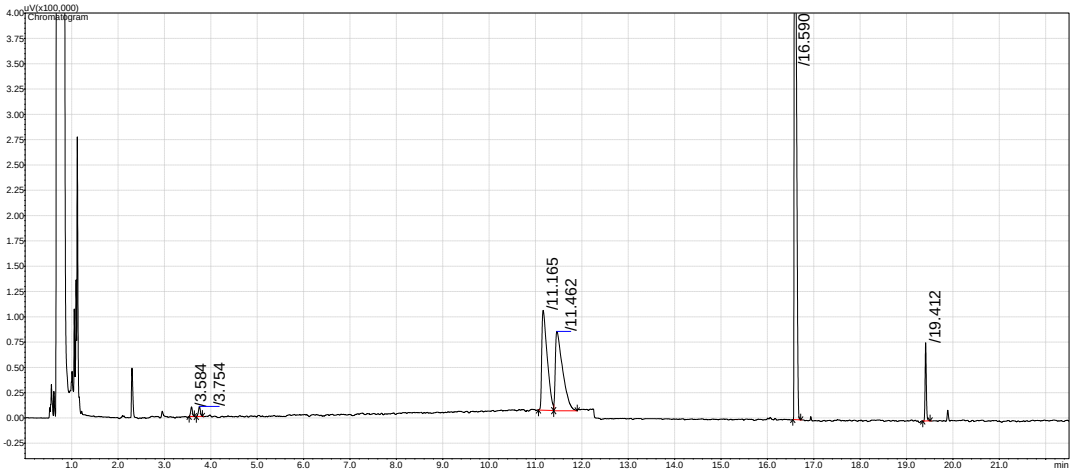
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,219	647647,1	16,95
11,486	971309,5	25,43
16,597 (Bifenila)	2200911,9	57,62

- NPUSAO 6 % Pd Tempo 2 h



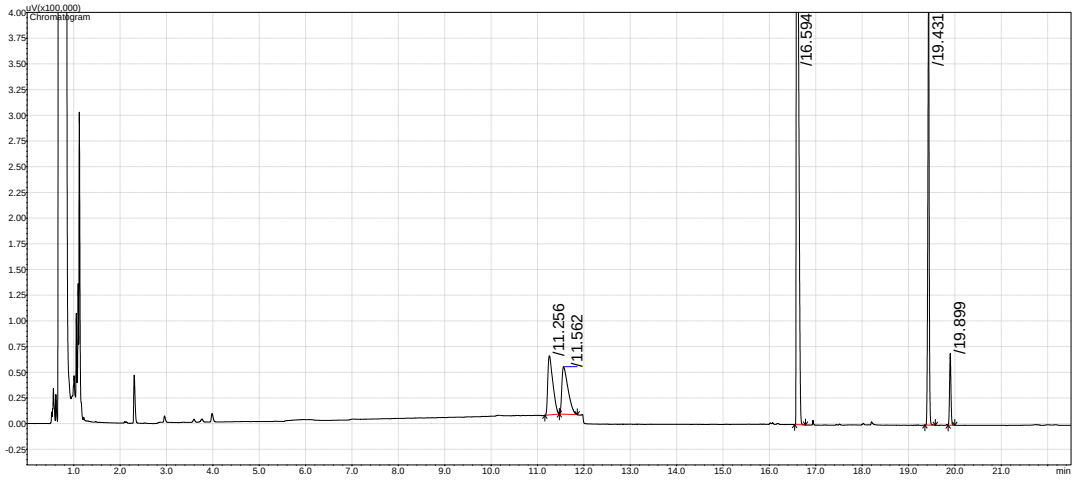
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,156	990109,5	22,43
11,438	1205131,3	27,30
16,592 (Bifenila)	2185072,4	49,47
Subprodutos	35229,7	0,80

- NPUSAO 6 % Pd Tempo 2h30



Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,165	807669,2	20,48
11,462	858083,7	21,75
16,590 (Bifenila)	2084722,7	52,85
Subprodutos	194000,9	4,92

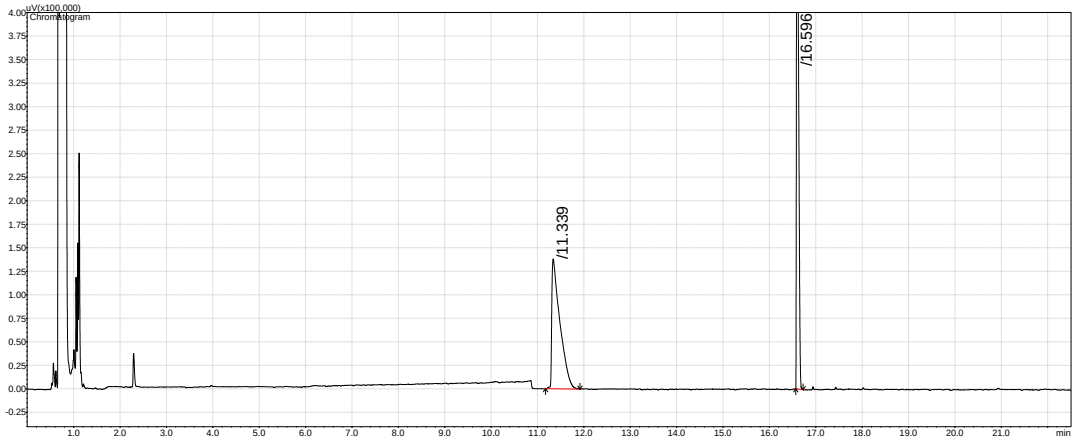
- NPUSAO 6 % Pd Tempo 3 h



Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,256	434413,4	10,58
11,562	425408,1	10,36
16,594 (Bifenila)	2248194,2	54,76
Subprodutos	997453	24,30

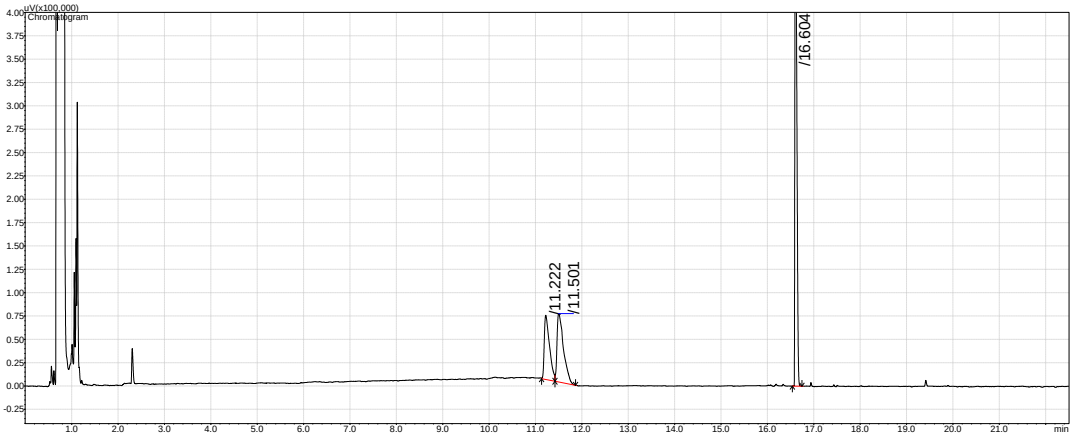
Racemização Sílica

- Sílica 3 % Pd Tempo inicial



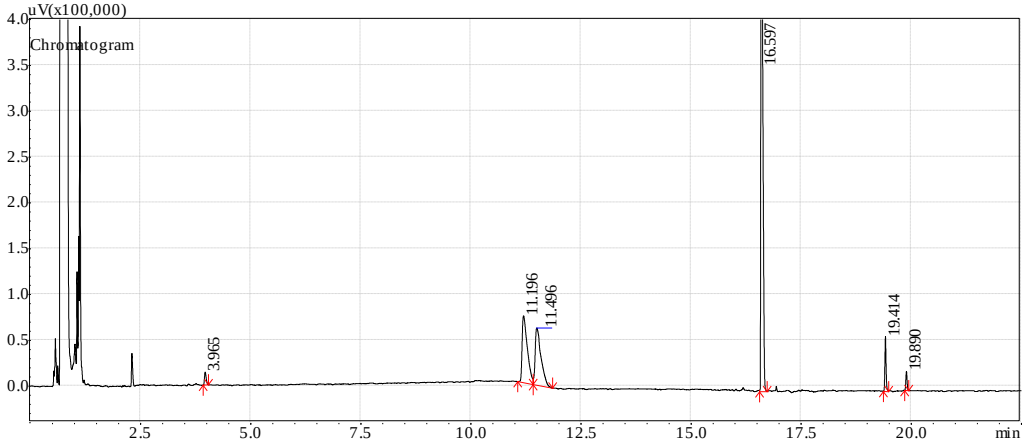
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,339	1695801,1	47,72
16,596 (Bifenila)	1857553,0	52,28

- Sílica 3 % Pd Tempo 30 min



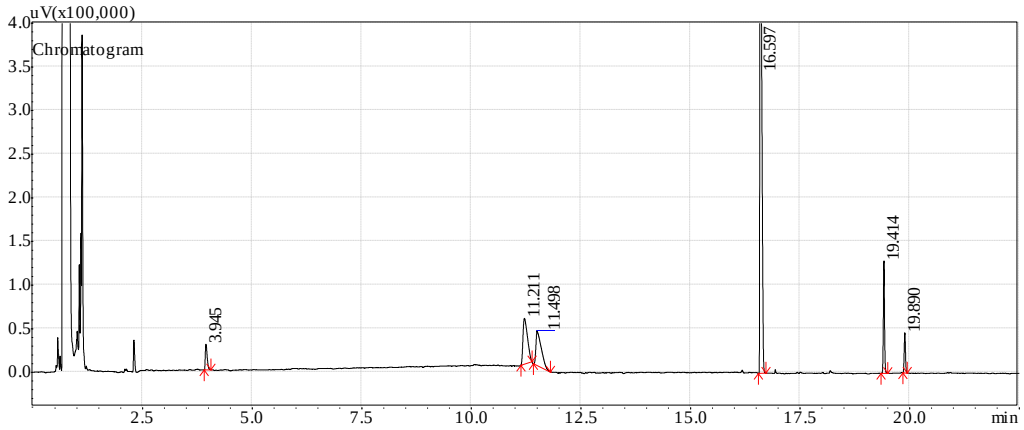
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,222	540050,8	19,20
11,501	712429,3	25,33
16,604 (Bifenila)	1559979,7	55,47

- Sílica 3 % Pd Tempo 1 h



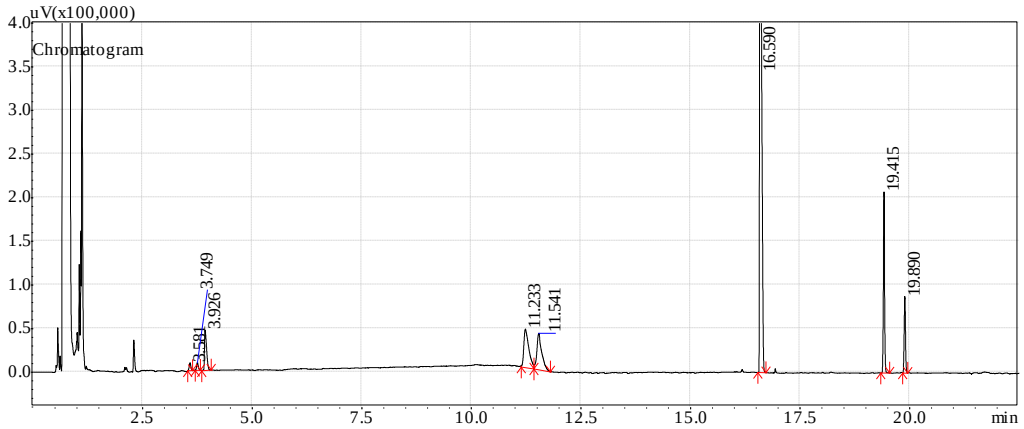
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,196	606234,1	18,82
11,496	581891	18,06
16,597 (Bifenila)	1837878,6	57,05
Subprodutos	195734,2	6,08

- Sílica 3 % Pd Tempo 1h30



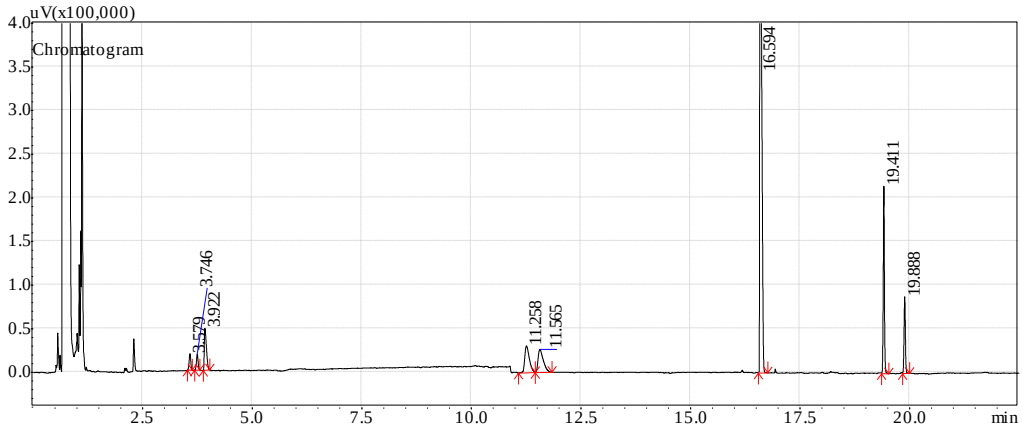
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,211	375473	12,78
11,498	335894,8	11,43
16,597 (Bifenila)	1807257	61,50
Subprodutos	419836,6	14,29

- Sílica 3 % Pd Tempo 2 h



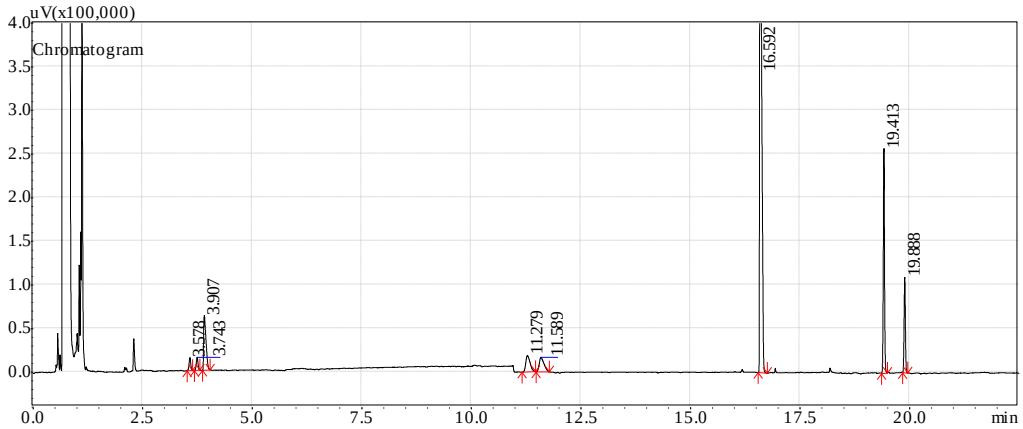
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,233	349038,4	9,90
11,541	325944,6	9,24
16,590 (Bifenila)	2070901,7	58,71
Subprodutos	781155,6	22,15

- Sílica 3 % Pd Tempo 2h30



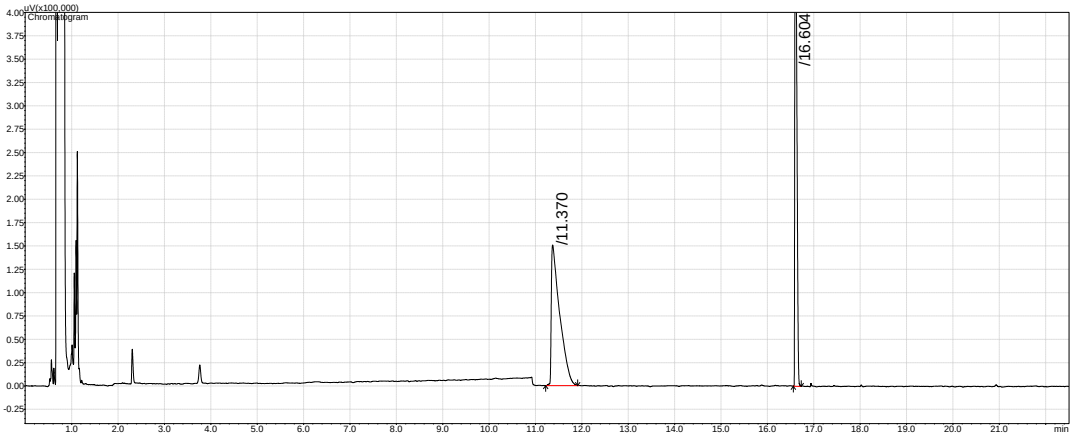
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,258	234440,2	7,33
11,565	224248,9	7,01
16,594 (Bifenila)	1894282,7	59,23
Subprodutos	845379,6	26,43

- Sílica 3 % Pd Tempo 3 h



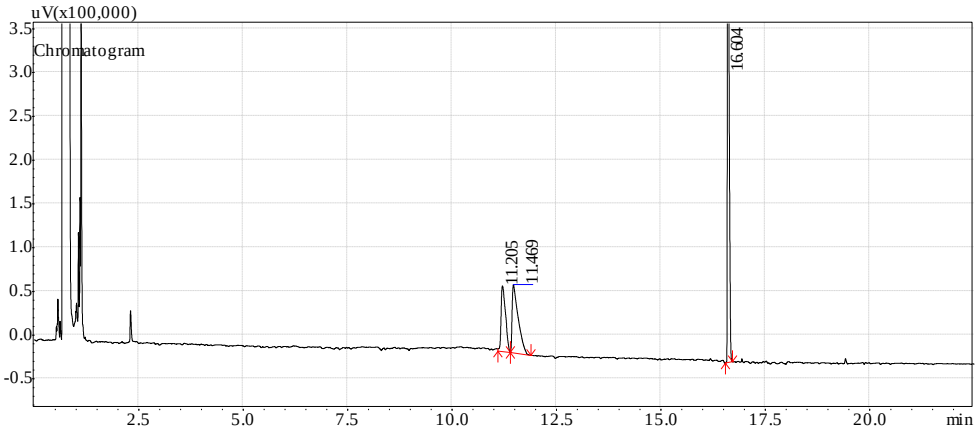
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,279	129165,8	3,92
11,589	125212	3,80
16,592 (Bifenila)	2005927,9	60,83
Subprodutos	1037055,6	31,45

