

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

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

**SÍNTESE DE ÉSTERES ALIFÁTICOS CATALISADA PELA
CV LIPASE IMOBILIZADA EM MICROEMULSÃO
ÁGUA-ÓLEO EM SISTEMA DE ORGANO-GEL**

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

ROBERTO DALLA VECCHIA

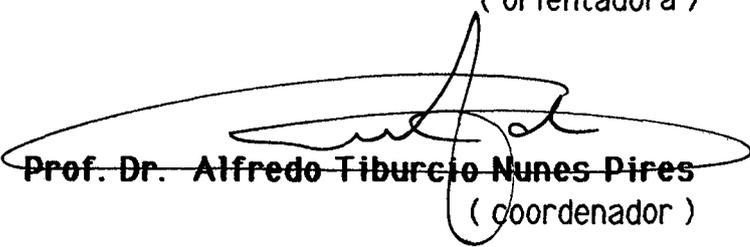
**FLORIANÓPOLIS
SANTA CATARINA - BRASIL
FEVEREIRO DE 1994**

**SÍNTESE DE ÉSTERES ALIFÁTICOS CATALISADA PELA CV LIPASE
IMOBILIZADA EM MICROEMULSÃO ÁGUA-ÓLEO EM SISTEMA DE ORGANO-GEL.**

ROBERTO DALLA VECCHIA

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do grau de Mestre em Ciências, especialidade em química orgânica, e aprovada em sua forma final pela orientadora e demais membros da banca examinadora.

M. Graça Nascimento
Profa. Dr. Maria da Graça Nascimento
(orientadora)


Prof. Dr. Alfredo Tiburcio Nunes Pires
(coordenador)

banca examinadora:

M. Graça Nascimento.
Profa. Dr. Maria da Graça Nascimento

Sônia Maria Hickel Probst
Profa Dr. Sônia Maria Hickel Probst

Ricardo
Prof. Dr. Ricardo José Nunes

**À minha mãe, Elena Maria, aos
amigos e minha orientadora.**

AGRADECIMENTOS

- A minha mãe, pelo seu amor.
- A minha família pelo apoio financeiro durante a graduação e pela oportunidade de realizar meus estudos.
- A professora Maria da Graça Nascimento pela orientação, incentivo e dedicação durante a realização do trabalho.
- Ao professor Brian H. Robinson da School of Chemical Sciences, University of East Anglia, Norwich, Inglaterra pela gentileza de ceder-nos as enzimas no início de nossos trabalhos, sem estas o trabalho seria inviabilizado.
- Aos professores Alfredo T. Nunes Pires e Valdir Soldi pelo acolhimento em seu laboratório.
- Aos amigos Beta, Sônia, Bene, Adriana, Sônia Corina, Lúcia, Rute, Rejane, Rogério, Theo, José Carlos, Thanar, Marcos e Alvaro pela amizade.
- Aos funcionários do departamento de Química e da biblioteca setorial do CFM.
- Ao departamento de Química da UFSC onde se realizou este trabalho.
- Ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

Enzimas solubilizadas em microemulsão água-óleo em sistema de organo-gel retém sua atividade catalítica e sua especificidade.

Neste trabalho verificou-se a eficiência catalítica da *Chromobacterium viscosum*, CV lipase, imobilizada em organo-gel na síntese de ésteres alifáticos derivados do ácido oleico em n-hexano. Parâmetros, tais como, tamanho da cadeia e ramificações próximas ao centro nucleofílico do álcool foram analisados e associados com a eficiência catalítica da enzima imobilizada neste sistema.

A atividade de lipases de cinco diferentes fontes, imobilizado no organo-gel, foi verificada na esterificação do ácido oleico com 1-pentanol a 25 °C em n-hexano. A mesma reação foi utilizada para demonstrar que a CV lipase imobilizada neste sistema pode ser utilizada em repetidas sínteses, no mínimo 15 vezes, sem perda considerável da atividade.

Os resultados obtidos foram comparados com os da literatura a fim de mostrar a eficiência deste sistema em comparação com os outros já descritos para a utilização de enzimas em solvente orgânico.

ABSTRACT

Enzymes solubilized in water-in-oil microemulsions based in organo-gel, retain their catalytic activity and also their specificity.

In this work the catalytic efficiency of *Chromobacterium viscosum* lipase, immobilized in organo-gel, was analysed through the synthesis of aliphatic esteres derived from oleic acid in n-hexane, as an organic solvent at 25 °C. Parameters such as chain length and branching near the nucleophilic centre of the alcohols, were associated with the catalytic efficiency of the enzyme immobilized in this system.

The activity of lipases from five different sources immobilized in organo-gel, was studied in the esterification of oleic acid with 1-pentanol at 25 °C. The same reaction was utilized to show that CV lipase immobilized in organo-gel can be re-used, for at least 15 times without loss of its activity.

The obtained results were compared with some reported in the literature, in order to show the efficiency of this system when compared with others previously described.

ÍNDICE GERAL.

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. PRINCIPAIS MÉTODOS PARA USO DE ENZIMAS EM SOLVENTE ORGÂNICO.....	2
1.1.1. Sistema bifásico.....	2
1.1.2. Enzimas Fisicamente Imobilizadas ou Quimicamente Modificadas.....	4
1.1.3. Enzimas em Suspensão.....	5
1.1.4. Enzimas em Micelas Reversas.....	7
1.1.5. Enzimas em Organo-gel.....	19
1.2. LIPASES- ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL, SÍTIO ATIVO E USOS.....	26
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	33
2.1. Componentes do Organo-gel, Reagentes e Solventes.....	33
2.2. PREPARAÇÃO DO ORGANO-GEL.....	34
2.2.1. Procedimento Geral para Preparação do Organo-gel para Síntese.....	34
2.2.2. Preparação do Meio Reacional.....	34
2.2.3. Purificação dos Produtos.....	35
2.2.4. Identificação dos Produtos.....	35
2.2.5. Diagrama de Fases do Organo-Gel em n-Hexano.....	35

3.	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....	36
3.1.	Diagrama de Fases do Organo-Gel de n-Hexano.....	36
3.2.	Síntese de Ésteres Utilizando CV Lipase Imobilizada em Organo-Gel.....	41
3.3	Atividade de Lipases de Diferentes Fontes.....	48
3.4.	Reutilização do Catalisador.....	49
3.5.	Uso de Coluna com Fluxo Contínuo.....	50
4.	CONCLUSÃO.....	53
5.	BIBLIOGRAFIA.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1.	Estrutura da micela reversa de AOT [60].....	7
1.2.	Estrutura do surfactante AOT (D1-2-etilhexil-sulfosuccinato de sódio).....	8
1.3.	Diagrama de fases esquemático de uma solução água/óleo/surfactante.....	9
1.4.	Efeito da quantidade de água e surfactante em um sistema de micela reversa.....	10
1.5.	Dependência da concentração máxima de proteína em função do grau de hidratação do surfactante.....	12
1.6.	Representação esquemática da interação de substratos distribuídos em um sistema de micelas reversas com enzimas hidrofílicas, enzima interfacial e enzima hidrofóbica.....	13
1.7.	Representação esquemática do complexo rodopsina-fosfolipídio em n-hexano.....	13
1.8.	Modelos de solubilização de moléculas de proteínas em micelas reversas.....	15
1.9.	Esquema da expulsão da água da cavidade da micela de AOT (modelo do tamanho fixo).....	16
1.10.	Esquema da eliminação da flutuação espontânea da estrutura da proteína dentro de uma micela reversa.....	17
1.11.	Modelo proposto para a estrutura do organo-gel (modelo da percolação [86][98].....	21
1.12.	Modelo proposto para a estrutura do organo-gel com formação de canais de gelatina em água envolvidos por uma camada de surfactante [93][94][98].....	22

1.13.	Modelo proposto para a estrutura do organo-gel com formação de uma rede de gelatina em água em equilíbrio com as microgotas de microemulsão [95][98].....	23
1.14.	Estrutura da lipase pancreática humana [105].....	27
1.15.	Modelo do sítio ativo da lipase da <i>Pseudomonas fluorescens</i> [107].....	28
1.16.	Modelo do sítio ativo postulado para a lipase da <i>Pseudomonas fluorescens</i> [107].....	29
1.17.	Estrutura do sítio ativo da lipase do <i>Rhizomucor miehei</i> na presença do N-hexilclorofosfonato de etila [108].....	30
1.18.	Representação esquemática do complexo tetraédrico enzima substrato da lipase do <i>Rhizomucor miehei</i> [108].....	31
1.19.	Diagrama representativo representando a mudança conformacional da lipase do <i>Rhizomucor miehei</i> [108].....	32
3.1.	Diagrama de fases do organo-gel em n-hexano.....	37
3.2.	Diagrama de fase do organo-gel em ciclo-hexano.....	39
3.3.	Espectro de infravermelho do oleato de butanoíla em filme.....	46
3.4.	Espectro de ¹ H-RMN do oleato de butanoíla.....	47
3.5.	Reutilização da CV lipase imobilizada em organo-gel.....	50
3.6.	Coluna de fluxo contínuo contendo organo-gel.....	51

