

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**

**CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
CURSO DE PÓS - GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**RESOLUÇÃO DE ÁLCOOIS SECUNDÁRIOS RACÊMICOS  
ATRAVÉS DA ESTERIFICAÇÃO CATALISADA POR  
ENZIMAS IMOBILIZADAS EM  
ORGANO - GEL**

**DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL  
DE SANTA CATARINA COMO PARTE DOS REQUISITOS  
PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE  
MESTRE EM CIÊNCIAS**

**PAULO CESAR DE JESUS**

**FLORIANÓPOLIS  
SANTA CATARINA - BRASIL  
FEVEREIRO DE 1994**

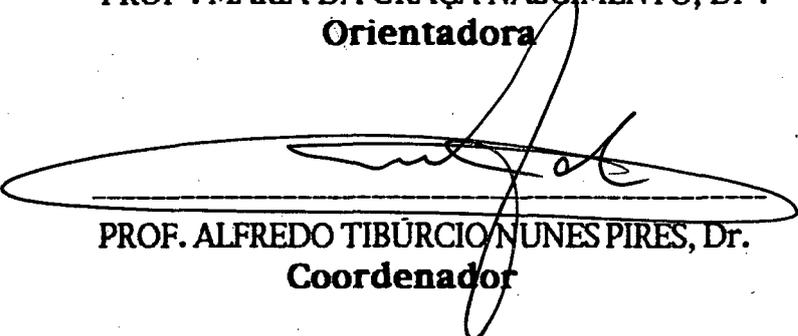
**RESOLUÇÃO DE ÁLCOOIS SECUNDÁRIOS RACÊMICOS ATRAVÉS DA  
ESTERIFICAÇÃO CATALISADA POR ENZIMAS IMOBILIZADAS EM  
ORGANO - GEL.**

**PAULO CESAR DE JESUS**

**ESTA DISSERTAÇÃO FOI JULGADA APROVADA EM SUA FORMA FINAL  
PELA ORIENTADORA E MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA.**

*M. Graça Nascimento*

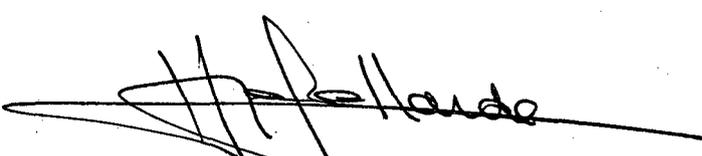
PROF<sup>ª</sup>. MARIA DA GRAÇA NASCIMENTO, Dr<sup>ª</sup>.  
**Orientadora**

  
PROF. ALFREDO TIBÚRCIO NUNES PIRES, Dr.  
**Coordenador**

**BANCA EXAMINADORA:**

*M. Graça Nascimento*

PROF<sup>ª</sup>. MARIA DA GRAÇA NASCIMENTO, Dr<sup>ª</sup>.

  
PROF. HUGO ALEJANDRO GALLARDO OLMEDO, Dr.

*N. A. Debacher*  
PROF. NITO ANGELO DEBACHER, Dr.

**à Professora  
Maria da Graça Nascimento**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha família pelo apoio que recebi durante o decorrer do curso.

A professora Dr<sup>a</sup>. Maria da Graça Nascimento em especial, pela oportunidade e confiança depositadas em minha pessoa no decorrer do desenvolvimento deste trabalho, além de sua dedicação e amizade.

Ao professor Brian H. Robinson da School of Chemical Sciences, University of East Anglia, Norwich, Inglaterra pela gentileza de ceder - nos as enzimas.

Ao professor Paulo S. Mohan e a técnica Claudia Martelli do I.Q., UNICAMP, por terem cedido gentilmente o polarímetro.

A UFSC e ao CNPq pelo apoio financeiro e facilidades concedidas.

Ao Pedro Luiz F. Silva e Geovani Burlin pela colaboração no decorrer deste trabalho.

Aos amigos, colegas e funcionários pela amizade e colaboração no decorrer deste trabalho.

A Deus pela força e pela luz, ajudando a iluminar meus caminhos para que eu pudesse realizar este trabalho com dedicação, contribuindo assim para o conhecimento humano e a Ciência.

## RESUMO

A habilidade de enzimas para atuar como catalisadores quirais já tem sido considerada por muitos anos, particularmente pela indústria farmacêutica.

A resolução de misturas de álcoois racêmicos pode ser realizada utilizando as propriedades enantioseletivas de enzimas hidrolíticas. A crescente busca de uma metodologia cada vez mais aperfeiçoada para utilização de enzimas em síntese orgânica, levou muitos pesquisadores a buscar um sistema que melhor se adaptasse às condições sintéticas desejadas. A imobilização de enzimas é uma das mais importantes técnicas na aplicação de catálise enzimática para reações sintéticas em solventes orgânicos.

O trabalho desenvolvido consistiu em uma nova metodologia para imobilização de enzimas e sua aplicação em síntese orgânica. Diferentes lipases (*Pseudomonas* sp, lipase Microbial, lipase de *Cândida cylindracea* e *Chromobacterium viscosum*) foram imobilizadas em sistema de organo-gel, formado pela solubilização de gelatina em uma microemulsão água / óleo (W/O) de Aerosol O-T em n-hexano. Este sistema foi usado para a resolução enantioseletiva dos álcoois racêmicos ( $\pm$ )-2-butanol, ( $\pm$ )-2-hexanol, ( $\pm$ )-2-octanol, ( $\pm$ )-1-phenil-1-ethanol, através de esterificação com os ácidos hexanóico e dodecanóico a 25°C.

Os álcoois opticamente ativos, foram obtidos com bons rendimentos e com excessos enantioméricos na faixa de 90-100%.

## ABSTRACT

The ability of enzymes to act as chiral catalysts have been considered for many years, specially in the pharmaceutical industry.

Resolution of racemic alcohols can be achieved using the enantioselective properties of hydrolytic enzymes. New systems, which operate well in the desired synthetic conditions, have been developed due to growing interest in having a more efficient methodology for using enzymes in organic synthesis. Enzyme immobilization is one of the more important technics for the application of this catalyst in synthetic reactions in organic media.

In this work, a new methodology for enzyme immobilization was developed, and used in organic asymmetric synthesis. Different lipases ( *Pseudomonas* sp, lipase Microbial, lipase de *Cândida cilyndracea* e C.V. lipase) were immobilized in a organo - gel system, formed by gelatin solubilized in a microemulsion water - in - oil (W/O) of Aerosol O-T/ n - hexane. This system was used for enantioselective resolution of the secondary racemic alcohols ( $\pm$ )2 - butanol; ( $\pm$ )2 - hexanol; ( $\pm$ )2 - octanol and ( $\pm$ )1 - phenylethanol by esterification of hexanoic and dodecanoic acids at 25°C.

The alcohols, optically active, were obtained in good yields with enantiomeric excess in the range of 90 - 100%.

## ÍNDICE GERAL

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. OBJETIVO E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. ENZIMAS EM SÍNTESE ORGÂNICA ASSIMÉTRICA .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2.1. Especificidade das Enzimas .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2.2. Especificidade Enantiomérica .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2.3. Catálise Enzimática .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2.4. Lipases .....</b>	<b>10</b>
<b>1.2.4.1. Catálise Estereoquimicamente Específica de Lipases .....</b>	<b>14</b>
<b>1.3. RESOLUÇÃO ENZIMÁTICA .....</b>	<b>14</b>
<b>1.3.1. Resolução Enzimática de Farmacos e Produtos Naturais .....</b>	<b>14</b>
<b>1.3.2. Resolução Enzimática de Álcoois Secundários Racêmicos .....</b>	<b>17</b>
<b>1.4. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS .....</b>	<b>22</b>
<b>1.4.1. Imobilização de Enzimas em Organo - Gel .....</b>	<b>23</b>
<b>1.5. ROTAÇÃO ÓPTICA .....</b>	<b>26</b>
<b>1.5.1. Rotação Específica .....</b>	<b>28</b>
<b>1.5.2. Pureza Óptica .....</b>	<b>29</b>

<b>2. PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>30</b>
<b>2.1. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
<b>2.1.1. Enzimas Utilizadas .....</b>	<b>30</b>
<b>2.1.2. Reagentes e Equipamentos .....</b>	<b>30</b>
<b>2.2. PREPARAÇÃO DA CATÁLISE ENZIMÁTICA .....</b>	<b>31</b>
<b>2.2.1. Preparação do Organo - Gel .....</b>	<b>31</b>
<b>2.2.2. Preparação do Meio Reacional via Catálise Enzimática em MBG's .....</b>	<b>33</b>
<b>2.3. TRATAMENTO DOS PRODUTOS DAS REAÇÕES .....</b>	<b>34</b>
<b>2.4. MEDIDAS DE ROTAÇÃO ÓPTICA .....</b>	<b>37</b>
<b>2.5. HIDRÓLISE DOS ÉSTERES .....</b>	<b>38</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1. REUTILIZAÇÃO E ESTABILIDADE DO SISTEMA DE MBG CONTENDO LIPASES IMOBILIZADAS .....</b>	<b>53</b>
<b>3.2. COMPARAÇÃO DO SISTEMA DE MBG's COM OUTROS JÁ UTILIZADOS PARA RESOLUÇÃO DE ÁLCOOIS RACÊMICOS VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA .....</b>	<b>55</b>
<b>3.3. CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS.....</b>	<b>58</b>
<b>4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>60</b>

<b>5. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>68</b>
------------------------------	-----------

#### **APÊNDICES**

<b>1. Espectro de <math>^1\text{H}</math> RMN do laurato de sec-feniletila .....</b>	<b>62</b>
<b>2. Espectro de infravermelho do laurato de sec - feniletila .....</b>	<b>63</b>
<b>3. Espectro de <math>^1\text{H}</math> RMN do laurato de sec - hexila .....</b>	<b>64</b>
<b>4. Espectro de infravermelho do laurato de sec - hexila .....</b>	<b>65</b>
<b>5. Espectro de infravermelho do hexanoato de sec - feniletila .....</b>	<b>66</b>
<b>6. Espectro de infravermelho do hexanoato de sec - hexila .....</b>	<b>66</b>
<b>7. Espectro de <math>^1\text{H}</math> RMN do álcool (+)1-fenil 1-etanol .....</b>	<b>67</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação da ligação de um substrato por 3 pontos a um centro ativo enzimático plano..... 6**
- Figura 2 - Representação geral de uma catálise enzimática atuando na quebra e formação de ligações covalentes ..... 7**
- Figura 3 - Representação da formação de um complexo ES segundo a hipótese do modelo de Fischer ..... 8**
- Figura 4 - Representação de um encaixe induzido por uma alteração estrutural da proteína segundo Koshland ..... 8**
- Figura 5 - Representação das vias alternadas de reações para obter uma alteração de conformação induzida pelo substrato ..... 9**
- Figura 6 - Estrutura do sítio ativo da *lipase da Mucor miehei* na presença do N-hexilclorofosfonato de etila ..... 11**
- Figura 7 - Representação da mudança conformacional na *lipase da Mucor miehei* ..... 12**
- Figura 8 - Representação esquemática do complexo tetraédrico enzima - substrato da *lipase da Mucor miehei* ..... 13**
- Figura 9 - Estruturas organizadas de microemulsões ..... 23**
- Figura 10 - Diagrama de fase de uma solução de água / óleo / surfactante ..... 24**
- Figura 11 - Modelo proposto para a estrutura do organo - gel ..... 25**

<b>Figura 12 - Representação esquemática da luz ordinária e plana polarizada .....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 13 - Representação esquemática de um polarímetro .....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 14 - Representação geral das reações realizadas experimentalmente .....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 15 - Ilustração esquemática da resolução de álcoois racêmicos via esterificação usando lipases imobilizadas em MBG's .....</b>	<b>35</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I - Preparação do organo - gel para as reações .....	32
Tabela II - Ácidos, álcoois racêmicos e enzimas utilizadas nas reações .....	34
Tabela III - Eluentes testados experimentalmente para a separação dos produtos por cromatografia .....	36
Tabela IV - Dados analíticos experimentais para a esterificação enzimática do ácido hexanóico com álcoois secundários racêmicos a 25°C .....	41
Tabela V - Dados analíticos experimentais para a esterificação do ácido láurico com álcoois secundários racêmicos a 25°C .....	42
Tabela VI - Valores experimentais de rotação óptica para a esterificação do ácido láurico e álcoois secundários, em MBG .....	45
Tabela VII - Valores experimentais de rotação óptica para a esterificação do ácido hexanóico com álcoois secundários, em MBG .....	46
Tabela VIII - Valores de rotação óptica e excessos enantioméricos para os álcoois secundários obtidos da hidrólise alcalina dos hexanoatos de alquila e arila .....	49
Tabela IX - Valores de rotação óptica e excessos enantioméricos para os álcoois secundários obtidos da hidrólise alcalina dos lauratos de alquila e arila .....	50

<b>Tabela X - Alguns valores de rotação óptica e excessos enantioméricos para os enantiômeros que não reagiram na reação de esterificação do ácido láurico com álcoois secundários racêmicos em MBG, a 25°C .....</b>	<b>51</b>
<b>Tabela XI - Alguns valores de rotação óptica e excessos enantioméricos para os enantiômeros que não reagiram na reação de esterificação do ácido hexanóico com álcoois secundários racêmicos em MBG, a 25°C .....</b>	<b>52</b>
<b>Tabela XII - Reutilização do gel na formação do laurato de sec - feniletila .....</b>	<b>54</b>

## CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - OBJETIVO E JUSTIFICATIVA

A exploração das propriedades enzimáticas em síntese orgânica vem aumentando nas últimas décadas.<sup>(1)</sup>

A necessidade da utilização de enzimas em síntese orgânica vem das altas propriedades estereoespecíficas e estereoseletivas que elas possuem. Métodos químicos usuais, geralmente são caros, e assim não vem sendo aplicados em larga escala, na produção de compostos opticamente ativos.

Substâncias quirais podem ser obtidas por muitos caminhos, por exemplo podem ser isoladas de plantas, animais ou microorganismos; podem ser sintetizadas de uma substância quiral isolada da natureza ou serem obtidas de uma mistura racêmica pelo uso de um reagente quiral para acompanhar a separação.

Assim, neste trabalho discutiremos o processo de obtenção de substâncias opticamente ativas partindo-se de misturas racêmicas, através da catálise enzimática, tendo como principais objetivos:

I - Estudar um novo método de imobilização de enzimas (lipases) para atuar em solvente orgânico (ex: n-hexano, heptano, etc...) que consiste basicamente da adição de gelatina a uma microemulsão água-óleo.<sup>(2)</sup>

II - Verificar se as enzimas imobilizadas neste novo sistema mantém sua conformação e atividade catalítica, além da sua estereoespecificidade estrutural.

III - Comparar o novo método de imobilização de enzimas com outros sistemas já existentes, por exemplo enzimas em sistema bifásico, em suspensão, adsorvidas em suportes sólidos entre outros.<sup>(2)</sup>

## 1.2 - ENZIMAS EM SÍNTESE ORGÂNICA ASSIMÉTRICA

A biocatálise enantioselectiva em meio não aquoso está tornando-se cada vez mais importante na química orgânica sintética preparativa. Durante as últimas décadas, vários trabalhos foram publicados mostrando a preparação de produtos opticamente ativos via reações envolvendo catálise enzimática.

Klibanov<sup>(3)</sup> admite que o imenso potencial do uso de enzimas como catalisadores já está bem documentada. Apesar disso, químicos orgânicos tem sido relutantes em usar enzimas em seus métodos sintéticos pelos seguintes motivos:

- As reações enzimáticas são geralmente conduzidas em meio aquoso, porque este meio (solvente) é ótimo para manter a conformação catalítica da enzima.
- Muitos compostos de interesse para a química orgânica são insolúveis em água, meio no qual as enzimas são encontradas na natureza e possuem alta solubilidade e atividade.
- A água muitas vezes promove reversibilidade de reações e decompõe vários reagentes (por ex: anidridos, compostos halogenados).
- O equilíbrio termodinâmico de muitos processos é desfavorável em água (ex. reações de esterificação, amidação).
- Quando água é substituída por um solvente apolar, a enzima tende a se reorganizar, implicando em uma drástica mudança conformacional e, conseqüentemente, o seu comportamento catalítico é esperado ser menor que o comportamento observado em água.

Estes fatos, talvez tenham impedido a investigação das propriedades estereoseletivas das enzimas em meio não-aquoso no passado.

A verificação de que enzimas podem funcionar em meio não aquoso, tem eliminado muitas dúvidas sobre o uso destas como catalisadores. Além disso, a catálise enzimática em solvente orgânico tem revelado alguns inesperados e benéficos fenômenos. Por exemplo:

- A estabilidade de enzimas em meio não aquoso pode ser aumentada comparando com aquela em água.<sup>(3)</sup>
- A especificidade do substrato frente as enzimas pode ser controlada pelo solvente.<sup>(4)</sup>
- Todas as propriedades enzimáticas de interesse particular para químicos orgânicos, como por exemplo enantioselectividade, podem ser controladas pelo solvente.<sup>(5),(6),(7),(8)</sup>

Em comparação com outros catalisadores, as enzimas são excepcionais em três principais aspectos<sup>(9)</sup>:

1) As enzimas são extremamente versáteis e catalisam uma extensa faixa de reações. Há um processo enzimático equivalente para a maior parte das reações orgânicas. As reações catalisadas por enzimas ocorrem sob condições suaves, normalmente à temperatura ambiente e em pH próximo a neutralidade. Isto minimiza os problemas de isomerização, racemização, epimerização e rearranjos, que freqüentemente permeiam a metodologia tradicional.

2) As enzimas podem ser catalisadores altamente eficientes. As velocidades das reações promovidas pelas enzimas podem ser até  $10^{12}$  vezes mais rápidas do que as reações correspondentes não catalisadas.

3) As enzimas são geralmente muito seletivas, em termos dos tipos de reações catalisadas, com respeito à estrutura e estereoquímica do substrato e do produto.

Estas propriedades constituem a especificidade de uma enzima, e são os seus aspectos mais importantes para a exploração e uso na síntese assimétrica.

### 1.2.1- ESPECIFICIDADE DAS ENZIMAS

A oportunidade de uso sintético fornecido pelas enzimas, vem da especificidade com que as catálises são realizadas. O grau com que as enzimas discriminam entre as características estruturais e estereoquímicas de seus substratos determina sua utilidade sintética.<sup>(9)</sup>

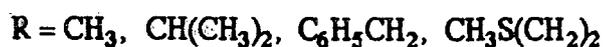
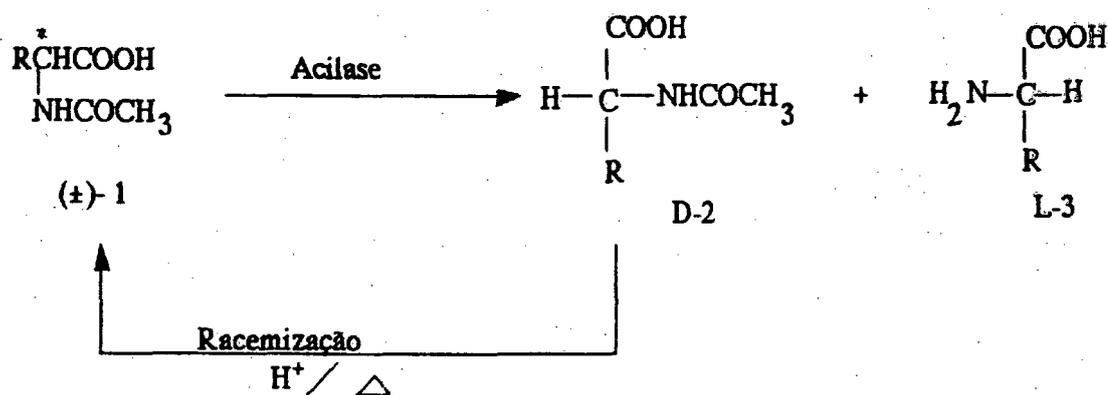
As enzimas mais úteis para aplicações em síntese orgânica são aquelas que aceitam uma larga faixa estrutural de substratos, enquanto retém a habilidade para operar estereoespecificamente em cada uma delas. Muitas enzimas satisfazem estas características, e geralmente as de mamíferos fixam melhor tais critérios. As enzimas microbiais geralmente, tem maior tolerância

estrutural específica. Contudo, isto é compensado por uma mais larga seleção de microorganismos disponíveis.<sup>(9)</sup>

### 1.2.2-ESPECIFICIDADE ENANTIOMÉRICA

A habilidade das enzimas para discriminar enantiômeros de substratos racêmicos está bem documentada.<sup>(9)</sup> Quando uma enzima é enantiomericamente específica, a transformação de um racemato para em 50% de conversão. Neste ponto, todo o enantiômero reativo reagiu.

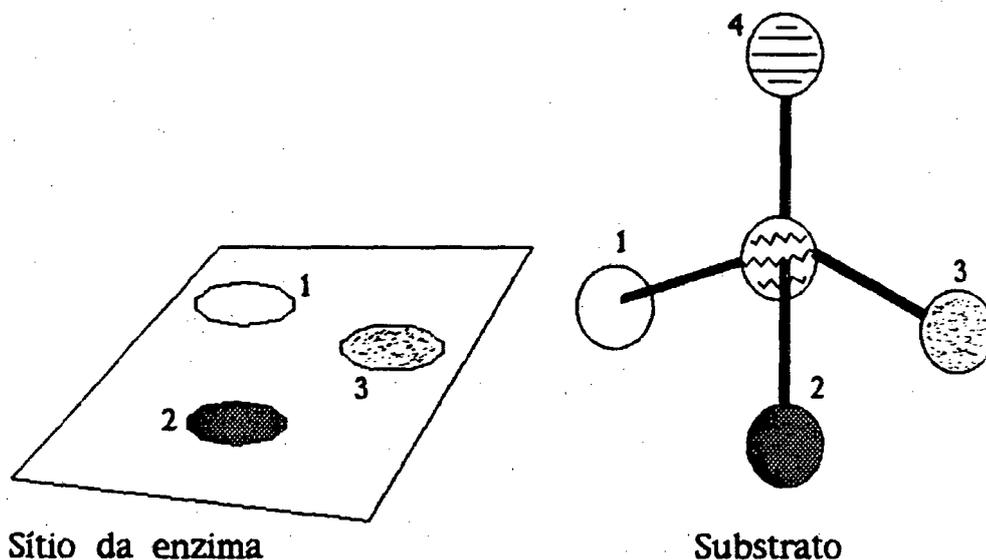
A primeira utilização de enzimas para resolução enantiomérica, foi na resolução de N-acil aminoácidos catalisada pela *acilase*, do rim do porco. *Acilases* são estereoespecíficas para os enantiômeros L, sendo que o N-acil-D-aminoácido pode ser reciclável via racemização induzida quimicamente<sup>(10)</sup> (esquema I). A resolução, usando *acilase*, do composto (±)-1 para o L-3 é industrialmente importante.