- Sílica 4,5 % Pd Tempo inicial



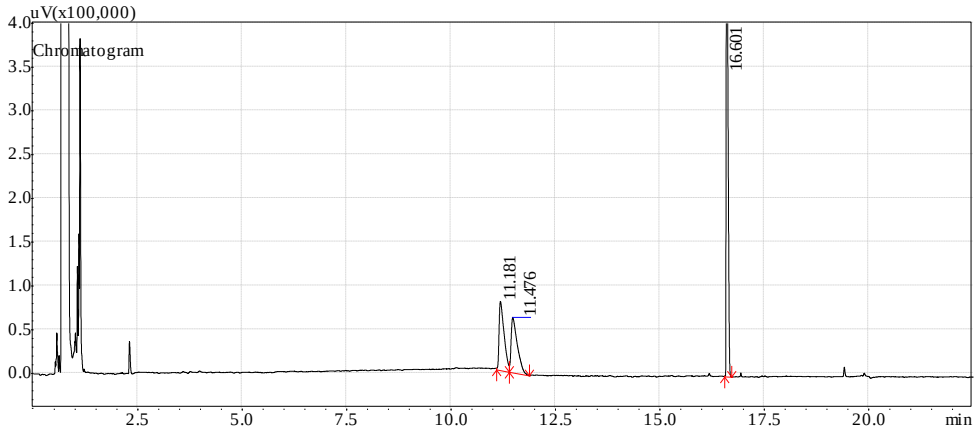
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,370	1898232,6	52,93
16,604 (Bifenila)	1687888,0	47,07

- Sílica 4,5 % Pd Tempo 30 min



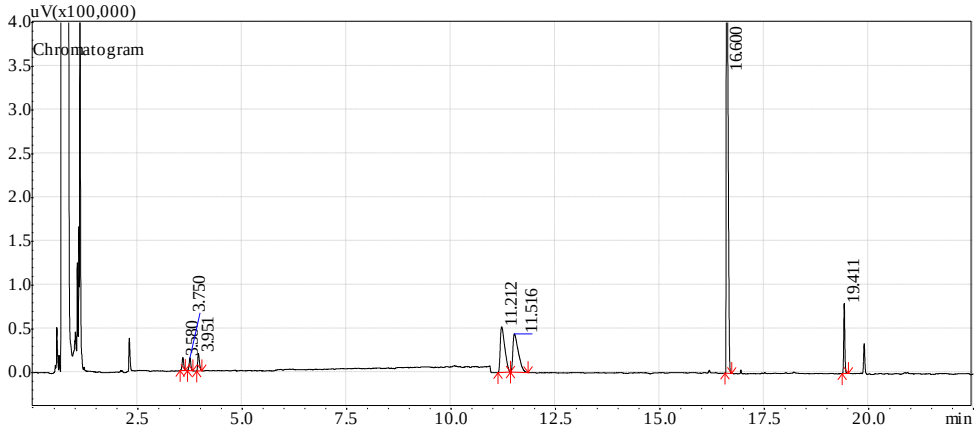
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,205	556881,2	18,73
11,469	789516,1	26,55
16,604 (Bifenila)	1627322,8	54,72

- Sílica 4,5 % Pd Tempo 1 h



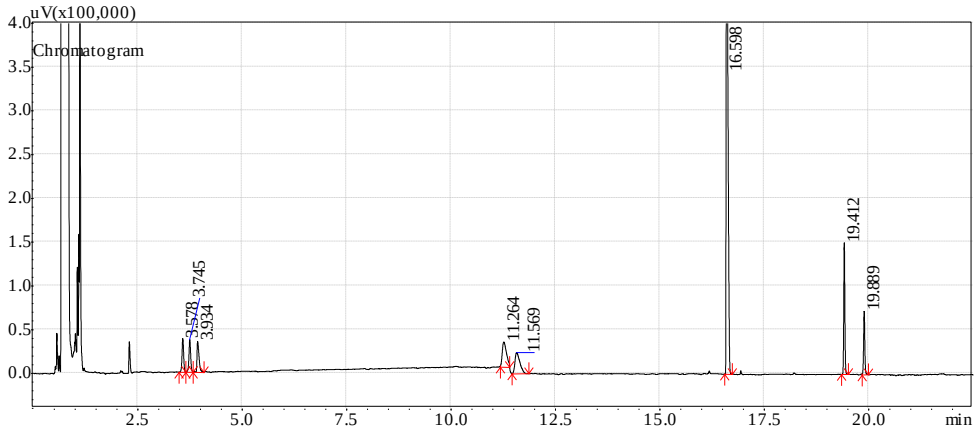
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,181	662652,0	22,01
11,476	662163,4	22,00
16,601 (Bifenila)	1685404,6	55,99

- Sílica 4,5 % Pd Tempo 1h30



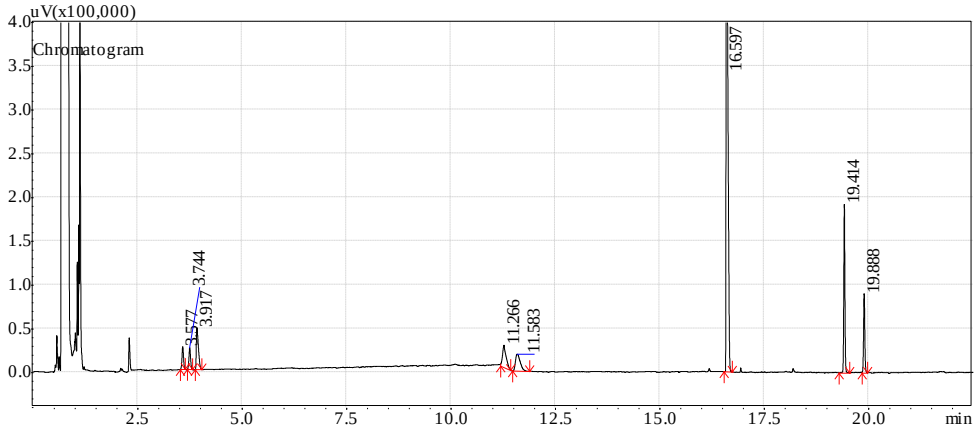
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,212	392618,2	14,55
11,516	393916,6	14,60
16,600 (Bifenila)	1626872,9	60,29
Subprodutos	285035,3	10,56

- Sílica 4,5 % Pd Tempo 2 h



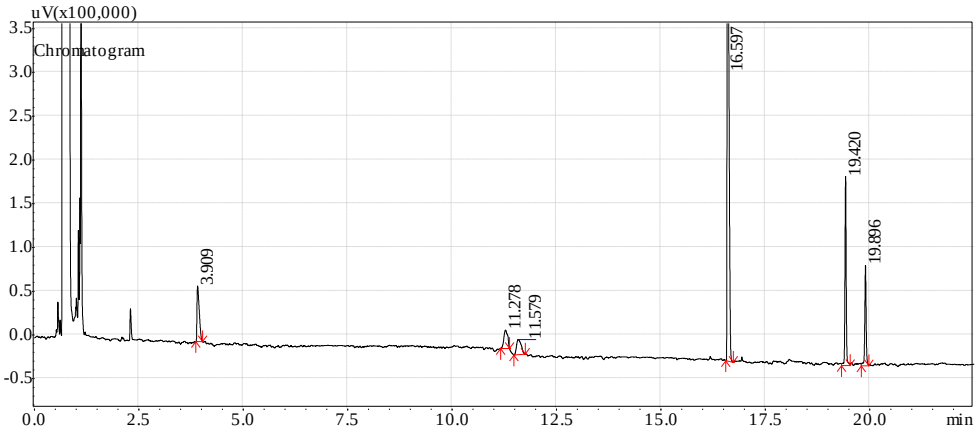
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,264	205189,7	7,22
11,569	206101,9	7,25
16,598 (Bifenila)	1665820,2	58,58
Subprodutos	766617,8	26,96

- Sílica 4,5 % Pd Tempo 2h30



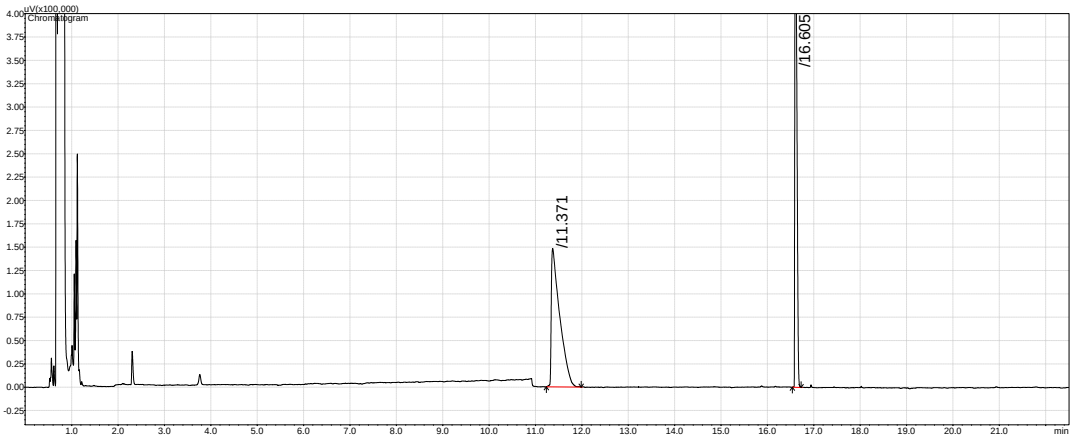
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,266	151471,6	5,26
11,583	155422,5	5,40
16,597 (Bifenila)	1708968,1	59,36
Subprodutos	863262,8	29,98

- Sílica 4,5 % Pd Tempo 3 h



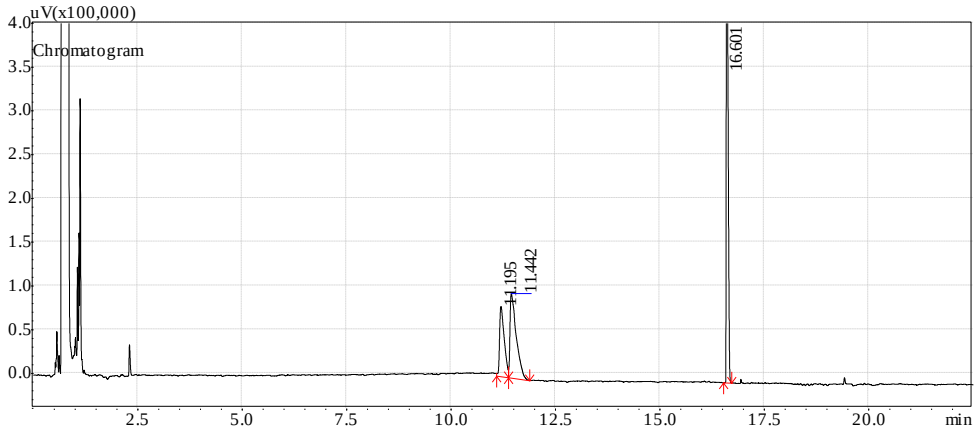
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,278	134926,1	4,54
11,579	133618,2	4,50
16,597 (Bifenila)	1758992,4	59,19
Subprodutos	944213,4	31,77

- Sílica 6 % Pd Tempo inicial



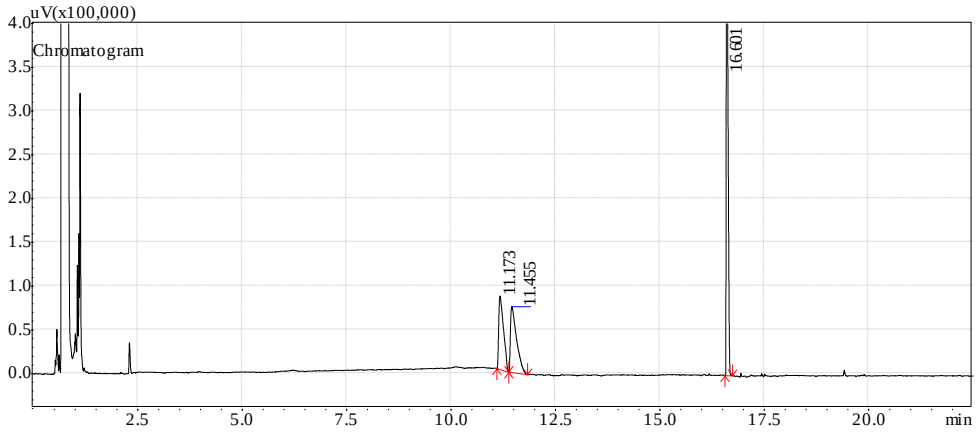
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,371	1879280,8	52,74
16,605 (Bifenila)	1683713,3	47,26

- Sílica 6 % Pd Tempo 30 min



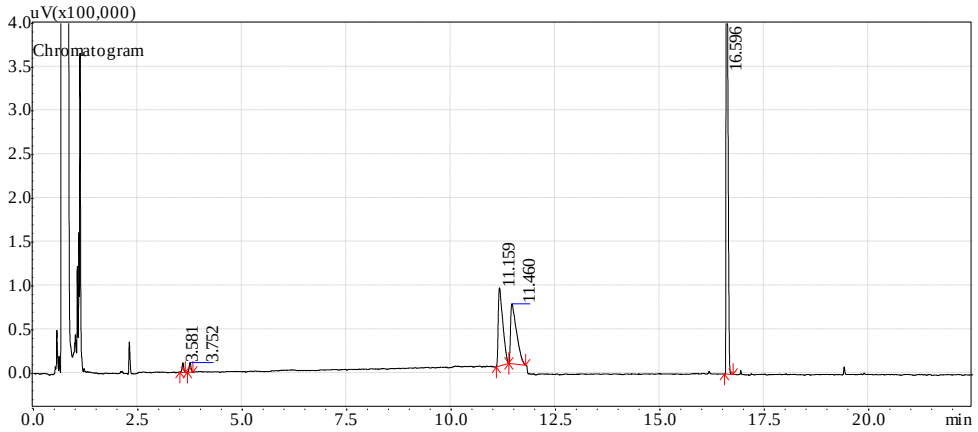
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,195	630781,2	18,97
11,442	1021097,3	30,72
16,601 (Bifenila)	1672437,5	50,31

- Sílica 6 % Pd Tempo 1 h



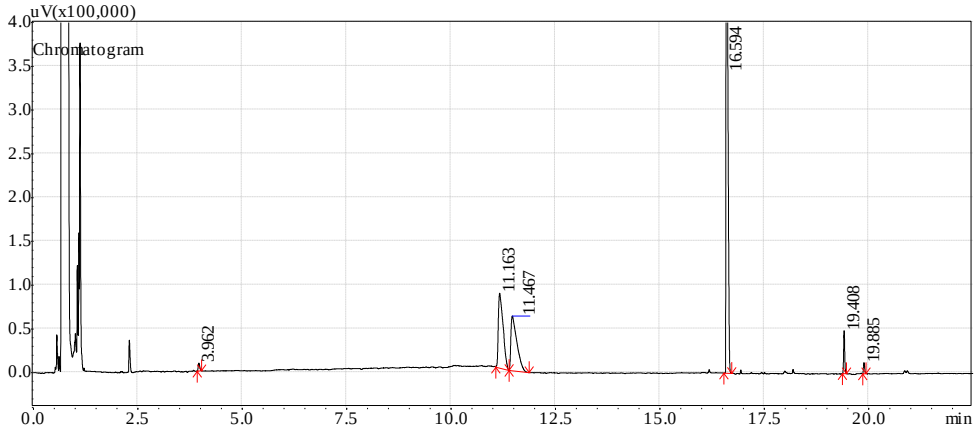
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,173	664931,7	21,71
11,455	774472,0	25,28
16,601 (Bifenila)	1623747,1	53,01

- Sílica 6 % Pd Tempo 1h30



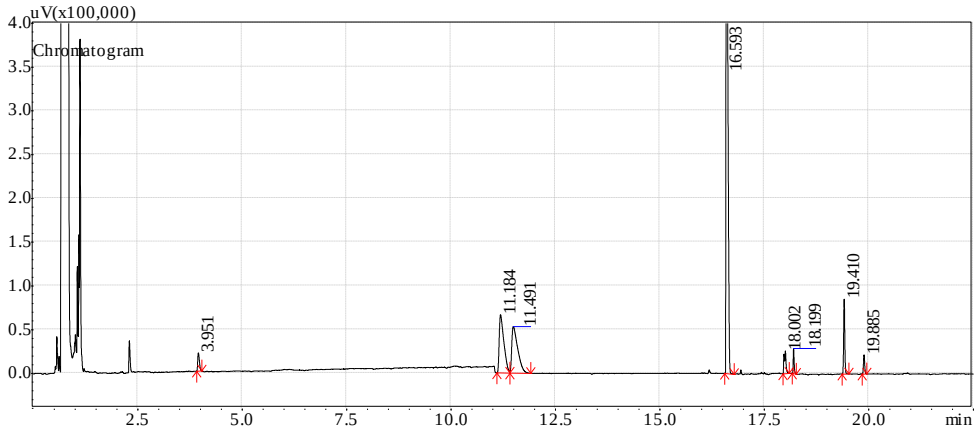
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,159	677532,2	21,40
11,460	682576,2	21,56
16,596 (Bifenila)	1745244,7	55,13
Subprodutos	60412,5	1,91