ÍNDICE DE TABELAS

3.1.	Síntese de ésteres catalisada pela CV lipase em organo-gel.....	44
3.2.	Dados espectrais de ^1H -RMN e infravermelho dos ésteres sintetizados em organo-gel.....	45
3.3.	Esterificação do ácido oleico com 1-pentanol com lipases de diferentes fontes	48
3.4.	Reação em coluna de fluxo contínuo para a esterificação do ácido oleico com 1-pentanol.....	51

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadores de natureza proteica, produzidas pelos organismos vivos. Nos sistemas biológicos, constituem a base das complexas e variadas reações que caracteriza os fenômenos vitais. Diversos processos no metabolismo animal são regidos pelas enzimas e estes se realizam em condições favoráveis para o indivíduo, sem liberação brusca de energia, a temperaturas fixas, num meio de pH e concentração salina praticamente constante. As enzimas produzidas pelos organismos vivos só catalisam, habitualmente, um tipo de reação ou uma determinada reação. As enzimas tem especificidade tão marcada que, em geral, atuam exclusivamente sobre substâncias de configuração precisa, por exemplo, só reagem com os amino ácidos que têm seu carbono α assimétrico, com configuração L e não revelam a menor atividade sobre formas idênticas desses amino ácidos que apresentam configuração do tipo D.

As enzimas representam as substâncias encarregadas de graduar a velocidade de determinadas reações no interior das células. Como nas diversas células se realizam uma infinidade de reações, deduz-se que existem milhares de enzimas.

A utilização das enzimas como catalisadores em síntese orgânica vem sendo explorada a alguns anos [1][2][3]. O interesse em utilizá-las como catalisadores é devido a essa versatilidade e condições suaves em que realizam as reações. A alta estereo e regioseletividade frente a substratos é também característica das enzimas [4]. Contudo, tem-se encontrado algumas dificuldades em incluí-las no arsenal de métodos sintéticos. Frequentemente as enzimas catalisam as reações em meio aquoso, mas a água não é um meio ideal para muitos processos orgânicos. Para a química preparativa, seria melhor utilizar conversões enzimáticas em solvente orgânico por várias razões [5] [38]:

- substratos orgânicos dissolvem-se melhor em meio orgânico do que em água;
- a água pode participar de reações laterais indesejáveis;
- o equilíbrio termodinâmico de muitos processos são desfavoráveis em água;
- a recuperação dos produtos em soluções aquosas são muitas vezes difíceis e caros;
- as enzimas podem ser mais estáveis em solvente orgânico do que em água

Pesquisas nesta área tem mostrado que muitas, senão todas as enzimas, podem catalisar reações em solvente orgânico contendo ou não água. Os principais métodos de síntese utilizando enzimas como catalisadores em solvente orgânico são: sistemas bifásicos, enzimas fisicamente imobilizadas ou quimicamente modificadas, enzimas em suspensão, enzimas em micelas reversas e enzimas em organo-gel.

1.1 – PRINCIPAIS MÉTODOS PARA USO DE ENZIMAS EM SOLVENTE ORGÂNICO.

1.1.1 – SISTEMA BIFÁSICO

Reese e Mandels em 1958 [6], foram os pioneiros a trabalhar com enzimas em solvente orgânico. O método consistia de um sistema contínuo de reação com a enzima em uma coluna de duas fases. A enzima (β -glucosidase ou invertase) era dissolvida em um meio aquoso e retida em coluna por uma fase estacionária, um sólido hidrofílico, tal como celulose e a fase móvel, num solvente orgânico (1-butanol), no qual estavam dissolvidos os substratos.

O sistema bifásico propriamente dito, segundo Semenov [7], foi utilizado pela primeira vez em reações biocatalíticas por Cremonesi e colaboradores, em 1973 [8] onde os autores testaram a atividade catalítica da β -hidroxiesteróide desidrogenase na desidrogenação de esteróides e a enzima demonstrou atividade por um longo período com alguns solventes orgânicos, tais como, 1-butanol, diclorometano e éter etílico. Buckland e colaboradores, em 1975 [9] utilizaram um sistema bifásico para conversão do colesterol em colesteno-4-eno-3-ona utilizando a *Nocardia sp.*

Martinek e colaboradores, em 1977 [15] propuseram que o sistema bifásico alteraria o equilíbrio em reações catalisadas por enzimas. A enzima se localizaria na fase aquosa na qual era protegida de desativação causada pelo solvente orgânico, a solubilidade do solvente orgânico em água seria baixa, provavelmente menor do que 1% e portanto a enzima não perderia a atividade catalítica e a sua especificidade. O equilíbrio seria alterado em direção aos produtos, pois estes estariam relativamente melhor solvatados na fase orgânica do que o material de partida. Alguns trabalhos descrevem vários aspectos físico-químicos, tal como, a mudança do equilíbrio termodinâmico de uma reação nestes sistemas [10][11][12][13][14].

Klibanov e colaboradores, em 1977 [16] efetuaram a síntese do etil N-acetil-L-triptofano em etanol e N-acetil-L-triptofano em um sistema bifásico água-clorofórmio. Quase 100% do produto foi obtido na preparação destes ésteres de amino-ácidos catalisada pela quimotripsina. Alguns autores tem usado outros solventes orgânicos tais como: heptano ou éter diisopropílico [17], hexano ou benzeno [18] para aumentar o rendimento das reações. Nestas condições a lipase foi insolúvel no solvente orgânico e portanto não desnaturada pelo mesmo, retendo assim sua atividade catalítica.

As principais vantagens do sistema bifásico são[12]:

- reação de substratos insolúveis em água, podem ser feitas em volume reduzido de uma mistura de reação;
- o produto pode ser facilmente separado do biocatalisador;
- a inibição da enzima por substratos ou produtos é minimizada devido a sua baixa concentração na fase aquosa, onde esta se localiza;
- enzimas hidrolíticas podem ser usadas em reações de transesterificação, síntese de peptídeos e reações de esterificações visto serem estas reações termodinamicamente desfavoráveis em meio aquoso.

As desvantagens deste sistema são:

- inativação ou inibição da enzima pelo solvente (minimizada pela escolha do solvente[12]);
- sistema em agitação permante, para acelerar a reação;
- perda da atividade enzimática a cada repetição.

O uso deste sistema em síntese é demonstrado por alguns autores, tais como: síntese de ésteres e glicerídeos catalisada por *Rhizopus arrhizus* [17], síntese de ésteres e glicerídeos catalisada por enzima em uma célula de fungo em um sistema de reação contínua [18], preparação de ésteres e álcoois opticamente ativos por transesterificação estereoseletiva catalisada por esterase em meio orgânico [19] e obtenção de compostos ópticamente ativos por transesterificação [20].

1.1.2 - ENZIMAS FISICAMENTE IMOBILIZADAS OU QUIMICAMENTE MODIFICADAS.

Marlot e colaboradores, em 1985 [21] utilizaram várias lipases imobilizadas em suportes hidrofílicos, tais como: esferosil XOB 015 e esferosil XOB 075, celite, vidro poroso, alumina, titânia e poliuretano na síntese de butiratos e lauratos de metila utilizando heptano como solvente.

Em 1986, Gillies e colaboradores [22] utilizaram lipase da *Candida cylindracea* absorvida em sílica gel, para síntese de butiratos de etila em heptano. Neste caso a atividade da enzima diminuiu durante as repetições devido a hidratação.

Em 1990, Gancet [23] utilizou célula morta de micélio do *Rhizopus arrhizus*, que é um sistema natural de lipase imobilizada, na hidrólise e síntese de ligações éster em solvente orgânico, e este fungo com o catalisador mostrou alta eficiência e estabilidade operacional. Outros suportes foram desenvolvidos e utilizados em síntese orgânica: agarose [24], náilon [25], *hyflo super cell* [26].

Em 1984, Inada e colaboradores [27] modificaram a lipase da *Pseudomonas fluorescens* e *Candida cylindracea* com polietileno glicol e estas foram facilmente dissolvidas em solventes orgânicos para síntese de ésteres. O mesmo sistema foi utilizado por Kadera e colaboradores em 1986 [28] e Nishio e colaboradores em 1988 [29], na preparação de ácidos carboxílicos α -substituídos utilizando a lipase da *Candida cylindracea* em benzeno e lipase da *Pseudomonas fragi* 22.39B na síntese de ésteres de ácidos graxos utilizando benzeno e hidrocarbonetos clorados como solvente, respectivamente. Em 1990 [30] Inada publicou uma revisão sobre o uso de enzimas modificadas com polietileno glicol em processos biotecnológicos.

