



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS- CFM**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**LABORATÓRIO DE BIOCATALÍSE**



**SÍNTESE DE DERIVADOS ACILADOS DA**  
**D-RIBONO-1,4-LACTONA CATALISADA**  
**POR LIPASES**

**MESTRANDO: Damianni Sebrão**  
**ORIENTADORA: Maria da Graça Nascimento**  
**CO-ORIENTADOR: Marcus Mandolesi Sá**

**Florianópolis, agosto de 2005.**

*“Ainda que eu falasse a língua dos homens e dos anjos, se não tiver **AMOR**, serei como o bronze que soa ou como o címbalo que ecoa. Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a **CIÊNCIA**; ainda que eu tenha tamanha **FÉ**, a ponto de transportar montes, se não tiver amor nada serei.”*

*Paulo de Tarso*

*Este trabalho é dedicado a minha esposa Gisele, a toda minha família e amigos, e, em especial, a professora Maria da Graça Nascimento.*

*Quero registrar minha sincera homenagem ao Prof. Dr. Reinaldo Carvalho Silva (tio Rei) que me inspirou, e a outros colegas, a explorar o mundo da Química. Reinaldo não se encontra mais entre nós, mas sua luz continua iluminando e inspirando novos discípulos em outros planos da vida.*

*“O difícil a gente tira de letra, o impossível a gente demora um pouquinho !”*

*(Reinaldo)*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido a vida, e com ela a oportunidade de errar, acertar, errar novamente, quantas vezes forem necessárias, para formar o meu caráter, e assim poder evoluir sempre.

A minha esposa Gisele pela compreensão, carinho e amor em todos momentos, e aos nossos filhos (de coração) Alexandre Jr. e Lucas Alexandre pelas risadas, brincadeiras, e tudo mais que só as crianças sabem proporcionar.

A toda minha família pelo amor e apoio que deles recebi. Em especial, ao meu pai Gilberto e minha mãe Graça pela acolhida desde o momento do nascimento, aos meus irmãos Júnior, Ricardo e Graciane por me aturarem, e a minha vó Rosa por tudo que ela representa para mim.

A todos os meus amigos.

Especialmente, a professora Maria da Graça Nascimento por sua orientação, amizade, dedicação e por ter me acolhido carinhosamente no Laboratório de Biocatálise.

Ao professor Marcus Sá pela orientação, compartilhando conosco de toda sua experiência, bom senso e acima de tudo, profissionalismo.

Aos doutorandos Gustavo e Luciano por toda ajuda na realização das sínteses, pelas conversas edificantes e pela amizade de quase 10 anos.

A Aline e Vanessa por toda ajuda e por serem grandes amigas.

Aos colegas de laboratório Alexandre, Cristiane, Fernanda, Marcelo, Maria Alice, Patrícia e Thiago e Thiago pelo companheirismo, amizade, risadas, cafés e por terem me ensinado tantas coisas boas.

A todos amigos conquistados durante toda a minha vivência acadêmica.

Ao todos os professores que contribuíram até agora para a minha formação.

A Central de Análises pelos serviços prestados.

A CAPES pelo incentivo financeiro (bolsa) para a realização deste trabalho.

A UFSC e ao Departamento de Química, e em especial a Graça e ao Jadir da Secretaria de Pós-Graduação por serem sempre tão prestativos e atenciosos.

Enfim, a todas pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho se concretizasse.

## ÍNDICE GERAL

1 – INTRODUÇÃO .....	1
1.1 – Enzimas .....	1
1.2 – Classificação das enzimas.....	4
1.3 – Imobilização de Enzimas .....	5
1.4 – Aplicações das enzimas .....	9
1.4.1 – Lipases e Aplicações.....	13
1.5 – Caseinato de Sódio.....	18
1.5.1 – Micelas de Caseína.....	19
1.6 – Carboidratos .....	20
2 – OBJETIVOS .....	25
2.1 – Objetivo geral.....	25
2.2 – Objetivos específicos .....	25
3 – PARTE EXPERIMENTAL.....	27
3.1 – Reagentes, Enzimas e Solventes Utilizados.....	27
3.2 – Equipamentos Utilizados .....	28
3.3 – Métodos Experimentais .....	29
3.3.1 – Preparação e caracterização dos filmes de caseinato de sódio.....	29
3.3.2 - Preparação de oleatos de <i>n</i> -pentila catalisada pelo sistema LPS/CS .....	30
3.3.3 - Preparação dos derivados acilados da D-ribono-1,4-lactona 1 catalisada pelo sistema LPS/CS .....	31
3.3.4 - Preparação dos lauratos de D-ribono-1,4-lactona catalisada pela CALB.....	32
3.3.5 – Preparação do padrão 5-lauril-D-ribono-1,4-lactona .....	33
3.3.5.1 – Preparação do derivado 2,3-isopropilideno-D-ribono-1,4-lactona .....	34

3.3.5.2 – Preparação do derivado 5- <i>O</i> -lauril-2,3-isopropilideno-D-ribono-1,4- lactona .....	34
3.3.5.3 – Preparação do derivado 5- <i>O</i> -lauril-D-ribono-1,4-lactona.....	35
3.3.6 – Preparação dos lauratos de D-ribono-1,4-lactona catalisada pelas lipases PS-C e PS-D .....	36
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1 – Caracterização dos filmes de caseinato de sódio com a LPS imobilizada.....	37
4.1.1 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	37
4.1.2 – Determinação da quantidade de água .....	38
4.2 – Preparação de oleatos de <i>n</i> -pentila catalisada pelos sistemas LPS/CS.....	39
4.3 – Síntese de derivados acilados de D-ribono-1,4-lactona catalisada pelos sistemas LPS/CS.....	41
4.4 – Síntese de lauratos de D-ribonolactona catalisada pela CALB.....	49
4.5 – Síntese de derivado 5-lauril em três etapas.....	56
4.5.1 – Síntese do derivado 2,3-isopropilideno-D-ribono-1,4-lactona (3) .....	56
4.5.2 – Síntese do derivado 5- <i>O</i> -lauril-2,3-isopropilideno-D-ribono-1,4-lactona (4) .....	57
4.5.3 – Síntese do padrão 5-lauril-D-ribono-1,4-lactona (5) .....	60
4.6 – Síntese de lauratos de D-ribonolactona catalisada pelas lipases PS-C e PS-D .....	63
5 – CONCLUSÕES.....	68
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	71

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Sequência de aminoácidos da estrutura cristalina da lipase de <i>Pseudomonas</i> sp.....	2
Figura 2 – Mecanismo de hidrólise de éster catalisada por lipase. ....	3
Figura 3 – Representação gráfica da estrutura tridimensional da lipase de <i>Pseudomonas</i> sp .....	4
Figura 4 – Principais métodos de imobilização de enzimas. ....	6
Figura 5 – Sobreposição das estruturas tridimensionais da LCR11 .....	14
Figura 6 – Estruturas da duloxetina e de seu precursor racêmico.....	16
Figura 7 – Modelos sugeridos para as micelas de $\alpha$ e $\beta$ - caseína .....	20
Figura 8 – Preparação dos filmes de CS e imobilização das lipases. ....	29
Figura 9 – Preparação e quantificação do oleato de <i>n</i> -pentila.....	31
Figura 10 – Preparação do meio reacional e análise dos derivados acilados. ...	32
Figura 11 – Preparação do meio reacional e análise dos derivados lauratos da D- ribonolactona.....	33
Figura 12 – Fotomicrografias das amostras de filmes de CS com e sem a LPS imobilizada .....	38
Figura 13 – Estruturas dos possíveis produtos de acilação da D-ribonolactona .....	42
Figura 14 – Cromatograma obtido por CG para a alíquota da reação de acilação de 1 com ácido láurico catalisada por PSL/CS ..	44
Figura 15 – Cromatograma obtido por CG para a alíquota da reação de acilação de 1 com ácido láurico catalisada pela CALB .....	50
Figura 16 – Cromatograma obtido por CG para a alíquota da reação de acilação de 1 com ácido láurico catalisada pela CALB .....	51
Figura 17 – Espectro de RMN- <sup>13</sup> C para o produto de acilação de 1 com ácido láurico catalisada pela CALB.....	53
Figura 18 – Espectros de massas do produto da reação de acilação da D-ribonolactona 1 com ácido láurico catalisada pela CAL .....	55



Figura 19 – Estrutura do produto monoacilado da reação entre a D-ribonolactona e ácido láurico, catalisada pela CALB.....	56
Figura 20 – Cromatograma obtido por CG para a alíquota da reação de acilação de 3 com ácido láurico catalisada pela CALB. ....	58
Figura 21– Espectro de RMN- <sup>1</sup> H do derivado 5-O-lauril-2,3-isopropilideno-D-ribono-1,4-lactona .....	59
Figura 22 – Ampliação do espectro de RMN- <sup>1</sup> H para o derivado 5-O-lauril-D-ribono-1,4-lactona. ....	61
Figura 23 – Cromatograma obtido por CG para o produto reação de acilação de 1 com ácido láurico catalisada pela CALB, sobreposto pelo cromatograma para o padrão 5.....	62
Figura 24 – Cromatograma obtido por CG para a alíquota da reação de acilação de 1 com ácido láurico catalisada pelos sistemas PS-C/CS e PS-D/CS.....	63
Figura 25 – Espectro de RMN- <sup>1</sup> H ampliado do produto da reação de acilação da D-ribonolactona 1 com ácido láurico catalisada pelo sistema PS-C/CS .....	65
Figura 26 – Espectro de massas do produto da reação de acilação da D-ribonolactona 1 com ácido láurico catalisada pelo sistema PS-C/CS. ....	66
Figura 27 – Estruturas dos possíveis produtos monoacilados da reação entre a D-ribonolactona e ácido láurico, catalisada por PS-C e PS-D.....	67

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1– Classificação das enzimas segundo a IUBMB <sup>2</sup> .....	5
Tabela 2 – Reações biocalisadas e aplicações de algumas enzimas termoestáveis.....	12
Tabela 3 – Efeito do solvente na conversão (%) em oleato de <i>n</i> -pentila catalisada pelo sistema LPS/CS. ....	40
Tabela 4 – Intensidades relativas dos produtos de acilação da D-ribonolactona 1 com os ácidos orgânicos, catalisada por LPS/CS.....	45

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Imobilização de enzimas pelo método da ativação com EDC....	8
Esquema 2 – Rotas sintéticas para preparação de aminoácidos racêmicos e L-aminoácidos.....	10
Esquema 3 – Rota da síntese da (-)-Neplanocina C partindo de D-ribonolactona.....	22
Esquema 4 – Rota sintética de derivados 5-acil-D-ribo-1,4-lactona.....	23
Esquema 5 – Rota sintética para dinucleotídeos análogos de NAD <sup>+</sup> a partir da D-ribonolactona 1.....	24
Esquema 6 – Isomerização da 1,4-lactona 1 para a 1,5-lactona.....	42
Esquema 7 – Síntese de derivados acilados de D-ribo-1,4-lactona catalisada por LPS/CS. ....	43

**LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

ADTP	= adenosina difosfato
Asp	= ácido aspártico
CALB	= lipase de <i>Candida antarctica</i> B (Novozymes)
ccd	= cromatografia de camada delgada
$\text{CDCl}_3$	= clorofórmico deuterado
CG	= cromatografia gasosa
CG/EM	= cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas
CS	= caseinato de sódio
d	= dublete
$\text{D}_2\text{O}$	= água deuterada
Da	= Dalton
DAG	= diacilglicerol
dd	= duplo dublete
DDI	= didanosina
DMSO	= dimetilsulfóxido
$\text{DMSO-d}_6$	= dimetilsulfóxido deuterado
DNA	= ácido desoxirribonucleico
DOD	= ( <i>E</i> )-7,10-dihidroxi-8-octadecenóico
E	= razão enantiomérica
E.C.3.1.1.3	= classificação das lipases
EDC	= 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
$ee_p$	= excesso enantiomérico do preduto
gGAPDH	= gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
Glu	= ácido glutâmico
His	= histidina

Hz	= Hertz
IV	= infra-vermelho
kDa	= $10^3$ Daltons
LCR	= lipase de <i>Candida rugosa</i>
log P	= logaritmo do coeficiente de partição
LPS	= lipase de <i>Pseudomona cepacia</i> (Amano)
LPS/CS	= lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i> imobilizada em caseinato de sódio
LRO	= lipase de <i>Rhizopus orizae</i> (Amano)
m	= múltiplo
m/z	= razão massa carga
MAG	= monoacilglicerol
MAG	= monoacilglicerol
<i>m</i> -CPBA	= ácido metacloroperbenzóico
MEV	= microscopia eletrônica de varredura
MHz	= mega Hertz ( $10^6$ Hertz)
MTBE	= éter metil t-butílico
NAD <sup>+</sup>	= íon dinucleotídeo adenosina nicotinamida
PDB	= <i>Protein Data Bank</i>
PEG	= poli(etilenoglicol)
PEO	= poli(óxido de etileno)
Pf.	= ponto de fusão
pH	= potencial hidrogeniônico
<i>p</i> -NPP	= palmitato de <i>p</i> -nitrofenila
ppm	= partes por milhão
PS-C	= lipase de <i>Pseudomona cepacia</i> imobilizada em cerâmica (Amano)

PS-D	= lipase de <i>Pseudomona cepacia</i> imobilizada em diatomita (Amano)
PVA	= álcool polivinílico
QTS	= quitosana
RMN- <sup>13</sup> C	= ressonância magnética nuclear de carbono
RMN- <sup>1</sup> H	= ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN-2D	= ressonância magnética nuclear em duas dimensões
RNA	= ácido ribonucleico
Ser	= serina
t	= tripleto
TAG	= triacilglicerol
TFA	= ácido trifluoroacético
THF	= tetraidrofurano
TMS	= tetrametilsilano
TOD	= ( <i>E</i> )-7,10,12-trihidroxi-8-octadecenóico
UFRRJ	= Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
UIBBM	= União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
δ	= deslocamento químico (ppm)

## RESUMO

A lipase de *Pseudomonas cepacia* (atualmente *Burkholderia cepacia*, LPS) foi imobilizada em filmes de caseinato de sódio (CS). Estes sistemas (LPS/CS) foram caracterizados morfológicamente por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a quantidade de água (em %) determinada pelo método de titulação de Karl-Fisher. O sistema LPS/CS foi utilizado como biocatalisador na preparação do oleato de *n*-pentila, onde foi avaliado o efeito do solvente orgânico. Os solventes com  $\log P > 2,5$  foram os mais eficientes na catálise enzimática. Usando tolueno ( $\log P 2,50$ ) e *n*-heptano ( $\log P 4,0$ ), as conversões em ésters foram de 39 e 58%, respectivamente. Foram realizados os estudos de acilação da D-ribono-1,4-lactona via catálise enzimática. Foram avaliados diversos parâmetros, tais como o comprimento da cadeia alquílica do doador acila e a utilização de lipases de diversas procedências (lipases de *Candida antactica* B (CALB) e de *Pseudomonas cepacia* (LPS, PS-D e PS-C)). Para as reações catalisadas pelo sistema LPS/CS, as conversões (%) em hexanoato, octanoato, decanoato e laurato de D-ribonolactona variaram de 50-90%. Nestas reações a regioseletividade da LPS foi moderada, e através de análises de cromatografia gasosa (CG), verificou-se a formação de misturas de compostos, sendo um deles majoritário, independente do doador acila utilizado. A CALB foi seletiva na acilação da D-ribonolactona com ácido láurico, formando como produto majoritário 5-O-lauril-D-ribono-1,4-lactona com conversão >99% em 24h de reação. As reações de acilação da D-ribonolactona com o ácido láurico catalisadas pelos sistemas PS-C/CS e PS-D/CS, também apresentaram alta regioseletividade. Foi observada a formação de um único produto, e as análises de CG e espectroscópicas de infra-vermelho e de ressonância magnética nuclear indicaram tratar-se do derivado 2- ou 3-lauril-1,4-D-ribono-1,4-lactona. Para fins comparativos, a lactona mono-acilada na posição 5 foi preparada em 3 etapas por procedimentos clássicos e já descritos na literatura. O padrão sintetizado quimicamente confirmou a formação do derivado 5-O-lauril-D-ribono-1,4-lactona na reação catalisada por LPS/CS. Os resultados obtidos mostram a habilidade e importância do uso de lipases em reações regioseletivas.

## ABSTRACT

Lipase from *Pseudomonas* sp (more specifically *Pseudomonas cepacia*, PSL) was immobilized in sodium caseinate films (SC). These systems (PSL/SC) were morphologically characterized by scanning electronic microscopy (SEM) and the water content (%) was evaluated by the Karl-Fisher methodology. The PSL/SC system was used as a biocatalyst for the preparation of *n*-pentyl oleate, using different organic solvents. Solvents with  $\log P > 2.5$  were the most efficient for the enzymatic catalysis. Using toluene ( $\log P$  2.5) and *n*-heptane ( $\log P$  4.0), the conversions in esters were 39% and 58%, respectively. Studies involving the D-ribone 1,4-lactone were carried out, via biocatalysis. Several parameters were evaluated, such as alkyl chain length of acyl donor, and the use of lipases from various sources (lipase from *Candida antarctica* B (CALB) and from *Pseudomonas cepacia* (PSL, PS-D and PS-C)). For the reactions catalysed by the PSL/SC system; the conversions (%) in D-ribonolactone hexanoate, octanoate, decanoate and laurate were in the range of 50-90%. In these reactions, the PSL regioselectivity was only moderate and through gas chromatography (GC) analysis a compound mixture was observed, one component being the major component regardless of the acyl donor. CALB was selective for the D-ribonolactone acylation with lauric acid, forming 5-O-lauryl-D-ribono 1,4 lactone in 99% conversion in a 24 h reaction as the main product. The acylation reactions of D-ribonolactone with lauric acid catalysed by PS-C/SC and PS-D/SC systems also presented high regioselectivity. Only one product was formed, and after GC, infra-red (IR) spectroscopic analysis and nuclear magnetic resonance (NMR), the formation of 2- or 3- lauryl-1,4- D-ribonolactone was proposed. For comparison, the 5-monoacyl lactone was prepared in three steps using classical procedures described in literature. This compound gave the same analytical and spectroscopic analysis result as that obtained via enzymatic catalysis using the PSL/SC system, that is 5-O-lauryl-D-ribono-1,4-lactone. The results obtained in this study, showed the ability and importance of the lipases in regioselective reactions.

# 1 – INTRODUÇÃO

## 1.1 – Enzimas

A história da bioquímica tem íntima relação com o estudo das enzimas, estas macromoléculas biológicas notáveis, que catalisam todas as reações que ocorrem nas células vivas<sup>1</sup>. Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA com propriedades catalíticas, todas as enzimas são proteínas<sup>2,3</sup>.

As enzimas são catalisadores versáteis, existindo para cada tipo de reação orgânica um processo enzimático equivalente<sup>4</sup>. As velocidades das reações por elas catalisadas são maiores, por fatores de  $10^6$  a  $10^{14}$  vezes, do que as correspondentes não catalisadas. Para organismos vivos, aumentos de velocidade desta ordem de grandeza são importantes, pois permitem a ocorrência de reações a velocidades razoáveis mesmo nas condições normais que existem nas células vivas (pH aproximadamente neutro e temperatura próxima a  $35^{\circ}\text{C}$ )<sup>1</sup>.

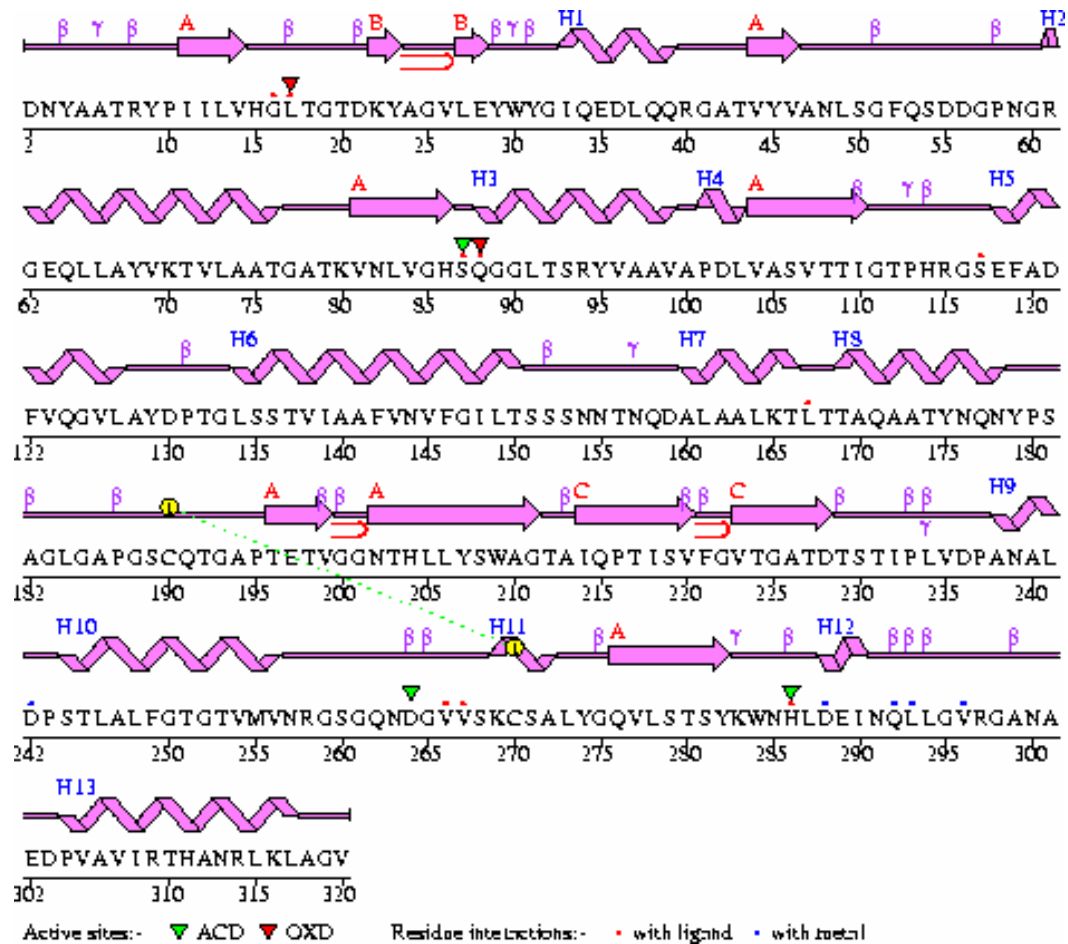
As proteínas têm um alto grau de especificidade diante dos respectivos substratos, o que faz com que raramente se formem produtos laterais ou secundários<sup>5</sup>. São quirais, podendo apresentar alta enantiosseletividade<sup>4,6,7,8,9</sup>.

As enzimas são formadas por uma longa cadeia de aminoácidos ligados através de ligações peptídicas, e a seqüência exata de aminoácidos da cadeia protéica é denominada estrutura primária. A conformação tridimensional dessa seqüência é chamada de estrutura secundária e a disposição espacial destas estruturas é denominada estrutura terciária<sup>5</sup>.

A **Figura 1** descreve as estruturas primária e secundária da lipase de *Pseudomonas* sp. As letras maiúsculas referem-se à seqüência de aminoácidos que compõem a estrutura primária da lipase, e a faixa rosa à estrutura secundária da mesma<sup>10</sup>.

As lipases são enzimas da família das hidrolases, que em seu meio natural hidrolisam triacilgliceróis aos correspondentes ácidos carboxílicos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicericóis.



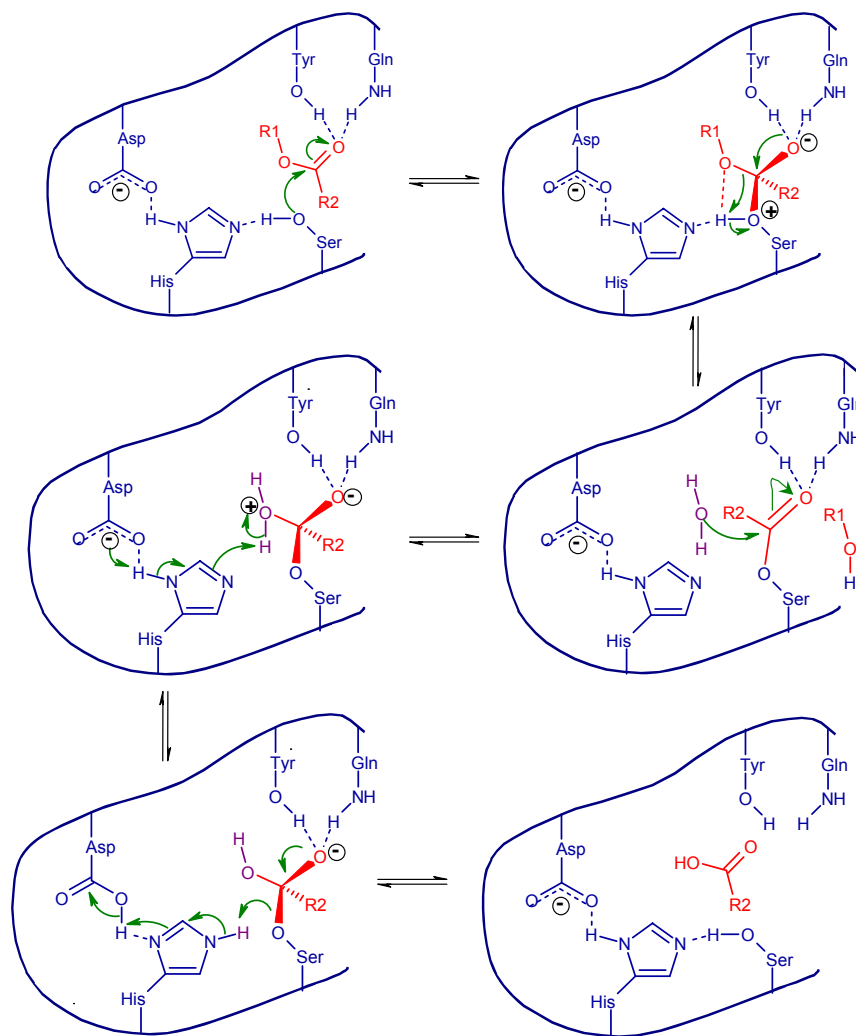


**Figura 1** - Sequência de aminoácidos da estrutura cristalina da lipase de *Pseudomonas sp*<sup>10</sup>.

Na mesma figura pode-se observar também os aminoácidos que fazem parte do sítio catalítico desta enzima, destacados pelos triângulos verdes, e os da cavidade oxianion destacados pelos triângulos vermelhos.

