

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

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

**DETERMINAÇÃO DE COEFICIENTE DE DIFUSÃO DE ÉSTERES E
REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO CATALISADAS 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”

JAIR JUAREZ JOÃO

FLORIANÓPOLIS - SANTA CATARINA - BRASIL
DEZEMBRO DE 1994

DETERMINAÇÃO DE COEFICIENTE DE DIFUSÃO DE ÉSTERES E REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO CATALISADAS POR ENZIMAS IMOBILIZADAS EM ORGANO-GEL.

JAIR JUAREZ JOÃO

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

M. Graça Nascimento

PROF^a. MARIA DA GRAÇA NASCIMENTO, Dr^a

Orientadora

F. Faruk Nome

PROF. FARUK NOME, Dr.

Coordenador

BANCA EXAMINADORA:

M. Graça Nascimento

PROF^a. MARIA DA GRAÇA NASCIMENTO, Dr^a

[Signature]

PROF^o. VALDIR ROSA CORREA, Dr.

[Signature]

PROF^o. VALDIR SOLDI, Dr.

[Signature]

PROF^o. RICARDO JOSÉ NUNES, Dr.

Ao meu filho, Axiel Júnio João.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

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

Aa CNPQ pelo apoio financeiro e facilidades concedidas.

A professora Dr^a Maria da Graça Nascimento em especial, pela sua dedicação e amizade.

A Deus, pela força e pela luz nos momentos difíceis encontrados no decorrer deste trabalho.

RESUMO

Neste trabalho, foi estudado o grau de impedimento imposto pelas barreiras difusionais de ésteres quando estes passam do meio reacional para o gel e vice-versa, através de medidas do coeficiente de difusão (D), segundo o tratamento de Crooks. Foram obtidos valores do coeficiente de difusão (D) dos benzoatos de etila, n-butila, n-octila, n-cetila e sec-butila, em organo-gel formado pela adição de gelatina a uma microemulsão água-óleo (w/o) de Aerosol O-T em n-hexano (MBG). Como solvente externo, utilizou-se o n-hexano, ciclohexano, heptano, acetonitrila e 1,4-dioxano.

Estudou-se, também, a atividade catalítica de lipases imobilizadas em MBG na reação de transesterificação do octanoato de p-nitrofenila com álcoois alifáticos (n-pentanol, n-hexanol, n-octanol e 2-butanol) em acetonitrila e 1,4-dioxano como solvente externo à 25°C. Parâmetros tais como o número de átomos de carbono e ramificações na cadeia do álcool bem como o tipo de lipase utilizada, foram discutidos em termos da eficiência catalítica das enzimas imobilizadas em MBG. De maneira geral, os álcoois primários são mais reativos que os secundários, independente do solvente externo utilizado. Em todas as reações estudadas a C.V. lipase apresentou maior atividade catalítica que a lipase Microbial e Pseudomonas sp.

ABSTRACT

In this work, it was studied the hindrance degree imposed by the diffusional barriers of the esters, when they pass from the reactional media to the organo-gel and vice-versa; through measurements of diffusion coefficient (D) according to the Crook's treatment. It was obtained values of diffusion coefficient (D) for ethyl, n-butyl, n-octyl e n-cetyl and sec-butyl benzoates in a organo-gel formed by the addition of gelatin in a water-in-oil microemulsion (W/O) of Aerosol O-T in n-hexane (MBG). As external solvent it was used n-hexane, cyclohexane, heptane, acetonitrile and 1,4-dioxane.

The catalytic activity of *C.V. lipase* immobilized in MBG, was also studied in the transesterification reaction of p-nitrophenyl octanoate with aliphatic alcohols (n-pentanol, n-hexanol, n-octanol and 2-butanol) using acetonitrile and 1,4-dioxane as external solvent, at 25°C. Parameters such as carbon chain length and branching in the alcohols, as well as the activity of lipases from three different sources, were discussed in terms of the enzyme efficiency when immobilized in MBG. In general, primary alcohols were more reactive than the secondary one independent of the external solvent. In all studied reactions the catalytic efficiency of *C.V. lipase* was higher than *Microbial* and *Pseudomonas sp.*

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO-----	1
1.1.OBJETIVO E JUSTIFICATIVA-----	1
1.2. DIFUSÃO-----	2
1.2.1.Velocidade de Liberação de Drogas Controladas por Difusão-----	2
1.2.2. Determinação do Coeficiente de Difusão-----	3
1.3. ENZIMAS E SUAS APLICAÇÕES-----	6
1.3.1. Lipases-----	6
1.3.2. Sítio Ativo da Lipase-----	7
1.3.3. Especificidade das Enzimas-----	9
1.3.4. Enzimas em Síntese Orgânica-----	9
1.3.5. Catálise Enzimática-----	10

1.3.6. Enzimas em Organo-Gel : Modelos Propostos-----	14
1.3.7. Transesterificação Catalisada por Lipases-----	20
2. PARTE EXPERIMENTAL-----	23
2.1. MATERIAIS E MÉTODOS-----	23
2.1.1. Reagentes e Equipamentos-----	23
2.1.2. Enzimas Utilizadas-----	24
2.2. PREPARAÇÃO DO ORGANO-GEL-----	25
2.3. PREPARAÇÃO DA COLUNA DE DIFUSÃO-----	26
2.3.1. Medidas experimentais de coeficiente de difusão em organo-gel-----	28
2.4. ESTUDOS CINÉTICOS-----	30

2.5. REAÇÕES-----	31
2.5.1. Preparação dos Benzoatos de Alquila-----	31
2.5.2. Preparação do Meio Reacional Para as Reações de Transesterificação Via Catálise Enzimática-----	32
2.5.3. Isolamento do Produto Final da Reação de transesterificação do Octanoato de p-nitrofenila com o n-pentanol-----	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES-----	35
3.1. IDENTIFICAÇÃO DOS BENZOATOS DE ALQUILA-----	35
3.1.1. Caracterização dos Produtos-----	36
3.2. RESULTADOS DA MEDIDA DE COEFICIENTE DE DIFUSÃO-----	37
3.3. TRANSESTERIFICAÇÃO-----	51
3.3.1. Análise dos Resultados Obtidos das Reações de Transesterificação-----	59

3.3.2. Identificação do Octanoato de n-amila-----	62
4. CONCLUSÃO-----	64
4.1. Perspectivas para o Futuro-----	65
5. BIBLIOGRAFIA-----	68

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 - Estrutura do sítio ativo da lipase da *Mucor miehei* na presença do n-hexilclorofosfonato de etila -----8**
- Figura 2 - Representação geral de uma catálise enzimática atuando na quebra e formação de ligações covalentes-----10**
- Figura 3 - Representação da formação de um complexo ES, segundo a hipótese do modelo de Fischer-----11**
- Figura 4 - Representação de um encaixe induzido por uma alteração estrutural da proteína (segundo Koshland)-----12**
- Figura 5 - Representação das vias alternadas de reações para obter uma alteração de conformação induzida pelo substrato-----13**
- Figura 6 - Modelo proposto para a estrutura do organo-gel (Modelo da percolação)-----15**

Figura 7 - Modelo proposto para a estrutura do organo-gel (Modelo de rede de gelatina) -----	17
Figura 8 - Modelos propostos para a estrutura do organo-gel -----	19
Figura 9 - Tubo de vidro utilizado para medidas experimentais do coeficiente de difusão -----	27
Figura 10 - Procedimento experimental utilizado para medidas dos coeficientes de difusão (de ésteres aromáticos) em organo-gel de n-hexano -----	29
Figura 11- Fração difundida do benzoato de etila, em função da raiz quadrada do tempo em organo-gel de n-hexano utilizando como solvente externo n-hexano -----	43
Figura 12- Fração difundida do benzoato de n-butila, em função da raiz quadrada do tempo em organo-gel de n-hexano utilizando como solvente externo n-hexano -----	44
Figura 13- Fração difundida do benzoato de n-octila, em função da raiz quadrada do tempo em organo-gel de n-hexano utilizando como solvente externo n-hexano -----	45

- Figura 14- Fração difundida do benzoato de n-cetila, em função da raiz quadrada do tempo em organo-gel de n-hexano utilizando como solvente externo n-hexano-----46**
- Figura 15- Fração difundida do benzoato de sec-butila, em função da raiz quadrada do tempo em organo-gel de n-hexano utilizando como solvente externo n-hexano-----47**
- Figura 16- Espectro de infravermelho do octanoato de n-pentila em filme em cela de NaCl.-----66**
- Figura 17- Espectro de ^1H -RMN 200 MHz do octanoato de n-pentila utilizando TMS como referência interna e CDCl_3 como solvente-----67**

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidades de reagentes utilizados na preparação do organo-gel-----	25
Tabela 2 - Dados de rendimento, R_f, IV e índice de refração para os benzoatos de alquila-----	35
Tabela 3 - Medidas de absorbância dos benzoatos de alquila em função do tempo, em organo-gel de n-hexano, utilizando como solvente externo n-hexano-----	38
Tabela 4 - Medidas de absorbância dos benzoatos de alquila em função do tempo, em organo-gel de n-hexano, utilizando como solvente externo ciclohexano-----	39
Tabela 5 - Medidas de absorbância dos benzoatos de alquila em função do tempo, em organo-gel de n-hexano, utilizando como solvente externo heptano-----	40
Tabela 6 - Medidas de absorbância dos benzoatos de alquila em função do tempo, em organo-gel de n-hexano, utilizando como solvente externo acetonitrila-----	41

- Tabela 7 - Medidas de absorbância dos benzoatos de alquila em função do tempo, em organo-gel de n-hexano, utilizando como solvente externo 1,4-dioxano-----42**
- Tabela 8 - Valores de coeficiente de difusão (D) dos benzoatos de alquila em organo-gel de n-hexano em diferentes solventes-----48**
- Tabela 9 - Medidas de absorbância em função do tempo para a reação de transesterificação do octanoato de p-nitrofenila com diferentes álcoois alifáticos com a *C.V. lipase* imobilizada em organo-gel de n-hexano, utilizando como solvente externo a acetonitrila a 25°C-----52**
- Tabela 10 - Medidas de absorbância em função do tempo para a reação de transesterificação do octanoato de p-nitrofenila com diferentes álcoois alifáticos com a *lipase Pseudomona sp* imobilizada em organo-gel de n-hexano, utilizando como solvente externo a acetonitrila a 25°C-----53**

Tabela 11 - Medidas de absorbância em função do tempo para a reação de transesterificação do octanoato de p-nitrofenila com diferentes álcoois alifáticos com a *lipase Microbial* imobilizada em organo-gel de n-hexano, utilizando como solvente externo a acetonitrila a 25°C-----54

Tabela 12 - Medidas de absorbância em função do tempo para a reação de transesterificação do octanoato de p-nitrofenila com diferentes álcoois alifáticos com a *C.V. lipase* imobilizada em organo-gel de n-hexano, utilizando como solvente externo a 1,4-dioxano a 25°C-----55

Tabela 13 - Medidas de absorbância em função do tempo para a reação de transesterificação do octanoato de p-nitrofenila com diferentes álcoois alifáticos com a *lipase Pseudomona sp* imobilizada em organo-gel de n-hexano, utilizando como solvente externo a 1,4-dioxano a 25°C-----56

Tabela 14 - Medidas de absorbância em função do tempo para a reação de transesterificação do octanoato de p-nitrofenila com diferentes álcoois alifáticos com a *lipase Microbial* imobilizada em organo-gel de n-hexano, utilizando como solvente externo a 1,4-dioxano a 25°C-----57

Tabela 15 - Valores das constantes de velocidade observadas (kobs) para a reação de transesterificação entre o octanoato de p-nitrofenila com diferentes álcoois alifáticos, utilizando como solvente externo a acetonitrila e 1,4-dioxano a 25°C.-----58

Tabela 16 - Dados de rendimento, Rf, infravermelho (IV) e de ressonância magnética nuclear (¹H-RMN) do octanoato de n-pentila-----62

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1.1 - OBJETIVO E JUSTIFICATIVA

A busca de uma metodologia mais eficiente para a utilização de enzimas em síntese orgânica levou a uma busca incessante de um sistema que melhor se adaptasse às condições sintéticas desejadas. A imobilização de enzimas em organo-gel é um exemplo da aplicação da catálise enzimática em reações sintéticas envolvendo solventes orgânicos.

O organo-gel é formado pela adição de gelatina a uma microemulsão água-óleo formada por um surfactante aniônico (por exemplo, o Aerosol O-T) e um solvente apolar, tal como o n-hexano (MBG). Verificou-se que quando este sistema é utilizado para imobilizar enzimas com a finalidade de efetuar reações de esterificação, há um grande efeito do solvente no rendimento dos ésteres formados.⁽¹⁾ Estas evidências sugeriram que a velocidade de difusão do substrato depende do meio reacional.

Na tentativa de quantificar o grau de impedimento imposto pelas barreiras difusionais encontradas pelos ésteres quando estes passam do meio reacional para o gel e vice-versa, pretende-se determinar os coeficientes de difusão para o sistema organo-gel (MBG). Utilizou-se para este propósito a técnica desenvolvida por Crooks para determinar o coeficiente de difusão do azul de bromofenol em gel de agar.⁽²⁾

Um outro objetivo do presente estudo é o de fazer a imobilização de várias lipases (por exemplo, *Chromobacterium Viscosum lipase*, *lipase Microbial* e *lipase Pseudomonas sp*) em organo-géis (MBG) para estudar reações de transesterificação. Estas reações podem ser representadas, de maneira geral, através da equação 1.



Será utilizado o octanoato de p-nitrofenila e diferentes álcoois alifáticos, tais como o n-pentanol, n-hexanol, n-octanol e 2-butanol. Os dados obtidos nos permitirão avaliar atividade das enzimas imobilizadas em MBG, nesta reação de transesterificação.

1.2- DIFUSÃO

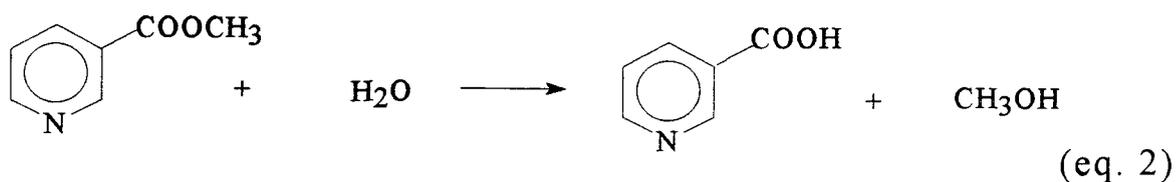
Difusão significa o movimento de uma partícula para, ao acaso, colidir com outras partículas e é um fenômeno físico-químico de grande importância prática e teórica. A difusão pode ser responsável pelas alterações ocorridas nas velocidades de muitas reações químicas, constituindo um processo espontâneo de transporte de massa num sistema físico-químico, por efeito do gradiente de concentração.

1.2.1 - VELOCIDADE DE LIBERAÇÃO DE DROGAS CONTROLADAS POR DIFUSÃO

Durante os últimos anos vários trabalhos foram concentrados no desenvolvimento de uma técnica para controlar o desprendimento de drogas nos organismos vivos em quantidades desejadas.⁽³⁻⁴⁾ Assim, tais drogas desprendidas fornecem um sistema em que a velocidade de liberação é controlada e determinada de acordo com as quantidades desejadas, ficando assim, insensível às variações biológicas.

Uma das técnicas mais bem sucedidas e de grande importância no procedimento para uma forma correta de dosagem foi o uso do processo de difusão para a determinação da velocidade de desprendimento da droga.⁽⁵⁾

Muitas reações químicas biológicas ou de interesse industrial podem ser controladas por difusão, sendo que estas envolvem um transporte de massa de um determinado substrato por efeito de um gradiente de concentração.⁽⁶⁾ Por exemplo, a reação de hidrólise do nicotinato de metila foi estudada em sistema bifásico (água e tetracloreto de carbono) e a sua velocidade foi controlada pelo transporte do substrato até a interface, por difusão, obtendo-se assim o ácido nicotínico e o metanol (equação 2).



A encapsulação de agentes farmacologicamente ativos dentro de uma cápsula de gel "softgel", pode oferecer uma melhor adsorção e maior biodisponibilidade da droga.

Durante muitos anos a indústria vem utilizando para a encapsulação de drogas gel de gelatina (softgel). Alguns produtos farmacêuticos tais como a Nifedina, Ciclosporina e Termazepam já tiveram uma boa aceitação no mercado, quando encapsuladas em gel.

Essencialmente um "softgel" fornece uma solução ou suspensão da droga dentro da cápsula do gel. Através da ruptura da cápsula no gastrointestinal, o conteúdo interno se espalha livremente. Drogas solubilizadas em "softgel" podem ter uma velocidade de adsorção superior e ser de grande biodisponibilidade se compararmos com a forma de dosagem tradicional.⁽⁷⁾

1.2.2 - DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE DIFUSÃO

Uma das maiores dificuldades, é a de se encontrar uma técnica experimental apropriada para a determinação do coeficiente de difusão, considerando-se que este processo é lento e requer muito tempo experimental.

Em 1976, Moskovits e Darewlany⁽⁸⁾ descreveram um trabalho que relata um experimento no qual uma solução concentrada foi colocada no interior de uma bolsa de diálise. A bolsa foi suspensa em um grande volume de solvente, com agitação lenta. Com o passar do tempo eles observaram um aumento na concentração do soluto, no solvente ao qual a bolsa de diálise estava exposta. Com estes dados eles determinaram o coeficiente de difusão. A desvantagem deste experimento é que a quantidade medida não é o coeficiente de difusão simples, mas o coeficiente de permeabilidade da membrana de diálise. Assim não é possível comparar estes dados com os da literatura.

Em 1980, Irina⁽⁹⁾ relatou uma metodologia experimental, usando um espectrofotômetro e um calorímetro para a determinação do coeficiente de difusão de vários sais (KNO_3 , AgNO_3 , LiNO_3 e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) em água.

A difusão dos cristais em água foi acompanhada através da absorção máxima dos sais. A maior desvantagem deste método é a demora na realização do experimento, que requer cerca de 40 horas, desde o início até o término do processo.

No mesmo ano, Clifford⁽¹⁰⁾ descreveu uma técnica de medidas de coeficiente de difusão em uma cela construída na forma de "Y", com uma torneira central contendo no interior uma solução de sacarose, que difundia-se em contato com o solvente. Posteriormente este solvente era analisado. Este método pode ser considerado preciso, mas requer algumas habilidades manuais e várias horas para mostrar o progresso de difusão com o tempo.