Esquema I

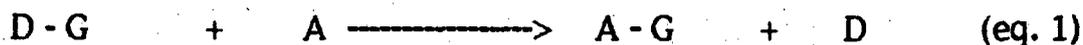


e sítios complementares podem interagir então, a molécula só pode ligar-se de um modo.

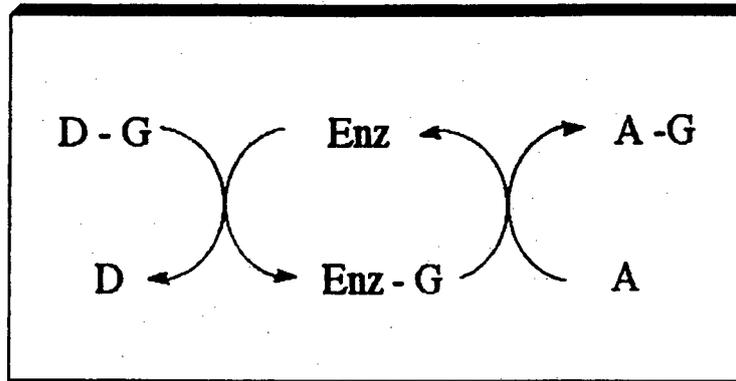


**Figura 1** - Representação da ligação de um substrato por 3 pontos a um centro ativo enzimático plano.

A maioria das reações catalisadas por enzimas envolvem a quebra ou formação de ligações covalentes. Considerando por exemplo a equação abaixo (equação 1);

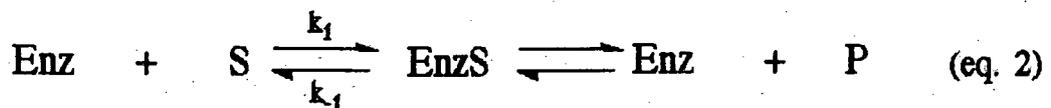


na qual um grupamento,  $G$ , é transferido de um doador  $D - G$ , para um receptor,  $A$ . A reação global envolve a quebra da ligação  $D - G$  e a formação de uma nova ligação  $A - G$ , podendo ser melhor representada pela figura 2.

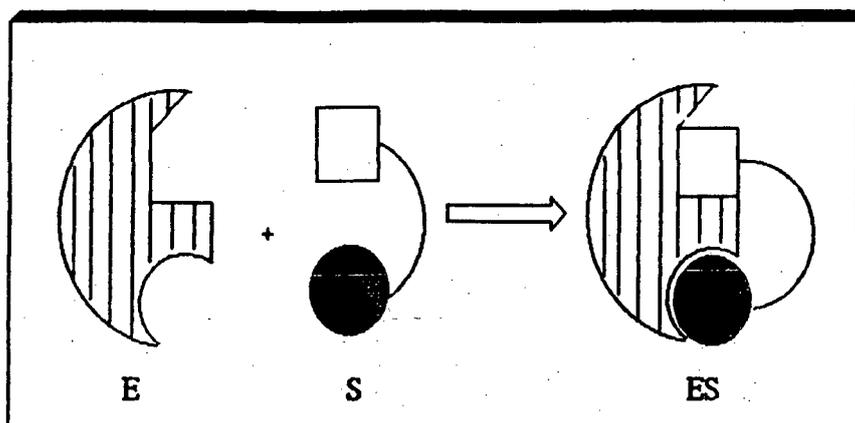


**Figura 2** - Representação geral de uma catálise enzimática atuando na quebra e formação de ligações covalentes.

Portanto, a enzima é um reagente que se combina com o substrato, formando um complexo enzima-substrato, **EnzS**, e que posteriormente se decompõe para formar um produto **P**, e a enzima livre (equação 2).

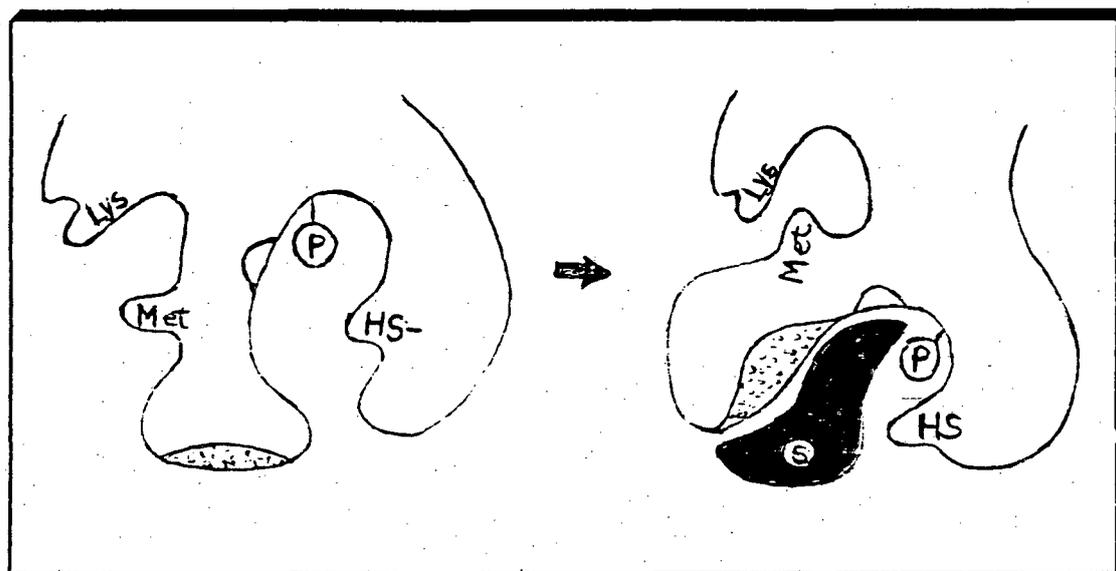


Apenas uma região restrita na enzima está envolvida com o processo de catálise. O modelo de sítio catalítico, proposto por Emil Fischer (citado na ref. 11), visualiza a interação entre o substrato e a enzima por analogia com um conjunto de "chave - fechadura" (figura 3), que ainda é útil para a compreensão de certas propriedades enzimáticas.



**Figura 3** - Representação da formação de um complexo ES segundo a hipótese do modelo de Fischer.

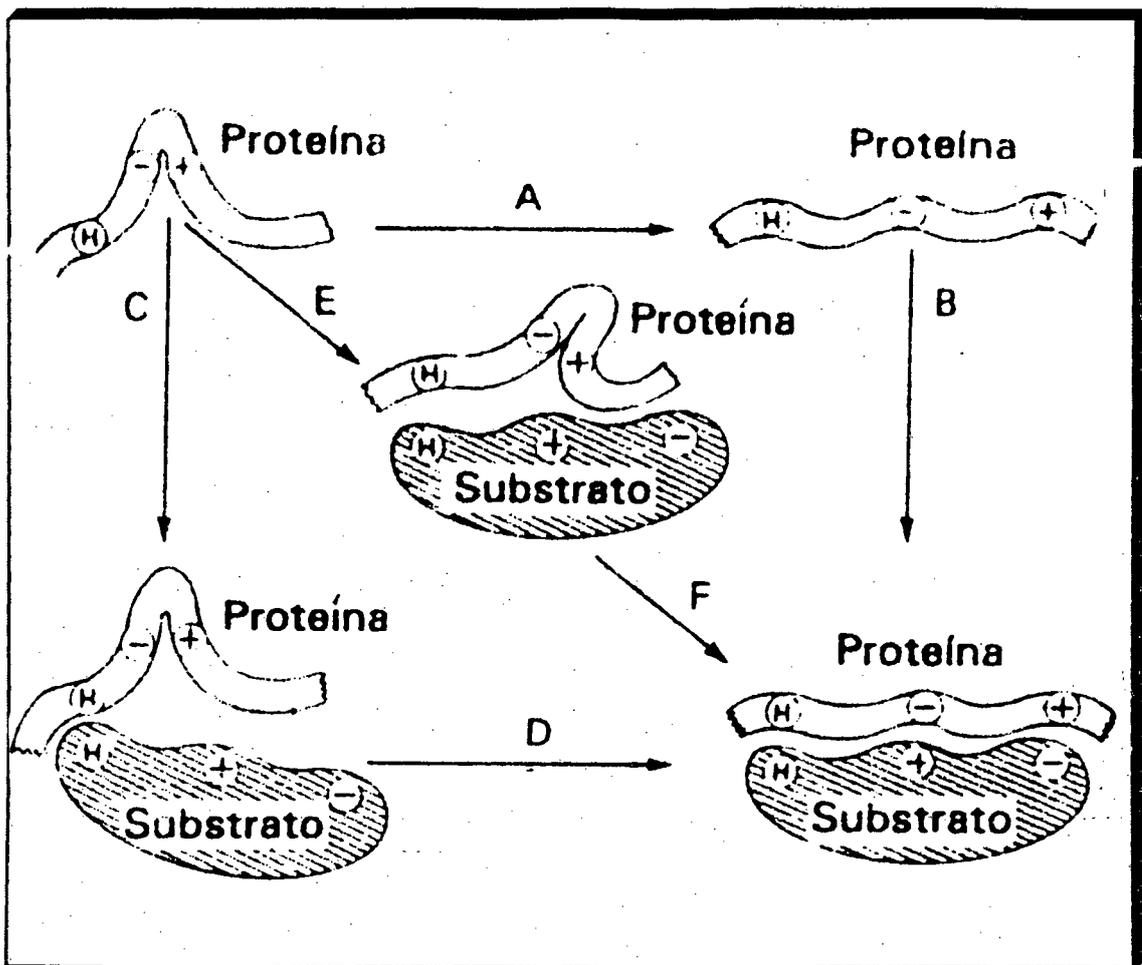
Um modelo mais refinado, e certamente mais útil para explicar as propriedades das enzimas, é o modelo do "encaixe induzido" de Koshland ( figura 4 ).(11)



**Figura 4** - Representação de um encaixe induzido por uma alteração estrutural da proteína (segundo Koshland).

Este modelo recebeu considerável apoio experimental, e tem como característica essencial a flexibilidade da região do centro

ativo. No modelo de Fischer, presume-se que o centro ativo é pré-formado para encaixar o substrato. No modelo do encaixe induzido, o substrato induz a uma mudança conformacional na enzima. Isto posiciona resíduos de aminoácidos, ou outros grupos, na enzima, na orientação espacial correta para a ligação do substrato, para a catálise, ou ambas. A seqüência exata dos eventos na mudança de conformação, induzida pelo substrato, ainda não foi totalmente estabelecida e existem varias possibilidades (figura 5).(11)

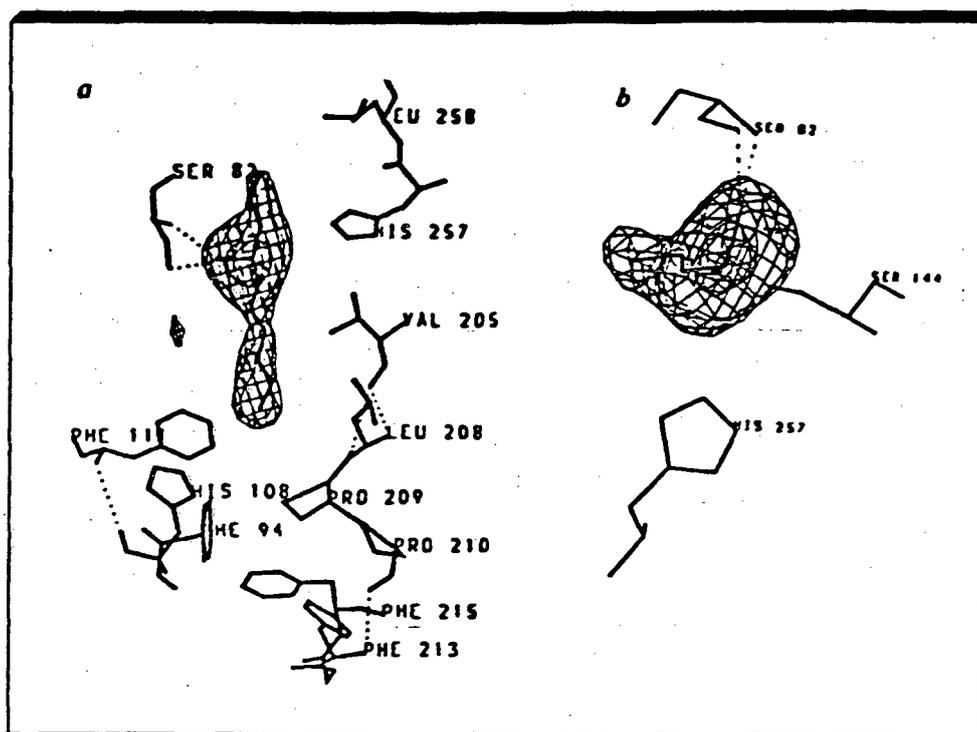


**Figura 5** - Representação das vias alternadas de reações para obter uma alteração de conformação induzida pelo substrato. A enzima sofre, primeiramente, uma alteração da conformação (A); em seguida, liga-se ao substrato (B). Como alternativa pode haver primeiro a ligação do substrato (C), com modificação subsequente da conformação (D). Finalmente, ambos os processos podem ocorrer de modo combinado (E), com isomerização na forma final (F).

#### 1.2.4 - LIPASES

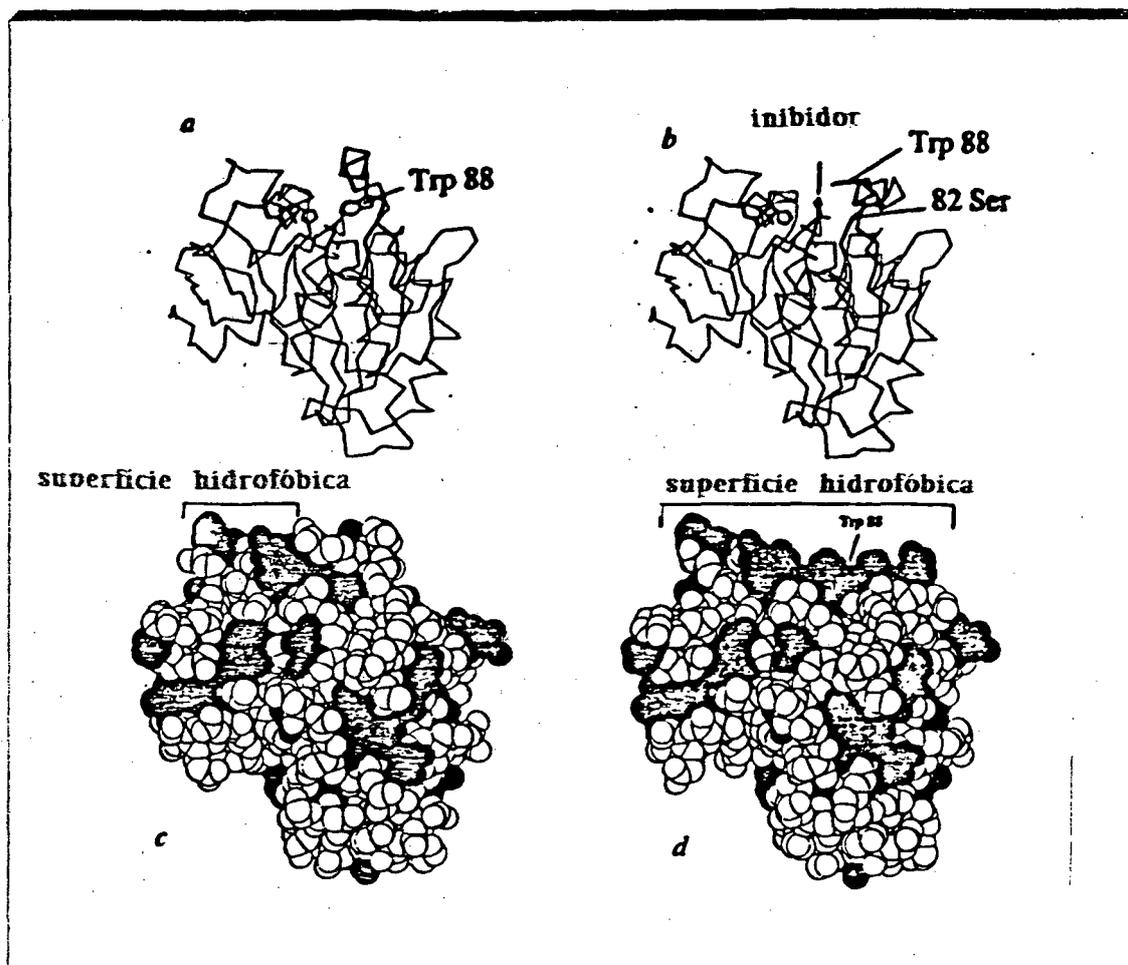
Lipases (triglicerol acilhidrolases E.C. 3.1.1.3), são enzimas hidrolíticas que hidrolisam triacilglicerídeos em ácidos graxos livres e glicerol. Elas tem atraído a atenção de químicos orgânicos sintéticos principalmente por suas propriedades enantioseletivas. As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica, devido à sua versatilidade catalítica, disponibilidade comercial, baixo custo e não requererem a utilização de cofatores.<sup>(12)</sup> Elas são estáveis em solventes orgânicos apolares e tem a grande habilidade de assumir diversas conformações para acomodar substratos de vários tamanhos. Portanto, compostos que são instáveis em água ( anidridos, compostos halogenados, etc...), podem ser usados como substratos em meio não aquoso. Reações de esterificação catalisadas por lipases em solventes orgânicos são muitas vezes mais enantioseletivas que as correspondentes reações hidrolíticas em água.<sup>(13)</sup> Apesar de lipases serem muito utilizadas em síntese orgânica, há poucas informações estruturais de raio-x disponíveis para as estereases e lipases.<sup>(14),(15)</sup>

Em 1991, em estudos sobre a estrutura das lipases, Brzozowski e col.<sup>(16)</sup>, estabeleceram com mais detalhes a estrutura da lipase isolada do fungo da *Rhizomucor* (*mucor*) *miehei*. Através da técnica de cristalografia de raio x e utilizando um inibidor, o éster N-hexilclorofosfonato de etila, que reagiu estequiometricamente com a lipase inibindo-a irreversivelmente, os autores estabeleceram um modelo para a ativação interfacial da lipase da *Mucor miehei*. Foi determinado sua estrutura a qual é composta de 269 resíduos de aminoácidos com peso molecular de 29.472, e caracterizado como centro ativo uma estrutura composta dos aminoácidos Asp 203 - His 257 - Ser 144 (figura 6), sendo que este está protegido por um segmento espiral curto da molécula, como se fosse uma tampa.



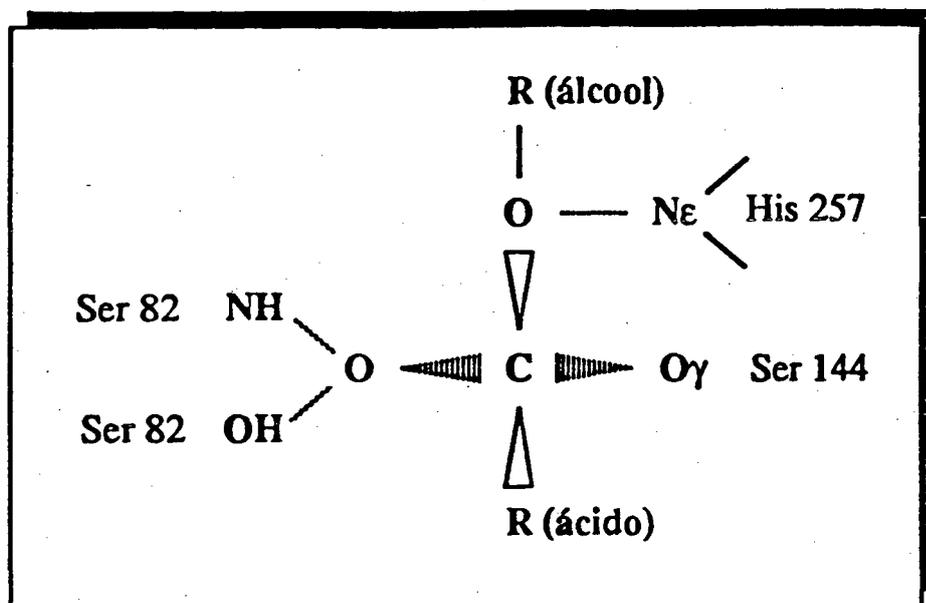
**Figura 6** - Estrutura do sítio ativo da *lipase da mucor miehei* na presença do N-hexilclorofosfonato de etila. (a) sítio ativo completo e inibidor; (b) secção transversal mostrando apenas a interação do inibidor com Ser 82, Ser 144 e His 257.

O mapa de densidade eletrônica da *lipase da mucor miehei*, revela uma mudança conformacional que está associada a um simples movimento da sua parte helicoidal, desprotegendo e expondo o sítio catalítico com o inibidor (figura 7).(16)



**Figura 7** - Representação da mudança conformacional na lipase da *Mucor miehei*. (a) enzima nativa; (b) o complexo enzima inibidor; (c) estrutura atômica completa da molécula nativa e do complexo (d).