A cavidade oxianion constitui uma parte muito importante de algumas classes de enzimas, sobretudo das lipases e proteases, estabilizando o oxianion formado no ataque nucleofílico da serina sobre o grupo carbonila do substrato, primeira etapa do mecanismo proposto para as reações catalisadas por lipases<sup>11,12</sup>.

A **Figura 2** mostra uma proposta para o mecanismo de hidrólise de um éster genérico, catalisada por uma lipase. Todas as reações catalisadas por lipases têm mecanismos similares a este, diferindo apenas as espécies eletrofílicas e nucleofílicas envolvidas.

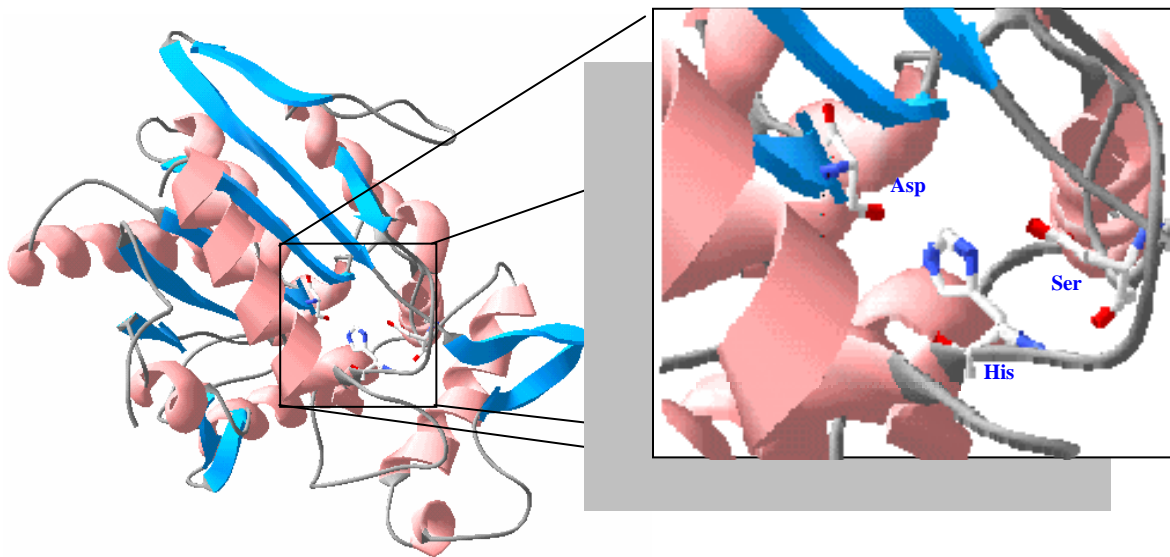


**Figura 2-** Mecanismo de hidrólise de éster catalisada por lipase<sup>12</sup>.

Os sítios ativos das enzimas ocupam somente uma pequena proporção do volume total destas, e estão usualmente na superfície ou próximos e, portanto devem estar acessíveis às moléculas dos substratos. Estes contêm aminoácidos cujas cadeias laterais formam uma superfície tridimensional complementar ao substrato, apresentando uma conformação e composição química determinante para a especificidade da catálise enzimática<sup>2</sup>.

No Banco de Dados de Proteínas (PDB), encontram-se catalogados 30.764 tipos de macromoléculas (entre proteínas, peptídeos, vírus, carboidratos, ácidos nucleicos e complexos proteína/ácido nucleico). Várias enzimas têm sua seqüência de aminoácidos e estrutura tridimensional determinadas através de cristalografia de raios-X e RMN-2D.

Na **Figura 3**, pode-se observar a representação gráfica da estrutura terciária da lipase de *Pseudomonas* sp com a ampliação do seu sítio ativo, que é composto dos resíduos de aminoácido Ser 87, His 286 e Asp 264<sup>10</sup>.



**Figura 3** - Representação gráfica da estrutura tridimensional da lipase de *Pseudomonas* sp<sup>10</sup>.

## 1.2 – Classificação das enzimas

Muitas enzimas podem ser nomeadas pela adição do sufixo “ase” ao nome do substrato ou da reação que está sendo catalisada. Por exemplo, a urease catalisa a hidrólise da uréia, e a DNA polimerase catalisa a polimerização de nucleotídeos para formar o DNA. Para outras enzimas, como a pepsina e a tripsina, seus nomes não têm relação alguma com os substratos ou reações que catalisam.

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM) classifica as enzimas em seis classes, com suas subclasses, de acordo com o tipo de reações que catalisam (**Tabela 1**)<sup>2,8</sup>.

**Tabela 1** - Classificação das enzimas segundo a IUBMB<sup>2</sup>.

<b>Classes</b>	<b>Tipos de reações catalisadas</b>
1. Oxidoreduases	Transferência de elétrons (íons híbridos ou átomos de H).
2. Transferases	Reações que envolvem transferência de pequenos grupos (CO, CN).
3. Hidrolases	Reações de hidrólise de ésteres e de amidas, e transesterificação.
4. Liasas	Adição de grupos a duplas ligações, ou formação de duplas ligações por remoção de grupos.
5. Isomerases	Transferência de grupos dentro das moléculas, produzindo formas isoméricas.
6. Ligases	Formação de ligações C-O, C-S, C-N e C-C por reações de condensação acoplada a clivagem de ATP

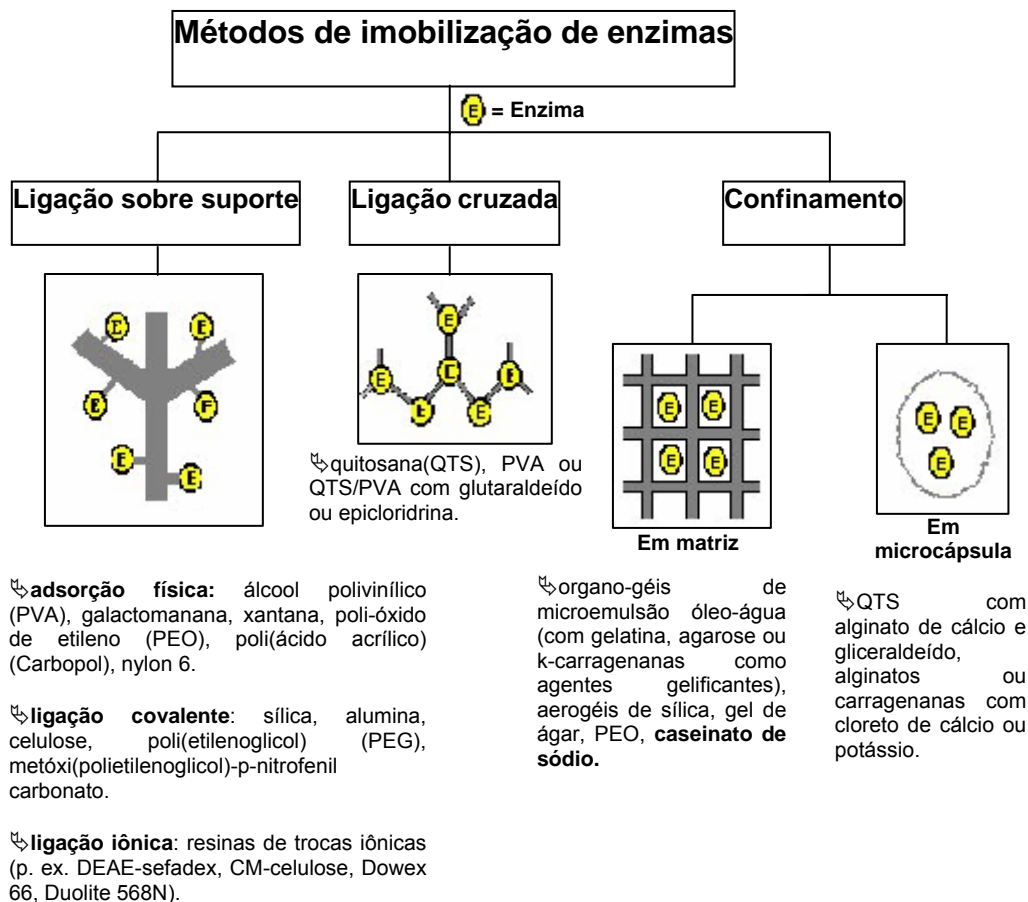
Muitas enzimas são cataliticamente ativas em ambientes hidrofóbicos, com eficiência similar àquela encontrada em solução aquosa. Porém, estes catalisadores estão sujeitos à inativação em meio orgânico, por fatores químicos, físicos ou biológicos. Visando protegê-los das interações com o solvente, técnicas de imobilização têm sido desenvolvidas<sup>4,13,14,15</sup>.

### 1.3 – Imobilização de Enzimas

A imobilização de enzimas é uma das importantes áreas da biotecnologia, e vários métodos vêm sendo desenvolvidos com este fim, tais como a adsorção em materiais insolúveis, confinamento em géis poliméricos, encapsulamento em membranas, ligações cruzadas com o auxílio de reagentes bi- ou multifuncionais, e ligações em suporte insolúvel<sup>4,16</sup>.

Para muitas enzimas a imobilização confere uma estabilidade adicional frente a várias formas de desnaturação, além de fornecer uma maneira fácil de recuperá-las e reutilizá-las, sem perda considerável da atividade <sup>4,17</sup>.

A **Figura 4** ilustra as principais técnicas de imobilização descritas na literatura.

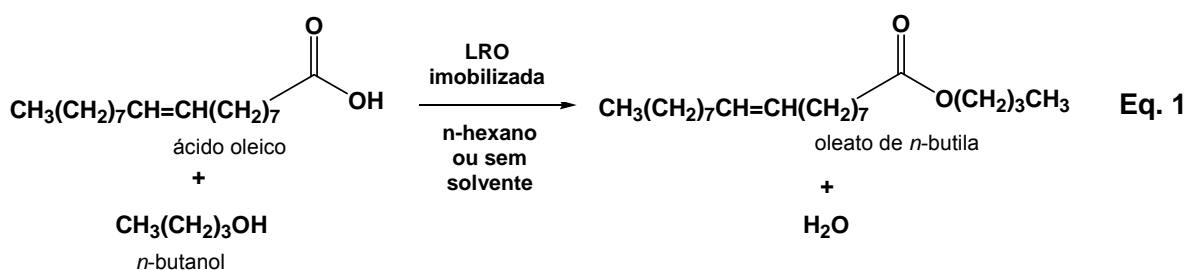


**Figura 4** - Principais métodos de imobilização de enzimas (adaptado da ref. 4).

A adsorção é um dos métodos de imobilização mais utilizados. É o processo no qual as enzimas ligam-se a um suporte sólido por interações intermoleculares, tais como as de van der Waals, ligações de hidrogênio e/ou iônicas. Vários materiais podem ser utilizados com esta finalidade, e a escolha de um deles depende de suas propriedades como força mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção da enzima e custo <sup>18</sup>.

Em processos de adsorção, o tamanho da proteína a ser imobilizada, assim como a área superficial, porosidade e o tamanho dos poros do material adsorvente são parâmetros relevantes na obtenção de sistemas enzima/suporte eficientes<sup>14</sup>.

Recentemente, Ghamgui e col.<sup>19</sup> reportaram a imobilização por adsorção da lipase de *Rhizopus orizae* (LRO) em cinco suportes diferentes (sílica gel 60, amberlite IRC-50, carboximetilsefadex, celite 545 e CaCO<sub>3</sub>). Os sistemas foram utilizados como catalisadores na síntese do oleato de *n*-butila, que é útil como aditivo para veículos a diesel, plastificante para cloreto de polivinila, agente resistente a água, e em fluidos hidráulicos (**Equação 1**).

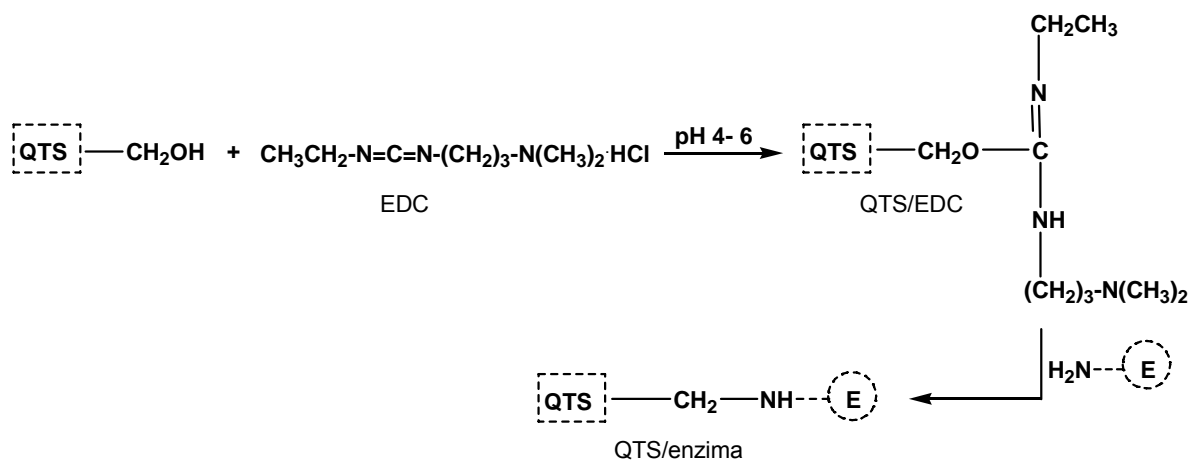


Foram avaliados parâmetros como a quantidade de enzima utilizada, teor de água dos sistemas e concentração dos substratos. A reação foi efetuada em *n*-hexano e sem solvente para fins comparativos, e outros ésteres foram preparados para verificar a influência do tamanho da cadeia alquílica dos ácidos e dos álcoois nas respectivas conversões. Foram também determinadas as atividades da lipase imobilizada nos cinco suportes. O CaCO<sub>3</sub> foi o material mais eficiente para a imobilização da LRO<sup>19</sup>.

As enzimas podem também ser imobilizadas através da formação de ligações covalentes com um material insolúvel em água, pela fixação em uma matriz por ligação covalente, ou pela formação de ligações cruzadas em uma matriz, utilizando agentes bifuncionais. Ambos procedimentos envolvem a modificação química de um resíduo de aminoácido da enzima<sup>20</sup>.

A quitosana (poli-*N*-acetilglucosamina) é um biopolímero catiônico derivado da desacetilação da quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza. Este biopolímero tem grupos hidroxilas que, devidamente ativados, podem ser substituídos por grupamentos amino das enzimas, que ficam desta forma ligadas covalentemente ao suporte. Ligações cruzadas utilizando glutaraldeído, que pode ligar-se aos grupos amino tanto da enzima quanto da quitosana, também têm sido reportadas<sup>21,22,23</sup>.

Wu e Chiou<sup>24</sup> imobilizaram a lipase de *Candida rugosa* (LCR) em duas formas esféricas (seca e úmida) de quitosana (QTS), após ativação dos grupamentos hidroxila com hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) (**Esquema 1**).



**Esquema 1** – Imobilização de enzimas pelo método da ativação com EDC.

As propriedades da LCR imobilizada nas esferas de quitosana seca e úmida foram avaliadas e comparadas. A imobilização conferiu à enzima uma maior estabilidade a mudanças de pH e temperatura. Foi observado um aumento de 2,11% na atividade da enzima imobilizada em quitosana úmida, frente a hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NPP), a 30°C e pH 9. A enzima imobilizada em ambas pérolas de quitosana manteve cerca de 80% de sua atividade inicial após 10 reutilizações<sup>24</sup>.

A imobilização por microencapsulação ou em matriz consiste em confinar o biocatalisador em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula. A vantagem desta técnica é que a enzima não interage quimicamente com o suporte, o que evita a sua desnaturação. Como desvantagem tem-se a diminuição da velocidade de difusão dos substratos e produtos através da membrana<sup>14</sup>.

O caseinato de sódio (CS) é um exemplo de suporte para imobilização em matriz polimérica. Este biopolímero forma filmes insolúveis em vários solventes orgânicos, e tem sido utilizado para imobilizar enzimas e células inteiras, com aplicação em síntese de ésteres e redução de compostos carbonilados<sup>25,26,27,28,29</sup>.

Vários outros trabalhos têm sido reportados tratando de imobilização de várias classes de enzimas, nos mais diversos suportes<sup>30,31,32,33,34</sup>.

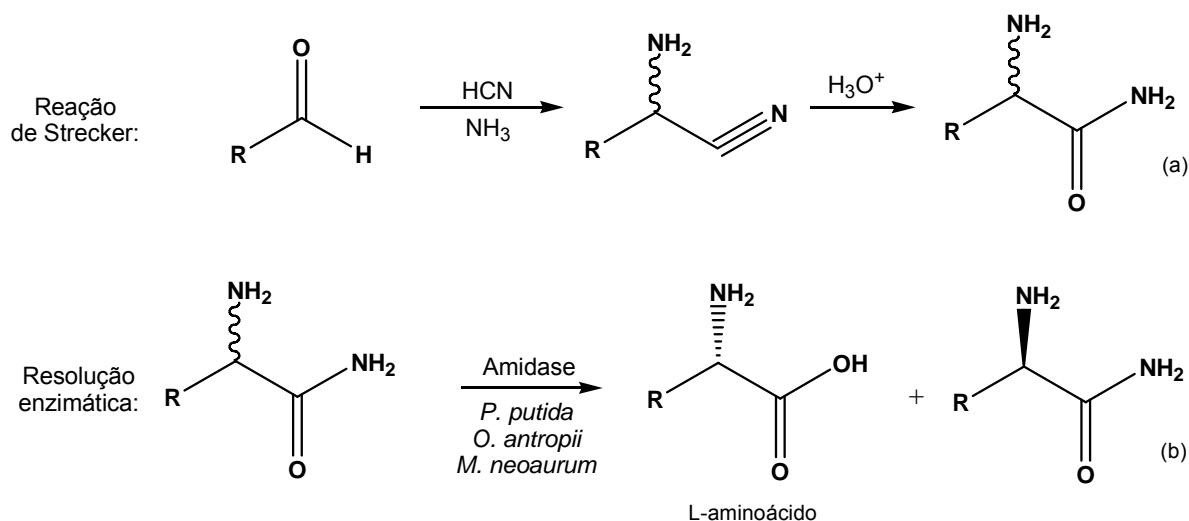
#### **1.4 – Aplicações das enzimas**

O emprego crescente de enzimas na indústria justifica-se pela especificidade e eficiência com que estas catalisam as diferentes reações<sup>35</sup>.

A companhia química holandesa DSM utiliza biocatálise, biotransformação e tecnologias de fermentação, juntamente com métodos químicos, na produção de insumos. Cita-se por exemplo, a síntese de L-aminoácidos não-naturais, que atuam como materiais de partida para compostos farmacêuticos. A demanda destes aminoácidos é grande, e eles não podem ser produzidos através de fermentação, ao contrário da maior parte dos 20 aminoácidos naturais.

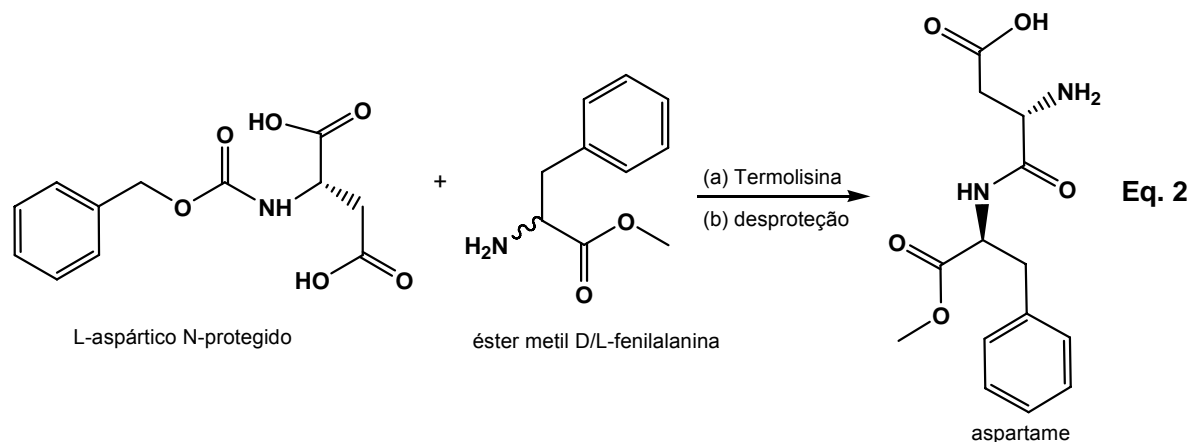


A produção de L-aminoácidos esta baseada na resolução de amidas racêmicas de aminoácidos, que são sintetizadas a partir de aldeídos, através da síntese de Strecker<sup>35</sup> (**Esquema 2**). As enzimas utilizadas foram as amidases de *Pseudomonas putida*, *Mycobacter neoaurum* ou *Ochrobactrum antropii*, que são específicas e enantiosseletivas frente a vários substratos<sup>35</sup>.



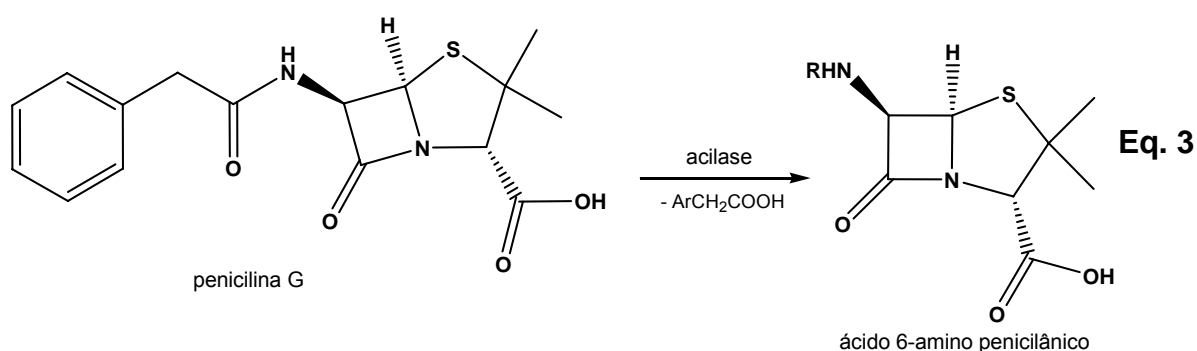
**Esquema 2** – Rotas sintéticas para preparação de aminoácidos racêmicos (a) e L-aminoácidos (b).

A Holland Sweetener Company produz aspartame (éster metil L- $\alpha$ -aspartil-L-fenilalanina) usando uma enzima proteolítica, a termolisina, para catalisar a formação deste dipeptídeo a partir do ácido L-aspartico N-protetido e éster metil D/L-fenilalanina (**Equação 2**). O aspartame é um adoçante de baixo teor calórico<sup>35</sup>.



Outra aplicação de enzimas na indústria envolve a produção da penicilina G/V por processo de fermentação usando cepas de *Penicillium chrysogenum*, ou ainda cepas melhoradas através de engenharia genética<sup>35</sup>.

Muitas das penicilinas, por exemplo penicilina G, podem ser convertidas por uma acilase aos ácidos 6-aminopenicilânicos que atuam como materiais para a síntese de penicilinas semi-sintéticas, resultando na obtenção de vários derivados de penicilina com diferentes propriedades antibióticas (**Equação 3**).



Devido às suas propriedades, as enzimas têm também vasta aplicação na síntese orgânica<sup>4</sup>. Seu uso como catalisadores em reações sintéticas em solventes orgânicos não é recente, sendo que no início do século XX surgiram as primeiras aplicações<sup>36,37,38,39</sup>.

As reações enzimáticas, ao contrário das catalisadas por reagentes químicos, ocorrem em condições relativamente suaves<sup>5</sup>. Porém, as enzimas termoestáveis, que são geralmente isoladas de organismos termofílicos, têm se tornado objeto de muitas investigações. Além da alta estabilidade térmica, algumas destas proteínas são resistentes a condições extremas de acidez e alcalinidade. Desta forma, a utilização das enzimas termoestáveis na indústria alimentícia, na fabricação de papel, detergentes e fármacos, e na remoção de resíduos tóxicos e drenagem para óleos têm sido extensivamente estudadas<sup>40</sup>.

Haki e Rakshit<sup>40</sup> revisaram recentemente trabalhos que reportam o uso de enzimas termoestáveis em processos industriais, indicando os microorganismos extremófilos dos quais derivam estas proteínas.

A **Tabela 2** apresenta algumas das conversões biocatalíticas e aplicações industriais de enzimas termoestáveis.