Posteriormente, Crooks⁽²⁾ desenvolveu uma metodologia para determinar o coeficiente de difusão do azul do bromofenol em gel de ágar. A difusão de uma substância altamente colorida como o azul de bromofenol pode ser acompanhada espectrofotometricamente e dados mais efetivos são observados visualmente. Neste experimento um grama de ágar foi aquecido e dissolvido em uma solução de aproximadamente 35 mg de azul de bromofenol em 50 mL de água. O gel, após alguns minutos de agitação, mas ainda no estado líquido, foi colocado em um tubo com aproximadamente 10 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro, preparado para retê-lo. O tubo contendo o gel foi então colocado num suporte que permitia que este fosse introduzido no interior de um becker de 250 mL, contendo 150 mL de água com o solvente. O tubo permaneceu suspenso a aproximadamente 2 cm do fundo do becker. O solvente do becker foi mantido vigorosa e constantemente sob agitação. Amostras do solvente foram retiradas a intervalos de tempo determinados e foram feitas as leituras de absorbância a 590 nm, que é a região de absorção máxima do azul de bromofenol.

Os valores de absorbância foram tratados matematicamente de acordo com a equação 3.

$$M_t/M_o = (A_t/A_o) (V_t^f/ V_t^i) (V_o^i/ V_o^f) \quad (\text{eq. 3})$$

onde:

Mt/M_0 = fração do soluto difundido no tempo t .

A_t = absorvância no tempo t

A_0 = absorvância da solução do substrato para determinar A_0 .

V_t^i = volume inicial da solução do substrato no gel.

V_t^f = volume final da solução do substrato (volume do solvente no becker)

V_0^i = volume inicial da solução do substrato para determinar A_0 .

V_0^f = volume final da solução do substrato para determinar A_0 .

Os resultados dos cálculos, utilizando a equação 3 foram então representados graficamente nas curvas por Mt/M_0 em função de $t^{1/2}$, que respeitam a equação 4:

$$Mt/M_0 = 2(Dt/\pi L^2)^{1/2} \quad (\text{eq. 4})$$

onde:

D = Coeficiente de difusão

L = comprimento do gel no cilindro

Aplicou-se uma regressão linear de primeira ordem na equação 4 e obteve-se o coeficiente de difusão do azul de bromofenol.

Neste trabalho determinou-se o coeficiente de difusão de benzoatos de alquila em organo-gel, (**MBG**), utilizando a técnica descrita acima.

Os valores de coeficiente de difusão, podem estar relacionados com o grau de interferência provocado pelos substratos (benzoatos de alquila) e pelos solventes na estrutura do organo-gel.

1.3 - ENZIMAS E SUAS APLICAÇÕES

Como foi citado anteriormente, neste trabalho, serão utilizadas enzimas como biocatalisadores em reação de transesterificação. A enzima utilizada será a lipase, uma esterase. Portanto, far-se-á uma breve descrição de lipases, sua aplicação em síntese orgânica e alguns métodos de imobilização.

1.3.1 - LIPASES

Enzimas são biocatalisadores que atuam sob condições suaves de reações e com grande eficiência catalítica.

A lipase é uma hidrolase que hidrolisa triacilglicerídeos em ácidos graxos livres e glicerol. Esta enzima possui peso molecular entre 40 a 50 Kda, com cerca de 300 resíduos de aminoácidos. A lipase é uma glicoproteína na qual a parte glicosilada hidrofílica é posicionada opostamente à região hidrofóbica que circunda o sítio ativo.⁽¹¹⁾

As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica devido à versatilidade catalítica, disponibilidade comercial, baixo custo e não requerem a utilização de cofatores.⁽¹²⁾ Elas são estáveis em solvente orgânico e tem grande habilidade de assumir diversas conformações para acomodar substratos de vários tamanhos. Portanto, compostos que são instáveis em meio aquoso (anidridos, compostos halogenados etc.), podem ser usados como substratos em meio não aquoso.⁽¹³⁾

1.3.2 - SÍTIO ATIVO DA LIPASE

Brady⁽¹⁴⁾, através de cristalografia de raios-x, determinou a estrutura da lipase proveniente do fungo *Mucor miehei*. Esta lipase apresenta um centro catalítico composto de três aminoácidos (Ser 144, His 257 e Asp 203) que está localizado perto da superfície da molécula da proteína, mas não está completamente exposto ao solvente.

O centro ativo está coberto por um segmento espiral curto da molécula como se fosse uma tampa (Figura 1).

As lipases apresentam uma característica catalítica comum: o envolvimento de uma interface lipídio-água em seu processo catalítico.

A atividade das lipases é 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.⁽¹⁵⁾

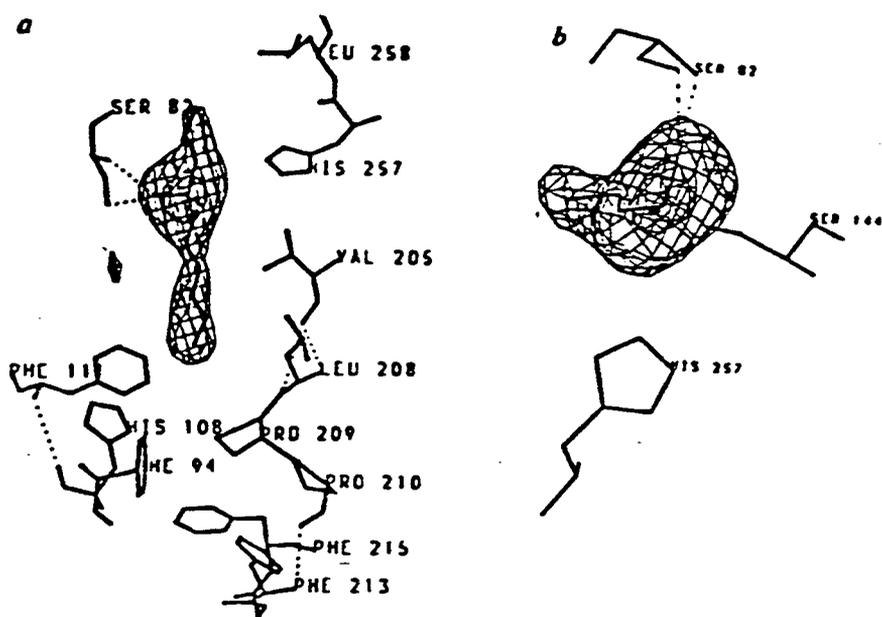


Figura 1 - Estrutura do sítio ativo da lipase da *Mucor miehei* na presença do N-hexilclorofosfonato de etila. (a) sítio ativo completo e inibidor; (b) secção transversal mostrando apenas a alteração do inibidor com Ser 82, Ser 144 e His 257.

1.3.3 - ESPECIFICIDADE DAS ENZIMAS

A especificidade das enzimas é a característica mais importante para a exploração e uso em síntese orgânica. A capacidade com que as enzimas discriminam entre as características estruturais e estereoquímicas de seus substratos determina sua atividade sintética.⁽¹⁶⁾

A utilização de enzimas para aplicações em síntese orgânica depende da sua aceitação por vários tipos de substratos, enquanto retêm a sua habilidade para operar estereoespecificamente nas diversas reações químicas. Uma quantidade razoável de enzimas satisfaz estas características, e geralmente as de mamíferos preenchem melhor tais critérios.

1.3.4 - ENZIMAS EM SÍNTESE ORGÂNICA

Em 1977, Klibanov⁽¹⁷⁾ utilizou enzimas em sistema bifásico composto por água e solvente orgânico imiscível em água, admitindo que enzimas tem um imenso potencial como catalisadores. Apesar disso, os químicos orgânicos ainda não aceitam muito usar enzimas em seus métodos sintéticos pelas seguintes razões:

- As reações enzimáticas são geralmente conduzidas em meio aquoso, porque este meio (solvente) é ótimo para manter a conformação catalítica da enzima;
- A água muitas vezes promove reversibilidade de reações e decompõe vários reagentes (por ex. anidridos e compostos halogenados);
- Muitos compostos de interesse para química orgânica são insolúveis em água, meio no qual as enzimas são encontradas na natureza e possuem alta solubilidade e atividade;
- O equilíbrio termodinâmico de muitos processos é desfavorável em água (ex. reações de esterificação, transesterificação e amidação).

Quando a água é substituída por um solvente apolar, a enzima tende a se reorganizar, implicando em mudança conformacional e, conseqüentemente o seu poder catalítico é reduzido.

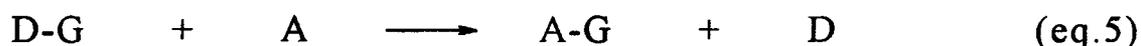
A verificação de que as enzimas podem funcionar em meio não aquoso tem eliminado muitas dúvidas sobre o uso destas como catalisadores.

A especificidade do substrato frente a enzimas pode ser controlada pelo solvente.⁽¹⁸⁾

Recentemente, lipases tem sido imobilizadas em géis e utilizadas em síntese. Uma grande variedade de ésteres estruturalmente diferentes, foram sintetizados em escala preparativa.⁽¹⁾

1.3.5 - CATÁLISE ENZIMÁTICA

Grande parte das reações catalisadas por enzimas envolvem a quebra ou formação de ligações covalentes. Consideremos por exemplo a equação abaixo (equação 5)



onde 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, sendo melhor representada pela figura abaixo (Figura 2).

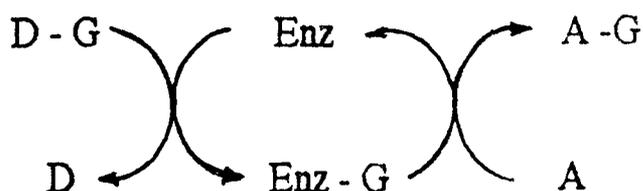


Figura 2 - Representação geral de uma catálise enzimática atuando na quebra e formação de ligações covalentes.

Sendo assim, a enzima é um reagente que se combina com o substrato, formando um complexo enzima-substrato (**Enz-S**)⁽¹⁹⁾ e que posteriormente se decompõe para formar um produto **P**, e a enzima livre (equação 6).



Dois modelos explicam a catálise enzimática. O modelo de sítio catalítico, proposto por Emil Fischer⁽¹⁹⁾, mostra a interação entre o substrato e a enzima por analogia com um conjunto "chave-fechadura" e ainda é útil para a compreensão de certas propriedades enzimáticas (Figura 3).

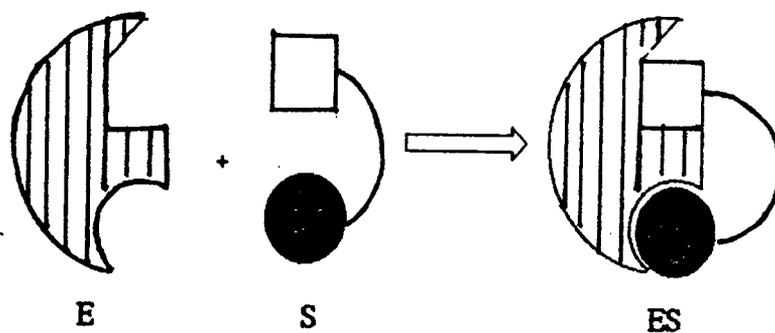


Figura 3- Representação da formação de um complexo ES segundo a hipótese do modelo de Fischer.

O modelo do "encaixe induzido" de Koshland⁽¹⁹⁾ 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 uma mudança conformacional na enzima (Figura 4).

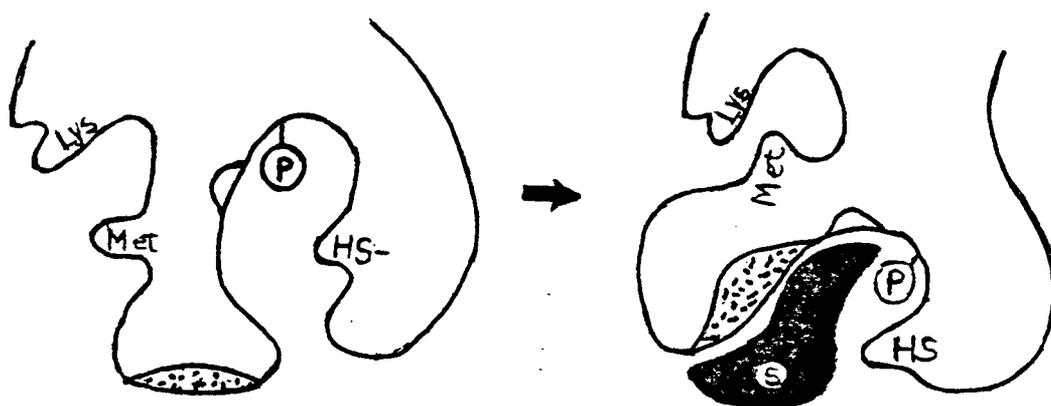


Figura 4- Representação de um encaixe induzido por uma alteração estrutural da proteína (segundo Koshland).

1.3.6 - ENZIMAS EM ORGANO-GEL : MODELOS PROPOSTOS

Em 1986, Haering e Luise⁽²⁰⁾ trabalhando na investigação da solubilização de gelatina em micelas reversas, depararam-se com um fato que marcou o início de uma nova metodologia para imobilização de enzimas. O objetivo dos autores neste trabalho era de investigar de que forma o meio micelar poderia alterar o comportamento gelificante da gelatina. A esperança dos autores era de que ocorresse a formação do gel dentro das micelas. Porém ocorreu algo completamente diferente: toda solução micelar tornou-se gel. O fenômeno de gelificação mostrou-se reversível, isto é, acima de 40°C o gel se liquefaz e esta solução pode ser transformada em gel novamente, tendo-se o cuidado de agitá-lo durante o resfriamento, caso contrário ocorre a separação de fase.

Os autores descreveram ainda a preparação do organo-gel, que consiste basicamente em adicionar a gelatina à uma solução micelar numa faixa de temperatura de 40°C a 45°C e agitar até esfriar. Um aspecto que intrigou os pesquisadores foi que a gelificação não ocorreu em todas as concentrações de gelatina e/ou água. A gelatina deve se encontrar em quantidade ligeiramente acima da sua solubilidade máxima.

Haering e Luise⁽¹⁸⁾ ficaram impressionados com o fenômeno de gelificação da solução, que consistia em mais de 80% de solvente orgânico, e descreveram uma hipótese para explicar o fato. Assumindo que a gelatina é hidrossolúvel, a mesma ficaria inicialmente confinada no interior das micelas. Como a concentração de surfactante (AOT) é relativamente alta, a distância entre as micelas da microemulsão é pequena. Eles então assumiram que existia um contato intermicelar e a percolação da gelatina, já que esta se encontra em excesso na solução. As moléculas de gelatina ligariam uma micela a outra. Inicialmente, isto ocorre de maneira dinâmica e após a gelificação da gelatina na microfase aquosa todo o sistema ficaria rígido. A transição parece ser muito complexa, por necessitar de agitação constante para a formação do gel. Os autores também sugeriram que este sistema pode ser utilizado para imobilização de enzimas.

Quellet e Heicke⁽²¹⁾ estudaram o mesmo sistema e descreveram o processo de gelificação em três etapas. Primeiramente, a gelatina se dissolveria no interior aquoso da micela e formaria o que denominaram de

"nanogel". Num passo intermediário, haveria a percolação das nanofases e uma enorme aglomeração de nanofases seria formada. Finalmente ocorreria a transição sol-gel, envolvendo as nanofases interconectadas por pontes de hélices tipo colágeno. Quillet e colaboradores reafirmaram esta estrutura em 1987⁽²²⁾, 1989⁽²³⁾, 1990⁽²⁴⁾ e 1991.⁽²⁵⁾ (Figura 6)

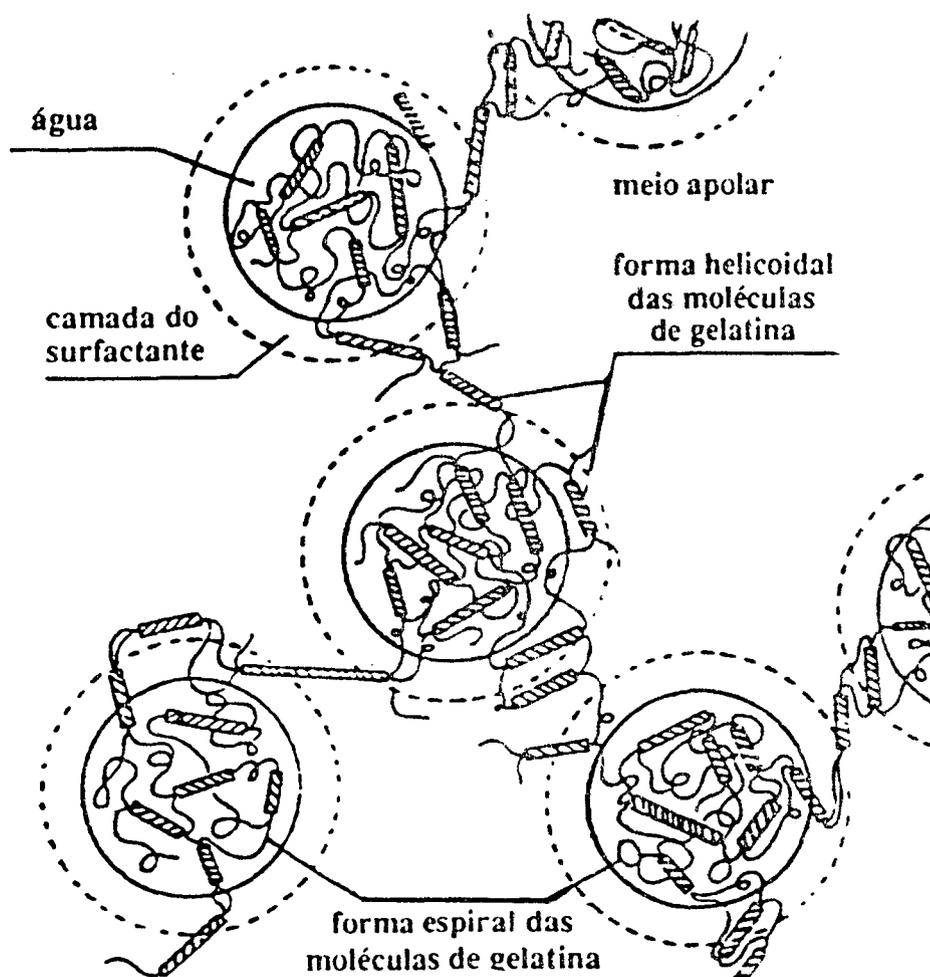


Figura 6- Modelo proposto para a estrutura do organo-gel (Modelo da percolação).