- Sílica 6 % Pd Tempo 2 h



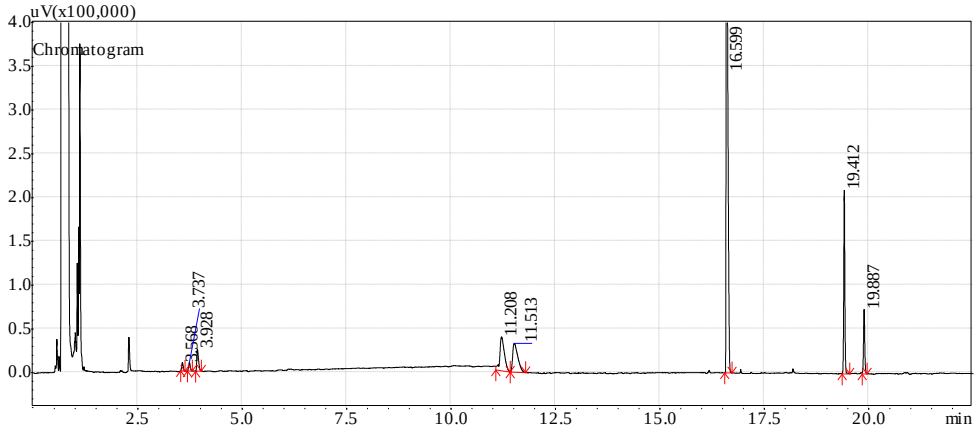
Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,163	677960,5	20,66
11,467	626022,0	19,08
16,594 (Bifenila)	1837758,6	56,00
Subprodutos	139769,7	4,26

- Sílica 6 % Pd Tempo 2h30



Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,184	516353,3	15,51
11,491	536336,6	16,11
16,593 (Bifenila)	1875374,2	56,34
Subprodutos	400615,1	12,04

- Sílica 6 % Pd Tempo 3 h



Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
11,208	295414,7	10,31
11,513	282310,7	9,85
16,599 (Bifenila)	1627664,7	56,80
Subprodutos	660280,6	23,04

Imobilização com glutaraldeído

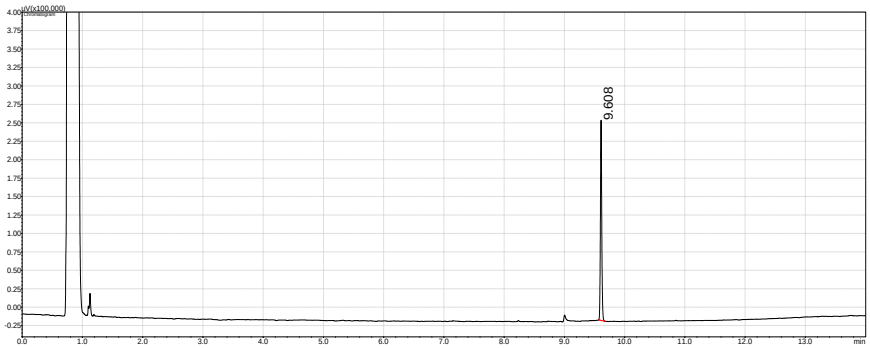
	Inicial	Otimiz. 1	Otimiz. 2	Otimiz. 3	Otimiz. 4
Massa suporte (g)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Vol. Enzima (mL)	0,8	1,6	3,2	1,2	1,6

Vol. Tampão (mL)	4	8	16	4	4
Abs. Branco	0,092	0,092	0,092	0,092	0,092
Abs. T0h	0,124	0,124	0,124	0,126	0,135
Abs. T24h	0,115	0,14	0,154	0,139	0,162
Conc. Enz. Inicial (mg/mL)	0,648	0,648	0,648	0,689	0,871
Conc. Enz. Final (mg/mL)	0,155	0,324	0,419	0,317	0,473
Eficiência de imobilização	76,04%	50,00%	35,42%	53,92%	45,74%
Qtd. Enz. Suporte (mg/g)	2,957	3,889	5,510	2,414	2,789

Atividade hidrolítica

	N435	NPUSAO 4,5% Pd EPI	NPUSAO 4,5% Pd GLU	Otimiz. 1	Otimiz. 2	Otimiz. 3	Otimiz. 4
Vol. Branco 1 (mL)	24,848	24,77	30,981	31,444	30,647	30,525	27,621
Vol. Branco 2 (mL)	24,713	24,626	31,089	31,01	30,804	30,804	27,294
Vol. Branco 3 (mL)	23,557	24,823	-	31,554	30,826	30,587	27,175
Vol. Enz. 1 (mL)	25,142	24,572	30,611	31,632	31,269	30,482	-
Vol. Enz. 2 (mL)	25,072	24,911	31,182	31,489	31,296	30,473	27,75
Vol. Enz. 3 (mL)	24,775	24,928	31,418	31,117	31,159	30,655	27,244
Atividade (U/g)	81	8	5	10	63	0	17

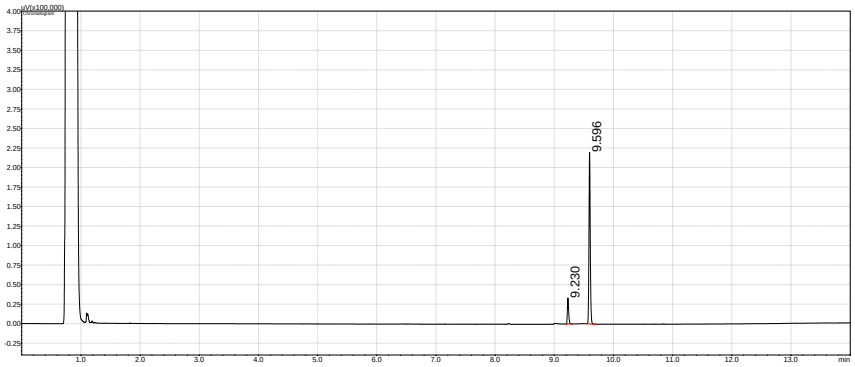
Potencial de conversão de esterificação do ácido palmítico Tempo inicial



Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,608	416977,3	100,00

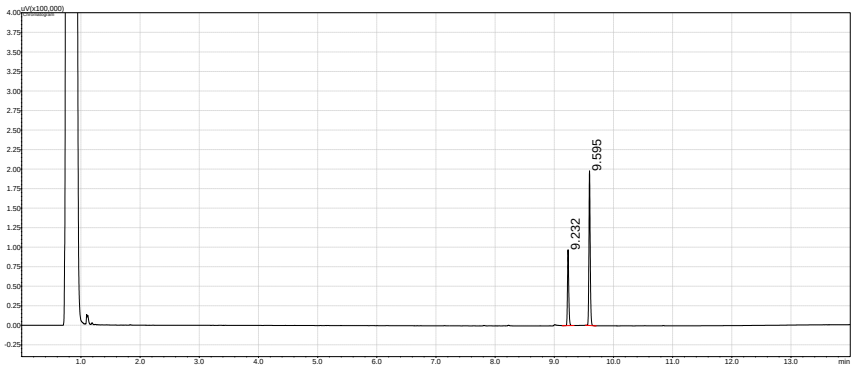
Potencial de conversão de esterificação do ácido palmítico - Inicial EPI

- Tempo 1 h



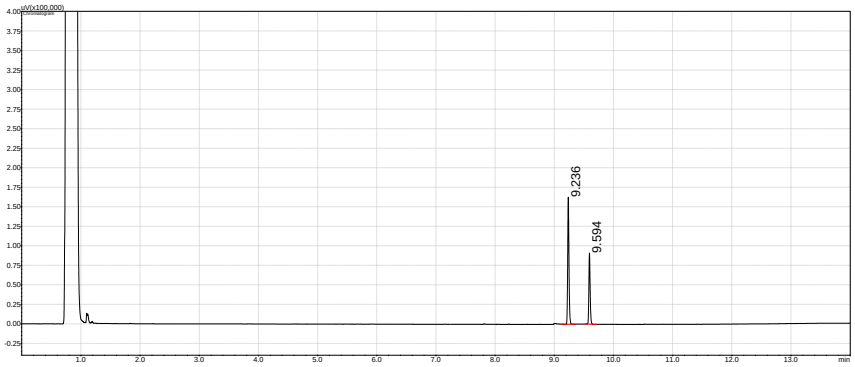
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,596	332926,5	86,82
Éster	9,230	50538,3	13,18

- Tempo 3 h



Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,595	298413,6	67,30
Éster	9,232	145025,6	32,70

- Tempo 6 h

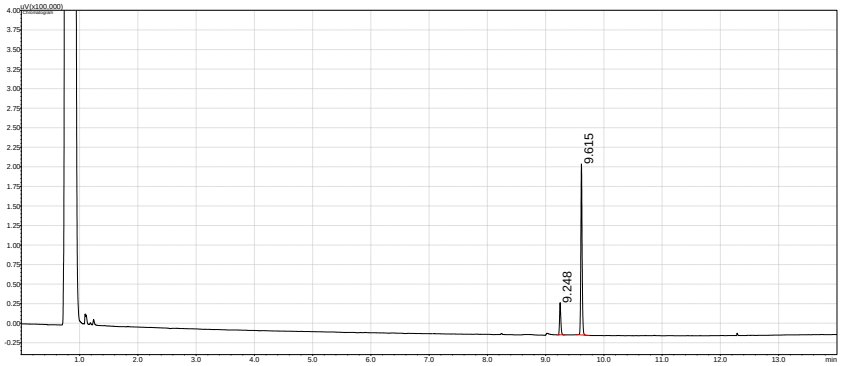


Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)

Ácido palmítico	9,594	137156,7	35,90
Éster	9,236	244844,7	64,10

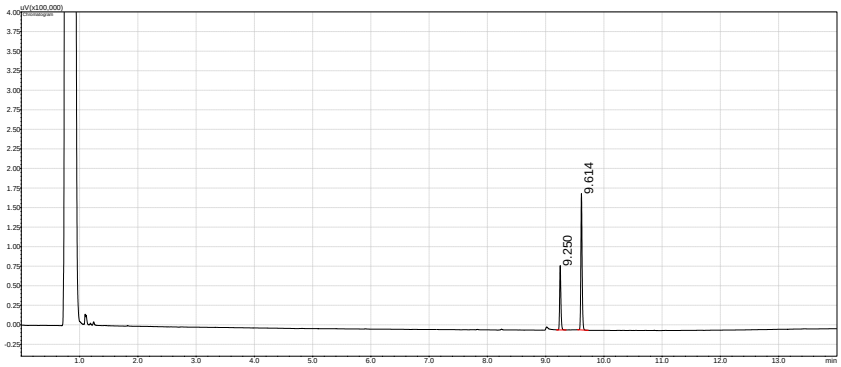
Potencial de conversão de esterificação do ácido palmítico - Inicial GLU

- Tempo 15 min



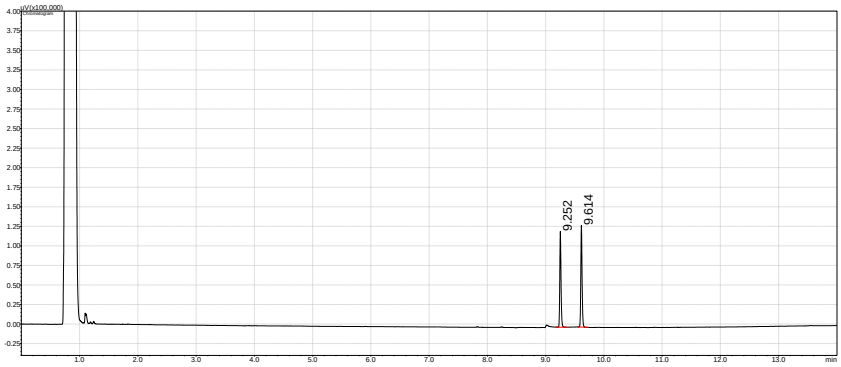
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,615	337815,3	85,38
Éster	9,248	62539,0	15,62

- Tempo 30 min



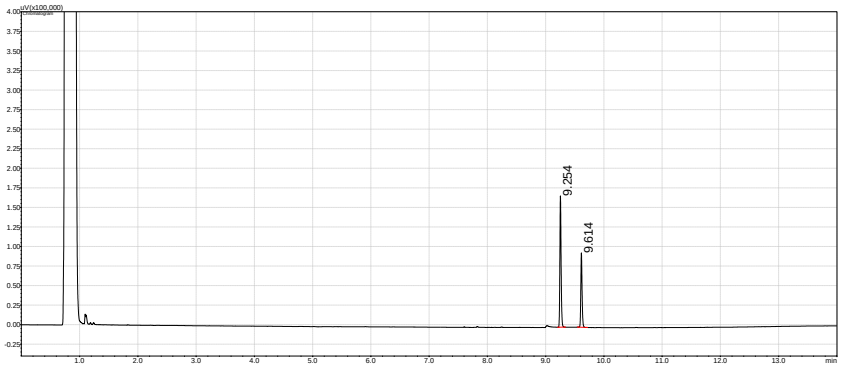
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,614	266393,2	68,30
Éster	9,250	123667,6	31,70

- Tempo 45 min



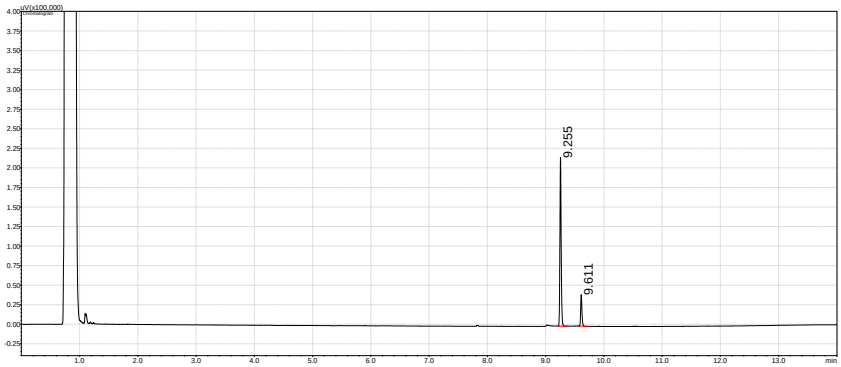
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,614	197412,1	51,93
Éster	9,252	182774,4	48,07

- Tempo 1 h



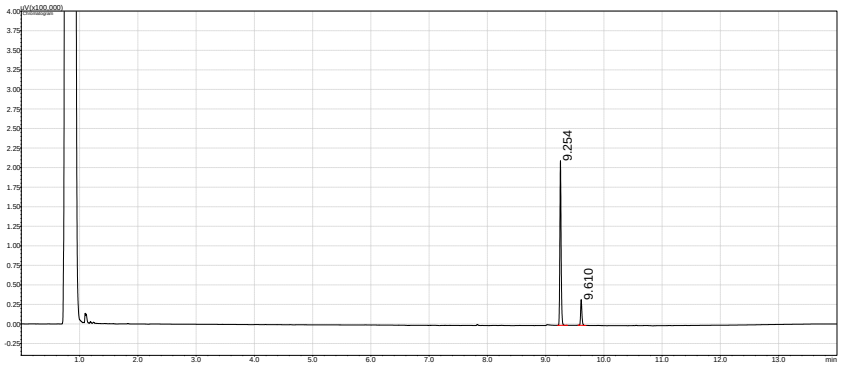
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,614	143757,8	36,79
Éster	9,254	246967,3	63,21

- Tempo 1h30



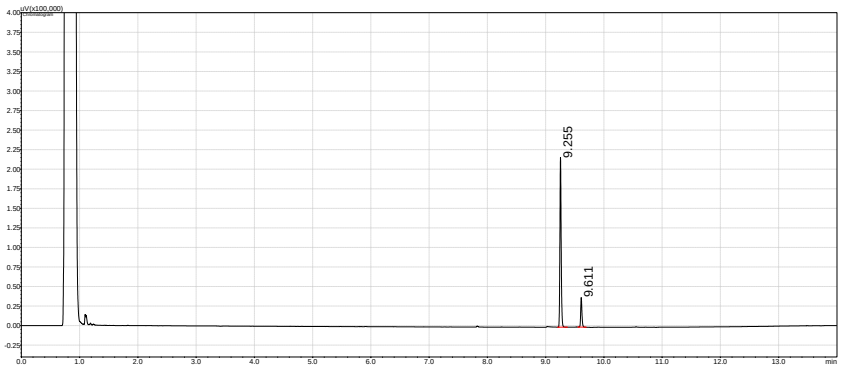
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,611	61936,5	16,10
Éster	9,255	322881,1	83,90

- Tempo 2 h



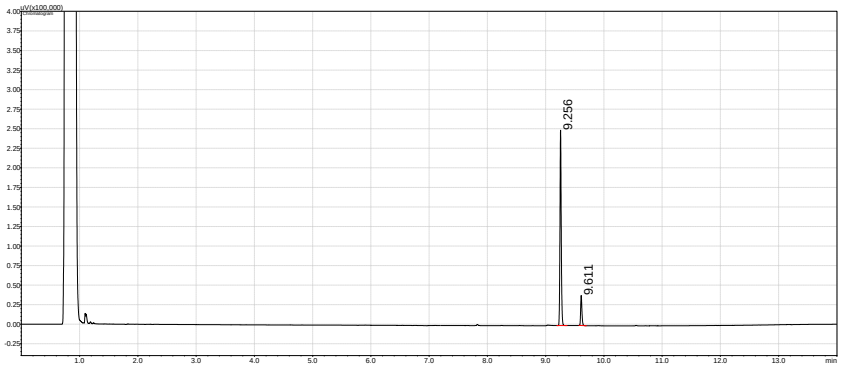
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,610	50551,4	13,78
Éster	9,254	316252,9	86,22

- Tempo 2h30



Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,611	57111,7	14,77
Éster	9,255	329563,9	85,23