Takahashi e colaboradores, em 1987 [31] utilizaram lipase magnética (partículas de Fe_3O_4 revestidas com lipase, proveniente da *Pseudomonas Fragi*, modificada com polietileno glicol) dispersa em solventes orgânicos, tais como, benzeno e 1,1,1-tricloroetano para síntese de lauratos de laurila.

Suckling [32] analisou os dois métodos , mencionados anteriormente, e concluiu que a técnica de imobilização física impõe uma barreira para os substratos encontrarem o sítio ativo da enzima e a modificação química além de alterar o ambiente da enzima, pode restringir o acesso do substrato ao sítio ativo. Holmberg [33] analisando o efeito da polaridade do meio na reatividade de aminoácidos em sílica concluiu que a imobilização covalente de uma proteína resulta na redução da atividade biológica. A razão para isto é que a ligação na superfície do sólido ocorre ao acaso e isto interfere em partes vitais da molécula, tal como, o sítio ativo.

Alguns autores vêm utilizando esse método de imobilização para os mais diversos tipos de reações de síntese em solvente orgânico tais como: síntese de ésteres de álcoois terpênicos catalisada por lipase [34], reações de acilação em n-hexano usando lipase em glicerol [35], modificação da lipase por diferentes polímeros sintéticos para uso em clorofórmio [36] e identificação enzimática de ésteres diastereoisoméricos [37].

1.1.3 – ENZIMAS EM SUSPENSÃO.

Em 1986, Klivanov [38] utilizou pela primeira vez enzimas em estado sólido para reações em meio orgânico. O sistema foi denominado como "reações enzimáticas em suspensão em solvente orgânico". No mesmo ano, o autor publicou uma revisão dos primeiros trabalhos realizados pelo seu grupo de pesquisa [39] tais como: acilações regioseletivas de glicóis catalisada por lipase [40], acilações regioseletivas de açúcares catalisada por lipase [41], transesterificações e esterificações assimétricas para obtenção de álcoois, ácidos e ésteres ópticamente ativos [42], oxidação regioespecífica de fenóis catalisada pela polifenol oxidase [43] entre outros [44][45].

Este mesmo sistema foi utilizado por vários autores para catálise enzimática em solventes orgânicos nos últimos anos [46][47][48][49][50].

Para que a enzima em pó, em suspensão, exerça uma atividade catalítica aceitável algumas regras devem ser seguidas [51]:

- solventes hidrofóbicos são melhores que os hidrofílicos;
- algumas enzimas requerem a adição de água ao solvente orgânico seco;
- a enzima é liofilizada a partir de soluções aquosas a pH ótimo para a atividade enzimática;
- como as enzimas são insolúveis, em quase todos os solventes orgânicos, as partículas de enzima devem ser suficientemente pequenas e sua suspensão deve ser continuamente agitada para minimizar as limitações difusionais.

As vantagens deste sistema comparado com o sistema bifásico são:

- simplicidade metodológica;
- possibilidade de aumento na estabilidade da enzima;
- possibilidade de mudança na especificidade do substrato;
- facilidade de isolamento da enzima do meio reacional (por filtração) e sua subsequente reutilização.

As desvantagens deste sistema são as seguintes:

- inibição da atividade enzimática pelo solvente (sensibilidade da enzima é diferente para cada solvente);
- necessidade de agitação da suspensão;
- concentração enzimática alta, variando em alguns trabalhos de 2 g/ml [50] a 800 mg/mL [49];
- perda em massa da enzima frente a cada repetição.

1.1.4 - ENZIMAS EM MICELAS REVERSAS

Micelas reversas [52] são agregados esferoidais os quais são formados quando certos surfactantes são dissolvidos em solventes apolares. O surfactante apresenta duas regiões distintas: uma hidrofóbica formada por uma longa cadeia contendo de 8 a 18 átomos de carbono, chamada "cauda", e uma outra hidrofílica formada por um grupo iônico ou polar sem carga, chamada "cabeça". Dependendo da natureza do grupo de cabeça, o surfactante pode ser classificado em catiônico, aniônico, não aniônico ou neutro [53].

Nas micelas reversas, a estrutura do agregado consiste de um núcleo polar formado pelas "cabeças" do surfactante e na superfície situam-se os grupos hidrofóbicos (cauda) em contato com o solvente orgânico (figura 1.1). Devido a esta dualidade estrutural, as micelas reversas têm a capacidade de solubilizar água em seu interior.

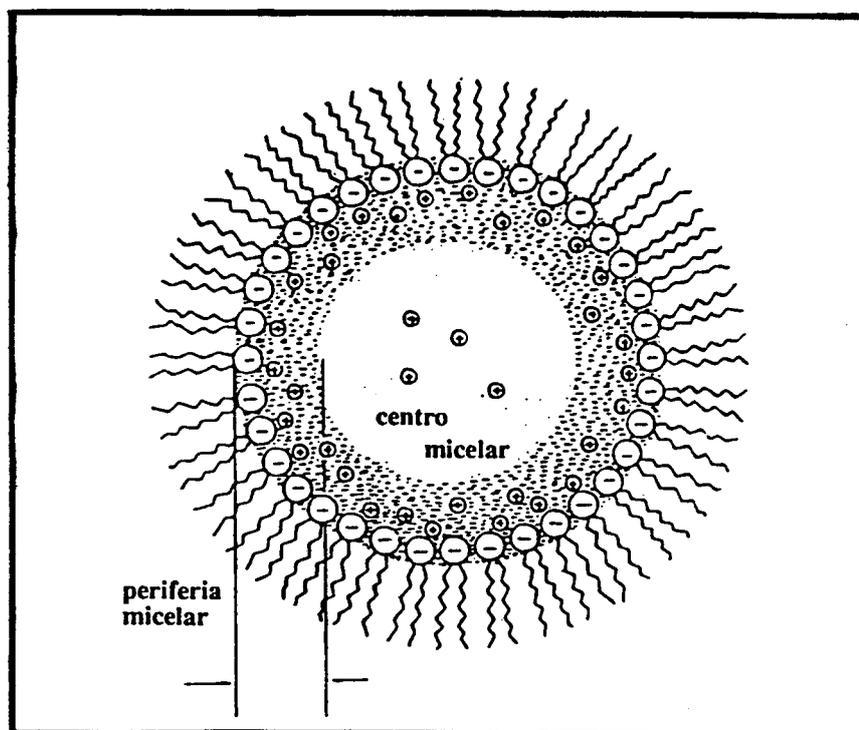


FIGURA 1.1 - Estrutura da micela reversa de Aerosol-OT [60].

A formação de micelas reversas resulta num meio microscópico em solução com propriedades físico-químicas (tais como polaridade, viscosidade, transparência óptica) muito diferentes dos sistemas aquosos comuns. Esta é uma das razões pelas quais a micela reversa altera, algumas vezes drasticamente, a velocidade e o mecanismo de muitas reações [54][55][56]. Estas alterações tem sido atribuídas à mudanças na reatividade e/ou nas concentrações locais dos reagentes, resultantes das interações entre as espécies reativas e a superfície micelar.

A formação da micela reversa é dependente da concentração dos seus três componentes: água, óleo (solvente orgânico) e surfactante. Na realidade, a micela reversa é uma das possibilidades que um sistema de microemulsão pode assumir [57]. A palavra microemulsão tem um significado amplamente diversificado causando equívocos e confusões. Segundo Danielsson [58], a microemulsão é definida como um sistema de água, óleo (solvente orgânico) e surfactante, que forma uma solução líquida, ópticamente isotrópica e termodinamicamente estável. Esta definição abrange as micelas reversas definidas anteriormente.

Um dos surfactantes mais apropriados para a formação de microemulsão água-óleo é o Aerosol-OT (Di-2-etilhexil-sulfosuccinato de sódio) (figura 1.2).