Atkinson e colaboradores⁽²⁶⁾, através de medidas de condutividade e espalhamento de nêutrons, propuseram uma estrutura em que a gelatina, que possui propriedades tensoativas, tem um papel interfacial junto com o AOT. Atkinson não acreditava que a gelatina entrasse em contato com a fase oleosa, como seria requerido para ligar as micelas no modelo de Quillet. Ele sugeriu que o excesso de água e surfactante podem coexistir na forma de micelas em equilíbrio dinâmico com a rede hidratada de gelatina.

Em 1989, o mesmo grupo de pesquisadores⁽²⁷⁾ publicou resultados adicionais na área e concluiu que ocorre uma mudança na microestrutura da microemulsão quando a mesma é gelificada. Isto é, ocorre a formação de uma extensa rede de canais de gelatina e água rodeada por uma camada de surfactante e que esta estrutura estaria em equilíbrio com as gotas da solução micelar (Figura 7). Atkinson e colaboradores reafirmaram esta estrutura em publicações posteriores.⁽²⁸⁾

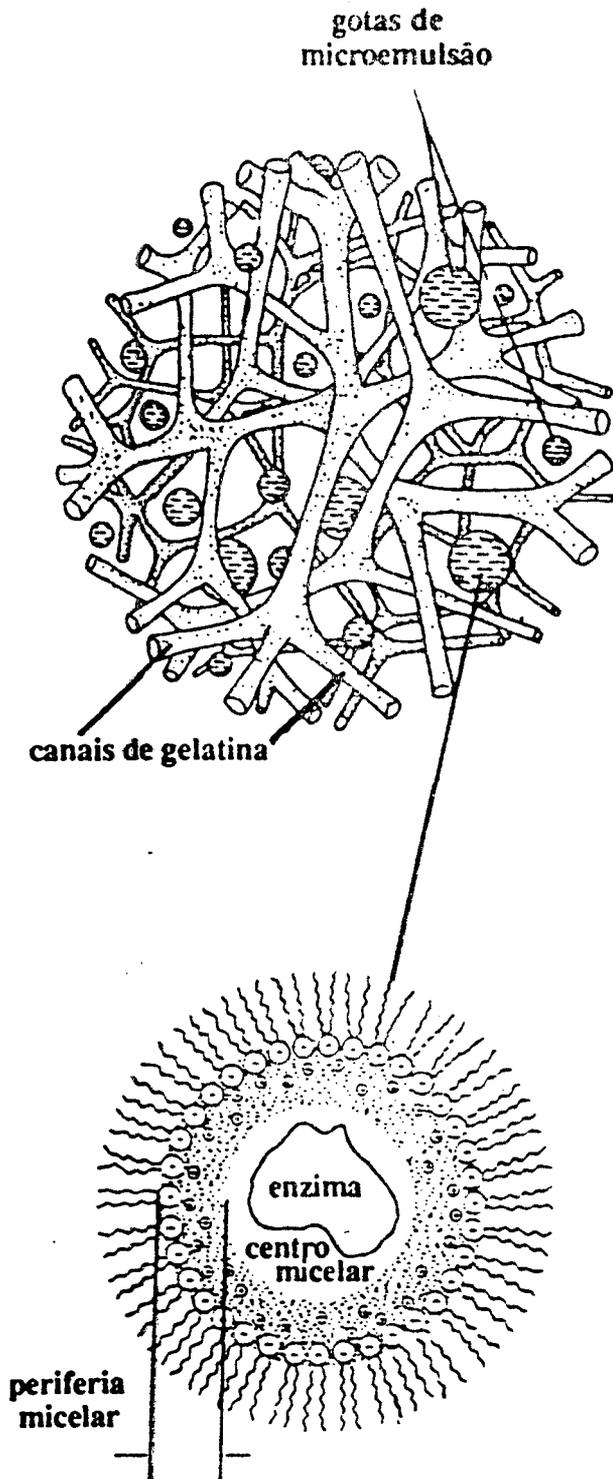


Figura 7- Modelo proposto para a estrutura do organo-gel (Modelo de rede de gelatina).

Os trabalhos mais recentes sobre a estrutura do organo-gel foram publicados por Petit.⁽²⁹⁻³⁰⁾ Estes trabalhos analisaram os três modelos para a estrutura do organo-gel (Figura 8).

Seus resultados foram os seguintes:

a) **Modelo da Estrutura Cilíndrica** (modelo de Luise e colaboradores): Este modelo é composto de uma microestrutura de moléculas de gelatina agregadas em uma rede rígida rodeada por água e AOT (Figura-8a). Para os proponentes deste modelo, a estrutura da gelatina é essencialmente conservada na água, cujo papel é hidratar a gelatina. Os cilindros conectados à gelatina são subsequenteiramente rodeados. Este modelo é consistente com os valores de condutância elétrica, mas não permite uma explicação para separação de fases observada no digrama de fase.

b) **Modelo da Estrutura Cilíndrica e Micelas Reversas** (modelo de Atkinson e colaboradores): Neste modelo a rede de gelatina e as micelas reversas são independentes (Figura-8b). As micelas esféricas de AOT são fixadas pela rede de gelatina protegidas pelo surfactante, independentemente das suas posições, como se estas não fossem conectadas pelos centros que contêm a água. As partes hidrofílicas da gelatina são cobertas pelo AOT. Este modelo permite explicar a forma do diagrama de fases, mas não prediz a percolação elétrica.

c) **Modelos das Micelas Reversas Interconectadas por Canais de Gelatina** (modelo da percolação de Quillet e colaboradores): Este modelo é composto de micelas contendo água e parte de gelatina. As micelas reversas de AOT são conectadas pela gelatina, sendo arranjadas em cordões helicoidais. Entretanto, elas não são cobertas pelo surfactante (Figura-8c). Para o sistema de micelas interconectadas, a estrutura das micelas e as características do sistema água/AOT/solvente são retidas durante todo o processo de gelificação.

Segundo Petit, todas estas estruturas podem a princípio existir em uma parte do diagrama de fase. Os espectros de espalhamento de raios-x (sensível para gelatina e água) e os espectros de nêutrons sensíveis somente ao centro aquosa da micela, são consistentes com os modelos

acima referidos. Entretanto, os espectros são quantitativamente diferentes, apesar de serem qualitativamente similares.

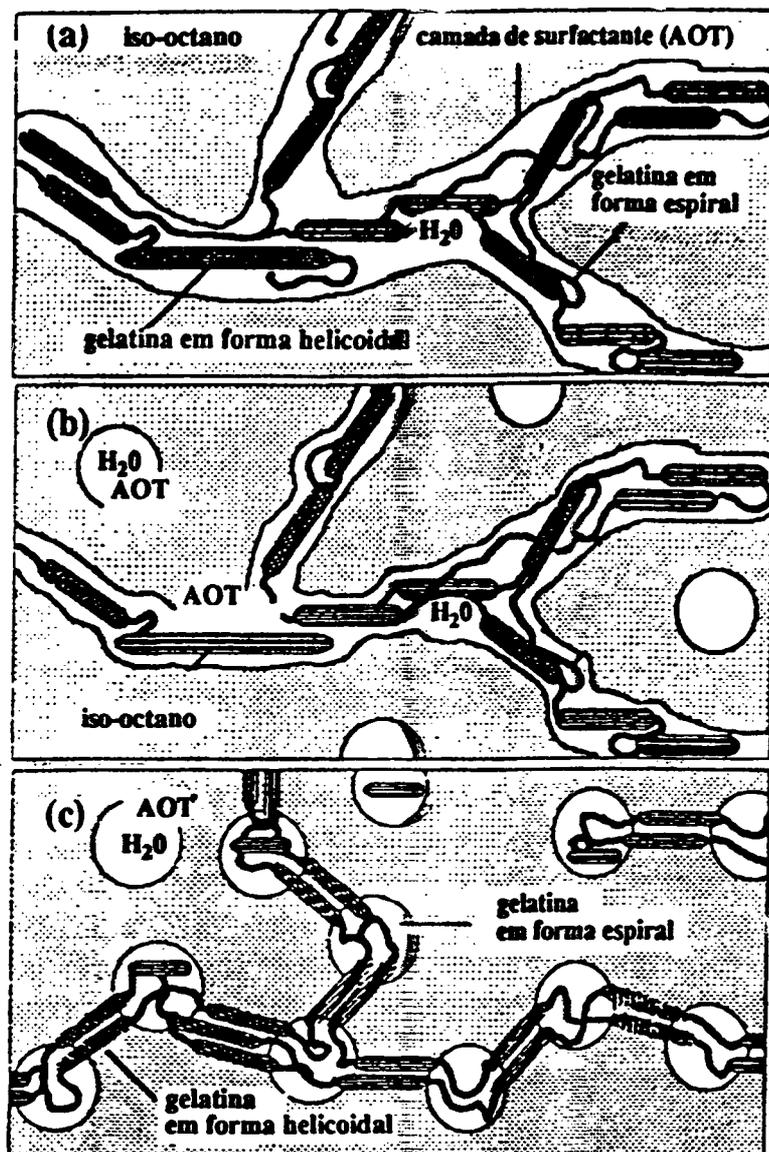


Figura 8. Modelos propostos para a estrutura do organo-gel: (a) Modelo da estrutura cilíndrica; (b) Modelo da estrutura cilíndrica em micelas reversas; (c) Modelo das micelas reversas interconectadas pelos canais de gelatina.

De qualquer forma, independentemente do modelo adotado, as principais características do sistema de organo-gel que se configuram como vantagens, são as seguintes:

- Constitui uma solução micelar sólida, transparente , possuindo todas as vantagens do sistema de micelas reversas;
- É insolúvel em solventes hidrocarbônicos (por exemplo, n-hexano, heptano, n-octano, iso-octano, etc.);
- Pode ser utilizado para imobilizar enzimas (por exemplo, esterases, hidrolases).

1.3.7 - TRANSESTERIFICAÇÃO CATALISADA POR LIPASES

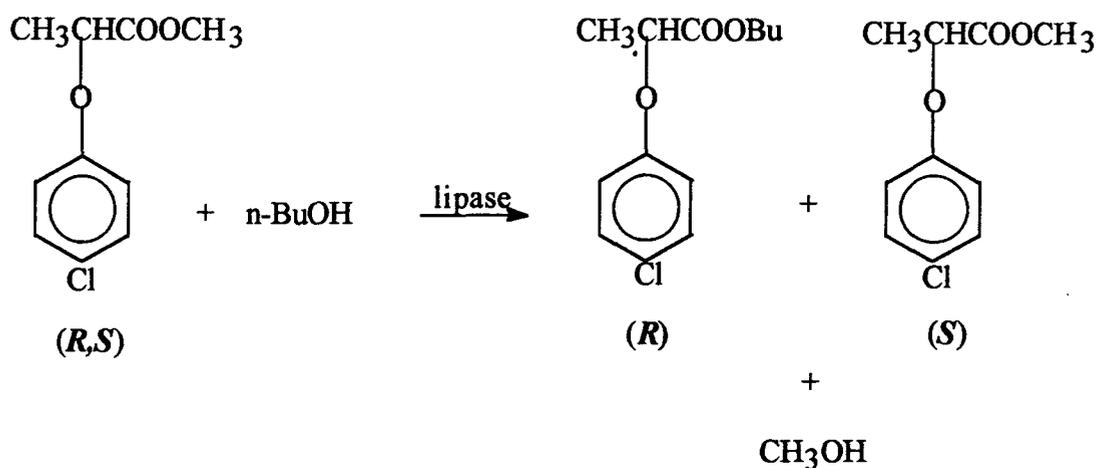
Durante os últimos anos, foi bem explorada a utilização de enzimas em solventes orgânicos nas reações de esterificação e transesterificação.⁽³¹⁻³²⁾ A imobilização é uma técnica muito importante na aplicação de enzimas como catalisadores nas reações de síntese em solventes orgânicos.⁽³³⁾

Atualmente, a aplicação de enzimas em transformações orgânicas de laboratório está num processo de crescente importância e em rápida expansão. A aplicação das enzimas em reações mais complexas está ligada a três aspectos principais:

- I) As enzimas são extremamente versáteis e catalisam um largo espectro de reações;
- II) As enzimas podem ser catalisadores altamente eficientes (velocidade cerca de 10^{12} vezes mais rápidas do que as reações não catalisadas);
- III) As enzimas são geralmente muito seletivas, em termos dos tipos de reações catalisadas, e com respeito a estrutura e estereoquímica do substrato e do produto.

Reações de esterificação e transesterificação catalisadas por lipases em solventes orgânicos são mais seletivas que as correspondentes reações hidrolíticas em água.⁽³⁴⁾

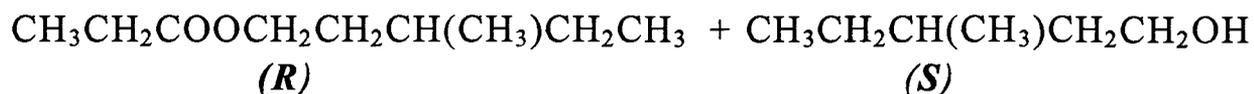
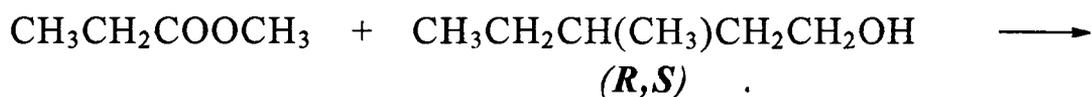
A resolução de álcoois racêmicos pode ser realizada explorando a habilidade de lipases imobilizadas para promover a esterificação ou transesterificação.⁽³⁵⁻³⁶⁾ Por exemplo, estudou-se a reação de transesterificação do (*R,S*) 2-(*p*-clorofenóxi)propionato de metila com o *n*-butanol, catalisada por lipase, e obteve-se o trans éster *R*, com pureza óptica de 97% e o *S* metil éster, com pureza óptica de 96% (equação 7).



(eq.7)

Em 1984, Klibanov e Cambou⁽³⁷⁾ desenvolveram uma metodologia para resolução de álcoois racêmicos através de reações de transesterificação catalisada por lipases de *cândida cilindrícea* e *carboxil esterease do fígado de porco*, em sistema bifásico.

Por exemplo, estudou-se a reação de transesterificação do acetato de etila com álcoois racêmicos tal como o (*R,S*) 3-metil-pentanol-1 em sistema bifásico formado por água e solvente orgânica imiscível em água (octano, ciclohexano), e obteve-se apenas o trans éster *R* e o álcool *S*, com pureza óptica de 97%. Eles utilizaram como suporte poroso a sefarose e o cromasorbe, aos quais eram adicionados uma solução enzimática (equação 8).



(eq.8)

CAPÍTULO 2 - PARTE EXPERIMENTAL

2.1 - MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo apresentaremos, em detalhes, os experimentos realizados na investigação dos tópicos do nosso interesse. O procedimento experimental é apresentado obedecendo a seguinte ordem:

- materiais, reagentes, solventes e equipamentos;
- preparação da coluna de difusão e a preparação do organo-gel;
- preparação dos benzoatos de alquila e do meio reacional para a reação de transesterificação;
- estudo da reação de transesterificação, catalisada por lipases, do octanoato de p-nitrofenila com álcoois alifáticos em organo-gel.

2.1.1 - REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Os ésteres (benzoatos de alquila) foram preparados e caracterizados de acordo com procedimento descritos na literatura e serão descritos posteriormente no item 2.5.1. Os álcoois etílico, n-butílico, cetílico, n-octílico e sec-butílico, foram fornecidos pela Merck e o ácido benzóico pela Vetec.

Os solventes heptano, ciclohexano e 1,4-dioxano foram fornecidos pela Merck, a acetonitrila e o n-hexano pela Vetec.

O Aerosol O-T e a gelatina em pó (tipo A : Bloom 300) foram fornecidos pela Sigma; a sílica gel 60 para cromatografia em coluna foi fornecida pela Merck; a sílica gel para cromatografia em placa foi fornecida pela Vetec bem como o sulfato de magnésio, bicarbonato de sódio e cloreto de cálcio. Os demais reagentes de foram de pureza analítica.

A difusão dos ésteres (benzoatos de alquila) em sistema de organogel foi acompanhada em um espectrofotômetro UV/VIS, marca Beckman DU-65.

Os produtos de esterificação e transesterificação foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho utilizando um aparelho Perkin Elmer Modelo 781, e por ^1H R.M.N., utilizando um espectrofotômetro Varian EM-360L 60 MHz ou um Bruker 200 MHz, com TMS como referência interna.

Os índices de refração foram obtidos com um refratômetro da Carl Zeiss Jena, a 20°C.

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

2.1.2 - 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.
- *Chromobacterium Viscosum (C.V.) lipase*, fornecida pela Genzyme Biochemicals Ltd (Inglaterra). Atividade específica de 3970 unidades/ mg de proteína.
- *Lipase Microbial*, fornecida pela Genzyme Biochemicals Ltd (Inglaterra). Atividade específica 1600 unidades/mg de proteína

2.2 - PREPARAÇÃO DO ORGANO-GEL

O organo-gel (MBG) foi preparado pela adição de uma solução de gelatina em água a 55°C à uma segunda solução de Aerosol O-T em n-hexano, também a 55°C. A mistura foi então agitada rigorosamente e deixada esfriar a temperatura ambiente para dar um gel rígido e estável. Para o aquecimento das soluções utilizou-se um banho termostatizado (Polyscience Series 9500).

A microemulsão água-óleo contendo a enzima foi preparada injetando-se com o auxílio de uma microseringa 0,25 mL de uma solução aquosa de enzima na solução de AOT.

As soluções de gelatina e de AOT com enzima foram termostatizadas a 55°C, misturadas e agitadas fortemente até o esfriamento.

As quantidades de reagentes utilizados nos experimentos realizados neste trabalho estão mostradas na Tabela 1.

Tabela 1- Quantidades de reagentes utilizados na preparação do organo-gel

organo-gel	Qtidade de gelatina(g)	Qtidade de água(mL)	Qtidade de AOT 0,5M (mL)	solvente n-hexano (mL)
com enzima ^(a)	1,40	2,15	4,00	2,20
controle	1,40	2,40	4,00	2,20

(a) a concentração da solução de lipases (*C.V.lipase, Pseudomonas sp e Microbial*) foi 10 mg/mL.

2.3 - PREPARAÇÃO DA COLUNA DE DIFUSÃO

Os ésteres (benzoatos de alquila) de concentração inicial 0,1M foram dissolvidos no solvente n-hexano que foi adicionado para fazer o gel (preparado de acordo com procedimento descrito no item 2.2). A concentração final dos ésteres no organo-gel foi de 0,01M.