A exposição dos resíduos catalíticos é acompanhada por um grande aumento na hidrofobicidade da superfície vizinha. A ativação interfacial, é assim explicada pela estabilização desta superfície não polar pelo envolvimento lipídico, que produz uma enzima cataliticamente competente, e habil para atacar as moléculas de triglicerídeos dentro da fase lipídica (figura 8).<sup>(16)</sup>



**Figura 8** - Representação esquemática do complexo tetraédrico enzima-substrato da *lipase da mucor miehei*.

Para a *lipase Pancreática*, resíduos de serina e histidina e um grupo carboxilato foram instituídos como essenciais para a sua atividade catalítica. Já a *lipase da Humicola lanuginosa* requer histidina, tirosina e um grupo carboxilato para a sua atividade, enquanto que a *lipase Geotrichum candidum* não apresenta nenhum envolvimento de resíduo de serina reativo.<sup>(17)</sup>

As lipases apresentam uma característica catalítica comum; o envolvimento de uma interface lipídio-água em seu processo catalítico. A atividade das lipases é grandemente aumentada na interface lipídio - água, e este fenômeno é conhecido como ativação interfacial. Esta característica única de catálise interfacial faz com que as lipases mostrem um envolvimento hidrofóbico e as distingue de outras enzimas hidrolíticas.<sup>(18)</sup>

#### **1.2.4.1 - CATÁLISE ESTEREOQUIMICAMENTE ESPECÍFICA DE LIPASES**

Em solventes orgânicos, as lipases catalisam a transferência de grupos acil doadores para uma ampla faixa de outros aceptores diferentes de água. Dependendo do tipo do acil doador e aceptor, as reações catalisadas por lipases incluem esterificações, transesterificações, amidação, síntese de peptídeos e formação de lactonas macrocíclicas. Destes, a síntese e/ou transesterificação enantioselectiva de ésteres é de interesse porque fornece aos químicos orgânicos sintéticos, um método fácil para a preparação de álcoois e ácidos opticamente ativos. Mecanicamente, a síntese e/ou troca do éster enzimaticamente, tem algumas características em comum com as reações hidrolíticas correspondentes, mas os princípios que governam a especificidade estereoquímica são diferentes e assim justifica a sua utilização.(19)

### **1.3 - RESOLUÇÃO ENZIMÁTICA**

#### **1.3.1 - RESOLUÇÃO ENZIMÁTICA DE FARMACOS E PRODUTOS NATURAIS**

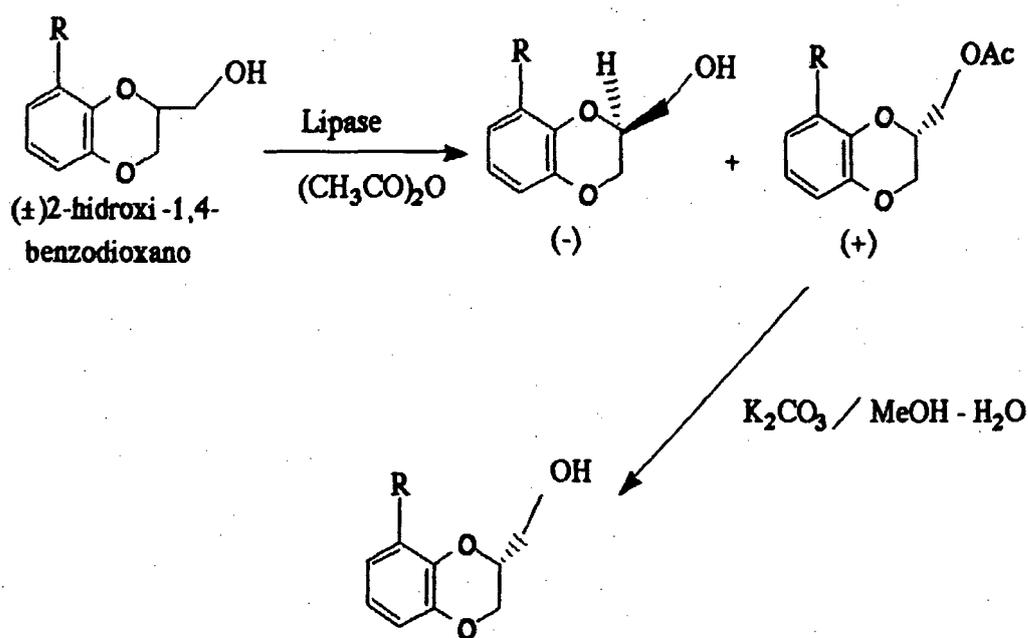
A habilidade de enzimas para atuar como catalisadores quirais já tem sido considerada por muitos anos, particularmente pela indústria farmacêutica. Atualmente, este procedimento bioquímico está tornando - se bem aceito como um procedimento de rotina em síntese orgânica. Visto que a atividade biológica numa droga racêmica muitas vezes reside em um único enantiomero; sintetizar tais drogas em sua forma enantiomericamente pura, está se tornando um dos caminhos importantes na química da biotransformação.

Em 1987, Belan e col.(20), na investigação de feromonas, publicaram um artigo no qual preocupavam-se em otimizar condições para a resolução preparativa dos enantiomeros do (+)-sulcatol



Também tem sido obtido via resolução enzimática através de transesterificação ou acilação, as 3-hidroxi-4-penteniluretanos<sup>(24)</sup> usadas na síntese de alcalóides hidroxilados.

O 1,4-benzodioxano<sup>(25)</sup> que ocupa um lugar tradicional entre os agentes cardiovasculares (esquema -IV), foi resolvido usando a PPL e a lipase de *Pseudomonas fluorescente*.



R= H ou CH<sub>3</sub>

**Esquema IV**

O trabalho realizado por Daniele Bianchi e col.<sup>(26),(27)</sup> na resolução enzimática de 1,2-dióis, demonstrou que drogas como a dropropizina ( (R,S) - 3 - (4 - fenil - 1 - piperazinil) -1,2 - propanodiol), que é um agente antitussígeno, foi usado por longo tempo na terapia humana em forma de mistura racêmica. Os dois isômeros separados possuem características farmaco-terapêuticas distintas que são particularmente vantajosas em comparação com a mistura racêmica. O isômero levorotatório possui a mesma atividade antitussígena que a mistura racêmica, mas é muito mais seletivo e tem grau de atividade mais baixo no sistema nervoso central (SNC).

O atenolol<sup>(28)</sup>, uma das cinco drogas mais vendidas no mundo, é comercializada como atenolol racêmico para o tratamento de hipertensão e angina, e tem mostrado esperanças no tratamento do pós-infarto do miocárdio. Porém, o isômero **S** tem sido recentemente usado para evitar o efeito colateral de uma parada cardíaca, que as vezes ocorre com o uso do racemato.

A aplicação da resolução enzimática na indústria farmacêutica é extensa. Compostos naturais como flavonóides<sup>(29)</sup> são amplamente distribuídos em plantas, e muitos possuem atividades biológicas potencialmente exploradas na biomedicina. As lipases tem sido utilizadas para realizarem hidrólises parciais destes flavonóides com alto grau de regioseletividade.<sup>(29)</sup>

Existem numerosas possibilidades para explorar biocatalisadores em produtos químicos naturais. A biocatálise pode realizar transformações de compostos modelos formando produtos que são raros, ou somente disponíveis em rendimentos muito baixos por caminhos químicos tradicionais.<sup>(30)</sup>

### 1.3.2 - RESOLUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÁLCOOIS SECUNDÁRIOS RACÊMICOS

Na última década vem crescendo os trabalhos na área de resolução enzimática <sup>(31),(32),(33),(34),(35),(36),(37)</sup> não só de álcoois, mas de amins<sup>(38)</sup>, amidas<sup>(39),(40),(41),(42)</sup> e ácidos carboxílicos<sup>(43),(44),(45)</sup>, devido a regioseletividade e especificidade enantiomérica das enzimas. A indústria de fármacos é uma das áreas de maior interesse na resolução de drogas por enzimas. Embora muitas das enzimas usadas para transformação assimétrica em solventes orgânicos tenham sido hidrolases, outras classes de enzimas também podem ser utilizadas. Em particular, oxidases estão disponíveis para tais explorações, isto é, para oxidação seletiva de hidrocarbonetos.

A resolução de álcoois racêmicos pode ser feita pelo uso das propriedades enantioseletivas de enzimas hidrolíticas. Álcoois opticamente ativos são obtidos ou em soluções aquosas por hidrólises estereoseletivas dos correspondentes ésteres racêmicos, por

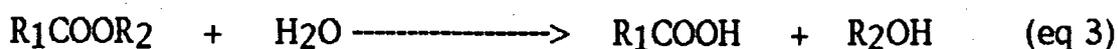
esterificação em solvente orgânico<sup>(46)</sup> ou transesterificação dos correspondentes álcoois racêmicos.<sup>(47),(48)</sup> A escolha do método depende de muitos fatores tais como rendimento, pureza, velocidade da reação, separação dos produtos e estabilidade das enzimas.

Com a exceção de certos álcoois estericamente impedidos, as lipases catalisam a acilação assimétrica de uma ampla faixa de substratos cíclicos e acíclicos com moderada a alta enantioseletividade. Para realizar uma boa acilação enantioseletiva, são importantes a seleção de um biocatalisador disponível e a otimização de condições reacionais.

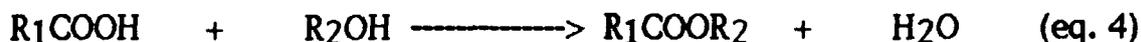
A resolução de álcoois racêmicos pode ser realizada explorando a habilidade de lipases imobilizadas para promover a esterificação ou transesterificação.

Há três caminhos alternativos para preparar álcoois e ácidos opticamente ativos usando hidrolases:

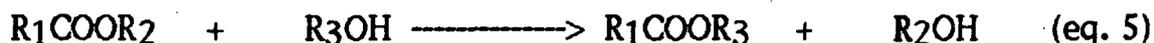
a) Hidrólise Assimétrica:



Uma hidrolase estereoespecífica catalisa a hidrólise de somente um enantiomero do éster. O carbono quiral pode estar no grupo acila ou na porção alcóolica do  $R_1COOR_2$ . A separação posterior da mistura éster, álcool e o ácido, é geralmente uma tarefa mais fácil.<sup>(49)</sup>

b) Esterificação Assimétrica:

Esta é o inverso da equação 3, e geralmente requer um esforço especial para realizar - se porque a aproximação mais útil e geral parece ser o deslocamento de água do meio reacional, pelo uso de uma mistura bifásica de água e solvente orgânico.<sup>(49),(50)</sup>

c) Transesterificação Assimétrica:

O centro quiral pode estar no éster ou no álcool. A hidrolase estereoespecífica idealmente reage com somente um isômero de  $R_1COOR_2$  ou  $R_3OH$ . O composto não quiral deve estar presente em um excesso molar sobre o composto racêmico para garantir a completa conversão do enantiomero reativo.<sup>(49)</sup>

Em 1984, Klivanov e Cambou<sup>(51)</sup> desenvolveram uma metodologia para resolução de álcoois racêmicos através de reações de transesterificações catalisada por *lipase de Cândida cilindracea* e *Carboxil esterease* do fígado do porco, em sistema bifásico. Eles utilizaram como suporte poroso sefarose e cromosorbe, aos quais eram adicionados uma solução de enzima, diminuindo assim a emulsão causada no meio.

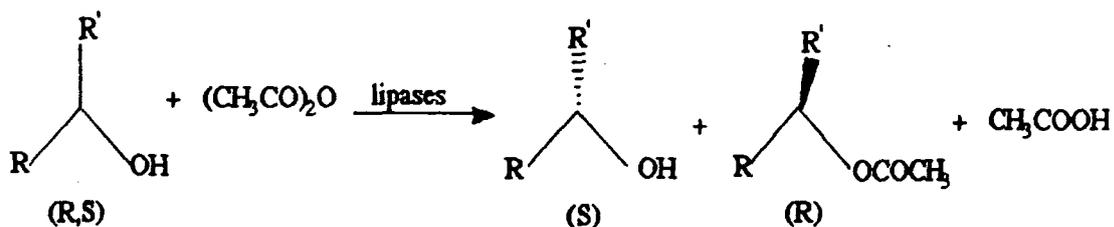
Em 1985, Klivanov<sup>(52)</sup> aplicou a metodologia de resolução enzimática para uma série de álcoois e ácidos carboxílicos racêmicos utilizando PPL (*Lipase do Pancreas do Porco*) e *lipase de Cândida*

*cilindracea* em solvente orgânico anidro. Afirmando que a principal desvantagem do uso do suporte poroso está na dificuldade de reproduzir o sistema com a mesma quantidade de enzima adsorvida, haja visto que a confecção do sistema depende da quantidade e qualidade do suporte poroso, solução tampão para controle do pH do meio, pureza da enzima utilizada e exatidão dos instrumentos para preparação das soluções. Os autores admitem que a menor variação no conteúdo de água do sistema pode causar um drástico efeito na velocidade e estereoespecificidade da transesterificação enzimática.

Langrand e col.<sup>(53)</sup>, em 1985, estudaram reações de esterificação em meio orgânico (n-hexano, heptano), usando a potencialidade estereoseletiva das lipases para a resolução de álcoois secundários racêmicos. Novamente foi utilizada a *lipase de Cândida cilindracea*, onde os autores descrevem a enantioseletividade desta enzima para a resolução de ciclohexanois  $\alpha$ -substituídos. A *lipase de Cândida cilindracea* mostrou ser seletiva para os álcoois com configuração absoluta R, e os autores afirmam que os compostos  $\alpha$ -trans são esterificados mais rapidamente que os  $\alpha$ -cis. Esta resolução é baseada na competição cinética entre os dois enantiômeros.

Com a crescente preocupação de desenvolver uma metodologia para reações enzimáticas, onde a enzima não sofra modificações químicas durante o processo, Bianchi, Cesti e Battistel<sup>(54)</sup>, em 1988, desenvolveram um novo método para a resolução de álcoois secundários racêmicos, usando *lipase de Pseudomonas fluorescense* adsorvida em celite 577 e como agente acilante utilizaram anidridos ácidos (esquema -V). Visto que esta reação não forma água, ela é completamente deslocada para o produto, porque a reação reversa é termodinamicamente desfavorável. Portanto, a velocidade das reações são mais altas que aquelas obtidas nos processos de esterificação ou transesterificação equivalente por métodos químicos tradicionais.

Uma baixa seletividade tem sido observada na acilação de álcoois secundários de cadeia longa com anidridos, usando *lipase de Pseudomonas fluorescense* adsorvida em celite.<sup>(54)</sup>



R = CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, Ph

R' = Ph, n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>

### Esquema V

Em 1989, Inada e col.<sup>(55)</sup> usaram a *lipase de Pseudomonas fragi* que foi modificada com polietilenoglicol (PEG - lipase), na resolução de álcoois secundários racêmicos. A lipase modificada é solúvel e ativa em solventes orgânicos tais como benzeno e 1,1,1-tricloroetano. Os autores afirmam que enzimas modificadas cuja superfície foi covalentemente atacada por uma macromolécula de polietilenoglicol sintética, dissolvem-se a um estado de transparência em vários solventes orgânicos. Estas enzimas modificadas podem ser usadas como catalisadores em reações químicas em solventes orgânicos.<sup>(55)</sup>

Morgan, Oehlschlanger e Stokes<sup>(56)</sup>, em 1991, estudaram a resolução de álcoois secundários racêmicos com cadeias hidrocarbônicas normais e ramificadas, utilizando a *lipase do Pâncreas do porco* (PPL). No presente estudo, foi investigado o efeito do comprimento e ramificação da cadeia hidrocarbônica na reação de transesterificação utilizando laurato e butirato de trifluoroetila, PPL e éter anidro como solvente. Foi também utilizada a PPL na síntese quimioenzimática do ácido (R)-(-) e (S)-(+)- 9-hidroxi-(E)-decenóico, o principal componente do complexo feromona da glandula mandibular da abelha rainha.<sup>(56)</sup>

É importante considerar a extensa faixa de biocatalisadores que podem ser usados para resolução biocatalítica em meio orgânico.

Portanto, as enzimas oferecem uma diversificação de catalisadores biológicos que podem atuar na síntese de compostos orgânicos, em condições suaves e com alta eficiência.

## 1.4 - IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A crescente busca de uma metodologia cada vez mais aperfeiçoada para utilização de enzimas em síntese orgânica, levou muitos pesquisadores a buscar um sistema que melhor se adaptasse as condições sintéticas desejadas. Reese e Mandeels, em 1958, publicaram o primeiro trabalho utilizando enzimas em solvente orgânico.<sup>(57)</sup> Com o passar dos anos, surgiram novas técnicas para a utilização de enzimas em solventes orgânicos.

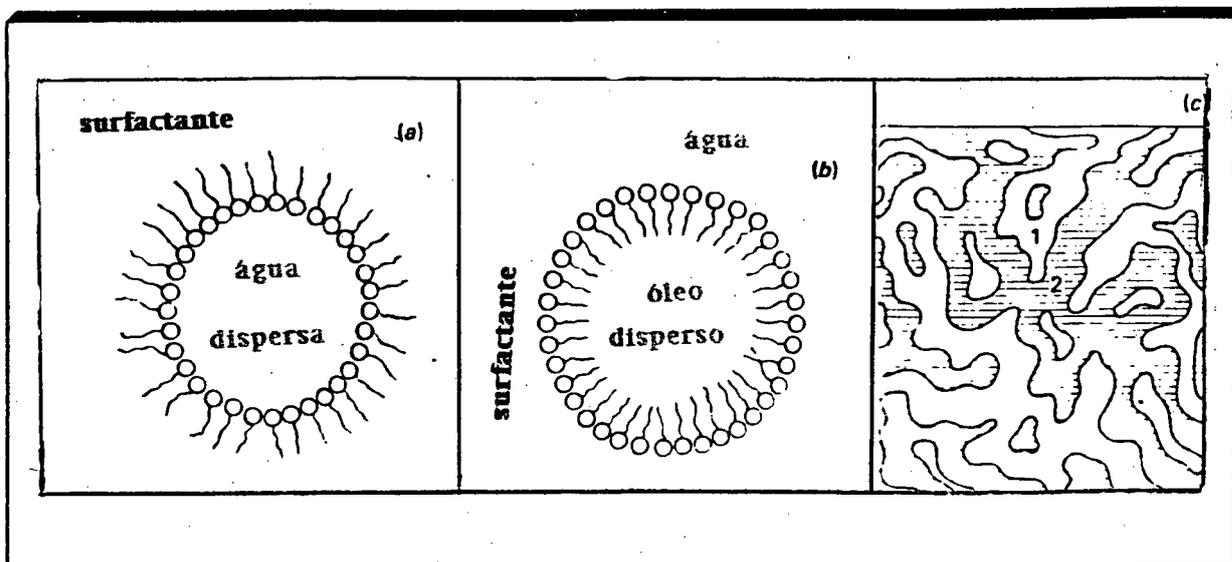
A imobilização de enzimas é uma das mais importantes técnicas na aplicação de catálise enzimática para reações sintéticas em solventes orgânicos. Por razões prática e econômica, é muitas vezes vantajoso usar de enzimas imobilizadas em suportes sólidos.<sup>(58)</sup> A imobilização tem a vantagem de aumentar a quantidade de enzima efetiva por extensão de material sólido, usando uma larga área superficial. Visto que, com poucas exceções, enzimas são insolúveis em solventes orgânicos, elas podem ser fixadas nos suportes por simples método de adsorção sem ligações covalentes que muitas vezes diminuem a atividade da enzima por reações indesejadas com os seus sítios catalíticos. Tais catalisadores são particularmente fáceis para manusear e podem ser recuperados do meio reacional. Portanto, muitas enzimas imobilizadas podem ser usadas repetidamente sem considerável perda da atividade.<sup>(59)</sup>

Considerando a compatibilidade com a enzima, geis hidrofílicos tem sido mais freqüentemente empregados como suportes enzimáticos. As vezes a enantioseletividade é aumentada.<sup>(59)</sup> Alguns sistemas que já foram usados são  $\alpha$ -quimiotripsina em Eupergit C<sup>(60)</sup>, suporte de celite<sup>(54),(56),(58)</sup>, quitosana e quitina<sup>(58)</sup>, agarose, cromosorb e sefarose<sup>(51),(52),(60)</sup> entre outros. Alguns destes sistemas podem ser utilizados em reatores de fluxo contínuo onde são capazes de sintetizar ésteres, efetuar hidrólises ou transesterificação. Mais comumente empregado é a modificação de enzimas com polietilenoglicol resultando em um pó solúvel em benzeno ou hidrocarbonetos clorados.<sup>(55),(61)</sup> Outras técnicas úteis são microencapsulação ou enclausuração de enzimas em membranas de dialises, que é recomendável como um procedimento operacionalmente simples e efetivo.<sup>(62)</sup> Outras técnicas que superam os problemas relacionados com a baixa solubilidade dos substratos, é o uso de surfactantes e micelas reversas.<sup>(63),(64),(65),(66)</sup>

### 1.4.1 - IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM ORGANO - GEL

Em 1989, Atkinson e col.<sup>(67)</sup> observaram que água e óleo podem formar dispersões opticamente transparente de microgotas de água em um meio contínuo de óleo e surfactante, sendo que este sistema é termodinamicamente estável, e conhecido como "microemulsão".