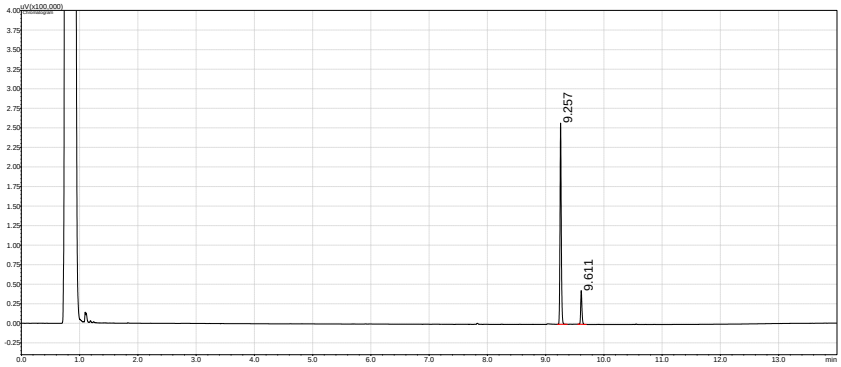
- Tempo 3 h



Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,611	59415,3	13,51

Éster	9,256	380480,6	86,49

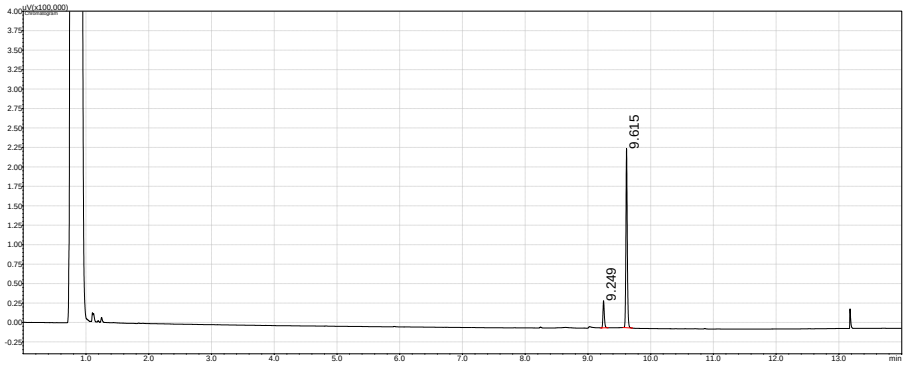
- Tempo 4 h



Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,611	67741,4	16,22
Éster	9,256	349967,0	83,78

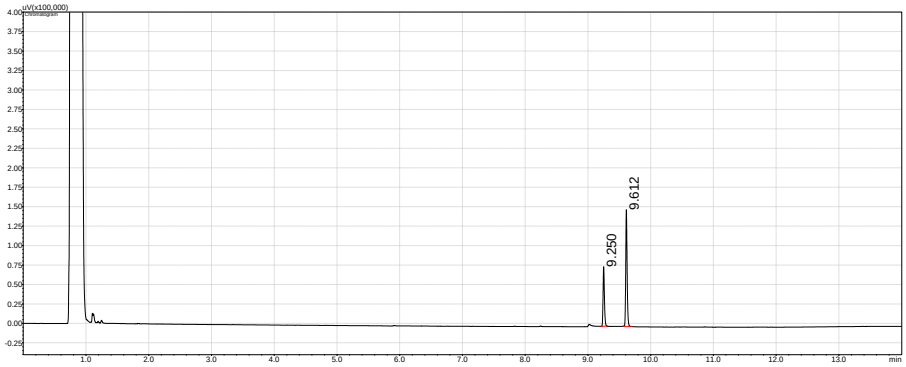
Potencial de conversão de esterificação do ácido palmítico – Otimização 1

- Tempo 15 min



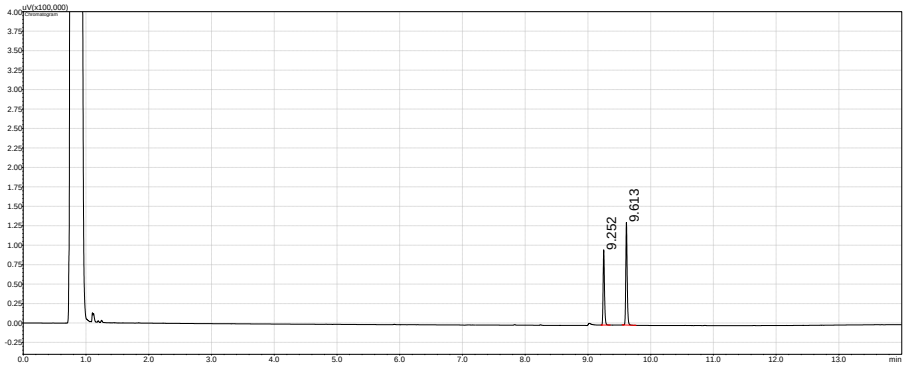
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,615	352429,1	86,92
Éster	9,249	53016,6	13,08

- Tempo 30 min



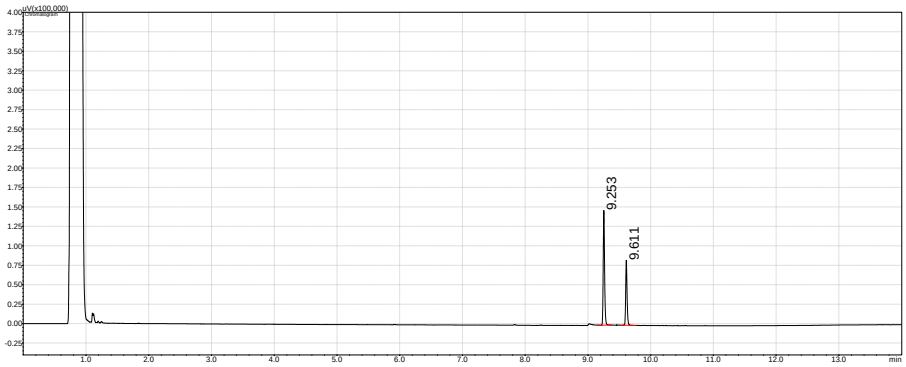
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,612	228329,0	66,61
Éster	9,250	114441,2	33,39

- Tempo 45 min



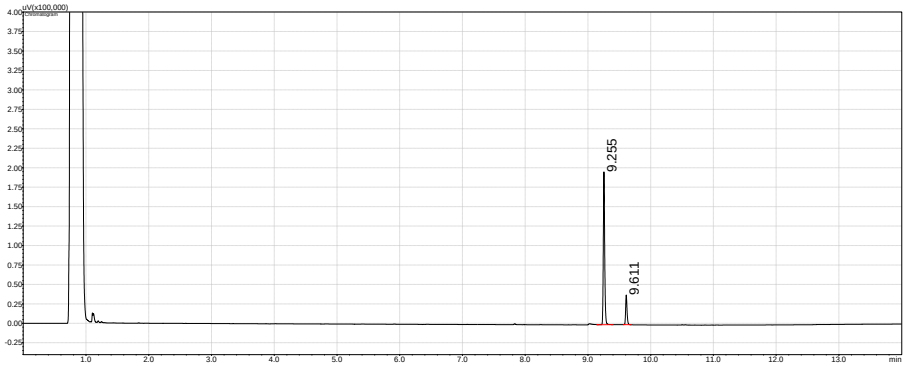
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,613	203730,2	58,16
Éster	9,252	146554,6	41,84

- Tempo 1 h



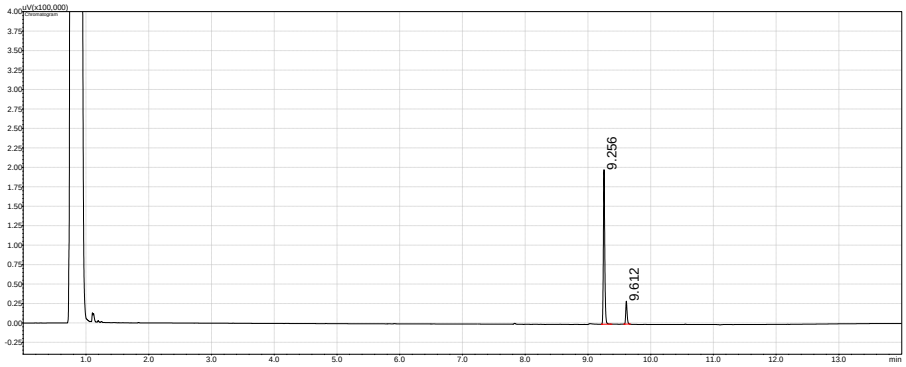
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,611	127328,0	35,93
Éster	9,253	227037,3	64,07

- Tempo 1h30



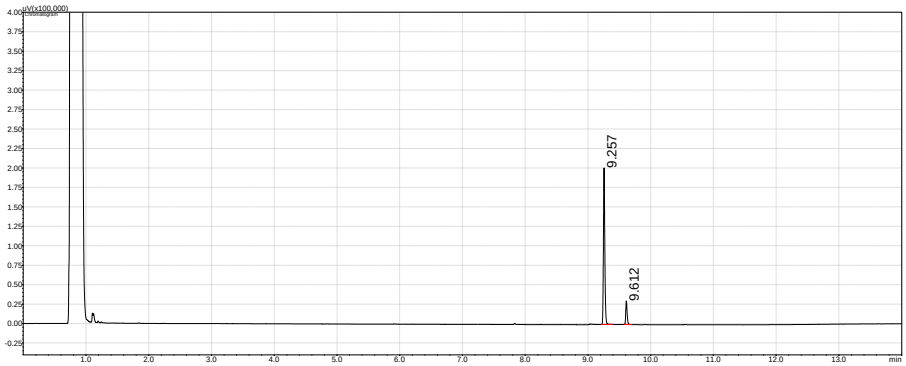
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,611	59495,9	16,47
Éster	9,255	301767,1	83,53

- Tempo 2h



Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,612	45147,8	12,94
Éster	9,256	303847,4	87,06

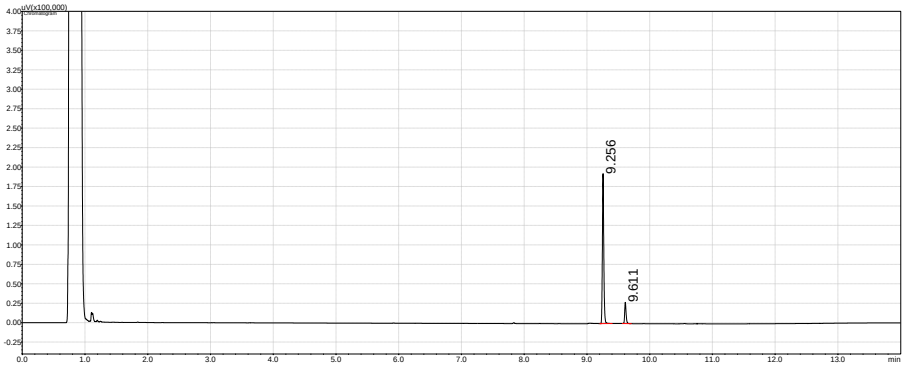
- Tempo 2h30



Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,612	46937,9	13,11

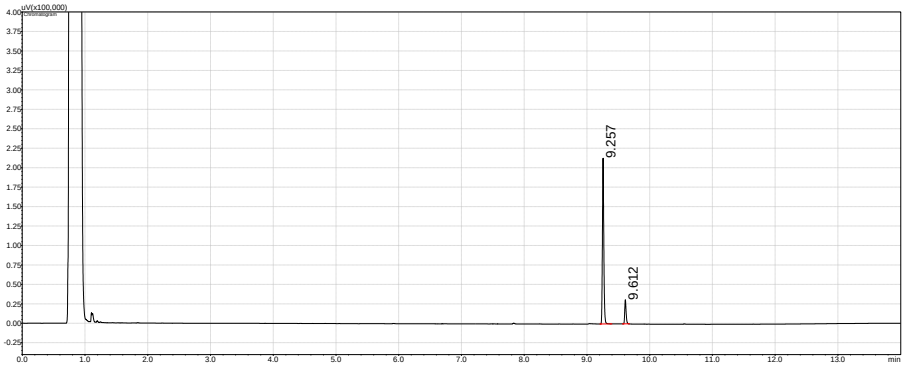
Éster	9,257	311052,6	86,89

- Tempo 3 h



Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,611	42811,2	12,62
Éster	9,256	296307,2	87,38

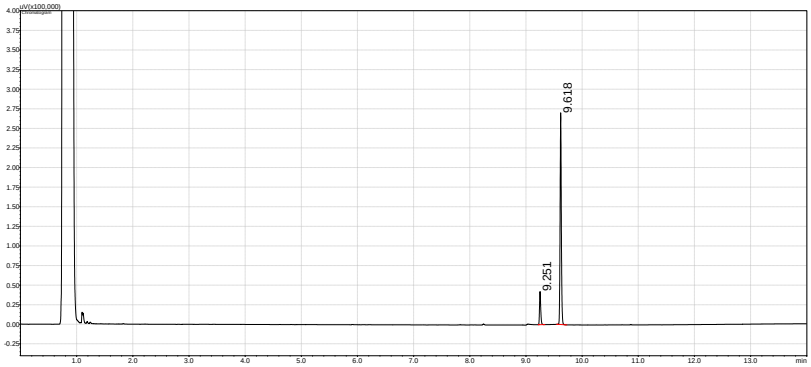
- Tempo 4 h



Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,612	47346,3	12,60
Éster	9,257	328535,4	87,40

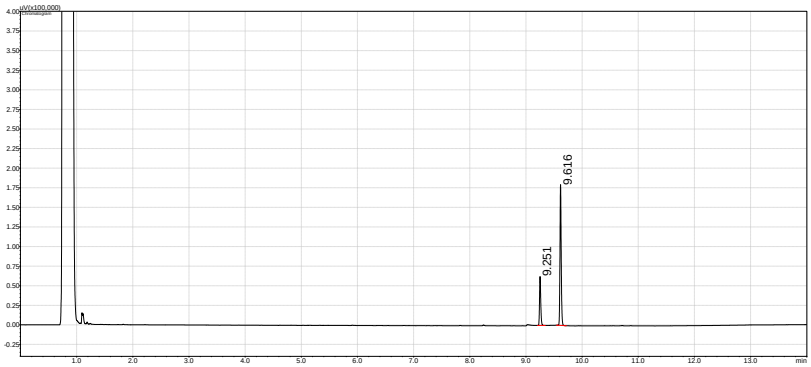
Potencial de conversão de esterificação do ácido palmítico – Otimização 2

- Tempo 15 min



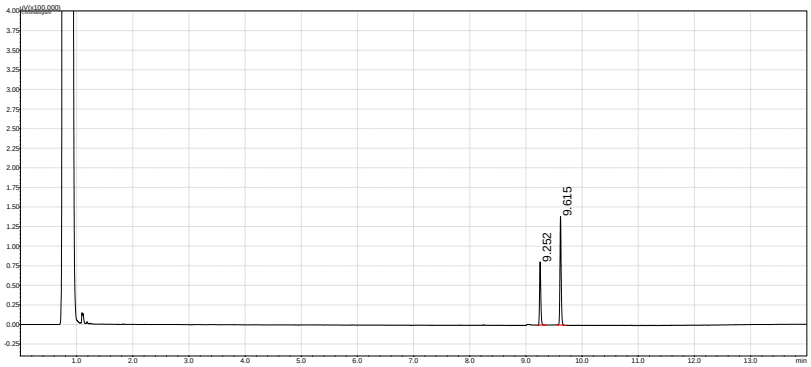
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,618	414084,7	86,69
Éster	9,251	63564,4	13,31

- Tempo 30 min



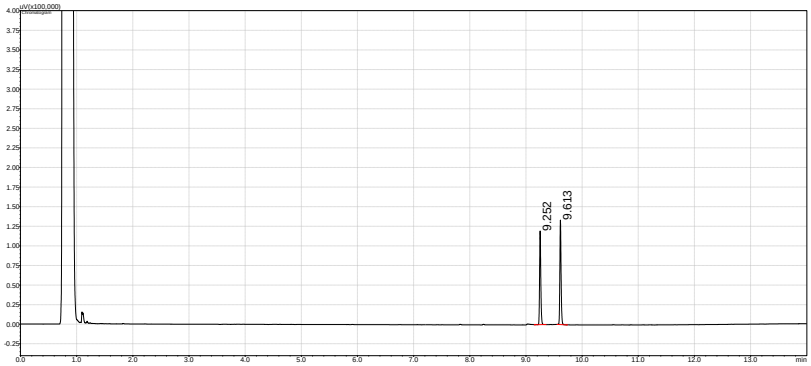
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,616	275675,3	74,48
Éster	9,251	94475,2	25,52

- Tempo 45 min



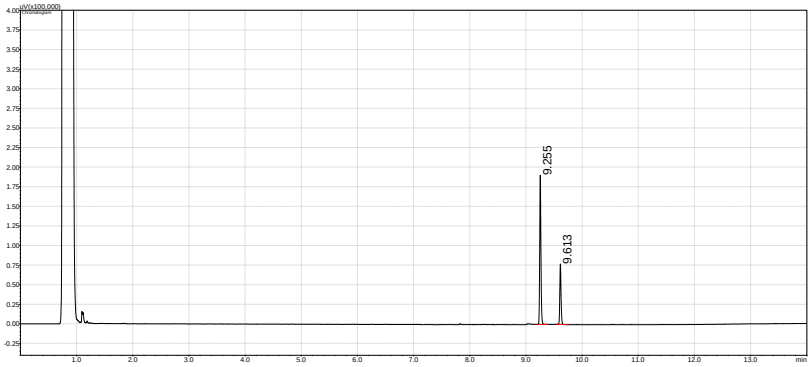
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,615	210766,6	63,47
Éster	9,252	121365,7	36,54

- Tempo 1 h



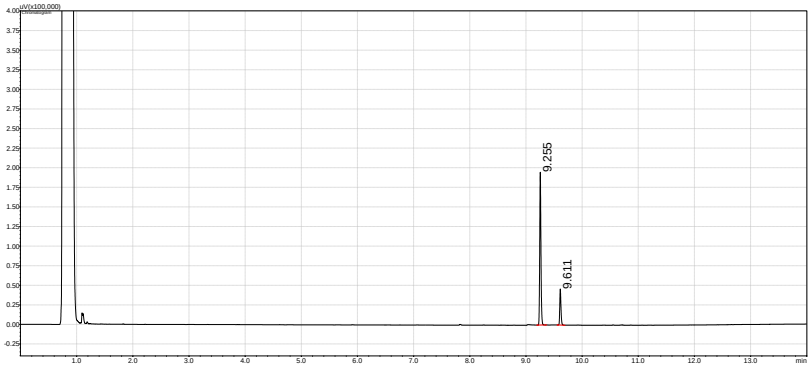
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,613	201516,9	52,75
Éster	9,252	180540,9	47,25

- Tempo 1h30



Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,613	118218,2	29,25
Éster	9,255	285994,8	70,75