Os espectros de absorção foram obtidos em um espectrofotômetro UV/VIS Beckman DU-65.

Para medir os coeficientes de difusão foram utilizados tubos de paredes grossas e sem fundo com aproximadamente 13 cm de comprimento e 1,9 cm de diâmetro, apropriados para reter o gel, conforme a Figura 9.

O organo-gel, após alguns minutos de agitação, mas ainda no "estado líquido", foi colocado no tubo citado acima, que tinha sido previamente colocado na posição vertical sobre uma pequena placa de petri.

A quantidade de gel preparado (aproximadamente 40 mL) foi suficiente para preencher aproximadamente 10 cm do tubo.

Em seguida, selou-se com parafilme a abertura superior do tubo para evitar a evaporação do solvente, e este foi deixado esfriar a temperatura ambiente. Posteriormente colocou-se na geladeira e após o gel estar totalmente congelado, procedeu-se a leitura do coeficiente de difusão conforme descrito no item 2.3.1.

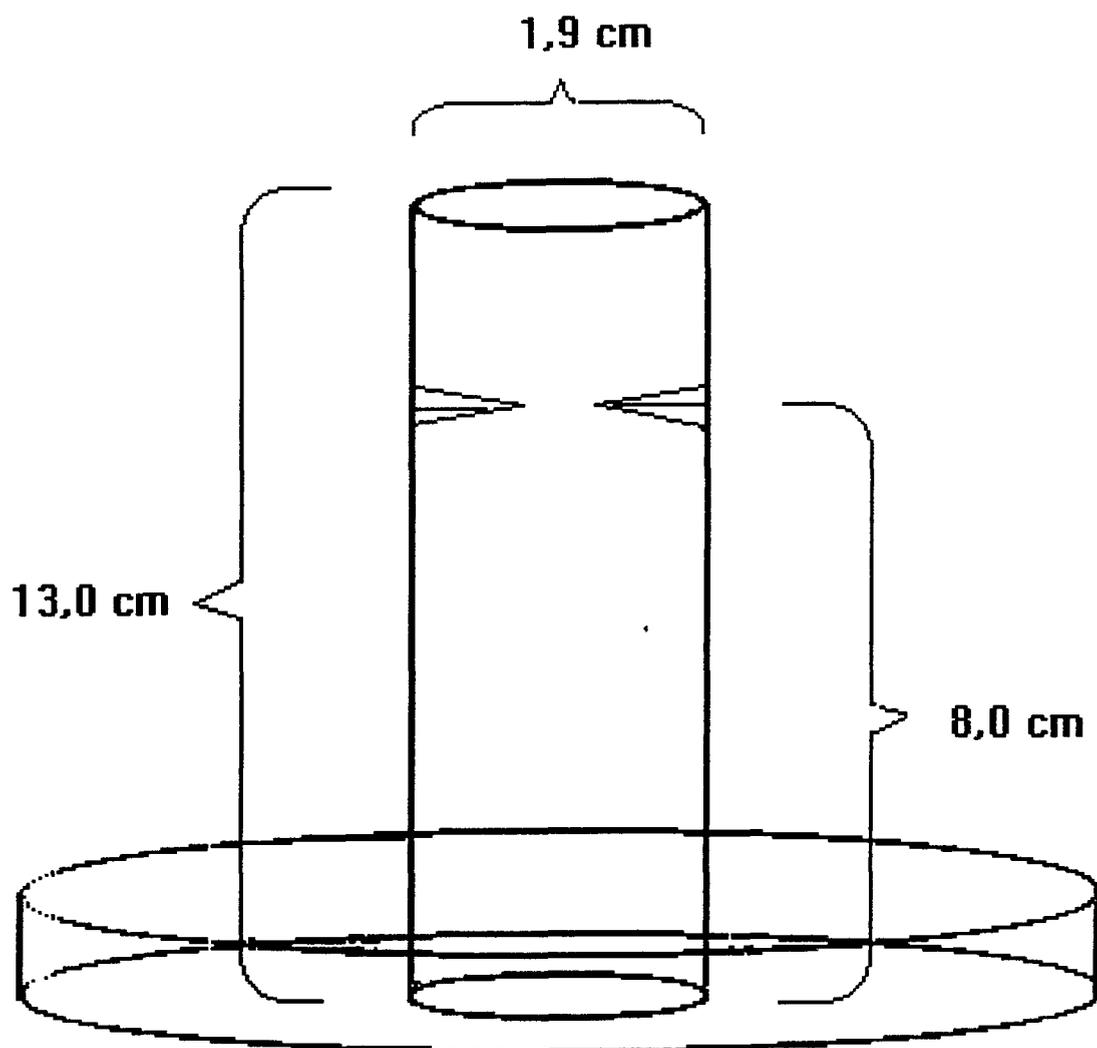


Figura 9 -Tubo de vidro utilizado nas medidas experimentais do coeficiente de difusão.

2.3.1 - MEDIDAS EXPERIMENTAIS DE COEFICIENTES DE DIFUSÃO EM ORGANO-GEL

O procedimento geral de medidas dos coeficientes de difusão está representado esquematicamente na Figura 10.

O tubo contendo o gel, após 24 horas na geladeira, foi retirado da placa de petri e colocado num suporte que permitia que o tubo fosse introduzido no centro de um becker com capacidade de 250 mL, contendo 100 mL de solvente (solvente externo). O tubo permaneceu suspenso a aproximadamente 2 cm do fundo do becker.

O solvente do becker foi mantido rigorosa e constantemente sob agitação com auxílio de um agitador magnético. Amostras do solvente foram retiradas em intervalos de tempos determinados e fez-se as leituras das absorbâncias em 226 nm (comprimento de onda de absorção máxima dos benzoatos de alquila).

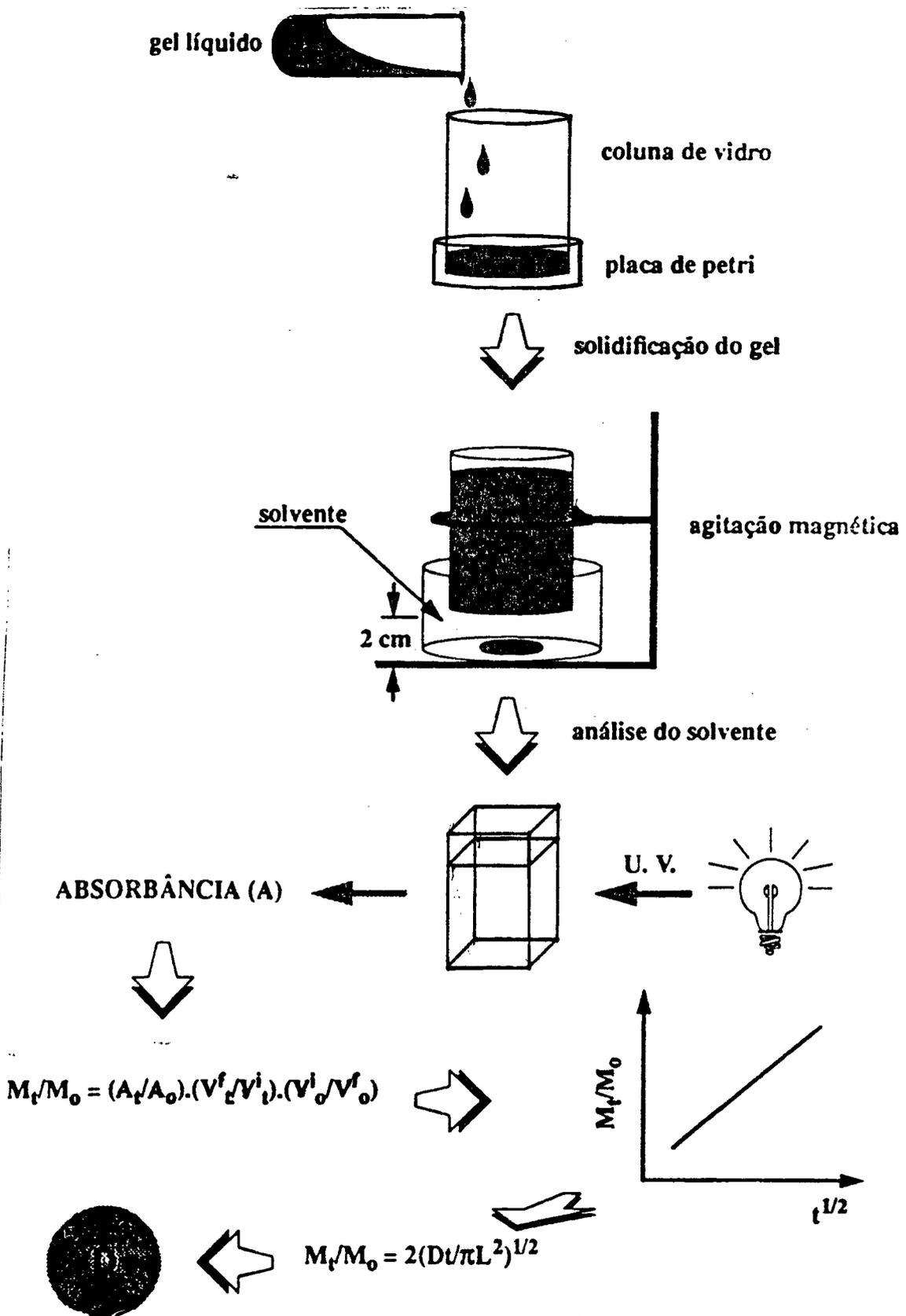


Figura 10 - Procedimento experimental utilizado para as medidas dos coeficientes de difusão (de ésteres aromáticos) em organo-gel de n-hexano.

A metodologia descrita foi baseada nos experimentos de medidas de coeficiente de difusão desenvolvida por Crooks em 1989 (ver item 1.2.2 da introdução).

2.4 - ESTUDOS CINÉTICOS

As cinéticas das reações do octanoato de p-nitrofenila e os álcoois n-pentanol, n-hexanol, n-octanol, 2-butanol, foram acompanhadas espectrofotometricamente a 25°C. Estas reações foram seguidas observando-se a formação de um dos produtos da reação, p-nitrofenol, em 307nm.

A concentração do octanoato de p-nitrofenila foi de $1,0 \times 10^{-4}M$, enquanto a dos álcoois foi de $5,0 \times 10^{-3}M$, estando portanto os álcoois em excesso com relação ao éster. Nestas condições a reação é de pseudo-primeira ordem.

As constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem (k_{obs}) foram calculadas usando-se um programa de computador⁽³⁸⁾ que usa a equação 9

$$k_{obs} = \log (A_{t\infty} - A_{tx}) / tx \quad (eq.9)$$

onde:

$A_{t\infty}$ = absorvância do éster em tempo infinito (fornecido pelo programa)

A_{tx} = absorvância no tempo "x"

tx = tempo "x" em segundos

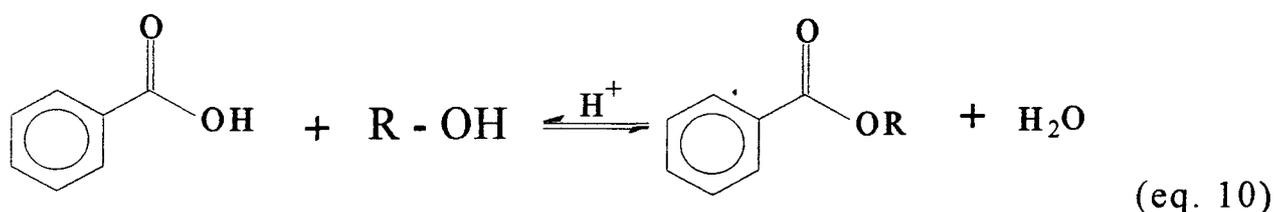
A partir dos dados experimentais de absorvância e de tempo, obtém-se um gráfico de $\log (A_{t\infty} - A_{tx})$ em função do tempo tx , cujo coeficiente angular fornece o valor de k_{obs} .

2.5 - REAÇÕES

2.5.1 - PREPARAÇÃO DOS BENZOATOS DE ALQUILA

Os benzoatos de alquila foram preparados segundo método clássico da literatura.⁽³⁹⁾ Uma série de ésteres derivados do ácido benzóico foi preparada, utilizando-se álcoois com cadeias carbônicas variando de 4 a 16 átomos de carbonos.

A reação de esterificação, de maneira geral, pode ser formulada conforme a equação 10.



composto1- R= C₂H₅

composto2- R= n-C₄H₉

composto3- R= n-C₈H₁₇

composto4- R= n-C₁₆H₃₃

composto5- R= sec-C₄H₉

As reações foram realizadas adicionando-se em um balão de 250 mL, 35 a 50 mL de tolueno, 0,05 moles de ácido benzóico e 0,05 moles do álcool. Como catalisador utilizou-se o ácido sulfúrico (algumas gotas). Em seguida, a mistura reacional foi refluxada por 4 a 16 horas, dependendo do tamanho da cadeia do álcool. As reações foram acompanhadas pela formação da água coletada através de um aparelho Dean- Stark.

Após o refluxo (4 a 16 horas), adicionou a mistura reacional em um funil de separação e lavou-se com solução aquosa de bicarbonato de sódio para eliminar o ácido que não reagiu. A seguir, extraiu-se os ésteres da fase orgânica com tetracloreto de carbono. A mistura foi seca sobre sulfato de magnésio ou cloreto de cálcio anidro.

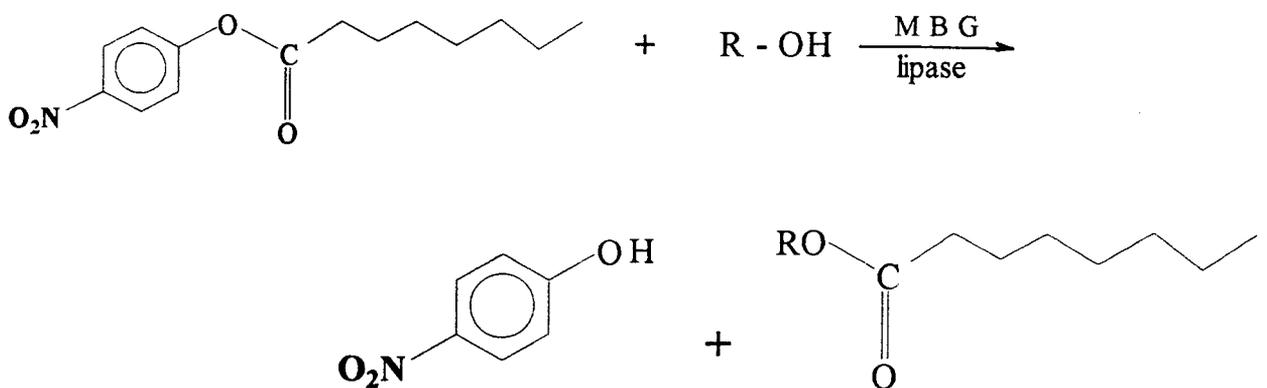
Os sais secantes foram filtrados, evaporou-se o solvente em evaporador rotatório; e obteve-se os ésteres. A purificação dos ésteres (benzoato de etila, benzoato de n-butila, benzoato de sec-butila e benzoato de n-octila) foi feita através de uma destilação simples e o benzoato de cetila, que é um sólido, foi recristalizado em n-hexano.

Os produtos assim obtidos, foram caracterizados por IV e $^1\text{H-RMN}$, além de medidas do índice de refração (Tabela 2, página 35).

2.5.2 - PREPARAÇÃO DO MEIO REACIONAL PARA AS REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA

Os organo-géis contendo a enzima, foram retirados do congelador e rapidamente separados dos tubos de ensaio. Em seguida foram cortados em secções de aproximadamente 125 mm^3 e então colocados em um erlenmeyer contendo o substrato (octanoato de p-nitrofenila e os correspondentes álcoois n-pentanol, n-hexanol, n-octanol e 2-butanol).

A reação de transesterificação pode ser representadas de acordo com a equação 11.



(eq.11)

$\text{R} = \text{n}-(\text{CH}_2)_4\text{-CH}_3, \text{n}-(\text{CH}_2)_5\text{-CH}_3, \text{n}-(\text{CH}_2)_7\text{-CH}_3$ e $\text{sec-C}_4\text{H}_9$
 lipases = *C.V., Microbial e Pseudomonas sp.*

As reações foram realizadas adicionando-se a um erlenmeyer de 15 mL de octanoato de p-nitrofenila de concentração $1,0 \times 10^{-4}$ M e 15 mL de álcool (n-pentanol, n-hexanol, n-octanol e 2-butanol) cuja concentração foi de 5×10^{-3} M. Esta concentração de álcool corresponde a uma concentração 50 vezes maior do que a do octanoato de p-nitrofenila.

O equivalente a um tubo de ensaio do organo-gel (aproximadamente 10 mL) contendo a enzima, foi então adicionado ao meio reacional e agitado em banho maria tipo Dubnoff termostatizado a 25°C durante aproximadamente duas horas.

As reações efetuadas estão representadas na equação 11. As enzimas utilizadas nas reações estão listadas no item 2.1.2.

Reações usando organo-géis controle (sem enzimas) foram executadas paralelamente às reações catalisadas enzimaticamente, e não foi observada formação de produtos nestas condições (2 horas à 25°C).

2.5.3 - ISOLAMENTO DO PRODUTO FINAL DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DO OCTANOATO DE P-NITROFENILA COM O n-PENTANOL

Para confirmar a obtenção do produto da reação de transesterificação fez-se o isolamento do produto final da reação do octanoato de p-nitrofenila com n-pentanol, em acetonitrila.

A reação foi realizada adicionando-se a um erlenmeyer 0,003 moles (0,78 g) de octanoato de p-nitrofenila e 0,15 moles (13,20 g) do n-pentanol em 30 mL de acetonitrila. O equivalente a um tubo de ensaio de organo-gel (aproximadamente 10 mL) contendo a enzima foi então adicionado ao meio reacional, e a mistura agitada em banho maria tipo Dubnoff, termostatizado a 25°C durante 48 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada, devido ao aparecimento do trans éster. Usou-se como eluente uma mistura de n-hexano/acetato de etila (15:1).

Após a separação dos “géis” do meio reacional, a solução foi concentrada em um evaporador rotatório. O produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna, usando-se como eluente uma mistura de n-hexano/acetato de etila (15:1) até sair todo o éster, o que foi acompanhado também por cromatografia em camada delgada. Após ter separado todo o octanoato de n-pentila, mudou-se o eluente para acetona, para retirar o p-nitrofenol, um subproduto da reação.