**Tabela 2** – Reações biocatalisadas e aplicações de algumas enzimas termoestáveis.

Enzima	Faixa de temp. (°C)	Bioconversões	Aplicações
$\alpha$ -Amilase (de bactéria)	90-100	Amido→xaropes de dextrose	Hidrólises de amido, preparo de bebidas fermentadas, cozimentos, detergentes
$\alpha$ -Amilase (de fungo)	50-60	Amido→xaropes de dextrose	Produção de maltose
Pululanase	50-60	Amido→xaropes de dextrose	Produção de xaropes de glicose
Xilanase	45-65,105 <sup>a</sup>	poupa tratada→xilana + lignina	Indústria de polpa e papel
Quitinase	65-75 <sup>b</sup>	Quitina→quitobiose Quitina→N-acetilglicosamina (quitibiase) N-acetilglicosamina→glicosamina (deacetilação) Quitina→quitosana (deacetilase)	Alimentos, cosméticos, farmacêuticos, agroquímicos
Celulase	45-55,95 <sup>c</sup>	Celulose→glicose	Hidrólise de celulose, degradação de polímeros em detergentes
Protease	65-85	Proteína→aminoácidos e peptídeos	Preparo de bebidas fermentadas, cozimentos, detergentes, indústria de couro
Lipase	30-70	Remoção de gordura, hidrólises, interesterificações, alcoólises, aminólises	Lactínios, óleos, detergentes, polpa, farmacêuticos, cosméticos e indústria de couro
DNA polimerase	90-95	Amplificações de DNA	Engenharia genética/PCR

<sup>a</sup>Xilanase de *Thermotoga* sp; <sup>b</sup>Dentro desta faixa, a atividade enzimática foi alta; <sup>c</sup>Celulases de *Thermotoga* sp.

As enzimas hidrolíticas (lipases, proteases, amilases e celulasas) são as mais freqüentemente usadas em síntese orgânica, e devido às suas propriedades e vantagens na utilização, as lipases têm sido amplamente investigadas<sup>14,15,41</sup>.

### 1.4.1 – Lipases e Aplicações

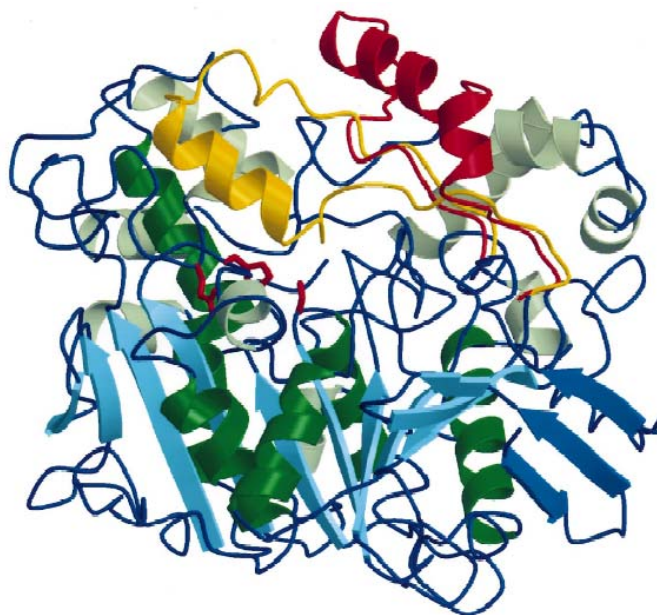
As lipases verdadeiras (triacilglicerol acilhidrolases E.C.3.1.1.3) são hidrolases que em seu ambiente natural catalisam a hidrólise total ou parcial de triacilglicerol (TAG) fornecendo diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG), glicerol e ácidos graxos livres. Essas enzimas apresentam uma capacidade única de agir apenas na interface óleo/água. Essa definição exclui as enzimas que agem em ésteres solúveis em água (esterases) ou que hidrolizam outros lipídeos (acilhidrolases, colesteroesterase, tioesterases e outras)<sup>42</sup>.

Estas enzimas encontram-se largamente distribuídas na natureza em animais, vegetais e microorganismos (fungos e bactérias). São, em sua maioria, extracelulares, favorecendo a sua extração, isolamento e purificação<sup>41,43</sup>.

Recentemente, Lima e col.<sup>44</sup> purificaram e caracterizaram uma lipase da bactéria *Bacillus megaterium* não descrita na literatura. A enzima foi utilizada como biocatalisador em meio orgânico, apresentando propriedades cinéticas e de estabilidade de grande interesse para aplicações em biocatálise.

As lipases apresentam massa molar entre 40-50 KDa com cerca de 300 resíduos de aminoácidos. São glicoproteínas, nas quais a parte glicosilada circunda o sítio ativo. Este é formado pela tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu, estando freqüentemente protegido por uma “tampa” hidrofóbica que sofre uma mudança conformacional ao interagir com interface lipídeo/água<sup>11</sup>.

A **Figura 5** mostra o diagrama de fitas da lipase de *Candida rugosa* (LCR) em seus dois estados superpostos. Em vermelho está a representação da tampa aberta da lipase e, em amarelo a sua conformação fechada, protegendo o sítio ativo também em vermelho<sup>11</sup>.

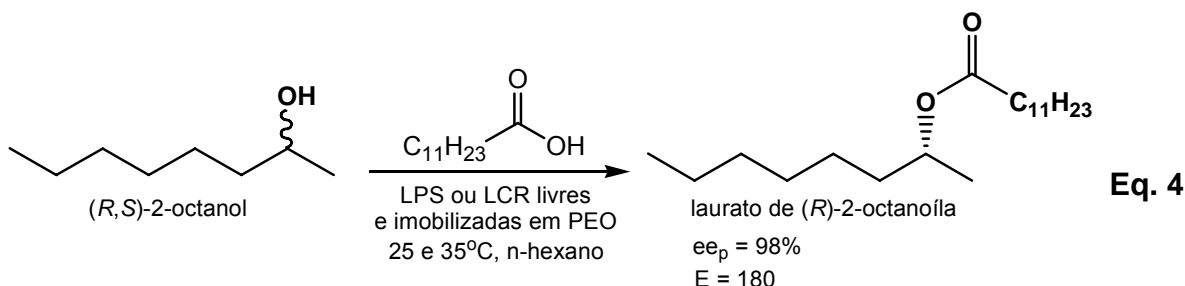


**Figura 5** - Sobreposição das estruturas tridimensionais (aberta e fechada) da LCR11. [produzida usando MOLSCRIPT e Raster3D]

Recentemente, Miled e col.<sup>45</sup> estudaram a inibição de várias lipases (gástricas humana e de cachorro, pancreática humana, e de *Humicola lanuginosa*) através do inibidor fosfonato de octil-undecila, medindo as subseqüentes modificações de suas respectivas mobilidades eletroforéticas. Foram determinados os valores experimentais para os pontos isoelétricos da lipase nativa (fechada) e inibida (aberta), que concordaram com os cálculos teóricos baseados no potencial eletrostático. Os resultados mostraram que há uma diferença significativa nos pontos isoelétricos entre as formas aberta e fechada para as quatro enzimas investigadas. A análise de eletroforese mostrou ser uma ferramenta útil para este estudo, além de ser um método experimental facilmente realizado.

Como vantagens na utilização de lipases pode-se citar o baixo custo, a sua versatilidade catalítica, o fato de não requererem cofatores, atuarem em faixas de pH bastante amplas, serem regiosseletivas e estereosseletivas<sup>46,47,48,49,50,51</sup>.

Nascimento e col.<sup>52</sup> utilizaram o poli(óxido de etileno) (PEO) para imobilizar as lipases de *C. rugosa* e de *Pseudomonas cepacia*\* (LPS) e estes sistemas foram usados para catalisar a síntese de ésteres em solvente orgânico. Entre outros parâmetros reacionais avaliados (tempo, concentração de enzima, temperatura e influência do solvente na preparação do laurato de *n*-pentila), as lipases livres e imobilizadas foram usadas na resolução do (*R,S*)-2-octanol, com o ácido láurico como doador acila **(Equação 4)**.



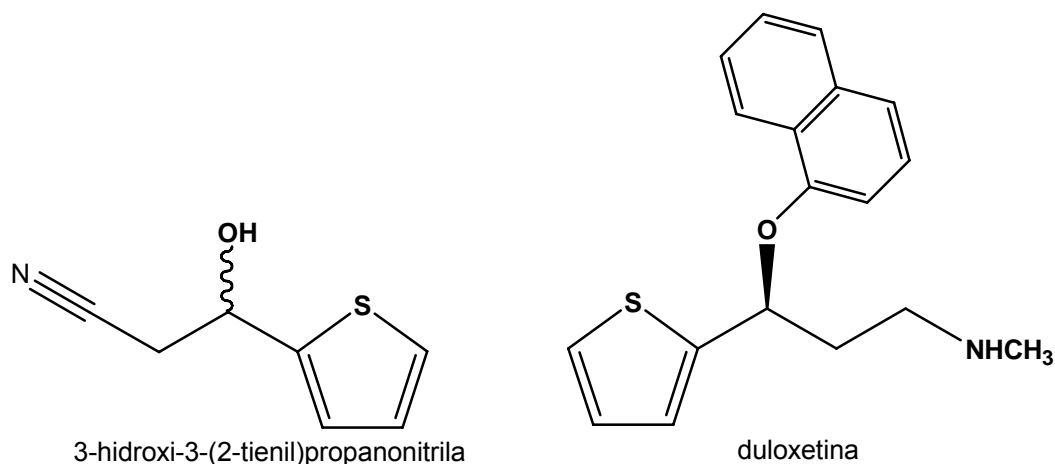
As duas lipases mostraram preferência pelo álcool *R*. O melhor resultado foi obtido com o sistema LPS/PEO com excesso enantiomérico do produto ( $ee_p$ ) de 98%, e razão enantiomérica (*E*) de 180, a 25°C em 25 dias<sup>52</sup>.

No mesmo trabalho foi investigada a esterificação de dois ácidos racêmicos com *n*-butanol, *n*-hexanol e ciclohexanol, catalisada pela LCR livre ou imobilizada em PEO. Todas as reações comprovaram a preferência da enzima pelo enantiômero *R*, com  $ee_p$  de 79-97% e 6-49% para a esterificação dos ácidos (*R,S*)-2-(4-clorofenoxi)propiónico e (*R,S*)-2-bromo hexanóico, respectivamente.

A estereosseletividade oriunda da catálise por lipases explica o seu enorme potencial em processos químicos como catalisadores em vários ramos da indústria e da medicina<sup>53,54</sup>.

\* Esta lipase passou a ser denominada de *Burkholderia cepacia*.

Kamal e col.<sup>55</sup> estudaram a resolução enzimática do 3-hidroxi-3-(2-tienil)propanonitrila com várias lipases. Este composto enantiomericamente puro serve como precursor na síntese da duloxetina, um agente antidepressivo extremamente eficiente no tratamento de distúrbios psiquiátricos. A **Figura 6** mostra as estruturas dos compostos acima citados.



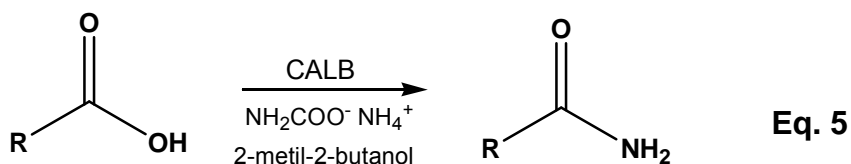
**Figura 6** - Estruturas da duloxetina e de seu precursor racêmico.

Em solvente orgânico, as lipases catalisam a transferência de grupos acilas de compostos doadores para uma ampla faixa de compostos aceptores diferentes da água. Dependendo do tipo do doador acila e do aceitor, as reações catalisadas por lipases incluem esterificação, tioesterificação, amidação, transesterificação, síntese de peptídeos e formação de perácidos. Estes últimos podem ser utilizados na síntese de epóxidos a partir de compostos insaturados<sup>56,57</sup>.

Nos últimos anos têm sido realizados vários estudos visando a utilização de lipases em meio orgânico, visto que muitos dos substratos empregados em síntese são insolúveis em água<sup>35,58,59,60</sup>.

Lima e col.<sup>61</sup> caracterizaram o extrato lipolítico de uma cepa selvagem do fungo *Penicillium aurantiogriseum* cuja lipase é bastante utilizada na produção de monoacilglicerídeos. O preparado enzimático mostrou ótima estabilidade em solventes orgânicos apolares, o que representa uma facilidade para os processos sintéticos que empregam lipases como catalisadores.

Levinson e col.<sup>62</sup> utilizaram a lipase de *Candida antarctica* B (CALB) para produção de amidas primárias de hidroxiácidos em 2-metil-2-butanol (**Equação 5**). Foram avaliadas as taxas de conversão nas respectivas amidas até sete dias, e os resultados foram comparados com os determinados para o ácido oleico (*cis*-9-octadecenóico).



$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{CH}=\text{CHC}_7\text{H}_{14}$  (oleico);  
 $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHC}_7\text{H}_{14}$  (ricinoleico);  
 $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHC}_9\text{H}_{18}$  (lesquerólico);  
 $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{CH}(\text{OH})\text{CH}=\text{CHCH}(\text{OH})\text{C}_5\text{H}_{10}$  (DOD);  
 $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}=\text{CHCH}(\text{OH})\text{C}_5\text{H}_{10}$  (TOD).

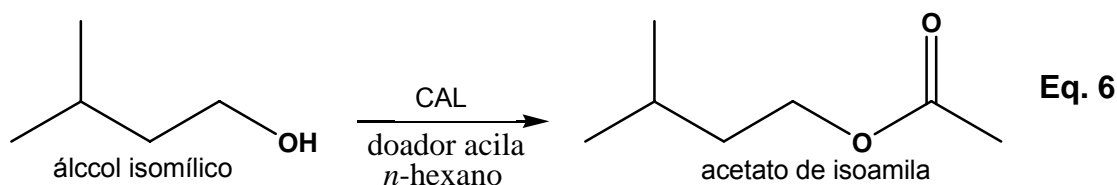
Foram utilizados os monohidroxiácidos ricinoleico (*cis*-12-hidroxi-9-octadecenóico) e lesquerólico (*cis*-14-hidroxi-11-eicosenóico), que são de derivados de fontes vegetais. Os di- e trihidroxiácidos (*E*)-7,10-dihidroxi-8-octadecenóico (DOD) e (*E*)-7,10,12-trihidroxi-8-octadecenóico (TOD) foram obtidos via fermentação bacteriana a partir dos ácidos oleico e ricinoleico<sup>62</sup>.

O ácido lesquerólico foi transformado na respectiva amida com uma elevada taxa de conversão, enquanto o ricinoleico apresentou uma taxa de conversão similar ao ácido oleico. A percentagem de conversão em sete dias foi maior que 93% para todos os substratos testados.

Um outro exemplo da utilização de lipases está na produção de aromatizantes naturais. Quando se utilizam métodos biotecnológicos, particularmente os enzimáticos, esses aromas podem ser caracterizados como “naturais” ou “idênticos aos naturais”, sendo por este motivo, preferidos pelo mercado consumidor<sup>63</sup>.

Recentemente, Romero e col.<sup>64</sup> reportaram a síntese do acetato de isoamila, a partir do álcool isoamílico, catalisada pela lipase de *Candida antactica* (CAL) em *n*-hexano (**Equação 6**).





Diferentes parâmetros reacionais foram explorados, tais como o tipo de doador acila utilizado, o efeito da temperatura, a razão enzima/substrato, e o efeito da concentração dos substratos entre outros. Dentre os ésteres de cadeia curta, que são fragrâncias e flavorizantes largamente usados na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica, o acetato de isoamila é o mais empregado em alimentos (74.000kg/ano), devido ao seu odor de banana.

A seguir serão discutidas algumas das principais propriedades e dos métodos de obtenção do caseinato de sódio, considerando que este biopolímero foi utilizado neste trabalho para imobilização de lipases.

### 1.5 – Caseinato de Sódio

O caseinato de sódio é um sal derivado da caseína, que é a principal proteína existente no leite de vaca, cuja constituição é de aproximadamente 3,5% de proteínas, das quais 2,9% são caseínas e 0,6% são proteínas do soro. O leite é uma solução aquosa de proteínas, lactose, minerais e algumas vitaminas. A caseína é definida como a proteína que precipita quando o leite desnatado é acidificado a pH 4,6 e temperatura 20°C<sup>65,66</sup>.

Estudos baseados na mobilidade molecular, tais como cromatografia, eletroforese, filtração e centrifugação, demonstram a existência de quatro tipos de caseína: a caseína  $\alpha_{s1}$  (50% do total de caseínas), a caseína  $\beta$  (33%), a caseína  $\kappa$  (15%) e a caseína  $\gamma$  em quantidades variáveis. O “s” da caseína  $\alpha$  refere-se à sensibilidade de precipitação frente aos íons cálcio<sup>65-67</sup>.

Embora os prefixos  $\alpha_s$ ,  $\beta$ , etc., definam espécies específicas de proteínas, atualmente reconhece-se que existe uma variedade de tipos de caseínas (variantes genéticas) que possuem pelo menos um resíduo de aminoácido diferente na cadeia polipeptídica. Por exemplo, a caseína  $\alpha_{s1}C$  difere da caseína  $\alpha_{s1}B$  (a variante mais comum) apenas porque na posição 192 da cadeia polipeptídica existe o resíduo glicina ao invés do resíduo ácido glutâmico. Atualmente pode-se identificar as raças das vacas através de uma análise detalhada de uma amostra de leite, para se verificar as proporções destas variantes<sup>65</sup>.

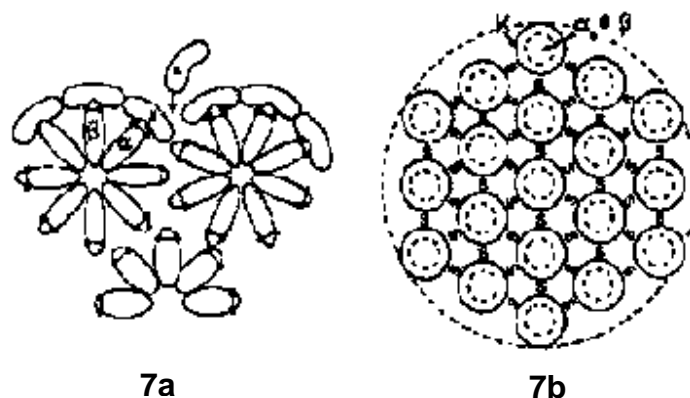
### 1.5.1 – Micelas de Caseína

Cerca de 80-90% de toda caseína do leite está na forma de partículas coloidais aproximadamente esféricas denominadas micelas, que medem de 50 a 200nm de diâmetro, com massa molar de  $10^7$  a  $10^9$ Da<sup>66</sup>.

O conhecimento das micelas de caseína é de grande importância, visto que muitos dos tratamentos em tecnologia do leite influenciam de alguma forma na estabilidade de suas micelas<sup>67</sup>.

Os modelos apresentados para as micelas são puramente hipotéticos, pois as suas estruturas ainda não são bem conhecidas. Supõem-se que essas micelas têm a forma mais ou menos esférica, formada por um grande número de sub-unidades unidas entre elas. Estas sub-unidades medem de 10-20nm de diâmetro e contém de 25 a 30 moléculas de caseína  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\kappa$  em proporções similares àquelas apresentadas para o leite desnatado<sup>65-67</sup>.

Uma primeira teoria sugere que as sub-unidades de caseína  $\alpha_{s1}$  e  $\beta$  formariam núcleos termodinamicamente estáveis em roseta cobertos por camadas periféricas de caseína  $\kappa$  (**Figura 7a**). A segunda apresenta uma estrutura aberta composta de sub-unidades de tamanho uniforme contendo as caseínas  $\alpha_{s1}$  e  $\beta$  no centro e caseína  $\kappa$  na periferia (**Figura 7b**)<sup>66</sup>.



**Figura 7** - Modelos sugeridos para as micelas de  $\alpha$  e  $\beta$  - caseína <sup>66</sup>.

Várias pesquisas têm sido desenvolvidas em torno das propriedades do caseinato de sódio, seja como gel ou na forma de filmes, sobretudo com aplicação em alimentos<sup>68,69,70</sup>. Recentemente, Istarova<sup>71</sup> e col. desenvolveram estudos termodinâmicos, combinando calorimetria e espalhamento de luz laser, para elucidar a origem da interação proteína-biosurfactante entre o caseinato de sódio e fosfolípidos de soja, e a influência desta nas propriedades molecular e funcional da proteína, em particular na sua habilidade para formar espuma.

## 1.6 – Carboidratos

Os carboidratos são assim denominados pelo fato da fórmula geral de muitos deles ser  $C_n(H_2O)_n$ , ou seja, carbono hidratado. São usualmente definidos como poli-hidroxi aldeídos e cetonas, ou substâncias cuja hidrólise produz estas estruturas. Os carboidratos simples são comumente conhecidos como açúcares ou sacarídeos (do latim *saccharum* e do grego *sakcharon*, açúcar)<sup>72,73</sup>.

Os denominados monossacarídeos são os carboidratos mais simples, incluindo açúcares de quatro, cinco e seis átomos de carbono. Os dissacarídeos e polissacarídeos são os carboidratos cuja hidrólise fornece dois ou mais monossacarídeos. A glicose, a sacarose e a celulose são exemplos de mono, di e polissacarídeos, respectivamente<sup>1,72,73</sup>.

Os carboidratos são constituintes essenciais de todos organismos vivos, onde desempenham várias funções nas células, desde estruturais, até como fonte substancial de energia metabólica<sup>72,73</sup>.

Em síntese orgânica, os carboidratos de baixa massa molar são importantes precursores quirais para a obtenção de moléculas com atividade biológica, principalmente devido a seu baixo custo, pelo fato de poderem ser obtidos com alta pureza e por sua abundância na natureza<sup>74</sup>.

Uma restrição no uso de carboidratos com fins sintéticos é a necessidade de protocolos de proteção e desproteção de grupos funcionais, devido a presença de vários grupamentos hidroxilas com reatividade química similar nestas moléculas.

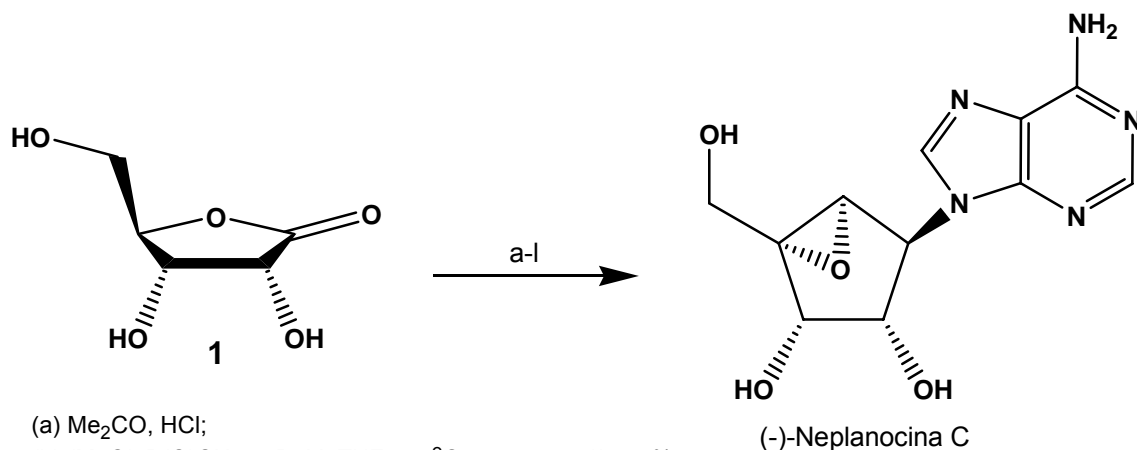
Recentemente, Sartori e col.<sup>75</sup> revisaram a utilização de vários catalisadores heterogêneos na proteção (e desproteção) de grupos funcionais, incluindo as hidroxilas. Este tipo de processo tem recebido atenção no meio científico devido a busca constante de métodos menos nocivos ao meio ambiente, viabilidade do ponto vista econômico, facilidade na separação do produto e sua purificação, e seletividade observada em muitos casos.

Reações de hidrólise, esterificação ou transesterificação catalisadas por enzimas são particularmente empregadas em processos que envolvem protocolos de proteção/desproteção seletivos. Kadereit e Waldmann revisaram a utilização de enzimas como método alternativo para a introdução e remoção de grupos protetores em moléculas polifuncionalizadas<sup>76</sup>.

A utilização de lactonas derivadas de açúcares pode também ser uma boa estratégia para transformações envolvendo carboidratos, pois estes têm seus centros anoméricos protegidos, no seu estado oxidado.

A D-ribono-1,4-lactona (**1**) está entre as aldolactonas mais utilizadas em síntese orgânica, estando disponível comercialmente<sup>77,78,79,80</sup>.

Comin e Rodriguez<sup>81</sup> realizaram, a partir da D-ribono-1,4-lactona **1**, a síntese enantiosseletiva da (-)-Neplanocina C, menor membro da família neplanocina de antibióticos. A rota sintética envolveu doze etapas (**Esquema 3**).