Portanto, uma microemulsão é uma dispersão isotrópica e opticamente transparente de óleo em água (O/W) ou água em óleo (W/O), onde o óleo é um solvente orgânico (n-hexano, heptano). O nome microemulsão deriva do fato que gotas de óleo no sistema (O/W), ou gotas de água no sistema (W/O) possuem um diâmetro que variam de 50 à 500 Å.<sup>(68)</sup> Visto que as microemulsões são sistemas organizados, elas são fáceis de serem preparadas (figura 9).<sup>(69)</sup>



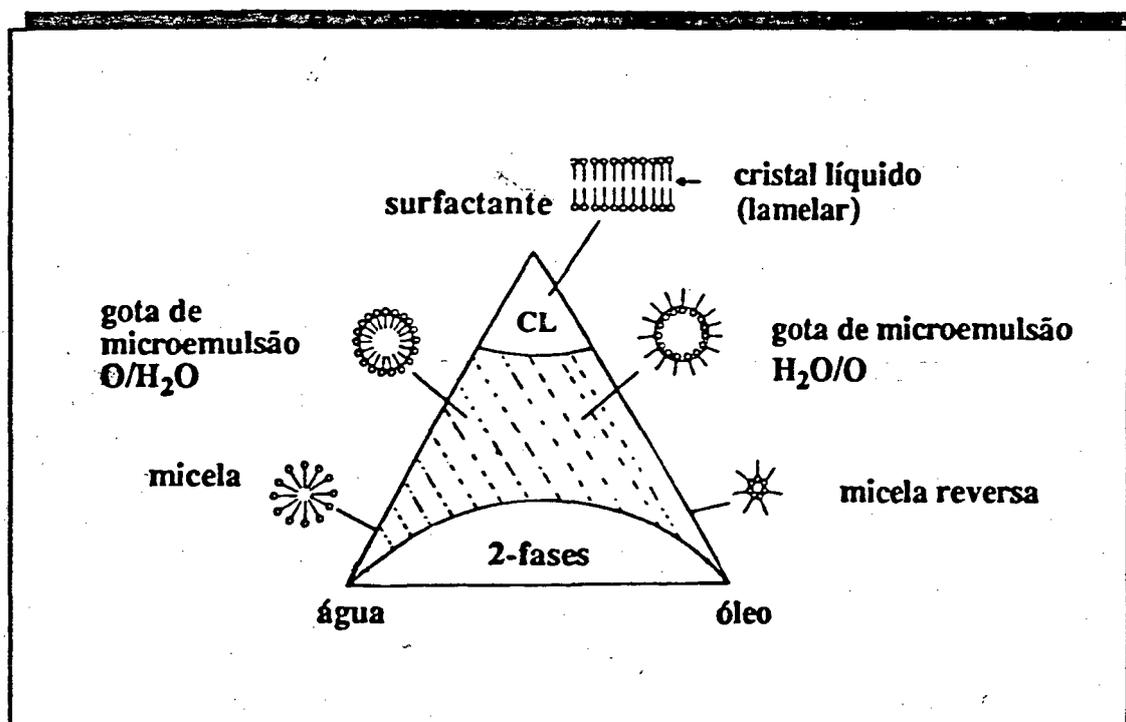
**Figura 9** - Estruturas organizadas de microemulsão: (a) gota de microemulsão água/óleo (W/O); (b) gota de microemulsão óleo/água (O/W); (c) uma possível estrutura bicontínua (1=óleo, 2=água).

A estabilidade da microemulsão depende da razão da concentração de água pelo surfactante adicionado ao meio, representado por  $W_o$ , onde:

$$W_o = [H_2O] / [\text{surfactante}]$$

A gota de microemulsão pode ser efetivamente considerada como um microreator.<sup>(69)</sup>

B. H. Robinson<sup>(69)</sup>, em 1990, em um breve estudo sobre as propriedades das microemulsões, concluiu que a estabilidade da microemulsão depende da concentração de óleo, água e surfactante presente no meio (figura 10).

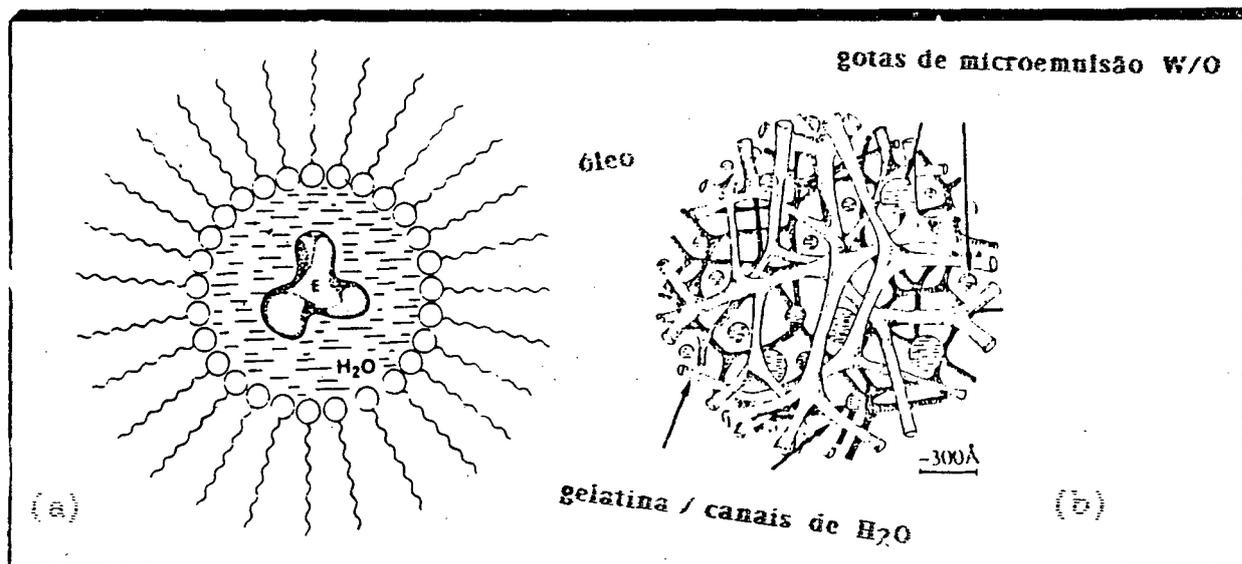


**Figura 10-** Diagrama de fase de uma solução de água / óleo / surfactante (a região sombreada denota a microemulsão).

Haering e Luise<sup>(70)</sup> em 1986, e Quillet e Eike<sup>(71)</sup> em 1987, investigaram a solubilização de gelatina em micelas reversas e em microemulsão água/óleo no que se referem aos aspectos físico-químicos dos sistemas.

Os autores descreveram o efeito da solubilização de gelatina em uma microemulsão água / óleo (W/O) na formação do gel. Isto é obtido pelo resfriamento de uma solução previamente aquecida a 55°C de Aerosol O-T (Di - 2-etilhexil sulfosuccinato de sódio) em solvente orgânico ( n-hexano, heptano), e uma solução aquosa de gelatina. O sistema final é um gel homogêneo cuja consistência e propriedades físicas dependem da relativa concentração de gelatina e água. A estrutura proposta para a "microemulsão baseado em organo - gel (MBG)" esta representada na figura 11, e consiste de gotas de microemulsão aquosas em equilíbrio com uma estrutura de gelatina e água, rodeada pelo surfactante Aerosol O-T.<sup>(72)</sup>

Em 1991, foi publicado por Rees e Nascimento<sup>(73)</sup> a utilização de lipases imobilizadas em sistemas de organo-gel, para a síntese de ésteres alifáticos.

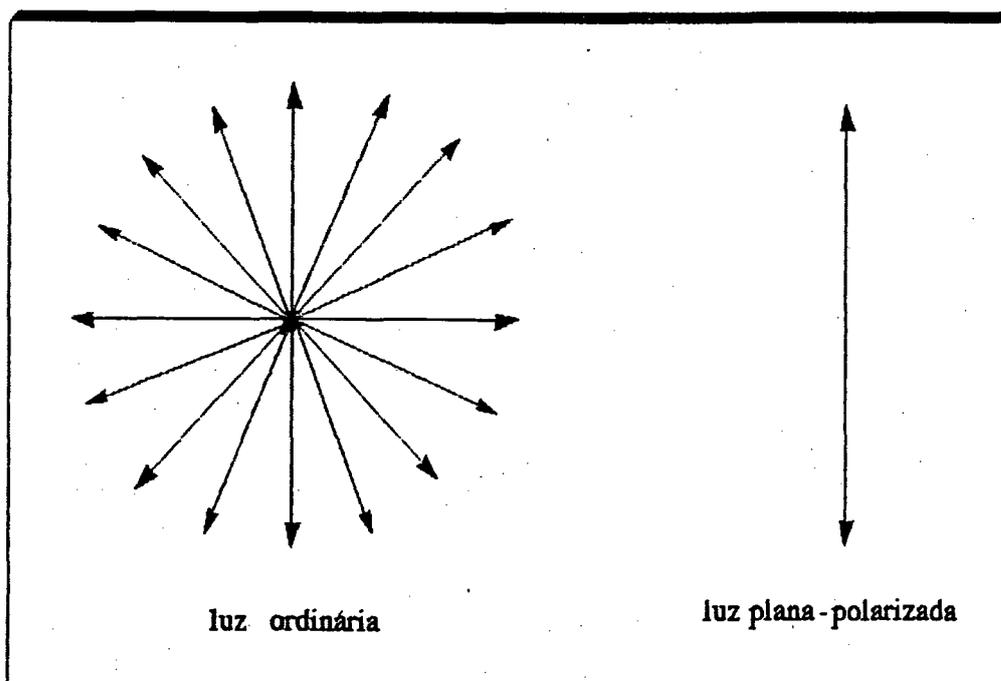


**Figura 11** - Modelo proposto para a estrutura do organo - gel: (a) representação esquemática de uma molécula de enzima hidrofílica incorporada no "centro aquoso" de uma microemulsão água/óleo (W/O); (b) modelo proposto para a gelatina contendo microemulsão-baseada em gel.

O uso do sistema de organo - gel (MBG), consiste de uma nova alternativa para a imobilização de enzimas, bem como sua utilização na catálise enzimática em meio orgânico.(74) Neste novo sistema a enzima está localizada no centro micelar (centro aquoso) da microemulsão água - óleo (W/O), e com isto elimina o tradicional problema de estabilizar a enzima contra inativação por um solvente não - aquoso. Assim, em contraste com outros processos comumente usados, o sistema de microemulsão gelificada (MBG) apresenta um baixo conteúdo de água. O sistema tem a vantagem de ser reprodutível, termodinamicamente estável, transparente e permite a utilização de baixa concentração de enzima e sua reutilização.(2),(72),(73),(74)

### 1.5 - ROTAÇÃO ÓPTICA(75)

A luz ordinária pode ser considerada como um fenômeno com vibrações ocorrendo em vários planos perpendiculares para a sua propagação. A luz plana-polarizada, que é a luz ordinária que passa através de um polarizador, é a luz com vibrações restritas para um simples plano (figura 12).



**Figura 12** - Representação esquemática da luz ordinária e plana - polarizada.

Quando a luz plana polarizada passa através de uma substância opticamente ativa, as moléculas desta substância são capazes de fazer girar seu plano de polarização. O ângulo rotacional obtido depende do número de moléculas no caminho da luz, e portanto, da concentração da amostra. O ângulo de rotação é medido com um instrumento chamado polarímetro (figura 13).

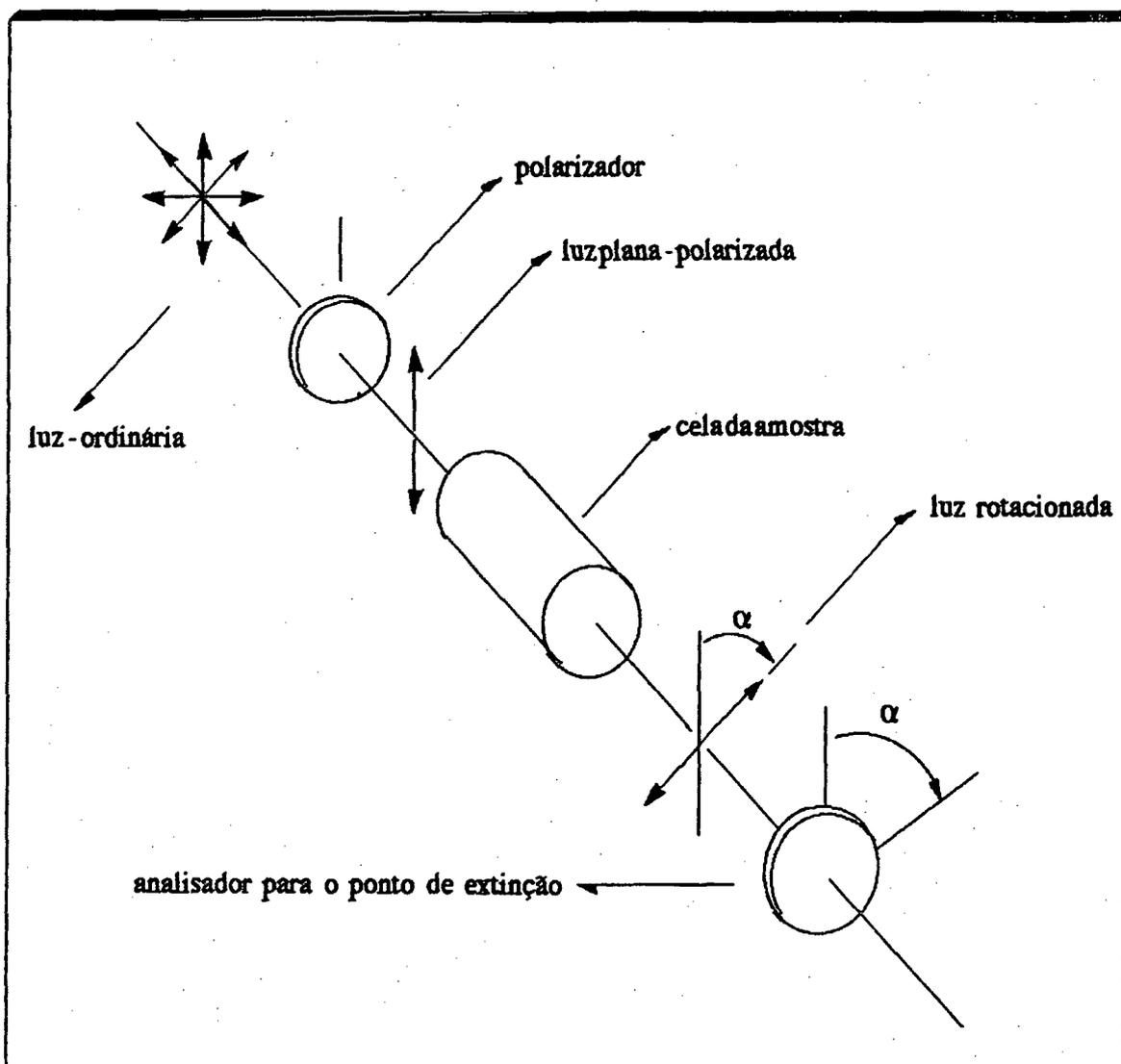


Figura 13 - Representação esquemática de um polarímetro

A rotação óptica da amostra é determinada medindo-se o ângulo para o qual ocorre a extinção (ângulo de mínima iluminação). Visto que o valor da rotação óptica depende de fatores que não são propriedades inerentes da amostra (tal como comprimento do tubo do polarímetro e concentração da amostra), esta rotação observada é convertida para rotação específica pela equação 5.

$$[\alpha]_D^t = \frac{\alpha}{l \cdot c}$$

(eq. 5)

$[\alpha]_D^t$  = rotação específica

$\alpha$  = rotação observada

$l$  = comprimento da cela polarimétrica, em decímetros

$c$  = concentração da solução, em gramas de soluto por mililitro de solução (para um líquido puro, substituir a densidade do líquido em g/ml)

### 1.5.1 - ROTAÇÃO ESPECÍFICA

A rotação específica de uma substância pura em uma dada série de condições, é uma propriedade invariável da substância e pode ser usada para caracterizá-la. A rotação específica pode também ser usada para medir a pureza óptica de um enantiomero ou a composição de uma mistura de substâncias opticamente ativas.

### 1.5.2 - PUREZA ÓPTICA

A pureza óptica de um enantiomero pode ser definida como a razão de sua medida de rotação específica pela rotação específica do enantiomero puro, multiplicado por 100 (equação 6).

$$\text{P.O} = \frac{[\alpha]_{\text{(observado)}} \cdot 100}{[\alpha]_{\text{(substância pura)}}$$

(eq. 6)

## CAPÍTULO 2 - PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1 - MATERIAIS E MÉTODOS

#### 2.1.1 - ENZIMAS UTILIZADAS

As enzimas utilizadas neste trabalho foram:

- *Lipase de Pseudomonas sp*, fornecida pela Genzyme Biochemicals Ltd (Inglaterra). Atividade específica de 1900 unidades/mg de proteína.
- *Lipase do tipo VII-S de Cândida cylindracea*, fornecido pela Sigma Chemical CO. Atividade específica de 71,000 unidades/mg de proteína.
- *Lipase Microbial*, fornecida pela Genzyme Biochemical Ltd (Inglaterra). Atividade específica de 1600 unidades/mg de proteína.
- *Chromobacterium viscosum (C.V.) lipase*, fornecido pela Genzyme Biochemical Ltd (Inglaterra). Atividade específica de 3970 unidades/mg de proteína.

#### 2.1.2 - REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Os álcoois ( $\pm$ )2- hexanol, ( $\pm$ )2-octanol e ( $\pm$ )2-feniletanol foram fornecidos pela Aldrich; ( $\pm$ )2- butanol pela Riedel -deHaën. O ácido dodecanóico (láurico) foi fornecido pela Merck e o ácido hexanóico pela Aldrich.

Os solventes acetato de etila, n-hexano, metanol, álcool isopropílico, éter de petróleo, tolueno e ácido sulfúrico foram

fornecidos pela Merck, e o éter etílico foi fornecido pela Químidrol. O hexano fornecido pela Vetec, foi previamente purificado.<sup>(76)</sup>

O Aerosol O-T (D-0885 lote 120H0456) e gelatina em pó (tipo A: Bloom 300) foram fornecidos pela Sigma; sílica gel 60 para cromatografia em coluna (70- 230 mesh) foi fornecida pela Merck; sílica gel para cromatografia em placa foi fornecida pela Vetec; sulfato de magnésio, bicarbonato de sódio e cloreto de cálcio foram fornecidos pela Vetec.

Os produtos de esterificação e hidrólise foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho utilizando um aparelho Perkin Elmer modelo 781, e por <sup>1</sup>H RMN, utilizando um espectrômetro Varian EM - 360L 60 MHz, com TMS como referência interna.

Os rendimentos dos produtos foram determinados utilizando - se uma balança semi - analítica Marte A500 e uma balança analítica Sartorius.

As vidrarias foram da Pyrex, e os demais reagentes utilizados foram de pureza analítica.

## **2.2 - PREPARAÇÃO DA CATÁLISE ENZIMÁTICA**

### **2.2.1 - PREPARAÇÃO DO ORGANO - GEL**

Foi preparado uma solução de Aerosol O-T 0,5M em n-hexano, retirado uma alíquota de 4,0 ml e transferido para um tubo de ensaio de 10 cm de comprimento e 13 mm de diâmetro. Adicionou - se ao tubo contendo solução de AOT, 2,2 ml de n-hexano. Em um segundo tubo de ensaio (mesmo tipo que o anterior) foi adicionado 1,4g de gelatina e 2,4 ml de água destilada. A solução de gelatina foi aquecida a 55°C em um banho termostatizado (Polyscience série 9500) até completa dissolução da mesma. A solução de AOT foi aquecida no termostato a 55°C durante cinco minutos e misturada com a solução de gelatina também a 55°C. A mistura foi então

agitada vigorosamente, e deixada em repouso até atingir a temperatura ambiente e formar um gel rígido.

O organo-gel (MBG) contendo a enzima imobilizada foi preparado adicionando a solução de Aerosol O-T descrita anteriormente, 0,25 ml de uma solução aquosa de enzima (10 mg de enzima / ml de água), e agitado para formar a microemulsão água - óleo. A solução de AOT contendo a enzima foi misturada com uma segunda solução de gelatina (1,4g de gelatina em 2,15 ml de água) também a 55°C. O procedimento segue o anteriormente descrito na preparação do organo-gel (tabela I).

**Tabela I - Preparação do Organo - Gel para Reação**

organo - gel	Qtidade de gelatina <sup>(c)</sup> (g)	Qtidade de água (ml)	Qtidade de AOT 0,5 M (ml)	solvente n-hexano (ml)	[H <sub>2</sub> O] (M)	[AOT] (M)	W <sub>o</sub> <sup>(b)</sup>
com enzima <sup>(a)</sup>	1,40	2,15	4,0	2,2	11,9	0,2	59,5
controle (sem enzima)	1,40	2,40	4,0	2,2	13,3	0,2	66,5

(a) as soluções de enzimas tiveram as seguintes composições: C.V.lipase, lipase de Pseud. sp e lipase Microbial 10 mg/ml; solução de *Cândida cilindracea* 20 mg/ml

(b)  $W_o = [H_2O]/[AOT]$

(c) densidade da gelatina 1g/ml

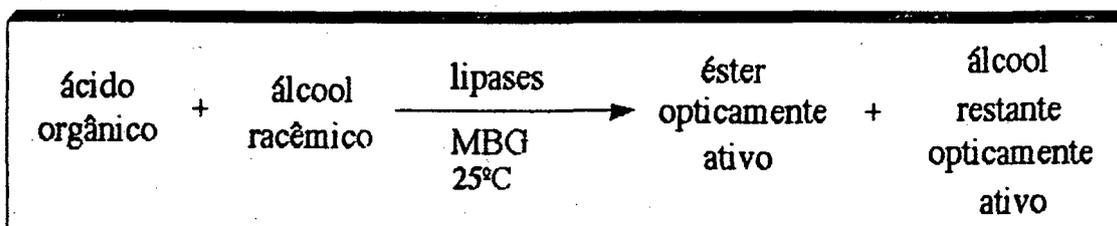
## 2.2.2 - PREPARAÇÃO DO MEIO REACIONAL VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA EM MBG's

Os géis contendo a enzima foram retirados do congelador e rapidamente separados dos tubos de ensaio, cortados em secções de aproximadamente 125 mm<sup>3</sup>, e então removidos para um erlenmeyer contendo 30 ml de hexano previamente purificado.

As reações foram realizadas adicionando em um erlenmeyer de 125 ml, 25ml de hexano, 0,03 moles de ácido e 0,03 moles do álcool racêmico. O equivalente a dois tubos de ensaio de gel contendo enzima foi adicionado ao meio reacional, o qual foi agitado em um banho maria tipo Dubnoff (TE 093 da Tecnal), termostatizado a 25 °C durante 5 dias. As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada usando como eluente uma mistura de hexano /acetato de etila (15:1).

Decorrido o tempo da reação os géis foram separados do meio reacional, lavados com hexano e reutilizados. A reação realizada está representada de modo geral na figura 14. Os substratos ácidos, álcoois racêmicos, e as enzimas utilizadas nas reações, estão listados na tabela II.

Reações usando géis de controle, ou seja sem enzima imobilizada, foram executadas paralelamente às reações catalisadas enzimaticamente, e não foi observado formação de produtos.