O produto foi então caracterizado por ^1H -RMN (ressonância magnética nuclear de próton) e IV (Infravermelho). Estes dados serão mostrados no próximo capítulo (Resultados e Discussão).

CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo contém os resultados dos experimentos descritos no capítulo 2, apresentados na forma de diagramas, figuras e tabelas, devidamente discutidos para sua melhor compreensão.

Todos os resultados obtidos nos experimentos feitos no laboratório, serão apresentados e discutidos, tenham sido eles bem sucedidos ou não. Esta abordagem foi adotada com o intuito de se executar um estudo razoavelmente completo do objeto da pesquisa.

Assim, alguns aspectos que aparentemente possam parecer negativos, contribuíram sem dúvida para o entendimento das características do organo-gel e de sua utilização potencial em síntese orgânica.

3.1 - IDENTIFICAÇÃO DOS BENZOATOS DE ALQUILA

Alguns dados analíticos e espectroscópicos para os produtos obtidos na esterificação do ácido benzóico com diferentes álcoois alifáticos, estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Dados de rendimento, Rf, IV e índice de refração para os benzoatos de alquila

composto	rendimento(%)	Rf ^(a)	IV ν -C=O (cm ⁻¹) ^(b)	índice de refração ^(c) exp. literatura ⁽³⁹⁾
1	94	0,58	1720	1,50 (1,50)
2	96	0,60	1721	1,48 (1,49)
3	52	0,57	1722	(-)
4	86	0,55	1724	(-)
5	47	0,59	1727	(-)

(a) eluente n-hexano : acetato de etila 15 : 1

(b) filme, em cela de NaCl

(c) temperatura 25°C.

A esterificação foi realizada refluxando-se com os álcoois e o ácido benzóico por um tempo de 4 a 16 horas, dependendo da cadeia carbônica do álcool, conforme discutido anteriormente.

Os benzoatos de alquila obtidos, apresentaram rendimentos que variaram de 47 a 96%. O menor rendimento foi obtido para a reação entre o ácido benzóico e o 2-butanol, mostrando novamente a menor reatividade dos álcoois secundários em relação aos álcoois primários.

Nos ésteres de cadeia alquílicas normais, a absorção no infravermelho do grupo carbonila ocorre em torno de 1740 cm^{-1} . Já nos benzoatos de alquila, devido à conjugação do grupo fenila com a carbonila, ocorre uma diminuição na frequência de estiramento e os valores são observados na região de 1720 cm^{-1} , conforme mostrado na Tabela 2.

A análise por $^1\text{H-RMN}$ confirmou a pureza dos ésteres aromáticos obtidos. Por exemplo, para os benzoatos de etila, n-butila, n-octila e cetila observou-se um triplete centrado em 4,3 ppm, característico do grupo $-\text{CH}_2-$ ligado ao oxigênio do grupo éster. Já para o benzoato de sec-butila observou-se um multiplete centrado em 4,9 ppm, que é característico do grupo $-\text{CH}-$ ligado ao oxigênio do grupo éster.

3.1.1 - CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS

- **benzoato de etila** : IV (NaCl) (cm^{-1}) 2982, 1720, 1602, 1452, 1368, 1276, 1174.

$^1\text{H RMN}$ (60 MHz, CDCl_3/TMS) δ (ppm) 1,0 - 2,4 (m, 5H, CH_3CH_2), 4,2 (t, 2H, CH_2), 7,2 (s, 5H, C_6H_5)

- **benzoato de n-butila** : IV (NaCl) (cm^{-1}) 2960, 2874, 1720, 1602, 1456, 1386,

1276, 1176. $^1\text{H RMN}$ (60 MHz, CDCl_3/TMS) δ (ppm) 1,0 - 2,4 (m, 9H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3$), 4,3 (t, 2H, CH_2), 7,1 (s, 5H, C_6H_5).

- **benzoato de sec-butila** : IV (NaCl) (cm^{-1}) 2962, 2874, 1718, 1604, 1456, 1274, 1174. ^1H RMN (60 MHz, CDCl_3 /TMS) δ (ppm) 1,0 - 2,4 (m, 8H, CH_3 , CH_2), 5,0 (t, 1H, CH), 7,4 (s, 5H, C_6H_5).

- **benzoato de n-octila** : IV (NaCl) (cm^{-1}) 2928, 2856, 1722, 1602, 1454, 1274, 1176. ^1H RMN (60 MHz, CDCl_3 /TMS) δ (ppm) 1,0 - 2,4 (m, 17H, CH_3 (CH_2)₇), 4,2 (t, 2H, CH_2), 7,2 (s, 5H, C_6H_5).

- **benzoato de cetila** : IV (NaCl) (cm^{-1}) 2922, 2850, 1718, 1602, 1474, 1276, 1178. ^1H RMN (60 MHz, CDCl_3 /TMS) δ (ppm) 1,0 - 2,4 (m, 33H, CH_3 (CH_2)₁₅), 4,2 (t, 2H, CH_2), 7,1 (s, 5H, C_6H_5).

3.2- RESULTADOS DA MEDIDA DE COEFICIENTE DE DIFUSÃO

Os resultados obtidos das medidas de absorvância dos benzoatos de alquila em função do tempo para cada sistema de organo-gel de n-hexano em diferentes solventes externo estão descritos nas Tabelas 3, 4, 5, 6, e 7.

Tabela 3 - Medidas de absorvância dos benzoatos de alquila em função do tempo, em organo-gel de n-hexano, utilizando como solvente externo n-hexano.

t(min.)	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.
composto	1	2	3	4	5
1	0,034	0,048	0,027	0,068	0,043
5	0,043	0,091	0,048	0,090	0,085
10	0,065	0,148	0,070	0,254	0,131
20	0,094	0,195	0,100	0,350	0,193
30	0,115	0,231	0,148	0,429	0,246
40	0,127	0,266	0,185	0,488	0,285
50	0,140	0,296	0,234	0,534	0,359
60	0,154	0,327	0,272	0,582	0,400
70	0,168	0,362	0,297	0,660	0,455
80	0,179	0,399	0,318	0,680	0,507
90	0,190	0,435	0,340	0,706	0,572

-composto 1 (benzoato de etila) → $A_o = 1,042$

- composto 2 (benzoato de n-butila) → $A_o = 1,064$

- composto 3 (benzoato de n-octila) → $A_o = 1,850$

- composto 4 (benzoato de cetila) → $A_o = 1,440$

- composto 5 (benzoato de sec-butila) → $A_o = 0,883$

-O comprimento do organo-gel no cilindro,foi sempre 10 cm.

Tabela 4- Medidas de absorvância dos benzoatos de alquila em função do tempo, em organo-gel de n-hexano, utilizando como solvente externo ciclohexano.

t(min.) composto	Abs. 1	Abs. 2	Abs. 3	Abs. 4	Abs. 5
1	0,017	0,032	0,048	0,030	0,010
5	0,049	0,064	0,069	0,049	0,021
10	0,066	0,092	0,095	0,069	0,032
20	0,088	0,120	0,135	0,091	0,050
30	0,107	0,146	0,173	0,109	0,065
40	0,136	0,169	0,220	0,126	0,078
50	0,156	0,192	0,252	0,145	0,101
60	0,174	0,210	0,271	0,154	0,116
70	0,208	0,228	0,323	0,168	0,131
80	0,216	0,250	0,343	0,181	0,143
90	0,227	0,265	0,358	0,191	0,160

- composto 1 (benzoato de etila) → $A_0 = 1,042$

- composto 2 (benzoato de n-butila) → $A_0 = 1,064$

- composto 3 (benzoato de n-octila) → $A_0 = 1,850$

- composto 4 (benzoato de cetila) → $A_0 = 1,440$

- composto 5 (benzoato de sec-butila) → $A_0 = 0,883$

-O comprimento do organo-gel no cilindro, foi 9,5 cm para os compostos 1, 2 e 5 e, 10 cm para os compostos 3 e 4.

Tabela 5 - Medidas de absorvância dos benzoatos de alquila em função do tempo, em organo-gel de n-hexano, utilizando como solvente externo heptano.

t(min.)	Abs. composto 1	Abs. 2	Abs. 3	Abs. 4	Abs. 5
1	0,042	0,022	0,024	0,020	0,023
5	0,050	0,063	0,063	0,051	0,029
10	0,065	0,097	0,116	0,071	0,036
20	0,086	0,126	0,174	0,099	0,058
30	0,104	0,160	0,221	0,148	0,080
40	0,118	0,188	0,263	0,179	0,102
50	0,130	0,202	0,303	0,198	0,123
60	0,146	0,218	0,336	0,220	0,140
70	0,165	0,239	0,366	0,246	0,161
80	0,173	0,250	0,391	0,265	0,183
90	0,182	0,265	0,429	0,293	0,205

composto 1 (benzoato de etila) → $A_o = 1,042$

-composto 2 (benzoato de n-butila) → $A_o = 1,064$

-composto 3 (benzoato de n-octila) → $A_o = 1,850$

-composto 4 (benzoato de cetila) → $A_o = 1,440$

-composto 5 (benzoato de sec-butila) → $A_o = 0,883$

-O comprimento do organo-gel no cilindro, foi 9,0 cm para o composto 4, 9,5 cm para os compostos 1 e 2 e, 10 cm para os compostos 3 e 5.

Tabela 6 - Medidas de absorvância dos benzoatos de alquila em função do tempo, em organo-gel de n-hexano, utilizando como solvente externa acetonitrila.

t(min.) composto	Abs. 1	Abs. 2	Abs. 3	Abs. 4	Abs. 5
1	0,012	0,029	0,011	0,020	0,011
5	0,063	0,050	0,031	0,030	0,017
10	0,098	0,075	0,055	0,038	0,026
20	0,143	0,104	0,085	0,063	0,036
30	0,183	0,124	0,120	0,083	0,041
40	0,216	0,142	0,149	0,102	0,047
50	0,248	0,161	0,176	0,109	0,061
60	0,271	0,182	0,195	0,121	0,075
70	0,292	0,199	0,208	0,146	0,082
80	0,313	0,216	0,227	0,166	0,089
90	0,336	0,237	0,240	0,178	0,098

-composto 1 (benzoato de etila) → $A_o = 1,042$

-composto 2 (benzoato de n-butila) → $A_o = 1,064$

-composto 3 (benzoato de n-octila) → $A_o = 1,850$

-composto 4 (benzoato de cetila) → $A_o = 1,440$

-composto 5 (benzoato de sec-butila) → $A_o = 0,883$

-O comprimento do organo-gel no cilindro, foi 9,5 cm para os compostos 3 e 5 e, 10 cm para os compostos 1, 2 e 4.

Tabela 7 - Medidas de absorvância dos benzoatos de alquila em função do tempo, em organo-gel de n-hexano, utilizando como solvente externo 1,4-dioxano.

t(min.) composto	Abs. 1	Abs. 2	Abs. 3	Abs. 4	Abs. 5
1	0,008	0,011	0,015	0,012	0,021
5	0,046	0,038	0,068	0,022	0,051
10	0,085	0,055	0,095	0,050	0,064
20	0,127	0,091	0,124	0,072	0,097
30	0,176	0,117	0,154	0,097	0,125
40	0,222	0,156	0,179	0,114	0,153
50	0,260	0,180	0,205	0,130	0,166
60	0,281	0,225	0,227	0,140	0,184
70	0,294	0,240	0,250	0,149	0,195
80	0,301	0,267	0,264	0,167	0,218
90	0,329	0,297	0,278	0,176	0,235

- composto 1 (benzoato de etila) → $A_0 = 1,042$
- composto 2 (benzoato de n-butila) → $A_0 = 1,064$
- composto 3 (benzoato de n-octila) → $A_0 = 1,850$
- composto 4 (benzoato de cetila) → $A_0 = 1,440$
- composto 5 (benzoato desec-butila) → $A_0 = 0,883$

-O comprimento do organo-gel no cilindro, foi 9,0 cm para o composto 5 e, 10 cm para os compostos 1, 2, 3 e 4.

Os valores das absorvâncias, de cada um dos experimentos, foram tratados matematicamente de acordo as equações 3 e 4 (item 1.2.2, página 5). A partir deste tratamento matemático, obteve-se as Figuras 11, 12, 13, 14 e 15 que mostram a fração difundida dos correspondentes ésteres (M_t/M_0) em função da raiz quadrada do tempo ($t^{1/2}$), em organo-gel de n-hexano e diferentes solventes externos.

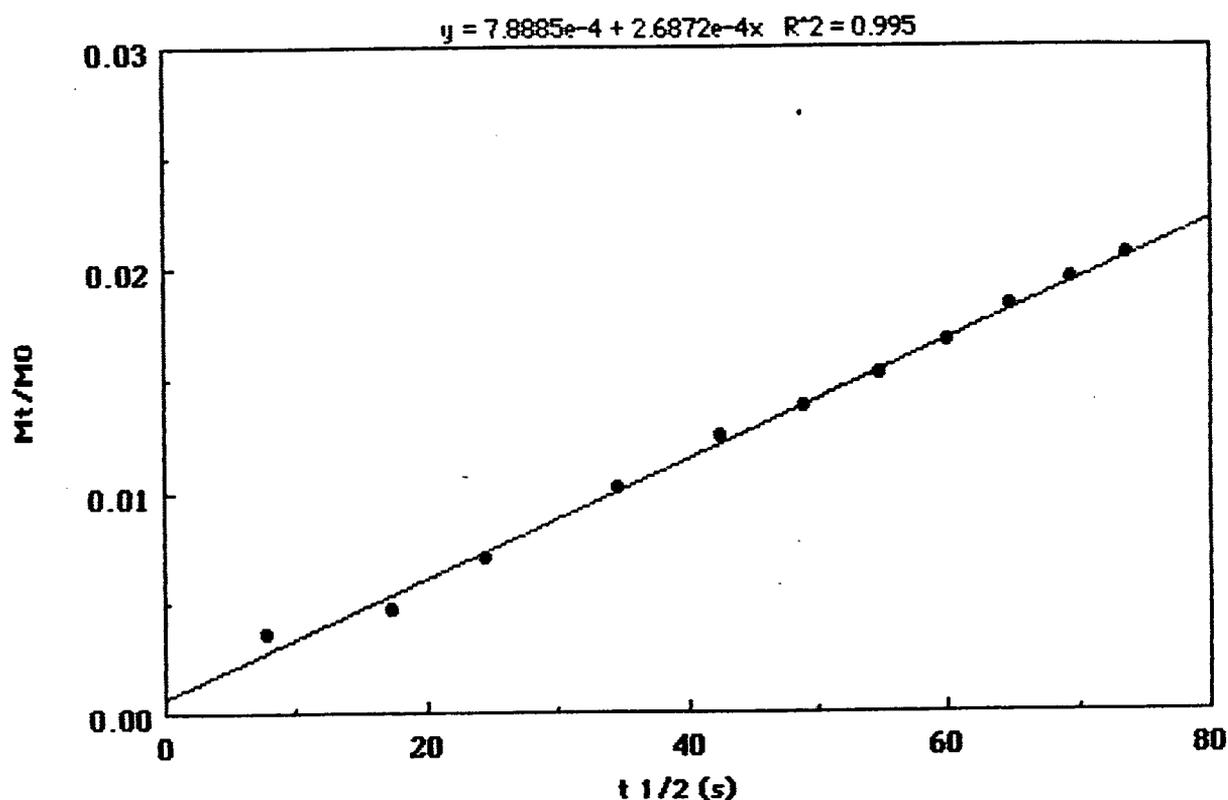


Figura 11 - Fração difundida do benzoato de etila, em função da raiz quadrada do tempo em organo-gel de n-hexano utilizando como solvente externo n-hexano.

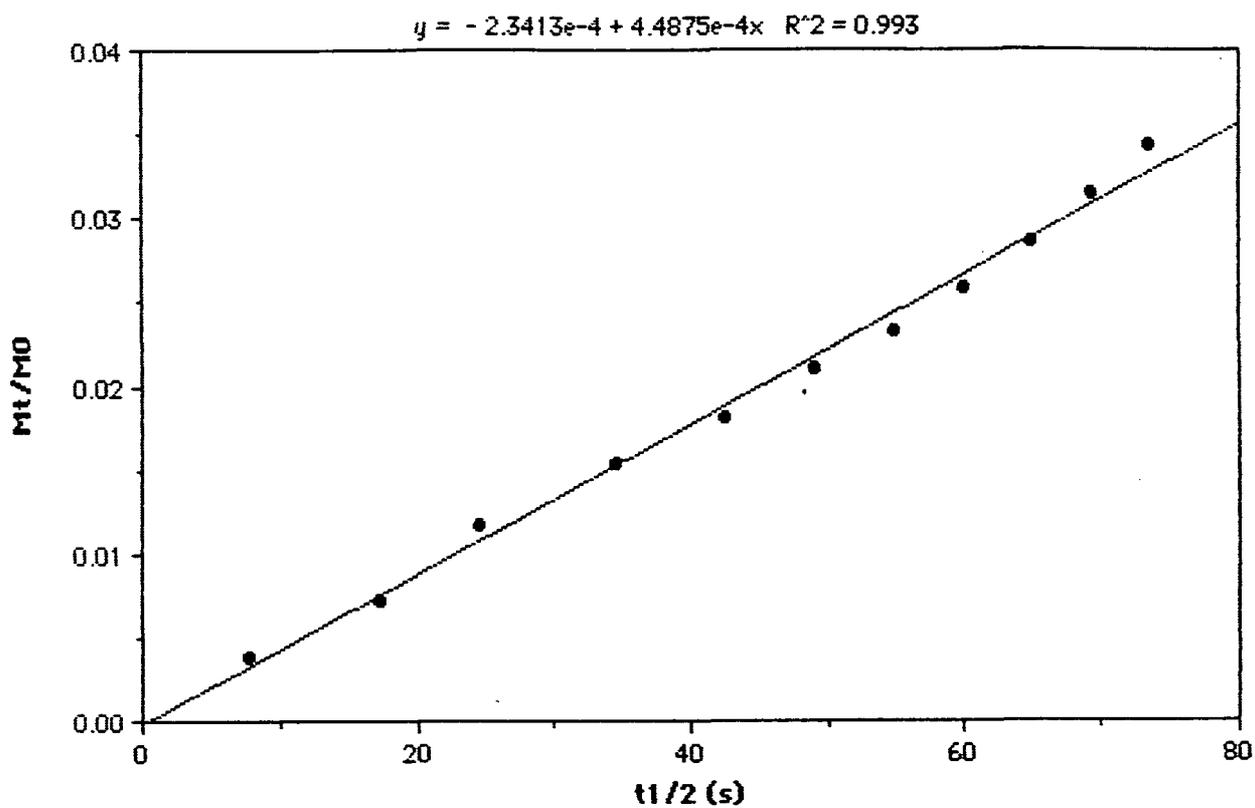


Figura 12 - Fração difundida do benzoato de n-butila, em função da raiz quadrada do tempo em organo-gel de n-hexano utilizando como solvente externo n-hexano.