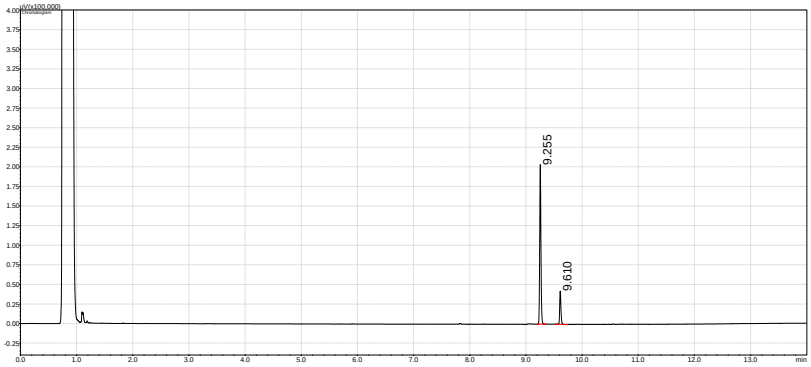
- Tempo 2 h



Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,611	69384,5	18,98

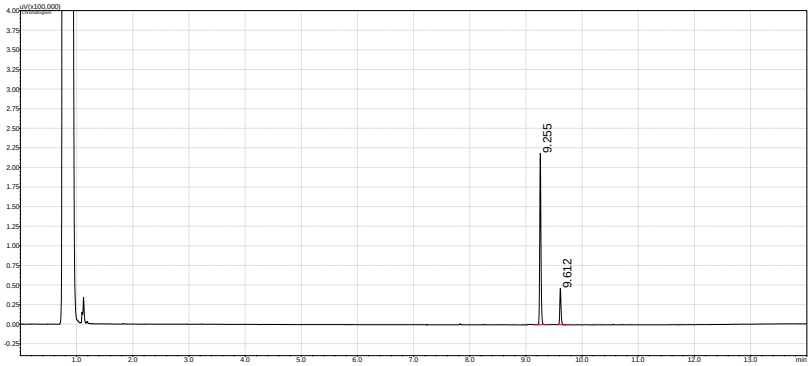
Éster	9,255	296088,3	81,02

- Tempo 2h30



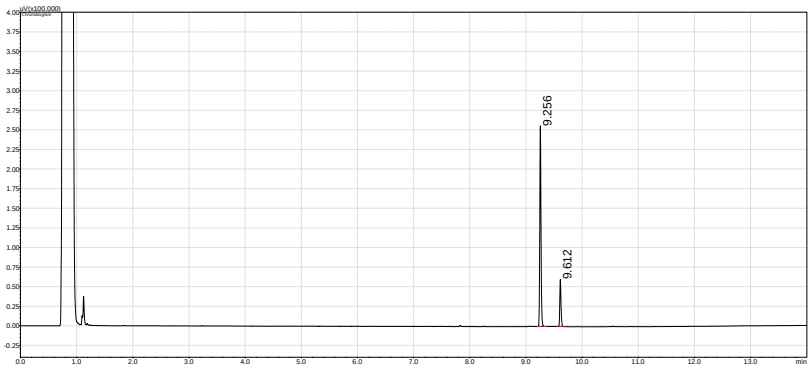
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,610	65809,1	17,51
Éster	9,255	309929,2	82,49

- Tempo 3 h



Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,612	70142,9	17,50
Éster	9,255	330570,8	82,50

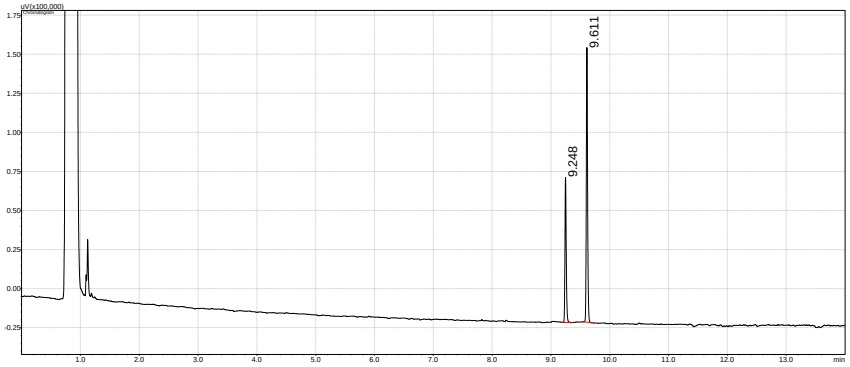
- Tempo 4 h



Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,612	90372,7	18,94
Éster	9,256	386732	81,06

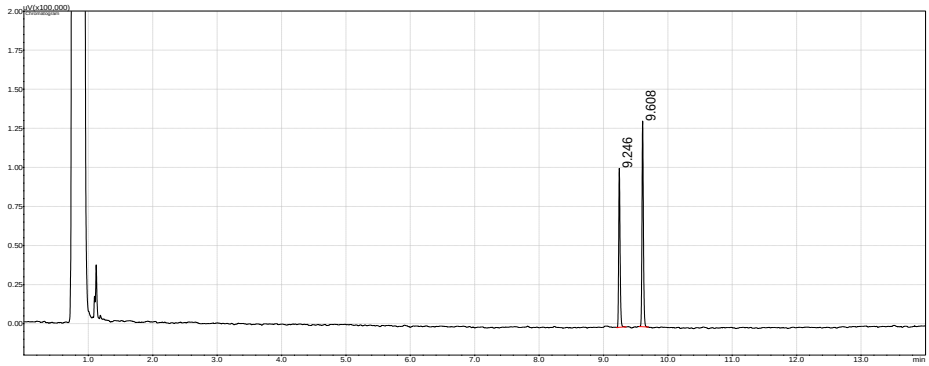
Potencial de conversão de esterificação do ácido palmítico – Otimização 3

- Tempo 15 min



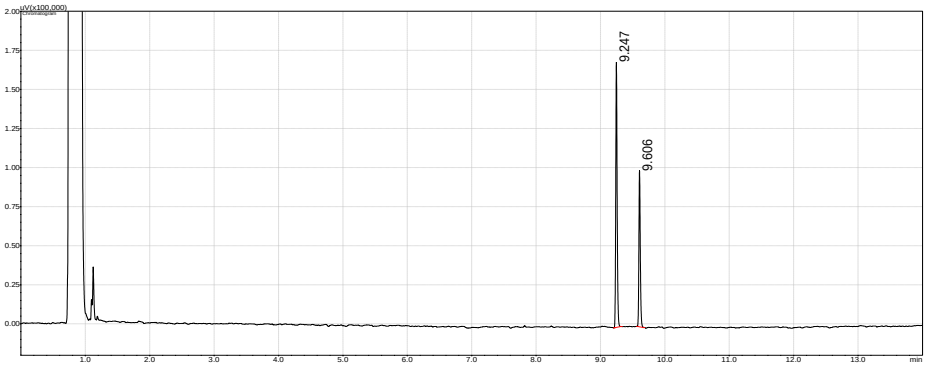
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,611	262966,9	65,10
Éster	9,248	140994,3	34,90

- Tempo 30 min



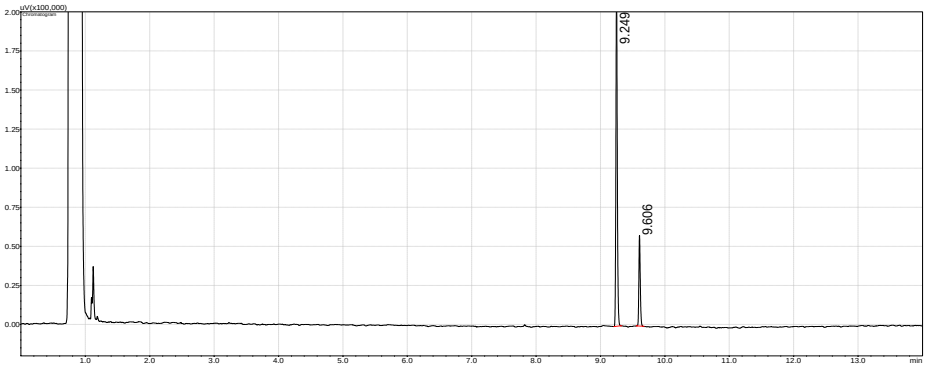
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,608	201471,0	56,54
Éster	9,246	154862,3	43,46

- Tempo 45 min



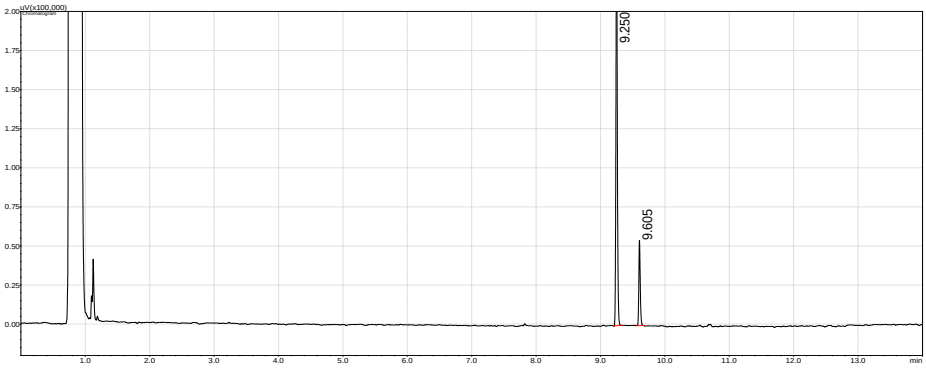
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,606	149581,9	36,95
Éster	9,247	255237,5	63,05

- Tempo 1 h



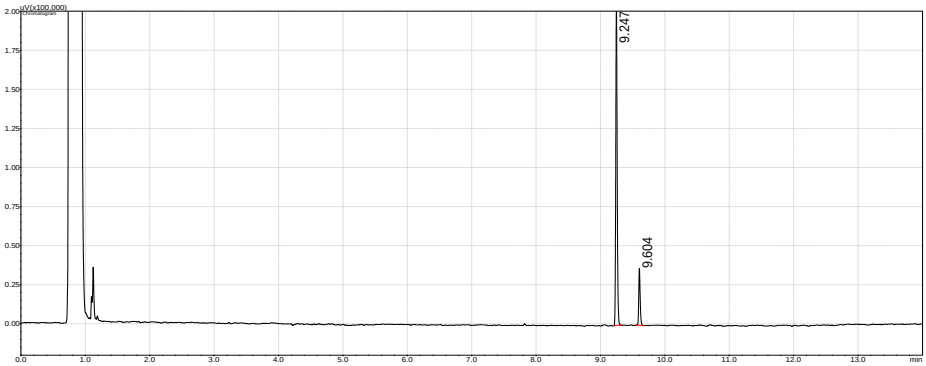
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,606	87848,9	21,12
Éster	9,249	328050,5	78,88

- Tempo 1h30



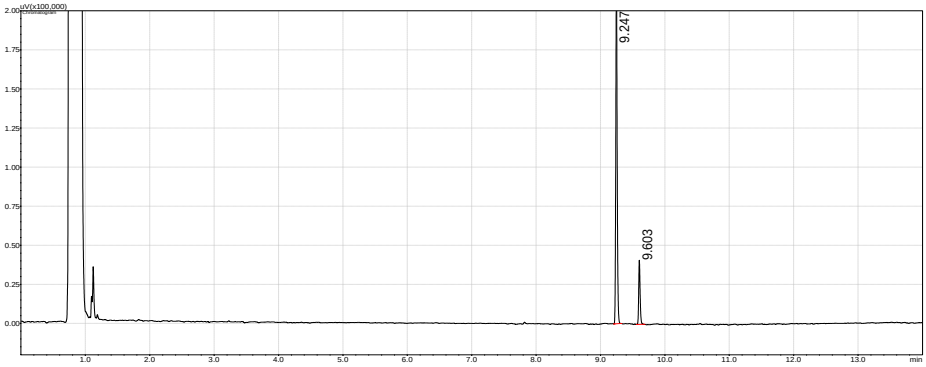
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,605	82587,5	17,73
Éster	9,250	383176,9	82,27

- Tempo 2 h



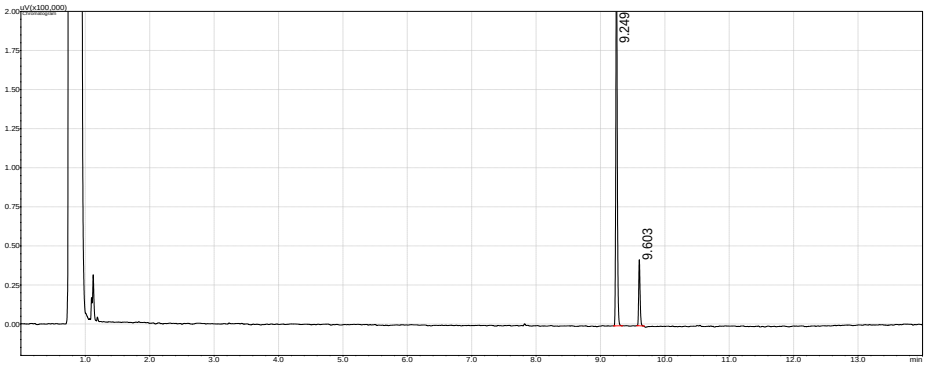
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,604	55575,5	15,12
Éster	9,247	312048,3	84,88

- Tempo 2h30



Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,603	62861,5	15,93
Éster	9,247	331771,4	84,07

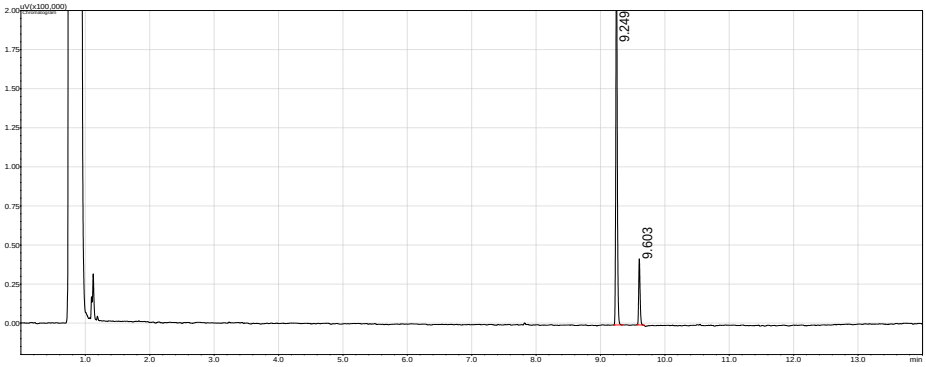
- Tempo 3 h



Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,603	63774,5	14,41

Éster	9,249	378882,1	85,59

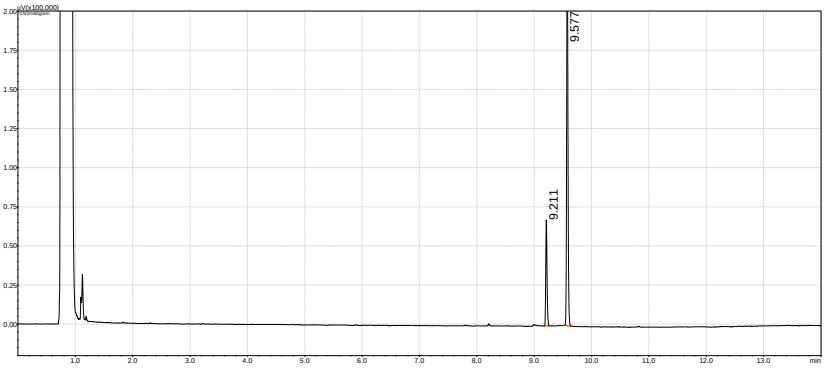
- Tempo 4 h



Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,603	73945,3	16,44
Éster	9,248	375801,3	83,56

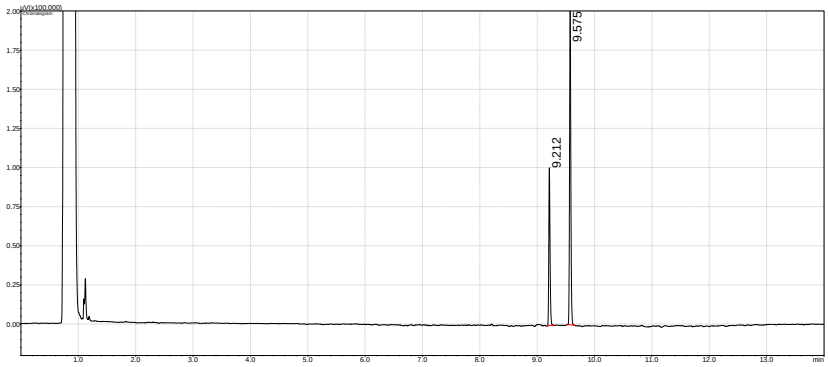
Potencial de conversão de esterificação do ácido palmítico – Otimização 4

- Tempo 15 min



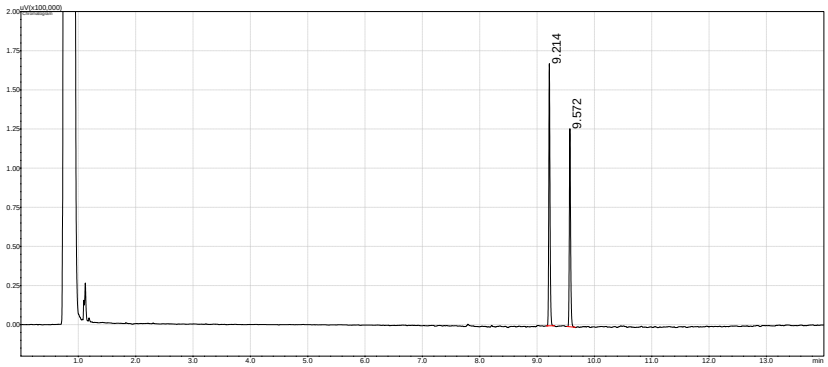
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,577	393829,8	79,14
Éster	9,21	103780,3	20,86