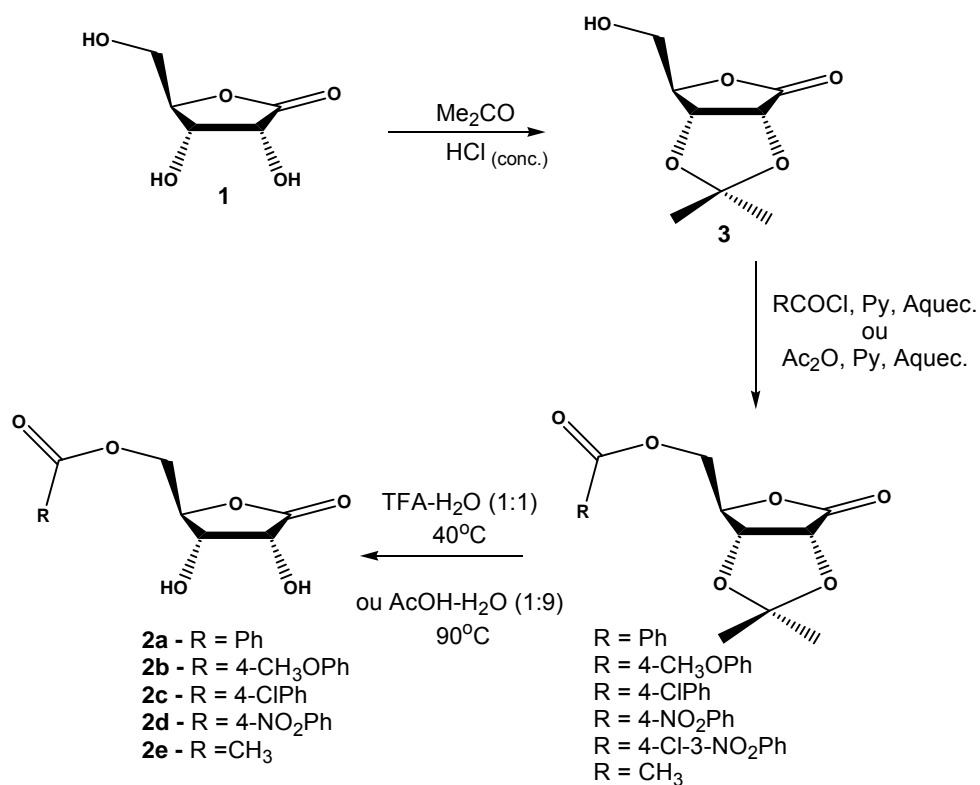


- (a) Me<sub>2</sub>CO, HCl;  
 (b) (MeO)<sub>2</sub>P(O)CH<sub>3</sub>, *n*-BuLi, THF, -78°C → aquec., 1h, 78%;  
 (c) 50% NaH, BnBr, DMF, 0°C, 30min, 92%;  
 (d) KOH, MeOH, aquec., 20h, 77%;  
 (e) Collins, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, aquec., 12h, 80%;  
 (f) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, PhH, 18-coroa-6, 56°C, 40min, 35%;  
 (g) NaBH<sub>4</sub>, CeCl<sub>3</sub>, MeOH, 0°C, 15min, 100%;  
 (h) 6-cloropurina, PPh<sub>3</sub>, DEAD, THF, aquec., 1h;  
 (i) AcOH, 50°C, 24h, 40%;  
 (j) *m*-CPBA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C → aquec., 10dias;  
 (k) NH<sub>3</sub>/MeOH, 70°C, 5h, 75%;  
 (l) H<sub>2</sub>, 10% Pd/C, 3atm, 88%.

### Esquema 3 – Rota da síntese da (-)-Neplanocina C partindo da D-ribonolactona 1.

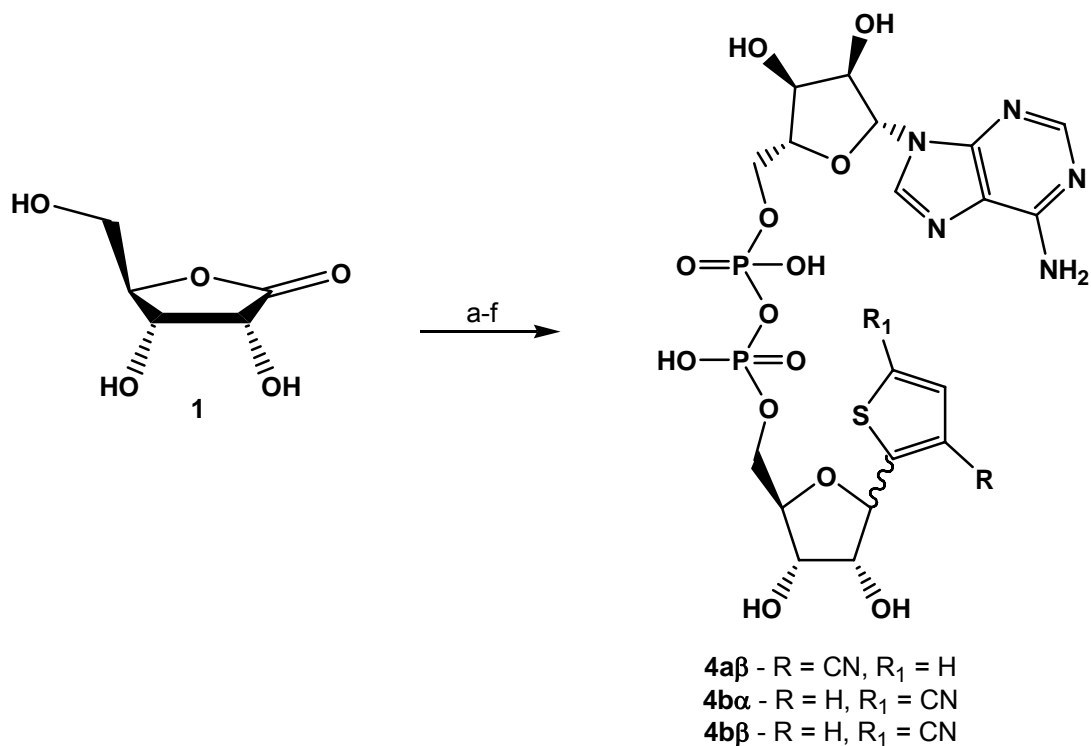
Sá e col.<sup>82</sup> descreveram a síntese de derivados acilados da D-ribonolactona 1 e de nucleosídeos, como possíveis inibidores da enzima gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (gGAPDH). Esta enzima é essencial para o metabolismo da glicose no protozoário *Trypanosoma cruzi*, parasita responsável pela infecção denominada doença de Chagas. Alguns dos compostos sintetizados mostraram moderada inibição frente a gGAPDH.

Derivados 5-acil-ribo-1,4-lactonas (**2a-2e**) foram obtidos com bons rendimentos, por um procedimento em três etapas envolvendo protocolos de proteção e desproteção. A primeira etapa envolve a formação do composto 2,3-isopropilideno-D-ribonolactona (**3**), com subsequente acilação e remoção do grupo protetor (**Esquema 4**).



**Esquema 4** – Rota sintética de derivados 5-acil-D-ribo-1,4-lactona.

Recentemente, três novos dinucleotídeos (4a $\beta$ , 4b $\alpha$  e 4b $\beta$ ) análogos do NAD<sup>+</sup> foram preparados por Batoux e col.<sup>83</sup>, partindo da D-ribonolactona **1** (**Esquema 5**). Estes compostos incorporam uma porção tiofeno no lugar da nicotinamida, sendo hidroliticamente estáveis. Foram avaliados como inibidores da atividade das enzimas adenosina difosfato (ADP) ribosil ciclase, glutamato desidrogenase e Sir2 aciltransferase.



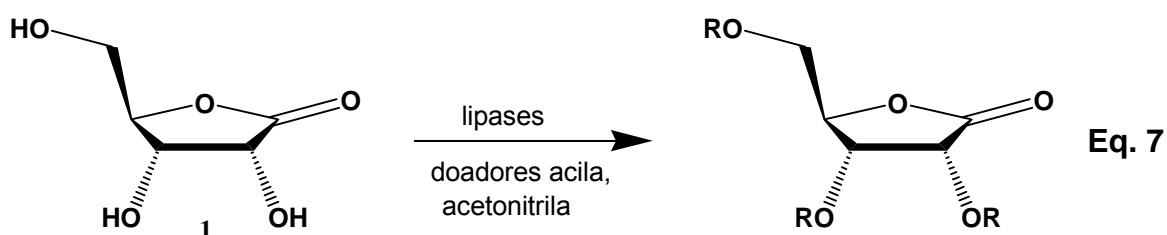
- (a) Me<sub>2</sub>CO, 2,2-dimetoxipropano, resina HCR-W<sub>2</sub> H<sup>+</sup>-Dowex, aquec., 4h, >99%;  
 (b) DMAP, trietilamina, DCM seco, 0°C → cloreto de t-butildimetilsilila, atm. de Ar, DCM, NH<sub>4</sub>Cl<sub>(aq)</sub>;  
 (c) tiofeno-2-carbonitrila ou tiofeno-3-carbonitrila, LDA, THF, -78°C, Me<sub>2</sub>CO, 95%;  
 (d) TMSOTf, Et<sub>3</sub>SiH, DCM, 0°C a t.a., TBAF, 47-50%;  
 (e) POCl<sub>3</sub>, (EtO)<sub>3</sub>PO, H<sub>2</sub>O, 25%;  
 (f) AMP-morfolidato, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, formamida, 30-42%.

**Esquema 5** – Rota sintética para dinucleotídeos análogos de NAD<sup>+</sup> a partir da D-ribonolactona **1**.

## 2 – OBJETIVOS

### 2.1 – Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho é avaliar a regiosseletividade de lipases comerciais como catalisadores na síntese de derivados acilados da D-ribonolactona **1** (Equação 7).



doadores acila: ácidos hexanóico, octanóico, decanóico ou láurico;

R = acil ou H

### 2.2 – Objetivos específicos

Os principais objetivos específicos deste trabalho são:

1. Utilizar filmes de caseinato de sódio para imobilizar as lipases derivadas da *Pseudomonas (Burkholderia) cepacia* LPS, PS-C e PS-D;
2. Realizar estudos de caracterização dos filmes de CS com e sem a LPS imobilizada, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
3. Determinar a quantidade de água nos filmes através de titulação pelo método de Karl Fischer;
4. Avaliar o efeito do solvente orgânico na síntese de oleatos de *n*-pentila com o sistema LPS/CS;
5. Investigar a seletividade da lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada em filmes de CS frente a acilação da D-ribonolactona com os ácidos hexanóico, octanóico, decanóico e láurico;



6. Verificar a regioseletividade da lipase de *Candida antarctica* como catalisador na síntese de lauratos de D-ribonolactona;
7. Sintetizar o padrão 5-lauril-D-ribono-1,4-lactona através de um protocolo sintético de proteção e desproteção;
8. Utilizar as lipases PS-C e PS-D imobilizadas em CS para catalisar a reação de preparação de lauratos de D-ribonolactona, avaliando-as quanto as suas regioseletividades;
9. Caracterizar os produtos por técnicas de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C), cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM).
10. Quantificar a formação dos produtos por técnicas de titulação volumétrica, CG e RMN-<sup>1</sup>H;

### 3 – PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 – Reagentes, Enzimas e Solventes Utilizados

- ✓ D-ribonolactona (Aldrich);
- ✓ *n*-pentanol (Vetec);
- ✓ Ácidos: hexanóico, octanóico e decanóico (Aldrich); láurico e oleico (Vetec); clorídrico (Carlo Erba); trifluoroacético (Merck);
- ✓ Bases: hidróxido de sódio; bicarbonato de sódio; carbonato de potássio (Vetec);
- ✓ Solventes: acetona, acetonitrila, *t*-butanol, diclorometano, *n*-heptano, e *n*-hexano (Vetec); acetato de etila (Grupo Química); cicloexano (Carlo Erba); éter etílico (Dinâmica); éter metil-*t*-butílico (Tedia); tolueno (F. Maia);
- ✓ Solventes deuterados: clorofórmio e dimetilsufóxido (Aldrich); acetona (Cambridge) e água (Sigma);
- ✓ Glicerol (Reagen);
- ✓ Caseinato de sódio (Tatua CO-OP Dairy Ltda);
- ✓ Enzimas: - Lipases de *Burkholderia cepacia*<sup>84</sup> LPS (Amano, 30.000 u/g\*), PS-C “Amano” I (Amano, 1.638U/g\*\*) e PS-D “Amano” I (Amano, 7.44U/g);  
- Lipase de *Candida antarctica*, imobilizada em resina aniônica (Novozyme 435, 10.000 PLU<sup>\*\*\*</sup>)<sup>85</sup>;
- ✓ Sílica gel (60 HF 254 da Merck);
- ✓ Fenolftaleína.

\* u/g é uma unidade da atividade lipolítica da enzima, sendo definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 $\mu$ mol de ácido graxo por um minuto.

\*\* U/g é uma unidade que produz 1,0 $\mu$ mol de álcool 1-feniletílico a partir do acetato de 1-feniletila.

\*\*\* PLU = unidade laurato de propila por grama.

### 3.2 – Equipamentos Utilizados

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada em um aparelho Philips XL30, do Laboratório de Materiais do Departamento de Engenharia Mecânica da UFSC. As amostras foram metalizadas com uma fina camada de ouro em um metalizador modelo P-2 Diod Sputtering System.

As titulações de Karl-Fischer foram efetuadas no titulador 633 Automatic Metrohm AG CH-9100 Herisau.

As reações foram realizadas em um agitador termostaticado do tipo Dubnoff, modelo TE 053.

Os espectros de RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram realizados nos espectrômetros BRUKER AC 200MHz e VARIAN 400MHz, usando tetrametilsilano (TMS) como referência interna.

A espectroscopia de IV foi feita em um espectrofotômetro PERKIN ELMER FTIR 16PC.

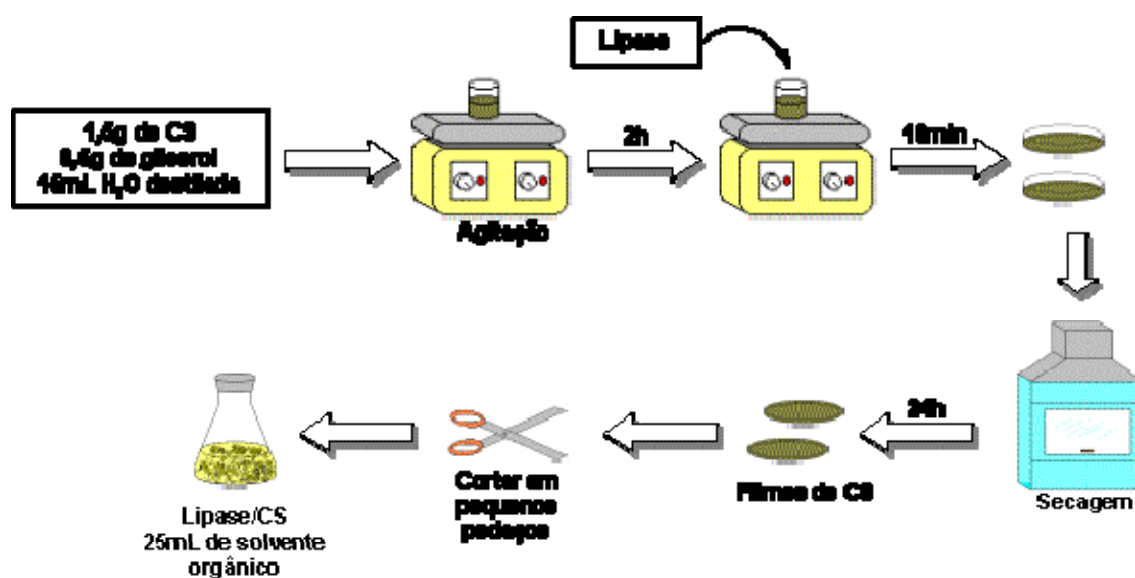
As análises de CG foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu 14B, utilizando uma coluna Shimadzu CBP5-M25.

As análises de CG/EM foram gentilmente efetuadas pelos grupos dos professores Faruk Nome, do Depto. de Química da UFSC (espectrômetro GCMS-Q85050, coluna J & W Cientific DB-5-M30), e Áurea Echevarria Aznar, do Depto. de Química da UFRRJ (espectrômetro SATURN GC/MS, coluna CP-SIL8CB).

### 3.3 – Métodos Experimentais

#### 3.3.1 – Preparação e caracterização dos filmes de caseinato de sódio

Os filmes de caseinato de sódio foram preparados pesando-se 1,5g deste sal e 0,5g de glicerol (agente plastificante), em um béquer de 50 mL. Adicionaram-se 15 mL de água destilada e a mistura foi mantida sob agitação magnética por 2 horas. A seguir adicionaram-se quantidades variadas das lipases (50-100mg), e o sistema foi agitado por mais 10 min. A mistura foi transferida para duas placas de Petri e o solvente evaporado em capela a temperatura ambiente, obtendo-se assim os filmes com a enzima imobilizada. Estes então foram cortados em pedaços de tamanhos similares e transferidos para erlenmeyers contendo solvente orgânico (Figura 8).



**Figura 8** - Preparação dos filmes de CS e imobilização das lipases.

Foram efetuados ensaios de MEV em amostras de filmes de CS com 100mg de LPS imobilizada, e sem a enzima para fins comparativos. Os filmes foram metalizados com uma fina camada de ouro, as suas superfícies analisadas através de um microscópio eletrônico de varredura, e os resultados registrados através de fotomicrografias.

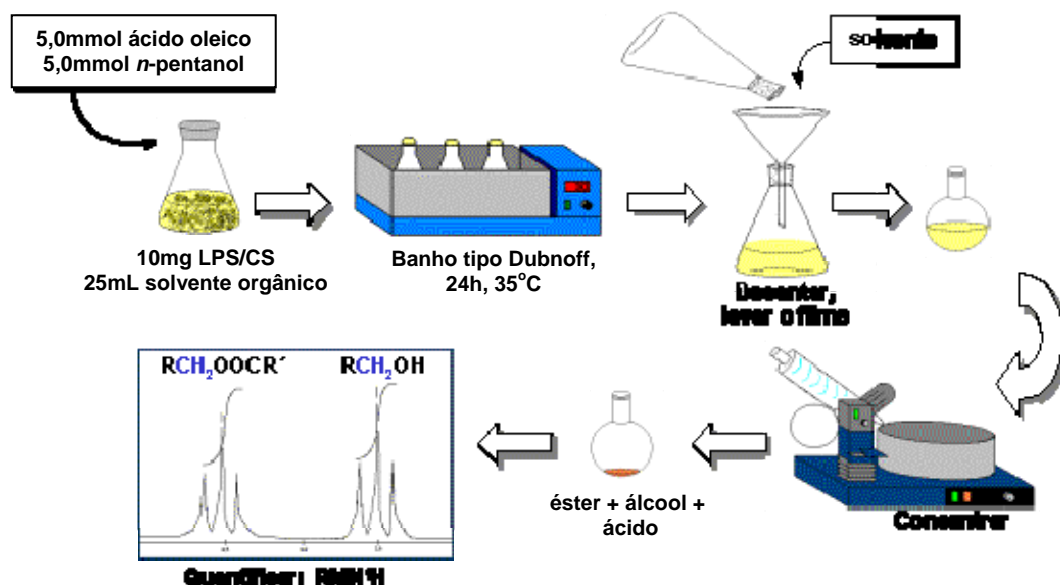
A quantidade de água presente no sistema LPS/CS foi determinada por titulação pelo método de Karl-Fischer. Os filmes de CS sem enzima ou contendo 50mg de LPS imobilizados foram previamente triturados, e amostras de 100mg aproximadamente foram usados para as análises. Os experimentos foram realizados em triplicata e o resultado expresso como média aritmética dos valores.

### 3.3.2 - Preparação de oleatos de *n*-pentila catalisada pelo sistema LPS/CS

Sistemas contendo 10mg de LPS imobilizados em CS foram utilizados para catalisar a esterificação de 5,0mmol (1,59mL) do ácido oleico com 5,0mmol (0,54mL) de *n*-pentanol, em 25mL de solvente orgânico. A mistura reacional foi agitada a 35°C, por 24h.

A formação dos ésteres foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (ccd) utilizando como eluente *n*-hexano:acetato de etila (9:1).

Após as 24 horas, os filmes foram lavados com o próprio solvente até retirar todos reagentes e produtos do filme. O solvente foi evaporado no rota-evaporador e o grau de conversão em produto foi obtido por análises de RMN-<sup>1</sup>H, por comparação da área do pico referente aos hidrogênios metilênicos do álcool (~ 3,5 ppm) com a dos mesmos hidrogênios após a esterificação (~ 4,1 ppm). A **Figura 9** mostra o procedimento para preparação dos oleatos de *n*-pentila.



**Figura 9** - Preparação e quantificação do oleato de *n*-pentila.

### 3.3.3 - Preparação dos derivados acilados da D-ribono-1,4-lactona **1** catalisada pelo sistema LPS/CS

Foram imobilizadas 50mg de LPS em CS, e os sistemas utilizados para catalisar a esterificação de 3 equivalentes (0,75mmol) dos ácidos hexanóico, octanóico, decanóico e láurico com **1** (0,25mmol, 27mg) em 25mL de acetonitrila. Deixou-se então a mistura reacional na temperatura de 35°C agitando por 72h em agitador termostatizado do tipo Dubnoff.

A formação dos ésteres foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (ccd) utilizando como eluente *n*-hexano:acetato de etila (9:1) e sílica gel como fase fixa. Após o término da reação, a mistura reacional foi decantada, e o filme foi lavado 3 x 15mL de acetonitrila para que todos reagentes e produtos fossem retirados do filme. Cessadas as lavagens, foram retiradas alíquotas para determinação da conversão (%) por titulação com solução padronizada de KOH 0,020mol.L<sup>-1</sup> e fenolftaleína como indicador. Alíquotas da reação também foram analisadas por CG (**Figura 10**).

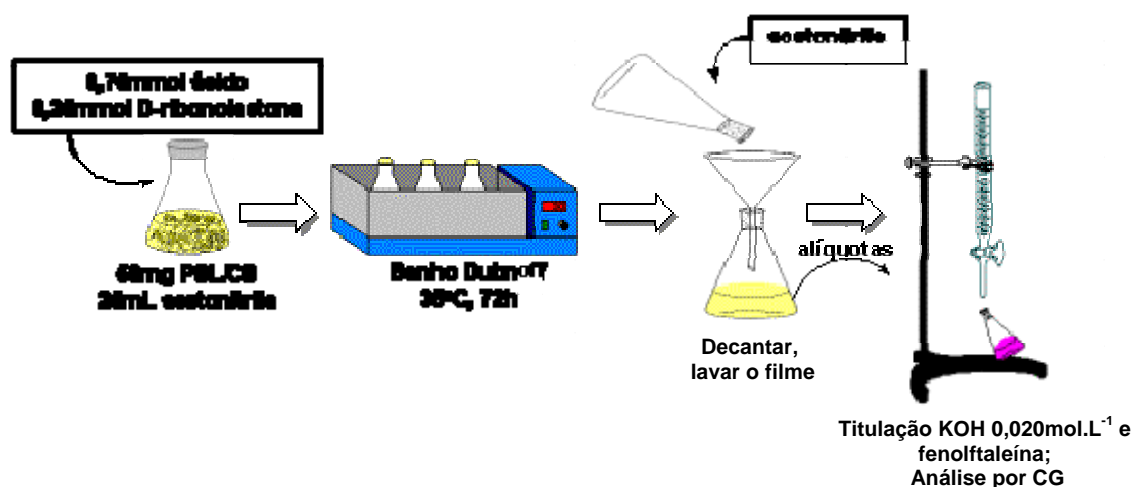


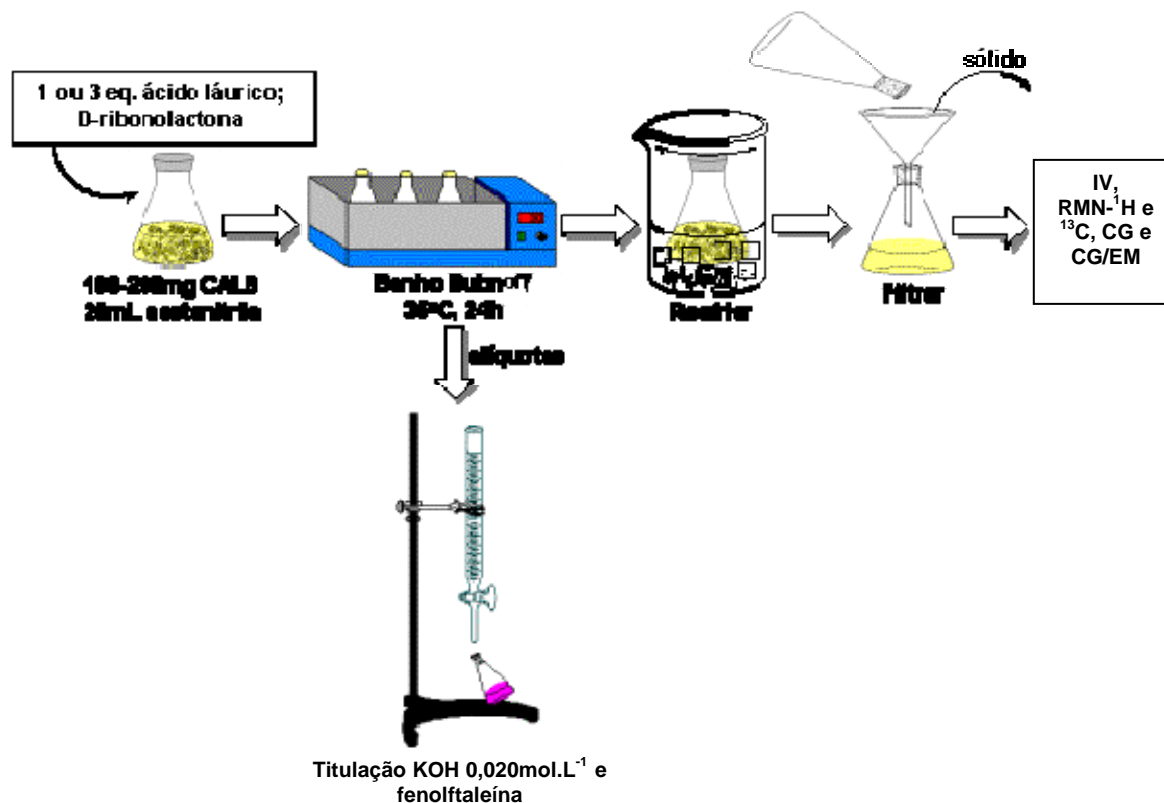
Figura 10 - Preparação do meio reacional e análise dos derivados acilados.