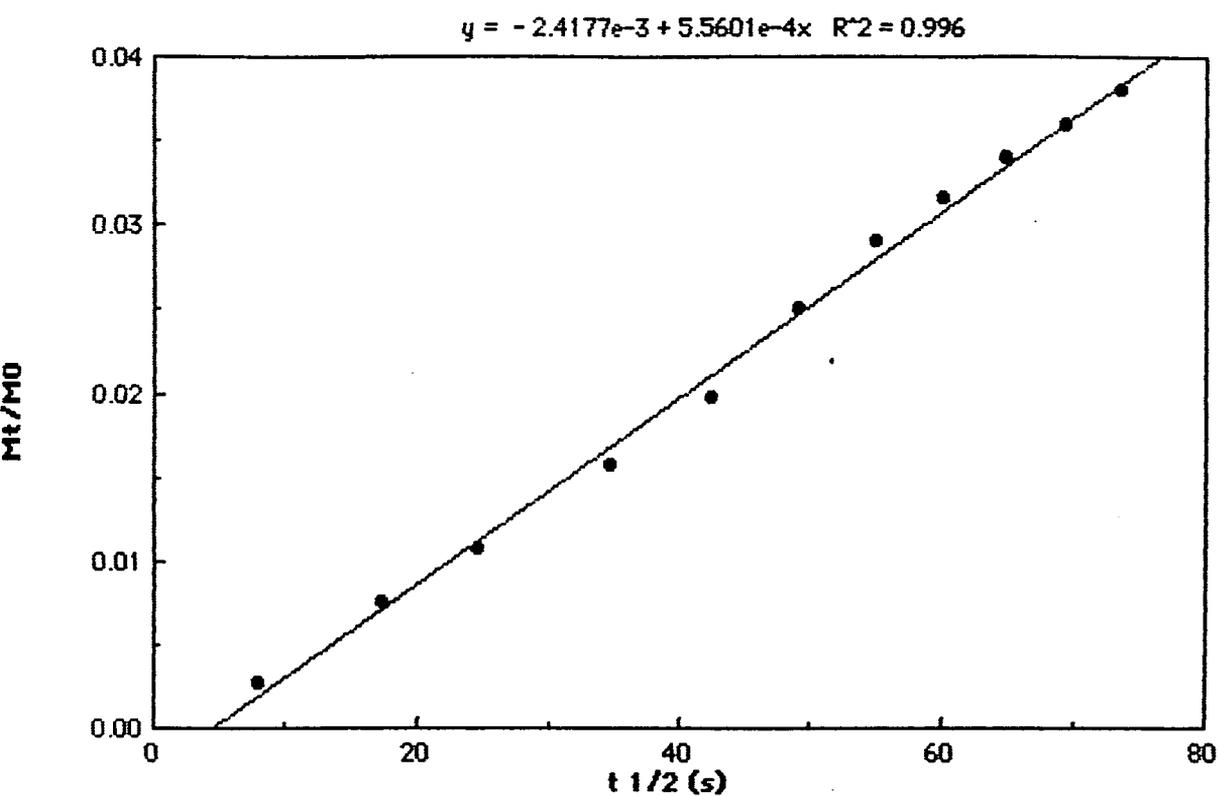


Figura 13- Fração difundida do benzoato de n-octila, em função da raiz quadrada do tempo em organo-gel de n-hexano utilizando como solvente externo n-hexano.

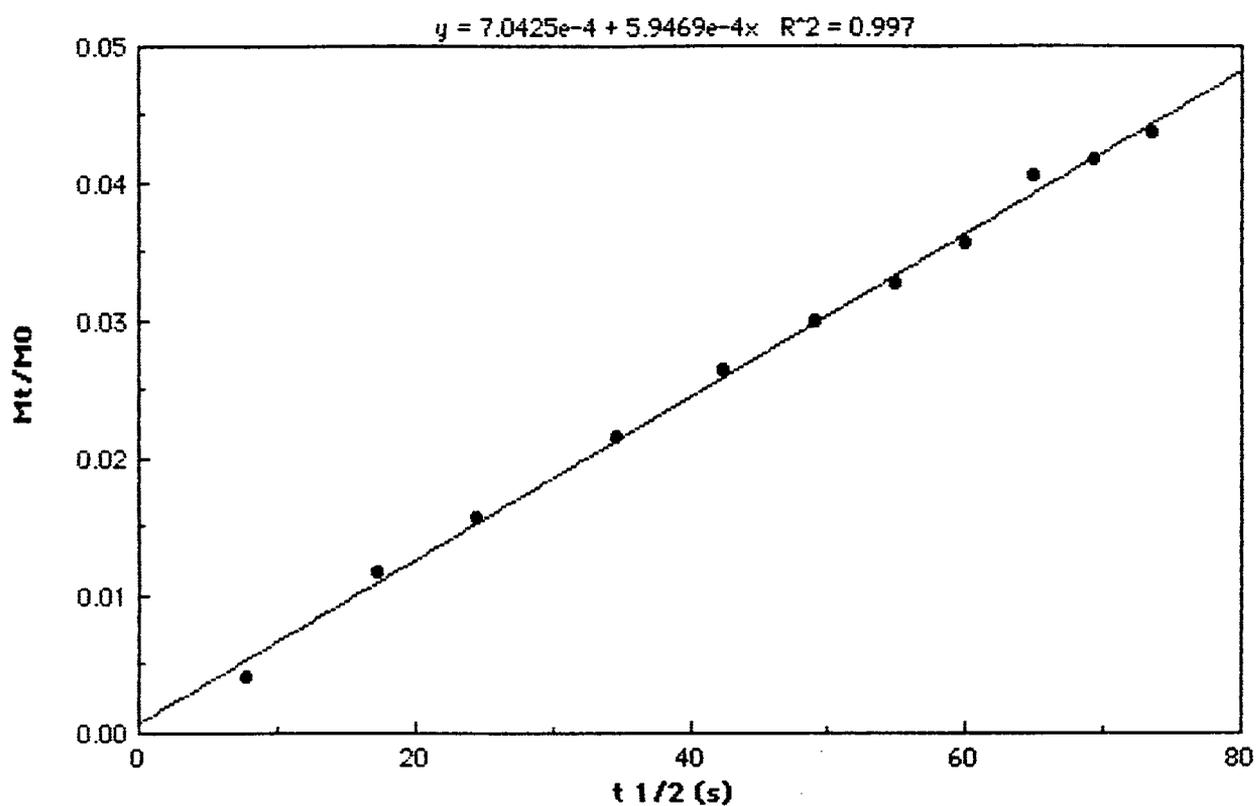


Figura 14 - Fração difundida do benzoato de cetila, em função da raiz quadrada do tempo em organo-gel de n-hexano utilizando como solvente externo n-hexano.

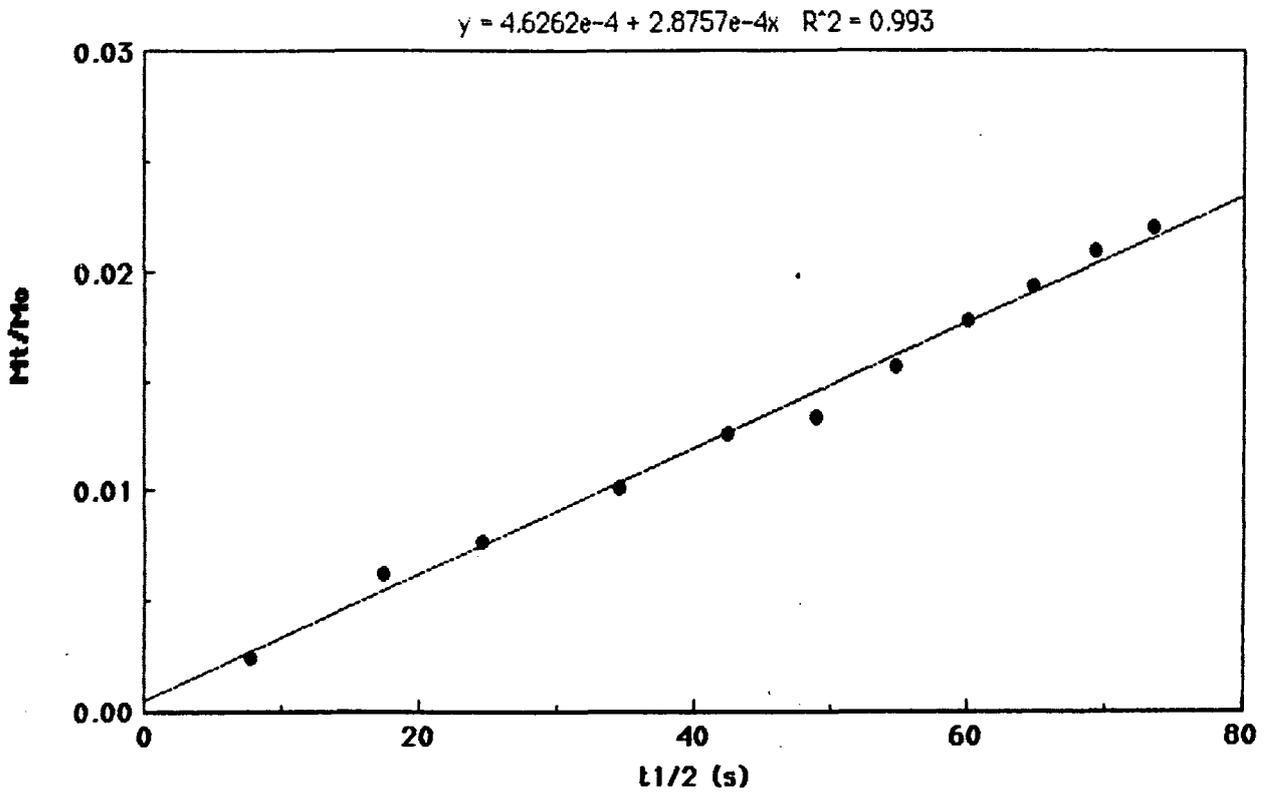


Figura 15 - Fração difundida do benzoato de sec-butila, em função da raiz quadrada do tempo em organo-gel de n-hexano utilizando como solvente externo n-hexano.

A equação 9 mostra que um gráfico de Mt/M_0 versus $t^{1/2}$ (Figuras 11, 12, 13, 14 e 15) fornece uma linha reta cujos os gradientes (D) podem ser calculados.

Aplicou-se uma regressão linear de primeira ordem às referidas curvas (equação 12), e obteve-se seus respectivos coeficientes angulares ($a = 2(D/\pi L^2)^{1/2}$). A partir destes valores, os correspondentes coeficientes de difusão (D) foram obtidos (equação 13):

$$Mt/M_0 = 2 (Dt/\pi L^2)^{1/2} \Rightarrow y = ax + b \quad (\text{eq. 12})$$

$$D = (AL/2)^2 \pi \quad (\text{eq.13})$$

onde:

a = coeficiente angular da curva

L = comprimento do organo-gel no cilindro (cm)

π = constante igual a 3,14159

Os resultados do coeficiente de difusão dos benzoatos de alquila, assim obtidos, utilizando diversos solventes externo estão representado na Tabela 8.

Tabela 8 - Valores de coeficiente de difusão (D) dos benzoatos de alquila em organo-gel de n-hexano em diferentes solventes.

solvente	log P	R= C ₂ H ₅	R= n-C ₄ H ₉	R= n-C ₈ H ₁₇	R= n-C ₁₆ H ₃₄	R= sec-C ₄ H ₉
Dx10 ⁵ (cm ² /s)						
hexano	3,50	0,57	1,60	2,40	2,80	0,70
ciclohexano	3,20	0,88	1,00	1,20	1,90	0,60
heptano	4,00	0,43	1,20	1,20	1,60	0,40
1,4-dioxano	-1, 10	1, 30	1,10	0,93	0,79	0,49
acetonitrila	-1,33	1,40	0,65	0,54	0,36	0,23

Os resultados mostram que à medida que aumenta a cadeia carbônica do éster, há em geral um favorecimento no aumento no coeficiente de difusão quando o solvente externo é apolar.

Os valores do coeficiente de difusão obtidos para os benzoatos de etila, n-butila, n-octila e cetila com o n-hexano como solvente externo são respectivamente $0,57 \times 10^{-5}$; $1,6 \times 10^{-5}$; $2,4 \times 10^{-5}$; $2,8 \times 10^{-5}$ cm^2/seg . O efeito da cadeia é observado ao se passar do benzoato de etila para os benzoatos de n-butila, n-octila e cetila, pois há um aumento no coeficiente de difusão com o aumento na cadeia carbônica do éster. Resultados análogos são observados para a difusão destes ésteres quando o solvente externo é o heptano e ciclohexano, que são semelhantes ao n-hexano, em termos de polaridade (ver valores de $\log P$ na Tabela 8). Observa-se também, que há uma grande diminuição no coeficiente de difusão do benzoato de sec-butila quando comparado com os benzoatos de cadeia alquílica normal, independente se o solvente externo é n-hexano, heptano ou ciclohexano. Por exemplo, o valor do coeficiente de difusão para o benzoato de cetila é $2,8 \times 10^{-5}$ cm^2/s e para o benzoato de sec-butila é $0,70 \times 10^{-5}$ cm^2/s , utilizando n-hexano como solvente externo (ver outros valores Tabela 8). A diminuição no valor do coeficiente de difusão (D) ao se utilizar um éster de cadeia ramificada e solvente externo apolar, provavelmente está relacionado com efeitos estéricos e uma maior dificuldade destes substratos difundirem-se através da estrutura do organo-gel, que é formada por extensa e ramificada rede de gelatina (Figura 8 , página 20).

Vecchia em 1993,⁽⁴⁰⁾ estudou reações de esterificação do ácido oleico com diversos álcoois alifáticos, utilizando enzimas (lipases) imobilizadas em organo-gel de n-hexano. Foi observado que há uma diminuição no rendimento de esterificação do ácido oleico, a medida que se usa álcoois com ramificações próxima a hidroxila. Quanto maior o número de ramificações, menor o rendimento sendo que no caso do terc-butanol, a reação não ocorreu. Este efeito da diminuição no rendimento devido as ramificações na cadeia lateral do álcool, pode ser atribuída ao efeito de reconhecimento da enzima, ou seja destes substratos impedidos estericamente não serem alojados efetivamente no centro ativo para que possa ocorrer a catálise. Portanto, a variação no rendimento do produto neste sistema pode também estar associado com o coeficiente de difusão, pois este coeficiente indica a velocidade com a qual os ésteres difundem-se do organo-gel para o meio reacional.

Um outro aspecto interessante que deve ser observado é o efeito da polaridade do meio. Aumentando a polaridade do solvente, observa-se um aumento na difusão para os benzoatos de cadeia carbônica pequena ($D_{\text{benzoato etila}} = 1,40 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{seg.}$ em acetonitrila e $0,57 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{seg.}$ em n-hexano) e uma diminuição para os benzoatos de cadeia longa ($D_{\text{benzoato cetila}} = 0,36 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{seg.}$ em acetonitrila e $2,80 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{seg.}$ em n-hexano).

Os valores do coeficiente de difusão (D) do benzoato de sec-butila não variaram significativamente em função do solvente externo, conforme mostrados na Tabela 8. Observa-se apenas uma pequena diminuição em função da polaridade do solvente, sendo que o menor valor do coeficiente de difusão foi obtido quando o solvente externo é acetonitrila ($D = 0,23 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{seg.}$), que é o mais polar da série.

Estes resultados podem estar associados com o coeficiente de partição ($\log P$) dos solventes. Este coeficiente é um indicador da hidrofobicidade das substâncias. Como a hidrofobicidade está relacionada com a polaridade, pode-se assumir $\log P$ como a medida quantitativa da polaridade. Portanto, quanto menor o $\log P$ do solvente, maior será sua polaridade, e conseqüentemente apresenta uma melhor afinidade por substratos de cadeias alquílicas menores. Pode-se também, observar claramente que solventes que apresentam $\log P$ maiores (ver Tabela 8), interagem melhor com substratos de cadeias alquílicas maiores, fazendo com que estes difundam-se mais rapidamente. Isto indica que estes substratos são mais apolares do que os correspondentes de cadeias alquílicas menores, em concordância com resultados anteriores de reações de esterificação em organo-gel ⁽⁴¹⁾

Outros solventes com polaridade intermediária entre a acetonitrila e o n-hexano foram testados, tais como o clorofórmio, tetrahidrofurano, acetato de etila e diclorometano, a fim de utilizá-los como solvente externo, para se determinar o coeficiente de difusão. Porém, estes não foram adequados para o uso como solventes externo para se efetuar a determinação do coeficiente de difusão, já que eles absorvem na mesma região dos benzoatos de alquila, que é em 226 nm.

3.3 - TRANSESTERIFICAÇÃO

Na hidrólise dos ésteres, a parte alcoólica é deslocada por um reagente nucleofílico, H_2O e na esterificação dos ácidos, o álcool comporta-se como reagente nucleofílico. Portanto, não deve nos surpreender que um álcool seja capaz de deslocar outro álcool de um éster.

A transesterificação pode ser catalisada por ácidos ou bases. Nos últimos anos vários trabalhos envolvendo estas reações estão sendo desenvolvidos, utilizando-se enzimas como catalisadores.⁽⁴²⁻⁴⁴⁾

Os experimentos, efetuados neste trabalho, foram realizados a $25^{\circ}C$ como previamente descrito.

A reação de transesterificação é mostrada na equação 11, página 32. Variou-se o número de átomos de carbono dos álcoois, o tipo de enzima imobilizada e o solvente externo (acetonitrila e 1,4-dioxano), e as mesmas foram acompanhadas pela formação do p-nitrofenol cuja absorção máxima é em 307nm.