- Tempo 30 min



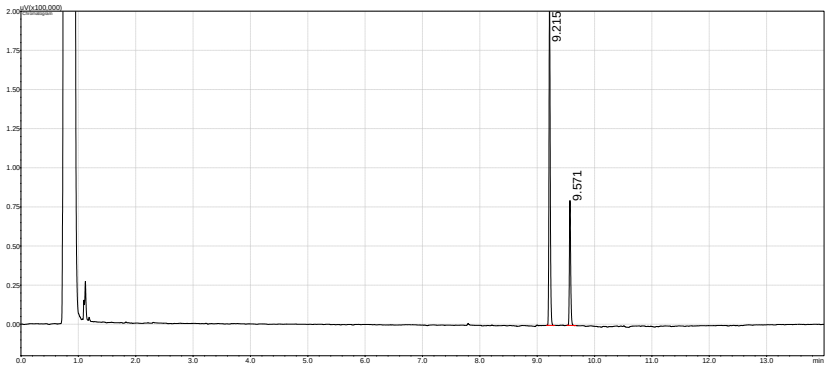
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,575	306628,6	67,11
Éster	9,212	150288,8	32,89

- Tempo 45 min



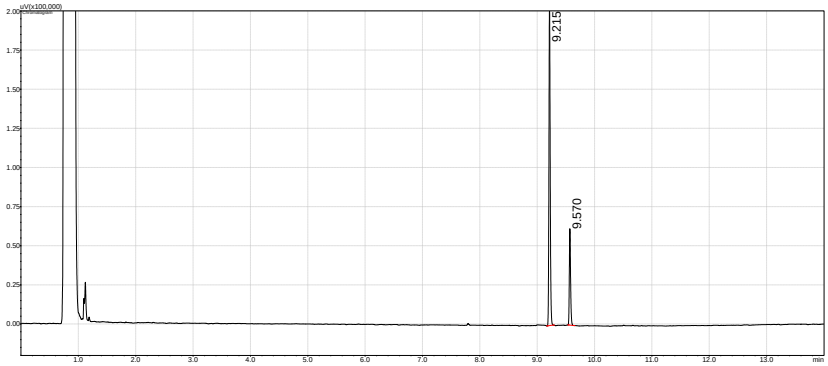
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,572	192253,3	43,70
Éster	9,214	247685,9	56,30

- Tempo 1 h



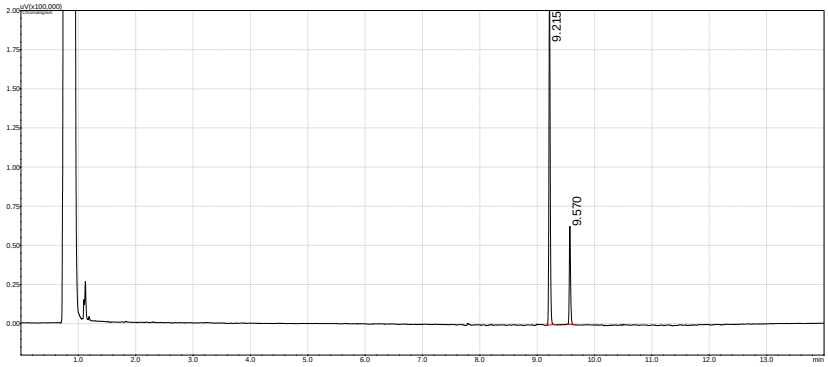
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,571	121576,4	27,62
Éster	9,215	318665,7	72,38

- Tempo 1h30



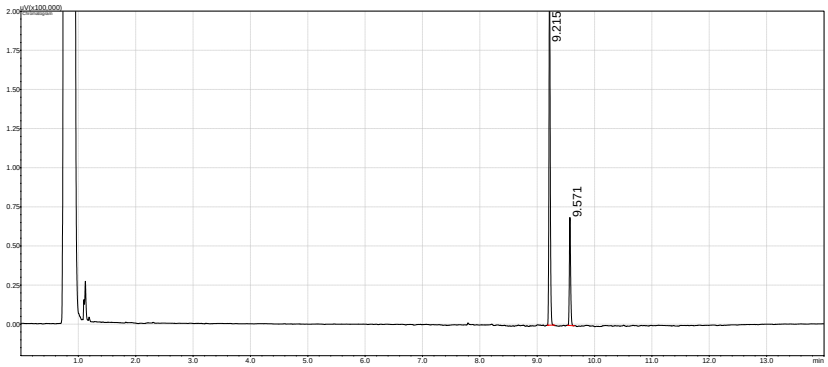
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,570	93315,5	22,95
Éster	9,215	313273,2	77,05

- Tempo 2 h



Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,570	94919,0	22,12
Éster	9,215	334117,4	77,88

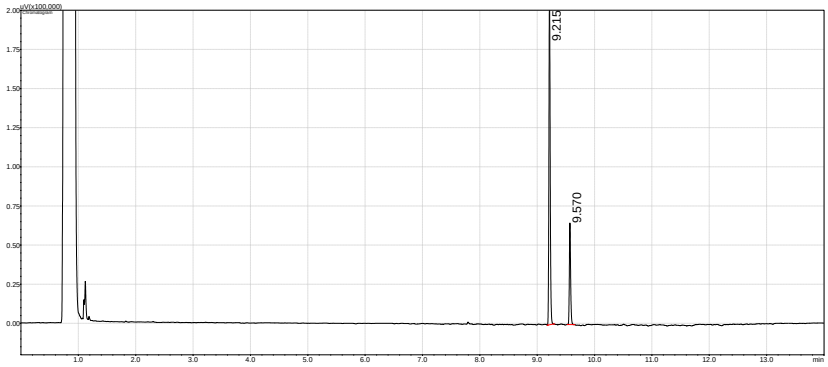
- Tempo 2h30



Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,571	104557,2	23,08

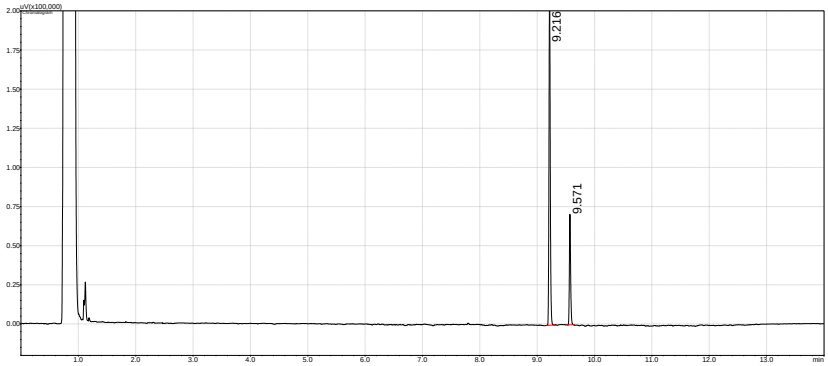
Éster	9,215	348511,8	76,92

- Tempo 3 h



Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,570	99483	23,20
Éster	9,215	329335,9	76,80

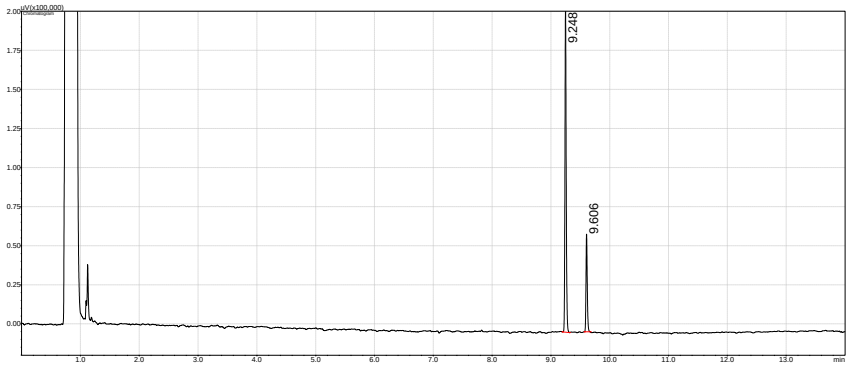
- Tempo 4 h



Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,571	105846,5	24,15
Éster	9,216	332529,8	75,85

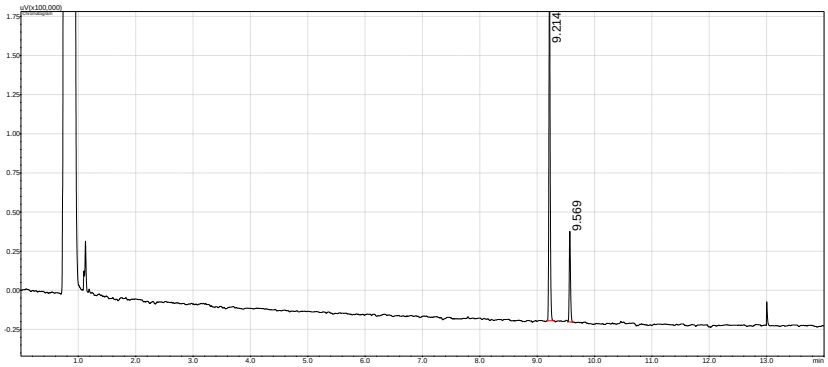
Potencial de conversão de esterificação do ácido palmítico – NOV435

- Tempo 15 min



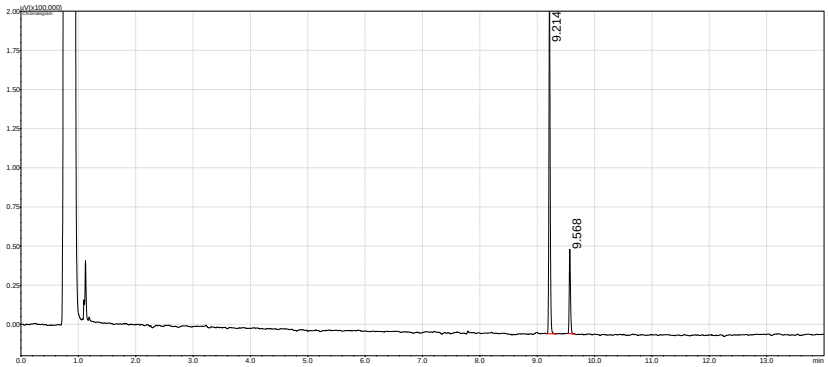
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,606	93650,5	23,26
Éster	9,248	309052,0	76,74

- Tempo 30 min



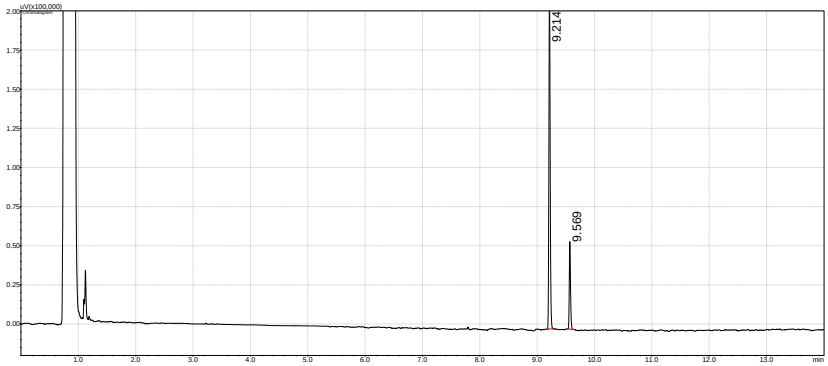
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,569	86445,9	20,12
Éster	9,214	343143,9	79,88

- Tempo 45 min



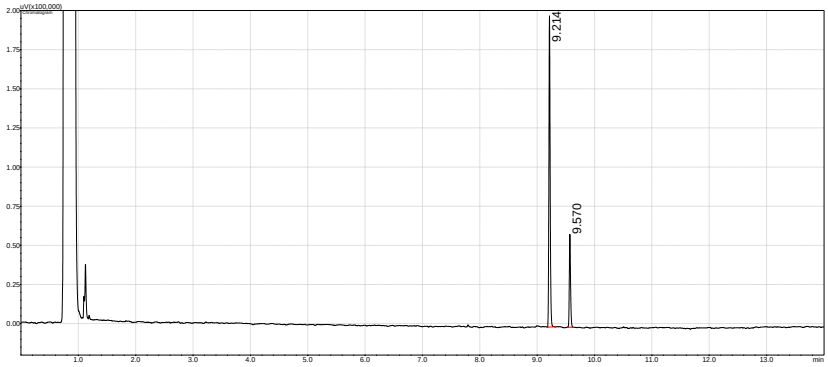
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,568	82025,6	19,72
Éster	9,214	333919,4	80,28

- Tempo 1 h



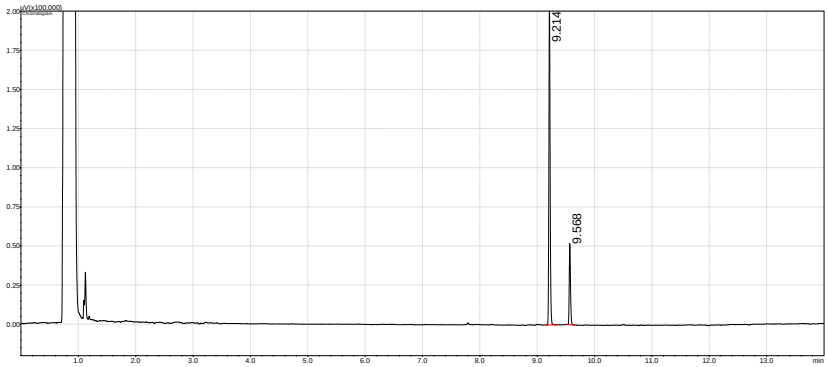
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,569	83393,4	19,84
Éster	9,214	336959,5	80,16

- Tempo 1h30



Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,570	88378,7	22,62
Éster	9,214	302346,9	77,38

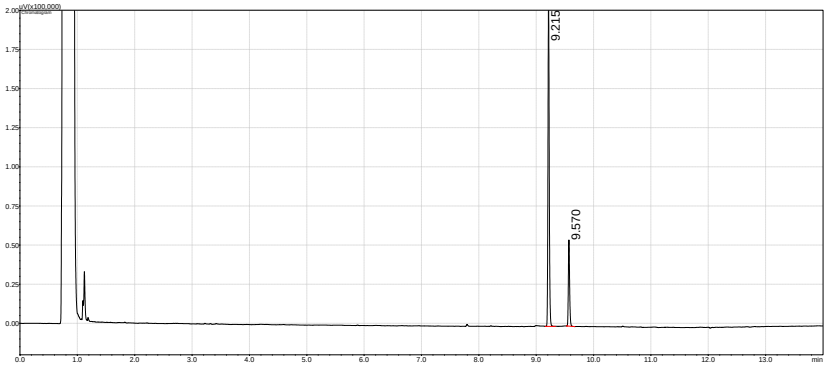
- Tempo 2 h



Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,568	78670,6	20,37

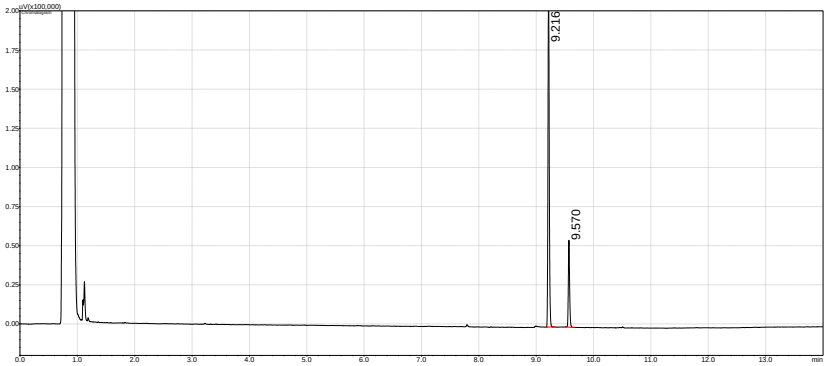
Éster	9,214	307617,2	79,63

- Tempo 2h30



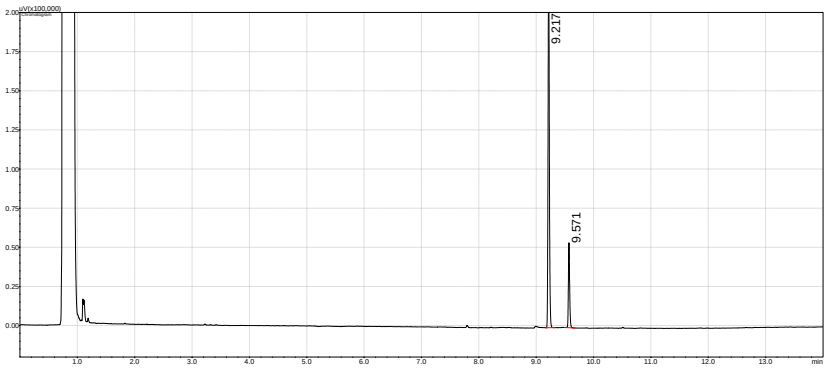
Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,570	84334,5	20,79
Éster	9,215	321401,1	79,21

- Tempo 3 h



Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,570	85096,6	20,04
Éster	9,216	339544,7	79,96

- Tempo 4 h

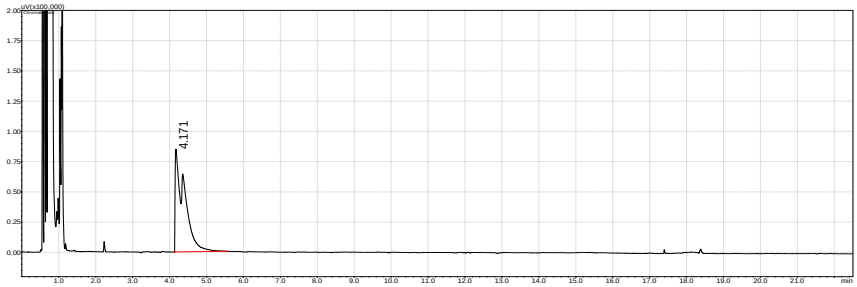


Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Porcentagem (%)
Ácido palmítico	9,571	82487	18,38
Éster	9,217	366179,4	81,62