### 3.3.4 - Preparação dos lauratos de D-ribono-1,4-lactona catalisada pela CALB

A um erlenmeyer contendo 25mL de acetonitrila, foram adicionados 100mg de CALB, 0,75mmol (150mg) de ácido láurico e 0,25mmol (37mg) de D-ribonolactona. O sistema foi agitado por 24h a 35°C, e a formação de produtos verificada por ccd (eluente *n*-hexano:acetato de etila 9:1). Alíquotas também foram retiradas e submetidas à titulação com solução padronizada de KOH 0,020mol.L<sup>-1</sup> e analisadas por CG.

A reação foi realizada também em escala preparativa: 1,5mmol (223mg) de **1** e 4,5mmol (904mg) de ácido láurico. A quantidade de lipase foi dobrada (200mg), mantendo 25mL de acetonitrila. A solução foi resfriada, filtrada e o sólido obtido submetido às análises de IV, RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, CG e CG/EM.

A **Figura 11** mostra os procedimentos utilizados para a síntese dos lauratos de D-ribonolactona.



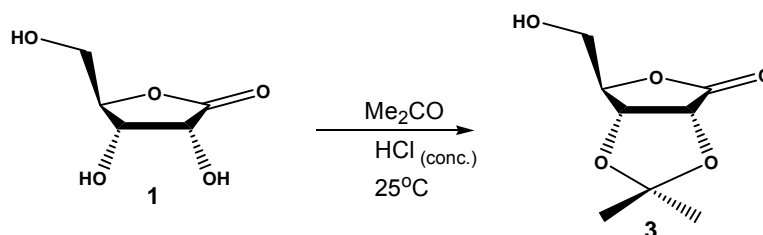
**Figura 11** - Preparação do meio reacional e análise dos derivados lauratos da D-ribonolactona.

### 3.3.5 – Preparação do padrão 5-lauril-D-ribono-1,4-lactona

O padrão 5-lauril-D-ribono-1,4-lactona foi obtido através de uma rota sintética em 3 etapas: proteção das hidroxilas secundárias com acetona e ácido clorídrico, esterificação enzimática com ácido láurico, e desproteção das hidroxilas com solução aquosa de ácido trifluoracético. As etapas serão descritas a seguir.



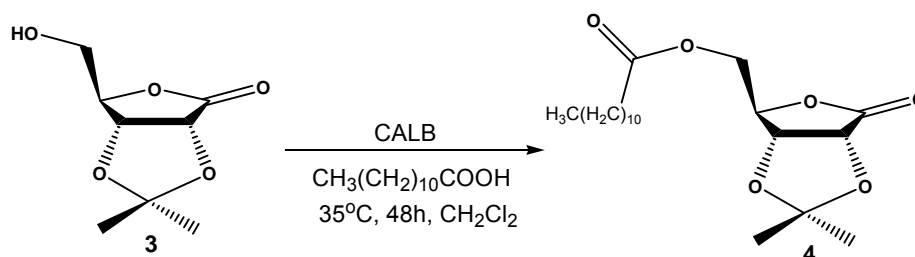
### 3.3.5.1 – Preparação do derivado 2,3-isopropilideno-D-ribono-1,4-lactona



Uma solução contendo 1,0g (6,75mmol) de 1, 50mL de acetona e 0,5mL de ácido clorídrico concentrado foi deixada sob agitação a temperatura ambiente por 24h. A reação foi cessada através da adição de uma pequena quantidade de carbonato de potássio, sob agitação durante 30min aproximadamente, seguida de filtração simples e evaporação da acetona. Uma única mancha ( $R_f$  0,91) foi verificada na ccd (eluente *n*-hexano:acetato de etila 9:1, revelada por UV).

Um sólido branco foi obtido com uma massa de 1,10g (rend. 86,6%), o qual foi submetido às análises de IV e RMN- $^1\text{H}$ , e caracterizado como o composto 2,3-isopropilideno-D-ribono-1,4-lactona 3. Pf.  $124-127^\circ\text{C}$  (Pf.<sup>86</sup> =  $139-140^\circ\text{C}$ ). IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3461 (-OH), 1769 (C=O lactona), 1382 ( $\text{CH}_3$ ). RMN- $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 1,31 (s, 3H,  $\text{CCH}_3$ ), 1,35 (s, 3H,  $\text{CCH}_3$ ), 3,60 (ddd, 2,8Hz, 5,2Hz, 12Hz, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 3,65 (ddd, 2,0Hz, 4,8Hz, 11,8Hz, 1H,  $\text{CH}_2$ ) 4,61 (t, 2,4Hz, 1H, H-4), 4,77-4,79 (m, 2H, H-2 e H-3) e 5,32 (t, 4,8Hz, 1H, -OH).

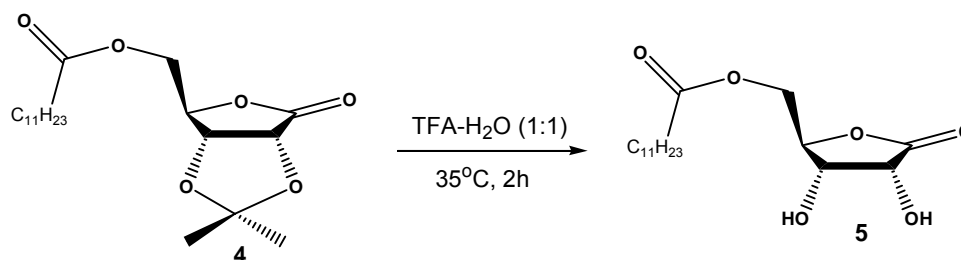
### 3.3.5.2 – Preparação do derivado 5-O-lauril-2,3-isopropilideno-D-ribono-1,4-lactona



Quantidades equimolares do derivado 2,3-isopropilideno-D-ribono-1,4-lactona **3** (190mg, 1,0mmol) e do ácido láurico (204mg, 1,0mmol) foram adicionadas a um balão contendo 50mg de CALB e 25mL de diclorometano. A mistura reacional foi agitada em um banho tipo Dubnoff a 35°C, durante 48h. Alíquotas foram submetidas a análise por CG.

A mistura reacional foi tratada com 2 x 20mL de KOH 0,01molL<sup>-1</sup> e 20mL de H<sub>2</sub>O. A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, o solvente evaporado, e o derivado 5-O-lauril-2,3-isopropilideno-D-ribono-1,4-lactona **4** isolado como um sólido (rend. 32,5%). Pf. 40°C. IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1775 (C=O lactona), 1751 (C=O éster), 1375 (CH<sub>3</sub>). RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ: 0,88 (t, 7,2Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,26 (m, 16H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,40 (s, 3H, CCH<sub>3</sub>), 1,50 (s, 3H, CCH<sub>3</sub>), 1,60 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,31 (t, 7,2Hz, 2H, CH<sub>2</sub>COO), 4,24 (dd, 2,4Hz, 12,8Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 4,38 (dd, 2,8Hz, 12,4Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 4,69 (d, 5,2Hz, 1H, H-3), 4,77 (m, 2H, H-2 e H-4).

### 3.3.5.3 – Preparação do derivado 5-O-lauril-D-ribono-1,4-lactona



Uma solução formada por 60mg (0,40mmol) do composto **4** e 1,5mL de uma solução aquosa de ácido trifluoroacético 50% foi deixada sob agitação por 2h, a temperatura de 35°C. Após a evaporação do solvente, foi obtido um sólido branco com um aspecto amorfo, caracterizado como o derivado 5-O-lauril-D-ribono-1,4-lactona **5**. Rend. >99%. Pf = 112-115°C. IV (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3300, 3485 (-OH), 1754 (C=O lactona), 1706 (C=O éster). RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,86 (t, 6,4Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,24 (m, 16H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,50 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,32 (t, 7,2Hz, 2H, CH<sub>2</sub>COO), 4,13 (m, 1H, H-3), 4,17 (dd, 5,6Hz, 12,0Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 4,27 (dd, 4,0Hz, 12,0Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 4,40-4,45 (m, 2H, H-2 e H-4), 5,57 (d, 4,4Hz, 1H, OH), 5,88 (d, 7,6Hz, 1H, OH).

### 3.3.6 – Preparação dos lauratos de D-ribono-1,4-lactona catalisada pelas lipases PS-C e PS-D

As lipases PS-C e PS-D (100mg de cada) foram imobilizadas, separadamente, em filmes de CS. Os dois sistemas foram utilizados para catalisar a reação entre o ácido láurico (1,5mmol, 300mg) e a D-ribonolactona (1,5mmol, 222mg), em 25mL acetonitrila. A reação foi realizada a 35°C, sob agitação contínua, sendo retiradas alíquotas em 24, 48 e 72h.

As alíquotas foram submetidas à análise por CG. Foi observado apenas um pico para os produtos obtidos com ambas lipases. As conversões, determinadas por CG, para os produtos das reações catalisadas por PS-C e PS-D foram de 54 e 7%, respectivamente.

Depois de evaporada a acetonitrila, o produto obtido com a PS-C foi solubilizado em 20mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, e tratado com 2 x 20mL H<sub>2</sub>O e 20mL solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>. Ao final do tratamento ainda restaram 20% do ácido láurico, e foram obtidos 132mg de um sólido branco, correspondente a 42,6% de massa recuperada. O sólido foi submetido às análises de IV, RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e CG/EM.

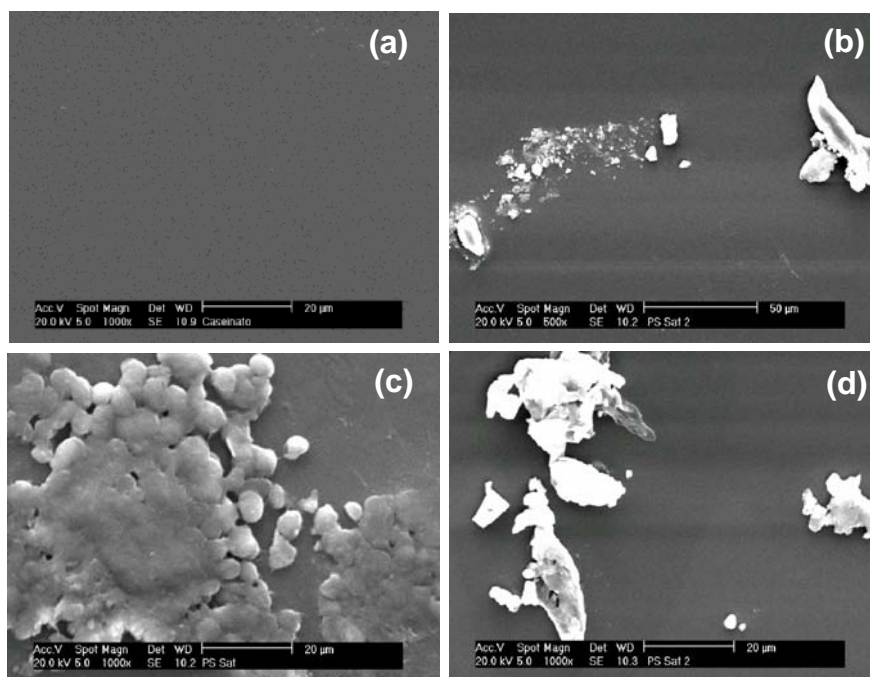
## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos neste trabalho. Inicialmente serão mostrados os dados referentes à caracterização morfológica dos filmes de caseinato de sódio (CS) na ausência e presença da lipase de *Pseudomonas cepacia* (LPS) através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e, em seguida, os resultados das quantidades (%) de água presentes nos filmes. A seguir, serão apresentados os dados obtidos para a conversão em oleatos de *n*-pentila com o sistema LPS/CS, em função do solvente orgânico. Dando continuidade, serão discutidos os resultados de acilação regioseletiva da D-ribonolactona via catálise enzimática, onde serão avaliados diversos parâmetros, tais como o efeito do comprimento da cadeia alquílica do doador acila e a utilização de lipases de diversas procedências. Para fins comparativos, o produto monoacilado foi preparado em três etapas por procedimentos clássicos e já descritos na literatura.

### 4.1 – Caracterização dos filmes de caseinato de sódio com a LPS imobilizada

#### 4.1.1 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A LPS (50mg) foi suportada em filmes de CS e o sistema submetido a ensaios de MEV. As fotomicrografias obtidas estão apresentadas na **Figura 12**.



**Figura 12** – Fotomicrografias das amostras de filmes de CS com e sem a LPS imobilizada [ampliações: (a) sem LPS, 1.000x; (b) com LPS, 500x; (c) e (d) com LPS, 1.000x].

Estas fotomicrografias mostram que os preparados enzimáticos, aparentemente adsorvidos, formam aglomerados em determinadas regiões da superfície dos filmes de CS, e que estes são homogêneos (**Fig. 12a**). Estes filmes apresentam alta resistência macroscópica com relação à solubilidade em diversos solventes orgânicos (exs. hexano, heptano, acetonitrila e tolueno) a temperatura ambiente.

#### 4.1.2 – Determinação da quantidade de água

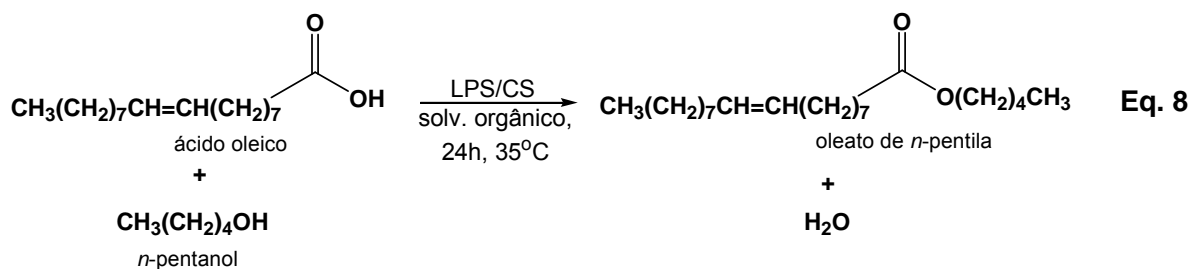
É bem reportado que a presença de água é um fator importante para a manutenção da conformação natural das lipases<sup>15</sup>.

A quantidade de água nos filmes de CS foi determinada pelo método titulométrico de Karl-Fischer. Os filmes com e sem a LPS imobilizada apresentaram 12,0 e 13,0% de água, respectivamente.

Esses resultados mostram que mesmo após a imobilização, os filmes de CS mantêm certa quantidade de água, contribuindo para a manutenção da conformação nativa e atividade catalítica da lipase, sendo este um requerimento importante nos estudos de biocatálise.

#### 4.2 – Preparação de oleatos de *n*-pentila catalisada pelos sistemas LPS/CS

Os sistemas contendo 10mg de LPS imobilizados em CS foram utilizados na síntese de oleatos de *n*-pentila, visando avaliar o efeito do solvente orgânico. A **Equação 8** refere-se à reação de esterificação mencionada.



Os resultados obtidos para a formação dos oleatos de *n*-pentila em meio orgânico são mostrados na **Tabela 3**.

**Tabela 3** – Efeito do solvente na conversão (%) em oleato de *n*-pentila catalisada pelo sistema LPS/CS.

Solvente	log P <sup>(a)</sup>	Conversão (%) <sup>(b)</sup>
Heptano	4,00	58
Hexano	3,50	23
Cicloexano	3,20	31
Tolueno	2,50	39
Diclorometano	1,50	6
<i>t</i> -Butanol	1,45	8
MTBE	1,43	8
Éter etílico	0,83	~0
Acetona	-0,23	8
Acetonitrila	-0,33	17

(a) Logarítmo do coeficiente de partição octanol/água<sup>87</sup>;

(b) Determinada por RMN-<sup>1</sup>H.

O log P, definido como o logarítmo do coeficiente de partição do solvente no sistema octanol/água, é o parâmetro mais freqüentemente utilizado para descrever quantitativamente o efeito do solvente em reações catalisadas por enzimas<sup>87</sup>.

Segundo Laane e col.<sup>87</sup> os solventes que possuem  $\log P \leq 2$  são hidrofílicos, não sendo adequados para biocatálise, porque perturbam fortemente a interação água/biocatalisador, tornando-o inativo ou ocasionando sua desnaturação. Os solventes com log P entre 2 e 4 são menos hidrofílicos, perturbando menos a interação água-biocatalisador. Os solventes com log P acima de 4 são hidrofóbicos e não perturbam estas interações, deixando o biocatalisador no seu estado ativo.

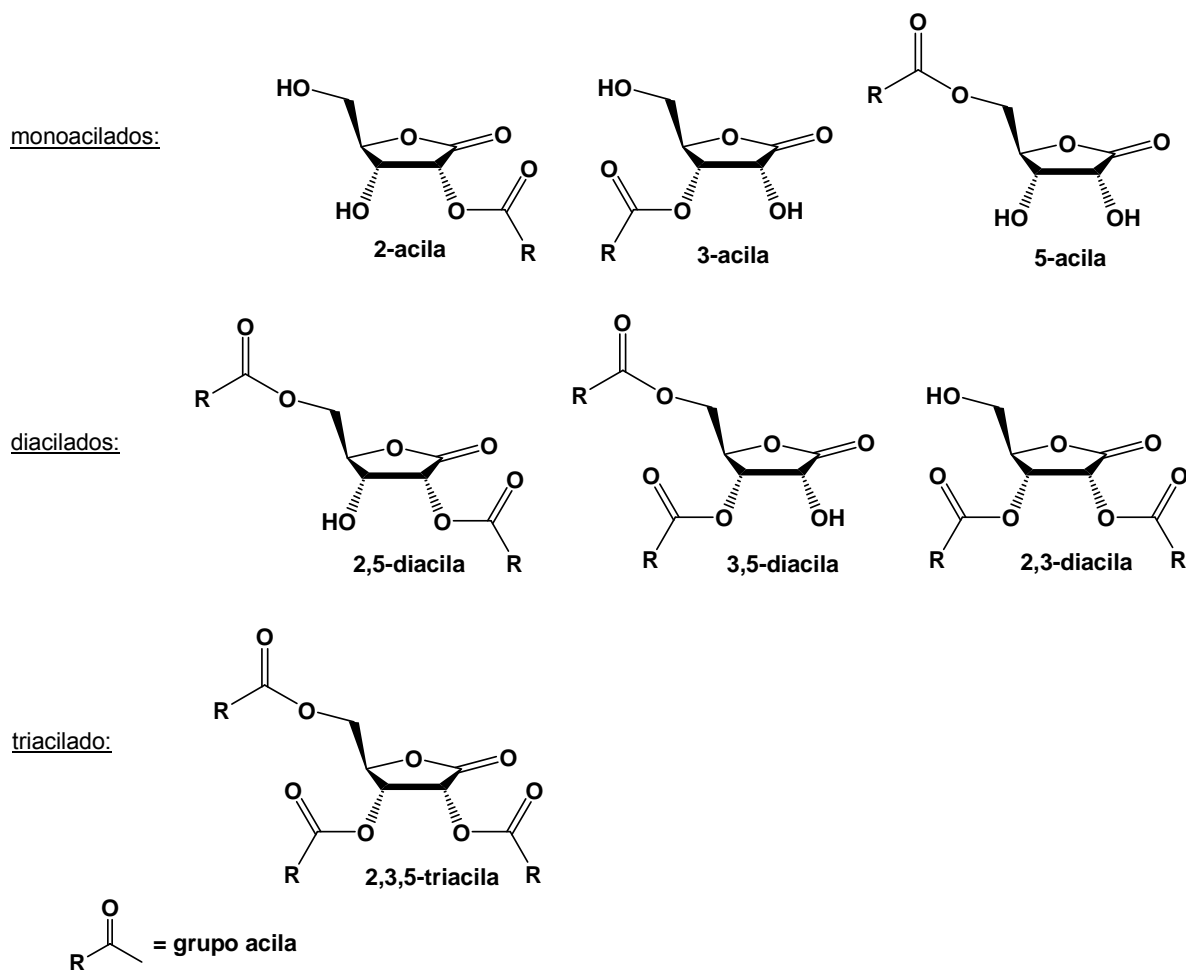
Os resultados obtidos corroboram com os estudos de Laane, mostrando claramente que a percentagem de conversão em éster foi dependente do tipo de solvente utilizado. Os solventes com log P acima de 2,50, ou seja os menos polares, foram os mais eficientes na catálise enzimática, formando os oleatos de *n*-pentila com maiores conversões em tolueno e *n*-heptano, sendo estas de 39 e 58%, respectivamente.

A conversão em oleato de *n*-pentila obtida em acetonitrila foi significativa (17%), considerando seu valor baixo de log P (-0,33). Deve-se salientar que a solubilidade dos substratos, em muitos casos, é o fator que determina a escolha do solvente orgânico em uma reação biocatalisada, mesmo que este não tenha um log P muito apropriado. Exemplos disto são as reações de acilação da D-ribono-1,4-lactona **1** desenvolvidas neste trabalho, que foram realizadas em acetonitrila.

#### **4.3 – Síntese de derivados acilados de D-ribono-1,4-lactona catalisada pelos sistemas LPS/CS**

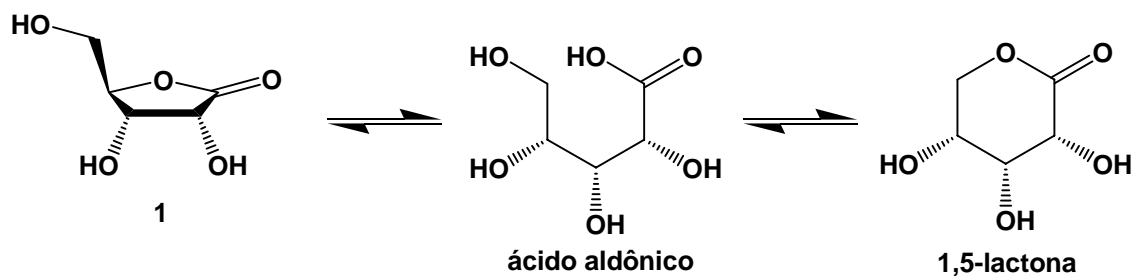
Segundo Solomons<sup>1</sup> “quando uma reação que potencialmente pode formar dois ou mais isômeros constitucionais formar apenas um destes (ou um preponderante), a reação é denominada regioseletiva”. As reações em estudo podem formar até sete produtos de acilação da D-ribonolactona (**Figura 13**).





**Figura 13** – Estruturas dos possíveis produtos de acilação da D-ribonolactona **1**.

A D-ribono-1,4-lactona **1** pode ainda sofrer isomerização, formando a sua correspondente 1,5-lactona, via ácido aldônico (**Esquema 6**)<sup>86</sup>. Este equilíbrio faz com que dobre o número de possibilidades de produtos a partir de **1**.

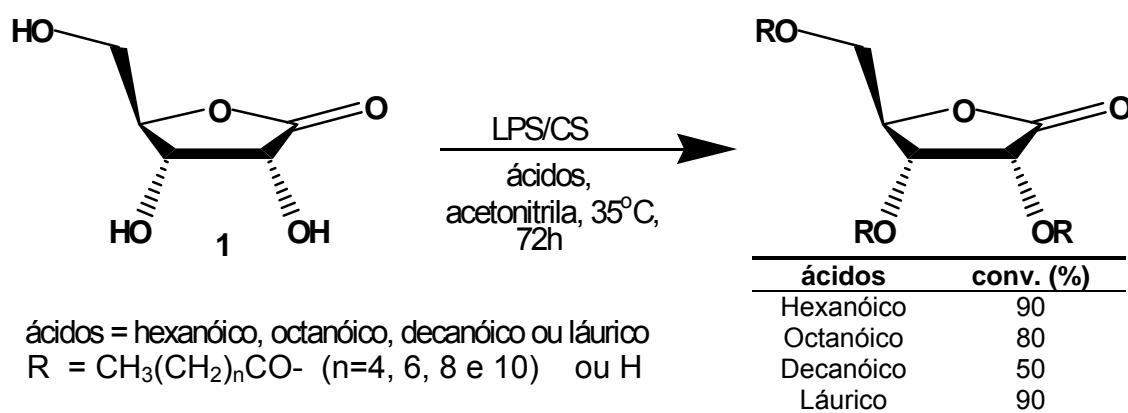


**Esquema 6** – Isomerização da 1,4-lactona **1** para a 1,5-lactona.

Para avaliar a regioseletividade da lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada em filmes de caseinato de sódio (LPS/CS), primeiramente 3,0 equivalentes dos ácidos hexanóico, octanóico, decanóico e láurico foram utilizados como doadores acila para a obtenção de ésteres da D-ribonolactona **1**. Para este estudo, foram utilizados 50mg da LPS.

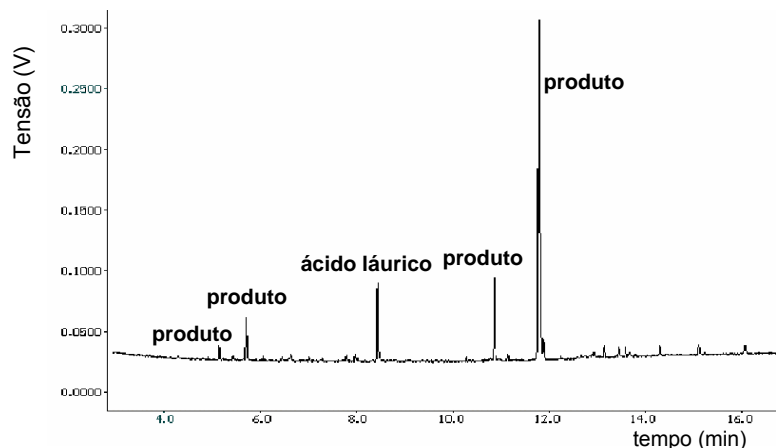
Os reagentes foram solubilizados em 25mL de acetonitrila e as reações foram mantidas sob agitação contínua a 30°C, sendo retiradas alíquotas em 24, 48 e 72h, que foram submetidas à titulação com solução de KOH 0,020molL<sup>-1</sup> para cálculo do consumo do ácido na reação. Os produtos obtidos foram analisados também por CG.

O **Esquema 7** representa as reações de esterificação catalisadas por LPS/CS realizadas neste estudo preliminar, e os valores de conversão (%) obtidos em função dos doadores acila utilizados.