Os resultados das medidas de absorbância em função do tempo para cada reação, estão descritos nas Tabelas 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

Tabela 9 - Medidas de absorvâncias em função do tempo para reação de transesterificação do octanoato de p-nitrofenila com diferentes álcoois alifáticos (R-OH) com a *C.V. lipase* imobilizada em organo-gel de n-hexano, utilizando como solvente externo acetonitrila, a 25°C.

t(min.)	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.
	n-C ₅ H ₁₁ -OH	n-C ₆ H ₁₃ -OH	n-C ₈ H ₁₇ -OH	sec-C ₄ H ₉ -OH
5	0,139	0,146	0,139	0,130
10	0,148	0,160	0,145	0,139
15	0,160	0,172	0,151	0,150
20	0,171	0,181	0,160	0,158
25	0,182	0,191	0,167	0,162
30	0,193	0,198	0,174	0,172
35	0,203	0,203	0,181	0,178
40	0,205	0,205	0,188	0,187
45	0,209	0,211	0,195	0,195
50	0,211	0,215	0,199	0,201
55	0,213	0,218	0,202	0,206
60	0,217	0,220	0,205	0,218
65	0,223	0,223	0,209	0,222
70	0,225	0,227	0,214	0,227
75	0,227	0,228	0,217	0,235
80	0,230	0,232	0,220	0,239
85	0,233	0,235	0,223	0,242
90	0,237	0,237	0,225	0,245
95	0,238	0,238	0,224	0,247
100	0,240	0,239	0,223	0,248
105	0,241	0,239	0,223	0,249

Tabela 10 - Medidas de absorvância em função do tempo para a reação de transesterificação do octanoato de p-nitrofenila com diferentes álcoois alifáticos (R-OH) com *lipase Pseudomonas sp* imobilizada em organo-gel de n-hexano, utilizando como solvente externo a acetoneitrila, a 25°C.

t(min.)	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.
	n-C ₅ H ₁₁ -OH	n-C ₆ H ₁₃ -OH	n-C ₈ H ₁₇ -OH	sec-C ₄ H ₉ -OH
5	0,140	0,144	0,136	0,141
10	0,165	0,150	0,147	0,147
15	0,196	0,161	0,150	0,156
20	0,208	0,167	0,151	0,160
25	0,218	0,176	0,152	0,163
30	0,227	0,179	0,154	0,166
35	0,238	0,184	0,157	0,168
40	0,246	0,186	0,160	0,170
45	0,256	0,190	0,165	0,172
50	0,264	0,193	0,171	0,174
55	0,270	0,196	0,178	0,177
60	0,275	0,199	0,188	0,180
65	0,282	0,202	0,195	0,183
70	0,288	0,205	0,201	0,186
75	0,290	0,208	0,207	0,189
80	0,294	0,212	0,217	0,192
85	0,296	0,215	0,226	0,194
90	0,297	0,218	0,230	0,195
95	0,298	0,220	0,232	0,196
100	0,299	0,221	0,234	0,197
105	0,300	0,222	0,236	0,198

Tabela 11 - Medidas de absorvância em função do tempo para a reação de transesterificação do octanoato de p-nitrofenila com diferentes álcoois alifático (R-OH) com *lipase Microbial* imobilizada em organo-gel de n-hexano, utilizando como solvente externo a acetonitrila, a 25°C.

t(min.)	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.
	n-C ₅ H ₁₁ -OH	n-C ₆ H ₁₃ -OH	n-C ₈ H ₁₇ -OH	sec-C ₄ H ₉ -OH
5	0,144	0,135	0,141	0,138
10	0,160	0,150	0,150	0,148
15	0,168	0,162	0,158	0,158
20	0,175	0,170	0,165	0,167
25	0,180	0,178	0,171	0,169
30	0,195	0,183	0,175	0,172
35	0,204	0,191	0,179	0,175
40	0,212	0,200	0,181	0,178
45	0,220	0,207	0,186	0,182
50	0,228	0,215	0,190	0,185
55	0,236	0,223	0,192	0,188
60	0,240	0,230	0,195	0,191
65	0,248	0,235	0,200	0,194
70	0,254	0,240	0,203	0,196
75	0,260	0,244	0,205	0,200
80	0,264	0,249	0,205	0,205
85	0,268	0,253	0,211	0,208
90	0,270	0,256	0,215	0,212
95	0,272	0,258	0,218	0,215
100	0,274	0,259	0,220	0,216
105	0,275	0,260	0,221	0,217

Tabela 12-Medidas de absobância em função do tempo para a reação de transesterificação do octanoato de p-nitrofenila com diferentes álcoois alifáticos (R-OH) com *C. V. lipase* imobilizada em organo-gel de n-hexano, utilizando como solvente externo o 1,4-dioxano a 25°C.

t(min.)	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.
	n-C ₅ H ₁₁ -OH	n-C ₆ H ₁₃ -OH	n-C ₈ H ₁₇ -OH	sec-C ₄ H ₉ -OH
5	0,145	0,130	0,135	0,132
10	0,171	0,145	0,160	0,150
15	0,194	0,159	0,185	0,162
20	0,215	0,167	0,195	0,171
25	0,238	0,177	0,222	0,195
30	0,255	0,185	0,235	0,205
35	0,272	0,195	0,246	0,215
40	0,285	0,204	0,255	0,240
45	0,293	0,211	0,264	0,258
50	0,305	0,219	0,273	0,267
55	0,315	0,227	0,282	0,278
60	0,323	0,237	0,291	0,288
65	0,330	0,245	0,300	0,293
70	0,336	0,254	0,308	0,297
75	0,341	0,262	0,316	0,303
80	0,348	0,272	0,324	0,309
85	0,350	0,283	0,330	0,314
90	0,352	0,291	0,336	0,320
95	0,353	0,300	0,341	0,325
100	0,354	0,308	0,346	0,328
105	0,355	0,314	0,348	0,330

Tabela 13 - Medidas de absorvância em função do tempo para a reação de transesterificação do octanoato de p-nitrofenila com diferentes álcoois alifáticos (R-OH) com lipase *Pseudomonas sp* imobilizada organo-gel de n-hexano, utilizando como solvente externo o 1,4-dioxano, a 25°C.

t(min.)	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.
	n-C ₅ H ₁₁ -OH	n-C ₆ H ₁₃ -OH	n-C ₈ H ₁₇ -OH	sec-C ₄ H ₉ -OH
5	0,130	0,130	0,136	0,140
10	0,155	0,140	0,158	0,151
15	0,169	0,150	0,176	0,157
20	0,183	0,159	0,192	0,165
25	0,195	0,168	0,210	0,172
30	0,206	0,177	0,227	0,184
35	0,217	0,188	0,239	0,194
40	0,226	0,198	0,252	0,200
45	0,233	0,205	0,266	0,210
50	0,240	0,213	0,280	0,215
55	0,246	0,220	0,294	0,221
60	0,251	0,226	0,307	0,229
65	0,257	0,232	0,316	0,236
70	0,262	0,240	0,328	0,242
75	0,266	0,245	0,339	0,248
80	0,270	0,250	0,350	0,255
85	0,273	0,255	0,360	0,260
90	0,276	0,259	0,368	0,263
95	0,278	0,261	0,374	0,265
100	0,282	0,262	0,378	0,266
105	0,285	0,263	0,380	0,267

Tabela 14 - Medidas de absorvância em função do tempo para a reação de transesterificação do octanoato de p-nitrofenila com diferentes álcoois alifáticos (R-OH) com *lipase Microbial* imobilizadas em organo-gel de n-hexano, utilizando como solvente externo 1,4- dioxano, a 25°C.

t(min.)	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.
	n-C ₅ H ₁₁ -OH	n-C ₆ H ₁₃ -OH	n-C ₈ H ₁₇ -OH	sec-C ₄ H ₉ -OH
5	0,140	0,143	0,140	0,130
10	0,156	0,165	0,150	0,145
15	0,170	0,195	0,160	0,160
20	0,185	0,216	0,168	0,170
25	0,198	0,239	0,175	0,181
30	0,214	0,244	0,178	0,190
35	0,230	0,266	0,186	0,198
40	0,243	0,285	0,192	0,207
45	0,258	0,300	0,198	0,214
50	0,269	0,314	0,205	0,223
55	0,272	0,327	0,212	0,235
60	0,284	0,340	0,218	0,245
65	0,297	0,356	0,225	0,257
70	0,310	0,370	0,231	0,263
75	0,322	0,385	0,236	0,275
80	0,330	0,396	0,240	0,280
85	0,338	0,410	0,244	0,287
90	0,343	0,418	0,248	0,291
95	0,346	0,424	0,250	0,294
100	0,348	0,427	0,252	0,297
105	0,350	0,429	0,254	0,300

As constantes de velocidade pseudo-primeira ordem (kobs) foram calculadas usando-se um programa de computador que utiliza a equação 9 (página 30), onde se obtêm um gráfico do logaritmo da diferença entre a absorbância no tempo infinito da reação e a absorbância no tempo "x", versus o tempo "x", em segundos. O coeficiente angular da reta fornece o valor kobs.

Tabela 15- Valores das constantes de velocidade observada (kobs) para a reação de transesterificação entre o octanoato de p-nitrofenila com diferentes álcoois alifáticos, utilizando como solvente externo a acetonitrila e 1,4-dioxano, a 25°C.

enzima	álcoois ^(b)	Kobs x 10 ⁴ , s ⁻¹ (a)	
		acetonitrila	1,4-dioxano
<i>C.V.lipase</i>	1-pentanol	4,56	4,54
	hexanol	4,03	4,08
	octanol	3,27	2,63
	2-butanol	1,74	2,04
<i>lipase Pseudomonas</i>	1-pentanol	3,70	3,59
	hexanol	2,31	2,12
	octanol	1,84	1,58
	2-butanol	1,29	1,16
<i>lipase Microbial</i>	1-pentanol	2,17	1,80
	hexanol	2,07	1,59
	octanol	1,68	1,33
	2-butanol	1,00	1,16

(a) Os valores dos coeficientes de correlação da reta de $\log (A_{\infty} - A_t)$ vs $t(s)$, foram sempre maiores que 0,99.

(b) Concentração igual 5×10^{-3} M.

3.3.1 - ANÁLISE DOS RESULTADOS OBTIDOS DAS REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO

O estudo da velocidade das reações fornece informações valiosas sobre como as transformações químicas ocorrem na realidade. A velocidade de uma reação é a medida da rapidez com que se formam os produtos e se consomem os reagentes.

As concentrações das espécies reagentes influenciam na velocidade da reação. Deve-se entender que a equação de velocidade não pode ser determinada a partir da expressão da reação global, mas deve ser obtida a partir das medidas experimentais de velocidades de reação.

No presente trabalho, estudou-se a reação de transesterificação do octanoato de p-nitrofenila com diversos álcoois alifáticos de cadeia carbônica variando-se o comprimento da mesma de 5 a 8 átomos de carbono. As reações foram efetuadas na presença de lipases imobilizadas agindo como catalisadores, em sistema de organo-gel a 25°C, utilizando como solvente externo a acetonitrila e 1,4-dioxano.

Os resultados obtidos das constantes de velocidade observadas para as reações de transesterificação estão apresentados na Tabela 15, página 58.

Os ensaios preliminares foram realizados, utilizando-se como solvente o n-hexano havendo uma forte evidência de que a reação ocorreu, pois o organo-gel apresentou uma coloração amarela no seu interior, o que é um indício da formação do p-nitrofenol, um dos produtos da reação de transesterificação. Porém, com este solvente, o p-nitrofenol não se difunde do organo-gel para o solvente externo. Portanto, a fim de acompanhar o desenvolvimento da reação, realizou-se alguns testes variando a polaridade do solvente com a finalidade de extrair o p-nitrofenol do interior do organo-gel. Os solventes utilizados nos testes foram os seguintes: n-heptano, ciclohexano, clorofórmio, 1,4-dioxano e acetonitrila. O n-heptano e o ciclohexano, análogos ao n-hexano em termos de polaridade não extraíram o p-nitrofenol do organo-gel para o solvente externo. Por outro lado, o clorofórmio, destruiu a estrutura macroscópica original do organo-gel. Resultados análogos foram encontrados com a água, acetona e ácido acético⁽⁴¹⁾.

Apenas a acetonitrila e 1,4-dioxano, puderam ser utilizados como solvente externo, na reação de transesterificação.

As constantes de velocidades obtidas nestas reações no sistema MBG, mostraram que as mesmas estão associadas tanto com o tamanho das cadeias hidrocarbônicas do substrato, bem como a atividade específica da enzima por miligrama de proteína usada.

Os dados de constante de velocidade, mostrados na Tabela 15, mostram que a *C.V. lipase* é o catalisador mais efetivo nestas reações, independentemente do comprimento da cadeia do álcool e do solvente utilizado. Esta observação pode ser relacionada com atividade específica das enzimas empregadas. Isto decorre do fato de que a *C.V.lipase* utilizada foi a enzima com maior atividade específica (3970 unidades/mg de proteína), seguido pela *Pseudomonas sp* (1900 unidades/mg de proteína) e a *lipase microbial* (1600 unidades/mg de proteína).

De acordo com a Tabela 15, o valor da constante de velocidade observada para a reação entre o octanoato de p-nitrofenila e o 1-pentanol em acetonitrila com *C.V.lipase* imobilizada é $4,56 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Utilizando *lipase Pseudomonas sp* e *lipase Microbial*, com atividades específicas inferiores que a da *C.V.lipase*, observou-se uma diminuição no valor da constante de velocidade observada ($3,70 \times 10^{-4}$ e $2,17 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ respectivamente).

Porém, como o meio reacional do sistema de organo-gel é muito mais complexo do que o meio contendo somente um solvente orgânico, ou mistura deles dados referentes ao coeficiente de difusão são úteis para tentar explicar as alterações nas velocidades das reações.

De acordo com a Tabela 8, os coeficientes de difusão para os ésteres (benzoatos de alquilas) em acetonitrila seguem a seguinte ordem crescente: benzoato de sec-butila ($D= 0,23 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$) < benzoato de cetila ($D= 0,36 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$) < benzoato de n-octila ($D= 0,54 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$) < benzoato de n-butila ($D= 0,65 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$) < benzoato de etila ($D= 1,4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$). Esta ordem crescente é semelhante à observada para as constantes de velocidade nas reações de transesterificação com este solvente: octanoato de sec-butila < octanoato de n-octila < octanoato de n-hexila < octanoato de n-pentila (Tabela 10). Conforme pode-se observar, os coeficientes de difusão e as constantes de velocidade para a reação de transesterificação em acetonitrila aumentam

a medida que o comprimento da cadeia carbônica do substrato diminui. Isto se deve ao fato do grau de interferência imposto pelas barreiras difusionais encontrados pelos substratos que aumentam com o aumento ou ramificação da cadeia alquílica lateral quando estes passam do meio reacional para o gel e vice-versa.

A constante de velocidade obtida na reação de transesterificação entre o octanoato de p-nitrofenila e o 2-butanol com enzimas imobilizadas em sistema MBG, mostra a baixa reatividade dos álcoois secundários em relação aos álcoois primários, evidenciando também a importância do impedimento estérico imposto pelas barreiras difusionais para substratos ramificados.

Um outro fator a ser considerado é o efeito da polaridade do meio. Embora os dois solventes utilizados na reação de transesterificação, 1,4-dioxano e acetonitrila, apresentem polaridades diferentes; não se observou diferenças significantes nos valores das constantes de velocidades observadas. Estas pequenas diferenças podem estar dentro da faixa de erro experimental. Por exemplo, considerando a reação entre o octanoato de p-nitrofenila e o n-pentanol em 1,4-dioxano e acetonitrila, os valores de k_{obs} são: $4,54 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ e $4,56 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Estes resultados podem estar também associados com o coeficiente de partição ($\log P$) das substâncias, o qual por sua vez está relacionado com a polaridade. A partir destes resultados, pode-se formular a seguinte hipótese para explicar os efeitos causados pelos solventes nestas reações: possivelmente, os solventes exercem uma ação sobre a estrutura da rede de gelatina, penetrando dentro da camada de água que estabiliza o biocatalisador ou retirando esta camada de água. Sendo assim, as pequenas diferenças nos valores das constantes de velocidades observadas para estes solventes (1,4-dioxano e acetonitrila) podem estar relacionados com a pequena diferença do $\log P$. Os valores de $\log P$ para o 1,4-dioxano e acetonitrila são: -1,10 e -1,33 respectivamente.

3.3.2 - IDENTIFICAÇÃO DO OCTANOATO DE n-PENTILA

Os dados analíticos e espectroscópicos para o produto obtido da transesterificação do octanoato de p-nitrofenila e o n-pentanol, estão mostrados na Tabela 16.

Tabela 16 - Dados de rendimento, Rf, infravermelho (IV) e de ressonância magnética nuclear ($^1\text{H-RMN}$) do octanoato de n-pentila.

Composto	Rendimento(%)	Rf ^(a)	IV ν -C=O(cm^{-1}) ^(b)	$^1\text{H-RMN}$ (ppm) -OCH ₂
octanoato de pentila	85	0,62	1738	4,2(t)

(a) eluente n-hexano : acetato de etila 15:1

(b) filme em cela de NaCl

A reação de transesterificação do octanoato de p-nitrofenila com n-pentanol foi realizada utilizando a *C.V. lipase* imobilizada em sistema MBG. O produto da reação, octanoato de n-pentila, foi deslocado do interior do meio catalítico para o solvente orgânico por difusão.

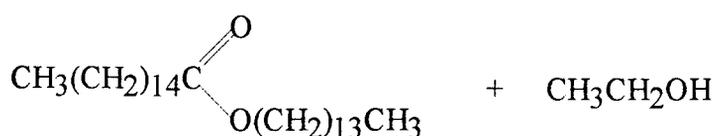
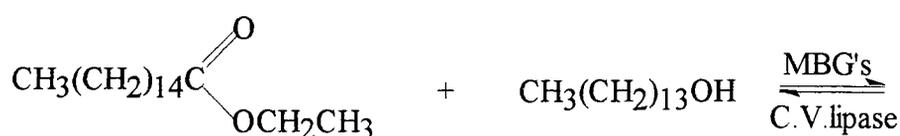
O produto, octanoato de n-pentila, foi obtido com rendimento de 85% o que mostra a eficiência da *C.V. lipase* como catalisador nas reações de transesterificação. No espectro de infravermelho (Figura 16) observou-se uma banda forte em 1738 cm^{-1} , que é característica de carbonila de ésteres alifáticos.

A análise por $^1\text{H-RMN}$ (Ressonância Magnética Nuclear de próton) também confirmou a obtenção do trans éster. O espectro mostra um triplete centrado em 4,2 ppm, que é característico do grupo metilênico (-CH₂-) ligado ao oxigênio do grupo éster (Figura 17).

Outras regiões de absorção no IV e outros picos no ^1H -RMN estão mostrados abaixo:

- **octanoato de n-amila** : IV (NaCl) (cm^{-1}) 2930, 2860, 1738, 1462, 1354, 1254, 1170. ^1H RMN (200 Mhz, CDCl_3 / TMS) δ (ppm) 1,0 - 2,4 (m, 26H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4$ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6$), 4,1 (t, 2H, CH_2).