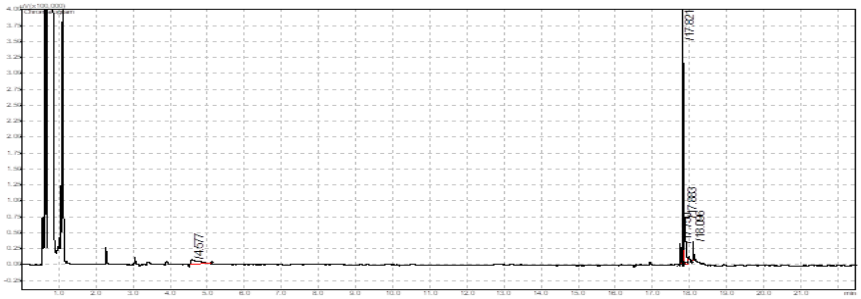
Resolução cinética dinâmica com formiato de amônio, 70 °C – Inicial EPI

Resolução cinética dinâmica com formiato de amônio, 70 °C – Inicial GLU

- Tempo inicial



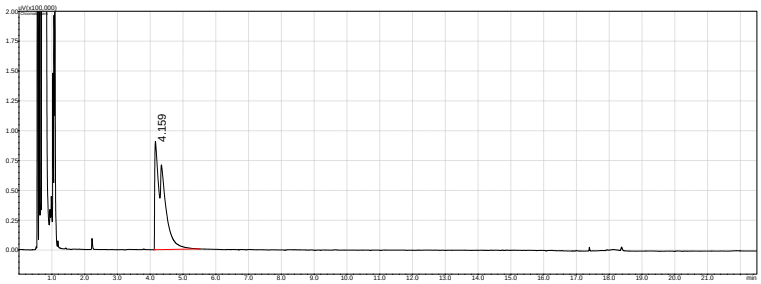
- Tempo 12 h



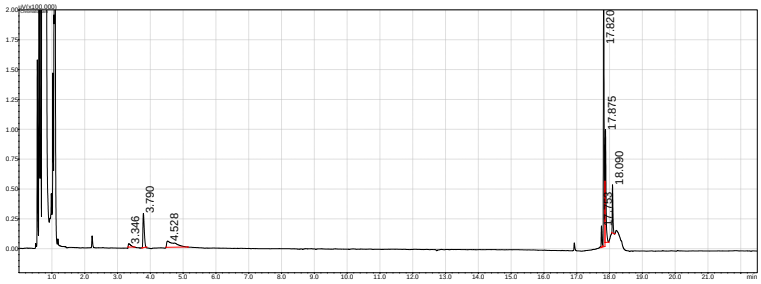
Composto	Tempo de retenção (min)	Área
Substrato	4,577	117093,0
Produto R	17,821	595876,3
Produto S	17,750	43174,6
Subproduto	-	218590,3

Resolução cinética dinâmica com formiato de amônio, 70 °C – Otimização 1

- Tempo inicial



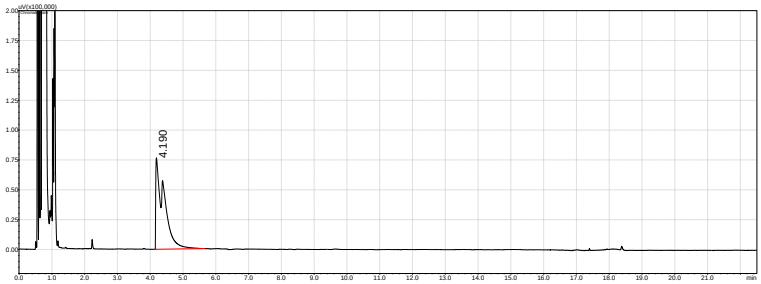
- Tempo 12 h



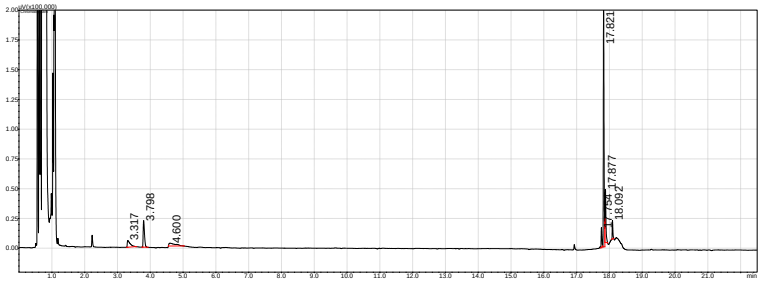
Composto	Tempo de retenção (min)	Área
Substrato	4,528	89206,4
Produto R	17,820	376983,3
Produto S	17,754	25874,7
Subproduto	-	331476,8

Resolução cinética dinâmica com formiato de amônio, 70 °C – Otimização 2

- Tempo inicial



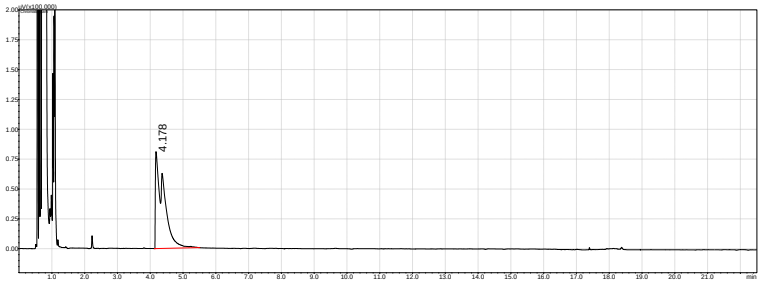
- Tempo 12 h



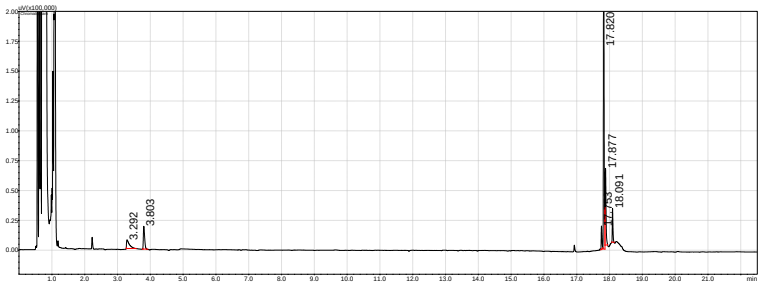
Composto	Tempo de retenção (min)	Área
Substrato	4,600	32807,7
Produto R	17,821	320111,6
Produto S	17,754	24039,7
Subproduto	-	200831,4

Resolução cinética dinâmica com formiato de amônio, 70 °C – Otimização 3

- Tempo inicial



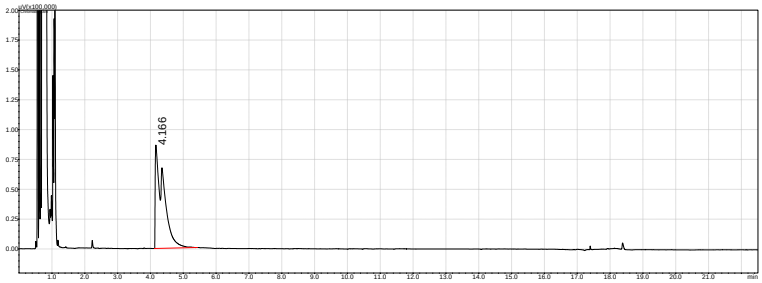
- Tempo 12 h



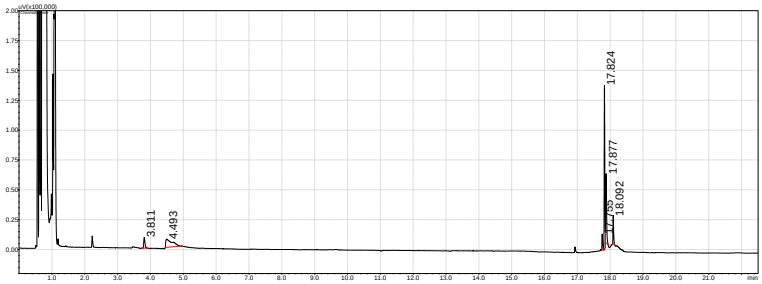
Composto	Tempo de retenção (min)	Área
Substrato	-	0,0
Produto R	17,820	424844,1
Produto S	17,753	27955,4
Subproduto	-	254331,6

Resolução cinética dinâmica com formiato de amônio, 70 °C – Otimização 4

- Tempo inicial



- Tempo 12 h

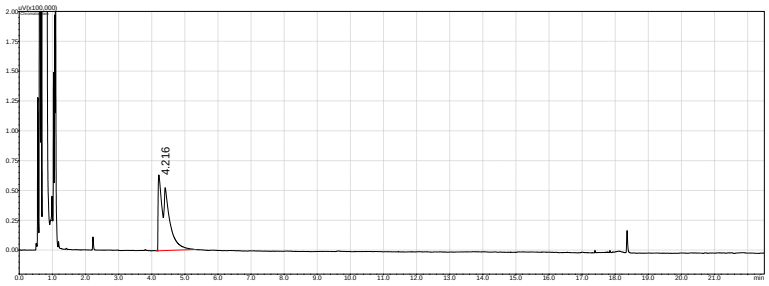


Composto	Tempo de retenção (min)	Área
Substrato	4,611	40167,8

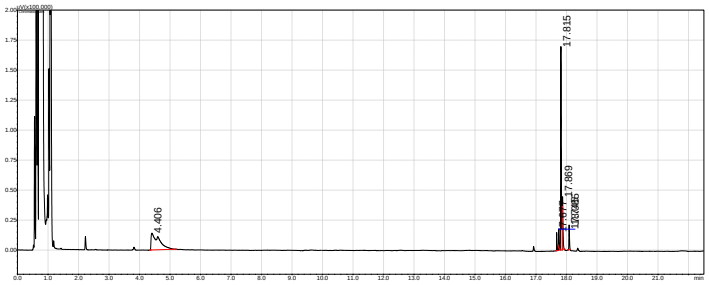
Produto R	17,822	206605,8
Produto S	17,754	22288,7
Subproduto	-	251517,0

Resolução cinética dinâmica com H_2, 70 °C – Inicial GLU

- Tempo inicial



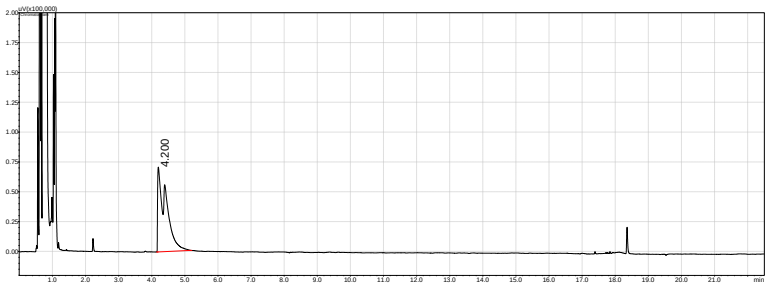
- Tempo 12 h



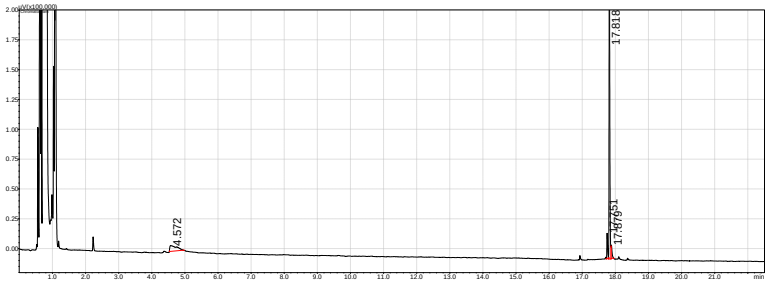
Composto	Tempo de retenção (min)	Área
Substrato	4,406	253985,6
Produto R	17,815	266855,6
Produto S	17,754	21214,6
Subproduto	-	110866,4

Resolução cinética dinâmica com H_2, 70 °C – Otimização 1

- Tempo inicial



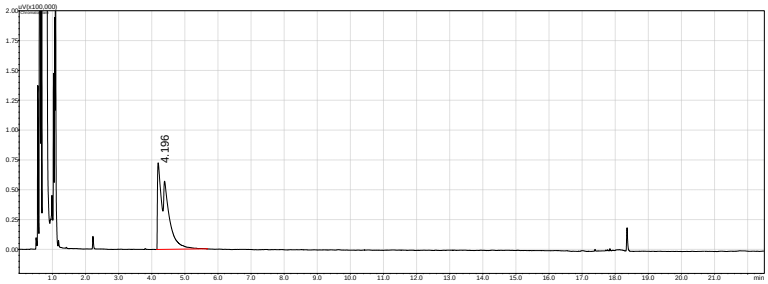
- Tempo 12 h



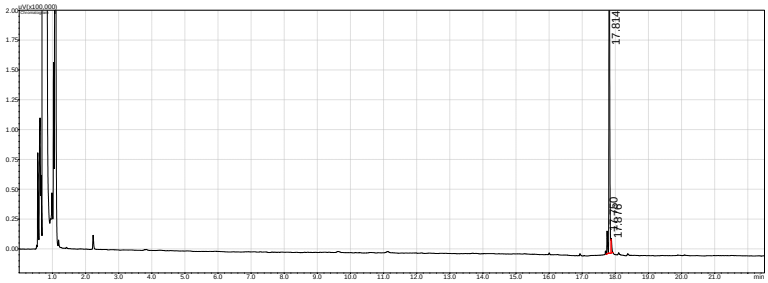
Composto	Tempo de retenção (min)	Área
Substrato	4,572	71716,8
Produto R	17,818	427147,6
Produto S	17,751	32137,4
Subproduto	-	29792,7

Resolução cinética dinâmica com H_2, 70 °C – Otimização 2

- Tempo inicial



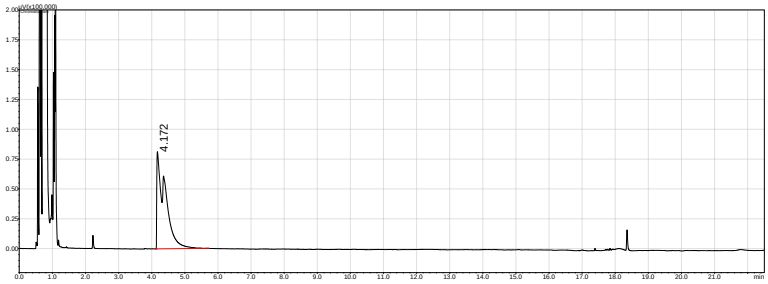
- Tempo 12 h



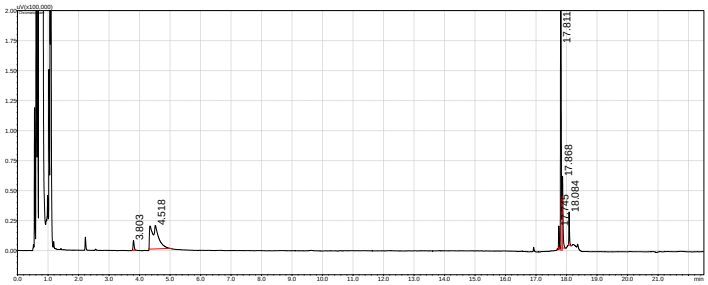
Composto	Tempo de retenção (min)	Área
Substrato	-	0,0
Produto R	17,814	595225,9
Produto S	17,750	28237,6
Subproduto	-	37001,7

Resolução cinética dinâmica com H_2, 70 °C – Otimização 3

- Tempo inicial



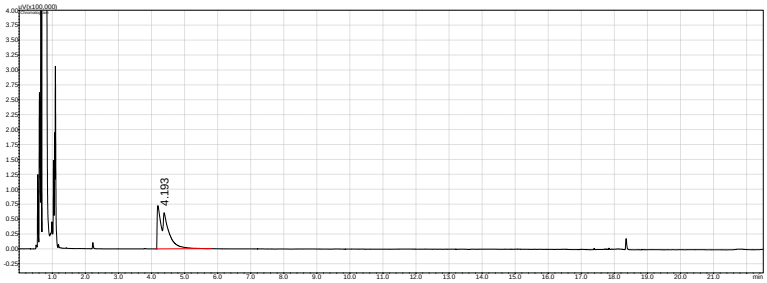
- Tempo 12 h



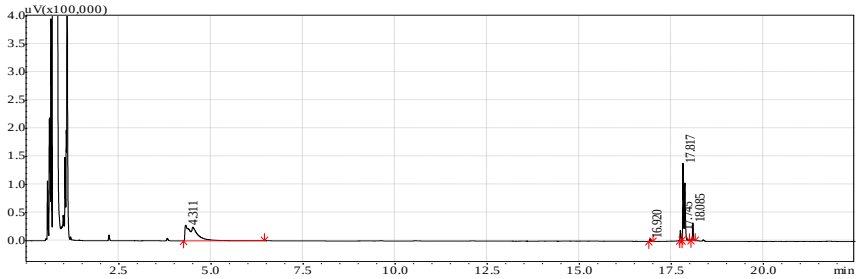
Composto	Tempo de retenção (min)	Área
Substrato	4,518	340484,6
Produto R	17,811	510726,2
Produto S	17,745	27234,2
Subproduto	-	165452,0

Resolução cinética dinâmica com H_2, 70 °C – Otimização 4

- Tempo inicial



- Tempo 12 h

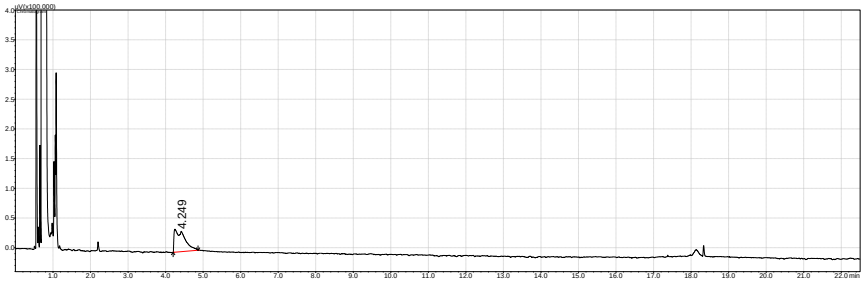


Composto	Tempo de retenção (min)	Área
Substrato	4,311	573669,6

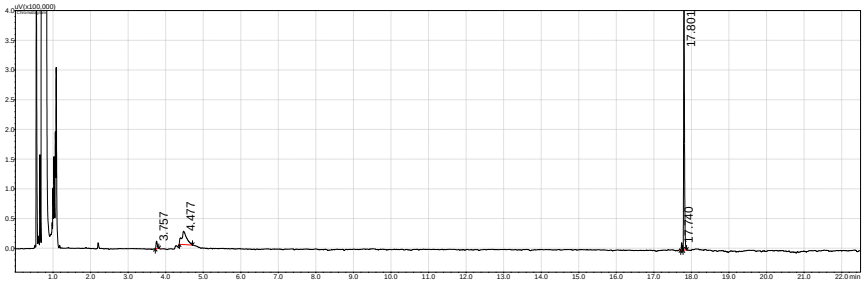
Produto R	17,817	403944,8
Produto S	17,745	27646,8
Subproduto	-	8457,7