**Esquema 7** – Síntese de derivados acilados de D-ribo-1,4-lactona catalisada por LPS/CS.

A **Figura 14** mostra a análise por CG para a reação de acilação da D-ribonolactona **1** com ácido láurico, catalisada pelo sistema LPS/CS.



[T.i.=50°C, r.a.= 20°C, T.f.=250°C, T. c.=250°C, T. inj.=280°C, T. det.=280°C, coluna Shimadzu CBP5-M25]<sup>†</sup>

**Figura 14** - Cromatograma obtido por CG para a alíquota da reação de acilação de **1** com ácido láurico catalisada pela LPS/CS [0,25mmol D-ribonolactona, 0,75mmol ácidos, 35°C, 72h].

Os resultados obtidos indicam uma certa seletividade do sistema LPS/CS, sendo que um dos produtos é formado majoritariamente em relação aos outros três. O pico em 8,4min, referente ao ácido láurico (adicionado em excesso) também é observado.

Os cromatogramas dos produtos obtidos com os outros ácidos também indicaram a formação de misturas de ésteres, após 72h de reação. Da mesma forma, a presença de um pico de maior intensidade em todos os cromatogramas mostrou a formação de um produto majoritário.

Os dados mostrados na **Tabela 4** referem-se aos cromatogramas obtidos na reação de **1** com os ácidos hexanóico, octanóico, decanóico e láurico. Os parâmetros dos produtos majoritários estão destacados em negrito.

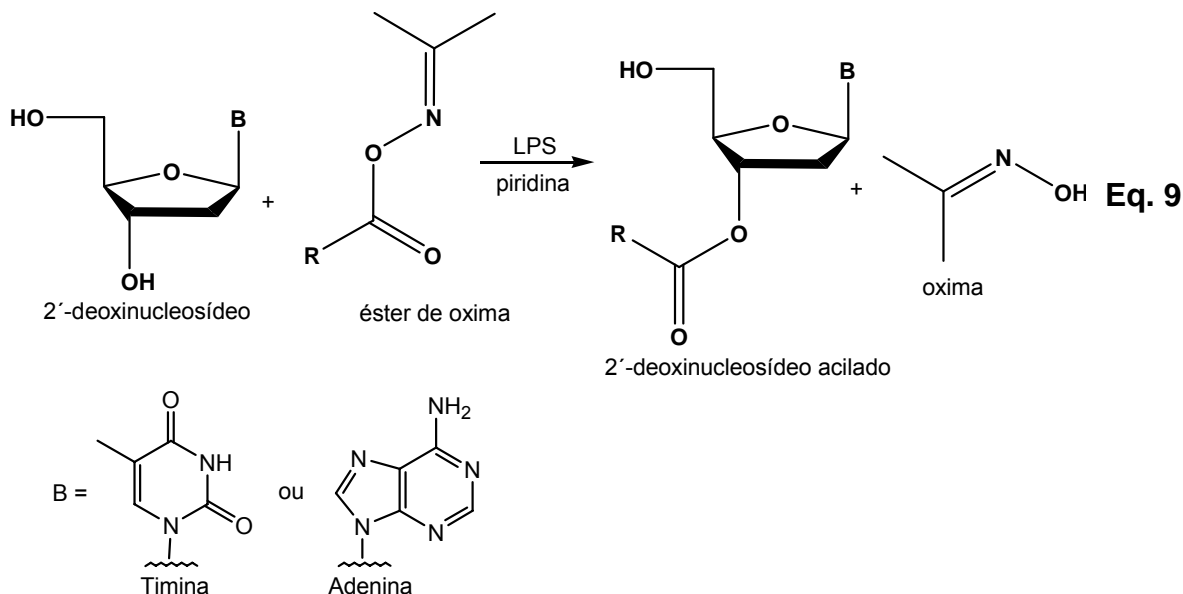
<sup>†</sup>T. i. = temperatura inicial, r.a. = rampa de aquecimento, T.f. = temperatura final, T. c. = temperatura da coluna, T. inj. = temperatura do injetor, T. det. = temperatura do detector.

**Tabela 4** – Intensidades relativas dos produtos de acilação da D-ribonolactona 1 com os ácidos orgânicos, catalisada por LPS/CS.

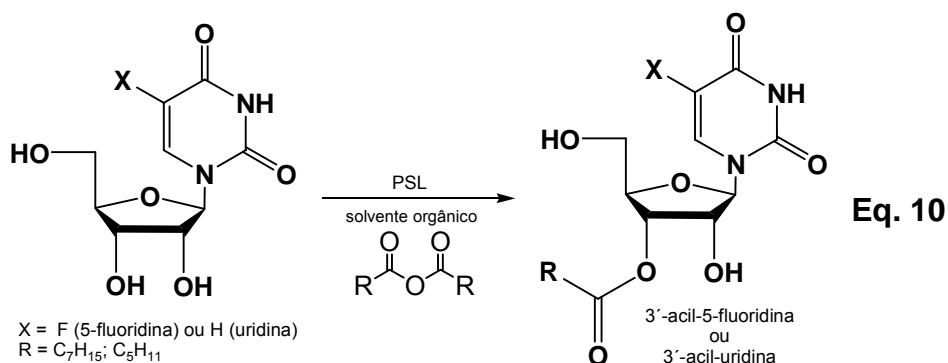
<b>Produtos</b>		
<b>Ácido</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>	<b>Intensidades relativas (%)</b>
Hexanóico	9,36	11,0
	<b>17,2</b>	<b>68,0</b>
	17,6	11,0
	18,3	10,0
Octanóico	8,16	25,0
	<b>15,7</b>	<b>75,0</b>
Decanóico	5,24	21,0
	<b>10,4</b>	<b>79,0</b>
Láurico	5,14	3,0
	5,71	8,0
	10,9	15,0
	<b>11,8</b>	<b>74,0</b>

A regiosseletividade das lipases de *Pseudomonas* tem sido reportada na literatura<sup>88,89,90</sup>. Gotor e col.<sup>89</sup> utilizaram a lipase de *Pseudomonas cepacia* na acilação de 2'-deoxinucleosídeos com ésteres de oxima como doadores acila (**Equação 9**).

As hidroxilas secundárias foram aciladas seletivamente, e não as primárias que são mais reativas quimicamente. Da mesma forma, não foi observada a *N*-acetilação do grupamento amino da 2'-deoxiadenosina, o que é bem relevante, pois contrasta com outros métodos de acilação reportados<sup>88</sup>.

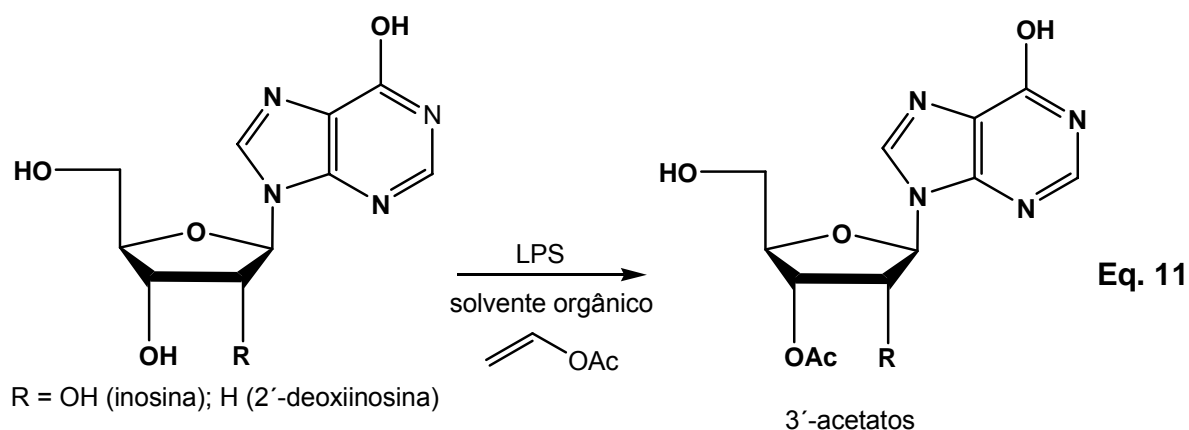


Ozaki e col.<sup>90</sup> prepararam derivados 3'-acilados da 5-fluoridina e uridina a partir de anidridos de ácidos, em reações de transesterificação catalisadas por LPS. A maior seletividade na acilação da 5-fluoridina foi obtida com o anidrido octanóico, e na acilação da uridina o anidrido hexanóico foi mais seletivo, com as duas lipases. Os produtos monoacilados 3'-octil-5-fluoridina e 3'-hexil-5-fluoridina foram obtidos com rendimentos superiores a 85%. Vários solventes orgânicos foram utilizados, porém o THF foi o mais eficiente nas reações (**Equação 10**).



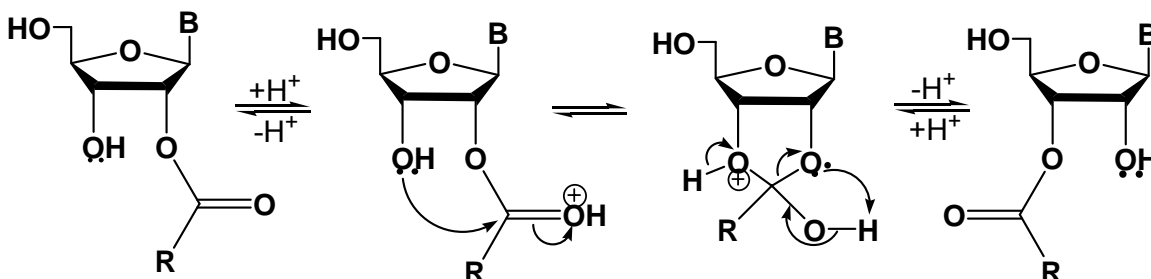
2',3'-Dideoxynucleosídeos vêm sendo utilizados como agentes quimioterapêuticos, com atividade anti-retroviral, contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV), o agente causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). A 2',3'-dideoxiinosina (Didanosina, DDI) foi aprovada no tratamento de adultos e crianças com infecção avançada do HIV, que possuem intolerância ao AZT, ou quando têm problemas de saúde causados pelo uso constante deste fármaco<sup>88,91</sup>.

A LPS foi utilizada por Santaniello e col.<sup>91</sup> para obter compostos precursores para a DDI, partindo da inosina ou 2'-deoxiinosina, através de reações de transesterificação com acetato de vinila. Foram obtidos derivados 3'-acetilados para os dois nucleosídeos. Para o acetato de 2'-deoxiinosina o rendimento foi de 72% em THF. Os rendimentos para os derivados de inosina foram 69 e 83%, em THF e DMSO, respectivamente (**Equação 11**).



Deve-se acrescentar que também foi observada a formação de derivados 2'-acetilados como produtos da acilação da inosina<sup>91</sup>. É bem sabido que hidroxísteres, e em particular os monoésteres de 1,2- e 1,3- dióis sofrem isomerização, sendo que estas ocorrem muito rapidamente em meio ácido ou alcalino<sup>80</sup>.

O **Esquema 8** representa o equilíbrio de migração do grupo acila para um 1,2-nucleosídeo monoacilado genérico.



**Esquema 8** – Mecanismo proposto para migração do grupo acila, catalisado por ácido (adaptado da ref. 80).

Em reações catalisadas por lipases, a isomerização também pode ocorrer. Primeiramente por um ataque nucleofílico do resíduo catalítico da Ser, presente no sítio ativo, sobre um dos isômeros com a formação do intermediário acil/enzima. Numa segunda etapa, o grupo hidroxila vicinal pode reagir com este intermediário, formando o outro isômero e regenerando o biocatalisador (ver **Figura 2**, p. 8).

As referências acima citadas mostram que a LPS foi regioseletiva na acilação de nucleosídeos, com a obtenção quase exclusiva de produtos 3'-acilados.

Deve-se salientar que as reações catalisadas pelo sistema LPS/CS até esta etapa do trabalho foram realizadas em quantidades apenas analíticas (<1,0mmol). Os experimentos foram realizados em caráter preliminar, e devido a seletividade moderada do sistema frente a acilação de **1**, estudos mais completos são necessários.

#### 4.4 – Síntese de lauratos de D-ribonolactona catalisada pela CALB

A regiosseletividade da lipase de *Candida antarctica* B (CALB), assim como sua elevada atividade diante de vários substratos, é bem reportada na literatura<sup>88,89,90,91,92,93,94,95</sup>.

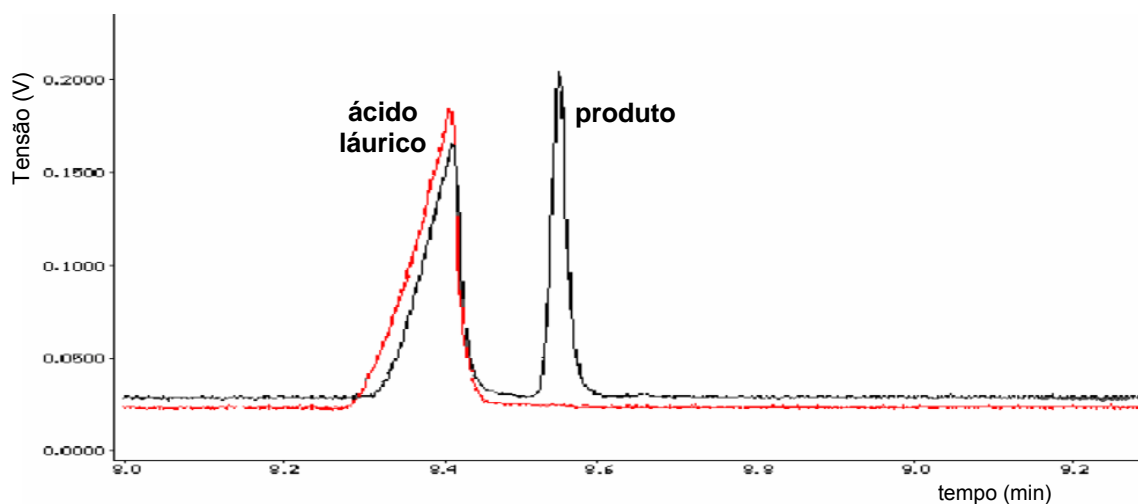
Em todas referências citadas anteriormente para acilações de nucleosídeos usando a LPS, também foram reportados estudos com as lipases de *C. antarctica*. Ao contrário da LPS, esta enzima catalisa acilações cujos produtos principais são derivados 5'-acilados de nucleosídeos, ou seja, as reações ocorrem preferencialmente nas hidroxilas primárias da função açúcar da molécula.

O fato de duas lipases terem regiosseletividades diferentes frente a um mesmo substrato é algo bem relevante. Pode-se desta forma, obter produtos diferentes, ou apenas um produto de interesse, com a mudança do sistema catalítico, o que é necessário em muitos casos.

Neste trabalho, foi avaliada a regiosseletividade promovida pela lipase de *Candida antarctica* B (CALB, Novozym 435) na acilação de **1** com 3,0 equivalentes do ácido láurico.

Após 24h obteve-se conversão >99%, e por análise de CG observou-se apenas um pico, além do que corresponde ao ácido, confirmando a seletividade da CALB nesta reação. O cromatograma está mostrado na **Figura 15**.



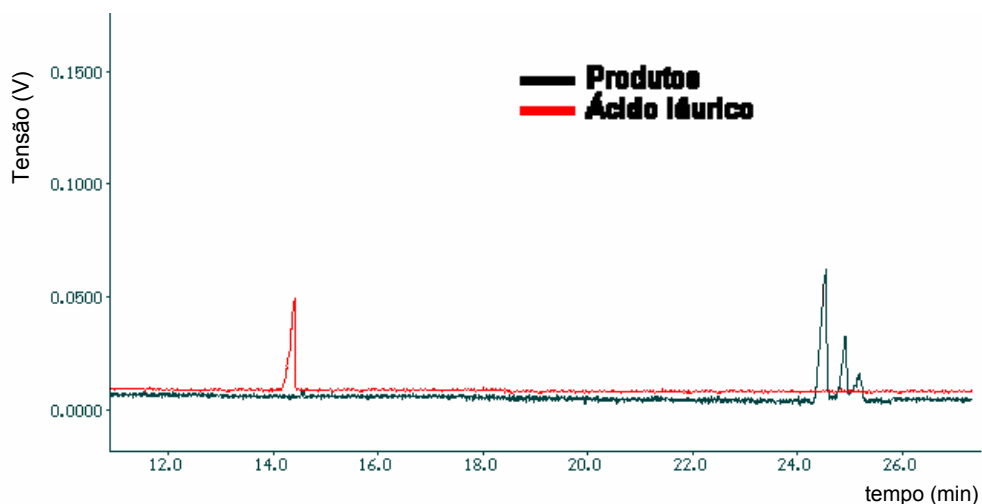


[T.i.=50°C, r.a=20°C, T.f.=250°C, T. c.=250°C, T. inj.=280°C, T. det.=290°C, coluna Shimadzu CBP5-M25]

**Figura 15** - Cromatograma obtido por CG para a alíquota da reação de acilação de **1** com ácido láurico catalisada pela CALB. [0,25mmol D-ribonolactona, 0,75mmol ácido láurico, 35°C, 24h]

Considerando os bons resultados obtidos com a CALB, optou-se por aumentar as quantidades de reagentes utilizados, para análises posteriores. Utilizando 4,5mmol (904mg) de ácido láurico e 1,5mmol (223mg) de **1**, após 72h de reação, foi obtido um sólido branco amorfo (rend. 92%, Pf=123-124°C), pouco solúvel em acetonitrila, e com conversão >99%.

Uma amostra foi submetida à análise de CG, e foram observados três picos distintos, sendo um deles majoritário (**Figura 16**).



[T.i.=50°C, r.a=10°C, T.f.=250°C, T. c.=250°C, T. inj.=280°C, T. det.=290°C, coluna Shimadzu CBP5-M25]

**Figura 16** - Cromatograma obtido por CG para a alíquota da reação de acilação de **1** com ácido láurico catalisada pela CALB [1,5mmol D-ribonolactona, 4,5mmol ácido láurico, 35°C, 72h].

Para determinação das estruturas dos produtos formados, as amostras foram submetidas às análises de IV, RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, e CG/EM.

O espectro de IV apresenta uma banda bem intensa (estiramento C=O) em 1754cm<sup>-1</sup>, resultante da sobreposição das bandas das carbonilas do éster e da lactona do produto formado. A diminuição da intensidade da banda larga de OH, presente no espectro da lactona em 3500-3000cm<sup>-1</sup>, com o surgimento de duas bandas de menor intensidade em 3484 e 3306cm<sup>-1</sup>, é uma forte evidência da acilação do reagente **1**. As bandas características das ligações CO estão entre 1298 e 1239cm<sup>-1</sup>, e dos grupos metila e metilênicos em 2919 e 2853cm<sup>-1</sup>.

No espectro de RMN- $^1\text{H}$  (**Anexo 1**), em DMSO- $\text{d}_6$ , observam-se três conjuntos de sinais; entre 0,85 e 2,30ppm aproximadamente, referente à cadeia alquílica do ácido láurico; outro entre 3,50 e 4,40ppm que se refere aos hidrogênios do anel lactônico; e o terceiro entre 5,10 e 6,00ppm que foram atribuídos aos hidrogênios hidroxílicos, tanto no material de partida, quanto no produto. Com a adição de uma pequena quantidade de  $\text{D}_2\text{O}$ , os cinco sinais com deslocamento acima de 5,00ppm não foram mais observados. Os hidrogênios hidroxílicos têm certa labilidade e podem ser trocados por deutérios fornecidos pela  $\text{D}_2\text{O}$ , que possuindo spin nuclear igual a 1, não entram em ressonância, e conseqüentemente não são verificados no espectro.

Foram observados dois conjuntos distintos de picos na região dos hidrogênios de álcoois (5,10 e 6,00ppm) no espectro em DMSO. As intensidades relativas 1:1:1 do conjunto de picos centrados em 5,18 (t), 5,38 (d) e 5,77ppm (d), e suas constantes de acoplamento de 5,4, 3,8 e 7,7Hz, respectivamente, indicam a presença da D-ribonolactona **1** de partida. Esta informação não foi detectada nas outras análises, e não condiz com a conversão determinada por titulação (>99%).

O outro conjunto de sinais centrados em 5,59 e 5,90ppm pode ser atribuído aos hidrogênios ligados às hidroxilas do produto mono-acilado na posição 5 do anel da lactona, pois o triplete é o único sinal desta região que não se repete nos dois conjuntos de sinais. Outra evidência da mono-acilação é o deslocamento do multiplete relativo aos hidrogênios metilênicos de 3,58ppm em **1**, para 4,20-4,40ppm no produto. Este comportamento é típico de acilação de álcoois primários<sup>96</sup>.

No espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (**Figura 17**), em DMSO, todos os sinais foram atribuídos aos seus respectivos carbonos, e apontam para a formação de um composto mono-acilado. O espectro foi comparado com o da lactona em DMSO.



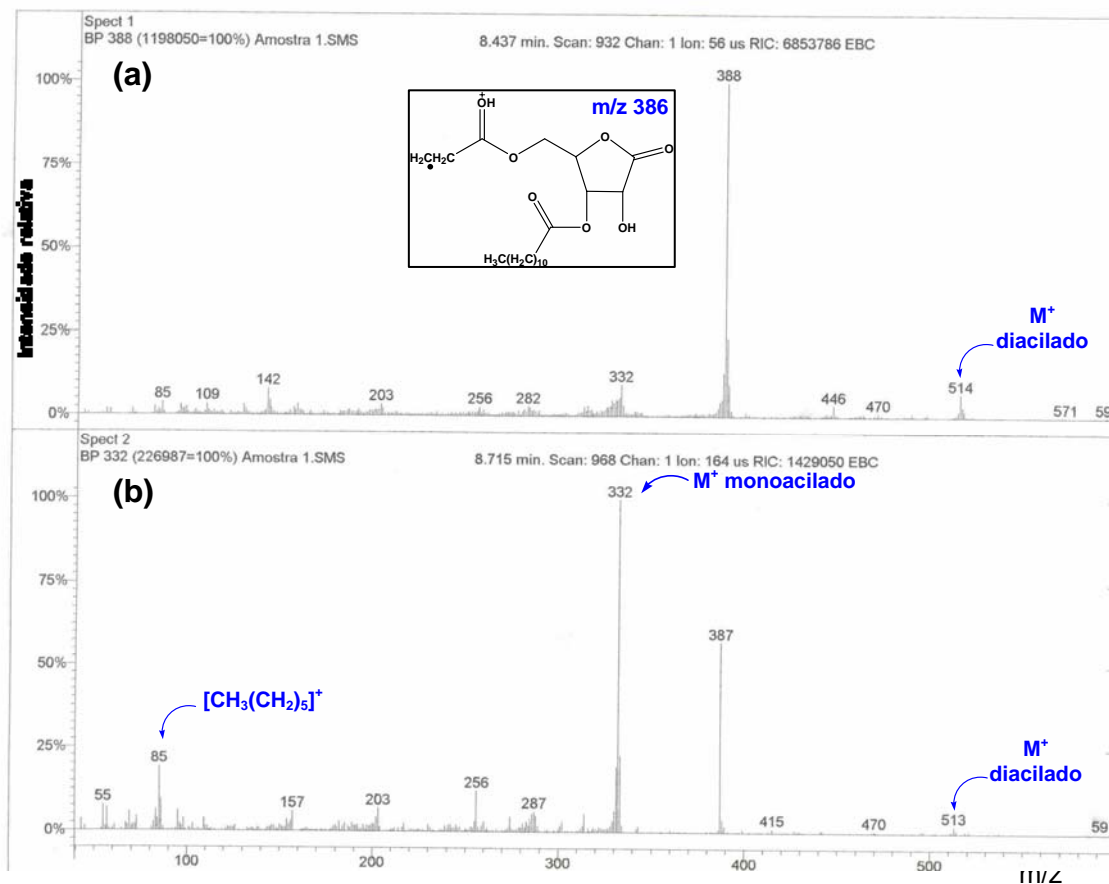
Os picos em 176 e 173ppm referem-se aos carbonos carbonílicos das funções lactona e éster, respectivamente, confirmando a monoacilação da lactona.

A região entre 65 e 86ppm corresponde aos carbonos do anel da lactona, que estão ligados diretamente aos oxigênios. O sinal centrado em 63ppm não é verificado no espectro da lactona, e refere-se possivelmente ao carbono 5 do éster formado. Este sinal sofreu um deslocamento de 2ppm aproximadamente, em relação ao reagente de partida. Os sinais em 69 e 70ppm foram atribuídos aos carbonos 3 e 4, e em 82ppm ao carbono 2 do anel lactônico.

A região do espectro compreendida entre 14 e 35ppm engloba os carbonos da cadeia alifática, oriunda do ácido láurico.

Na análise de CG/EM foram verificados apenas dois picos, em contraste com os três picos obtidos na análise de CG. Esta diferença pode ser explicada pelo uso de diferentes colunas e condições experimentais para as duas análises, ocasionando a sobreposição de um dos picos na análise de CG/EM. Da mesma forma, um pico de maior intensidade indicou a formação de um produto majoritário.

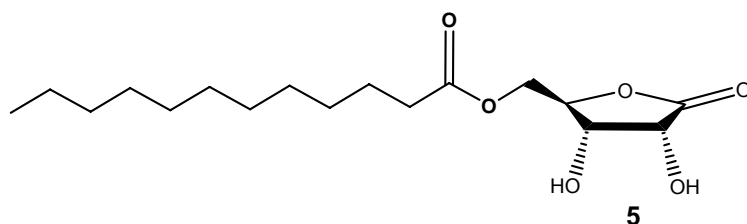
A **Figura 18** mostra os espectros de massas relativos aos picos mencionados e os fragmentos sugeridos para alguns dos picos principais. A sobreposição dificultou a análise dos espectros de massas, sendo o espectro **b** correspondente a uma mistura de dois compostos, um deles o produto majoritário da reação.