**Figura 14** - Representação geral das reações realizadas experimentalmente

**Tabela II - Ácidos, álcoois racêmicos, e enzimas utilizadas nas reações de esterificação**

ácidos	álcoois	enzimas (lipases)
ácido hexanóico ácido láurico	(±)2-octanol (±)2-hexanol (±)2-butanol (±)1-fenil-1-etanol	C.V. lipase lipase Microbial lipase de Pseudomonas sp lipase de C. cylindracea

### 2.3 - TRATAMENTO DOS PRODUTOS DAS REAÇÕES

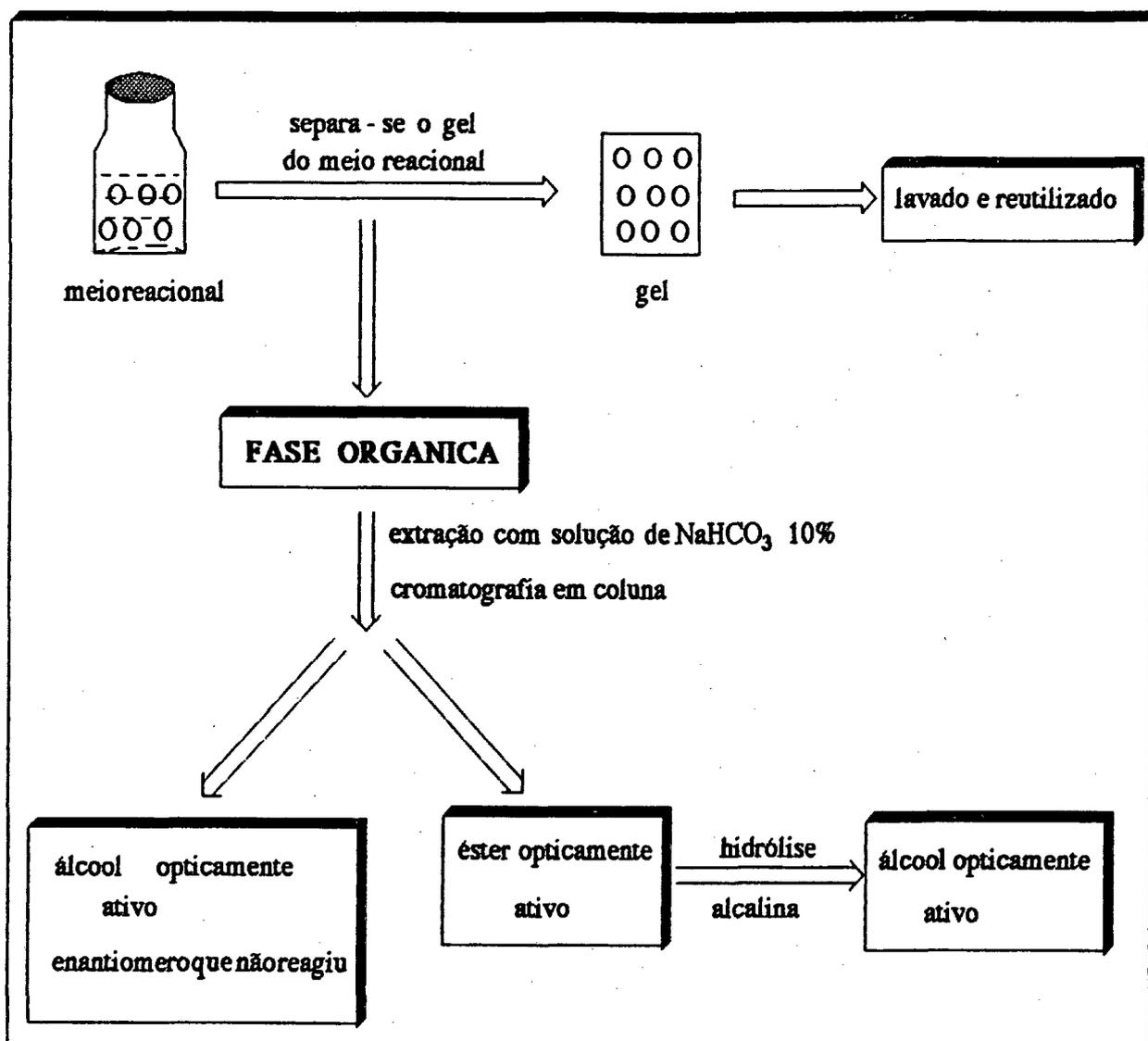
A figura 15 representa, de modo geral, o tratamento feito aos produtos das reações.

Após a separação dos géis do meio reacional, adicionou-se trietilamina até turbidez da solução para eliminar o ácido que não reagiu, e então filtrou-se o precipitado. A solução reacional foi concentrada em um evaporador rotatório RE 111 com banho de água 461 da Büchi. Adicionou-se então éter ao meio reacional e fez-se a extração com solução 10% de NaHCO<sub>3</sub>. Em seguida, a mistura reacional foi secada sobre sulfato de magnésio anidro ou cloreto de cálcio. Os sais secantes foram filtrados, e então evaporou-se o solvente.

Foi retirado uma alíquota da mistura reacional, após tratamento com bicarbonato de sódio, para determinar o grau de conversão da reação por <sup>1</sup>H RMN. Esta técnica consiste na integração dos diferentes prótons metilênicos que aparecem em regiões diferentes para o álcool de partida e o éster formado. A integração exata dos sinais apropriados permite determinar a razão entre o material de partida e o produto, e assim, determinar o grau de conversão.

Os produtos obtidos foram então separados por cromatografia em coluna usando como eluente uma mistura de hexano/acetato de etila (15:1) até separar todo o éster, que foi acompanhado por cromatografia em camada delgada. Após ter

separado todo éster, mudou - se o eluente para metanol absoluto. A coluna cromatografica utilizada possuía uma altura de 70 cm e um diâmetro de 15 mm, e foi preenchida (50 cm) com sílica gel 60 (70 - 230 mesh), com um tempo de eluição entre 2,3 - 2,8 segundos por gota para uma melhor eficiência. Várias misturas de eluentes foram testadas na separação dos produtos até chegar - se a uma mistura ideal, e estas estão listadas na tabela III.



**Figura 15** - Ilustração esquemática da resolução de álcoois racêmicos via esterificação usando lipases imobilizadas em MBG.

Após o término do processo, os produtos foram quantificados e caracterizados por  $^1\text{H}$  RMN e I.V.

**Tabela III - Eluentes Testados Experimentalmente para Separação dos Produtos por Cromatografia.**

Eluentes	Observação
Hexano / éter etílico (6:4)	nenhuma separação
Hexano / álcool isopropílico (9:1)	nenhuma separação
Hexano / álcool isopropílico (30:1)	razoável separação
Benzeno/éter /etanol/ác. acético (25:20:1:0,1)	nenhuma separação
Diclorometano / metanol/ác. acético (96:4:1)	nenhuma separação
Éter de petróleo / acetato de etila (4:1)	nenhuma separação
Dioxano - 1, 4	nenhuma separação
Hexano	nenhuma separação
Hexano / acetato de etila (1:1)	nenhuma separação
Hexano / acetato de etila (4:1)	nenhuma separação
Hexano / acetato de etila (7:3)	nenhuma separação
Hexano / acetato de etila (8:2)	nenhuma separação
Hexano / acetato de etila (9:1)	boa separação
Hexano / acetato de etila (9,5:0,5)	boa separação
Hexano / acetato de etila (10:1)	boa separação
Hexano / acetato de etila (15:1) <sup>(a)</sup>	ótima separação
Hexano / acetato de etila (20:1)	boa separação
Hexano / acetato de etila (30:1)	nenhuma separação

(a) mistura de eluente utilizada na obtenção dos ésteres opticamente ativos.

## 2.4 - MEDIDAS DE ROTAÇÃO ÓPTICA

As medidas de rotação óptica para os ésteres foram realizadas em um polarímetro Polamat A da Carl Zeiss, com lâmpada da mercúrio. A conversão para lâmpada de sódio foi feita através de um tratamento matemático aplicando as equações 7, 8 e 9.

$$\alpha_t = \alpha_{20} [ 1 + 0.000143 ( t-20 ) ] \quad (\text{eq. 7})$$

$$\alpha_{\text{Hg}}^{20} = \frac{40,691}{34,618} \cdot \alpha_{\text{Na}} \quad (\text{eq. 8})$$

$$\alpha_{\text{Hg}}^{20} = 1,17543 \cdot \alpha_{\text{Na}} \quad (\text{eq. 9})$$

$\alpha_t$  = rotação óptica em uma temperatura  $t = t$

$\alpha_{20}$  = rotação óptica a 20 °C

$\alpha_{\text{Hg}}^{20}$  = rotação óptica medida na lâmpada de mercúrio

$\alpha_{\text{Na}}$  = rotação óptica medida na lâmpada de sódio

$t$  = temperatura na qual realizou a medida, em °C

As medidas de rotação óptica dos álcoois da hidrólise alcalina dos respectivos ésteres, foram realizadas utilizando um polarímetro com LEP A2 da Carl Zeiss com lâmpada de sódio.

As soluções foram preparadas utilizando uma balança analítica (Mettler H54AR) para pesagem das amostras e como solvente foi utilizado clorofórmio destilado. O comprimento do tubo da cela polarimétrica utilizado foi de 0.2 dm. Foram preparados soluções de 1 e 5 ml para as respectivas medidas. Após as medidas, foi realizado o branco do solvente, o qual foi zero.

Os valores de excessos enantioméricos foram obtidos comparando as rotações ópticas determinadas experimentalmente com aquelas descritas na literatura (77) para os respectivos álcoois opticamente ativos.

## 2.5 - HIDRÓLISE DOS ÉSTERES

Os ésteres opticamente ativos foram hidrolisados aos correspondentes álcoois opticamente ativos por hidrólise alcalina.

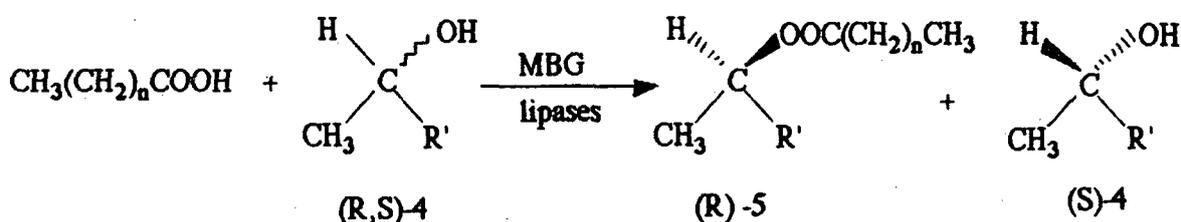
Foi dissolvido num erlenmeyer 1 g de NaOH em 30 ml de etanol (utilizando um banho de ultrasom para completar a dissolução do NaOH em etanol), e então transferido para um balão volumétrico de 50 ml e adicionado etanol até completar o volume. Esta solução foi utilizada para a hidrólise dos ésteres obtidos experimentalmente. Foi preparado o equipamento para refluxo (ver ref. 76) utilizando um balão de fundo redondo de 50 ml e uma manta de aquecimento. Adicionou-se ao balão a solução de hidróxido de sódio 0,5 M e 0,01 mol de éster obtido experimentalmente, e então foi realizado a hidrólise do éster sobre refluxo suave, durante 4 horas, acompanhando o desenvolvimento da reação por cromatografia em camada delgada. Interrompido o refluxo, o precipitado (sal do ácido carboxílico) foi filtrado e lavado com éter, e então, foi feita a extração da solução etérea com solução de NaHCO<sub>3</sub> 10%, para garantir a total eliminação do ácido carboxílico. Após a extração, adicionou-se sulfato de magnésio anidro para eliminar o resíduo de água presente, e então foi filtrado o sulfato de magnésio e evaporado o solvente em um evaporador rotatório.

O álcoois obtidos foram caracterizados por <sup>1</sup>H RMN e I.V. e guardado para medidas de rotação óptica.

Este procedimento foi geral para a hidrólise de todos os ésteres.

### CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

A enantioselectividade de lipases de diferentes fontes (*C.V.lipase*, *lipase de Pseudomonas sp*, *lipase Microbial* e *lipase de Cândida cilindracea*), foi analisada na resolução dos álcoois racêmicos ( $\pm$ )2-octanol, ( $\pm$ )2-hexanol, ( $\pm$ )2-butanol e sec-feniletanol com os ácidos hexanóico e dodecanóico (equação 10).



$n = 4; 10$

$\text{R}' = \text{C}_2\text{H}_5; \text{C}_4\text{H}_9; \text{C}_6\text{H}_{13}; \text{C}_6\text{H}_5$

(eq. 10)

Por analogia com outros trabalhos publicados(26),(51),(52),(54) de resolução de álcoois secundários racêmicos catalisada por lipases, podemos supor que para as lipases e os substratos racêmicos (R,S)-4 utilizados neste trabalho, a preferência na catálise é pelo isomero que tem a configuração absoluta **R**. Como produtos da reação obtem - se o éster (R)-5 e o álcool (enantiomero) que não reagiu (S)-4.

Além da formação do éster e do álcool opticamente ativo, há ainda o excesso de ácido e formação de água no meio reacional.

Geralmente, a água é que perturba o equilíbrio das reações de esterificação, promovendo a reversibilidade e afetando o rendimento. No sistema de MBG, a pequena quantidade de água

formada pela reação (0,03 moles), é deslocada do interior do meio catalítico para o solvente orgânico por difusão, juntamente com os produtos da reação, e ocorre a formação de duas fases imiscíveis de água e hexano, sendo que os produtos principais vão para a fase orgânica. Após o término da reação a água é eliminada pelo uso de um sal secante. A hipótese de que a água poderia ficar no interior do gel, na parte hidrofílica, foi descartada pelos seguintes motivos:

I - Se água permanece no interior do gel, seria observado com o tempo a sua destruição, devido a solubilidade da gelatina em água.

II - A catálise diminuiria devido a modificação estrutural do gel, que provavelmente, destruiria as microemulsões W/O (figura 10) formadas, onde a enzima está retida para a catálise.

III - Uma vez afetada a estrutura do organo - gel, a sua reutilização seria dificultada.

Os experimentos foram realizados em escala preparativa a 25 °C como foi previamente descrito. As reações foram interrompidas após 5 dias e os produtos separados por cromatografia em coluna, e então, determinado os rendimentos considerando que as enzimas tenham sido estereoseletivas e apenas um dos enantiômeros da mistura racêmica reagiu. Os resultados de rendimentos são valores correspondentes aos ésteres já purificados. Os resultados obtidos estão mostrados na tabela IV para reações com o ácido hexanóico, e na tabela V para as reações com o ácido láurico.

**Tabela IV - Dados Analíticos Experimentais para a Esterificação Enzimática do Ácido Hexanóico com Álcoois Secundários Racêmicos a 25°C.**

Éster	Enzima <sup>(b)</sup>	% de conv. <sup>(a)</sup>	Rend. <sup>(d)</sup> %	Rf <sup>(c)</sup>
Hexanoato de sec-octila	C.V. lipase	17,5	32,0	0,63
	lipase Microbial	16,0	26,0	
	lipase Pseud. sp	15,1	20,0	
	lipase C. cilindracea	-	-	
Hexanoato de sec-hexila	C.V. lipase	26,3	30,6	0,60
	lipase Microbial	19,4	13,6	
	lipase Pseud. sp	16,0	10,4	
	lipase C. cilindracea	-	-	
Hexanoato de sec-butila	C.V. lipase	53,0	23,6	0,59
	lipase Microbial	51,0	21,2	
	lipase Pseud. sp	48,7	18,0	
	lipase C. cilindracea	-	-	
Hexanoato de sec-feniletila	C.V. lipase	25,0	31,4	0,52
	lipase Microbial	23,0	28,0	
	lipase Pseud. sp	17,0	22,0	
	lipase de C. cilindracea	-	-	

(a) grau de conversão determinado por <sup>1</sup>H RMN.

(b) enzimas imobilizadas em MBG's.

(c) eluente hexano / acetato de etila (15:1).

(d) valores de rendimento do éster já purificado, considerando que apenas um dos enantiômeros reagiu.

**Tabela V** - Dados Analíticos Experimentais para a Esterificação Enzimática do Ácido Láurico com Álcoois Secundários Racêmicos a 25°C.

Éster	Enzima <sup>(b)</sup>	% de conv. <sup>(a)</sup>	Rend. <sup>(d)</sup> %	Rf <sup>(c)</sup>
Laurato de sec-octila	C.V. lipase	42,3	45,4	0,70
	lipase Microbial	28,6	39,9	
	lipase Pseud. sp	20,4	27,8	
	lipase C.cilindracea	-	-	
Laurato de sec-hexila	C.V. lipase	40,0	32,4	0,64
	lipase Microbial	27,0	22,4	
	lipase Pseud. sp	22,0	15,0	
	lipase C.cilindracea	-	-	
Laurato de sec-butila	C.V. lipase	55,8	59,2	0,60
	lipase Microbial	40,0	31,2	
	lipase Pseud. sp	52,9	16,0	
	lipase C.cilindracea	-	-	
Laurato de sec-feniletila	C.V. lipase	40,0	34,8	0,54
	lipase Microbial	33,0	28,5	
	lipase Pseud. sp	18,0	26,5	
	lipase C.cilindracea	-	-	

(a) grau de conversão determinado por <sup>1</sup>H RMN.

(b) enzimas imobilizadas em MBG's.

(c) eluente hexano / acetato de etila (15:1).

(d) valores de rendimento do éster já purificado, considerando que apenas um dos enantiômeros reagiu.

Trabalhos já publicados, mostraram que este novo sistema de organo-gel é bastante eficiente na imobilização de enzimas para a catálise enzimática na esterificação de álcoois primários.<sup>(70),(73),(74)</sup>

Neste trabalho, pela primeira vez, está se usando este sistema para a resolução de álcoois racêmicos em escala preparativa e com diferentes lipases.

Os graus de conversão foram estimados pela comparação da integração do multiplete metínico do éster formado (centrado em torno de 4,9 ppm para os ésteres alifáticos e 5,9 ppm para o éster aromático) com a integração do multiplete metínico dos álcoois correspondentes (centrada em 3,5 - 3,8 ppm para os álcoois alifáticos, e 4,5 - 4,8 ppm para o álcool aromático).

Os graus de conversão foram determinados após extração dos produtos com 10% de solução aquosa de  $\text{NaHCO}_3$  em meio etéreo para eliminar o resíduo de ácido presente. Portanto, os resultados obtidos para graus de conversão expressos nas tabelas IV e V demonstram o rendimento do processo antes da purificação do produto, pois se apenas um dos enantiômeros reagiu, então é esperado que a reação pare em 50% de conversão do racemato.

A discrepância observada para o grau de conversão no caso das reações com o ( $\pm$ )-2-butanol, com valores acima de 50% de conversão pode ser avaliada pelos seguintes aspectos:

I - Um valor de grau de conversão acima de 50% pode expressar que a enzima não está sendo estereoseletiva para este substrato.

II - O fato de se fazer extração com solução aquosa de  $\text{NaHCO}_3$  10% antes da medida do grau de conversão, pode levar a uma medida errônea para substratos alcóolicos de baixo peso molecular por estes terem, uma certa solubilidade em água; no caso do ( $\pm$ )-2-butanol 8g/100 ml de água.

O que determina se o caso I ou o II está correto seria a medida do excesso enantiomérico. Porém, não foi possível obter este resultado devido a dificuldade de se isolar o álcool (2-butanol) opticamente ativo a partir da hidrólise alcalina do respectivo éster.

Pode-se ainda observar nas tabelas IV e V que de modo geral para os álcoois secundários alifáticos, os melhores rendimentos são com o ( $\pm$ )2-octanol, tanto para *C.V.lipase*, quanto para *lipase Microbial* e *lipase de Pseudomonas sp.* Isto mostra que o sistema é eficiente para compostos de cadeias longas, já que o ácido láurico (C<sub>12</sub>) mostrou-se mais efetivo neste sistema que o ácido hexanóico (C<sub>6</sub>). No caso do álcool sec - feniletanol, os rendimentos foram similares para os dois substratos ácidos. Aguiar<sup>(2)</sup> em estudos de rendimentos de formação de ésteres alifáticos e tioésteres frente ao sistema de MBG, mostrou que o ácido láurico é o melhor substrato para ser utilizado neste sistema, devido aos seus produtos passarem mais rapidamente para a fase orgânica após sua formação do que os produtos formados por substratos de cadeias hidrocarbônicas menores.

O rendimento obtido nas reações no sistema de MBG, mostrou que está associado tanto com o tamanho das cadeias hidrocarbônicas dos substratos ácidos e álcoois, bem como, com a atividade específica da enzima por miligrama de proteína usada. A *C.V.lipase* que foi a enzima mais eficiente no sistema de MBG, possuía uma maior atividade específica que as outras (3970 unidades/ mg de proteína). A baixa atividade específica da *lipase de Cândida cilindracea* imobilizada neste sistema (71 unidades / mg de proteína) provavelmente foi o principal motivo de não ter ocorrido a reação de esterificação. Os trabalhos realizados por Klibanov<sup>(51),(52)</sup> mostraram que *lipase de Cândida cilindracea* com atividade específica de 2415 unidades / mg de proteína reage estereoespecificamente e com bons rendimentos em sistemas bifásicos, sendo que neste sistema a enzima está em contato direto com os substratos.

Os resultados experimentais da resolução enzimática estão representados na tabela VI e VII. As enzimas imobilizadas no sistema de MBG mostraram manter sua atividade catalítica, além da sua estereoespecificidade estrutural.

**Tabela VI** - Valores Experimentais de Rotação Óptica para Esterificação do Ácido Láurico e Álcoois Secundários, em MBG.

Éster(c)	Enzima(a)	C(b)	$\alpha^{20}_{obs}(d)$	$[\alpha]^{20}_D(e)$
Laurato de sec-octila	C.V. lipase	15,4	-0,130	-4,27
	lipase Microbial	16,1	-0,190	-4,85
	lipase Pseud. sp	0,90	-0,012	-6,64
Laurato de sec-hexila	C.V. lipase	22,4	-0,247	-5,56
	lipase Microbial	39,4	-0,476	-6,03
	lipase Pseud. sp	12,7	-0,145	-5,72
Laurato de sec-butila	C.V. lipase	51,4	-0,272	-2,64
	lipase Microbial	46,6	-0,264	-2,83
	lipase Pseud. sp	6,70	-0,034	-2,54
Laurato de sec-feniletila	C.V. lipase	9,20	+0,825(f)	+44,5
	lipase Microbial	5,20	+0,410(f)	+39,4
	lipase Pseud. sp	14,4	+1,455(f)	+50,3

(a) concentração de enzima 10 mg /ml de solução.