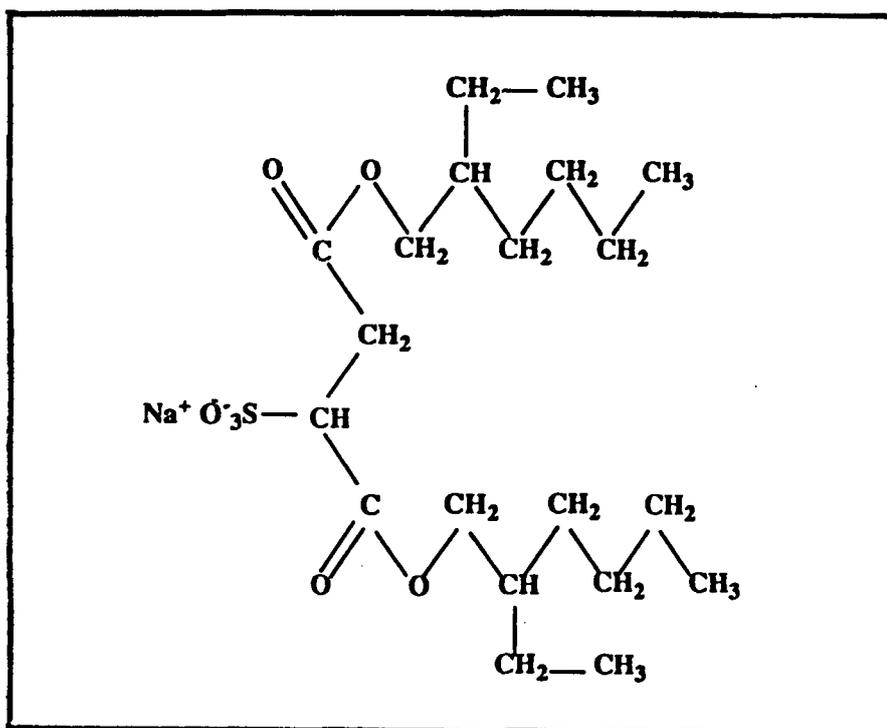


FIGURA 1.2 - Estrutura do surfactante Aerosol-OT (Di-2-etilhexil-sulfosuccinato de sódio).

As principais características do Aerosol-OT são [59]:

- dissolve-se em óleo a uma temperatura relativamente baixa e solubiliza grande quantidade de água. Por outro lado, dissolve-se em água a uma temperatura relativamente alta e solubiliza uma grande quantidade de óleo;
- possui propriedades hidrofílicas-lipofílicas melhor balanceadas que os demais surfactantes iônicos, por possuir duas cadeias hidrocarbônicas;
- sua camada fica essencialmente localizada na interface óleo/água, podendo assumir uma grande variação de curvatura [60];
- uma molécula de surfactante é hidratada por 12 moléculas de água (água ligada)[61].

Existem basicamente dois tipos de microemulsão [57]: microemulsão óleo-água (O/W) e microemulsão água-óleo (W/O) (figura 1.3). A microemulsão água-óleo forma-se preferencialmente quando a solução é rica em óleo e a microemulsão óleo-água forma-se quando a solução é rica em água. O tamanho das microgotas nas microemulsões variam de 1 a 10 nm. Quando as microgotas em sistemas água-óleo são pequenos as vezes são chamadas de micelas reversas. A transição micela reversa para microemulsão, segundo alguns autores [62][63] para micelas de Aerosol-OT, ocorre a uma fração molar de $[H_2O]/[AOT]$ em torno de 10. Um valor semelhante foi estabelecido para esta transição em sistemas água/oleatos de potássio/benzeno [64]. A linha divisória entre micela e microemulsão não é ainda muito clara.

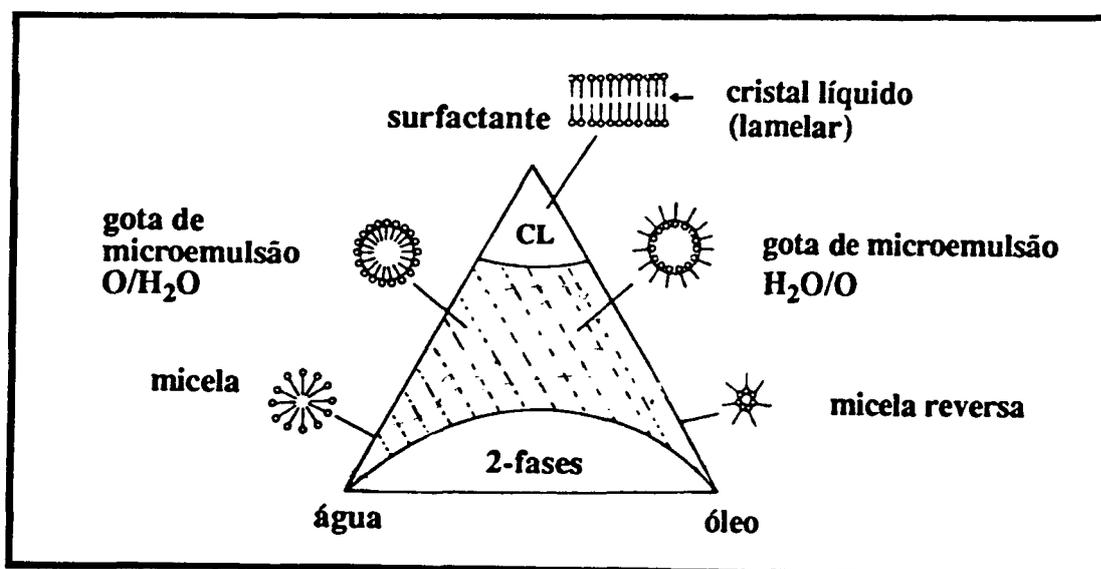


FIGURA 1.3 - Diagrama de fase esquemático de uma solução água/óleo/surfactante (região sombreada representa o domínio da microemulsão) [57].

Estudos estruturais [64] de micelas de Aerosol-OT por espectroscopia de TF-IR (infravermelho com transformada de Fourier), mostraram que no interior da micela existem três "tipos" de água coexistindo no "coração" aquoso da microgota. Estas são: água "ligada", que compõe a camada de hidratação primária e secundária do surfactante, água "livre", que fica preenchendo o restante da cavidade da micela reversa e por último a água "bloqueada" na interface. A estrutura e as propriedades (acidez, microviscosidade e polaridade) destes três tipos de água tem sido estudada por vários autores [65][66][67].

As propriedades físicas e estruturais de uma microemulsão são dependente da razão molar de água e surfactante, denominada de W_0 ou R ($W_0 = [H_2O]/[surfactante]$) [68]. Se a concentração de surfactante permanecer constante e a concentração de água aumentar, a dimensão micelar aumenta. Com o aumento proporcional das concentrações de surfactante e água o número de micelas aumenta mas a dimensão da micela é constante. Finalmente, se a concentração de surfactante aumentar e a concentração de água for constante ocorrerá um aumento do número de micelas e uma diminuição do tamanho micelar (figura 1.4).

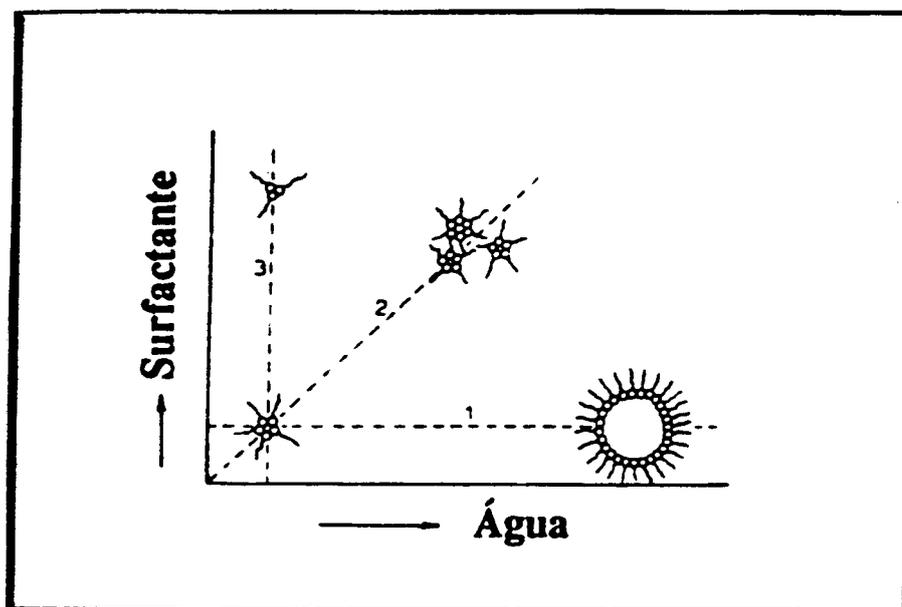


FIGURA 1.4 - Efeito da quantidade de água e surfactante em sistema de micela reversa: (1) concentração do surfactante é constante, $[H_2O]$ aumenta (aumenta o grau de hidratação): dimensão micelar aumenta e o número de micelas diminui; (2) $[surfactante]$ e $[H_2O]$ aumentam em proporções iguais (grau de hidratação é constante): dimensão micelar permanece constante e o número de micelas aumenta; (3) $[surfactante]$ aumenta, $[H_2O]$ é constante (grau de hidratação diminui): a dimensão micelar diminui e o número de micelas aumenta, [71].

A reatividade e a conformação de proteínas solubilizadas em micelas reversas, mudaria em função dos parâmetros micelares, em particular em função do W_0 . Com o aumento do W_0 , ou seja, com o aumento da quantidade de água no sistema, as propriedades físico-químicas entre a água micelar e a água comum ficam menos pronunciadas, e a proteína contida na micela pode ser vista como um microreator, cujas propriedades físicas podem ser continuamente modificadas por simples controle da quantidade de água presente no sistema micelar [60][69].