**Figura 18** – Espectros de massas do produto da reação de acilação da D-ribonolactona **1** com ácido láurico catalisada pela CALB.

Os resultados indicaram a formação majoritária do composto mono-acilado ( $m/z$  332) acompanhado dos derivados di-acilados ( $m/z$  514 em **a** e 513 em **b**). Os picos com  $m/z$  388 no espectro **a**, e  $m/z$  387 no espectro **b** sugerem a presença de derivados mono-acilados, e podem ser explicados pelo fragmento  $m/z$  386 ou análogos<sup>96</sup>. Este fragmento está em destaque no espectro **a**.

Portanto, através de todas análises realizadas, postula-se que ocorreu a formação de uma mistura de isômeros, cujo componente majoritário é o derivado 5-O-lauril-D-ribonolactona **(5)** (**Figura 19**).



**Figura 19** - Estrutura do produto monoacilado da reação entre a D-ribonolactona **1** e ácido láurico, catalisada pela CALB.

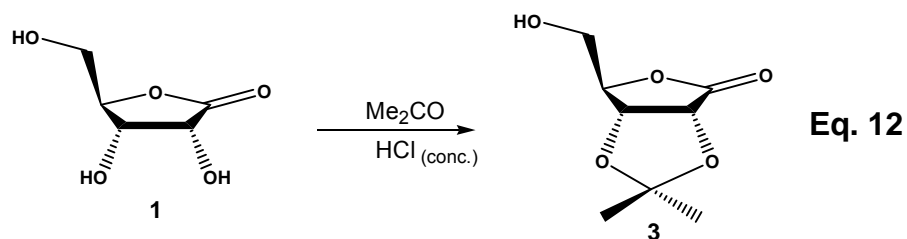
Estes resultados corroboram com os estabelecidos para a regioseletividade das lipases de *C. antarctica* em reações de acilação de nucleosídeos reportadas na literatura<sup>88-95</sup>.

#### 4.5 – Síntese de derivado 5-lauril em três etapas

Com intuito de obter-se um padrão do derivado 5-lauril-D-ribonolactona, e assim confirmar os resultados anteriores, optou-se pela síntese deste composto através de uma rota sintética que envolveu etapas de proteção e desproteção. Para tanto, procurou-se seguir o procedimento que Sá e col.<sup>82</sup> descreveram como rota sintética para a síntese de derivados 5-acilados de D-ribonolactona, citado anteriormente.

##### 4.5.1 – Síntese do derivado 2,3-isopropilideno-D-ribo-1,4-lactona (**3**)

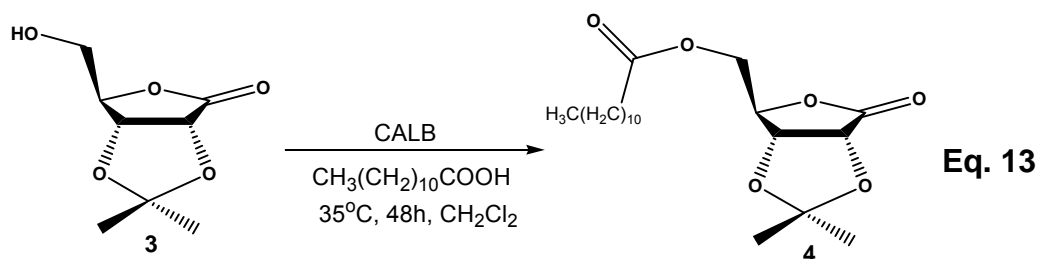
A primeira etapa envolveu a proteção de **1** com acetona catalisada por ácido clorídrico concentrado (**Equação 12**).



Depois de neutralizar a mistura reacional com  $K_2CO_3$ , o derivado 2,3-isopropilideno-D-ribono-1,4-lactona **3** (Pf. 124-127°C) foi obtido com 86,6% de rendimento. O composto foi submetido às análises de RMN- $^1H$  e IV, que concordaram com as reportadas na literatura. Joullié e col.<sup>97</sup> sintetizaram o composto **3** obtendo Pf. 139-140°C. Para Sá e col.<sup>82</sup> o mesmo produto apresentou Pf. 134-135 °C. Os diferentes pontos de fusão reportados podem ser explicados pelo equilíbrio mostrado no **Esquema 6** (p. 47). Os acetais cíclicos podem formar-se tanto da D-ribonolactona **1** quanto da sua correspondente 1,5-lactona, levando a formação de isômeros.

#### 4.5.2 – Síntese do derivado 5-O-lauril-2,3-isopropilideno-D-ribono-1,4-lactona (**4**)

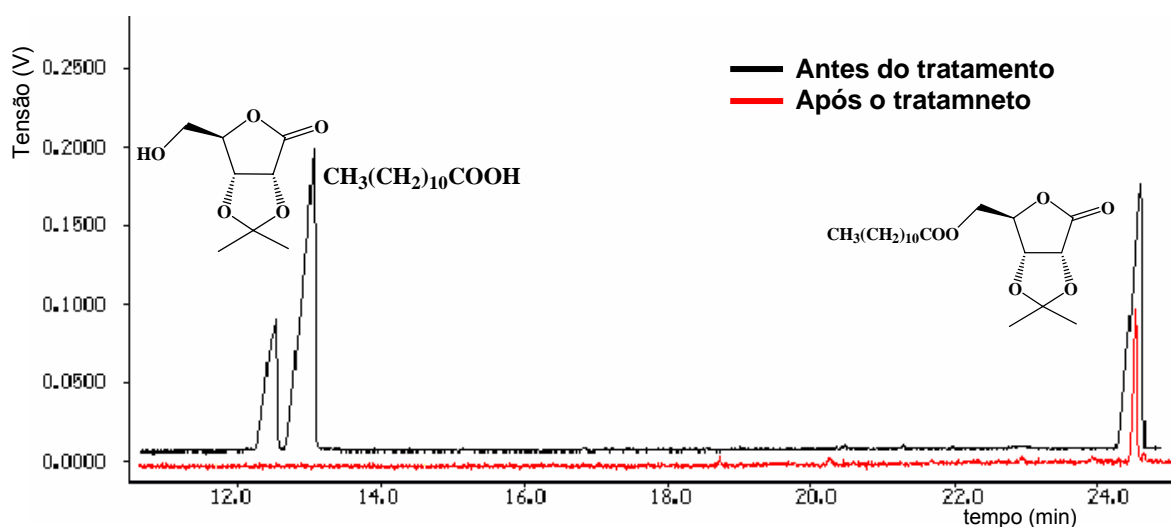
O derivado **3** foi utilizado como reagente de partida para a preparação do correspondente laurato. Nesta etapa, houve uma modificação do método descrito por Sá e col.. O doador acila foi o ácido láurico e a reação catalisada pela CALB. No trabalho anterior foi utilizado cloreto de ácido e piridina<sup>82</sup> (**Equação 13**).





O produto 5-O-lauril-2,3-isopropilideno-D-ribono-1,4-lactona **4** foi isolado com um rendimento de 32,5%, após tratamentos da mistura reacional com H<sub>2</sub>O e solução aquosa de KOH.

A **Figura 20** mostra a análise de CG efetuada para uma alíquota da acilação enzimática de **3**, antes e após o tratamento com KOH.



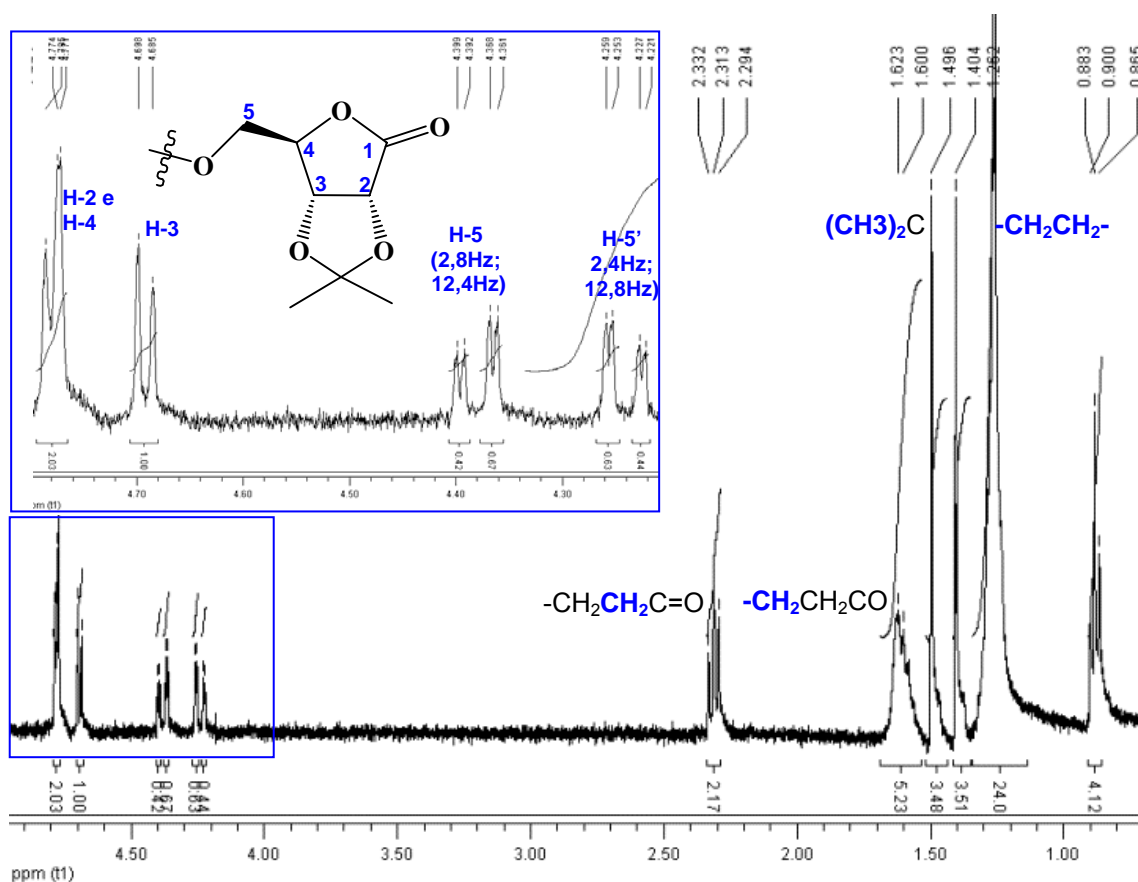
[T.i.=50°C, r.a=10°C, T.f.=250°C, T. c.=250°C, T. inj.=280°C, T. det.=290°C, coluna Shimadzu CBP5-M25]

**Figura 20** - Cromatograma obtido por CG para a alíquota da reação de acilação de **3** com ácido láurico catalisada pela CALB [1,0mmol 2,3-isopropilideno-D-ribono-1,4-lactona, 1,0mmol ácido láurico, 35°C, 48h].

Através do cromatograma antes do tratamento pôde-se acompanhar a reação de acilação. Os picos referentes ao derivado **3** e ácido láurico têm seus tempos de retenção em 12,4 e 13,0min, respectivamente. O produto **4** têm seu pico em 24,5min. No cromatograma concernente ao tratamento com KOH, apenas o pico do derivado **4** é observado, mostrando que o processo de purificação foi efetivo.

O composto isolado foi analisado por RMN-<sup>1</sup>H e IV. O espectro de IV apresentou duas bandas características de carbonila, referentes aos estiramentos C=O da lactona (1775cm<sup>-1</sup>) e do éster (1751cm<sup>-1</sup>).

No espectro de RMN-<sup>1</sup>H em CDCl<sub>3</sub> observaram-se os sinais relativos aos hidrogênios do derivado **4** (**Figura 21**).



**Figura 21**– Espectro de RMN- $^1\text{H}$  do derivado 5-O-lauril-2,3-isopropilideno-D-ribo-1,4-lactona [ $\text{CDCl}_3$ , 400MHz].

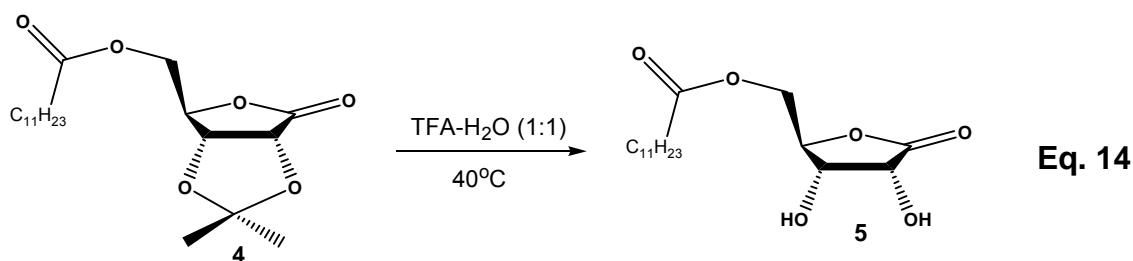
Pode-se dividir o espectro em dois conjuntos de sinais. Os sinais na região entre 0,80 e 2,4ppm foram atribuídos aos hidrogênios relativos a cadeia alquílica do ácido láurico, exceto os dois singletes em 1,4 e 1,5ppm que se referem aos hidrogênios das metilas ligadas ao carbono quartenário do grupamento isopropilideno. O triplete (2H, 7,2Hz) em 2,31ppm corresponde aos hidrogênios metilênicos vicinais ao carbono  $\text{sp}^2$  carbonílico. A região do espectro entre 4,0 e 5,0ppm refere-se aos hidrogênios do anel lactônico, sendo mostrada na ampliação. O par de duplos dubletes centrado em 4,30ppm refere-se aos hidrogênios metilênicos da posição 5 (H-5 em 4,38 e H-5' em 4,24ppm), e estes estão deslocados 0,40ppm para campo baixo em relação aos seus correspondentes no espectro do derivado 2,3-isopropilideno-D-ribo-1,4-lactona **3**, ou seja, antes da acilação.

Em 4,77ppm observa-se a sobreposição de sinais correspondentes a dois hidrogênios. Estimou-se que um deles é o hidrogênio ligado ao carbono 2, mais desblindado devido ao efeito de ressonância da carbonila vizinha, e o outro é o hidrogênio 4, cujo sinal está deslocado 0,16ppm a campo baixo em relação ao do espectro do derivado **3** em DMSO. O dublete em 4,69ppm corresponde ao hidrogênio 3, que tem uma constante de acoplamento de 5,8Hz com o hidrogênio 2, e não acopla com o hidrogênio 4 devido ao ângulo diedro desfavorável.

Deve-se salientar que este procedimento pode ser utilizado na obtenção de outros padrões mono-acilados na posição 5 da D-ribonolactona **1**, bastando para isto utilizar outros doadores acila.

#### 4.5.3 – Síntese do padrão 5-lauril-D-ribo-1,4-lactona (**5**)

A terceira e última etapa da síntese do padrão 5-lauril envolveu a hidrólise do grupo protetor isopropilideno (**Equação 14**). Utilizou-se neste processo o ácido trifluoroacético (TFA) 50% a 35°C em 2h de reação. Um sólido branco amorfo foi isolado com rendimento quantitativo (>99%).

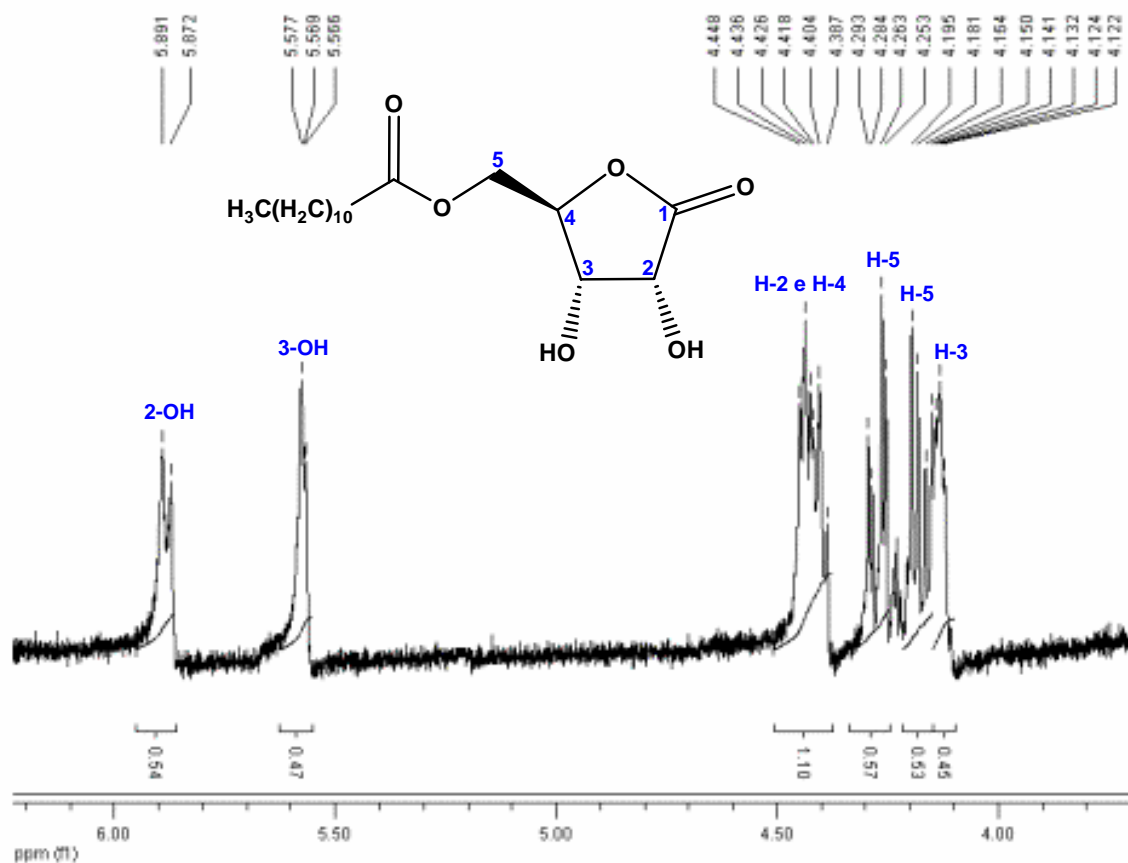


O derivado 5-lauril-D-ribo-1,4-lactona **5** foi caracterizado por IV e RMN-<sup>1</sup>H, e uma amostra diluída em acetona foi analisada por CG.

O IV para o derivado **5**, realizado em pastilha de KBr, apresentou duas bandas em 1754 e 1706cm<sup>-1</sup>, provenientes dos estiramentos C=O da lactona e de éster. Com a diminuição da banda larga de OH, presente no espectro de **1** entre 3000-3500cm<sup>-1</sup>, sugeriram outras duas de menor intensidade em 3485 e 3302cm<sup>-1</sup>, sugerindo a formação do produto mono-acilado. A acilação diminui a probabilidade

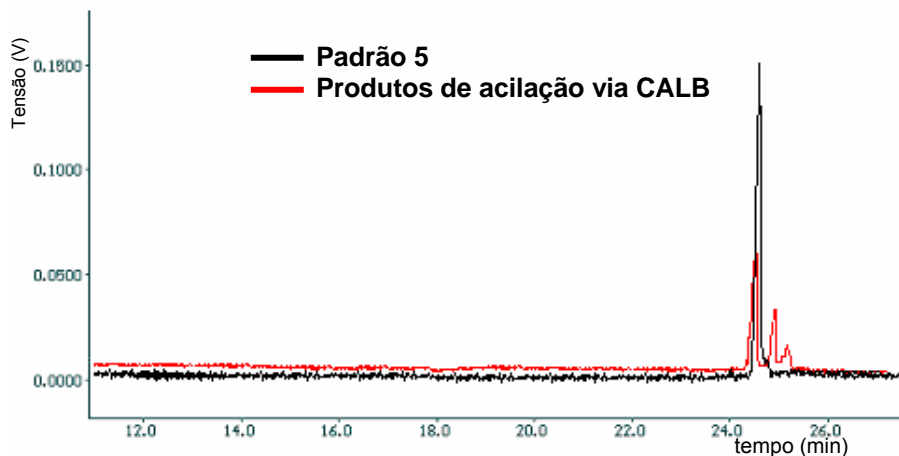
de formação de ligações de hidrogênio intermoleculares, reduzindo a intensidade da banda.

Na ampliação do espectro de RMN-<sup>1</sup>H observam-se dois dubletes em 5,57ppm (4,4Hz) e 5,88ppm (7,6Hz) que correspondem aos hidrogênios hidroxílicos ligados aos carbonos 3 e 2, respectivamente. Na região entre 4,00 e 4,50ppm encontram-se os sinais dos cinco hidrogênios do anel da função lactona, incluindo os ligados ao carbono 5. Os duplos dubletes centrados em 4,17ppm (5,6 e 12,0Hz) e 4,27ppm (4,0 e 12,0Hz) referem-se aos hidrogênios metilênicos, deslocados para campo baixo devido ao efeito de desblindagem após a acilação. O sinal do hidrogênio H-3 está em 4,13ppm. O multiplete na região entre 4,40 e 4,45ppm é concernente à sobreposição de sinais dos hidrogênios H-2 e H-4. (Figura 22).



**Figura 22** - Ampliação do espectro de RMN-<sup>1</sup>H para o derivado 5-O-lauril-D-ribono-1,4-lactona [DMSO-d<sub>6</sub>, 400MHz].

A **Figura 23** mostra os cromatogramas sobrepostos do padrão **5** e do produto obtido na reação de acilação catalisada pela CALB.



[T.i.=50°C, r.a.=10°C, T.f.=250°C, T. c.=250°C, T. inj.=280°C, T. det.=290°C, coluna Shimadzu CBP5-M25]

**Figura 23** - Cromatograma obtido por CG para o produto da reação de acilação de **1** com ácido láurico catalisada pela CALB, sobreposto pelo cromatograma para o padrão **5**.

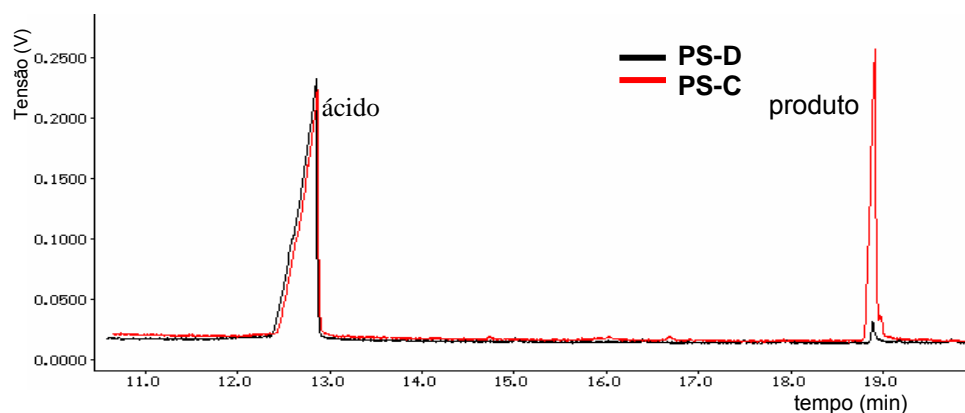
A análise cromatográfica mostra que o tempo de retenção do padrão **5** é o mesmo obtido para o produto majoritário da acilação catalisada pela CALB. Este resultado comprova que a CALB foi seletiva na reação, e que o produto majoritariamente formado é o 5-O-lauril-D-ribose-1,4-lactona **5**.

#### 4.6 – Síntese de lauratos de D-ribonolactona catalisada pelas lipases PS-C e PS-D

Apesar das lipases de *Pseudomonas cepacia* PS-C e PS-D serem fornecidas já imobilizadas, optou-se por submetê-las a uma nova imobilização com CS, por se tratarem de pós muito finos. Este fator dificultaria o isolamento dos produtos e reciclagem dos catalisadores, no final do processo de síntese.

Portanto, 100mg das lipases PS-C e PS-D foram imobilizadas em filmes de CS e estes sistemas utilizados na acilação da lactona **1** (1,5mmol) com ácido láurico (1,5mmol).

Após 48h, apenas um produto foi detectado na análise de CG, com conversões de 54 e 7% para as reações catalisadas pela PS-C e PS-D, respectivamente (**Figura 24**).



[T.i.=50°C, r.a=20°C, T.f.=250°C, T. c.=250°C, T. inj.=280°C, T. det.=290°C, coluna Shimadzu CBP5-M25]

**Figura 24** - Cromatograma obtido por CG para a alíquota da reação de acilação de **1** com ácido láurico catalisada pelos sistemas PS-C/CS e PS-D/CS. [1,5mmol D-ribono-1,4-lactona, 1,5mmol ácido láurico, 35°C, 48h]

O produto obtido com a PS-C foi submetido a um tratamento com KOH 0,01molL<sup>-1</sup>, para retirar o excesso de ácido, e em seguida às análises de IV, RMN-<sup>1</sup>H e CG/EM.