(b) concentração de éster em g /100 ml de solução , solvente  $CHCl_3$ .

(c) tempo de reação 5 dias a 25°C.

(d) calculado de acordo com as equações 7 e 9.

(e) calculado de acordo com a equação 5.

(f) medido direto em um polarímetro com lâmpada de sódio.

**Tabela VII** - Valores Experimentais de Rotação Óptica para Esterificação do Ácido Hexanóico com Álcoois Secundários, em MBG.

Éster <sup>(c)</sup>	Enzima <sup>(a)</sup>	C <sup>(b)</sup>	$\alpha^{20}_{obs}$ <sup>(d)</sup>	$[\alpha]^{20}_D$ <sup>(e)</sup>
Hexanoato de sec-octila	C.V. lipase	25,1	-0,238	-4,75
	lipase Microbial	4,90	-0,060	-6,05
	lipase Pseud. sp	12,0	-0,123	-5,10
Hexanoato de sec-hexila	C.V. lipase	2,60	-0,043	-8,26
	lipase Microbial	23,4	-0,349	-7,45
	lipase Pseud. sp	0,64	-0,010	-7,80
Hexanoato de sec-butila	C.V. lipase	45,6	-0,446	-4,89
	lipase Microbial	40,5	-0,416	-5,14
	lipase Pseud. sp	0,87	-0,008	-4,88
Hexanoato de sec-feniletila	C.V. lipase	9,90	+0,995 <sup>(f)</sup>	+50,2
	lipase Microbial	8,90	+0,785 <sup>(f)</sup>	+44,0
	lipase Pseud. sp	9,50	+1,000 <sup>(f)</sup>	+52,4

(a) concentração de enzima 10 mg /ml de solução.

(b) concentração de éster em g /100 ml de solução , solvente CHCl<sub>3</sub>.

(c) tempo de reação 5 dias a 25°C.

(d) calculado de acordo com as equações 7 e 9.

(e) calculado de acordo com a equação 5.

(f) medido direto em um polarímetro com lâmpada de sódio.

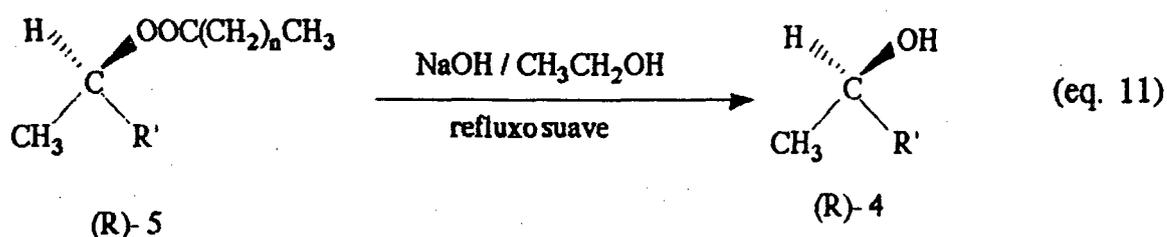
Para os álcoois racêmicos alifáticos, as enzimas (lipases) mostraram preferência pela forma estrutural com rotação óptica negativa ( $[\alpha]_D^-$ ), porém, no caso do substrato aromático a preferência foi pela forma estrutural com rotação óptica positiva ( $[\alpha]_D^+$ ), provavelmente devido a efeitos estruturais.

Sabe-se que a habilidade das enzimas para discriminar enantiômeros de substratos racêmicos está no fato de elas serem compostas de L - aminoácidos e, conseqüentemente, seus centros ativos constituem um meio dissimétrico que é apropriado para distinguir entre os enantiômeros. O isômero reativo, será então aquele que possui uma estrutura que melhor encaixa no sítio ativo da enzima, pois segundo a hipótese da ligação por três pontos, o centro ativo só pode ser abordado de uma forma, e somente os átomos e sítios complementares podem interagir, e conseqüentemente apenas o isômero que está na posição correta será encaixado no sítio ativo e catalisado. O modelo do encaixe induzido de Koshland admite uma mudança de conformação na enzima, o que posiciona resíduos de aminoácidos, ou grupos ativos da enzima, na orientação espacial correta para a ligação do substrato para a catálise.

Brzozowski et al.<sup>(16)</sup>, em estudos da atividade interfacial da lipase isolada do fungo *Rhizomucor miehei*, determinaram sua estrutura e caracterizaram como centro ativo da lipase de *Mucor meihei* uma estrutura composta dos aminoácidos Asp - His - Ser, sendo que estes se encontram em uma cavidade hidrofóbica formada pelos segmentos espirais curtos da molécula, mostrando então que o sítio ativo da enzima não está exposto. O substrato, para interagir, precisa ter uma configuração que seja adequada a catálise, independentemente de possuir rotação óptica (+) ou (-). Portanto, os resultados de rotação óptica para os substratos aromáticos e alifáticos devem estar na preferência pelas lipases, usadas neste trabalho, pelo isômero com configuração R.

Bianchi<sup>(54)</sup>, Klivanov<sup>(51),(52)</sup> e Inada<sup>(55)</sup> em seus estudos de resolução enzimática utilizando lipases, obtiveram valores de rotação óptica positiva (+) para ésteres derivados do álcool racêmico sec - feniletanol e outros aromáticos, e valores de rotação óptica negativa (-) para ésteres derivados de álcoois alifáticos. Os esquemas III e IV (paginas 15 e 16) na introdução, mostram exemplos de resolução enzimática onde a preferência pela catálise foi para o composto aromático com rotação óptica (+), enquanto o esquema V (pagina 21) confirma a preferência pelo isômero R.

Os ésteres obtidos foram submetidos a hidrólise alcalina para se obter os álcoois opticamente ativos (equação 11).



$n = 4; 10$

$\text{R}' = \text{C}_2\text{H}_5; \text{C}_4\text{H}_9; \text{C}_6\text{H}_{13}; \text{C}_6\text{H}_5$

Os resultados obtidos da hidrólise alcalina dos ésteres para seus correspondentes álcoois opticamente ativos estão representados na tabela VIII e IX. Os excessos enantioméricos foram na faixa de 90 - 100%, confirmando a alta enantioseletividade das enzimas imobilizadas no sistema de MBG.

**Tabela VIII** - Valores de Rotação Óptica e Excessos Enantioméricos para os Álcoois Secundários Obtidos da Hidrólise Alcalina dos Hexanoatos de Alquila e Arila.

Álcool	Enzima	C <sup>(a)</sup>	$\alpha^{20}/_{obs}$	$[\alpha]^{20}/_D$	ee (%) <sup>(b)</sup>
2-octanol	C.V. lipase	5,36	-0,100	-9,32	94,2
	l. Microbial	3,44	-0,065	-9,40	94,9
	l. Pseud. sp	2,91	-0,055	-9,42	95,2
2-hexanol	C.V. lipase	6,03	-0,145	-12,02	99,8
	l. Microbial	4,90	-0,115	-11,70	97,4
	l. Pseud. sp	3,10	-0,070	-11,30	93,9
1-fenil-1- etanol	C.V. lipase	3,49	+0,290	+41,5	96,8
	l. Microbial	6,02	+0,485	+40,2	93,8
	l. Pseud. sp	1,56	+0,125	+40,1	93,5

(a) concentração considerada g/ 100ml de solução, solvente CHCl<sub>3</sub>.

(b) excessos enantioméricos foram determinados por comparação com os valores de rotação óptica dos álcoois opticamente puros descritos na lit.<sup>(77)</sup>, aplicando a equação 6. 2-octanol  $[\alpha]^{17}/_D = -9,9$  {puro}; 2-hexanol  $[\alpha]^{20}/_D = -12,04$  {puro}; 1-fenil-1-etanol  $[\alpha]^{19}/_D = +42,9$  {puro}.

**Tabela IX** - Valores de Rotação Óptica e Excessos Enantioméricos para os Álcoois Secundários Obtidos da Hidrólise Alcalina dos Lauratos de Alquila e Arila.

Álcool	Enzima	C(a)	$\alpha^{20}_{obs}$	$[\alpha]^{20}_D$	ee (%) <sup>(b)</sup>
2-octanol	C.V. lipase	6,36	-0,125	-9,80	99,3
	I. Microbial	7,35	-0,135	-9,20	93,0
	I. Pseud. sp	5,07	-0,095	-9,40	94,9
2-hexanol	C.V. lipase	1,09	-0,025	-11,50	95,5
	I. Microbial	3,10	-0,075	-12,11	100
	I. Pseud. sp	9,14	-0,215	-11,76	97,6
1-fenil-1- etanol	C.V. lipase	2,75	+0,230	+41,9	97,7
	I. Microbial	3,10	+0,250	+40,4	94,2
	I. Pseud. sp	3,92	+0,325	+41,5	96,7

((a) concentração considerada g/ 100ml de solução, solvente  $CHCl_3$ .

(b) excessos enantioméricos foram determinados por comparação com os valores de rotação óptica dos álcoois opticamente puros descritos na lit.<sup>(77)</sup>, aplicando a equação 6. 2-octanol  $[\alpha]^{17}_D = -9,9$  {puro}; 2-hexanol  $[\alpha]^{20}_D = -12,04$  {puro}; 1-fenil-1-etanol  $[\alpha]^{19}_D = +42,9$  {puro}.

As tabelas X e XI mostram os resultados de  $\alpha_D$  e excessos enantioméricos dos enantiomeros (álcoois) que não reagiram na esterificação por catálise enzimática, confirmando a preferência das enzimas (lipases) pela forma estrutural com rotação óptica negativa (-) para racematos alifáticos e forma estrutural com rotação óptica positiva (+) para o aromático, indicando que enzimas imobilizadas em MBG podem discriminar os enantiomeros de um racemato com alta enantioseletividade.

Foi realizada a esterificação química utilizando sistema de refluxo com os álcoois ( $\pm$ )2- butanol e ( $\pm$ )2- octanol com o ácido hexanóico, e catálise ácida, e o valor de rotação óptica para o éster hexanoato de sec - octila foi zero ( $\alpha_D = 0,0$ ), e para o éster hexanoato de sec - butila foi + 0,081, mostrando a incompatibilidade da esterificação direta sem o uso de enzimas ou outro agente quiral, no que diz respeito a enantioseletividade do produto obtido.

**Tabela X-** Alguns Valores de Rotação Óptica e Excessos Enantioméricos para os Enantiômeros que não Reagiram na Reação de Esterificação do Ácido Láurico com Álcoois Secundários Racêmicos em MBG, a 25°C.

Álcool	Enzima	C(a)	$\alpha^{20}_{obs}$	$[\alpha]^{20}_D$	ee (%) <sup>(b)</sup>
2-hexanol	C.V.lipase	11,0	+0,047	+2,13	15,1
2-octanol	Microbial	9,90	+0,035	+1,78	18,0
2-octanol	C.V.lipase	11,0	+0,060	+2,72	27,5
2-octanol	Pseud.sp	13,1	+0,030	+1,14	11,5
2-octanol	Microbial	6,80	+0,025	+1,84	18,6
2-octanol	C.V.lipase	4,90	+0,035	+3,56	36,0
2-feniletanol	C.V.lipase	9,80	-0,405	-20,7	45,5
2-feniletanol	Pseud.sp	5,10	-0,240	-23,5	51,6
2-feniletanol	Microbial	5,60	-0,075	-6,67	14,7
2-feniletanol	C.V.lipase	13,2	-0,190	-7,19	15,8
2-feniletanol	Microbial	11,9	-0,100	-4,21	9,30

(a) concentração considerada g/ 100ml de solução, solvente  $CHCl_3$ .

(b) excessos enantioméricos foram determinados por comparação com os valores de rotação óptica dos álcoois opticamente puros descritos na lit.<sup>(77)</sup>, aplicando a equação 6. 2- octanol  $[\alpha]^{17}_D = - 9,9$  {puro}; 2-hexanol  $[\alpha]^{20}_D = - 12,04$  {puro}; 1-fenil-1-etanol  $[\alpha]^{19}_D = + 42,9$  {puro}.

**Tabela XI- Alguns Valores de Rotação Óptica e Excessos Enantioméricos para os Enantiômeros que não Reagiram na Reação de Esterificação do Ácido Hexanóico com Alcoois Secundários Racêmicos em MBG, a 25°C.**

Álcool	Enzima	C(a)	$\alpha^{20}_{obs}$	$[\alpha]^{20}_D$	ee (%) (b)
2-hexanol	C.V.lipase	17,9	+0,026	+0,71	5,0
2-octanol	Microbial	23,6	+0,010	+0,21	2,1
2-octanol	C.V.lipase	30,5	+0,043	+0,71	7,2
2-octanol	Pseud.sp	15,6	+0,026	+0,64	6,5
2-octanol	Microbial	13,8	+0,005	+0,18	1,8
2-octanol	C.V.lipase	10,3	+0,020	+0,97	9,9
2-octanol	Pseud. sp	30,4	+0,009	+0,14	1,4
2-hexanol	Microbial	2,13	+0,005	+1,17	8,3
2-feniletanol	C.V.lipase	16,4	-0,345	-10,5	23,8
2-feniletanol	Microbial	16,0	-0,185	-5,80	12,7

(a) concentração considerada g/ 100ml de solução, solvente  $CHCl_3$ .

(b) excessos enantioméricos foram determinados por comparação com os valores de rotação óptica dos álcoois opticamente puros descritos na lit.<sup>(77)</sup>, aplicando a equação 6. 2-octanol  $[\alpha]^{17}_D = -9,9$  {puro}; 2-hexanol  $[\alpha]^{20}_D = -12,04$  {puro}; 1-fenil-1-etanol  $[\alpha]^{19}_D = +42,9$  {puro}.

### 3.1 -REUTILIZAÇÃO E ESTABILIDADE DO SISTEMA DE MBG CONTENDO LIPASES IMOBILIZADAS

Uma das grandes vantagens do sistema de MBG reside na sua reutilização. Este é um fator importante quando considera-se a aplicação prática de um método particular de síntese.

Em trabalhos anteriores, já foi verificado que o gel possui elevada estabilidade e reversibilidade térmica, sendo que a enzima imobilizada neste sistema permanece com uma atividade de até 87% por um período de até doze meses quando armazenado a temperatura ambiente.<sup>(2)</sup>

Nascimento e col.<sup>(74)</sup>, afirmam que a principal vantagem do método presente inclui a reutilização de pequenas quantidades de enzimas, convenientemente imobilizadas em um meio aquoso onde sua solubilidade e atividade são adequadas. Este processo mostrou ser econômico.

No presente trabalho de resolução de álcoois secundários racêmicos utilizando diferentes lipases, foi confirmado a eficiência do método de MBG. Foi preparado 1 ml de solução contendo 10 mg de enzima e dividido o conteúdo da solução em 4 tubos de ensaio, o que equivale a 0,25 ml de solução por tubo de gel preparado. Este gel foi usado no desenvolvimento de toda a parte experimental, utilizando a mesma lipase imobilizada em MBG para catalisar reações envolvendo diferentes substratos, com repetição de algumas reações.

Foi observado o comportamento do laurato de sec-feniletila na reutilização do sistema de MBG, e o resultado está expresso na tabela XII.

**Tabela XII** - Reutilização do Gel na Formação do Laurato de sec - Feniletila.

Éster	Enzima	Rendimento (%) <sup>(a)</sup>	
		I	II
Laurato de sec-feniletila	C.V.lipase	34,8	14,4
	lipase Microbial	28,5	10,3

I - Após 5 utilizações do catalisador.

II - Após 10 utilizações do catalisador.

(a) - rendimento do éster já purificado.

O excesso enantiomérico permaneceu na faixa de 90 - 100% enquanto que o rendimento caiu aproximadamente pela metade. O gel apresentou um aspecto esbranquiçado e mais rígido após sucessivas utilizações, mostrando - se desgastado pelo processo.

O enantiomero do álcool sec -feniletanol, que não reagiu, teve um excesso enantiomérico de 45,5% para o gel contendo C.V.lipase imobilizada, após 5 utilizações e caiu para 15,8% após terem sido reutilizados 10 vezes (tabela X). O mesmo foi observado para a reação catalisada por lipase Microbial, sendo 14,7% e 9,3% respectivamente os valores dos excessos enantioméricos dos enantiomeros que não reagiram.

agi

### 3.2 - COMPARAÇÃO DO SISTEMA DE MBG's COM OUTROS JÁ UTILIZADOS PARA RESOLUÇÃO DE ÁLCOOIS RACÊMICOS VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA

Os sistemas usados para resolução de álcoois racêmicos via catálise enzimática são geralmente enzimas em sistemas bifásicos<sup>(3)</sup>, enzimas em solvente orgânico como éter anidro<sup>(46)</sup>, enzimas imobilizadas em suporte poroso tal como celite<sup>(54)</sup>, cromosorbe e sefarose.<sup>(51)</sup> Em todos estes sistemas, a transesterificação é o método mais utilizado com *lipase de Cândida cilindracea*, *lipase de Pseudomonas fluorescente* e, *lipase do Pancreas do porco* por serem mais baratas. Um pó de enzima livre ou imobilizado é simplesmente adicionado ao solvente contendo o álcool racêmico ou o éster racêmico.

Nos sistemas descritos acima, o uso de esterificação para resolução enzimática não é conveniente por não poder utilizar altas concentrações de ácidos.<sup>(19)</sup> A transesterificação é mais utilizada nestes métodos por ser mais versátil que a esterificação direta em termos de velocidades de reações, e limitações termodinâmicas.<sup>(3)</sup>

A grande inconveniência dos métodos utilizando sistema bifásico, enzimas em suspensão em solventes orgânicos anidros ou suporte poroso são:

- a enantioseletividade pode ser afetada pelo solvente<sup>(5),(7)</sup>;
- necessidade do sistema ficar sob agitação permanente para acelerar a reação<sup>(2)</sup>;
- alta concentração de enzima no sistema, variando de 5 a 20 mg / ml, chegando a gastar de 200 mg a 13 g para realizar um experimento<sup>(32),(36),(46)</sup>;
- quando as enzimas são imobilizadas em suportes porosos como cromosorbe ou sefarose, a grande dificuldade está na reprodutibilidade do sistema<sup>(52)</sup>;

- o uso de tampões para controlar o pH do meio, e a necessidade de aquecimento e controle de temperatura, que são fatores importantes para a catálise enzimática, e devem ser sempre observados nestes sistemas.

Porém, existem vantagens tais como(2):

- reações de substratos insolúveis em água podem ser feitas em volumes substancialmente reduzidos da mistura de reagentes;

- o produto pode ser facilmente separado do biocatalisador;

- reações termodinamicamente desfavoráveis em meio aquoso, tornam-se viáveis;

- uso de diferentes substratos, sem limitações de cadeia carbônica.

As vantagens do sistema de microemulsão imobilizada em organo-gel (MBG) frente a outros métodos para resolução enzimática de álcoois racêmicos são:

- fácil preparação do sistema de organo-gel frente aos outros métodos;

- utilização de pequena quantidade de enzimas 10 mg /-ml de solução, sendo que, é preparado uma solução de 1 ml de enzima e distribuído em quatro tubos de ensaio e então imobilizada no organo-gel;

- facilidade para separar os produtos do biocatalisador;

- as reações podem ser realizadas a temperatura ambiente;

- dispensa uso de tampões;
- um vez preparado o sistema, não há necessidade de controle de pH;
- as enzimas matêm - se estáveis neste sistema;
- a enantioseletividade das enzimas não é afetada;
- o sistema pode ser sucessivamente reutilizado para várias reações com baixa perda da atividade catalítica, até que o gel apresente desgaste.

As principais desvantagens são:

- limitação no uso de solventes, pois apenas solventes bastante apolares podem ser usados;
- o gel deve ser submetido a extração dos possíveis produtos e substratos remanescentes após o término da reação, evitando - se assim a contaminação nas reações subseqüentes;
- limitação no uso de substratos, ou seja, ácidos de cadeias pequenas (C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub>) altamente hidrofílicos, atacam e destroem o gel, bem como substratos muito polares tais como o metanol, 2-dimetilaminoetanol;
- deve - se ter o cuidado (alta agitação) na confecção do sistema para uma boa consistência do gel, pois uma vez a enzima imobilizada não há como recuperá - la.

### 3.3 - CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS

- Hexanoato de sec-octila: IV (NaCl)( $\text{cm}^{-1}$ ) 2934, 2870, 1737, 1468, 1378, 1200.  $^1\text{H}$  RMN (60 MHz,  $\text{CCl}_4/\text{TMS}$ )  $\delta(\text{ppm})$  1,1 - 2,4 (m, 27H,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4$ ,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5$ ), 4,9 (q, 1H, CH).
- Hexanoato de sec-hexila: IV (NaCl)( $\text{cm}^{-1}$ ) 2940, 2860, 1735, 1460, 1360, 1200.  $^1\text{H}$  RMN (60 MHz,  $\text{CCl}_4/\text{TMS}$ )  $\delta(\text{ppm})$  1,0 - 2,5 (m, 23H,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3$ ,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4$ ), 4,8 (q, 1H, CH).
- Hexanoato de sec-butila: IV (NaCl)( $\text{cm}^{-1}$ ) 2946, 2870, 1734, 1459, 1376, 1246, 1178.  $^1\text{H}$  RMN (60 MHz,  $\text{CCl}_4/\text{TMS}$ )  $\delta(\text{ppm})$  1,0 - 2,4 (m, 19H,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4$ ), 5,0 (q, 1H, CH).
- Hexanoato de sec-feniletila: IV (NaCl)( $\text{cm}^{-1}$ ) 3020, 2940, 2860, 1735, 1240, 1170, 750.  $^1\text{H}$  RMN (60 MHz,  $\text{CCl}_4/\text{TMS}$ )  $\delta(\text{ppm})$  1,0 - 2,4 (m, 14H,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4$ ), 5,7 (q, 1H, CH), 7,1 (s, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ).
- Laurato de sec-octila: IV (NaCl)( $\text{cm}^{-1}$ ) 2920, 2840, 1740, 1470, 1380, 1200.  $^1\text{H}$  RMN (60 MHz,  $\text{CCl}_4/\text{TMS}$ )  $\delta(\text{ppm})$  1,0 - 2,4 (m, 40H,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5$ ,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}$ ), 4,9 (q, 1H, CH).
- Laurato de sec-hexila: IV (NaCl)( $\text{cm}^{-1}$ ) 2990, 2860, 1745, 1460, 1380, 1200, 1190.  $^1\text{H}$  RMN (60 MHz,  $\text{CCl}_4/\text{TMS}$ )  $\delta(\text{ppm})$  1,0 - 2,5 (m, 35H,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3$ ,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}$ ), 4,8 (q, 1H, CH).
- Laurato de sec-butila: IV (NaCl)( $\text{cm}^{-1}$ ) 3000, 2890, 1734, 1459, 1360, 1200, 1184.  $^1\text{H}$  RMN (60 MHz,  $\text{CCl}_4/\text{TMS}$ )  $\delta(\text{ppm})$  1,0 - 2,4 (m, 31H,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}$ ), 4,8 (q, 1H, CH).
- Laurato de sec-feniletila: IV (NaCl)( $\text{cm}^{-1}$ ) 3040, 3000, 2820, 1730, 1200, 1170, 800.  $^1\text{H}$  RMN (60 MHz,  $\text{CCl}_4/\text{TMS}$ )  $\delta(\text{ppm})$  1,0 - 2,5 (m, 26H,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}$ ), 5,8 (q, 1H, CH), 7,2 (s, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ).