A atividade catalítica de enzimas em micelas reversas, foi demonstrado primeiramente por Martinek e colaboradores em 1977 [70], que utilizaram a quimotripsina e a peroxidase solubilizadas em micelas de Aerosol-OT em octano (ou benzeno), levados pelo fato de que a enzima neste sistema seria solubilizada no interior da micela reversa protegida da desnaturação, causada pelo solvente orgânico, pela camada de surfactante.

Após este trabalho iniciou-se uma extensa pesquisa neste campo. Os grupos mais ativos nesta área são os de: Martinek, em Moscou; Robinson, na Inglaterra; Laane, nos Países Baixos; Balasubramanian, na Índia e alguns grupos na França, tais como os de Pileni, Waks, Biellmann.

Segundo Martinek, a solubilização de uma proteína em micelas reversas ocorre espontaneamente [71], pela adição simples da enzima liofilizada ou a injeção de uma solução de proteína dentro de um sistema contendo solvente orgânico, água e surfactante. A agitação do sistema é necessária para estabelecer o equilíbrio mais rapidamente.

Quando uma proteína é solubilizada neste sistema, alguns fatos devem ser levados em conta. Para valores baixos de W_0 (menor que 2), as proteínas são pouco solúveis em sistemas de micelas reversas e pode-se esperar, também, alguma interação entre a superfície da proteína e a parede interna da micela, a qual poderá afetar o mecanismo de uma reação. A solubilização da proteína começa somente a partir de certos valores de W_0 , além do qual um aumento do grau de hidratação do surfactante é acompanhado por um aumento linear na solubilidade da proteína, até alcançar uma concentração comparável à obtida em solução aquosa. A figura 1.5 [67] mostra a solubilização da α -quimotripsina. A mudança na linearidade da curva possibilita estimar a solubilidade limite da proteína no sistema considerado, e determinar a quantidade mínima de detergente necessária para solubilizar uma proteína. Segundo Klyachko [72] a solubilização da quimotripsina requer 100 moléculas de surfactante, que é aproximadamente a quantidade necessária para cobrir toda a superfície da proteína com uma monocamada de surfactante.

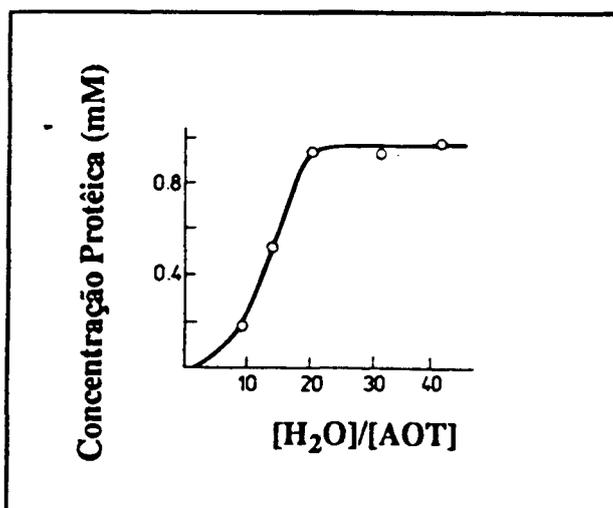


FIGURA 1.5 - Dependência da concentração máxima de proteína (α -quimotripsina) solubilizada num sistema AOT 0,1M/octano em função do grau de hidratação do surfactante, [71].

O processo de solubilização de uma proteína em sistema de micelas reversas, resulta na formação de uma micela reversa hidratada contendo proteína. O sistema é termodinamicamente reversível. Como resultado, as moléculas de enzima estão localizadas na cavidade de água no interior destas micelas, (figura 1.6). Assim, uma enzima hidrofílica (E_1) localiza-se no centro da micela e é rodeada por uma camada de água e outra de surfactante que protege a enzima contra a inativação causada pelo solvente. Em uma enzima interfacial (E_2), a superfície ativa da enzima (por exemplo, a lipase) pode interagir com a camada interfacial da micela. Finalmente, moléculas de enzimas hidróbicas (E_3) podem, em princípio, ficar em contato com o solvente orgânico.

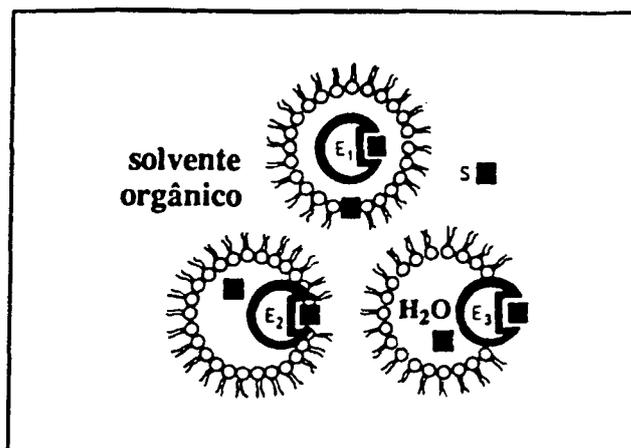


FIGURA 1.6 - Representação esquemática da interação de substratos (s) distribuídos em um sistema de micelas reversas com enzimas hidrofílicas (E_1), enzima interfacial (E_2) e enzima hidrofóbica (E_3), [71].

Quando as moléculas de proteína não são totalmente hidrofóbicas (por exemplo, bacteriorodopsina), a molécula de enzima induz a formação de um agregado micelar como um haltere na qual a parte polar das moléculas de proteína são incorporadas dentro da micela reversa, enquanto que a parte hidrofóbica central da proteína está em contato com o solvente orgânico (figura 1.7).

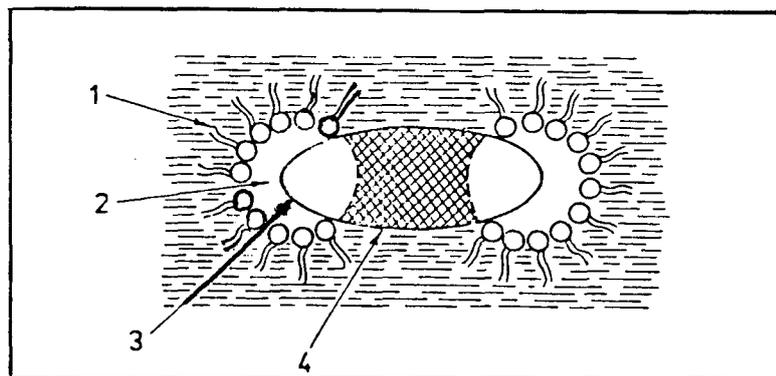


FIGURA 1.7 - Representação esquemática do complexo rodopsina-fosfolipídio em hexano. (1) lipídio; (2) água; (3) e (4) fragmentos hidrofílicos e hidrofóbicos da molécula da proteína respectivamente, [71].

Os modelos, anteriormente mencionados, de micelas reversas contendo proteína é aceita por todos os autores que trabalham nesta área. Entretanto, existe uma controvérsia considerável com relação a organização estrutural. Dois modelos de micelas reversas contendo enzimas são discutidos na literatura [69][71].

Luisi e colaboradores [52][69] trabalhando com uma enzima hidrofílica, consideram que a incorporação de uma molécula de proteína em uma micela reversa é invariavelmente acompanhada por um aumento do tamanho micelar, sendo que a micela carregada contém mais surfactante e água do que a micela vazia, como resultado da redistribuição dos componentes micelares entre as micelas carregadas e micelas vazias (modelo da camada de água) (figura 1.8a).

Martinek e colaboradores [71] assumem, também para uma enzima hidrofílica, que tal aumento no tamanho ocorre somente quando a cavidade da micela vazia é menor do que a molécula de proteína. Neste caso a incorporação da proteína pode, em princípio, resultar num aumento do número de agregação, bem como no grau de hidratação do surfactante (modelo do tamanho induzido) (figura 1.8b). Por outro lado, se o tamanho da cavidade inicial da micela exceder (ou ser aproximadamente igual) ao tamanho da molécula de proteína, a incorporação da proteína não causaria nenhum aumento substancial no tamanho da micela reversa (modelo do tamanho fixo) (figura 1.8c). Medidas de ultracentrifugação [73] confirmam a validade do modelo de tamanho fixo para várias proteínas hidrofílicas solúveis em água, tais como tripsina, quimotripsina, lisozima, albumina de ovo, álcool desidrogenase do fígado de cavalo e γ -globulina. Estabeleceu-se que o aumento do volume da micela reversa, como resultado da incorporação da molécula de proteína, não excede 10% do valor inicial, mesmo quando a molécula de proteína e a cavidade de água inicial forem do mesmo tamanho. A micela reversa contendo a proteína, ou não, possui praticamente o mesmo número de moléculas de surfactante e água, e isto quer dizer que a massa observada no novo agregado (contendo a proteína) é igual a massa da proteína mais a micela vazia.