Resolução cinética dinâmica com H_2, 60 °C – Inicial GLU

- Tempo inicial



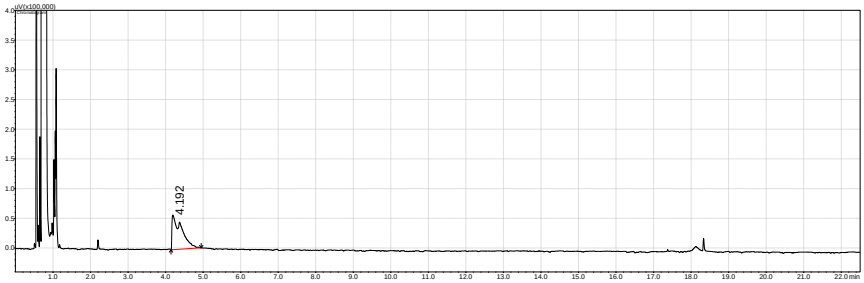
- Tempo 12 h



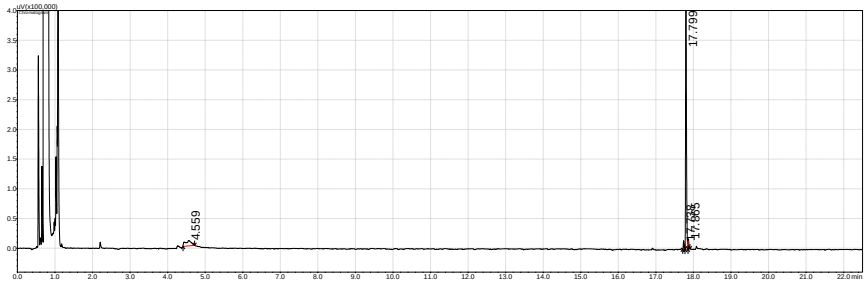
Composto	Tempo de retenção (min)	Área
Substrato	4,477	210933,3
Produto R	17,801	719383,1
Produto S	17,740	17408,7
Subproduto	-	31208,6

Resolução cinética dinâmica com H_2, 60 °C – Otimização 1

- Tempo inicial



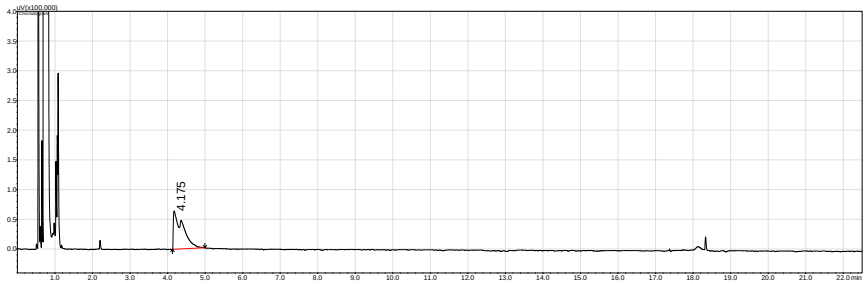
- Tempo 12 h



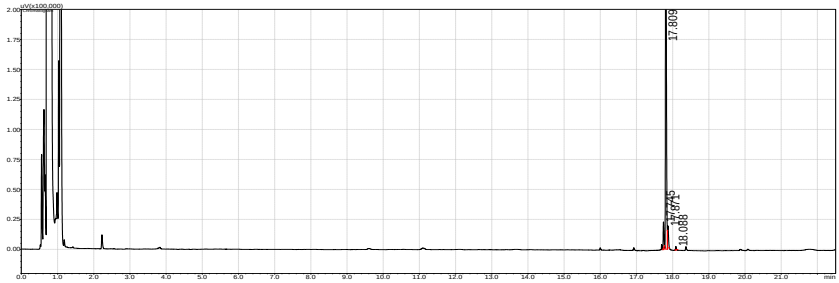
Composto	Tempo de retenção (min)	Área
Substrato	4,559	100395,6
Produto R	17,799	811378,7
Produto S	17,738	18956,7
Subproduto	-	25823,2

Resolução cinética dinâmica com H_2, 60 °C – Otimização 2

- Tempo inicial



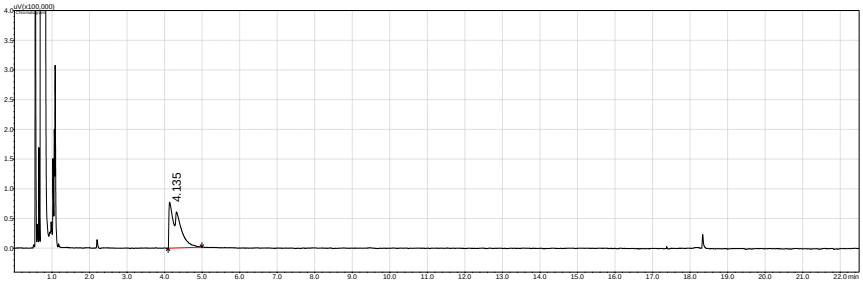
- Tempo 12 h



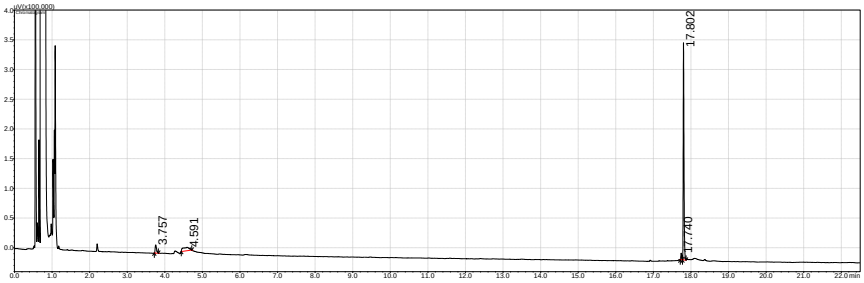
Composto	Tempo de retenção (min)	Área
Substrato	-	0,0
Produto R	17,821	689543,7
Produto S	17,754	30250,1
Subproduto	-	37001,7

Resolução cinética dinâmica com H_2, 60 °C – Otimização 3

- Tempo inicial



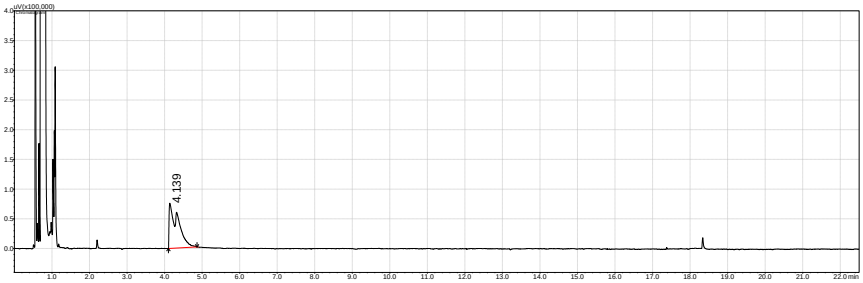
- Tempo 12 h



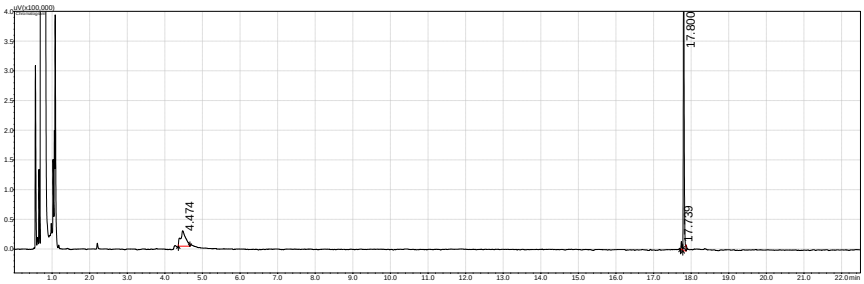
Composto	Tempo de retenção (min)	Área
Substrato	4,591	69184,4
Produto R	17,802	537758,3
Produto S	17,740	15885,1
Subproduto	-	35501,9

Resolução cinética dinâmica com H_2, 60 °C – Otimização 4

- Tempo inicial



- Tempo 12 h

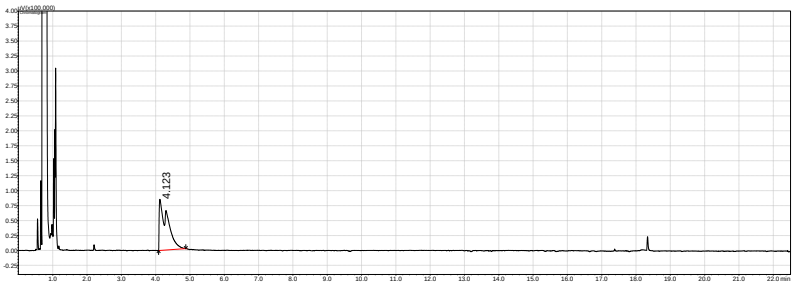


Composto	Tempo de retenção (min)	Área
Substrato	4,542	99231,7

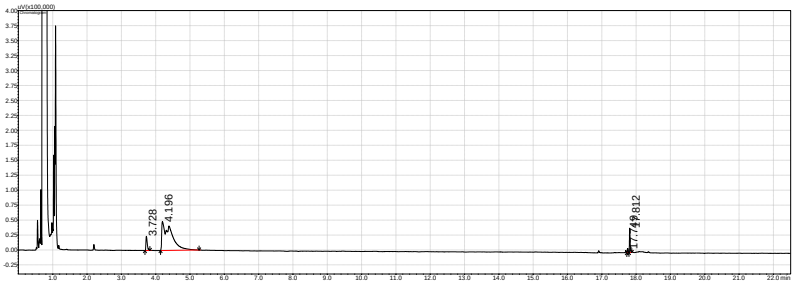
Produto R	17,800	729207,6
Produto S	17,739	15590,1
Subproduto	-	0,0

Resolução cinética dinâmica com H_2, 60 °C, Reciclo – Inicial GLU

- Tempo inicial



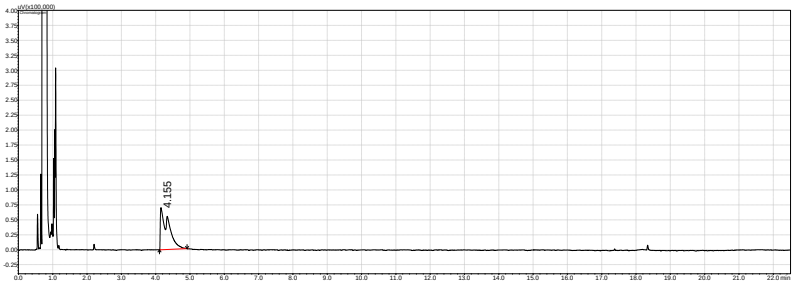
- Tempo 12 h



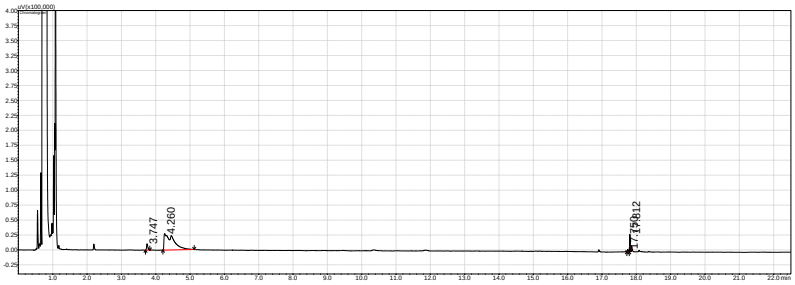
Composto	Tempo de retenção (min)	Área
Substrato	4,196	915883
Produto R	17,812	61196,5
Produto S	17,749	9456,8
Subproduto	-	64026

Resolução cinética dinâmica com H_2, 60 °C, Reciclo – Otimização 1

- Tempo inicial



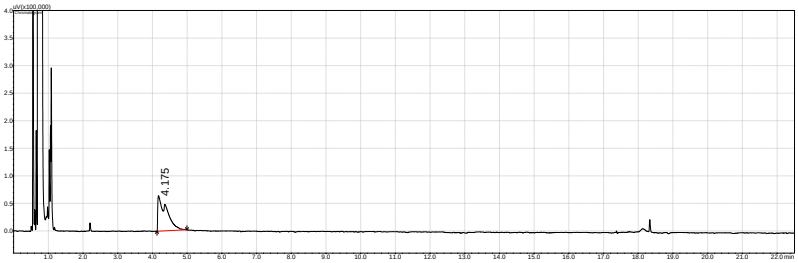
- Tempo 12 h



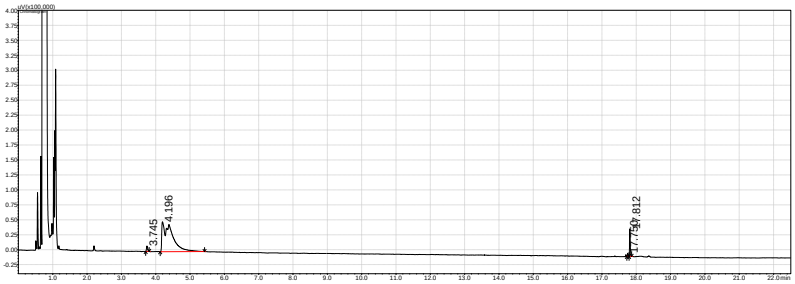
Composto	Tempo de retenção (min)	Área
Substrato	4,260	522101,2
Produto R	17,812	43851,7
Produto S	17,750	5495,7
Subproduto	-	27596,4

Resolução cinética dinâmica com H_2, 60 °C, Reciclo – Otimização 2

- Tempo inicial



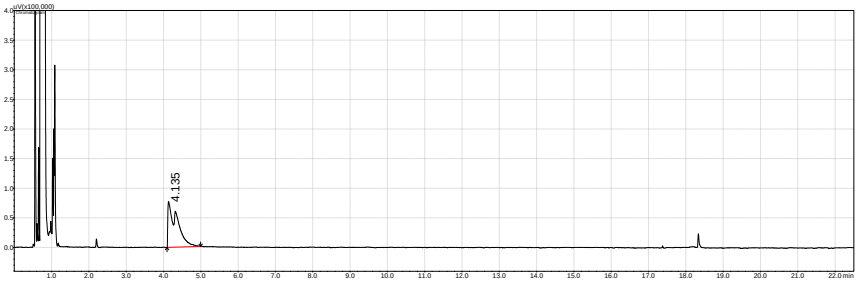
- Tempo 12 h



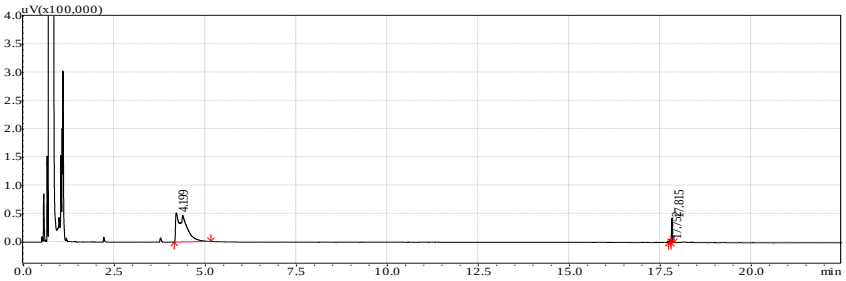
Composto	Tempo de retenção (min)	Área
Substrato	4,196	1025696,6
Produto R	17,812	63755,8
Produto S	17,750	7718,3
Subproduto	-	22695,7

Resolução cinética dinâmica com H_2, 60 °C, Reciclo – Otimização 3

- Tempo inicial



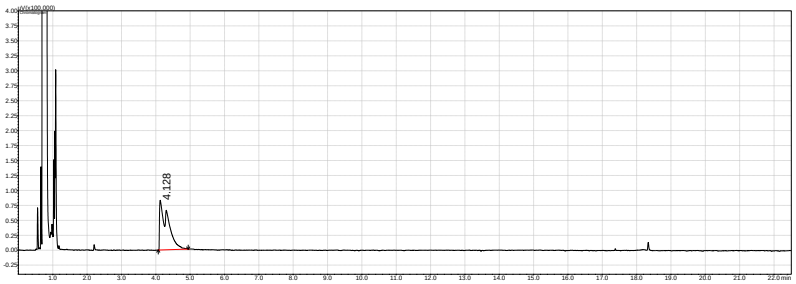
- Tempo 12 h



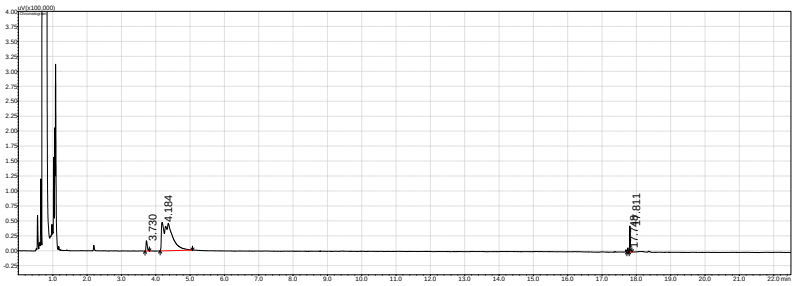
Composto	Tempo de retenção (min)	Área
Substrato	4,199	970836,3
Produto R	17,815	60221,4
Produto S	17,752	6957,9
Subproduto	-	8289,4

Resolução cinética dinâmica com H_2, 60 °C, Reciclo – Otimização 4

- Tempo inicial



- Tempo 12 h



Composto	Tempo de retenção (min)	Área
Substrato	4,184	952151,1

Produto R	17,811	60832,1
Produto S	17,748	9700,9
Subproduto	-	45228,4