- (-)-2-octanol: IV (NaCl)(cm<sup>-1</sup>) 3348, 2960, 2858, 1462, 1374, 1114, 840. <sup>1</sup>H RMN (60 MHz, CCl<sub>4</sub>/TMS) δ(ppm) 0,8 - 2,3 (m, 16H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>), 3,7(q, 1H, CH).
- (-)-2-hexanol: IV (NaCl)(cm<sup>-1</sup>) 3354, 2962, 2862, 1658, 1462, 1376, 1212, 1146, 1112, 842. <sup>1</sup>H RMN (60 MHz, CCl<sub>4</sub>/TMS) δ(ppm) 1,0 - 2,2(m, 12H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 3,7(q, 1H, CH).
- (+)-1-phenyl-1-ethanol: IV (NaCl)(cm<sup>-1</sup>) 3358, 3062, 2974, 2878, 1602, 1494, 1204, 1098, 900, 760. <sup>1</sup>H RMN (60 MHz, CCl<sub>4</sub>/TMS) δ(ppm) 1,2 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.1 - 4.4 (q, 1H, CH), 7.2 (s, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

## CAPÍTULO 4 -CONCLUSÃO

Neste estudo foi descrito um novo caminho para o uso de enzimas em solvente orgânico. A imobilização de lipases em MBG mostrou ser um método estável que pode ser aplicado em solventes apolares.

A partir dos resultados obtidos, as principais conclusões deste trabalho são:

I - Enzimas são biocatalisadores enantioseletivos que podem ser utilizados para separação de racematos.

II - O sistema de MBG utiliza baixa quantidade de enzima (250 mg / ml), bem menor que os outros sistemas.

III - Enzimas imobilizadas em MBG resultam num método bastante eficiente, na reação de esterificação de álcoois secundários racêmicos com ácidos alifáticos.

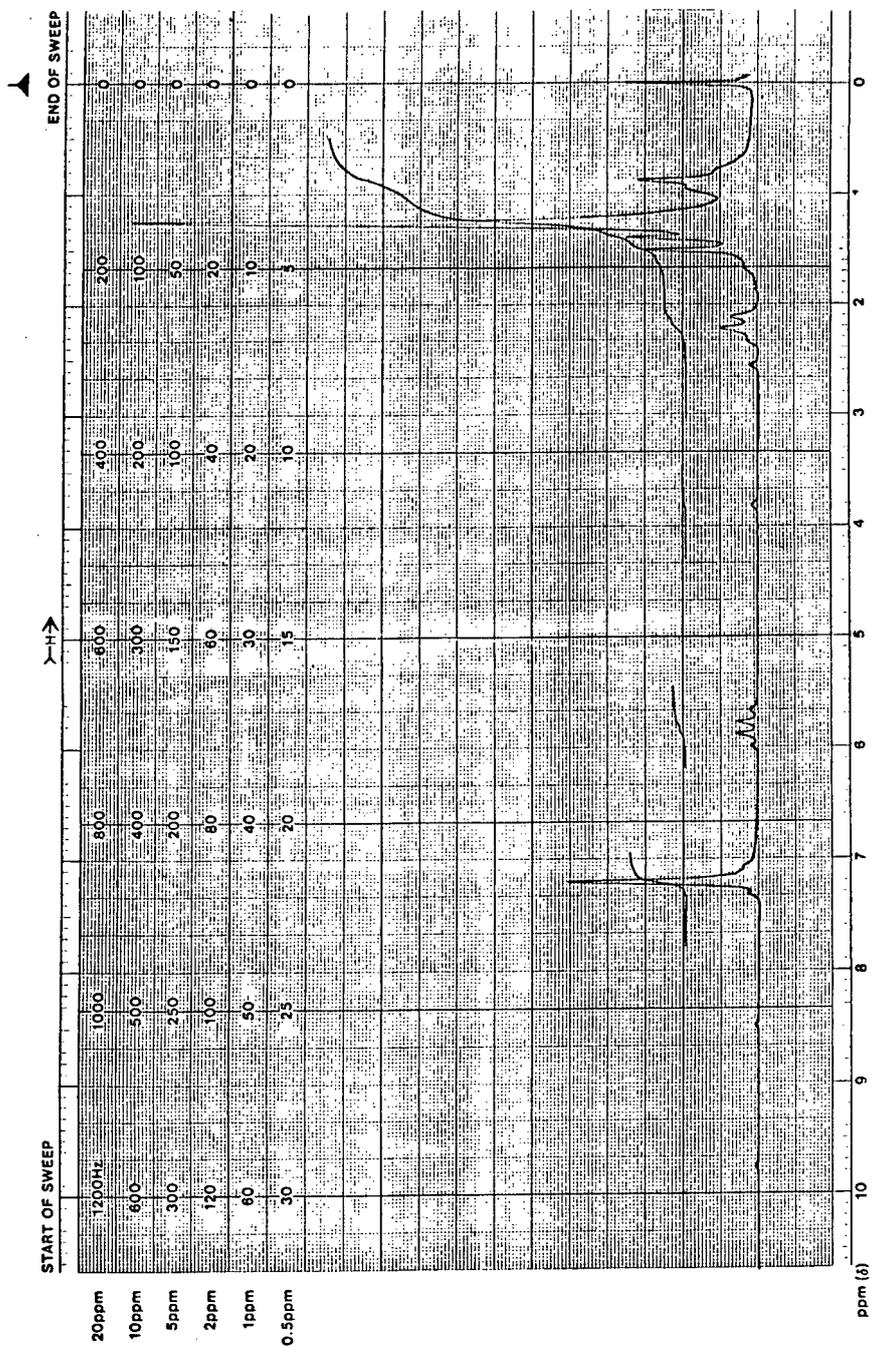
IV - Os álcoois, opticamente ativos, foram obtidos com bons rendimentos e com alto excessos enantioméricos (> 90 %).

V - A pureza enzimática está associada com sua eficiência e atividade catalítica.

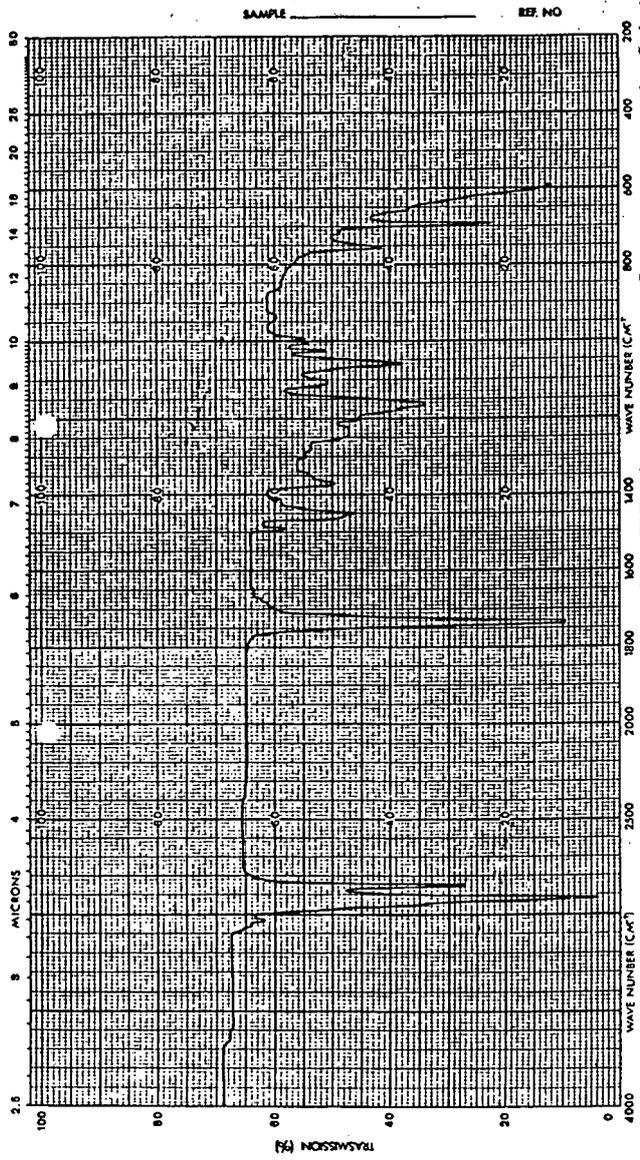
VI - Lipase de *Pseudomonas* sp, C.V. lipase e lipase Microbial, são estereoespecíficas para álcoois alifáticos que possuem  $\alpha_D$  (-) e para álcoois aromáticos que possuem  $\alpha_D$  (+); indicando que a estrutura do substrato é o fator determinante na catálise.

**VII-** O sistema pode ser reutilizado em sucessivas reações de esterificação com os mesmos substratos e/ou substratos diferentes.

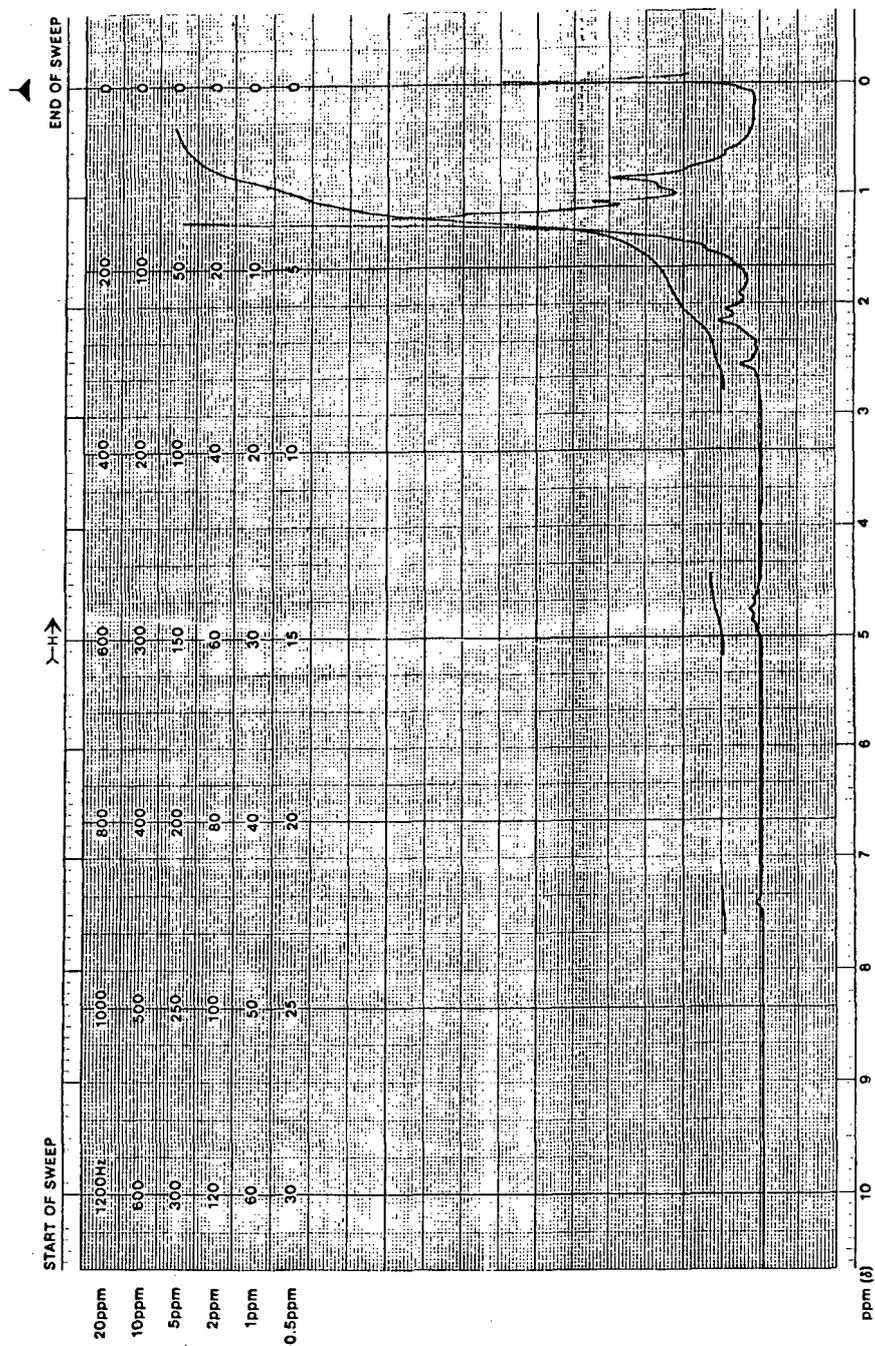
Concluído, o método representa um **significante** **melhora-**  
**mento** no uso de enzimas para a produção preparativa de álcoois opticamente ativos. O procedimento descrito é rápido, simples e pode ser facilmente repetido.



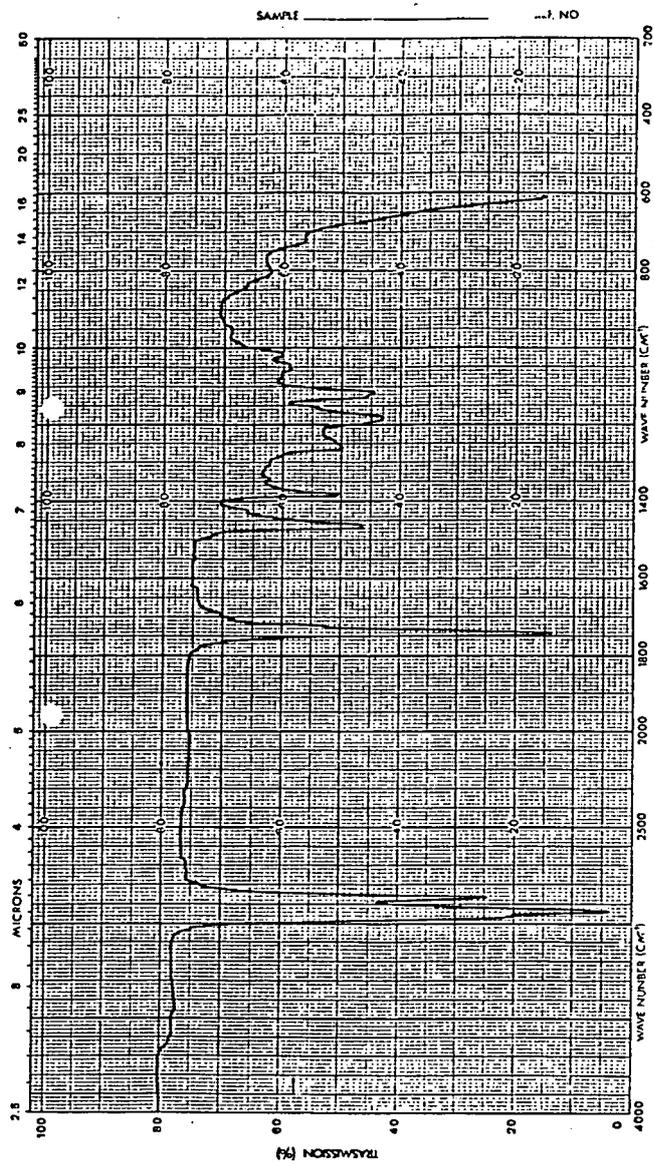
**APÊNDICE 1** - Espectro de  $^1\text{H}$  RMN 60 MHz do laurato de sec - feniletila utilizando TMS como referência interna e  $\text{CCl}_4$  como solvente.



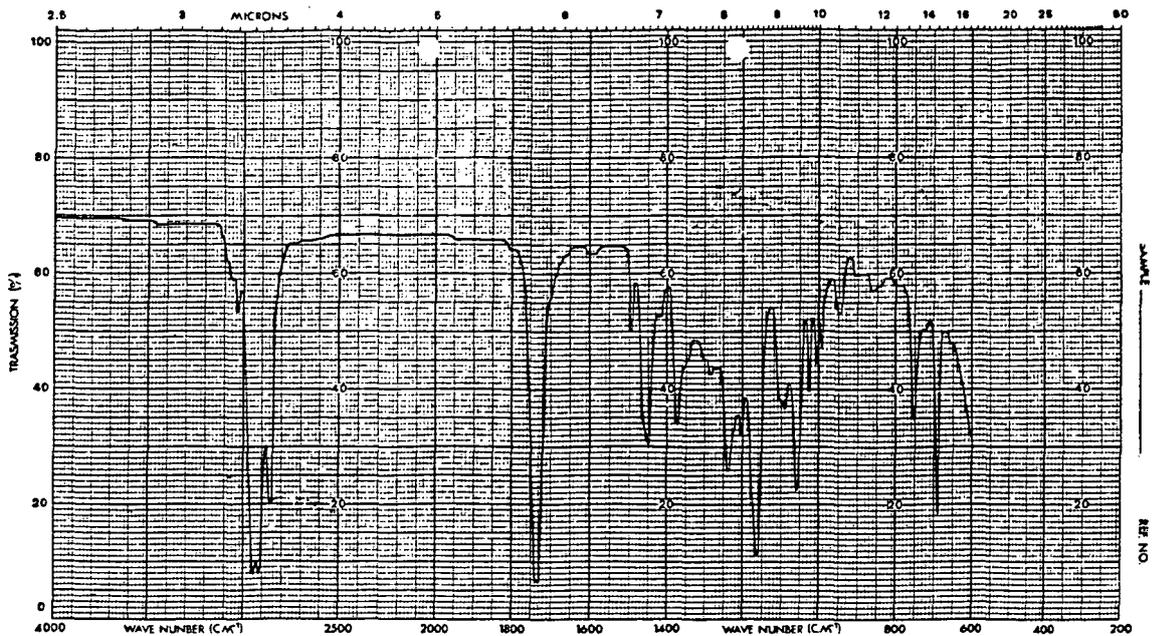
**APÊNDICE 2 - Espectro de infravermelho do laurato de sec - feniletila em filme em cela de NaCl.**



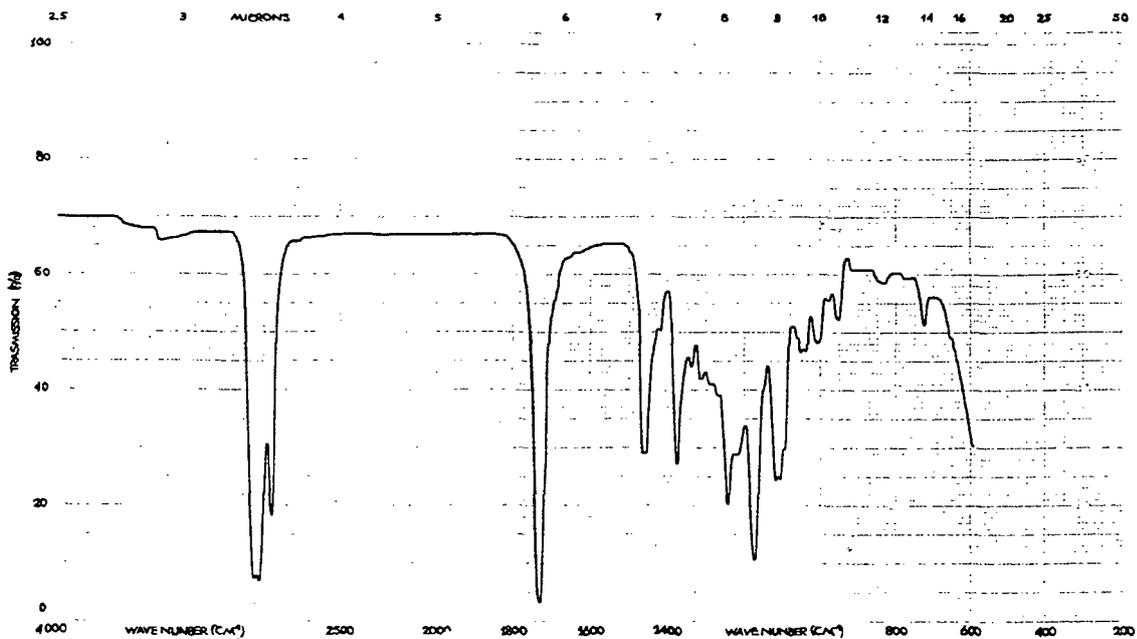
**APÊNDICE 3** - Espectro de  $^1\text{H}$  RMN 60 MHz do laurato de sec - hexila utilizando TMS como referência interna e  $\text{CCl}_4$  como solvente.