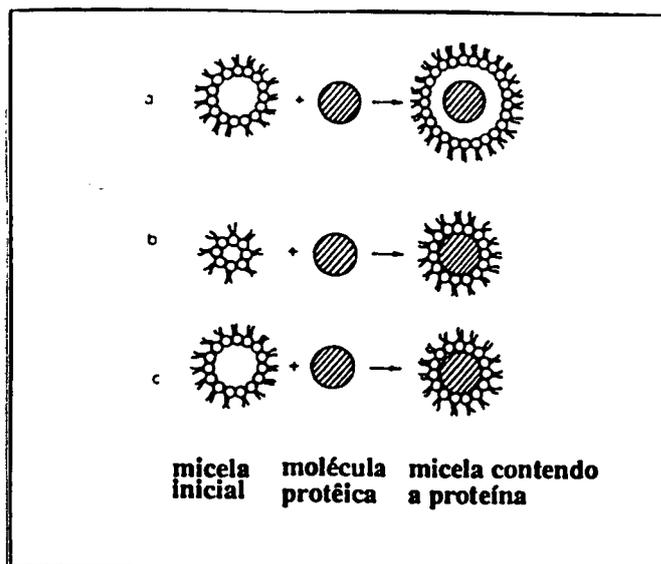


FIGURA 1.8 - Modelos de solubilização de moléculas de proteínas em micelas reversas [66]: (a) modelo da camada de água; (b) modelo do tamanho induzido; (c) modelo do tamanho fixo, [71].

Experimentos com métodos físicos, tais como, espalhamento de nêutrons, espectroscopia de infravermelho e ^{13}C -RMN [74][75] tem confirmado a validade do modelo de tamanho fixo. Contudo, o modelo tem sido objeto de crítica, porque implica no desaparecimento da água micelar quando a molécula de proteína é incorporada, sem nenhuma perda apreciável de massa. Através de ^{13}C -RMN e ^1H -RMN foi possível elucidar o rearranjo estrutural ocorrido na micela, com a inserção da molécula de proteína, o qual mostrou o aparente desaparecimento da água.

Martinek [71] utilizou um sistema modelo: α -quimotripsina dissolvida em micelas reversas de Aerosol-OT/octano que é descrito para assumir um modelo de tamanho fixo por alguns autores [73]. Era conhecido que a dimensão da molécula de α -quimotripsina poderia ser aproximada para uma esfera de volume em torno de 41000\AA^3 com raio de $21,5\text{\AA}$. O tamanho da cavidade da micela de Aerosol-OT em octano depende do grau de hidratação do surfactante expresso pelo W_0 . Martinek utilizou $W_0=12$ e neste caso o raio da cavidade da micela é $22,1\text{\AA}$. Isto significa que o volume inicial da cavidade da micela vazia (45200\AA^3) é ligeiramente maior que a molécula de enzima, sendo esta a condição requerida para a obtenção do modelo de tamanho fixo (figura 1.8c). De acordo com este modelo [75], a quantidade

de água e o número de agregação do Aerosol-OT são as mesmas, para a micela contendo ou não a enzima. Através de cálculos, foi demonstrado que as moléculas de água na micela contendo a enzima formaria uma camada de aproximadamente 6 Å de espessura em torno da mesma. Para que as dimensões da micela contendo a enzima permanecesse inalterada, esta camada de água, seria expelida da cavidade da micela a qual está completamente ocupada pela molécula de enzima, e penetraria na camada de surfactante em direção a fase orgânica. As medidas de ^{13}C -RMN [74] confirmam as conclusões acima descritas. A situação é mostrada na figura 1.9.

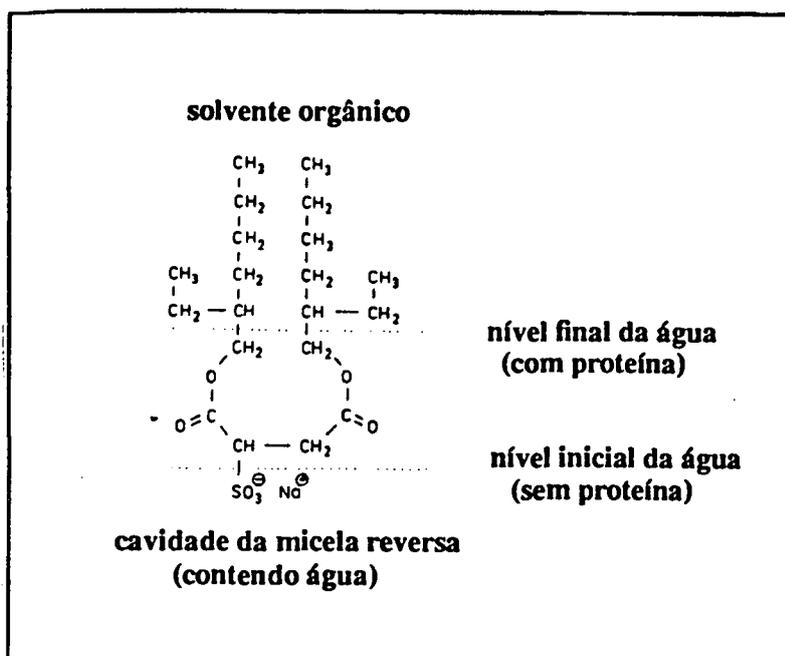


FIGURA 1.9 - Esquema da expulsão da água da cavidade da micela de AOT com solubilização de uma molécula de proteína (modelo do tamanho fixo), [71].

Rahaman, em 1991 [75] fez uma revisão dos modelos, para a incorporação de uma molécula de proteína em sistemas micelares, expondo as ambigüidades entre os modelos propostos. Os autores desenvolveram um modelo termodinâmico para elucidar o tamanho das micelas contendo ou não proteína, em função de alguns parâmetros, tais como: força iônica, tamanho e carga da proteína, concentração proteica e conteúdo de água na fase micelar. Utilizando medidas de espalhamento de nêutrons (SANS), para predizer o tamanho das micelas, em sistemas micelares de Aerosol-OT/isooctano utilizando a enzima α -quimotripsina, mostrou-se alguns

detalhes sobre a natureza do complexo proteína-micela. As análises mostraram que o tamanho da micela contendo enzima pode ser maior ou menor do que a micela sem proteína, e é a energia das micelas com proteína que tem uma contribuição dominante na energia livre do sistema micelar. O modelo identifica a energia livre associada com a interação de cargas simples dentro das micelas como a maior força eletrostática atuante responsável pela solubilização de proteínas nesse sistema de microemulsão carregada. A presença de um corpo de constante dielétrica baixa (a proteína) dentro da micela abaixa a energia eletrostática livre para que até uma proteína carregada (condição desfavorável) possa ser dissolvida.

Um dos efeitos micelares mais notáveis sobre a enzima, é o aumento da sua atividade (superatividade). Martinek [71] sugere a seguinte hipótese para explicar este fato: esta superatividade é devido a alta rigidez da camada de surfactante que envolve a enzima. Esta camada de surfactante absorveria as excessivas flutuações na organização da molécula de enzima, sendo que estas flutuações seriam responsáveis pela perda da conformação catalítica da enzima em água. Martinek chega a esta conclusão devido a evidências nos estudos da atividade catalítica de enzimas solubilizadas em função da microviscosidade do centro da micela (figura 1.10). Ruckenstein e Karpe, em 1990 [76] mostraram que a superatividade das enzimas em micelas reversas é causada pelos seguintes fatores.

- o aumento da concentração de substratos próximos da superfície da enzima, causado pelo afastamento do substrato da superfície carregada da micela.
- uma maior concentração do substrato no pequeno volume do interior da micela do que no volume total da solução micelar.

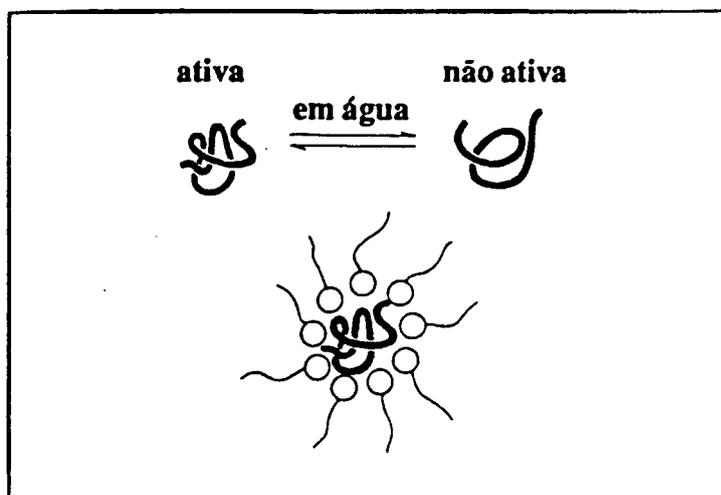


FIGURA 1.10 – Esquema da eliminação da flutuação espontânea da estrutura da proteína dentro de uma micela (flutuações as quais usualmente destroem a conformação catalítica em água), [71].