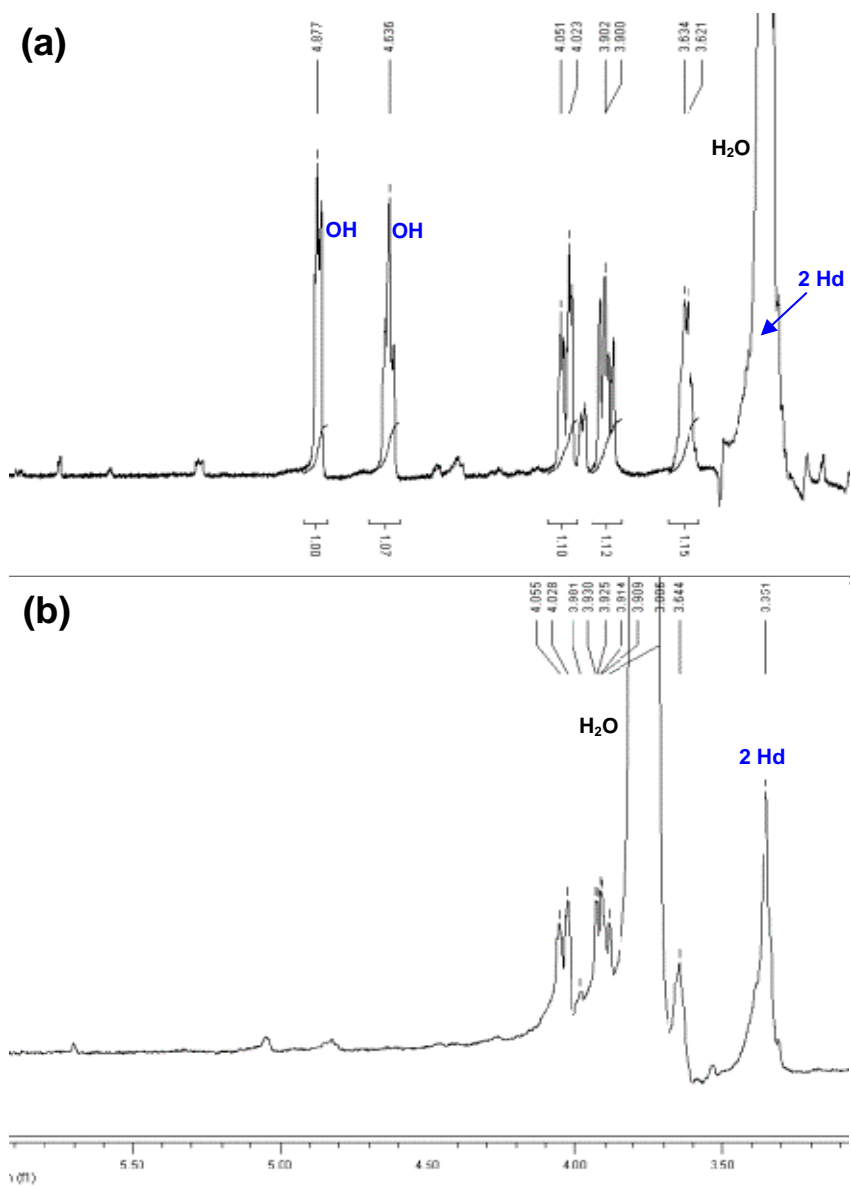
No espectro de IV observa-se novamente apenas uma banda referente ao estiramento C=O ( $1731\text{cm}^{-1}$ ), que pode ser atribuída a sobreposição das bandas de carbonila do éster e da lactona. Novamente foi observada a diminuição da banda larga de OH ( $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ ), originando duas de menor intensidade em  $3244$  e  $3306\text{cm}^{-1}$ . Estes dados mostram a formação de um produto acilado.

O espectro de RMN- $^1\text{H}$  do produto foi comparado com o da lactona de partida. A **Figura 25** mostra as ampliações da região entre 3,0 e 6,0ppm dos espectros de RMN- $^1\text{H}$  em DMSO- $\text{d}_6$ , antes e após a adição de uma pequena quantidade de  $\text{D}_2\text{O}$ .

A presença de dois sinais hidroxílicos, sendo um deles ligado ao carbono 5 do anel lactônico, indica a mono-acetilação de **1**, e que esta ocorreu nas posições 2 ou 3. Com a adição de  $\text{D}_2\text{O}$  (espectro **b**), estes sinais não foram mais observados, pois os hidrogênios hidroxílicos são trocados por deutérios, que não são detectados pelo aparelho.

A adição de  $\text{D}_2\text{O}$  também foi importante para a verificação do multiplete (2H) em 3,35ppm, que corresponde aos hidrogênios metilênicos. Este sinal encontrava-se encoberto pelo sinal largo dos hidrogênios da água presente no solvente DMSO- $\text{d}_6$ . A  $\text{D}_2\text{O}$  acrescentada promoveu o deslocamento a campo baixo do sinal da água, enquanto os demais sinais ficaram fixos.

Deve-se salientar que os sinais do composto obtido estão deslocados aproximadamente 0,50ppm para campo alto em relação aos hidrogênios da D-ribonolactona **1**. Com base nos estudos realizados por Sá e col.<sup>80,82</sup>, este comportamento não é esperado para derivados acilados de **1**. Apesar das análises apontarem para a formação do derivado mono-acilado nas posições 2 ou 3 do anel lactônico, novas análises estão sendo realizadas para caracterização do produto.

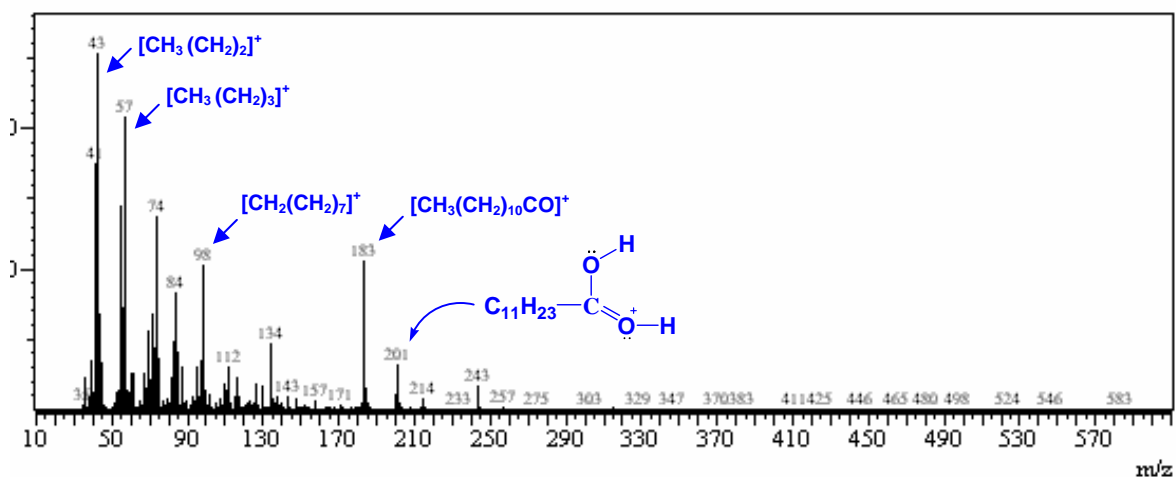


**Figura 25** - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H ampliado do produto da reação de acilação da D-ribonolactona **1** com ácido láurico catalisada pelo sistema PS-C/CS [(a) DMSO<sub>6</sub>, (b) DMSO<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O; 400MHz].



Para análise de CG/EM, uma amostra do produto foi solubilizada em acetonitrila e foi adicionado diazometano para metilar o ácido láurico remanescente, e obter uma melhor resolução no cromatograma. Apenas um pico foi verificado no tempo de retenção de 23,1min.

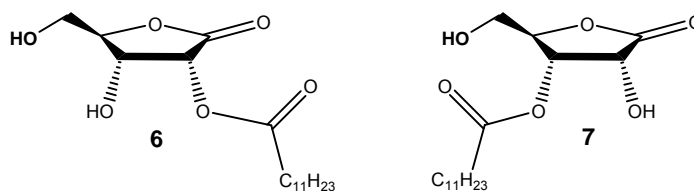
A **Figura 26** mostra o espectro de massas do produto, atribuindo aos principais picos possíveis fragmentos formados.



**Figura 26** – Espectro de massas do produto da reação de acilação da D-ribonolactona **1** com ácido láurico catalisada pelo sistema PS-C/CS.

Na análise do espectro, apenas os fragmentos do ácido láurico foram observados. O fragmento  $m/z$  183 é proveniente da quebra da ligação entre o oxigênio e o carbono  $sp^2$  carbonílico. O pico base ( $m/z$  43) deriva da quebra da cadeia alquílica do ácido láurico. O íon molecular ( $m/z$  330) que indica a formação do derivado mono-acilado, não foi detectado, provavelmente devido a sua baixa estabilidade. O pico com  $m/z$  201 pode ser proveniente do rearranjo, típico de ésteres de álcoois de cadeia longa, que envolve a eliminação da fração alquílica e a transferência de dois átomos de hidrogênio<sup>96</sup>.

De posse dos resultados descritos, pode-se propor que as lipases PS-C e PS-D foram regioseletivas, e os possíveis produtos obtidos utilizando-as como catalisador na acilação de **1** com o ácido láurico são o 2-lauril-1,4-D-ribono-1,4-lactona **6** ou o 3-lauril-1,4-D-ribono-1,4-lactona **7** (**Figura 27**).



**Figura 27**– Estruturas dos possíveis produtos monoacilados da reação entre a D-ribonolactona **1** e ácido láurico, catalisada por PS-C e PS-D.

## 5 – CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no que se refere a preparação e utilização de filmes de caseinato de sódio, como suporte para lipases, em reações biocatalisadas, as principais conclusões são:

1 – Os filmes de caseinato de sódio são estáveis em diversos solventes orgânicos e contém aproximadamente 10-12% de água.

2 – Análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram que os aglomerados enzimáticos estão localizados na superfície dos filmes.

3 – A conversão em oleato de *n*-pentila catalisada pelo sistema LPS/CS é dependente do solvente orgânico, sendo os apolares mais efetivos (por ex. 39% de conversão com tolueno e 58% em *n*-heptano).

4 – Com o sistema LPS/CS obteve-se moderada regioseletividade na acilação da D-ribono-1,4-lactona **1** com os ácidos hexanóico, octanóico, decanóico e láurico, com a formação de misturas de ésteres e a presença de um produto majoritário para cada reação efetuada. As conversões em alquilatos de **1** variaram de 50-90%, em 72h.

5 – A CALB foi regioseletiva na acilação da D-ribono-1,4-lactona **1** com ácido láurico, catalisando majoritariamente a formação do derivado 5-O-lauril-D-ribono-1,4-lactona **5** com conversão >99% em 72h de reação.

6 – O derivado 5-O-lauril-D-ribono-1,4-lactona **5** foi sintetizado através de um processo envolvendo 3 etapas, confirmando a formação deste produto na acilação catalisada pela CALB.

7 – As lipases PS-C e PS-D imobilizadas em filmes de CS foram regioseletivas na acilação de **1** com o ácido láurico, formando apenas um produto com conversões de 54 e 7%, respectivamente em 48h. As análises indicaram que o produto formado não é o derivado 5-O-lauril-D-ribo-1,4-lactona **5**, e novos experimentos estão sendo realizados para confirmar a estrutura do produto. Propõe-se que o derivado mono-acilado 2-lauril-1,4-D-ribo-1,4-lactona **6** ou 3-lauril-1,4-D-ribo-1,4-lactona **7** foi obtido.

**Anexo 1** - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H para o produto de acilação de 1 com ácido láurico catalisada pela CALB [DMSO-d<sub>6</sub>, 200MHz].

## 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- 1 Solomons, T. W. G.; **Organic Chemistry**, 6th Edition, John Wiley & Sons Inc., Cap. 24, 1142-1183, 1996.
- 2 Nelson D. L.; Cox, M. M.; **Lehninger: Principles of Biochemistry**, 3rd Edition, Worth Publishers, Cap. 5, 113-152, 2000.
- 3 Campbell, M. K.; **Biochemistry**, Saunders College Publishing, 2nd Edition, Cap. 3, 4 e 5, 68-172, 1995.
- 4 Faber, K.; **Biotransformations in Organic Chemistry**, 3rd Edition, Springer-Verlag, New York, Cap. 1 e 2, 1-116, 1997.
- 5 Voet, D.; Voet, J. G.; **Biochemistry**, 2nd Edition, John Wiley & Sons Inc., New York, 1994.
- 6 Roberts, S. M.; **Biocatalysts for Fine Chemicals Synthesis**, John Wiley & Sons, England, 1999.
- 7 Queiroz, N.; Nascimento, M. G.; **Tetrahedron Lett.**, 43, 5225, 2002.
- 8 Zanotto, S. P.; Fernandes, L.; Nascimento, M. G.; Sá, M. M.; **Tetrahedron: Asymmetry**, 14, 3111, 2003.
- 9 Thorleif, A.; Elisabeth, E. J.; **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, 2, 55, 2003.
- 10 **Swiss Protein Data Bank Viewer**, (<http://www.rcsb.org/pdb/>; cód. 4lip), acessado em 11/05/2005.
- 11 Cygler, M.; Schrag, J. D.; **Biochim. Biophys. Acta**, 1441, 205, 1999.
- 12 Pleiss, J.; Fischer, M.; Schmid, R.; **Chem. Phys. Lipids**, 79, 1998.
- 13 Klibanov, A. M.; **Nature**, 404, 241, 2001.
- 14 Dalla-Vecchia, R.; Sebrão, D.; Soldi, V.; Nascimento, M. G.; **Process Biochem.**, 40, 2677, 2005.
- 15 Vecchia, R. D.; Soldi, V.; Nascimento, M. G.; **Quim. Nova**, 27, 4, 623, 2004.
- 16 Munjal, N.; Sawheney, S. K.; **Enzyme Microb. Technol.**, 30, 613, 2002.
- 17 Arica, M. Y.; Bayramoglu, G.; Kacar, Y.; Denizli, A.; **J. Food Eng.**, 52, 367, 2002.
- 18 Villeneuve, P.; Muderhwa, J. M.; Graille, J.; Haas, M. J.; **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, 9, 113, 2000.

- 
- 19 Ghamgui, H.; Karra-Chaâbouni, M.; Gargouri, Y.; **Enzyme Microb. Technol.**, 35, 355, 2004.
- 20 Matsushima, A.; Kodera, Y.; Hiroto, M.; Nishimura, H.; Inada, Y.; **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, 2, 1, 1996.
- 21 Hung, T. C.; Giridhar, R.; Chiou, S. H.; Wu, W. T.; **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, 26, 69, 2003.
- 22 Amorim, R. V. S.; Melo, E. S.; Carneiro-da-Cunha, M. G.; Ledingham, W. M.; Campos-Takaki, G. M.; **Bioresour. Technol.**, 89, 35, 2003.
- 23 Jiang, D. S.; Long, S. Y.; Huang, J.; Xiao, H. Y.; Zhou, J. Y.; **Biochem. Eng. J.**, 25, 15, 2005.
- 24 Chiou, S. H.; Wu, W. -T.; **Biomaterials**, 25, 197, 2004.
- 25 Sebrão, D.; **Síntese de Ésteres Catalisada por Lipase de *Pseudomonas* sp. Imobilizada em Filmes de Caseinato de Sódio/Glicerol**; Trabalho de Conclusão de Curso, UFSC, 2003.
- 26 Pimentel, A.; Silva, V. D.; Sebrão, D.; Soldi, V.; Nascimento, M. G.; **Imobilização Simultânea de Duas Lipases em Filmes de Caseinato de Sódio**, Livro de Resumos do *Biocatálisis y Biotransformaciones*, PSD-4, 2004.
- 27 Sebrão, D.; Sá, M. M.; Fernandes, L.; Silveira, G. P.; Nascimento, M. G.; **Síntese de Derivados de D-ribonolactona Catalisada pela Lipase de *Pseudomonas* sp. Imobilizada em Filmes de Caseinato de Sódio**, Livro de Resumos da 28<sup>a</sup> RASBQ, QO-025, 2005.
- 28 Silva, V. D.; Pimentel, A.; Sebrão, D.; Nascimento, M. G.; **Filmes de Caseinato de Sódio como Suporte para as Lipases de *Pseudomonas* sp. e *Rhizopus orizae***, Livro de Resumos da 28<sup>a</sup> RASBQ, QO-123, 2005.
- 29 Albuquerque, P. M.; Witt, M. A.; Zannoto, S. P.; Stambuk, B. U.; Nascimento, M. G.; **Influence of the support on the reduction of ethyl acetoacetate by immobilized baker`s yeast**, 11th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, Book of Abstracts, p. 167, 2005.
- 30 Ye, P.; Xu, Z. K.; Che, A. F.; Wu, J.; Seta, P.; **Biomaterials**, 26, 6394, 2005.

- 
- 31 Deng, H. T.; Xu, Dai, Z. W.; Wu, J.; Seta, P.; **Enzyme Microb. Technol.**, 36, 996, 2005.
- 32 Kuroiwa, T.; Shoda, H.; Ichikawa, S.; Sato, S.; Mukataka, S.; **Process Biochem.**, 40, 2637, 2005.
- 33 Su, X.; Zong, Y.; Richter, R.; Knoll, W.; **J. Colloid Interface Sci.**, 287, 35, 2005.
- 34 Catana, R.; Ferreira, B. S.; Cabral, J. M. S.; Fernandes, P.; **Food Chem.**, 91, 517, 2005.
- 35 Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B.; **Nature**, 409, 258, 2001.
- 36 Zaks, A.; Klibanov, A. M.; **Science**, 224, 1249, 1984.
- 37 Zaks, A.; Klibanov, A. M.; **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 82, 3192, 1985.
- 38 Zaks, A.; Klibanov, A. M.; **J. Biol. Chem.**, 17, 8017, 1988.
- 39 Zaks, A.; Klibanov, A. M.; **J. Biol. Chem.**, 263, 3194, 1988.
- 40 Haki, G. D.; Rakshit, S. K.; **Bioresour. Technol.**, 89, 17, 2003.
- 41 Whitesides, G. M.; Wong, C. H.; **Angew. Chem., Int. Ed.**, 24, 617, 1985.
- 42 Carvalho, P. D.; Campos, P. R. B.; Noffs, M. D.; **Quim. Nova**, 26, 1, 7580, 2003.
- 43 Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, U. C.; **Biotechnol. Adv.**, 19, 627, 2001.
- 44 Lima, V. M. G., **PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA LIPASE DE *BACILLUS MEGATERIUM* CCOC-P2637 E SUA APLICAÇÃO EM BIOCATALÍSE EM SOLVENTES ORGÂNICOS**, Tese de Doutorado em Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, 2004.
- 45 Miled, N.; Riviere, M.; Cavalier, J. F.; Buono, G.; Berti, L.; Verger, R.; **Anal. Biochem.**, 338, 171, 2005.
- 46 Henen, W. J.; Sweer, H. M.; Wang, Y.; Wong, C.; **J. Org. Chem.**, 53, 4939, 1998.
- 47 Ciuffreda, P.; Casati, S.; Santaniello, E.; **Tetrahedron Lett.**, 44, 3663, 2003.
- 48 Ciuffreda, P.; Alessandrini, L.; Terraneo, G.; Santaniello, E.; **Tetrahedron: Asymmetry**, 14, 3197, 2003.
- 49 Chien, T.; Chern, J.; **Carbohydr. Res.**, 339, 1215, 2004.



- 
- 50 Framis, V.; Camps, F.; Clapés, P.; **Tetrahedron Lett.**, 45, 5031, 2004.
- 51 Lohith, K.; Divakar, S.; **J. Biotechnol.**, 117, 49, 2005.
- 52 Crespo, J. S.; Queiroz, N.; Nascimento, M. G.; Soldi, V.; **Process Biochem.**, 40, 401, 2005.
- 53 **Biotimes - Revista Bioindustrial Trimestral da Novozymes**, 1998-2005.
- 54 Xi, W. W; Xu, J. H.; **Process Biochem.**, 40, 2161, 2004.
- 55 Kamal, A.; Khanna, G. B. R.; Ramu R.; Krishnaji, T.; **Tetrahedron Lett.**, 44, 4783, 2003.
- 56 Moreira, M. A.; **UTILIZAÇÃO DE LIPASES EM REAÇÕES DE EPOXIDAÇÃO QUIMIO-ENZIMÁTICA**; Dissertação de Mestrado em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.
- 57 Moreira, M. A.; Bitencourt T. B.; Nascimento, M. G.; **Synth. Commun.**, 35, 2107, 2005.
- 58 Zhou, R.; Xu, J.; **Biochem. Eng. J.**, 23,1, 11, 2005.
- 59 Kreiner, M.; Fernandes, J. F. A.; O'Farrell, N.; Halling, P. J; Parker, M. C.; **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, 33, 65, 2005.
- 60 Peres C.; Harper, N.; Silva, M. D. R. G.; Barreiros S.; **Enzyme Microb. Technol.**, 37, 145, 2005.
- 61 Lima, V. M. G.; Krieger, N.; Mitchell, D. A.; Fontana, J. D.; **Biochem. Eng. J.**, 18, 2004.
- 62 Levinson, W. E., Kuo, T. M.; Kurtzman, C. P.; **Enzyme Microb. Technol.**, 37, 126, 2005.
- 63 Macedo, G. A.; Pastore, G. M.; **Revista Ciência Tecnol. Aliment.**, 17,115, 1997.
- 64 Romero, M. D.; Calvo, L.; Alba, C.; Daneshfar, A.; Ghaziaskar, H. S.; **Enzyme Microb. Technol.**, 37, 42, 2005.
- 65 Coultate, T. P.; **Food – The Chemistry of Its Components**, Royal Society of Chemistry Paperbacks, London, 1988.
- 66 Sgarbieri, V. C.; **Proteínas em Alimentos Proteicos: Propriedades, Degradações, Modificações**, Livraria Varela Ltda, São Paulo-SP, 1996.
- 67 Amiot, J.; **Ciencia y Tecnologia de la Leche**, Ed. Acribia S.A..

- 
- 68 Barreto, P. L. M.; Roeder, J.; Crepo, J. S.; Maciel, G. R.; Terenzi, H.; Pires, A. T. N.; Soldi, V.; **Food Chem.**, 82, 425, 2003.
- 69 Khwaldia, S. B.; Perez, C.; Desobry, S.; **J. Dairy Sci.**, 87, 2011, 2004.
- 70 Jang, W.; Nikolov, A.; Wasan, D. T.; **Ind. Eng. Chem. Res.**, 44, 4855, 2005.
- 71 Istarova, T. A.; Semenova, M. G.; Sorokoumova, G. M.; Selishcheva, A. A.; Belyakova, L. E.; Polikarpov, Y. N.; Anokhina, M. S.; **Food Hydrocolloids**, 19, 429, 2005.
- 72 Allinger, N. L; **Química Orgânica**, 2<sup>a</sup> ed., Guanabara Dois, Cap. 25, 621-641, 1978.
- 73 Bruice, P. Y.; **Organic Chemistry**, 4th Edition, Upper Saddle River: Pearson Education International, Cap. 22, 921-958, 2004.
- 74 Hollingsworth, R. I.; Wang, G.; **Chem. Rev.**, 100, 4465, 2000.
- 75 Sartori, G.; Ballini, R.; Bigi, F.; Bosica, G.; Maggi, R.; Righi, P.; **Chem. Rev.**, 104, 199, 2004.
- 76 Kadereit, D.; Waldmann, H.; **Chem. Rev.**, 101, 3367, 2001.
- 77 Chen, S.; Joullié, M. M.; **J. Org. Chem.**, 49, 2168, 1983.
- 78 Bhat, K. L.; Chen, S.; Joullié, M. M.; **Heterocycles**, 23, 691, 1985.
- 79 Lederkremer, R. M.; Varela, O.; **Adv. Carb. Chem. Biochem.**, 50, 125, 1994.
- 80 Silveira, G. P.; **SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA FRENTE À ENZIMA GAPDH DE DERIVADOS DE CARBOIDRATOS VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE NOVAS DROGAS ANTICHAGÁSICAS**; Dissertação de Mestrado em Química, UFSC, 2002.
- 81 Comin M. J.; Rodriguez, J. B.; **Tetrahedron**, 56, 4639, 2000.
- 82 Sá, M. M., Silveira, G. P.; Castilho, M. S.; Pavão, F.; Oliva, G.; **Arkivoc**, 8, 112, 2002.
- 83 Batoux, N. E.; Paradisi, F.; Engel, P. C.; Migaud, M. E.; **Tetrahedron**, 60, 6609, 2004.
- 84 Fichas técnicas das lipases, **Amano Enzyme** (<http://www.amano-enzyme.co.jp>), acessado em 01/08/2005.

- 
- 85 Ficha técnica da Novozym 435, **Novozymes**, (<http://www.novozymes.com>), acessada em 01/08/2005.
- 86 Han, S. Y.; Joullié, M. M.; Petasis, N. A.; Corbera, J.; Font, J.; Ortuno, R. M.; **Tetrahedron**, 49, 349, 1993.
- 87 Laane, C.; Boeren, S.; Veeger, C.; **Biotechnol. Bioeng.**, 30, 81, 1987.
- 88 Ferrero, M.; Gotor, V.; **Chem. Rev.**, 100, 4319, 2000.
- 89 Gotor, V.; Morís, F.; **Synthesis**, 626, 1992.
- 90 Ozaki, S.; Yamashita, K.; Konish, T.; Maekawa, T.; Escima, M.; Uemura, A.; Ling, L.; **Nucleosides Nucleotides**, 14, 401, 1995.
- 91 Ciuffreda, P.; Casati, S.; Santaniello, E.; **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 9, 1577, 1999.
- 92 Slingh, H. K.; Cote, G. L.; Sikorski, R. S.; **Tetrahedron Lett.**, 34, 5201, 1993.
- 93 Roncaglia, D.; Schmidt, A. M.; Iglesias, L. E.; Iribarren, A. M.; **Biotechnol. Lett.**, 23, 1439, 2001.
- 94 Zinni, M.; Iglesias, L. E.; Iribarren, A. M.; **Biotechnol. Lett.**, 24, 979, 2002.
- 95 García, J.; Fernández, S.; Ferrero, M.; Sanghvi, Y. S.; Gotor, V.; **Tetrahedron Lett.**, 45, 1709, 2004.
- 96 Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C.; **Spectrometric Identification of Organic Compounds**, 5th Edition, John Wiley & Sons Inc., 165-265, 1991.
- 97 Han, S. Y.; Joullié, M. M.; Petasis, N. A.; Bigorra, J.; Corbera, J.; Fonte, J.; Ortuno, R. M.; **Tetrahedron**, 49, 349, 1993.