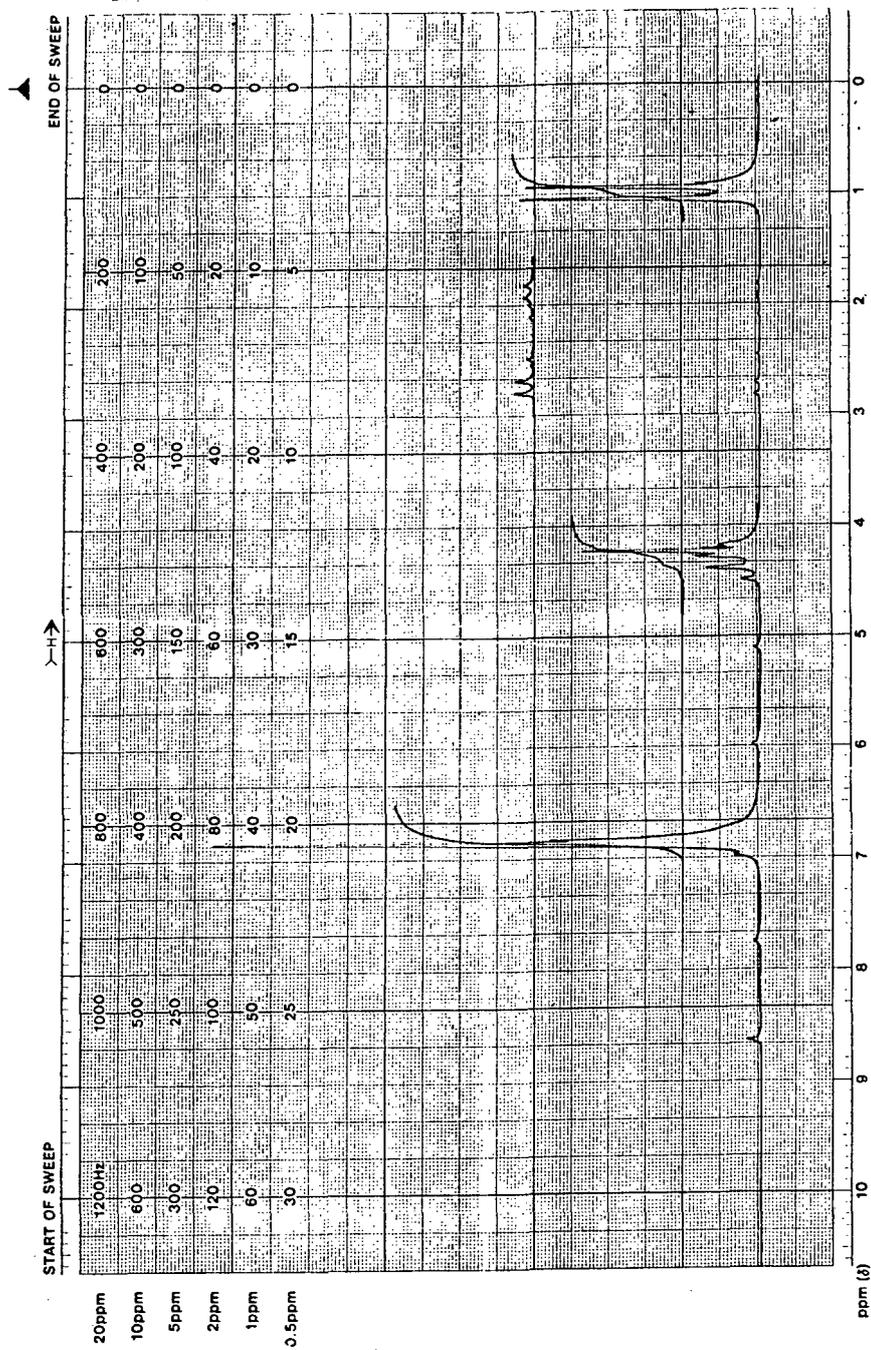
**APÊNDICE 4 - Espectro de infravermelho do laurato de sec - hexila em filme em cela de NaCl.**



APÊNDICE 5 - Espectro de infravermelho do hexanoato de sec-feniletila em filme em cela de NaCl.



APÊNDICE 6 - Espectro de infravermelho do hexanoato de sec-hexila em filme em cela de NaCl.



**APÊNDICE 7** - Espectro de <sup>1</sup>H RMN 60 MHz do (+)1 - fenil - 1 - etanol utilizando TMS como referência interna e CCl<sub>4</sub> como solvente.

## CAPÍTULO 5 - BIBLIOGRAFIA

- 1 - KLIBANOV, A. M., SAMOKHIN, G. P., MARTINEK, K., BEREZIN, I.V. A new approach to preparative enzymatic synthesis. Biotechnology and Bioeng., v. XIX, p. 1351 - 1361, 1977.
- 2- AGUIAR, L. M. Z. Estudo da atividade enzimática e das propriedades físico-químicas do organo-gel através de reações catalisadas pela C.V. lipase. Tese (M. Sc.). Curso de Pós - Graduação em Química, UFSC, Florianópolis, SC, 1992.
- 3 - KLIBANOV, A. M. Asymmetric transformations catalysed by enzymes in organic solvents. Acc. Chem. Res., v.23,, n.4, p. 114 - 120, 1990.
- 4 - ZAKS, A., KLIBANOV, A.M. Substrate specificity of enzymes in organic solvents vs water is reversed. J. Am. Chem. Soc., v. 108, p. 2767 - 2768, 1986.
- 5 - SAKURAI, T., MARGOLIN, A. L., RUSSEL, A. J., KLIBANOV, A. M. Control of enzyme enantioselectivity by the reaction medium. J. Am. Chem. Soc., v.110, p. 7236 - 7237, 1988.
- 6 - KITAGUCHI, H., FITZPATRICK, P. A., HUBER, J. E., KLIBANOV, A. M. Enzymatic resolution of racemic amines: crucial role of the solvent. J. Am. Chem. Soc., v. 111, p. 3094 - 3095, 1989.
- 7 - HIROSE, Y., KARIYA, K., SASAKI, I. et al. Drastic solvent effect on lipase - catalized enantioselective hydrolysis of prochiral 1,4-dihydropyridines T. Letters, v. 33, n. 47, p. 7157 - 7160, 1992.
- 8 - RUBIO, E., MAYORALES, A. F., KLIBANOV, A. M. Effect of the solvent on enzyme regioselectivity. J. Am. Chem. Soc., v. 113, p. 659 - 696, 1991.
- 9 - JONES, J. B. Enzymes in organic synthesis. Tetrahedron, v.42, n.13, p. 3351 - 3403, 1986.

- 10 - GREENSTEIN, J. P. *The resolution of racemic  $\alpha$ -amino acids.* Adv. Protein.Chem., v. 9, p. 121 - 202, 1954.
- 11 - MURRAY, R. K., GRANNER, D. K., MAYES, P. A. HARPER: Bioquímica. Atheneu, SP, 6<sup>ed.</sup>, p. 50 -75, 1990.
- 12 - GUTMAN, A. L.; ZUOBI, K.; GUIBE, J. E. *Lipase catalysed hydrolyses of  $\gamma$ -substituted  $\alpha$ -aminobutyrolactones.* T. Letters, v. 31, n. 14, p.2037 - 2038, 1990.
- 13 - CHEN, S. C.; WU, S. H.; GIRDAUKAS, G.; SIH, C. J. *Quantitative analyses of biochemical kinetic resolution of enantiomers. 2. enzyme-catalysed esterifications water - organic solvent biphasic systems.* J. Am. Chem. Soc., v. 109, 2812 - 2817, 1987.
- 14 - BRADY, L., BRZOZOWSKI, A. M. et al. *A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase.* Nature, v. 343, p. 767 -770, 1990.
- 15 - WINKLER, F. K., D'ARCY, A. et al. *Structure of human pancreatic lipase.* Nature, v. 343, p.771 - 774, 1990.
- 16 - BRZOZOWSKI, A. M., DEREWENDA, U. et al. *A model for interfacial activation in lipase from the structure of a fungal lipase - inhibitor complex.* Nature, v. 351, p. 491 - 494, 1991.
- 17 - HATA, Y., MATSURA, Y., TANAKA, N. et al. *Low resolution crystal structure of lipase from *Geotrichum candidum*.* J. Biochem., v. 86, p. 1821, 1979.
- 18 - BLOCKMAN, H., MONSEN, W.E., TSUJITA, T. *Lipid - lipid complexes: properties and effects on lipase binding to surfaces.* J.A.O.C.S., v. 65 (6), p.891 - 896, 1988.
- 19 - SIH, C. J., CHEN, C. S. *General aspects and optimization of enantio-selective biocatalysis in organic solvents: the use of lipases.* Angew. Chem. Int. Ed. Engl., v. 28, p. 695 - 707, 1989.

- 20 - BELAN, A., BOLTE, J., FAUVE A., GOURCY, G.J., VESCHAMBRE, H. Use of biological systems for the preparation of chiral molecules. 3. An application in pheromone synthesis: Preparations of sulcatol enantiomers. J. Org. Chem., v. 52, p. 256 - 260, 1987.
- 21 - STOKES, M. T., OEHLISCHLAGER, A. C. Enzyme reactions in apolar solvents: The resolution of ( $\pm$ ) - sulcatol with porcine pancreatic lipase. T. Letters, v. 28, n. 19, p. 2091 - 2094, 1987.
- 22 - OTTOLINA, G. CARRERA G., RIVA, S. Synthesis of ester derivatives of chloramphenicol by lipase - catalysed transesterification in organic solvents. J. Org. Chem.; v. 55, p. 2366 - 2369, 1990.
- 23 - ENNIS, M. D. GHAZAL, N.B. The Synthesis of (+)- and (-)- fleroxan: Application of enzymatic resolution methodology. T. Letters, v. 33, n. 42, p. 6287 - 6290, 1992.
- 24 - TAKARATA, H., UCHIDA, Y. TAKEFUMI, M. Transesterification - based enzymatic resolution of racemic 3 - Hydroxy - 4 - pentenyl - urethanes in Organic Solvents. T. Letters, v. 33, n. 23, p. 3331 - 3332, 1992.
- 25 - ENNIS, M. D., OLD, D.W. Enzymatic resolution of 2 - hydroxymethyl - 1,4 - benzodioxanes. T. Letters, v. 33 (42), p. 6283 - 6286, 1992.
- 26 - BIANCHI, D., BOSETTI, A., CESTI, P., GOLINI, P. Enzymatic resolution of 1,2 - diols: preparation of optically Pure dropropizine. T. Letters, v.33, n. 22, p. 3231 - 3234, 1992.
- 27 - BIANCHI, D., BOSSETI, A. et al. Enzymatic resolution of 1,2 - diols: comparison between hydrolysis and transesterification reactions. J. C. S. Perkin Trans. I, p. 2395 - 2398, 1992.
- 28 - BEVINAKATTI, H. S., BANERJI A. A. Lipase catalysis in organic solvents. Application to the synthesis of (R) - and (S) - atenolol. J. Org. Chem., v. 57, p. 6003 - 6005, 1992.
- 29 - NATOLI, M., NICOLOSI, G., PATTELLI, M. Regioselective alcoholysis of flavonoid acetates with lipase in an organic solvent. J. Org. Chem., v. 57, p. 5776 - 5778, 1992.

- 30 - SARIASLANI, F. S., ROSAZZAJ, P. N. *Biocatalysis in natural products chemistry*. Enzyme Microb. Technol., v. 6, p. 242 - 253, 1984.
- 31 - AKITA, H. et al. *Total synthesis of (-) - Oudemansin - x based on enzymatic resolution using immobilized lipase*. T. Asymmetry, v.4, n. 5, p. 757 - 760, 1993.
- 32 - BALDOLI, C., MAIORANA, S., CARRERA, G., RIVAS, S. *Studies on the enzymatic resolution of chiral tricarbonyl (benzaldehyde oxime) chromium complexes*. T. Asymmetry, v. 4, n. 5. p. 767 - 772, 1993.
- 33 - BEVINAKATTI, H. S., NEWADKAR, R. V. *Lipase catalysis in organic solvents. In search of practical derivatizing agents for the kinetic resolution of alcohols*. T. Asymmetry, v. 4, n. 5, p. 773 - 776, 1993.
- 34 - BLANCO, L., ROUSSEAU, G., BARNIER, J. P., JAMPEL, E. G. *Enzymatic resolution of 3 - substituted - 4 -oxoesters*. T. Asymmetry, v.4, n.5, p. 783 - 792, 1993.
- 35 - BARTH, S., EFFENBENBERGER, F. *Lipase - catalyzed resolution of racemic 2 - alkyl substituted 1 - alkanols*. T. Asymmetry, v.4, n.5, p. 823 - 833, 1993.
- 36 - GUTMAN, A. L., BRENNER, D., BOLTANSKI, A. *Convenient practical resolution of racemic alkyl - aryl alcohols via enzymatic acylation with succinic anhydride in organic solvents*. T. Asymmetry, v.4, n. 5, p. 839 - 844, 1993.
- 37 - NAEMURA, K. et al. *Enzyme - catalysed asymmetric acylation and hydrolysis of cis - 2,5 - disubstituted tetrahydrofuran derivatives: contribution to development of models for reactions catalyzed by porcine liver esterase and porcine pancreatic lipase*. T. Asymmetry, v. 4, n. 5, p. 911 - 918, 1993.
- 38 - DJEGHABA, Z., DELEUZE, H. et al. *Enzymes in organic synthesis VII: Enzymatic acylation of amines*. T. Letters, v. 32, n. 6, p. 761 - 762, 1991.

- 39 - TUCCIO, B., FERRÉ, E., COMEAU, L. *Lipase - catalyzed synthesis n - Octyl - alkylamides in organic media.* T.Letters, v. 32, n. 24, p. 2763 - 2764, 1991.
- 40 - BRIEVA, R., REBOLLEDO, F., GOTOR, V. *Enzymatic synthesis of amides with two chiral centres.* J. C. S. Chem. Commun., p. 1386 - 1387, 1990.
- 41 - REBOLLEDO, F., BRIEVA, R., GOTOR, V. *Enzymatic synthesis of propargylamides* T.Letters, v. 30, n. 39, p. 5345 - 5346, 1989.
- 42 - GOTOR, V., BRIEVA, R., REBOLLEDO, F. *A simple procedure for the preparation of chiral amides.* T.Letters, v. 29, n. 52, p. 6973 - 6974, 1988.
- 43 - GU, Q. M., CHEN, C. S., SIH, C. J., *A facile enzymatic resolution process for the preparation of (+) - S - 2 - (6 - methoxy - 2 - naphthyl) proprionic acid (naproxen).* T.Letters, v. 27, n. 16, p. 1763 - 1766, 1986.
- 44 - MIYAZAWA, T. et al. *Resolution of mandelic acids by lipase - catalysed transesterification in organic media: Inversion of enantioselectivity mediated by the acyl donor.* J. C. S. Perkin Trans I, p. 2253 - 2256, 1992.
- 45 - YAMAMOTO, K., NISHIOKA, T., ODA, J. *Asymmetric ring opening of cyclic acid anhydrides.* T.Letters, v. 29, n. 14, p. 1717 - 1720, 1988.
- 46 - MORGAN, B., OEHLISCHLAGER, A. C., STOKES, T. M. *Enzyme reactions in apolar unsaturation on the PPI - catalyzed Kinetic resolution of secondary alcohols.* J. Org. Chem., v. 57, p. 3231 - 3236, 1992.
- 47 - MELTZ, M. SACCOMANO, N. A. *Lipase mediated optical resolution of bicyclic secondary carbinols.* T.Letters, v. 33, n. 9, p. 1201 - 1202, 1992.

- 48 - WANG, Y. F., CHEN, S. T., LIU, K. C., WONG, C. H. *Lipase - catalysed irreversible transesterification using enol esters: Resolution of cyanohidrins and synthesis of ethyl (R) - 2 - hydroxy - 4 - phenyl - butyrate and (S) - propranolol.* T. Letters, v. 30, n. 15, p 1917 - 1920, 1989.
- 49 - CAMBOU, B., KLIBANOV, A. M. *Comparison of different strategies for the lipase - catalyzed preparative resolution of racemic acids and alcohols: Asymmetric hydrolysis, esterification, and transesterification.* Bitechnology and bioengineering, v. 26, p. 1449 - 1454, 1984.
- 50 - VIDALUC, J. L., BABOULENE, M., SPEZIALE, V., LATTES, A. *Optimization of the enzymatic synthesis of amino acid esters. Reaction in polyphasic medium.* Tetrahedron, v. 39, n. 2, p. 269 - 274, 1983.
- 51 - KLIBANOV, A. M., CAMBOU, B. *Preparative production of optically active esters and alcohols using esterase - catalyzed stereospecific transesterification in organic media.* J. Am. Chem. Soc., v. 106, p. 2687 - 2692, 1984.
- 52 - KLIBANOV, A. M., KIRCHNER, G., SCOLLAR, M. P. *Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents.* J. Am. Chem. Soc., v. 107, p. 7072 - 7076, 1985.
- 53 - LANGRAND, G. et al. *Lipase - catalyzed ester formation in organic solvents an easy preparative resolution of  $\alpha$  - substituted cyclo - hexanols.* T. Letters, v. 26, n. 15, p. 1857 - 1860, 1985.
- 54 - BIANCHI, D., CESTI, P., BATTISTEL, E. *Anhydrides as acylating agents in lipase - catalyzed stereoselective esterification of racemic alcohols.* J. Org. Chem., v. 53, p. 5531 - 5534, 1988.
- 55 - INADA, Y., KIKAWA, S., TAKAHASHI, K., KATADA, T. *Esterification of chiral secondary alcohols with fatty acid in organic solvents by polyethylene glycol - modified lipase.* Biochem. Int., v. 19, n. 5, p. 1125 - 1131, 1989.

- 56 - MORGAN, B., OEHLISCHLAGER, A. C., STOKES, T. M. *Enzyme reactions in apolar solvents. The resolution of branched and unbranched 2-alkanols by porcine pancreatic lipase.* Tetrahedron, v. 47, n. 9, p. 1611 - 1620, 1991.
- 57 - REESE, E. T., MANDEELS, M. *Enzyme action on partition chromatographic columns.* J. Am. Chem. Soc., v. 80, n. 17, p. 4625 - 4627, 1958.
- 58 - KISE, H., HAYAKAWA, A., NORITOMI, H. *Proteased - catalyzed synthetic reactions and immobilization - activation of the enzymes in hydrophilic organic solvents.* J. Biotechnology, v. 14, p. 239 - 254, 1990.
- 59 - POTTIE, M., EYCKEN, J. V., VANDEWALLE, M. *Enzymatic enantioselective hydrolysis of 2,2 - dimethyl - 1,3 - dioxolane - 4 - carboxylic esters.* T. Letters, v. 30, n. 39, p. 5319 - 5322, 1989.
- 60 - KALBÉ, J., HÖCKER, H., BERNDT, H. *Design of enzyme reactors as chromatographic columns for racemic resolution of amino acid esters.* Chromatographia, v. 28, n. 3/4, p. 193 - 196, 1989.
- 61 - TAKAHASHI, K., AJIMA, A., YOSHIMOTO, T., INADA, Y. et al. *Chemical reactions by polyethylene glycol modified enzymes in chlorinated hydrocarbons.* J. Org. Chem., v. 50, n. 18, p. 3414 - 3417, 1985.
- 62 - BEDNARKI, M. D., CHEMAULT, K. et al. *Membrane - enclosed enzymatic catalysis (MEEC): A useful, practical new method for the manipulation of enzymes in organic synthesis.* J. Am. Chem. Soc., v. 109, n. 4, p. 1283 - 1285, 1987.
- 63 - BARBARIC, S., LUISI, P. L. *Micellar solubilization of biopolymers in organic solvents. 5. Activity and conformation of  $\alpha$  - chymotrypsin in isooctane - AOT reverse micelles.* J. Am. Chem. Soc., v. 103, p. 4239 - 4244, 1981.
- 64 - MENGER, F. M., YAMADA, K. *Enzyme catalysis in water pools.* J. Am. Chem. Soc., v. 101, n. 22, p. 6731 - 6733, 1979.

- 65 - LUISI, P. L. *Enzymes hosted in reverse micelles in hydrocarbon solution.* Angew. Chem. Int. Ed. Engls., v. 24, n. 6, p. 439 - 450, 1985.
- 66 - LESER, M. E., LUISI, P. L. et al. *Applications of enzyme - containing reverse micelles.* J. Chimie Physique, v. 84, n. 9, p. 1113 - 1118, 1987.
- 67 - ATKINSON, P. J., GRIMSON, M. J. et al. *Structure of microemulsion - based organo - gel.* J. Chem. Soc. Chem. Commun., p. 1807 - 1809, 1989.
- 68 - MENGER, F. M. *Chemical collectivism.* Chemistry in Britain, p. 300 - 302, 1993.
- 69 - ROBINSON, B. H. *Microemulsions - properties and novel chemistry.* Chemistry in Britain, v.4, p. 342 - 344, 1990.
- 70 - HAERING, G., LUISI, P. L. *Hydrocarbon gels from water - in - oil microemulsions.* J. Phys. Chem., v. 90, p. 5892 - 5895, 1986.
- 71 - QUELLET, C., EICKE, H. F. *Some comments on the gelation of gelatin containing water / oil microemulsions.* J. Phys. Chem., v. 91, p. 4211 - 4212, 1987.
- 72 - REES, G. D., JENTA, T. R. J., NASCIMENTO, M. G. et al. *Use of water - in - oil microemulsions and gelatin - containing microemulsion based gels for lipase - catalysed ester synthesis in organic solvents.* Indian Journal of Chemistry, v. 32B, p. 30 - 34, 1993.
- 73 - REES, G. D., NASCIMENTO, M. G. et al. *Reverse enzyme synthesis in microemulsion - based organo - gels.* Biochimica et Biophysica Acta, v. 1073, p. 493 - 501, 1991.
- 74 - NASCIMENTO, M. G., REZENDE, M. C., VECCHIA, R. D., JESUS, P. C., AGUIAR, L. M. Z. *Enzyme - catalyzed esterifications in microemulsion - based organo - gels.* T. Letters, v. 33, n. 40, p. 5891 - 5894, 1992.

- 75 - LEHMAN, J. W. Operational organic chemistry. A laboratory course. 2nd ed, Allyn. L. Bacon. Inc., p 733 - 737.
- 76 - VOGEL, A. Textbook of practical organic chemistry. Fourt edition, Longman Inc., New York, EUA, 1978.
- 77 - Handbook of Chemistry and Physics, 64<sup>TH</sup> edition (1983 - 1984).