Para W_0 com valores grandes e também a concentração de surfactante sendo grande a atividade enzimática encontrada seria menor do que em meio aquoso, devido ao fato do substrato distribuir-se na camada do surfactante, e uma menor quantidade de substrato estar disponível para a reação no interior da micela. A atividade enzimática também depende da concentração dos eletrólitos na solução e do aumento da constante dielétrica do meio.

As vantagens desse sistema são:

- eliminação da necessidade de agitação;
- transparência óptica, o que o torna conveniente para estudos espectroscópicos;
- fácil reprodutibilidade em termos de estrutura e dimensões;
- apresentação de uma área interfacial muito grande, o que torna a transferência de massa dos substratos e produtos mais eficiente que em sistemas bifásicos.

As desvantagens deste sistema são:

- dificuldade de recuperação da enzima do meio para um possível reutilização [75];
- dificuldade de isolamento dos produtos em relação a outros sistemas bifásicos.

Porém, as enzimas em sistemas de micelas reversas tem sido utilizadas por vários autores em síntese orgânica, tais como: estudo cinético de reações catalisadas por enzima (como quimotripsina, tripsina, pirofosfatase, peroxidase, lactato desidrogenase e piruvato quinase) [77]; reatividade da α -quimotripsina em microemulsão água-óleo na hidrólise da N-glutaril-L-fenilalanina-p-nitroanilida (GNPA), N-succinil-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilida (SAAP) e o N-trans-cinamoil-imidazol (t-CNI) [78]; oxidação do isobutanol para isobutiraldeído catalisada por álcool desidrogenase [79]; hidrólise de ésteres de p-nitrofenila de ácidos graxos (C_4 - C_{16}) catalisada por lipase [80]; atividade da α -amilase e celulase em micelas reversas de Tween-80 em n.hexano na hidrólise de celulose e amido [81]; reações de esterificação catalisada por lipase [82]; hidrólise do óleo de Crambe (óleo extraído da *Crambre abyssinica* que contém triglicerídeos assimétricos e com peso molecular alto, sendo que 70% destes contém 60 átomos de carbono ou mais) catalisada por lipase [83].

1.1.5 - ENZIMAS EM ORGANO-GEL

Haering e Luisi, em 1986 [84] investigando a solubilização de gelatina em sistema de microemulsão água/óleo, utilizando como surfactante Aerosol-OT, chegaram a resultados bastante curiosos. Era conhecido que a gelatina formava gel, isto era obtido por aquecimento de uma solução concentrada à temperaturas em torno de 40 a 50 °C e posterior resfriamento a 30 °C [85]. Era conhecido também que ela se solubilizava em micelas reversas. Os autores acharam interessante investigar como o ambiente micelar afetaria o comportamento da gelatina gelificada. A expectativa era que a formação do gel se daria dentro das micelas reversas, eventualmente produzindo a opacidade da solução micelar e possivelmente a separação do gel aquoso. Para surpresa dos autores, algo completamente diferente ocorreu. Toda a solução micelar tornou-se um gel. A formação deste mostrou-se reversível, por aquecimento do gel acima de 40 °C, ele torna-se líquido e esta solução pode ser transformada em gel novamente, tomando o cuidado de agitá-la durante o resfriamento, caso contrário, ocorreria a separação de fase.

A preparação do organo-gel foi descrita e consiste basicamente em: adicionar a gelatina sólida à uma solução micelar de Aerosol-OT/H₂O/isooctano numa faixa de temperatura de 40 a 50 °C. A mistura é agitada vigorosamente até o seu resfriamento. Um fato curioso ocorreu, a gelificação da microemulsão não aconteceu em todas as concentrações de gelatina e/ou água. A quantidade de gelatina deve se encontrar em uma quantidade ligeiramente acima de sua solubilidade máxima no sistema micelar. Quando a quantidade de água é muito pequena (valores de W_0 baixos) a formação do gel não é possível, devido a gelatina não poder ser dissolvida em quantidades suficientes para gelificar todo o sistema. Não foram obtidos geis com W_0 abaixo de 20 apesar da alta concentração do surfactante.

A gelificação da solução, que consistia em mais de 80% de solvente orgânico impressionou Haering e Luisi, levando-os a descrever uma hipótese sobre o fenômeno: a gelatina, sendo um material solúvel em água e insolúvel em fase orgânica, é inicialmente confinada predominantemente no interior da micela reversa. Isto deve-se a concentração relativamente alta de surfactante (Aerosol-OT) utilizada, e a pequena distância existente entre as microgotas (aproximadamente 100Å para $W_0=30$). Eles assumiram que existia um extenso contato intermicelar e que a percolação da gelatina estaria presente, já que esta

estava em excesso na solução. O sistema poderia ser descrito como uma molécula de gelatina interligando uma micela a outra. Inicialmente, dá-se por um caminho dinâmico, com um rápido equilíbrio entre as muitas configurações possíveis. Como resultado da gelificação da gelatina, a microfase aquosa e todo o sistema sofre um processo de enrijecimento com a formação de uma rede homogênea e contínua.

A descrição qualitativa, baseada na percolação micelar e conectada por gelatina, não explicou muito bem como uma grande massa de solvente orgânico foi capaz de produzir o gel. Segundo os autores a descrição termodinâmica da transição é muito complexa, devido a necessidade de extensiva agitação para a formação do gel. Os autores sugeriram que este novo material poderia ser utilizado na imobilização de enzimas.

Quellet e Eicke [86] através de técnicas de espalhamento de luz, dicroísmo circular, condutividade elétrica e rotação óptica, analisaram o mesmo sistema descrito por Haering e Luisi. Quellet e Eicke chegaram a conclusão de que o processo global de gelificação podia ser demonstrado através de três etapas: a primeira etapa seria a gelificação do polipeptídeo no interior micelar formando um nanogel, sendo o mecanismo de formação idêntico ao de gelificação em água pura, que envolve a formação de ligações intra e intermolecular da gelatina com a formação de segmentos helicoidais do tipo colágeno. Uma segunda etapa do processo seria a percolação das nanofases. Neste ponto, segundo os autores, o sistema passa por uma mudança drástica na estrutura e nas suas propriedades conectivas, e uma enorme aglomeração de nanofases é formada. Os autores alegam que a percolação das nanofases está relacionada com a organização das moléculas de gelatina na interface água/óleo com a formação de segmentos helicoidais estendendo-se para dentro da fase óleo. Esta suposição é reforçada pelo fato de que tais segmentos são consideravelmente mais hidrofóbicos do que um segmento estendido, porque em segmentos helicoidais ocorre a proteção dos grupos carregados. Na terceira e última etapa no processo de gelificação ocorre a transição sol-gel, e nesta etapa há formação de uma rede tridimensional consistindo de nanofases interconectadas por pontes de hélice tipo colágeno. Esta estrutura foi reafirmada por Quellet e colaboradores em 1987 [87], 1989 [88], 1990[89] e 1991 [90](figura 1.11).