Trabalhos anteriores, mostraram que este novo sistema de organogel (MBG) pode ser usado para imobilizar lipases e ser utilizado em reações de transesterificação. Por exemplo, a reação do palmitato de etila com o álcool mirístico foi estudada, e obteve-se o palmitato de miristila com rendimento de 30% (equação 14).⁽⁴⁵⁾



(eq. 14)

CAPÍTULO 4 - CONCLUSÃO

Analisando-se os objetivos estabelecidos (capítulo1), observa-se que os mesmos foram alcançados. A seguir, estão apresentadas as principais conclusões que foram obtidas a partir da execução deste trabalho.

- 1 - A velocidade de difusão é favorecida para ésteres de cadeia alquílica longa em meio apolar, visto que o coeficiente de difusão aumenta com o aumento da cadeia do substrato.
- 2 - O grau de impedimento impostos pelas barreiras difusionais é maior quando os substratos são ramificados (por ex. benzoato de sec-butila).
- 3 - O aumento da polaridade do meio favorece a difusão de substratos de cadeia carbônica pequena.
- 4 - A determinação do coeficiente de difusão, mostrou uma relação entre o rendimento da reação de esterificação ou transesterificação com a velocidade de difusão do substrato no organo-gel (MBG).
- 5 - O sistema de MBG utiliza pequena quantidade de enzima (10 mg / ml), bem menor que outros sistemas, e é um método que pode ser amplamente utilizado em solventes de baixa polaridade.
- 6 - Lipases imobilizadas em MBG resultaram num método bastante eficiente, na reação de transesterificação.
- 7 - A *C.V.lipase* quando imobilizada em sistema de organo-gel é a mais ativa como biocatalisador em reações de transesterificação, pois apresenta maior velocidade se comparada com outras lipases (*lipase Microbial* e *lipase Pseudomonas sp*).
- 8 - A medida que se aumenta a cadeia carbônica do álcool na reação de transesterificação a velocidade da reação diminui (kobs) o que também pode ser atribuído à efeito estéricos e uma maior dificuldade dos reagentes chegarem até a “ microgota” na microemulsão água-óleo, onde se encontra a enzima.

Concluindo, a determinação do coeficiente de difusão mostrou que as diferenças nos rendimentos das reações de esterificação, podem estar relacionadas com as interferências encontradas pelos substratos quando estes passam do meio para o organo-gel ou vice-versa; e o método de imobilização de enzimas (MBG) representa um significativo melhoramento no seu uso em meio orgânico. O procedimento descrito é rápido, simples e pode ser facilmente repetido.

4.1 - PERSPECTIVAS FUTURAS

A seguir serão apresentados algumas sugestões para otimização de alguns dos experimentos apresentados no capítulo 3.

Com relação a investigação de questões ainda pendentes sobre o sistema de organo-gel em reações de transesterificação, com enzimas imobilizadas, propõe-se:

- a) a reutilização do sistema nas reações de transesterificação, com objetivo de avaliar a perda ou não da atividade catalítica, bem como a sua estabilidade.
- b) alterar as condições das reações, variando por exemplo, a concentração e solvente.
- c) utilizar diferentes concentrações de enzimas para avaliar a relação entre velocidade versus concentração e determinar a constante catalítica.
- d) utilizar lipases de diferentes fontes e com atividades específicas variáveis
- e) determinar a velocidade de diferentes reações de transesterificação, por cromatografia gasosa.

Quanto ao desenvolvimento do experimento para determinar o coeficiente de difusão de ésteres em organo-gel, propõe-se:

- a) verificar a existência de uma possível relação entre o coeficiente de difusão e temperatura, aplicando esta metodologia para medidas do coeficiente de difusão de ésteres em temperaturas mais elevadas.

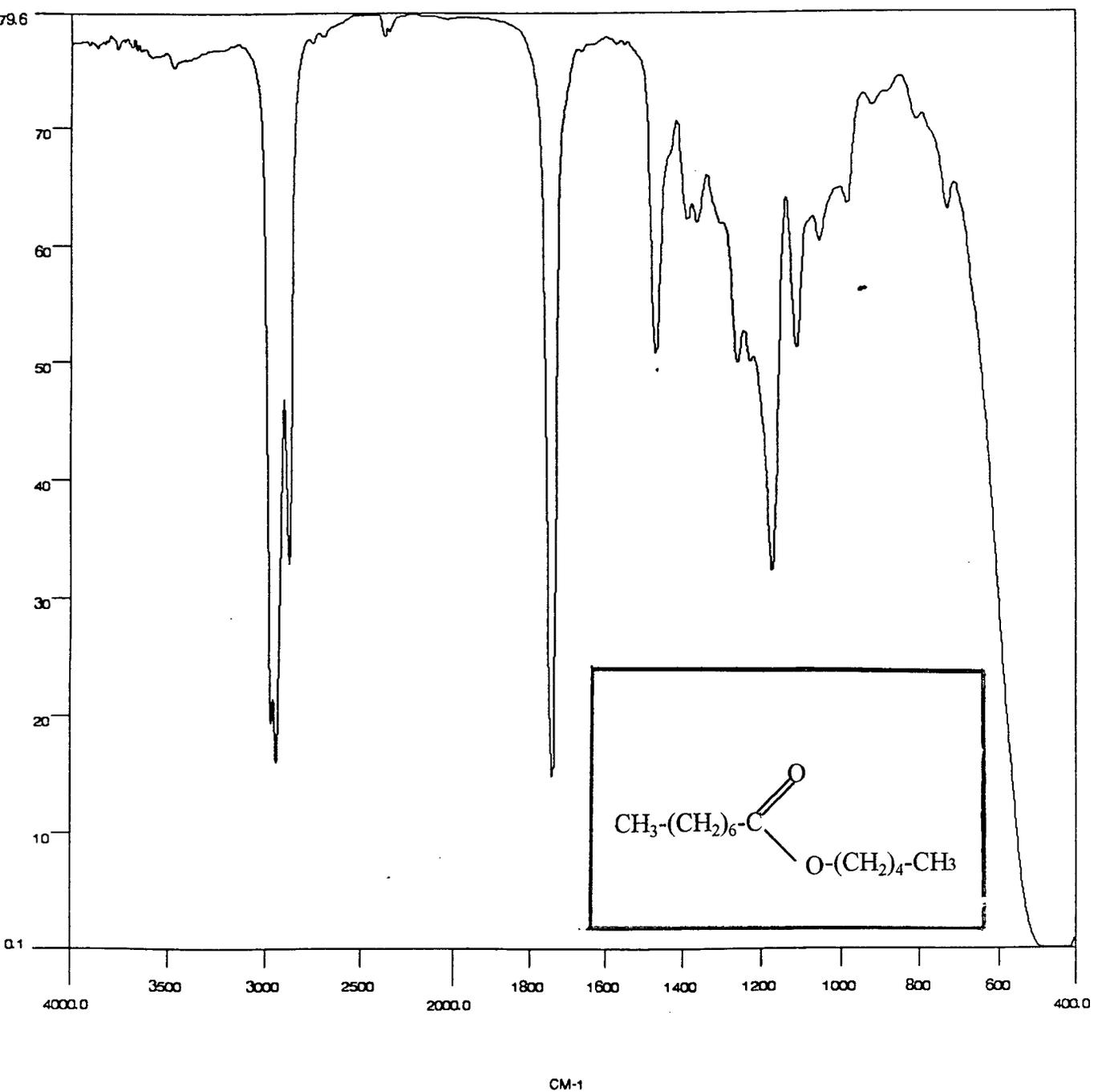


FIGURA 16 - Espectro de infravermelho do octanoato de n-pentila em filme em cela de NaCl.

CAPÍTULO 5 - BIBLIOGRAFIA

- 1 - NASCIMENTO, M. G., Vecchia, R. D., Jesus, P. C., e Aguiar, L. M. Z., Enzyme catalyzed esterifications in microemulsion based organo-gels. **T. Letters**, v.33, p.5891, 1992.
- 2 - CROOKS, J. E., Measurement of diffusion coefficients. **J. Chem. Ed.** v.66, p.614-615, 1989.
- 3 - FOREMAN, M. I., KELLY, I., LUKOWIECKI, G, A. A method for the measurement of diffusion constants suitable for studies of non-occluded skin., **J. Pharm. Pharmac.**, v.29, p.108-109, 1977. .
- 4 - CONSTANTINO, L., VOLPE, C. D., ORTONA, O., et al. Difusion in microemulsion systems. **J. Col. Inter. Sci.**, v.148, p.72-79, 1992.
- 5 - HADGRAFT, J., Calculations of drug release rates from controlled release devices. **Inst. J. Pharmaceut.**, v.2, p.177-194, 1979.
- 6 - ALBERY, W. J., COUPER, A. M., HADGRAFT, J., et al. Transport and kinetics in two phase systems. **J. Chem. Soc., Faraday Trans I**, v.70, p.1124-1131, 1974.
- 7 - KARSA, D. R., and STEPHENSON, R. A., Encapsulation and controlled release. **The Royal Society of Chemistry**, p.86-98, 1993.
- 8 - MOSKOVITS, M., DEREWLANY, L., A physical, chemistry experiment **J. Chem. Educ.**, v.15, p.45-52, 1976.
- 9 - IRINA, J., A spectrophotometric method for measuring diffusion coefficients. **J. Chem. Educ.**, v.57, p.676-677, 1980.
- 10 - CLIFFORD, B., OCHIAL, E. I., A practical and convenient diffusion apparatus. **J. Chem. Educ.**, 57, 678-679, 1980.

- 11 - GANCET, C. Catalysis with immobilized enzymes: hydrolysis and esterification by *Rhizopus arrhizus*. **Heterogeneous Catalysis and Fine Chemicals** 2nd int. Symp. held at Poitiers, France, 1990. p.62-69.
- 12 - GUTMAN, A. L., ZUOBI, K., GUIBE, J. E., Lipase catalysed hydrolysis of γ -substituted α -aminobutyrolactones. **T. Lett.**, v.31, p.2037-2038,1990.
- 13 - CHEN, S. C., WU, S. H., GIRDAUKAS, G., SIH, C. J., Quantitative analysis of biochemical kinetic resolution of enantiomers enzymes-catalysed esterifications water-organic solvent biphasic systems. **J. Am. Chem. Soc.**, v.109, p.2812-2817, 1987.
- 14 - BRADY, L., BRZOZOWSKI, A. M., DEREWENDA, Z. S. et al. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v.343, p. 767-770, 1990.
- 15 - BLOKMAN, H., MONSEN, TSUJITA, T., Lipid-lipid complexes: properties and effects on lipase binding to surfaces. **J. Am. Org. Chem. Soc.**, v. 65(6), p.891 - 896, 1988.
- 16 - JONES, J. B. Enzymes in organic synthesis. **Tetrahedron.**, v.42, p.3351-3403, 1986.
- 17 - KLIBANOV, A. M. Asymmetric transformations catalysed by enzymes in organic solvents. **Acc. Chem. Res.**, v.23, p.114-120, 1990.
- 18 - ZAKS, A., KLIBANOV, A.M. Substrate specificity of enzymes in organic solvents vs water is reverse. **J. Am. Chem. Soc.**, v.108, p.2767 - 2768, 1986.
- 19 - MURRAY, R. K., GRANNER, D. K., MAYES, P.A., **HARPER: Bioquímica Atheneu, SP, 6^oed.**, p.50-75, 1990.
- 20 - HAERING, G., LUISE, P. L. Hydrocarbon gels from water-in-oil

- microemulsion. **J. Phys. Chem.**, v.90, p.5892-5895, 1986.
- 21 - QUELLET, C., EICKE, H. F. Mutual gelation of gelatin and water-in-oil microemulsion. **Chimia.**, v.40, p.233-237, 1986.
- 22- QUELLET, C., EICKE, H. F. Some comments on the gelation of gelatin containing water/oil microemulsions. **J. Phys. Chem.**, v.91, p.4211- 4212, 1986.
- 23 - QUELLET, C., EICKE, H. F., GEHRKE, R. et. al. Evidence of fractal network formation in gelatin - w/o microemulsions. **Europhys. Lett.**, v.9, p.293-298, 1989.
- 24 - XU, G., QUELLET, C., EICKE, H. F. Synthesis of covalently crosslinked gelatin gels in percolating water-in-oil microemulsions. **Makromol. Chem. Rapid Commun.**, v.11, p.217-222, 1990.
- 25 - QUELLET, C., EICKE, H. F., SAGER, W. Formation of microemulsion-based gels. **J. Phys. Chem.**, v.95, p.5642-5655, 1991.
- 26 - ATKINSON, P. J., GRIMSON, M. J., HEENAN, R. K., et. al. Microemulsion based gels: a small-angle neutron scattering study. **Chem. Phys. Lett.**, v.151, p. 494-498, 1988.
- 27 - ATKINSON, P. J., GRIMSON, M. J., HEENAN, R. K., et al. Structure of microemulsion-based organo-gels. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.** p.1807-1809, 1989.
- 28 - ATKINSON, P. J., CLARK, D. C., HOWE, A. M. et al. Characterization of microemulsion-based organo-gels. **Progr. Colloid. Polym. Sci.**, v.84, p.129-132, 1991.
- 29 - PETIT, C., ZEMB, TH., PILENI, M. P., Structural study of microemulsion based gels at the saturation point. **Langmuir.** v.7, p.223-231, 1991.
- 30 - PETIT, C., ZEMB, TH., PILENI, M. P., Gelation of reverse micelles. **AIP Conf. Proc.**, v.226, p.509-517, 1991.

- 31 - OTTOLINA, G., CARREA, G., and RIVA S. Synthesis of ester derivatives chloramphenicol by lipase-catalyzed transesterification in organic solvents. **J. Org. Chem.** v.55, p.2366-2369, 1990.
- 32 - KLIBANOV, A. M., Enzymes that work in organic solvents. **Chemtech.** v.16, p.354-359, 1986.
- 33 - REES, G. D., NASCIMENTO, M. G., JENTA, T. R. J., et al. Reverse enzyme synthesis in microemulsion-based organo-gel. **Biochim. et Biophys. Acta.** v.1073, p.493-501, 1991.
- 34 - TAKAHATA, H., UCHIDA, Y., and MOMOSE, T. Transesterification-based enzymatic resolutions of racemic 3-hydroxy-4-pentenylurethanes in organic solvents. **T. Lett.**, v.33, p.3331-3332, 1992.
- 35 - BOSETTI, A., BIANCHI, D., CESTI, P., GOLINI, P., and SPEZIA, S., Enzymatic resolutions of 1,2-diols: Comparison between hidrolisis and transesterification reactions. **J. Chem. Soc. Perkin Trans.**, p.2395-2398, 1992.
- 36 - CAMBOU, B., KLIBANOV, A. M., 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.
- 37 - CAMBOU, B., KLIBANOV, A. M., Comparison of different strategies for the lipase-catalyzed preparative resolution of racemic acids and alcohols: Assymetric hydrolysis, esterification, and transesterification. **Biotech. Bioeng.** v.26 p.1449-1454, 1984.
- 38 - BAUMANN, K. D., Reações de compostos carbonílicos com ácido barbitúrico e 1,3-dimetilbarbitúrico. **Dissertação de Tese de Mestrado**, UFSC - 1992.
- 39 - VOGEL, A. **Textbook of practical chemistry**. Fourt edition, longman Inc., New York, EUA, 1978.

- 40 - VECCHIA R. D Síntese de ésteres alifáticos catalisada pela *C.V. lipase* imobilizada em microemulsão água-óleo em sistema de gel. **Dissertação de Tese de Mestrado** - UFSC.,1994.
- 41 - AGUIAR, L. M.,Z., Estudo da atividade enzimática e das propriedades físico-química do organo-gel através de reações catalisadas pela *C. V. lipase*. **Dissertação de Tese de Mestrado** - UFSC.,1992.
- 42 - REES, G. D., and ROBINSON, B.H., Microemulsion and organogels: Properties and novel applications. **Adv. Mat.** v.5, p.608-618, 1993.
- 43 - WANG, Y. F., LALONDE, J. J., MOMANGAN, M. et al. Lipase-catalized irreversible transesterifications using enol esters as acylating reagents: Preparative enantio-and regioselective synthesis of alcohols, glycerol derivatives, sugars, and organometallics. **J. Am. Chem. Soc.** v.110, p. 7200-7205, 1988.
- 44 - HAYES, D. G., and GULARI, E., Esterification reactions of lipase in reverse micelles. **Biotech. Bioeng.** v.35, p.793-801, 1990.
- 45 - NASCIMENTO, M. G., Resultados não publicados.
- 46 - KISE, H., HAYAKAWA, A., NORITOMA, H., Proteased-catalyzed synthetic reactions and immobilization - activation of the enzymes in hydrophilic organic solvents. **J. Biotechnology.** v.14, p.239-254, 1990.
- 47 - DDETZ, J. S., and ROZZEL, J. D., Enzyme-catalysed reactions in non-aqueous media. **Tibtech.** v.6, p.15-19, 1988.
- 48 - CAPITANI, D., SEGRE, A. L., and HAERING, G., LUISE, P. L., Mobility measurements in microemulsion gels. **J. phys. Chem.**, v.92, p.3500-3504, 1988.
- 49 - ZULAUF, M., EICKE, H. F., Inverted micelles and microemulsion in the ternary system $H_2O/Aerosol-OT/isooctane$ as studied by photon correlation spectroscopy. **J. Phys.Chem.**, v.83, p.480-485, 1979.

- 50 - MENGER, F. M., YAMADA, K. Enzyme catalysis in water pools. **J. Am. Chem. Soc.**,v.101,n.22,p.6731 - 6733, 1979.
- 51 - KATAYAMA, S., MYOGA, A., and AKAIORI Y. Swelling behavior of amphoteric gel and the volume phase transition. **J. Phys. Chem.**, v.96, p.4698-4701, 1992.
- 52 - CLELAND, W. W., What limits the rate of an enzyme-catalyzed reaction. **Acc. Chem. Res.** v.08, p.145-151, 1975.
- 53 - FLETCHER, P. D. I., and ROBINSON, B. H., and FREEDMAN, R. B., et al. Activity of lipase in water-in-oil microemulsion. **J. Chem. Soc. Faraday Trans.**,v.81, p.2667-2679, 1985.
- 55 - KLIBANOV, A. M., SAMOKHIN, G. P., MARTINEK, K et al. A new approach to preparative enzymatic synthesis. **Biotech. Bioeng.**, v.19, p.1351-1361, 1977.