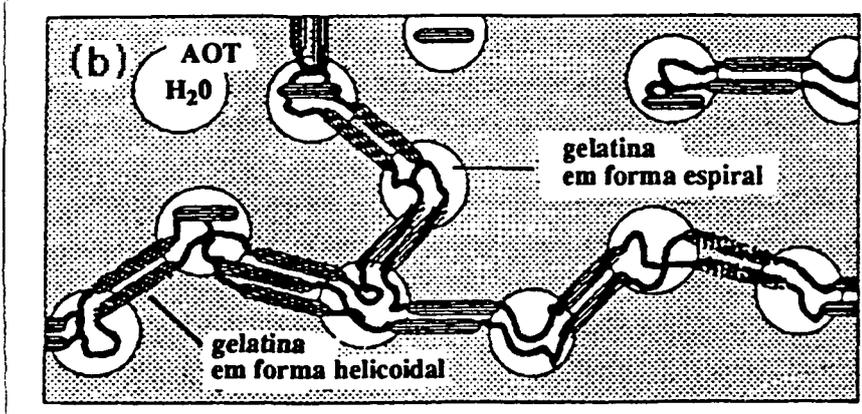
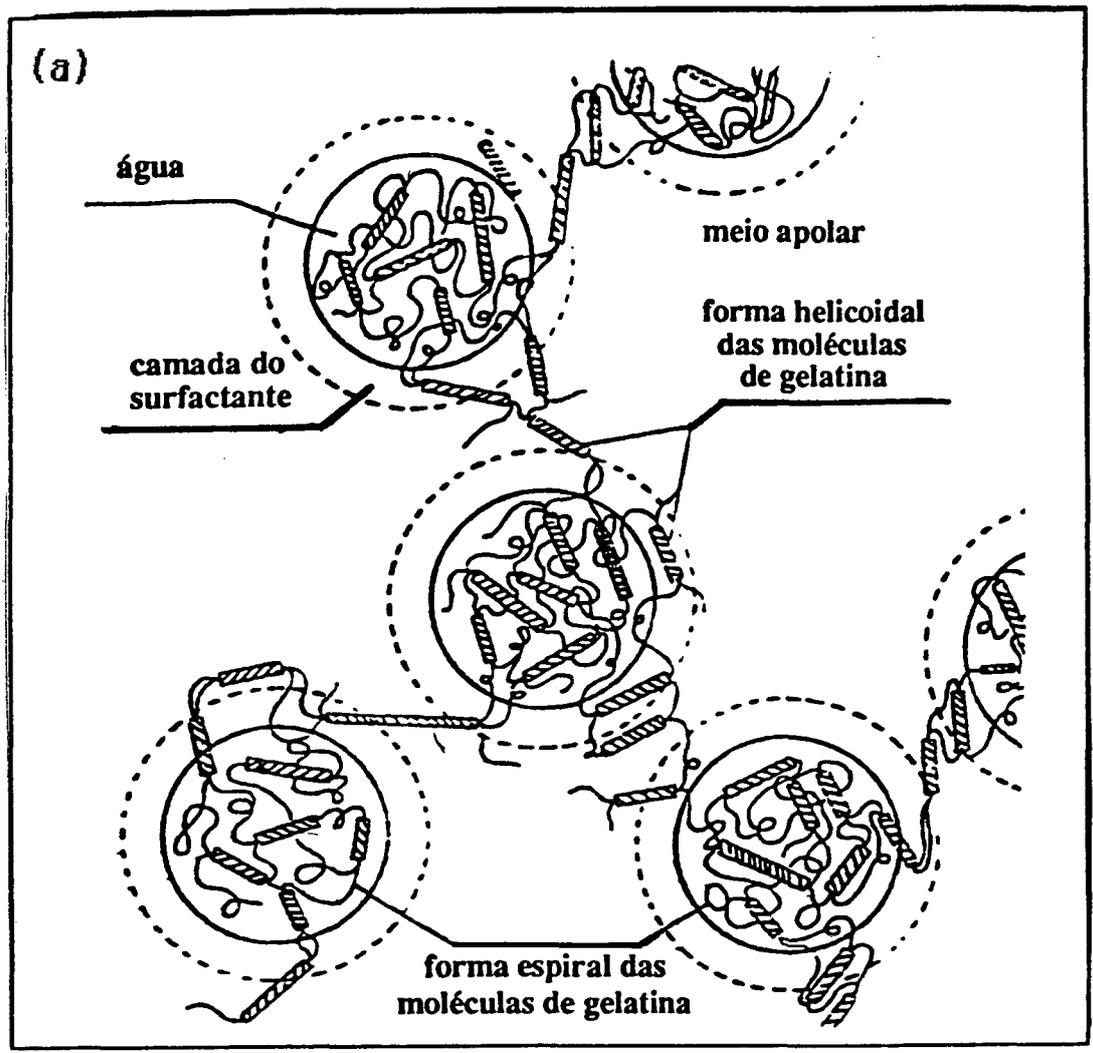


FIGURA 1.11 - Modelo proposto para a estrutura do organo gel onde as micelas são interconectadas por canais de gelatina, (a) [86] e (b) [98].

Capitani e colaboradores, em 1988 [91], estudaram a estrutura do gel formado por Aerosol-OT/água/isooctano por técnica de RMN, com o objetivo de investigar a mobilidade do solvente neste sistema. Primeiramente os autores mostraram que os valores de deslocamento químico de prótons da água neste sistema, é muito similar aos dados publicados para micelas reversas com alta concentração de água. E em segundo, a mobilidade do solvente no gel é comparável com a do solvente puro, embora o resultado fosse inesperado, tendo em vista a alta viscosidade do gel, em torno de 1000 Poise [92]. Apesar do aparente paradoxo, alta viscosidade do gel e a alta mobilidade do solvente, eles propoem uma estrutura compatível com estes dados. Segundo Capitani, ocorreria a formação de uma rede com uma estrutura muito rígida e com grandes cavidades. Como a gelatina é insolúvel em solvente orgânico ela seria rodeada por moléculas de surfactante, e a água ficaria entre as moléculas de gelatina e surfactante.

Atkinson e colaboradores, em 1988 [93], [94] em estudos preliminares, através de técnicas de espalhamento de nêutrons e medidas de condutividade elétrica e difusão, consideraram que a gelificação de uma microemulsão ocorreria com a formação de uma rede de gelatina, envolvida por água formando canais condutores. Estes canais condutores são envolvidos por uma monocamada de surfactante a qual coexiste com microgotas de microemulsão. O modelo proposto por Atkinson é idêntico ao proposto por Capitani e colaboradores (figura 1.12).

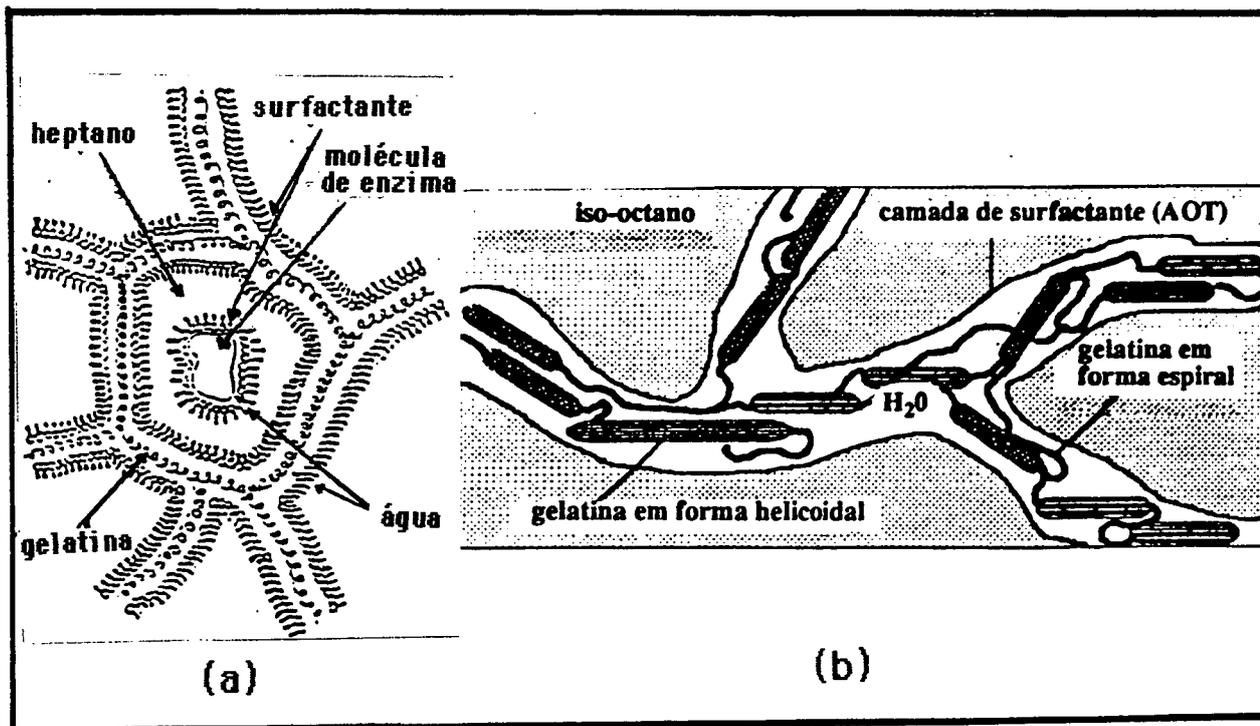


FIGURA 1.12 - Modelo proposto para a estrutura do organo gel com formação de canais de gelatina em água envolvidos por uma camada de surfactante, (a) [93] [94] e (b) [98].

No ano seguinte Atkinson e colaboradores [95] unindo os resultados obtidos anteriormente e juntamente com os dados de RMN, obtidos por Capitani [91], propoem um novo modelo para a estrutura do gel. Durante o fenômeno da gelificação ocorreria uma mudança na microestrutura da microemulsão, a qual forma uma extensiva rede de canais de água e gelatina, sendo que esta estrutura estaria em equilíbrio com as microgotas de microemulsão protegidas pelo surfactante (figura 1.13). Atkinson confirma esta estrutura novamente em trabalhos posteriores [96] [97].

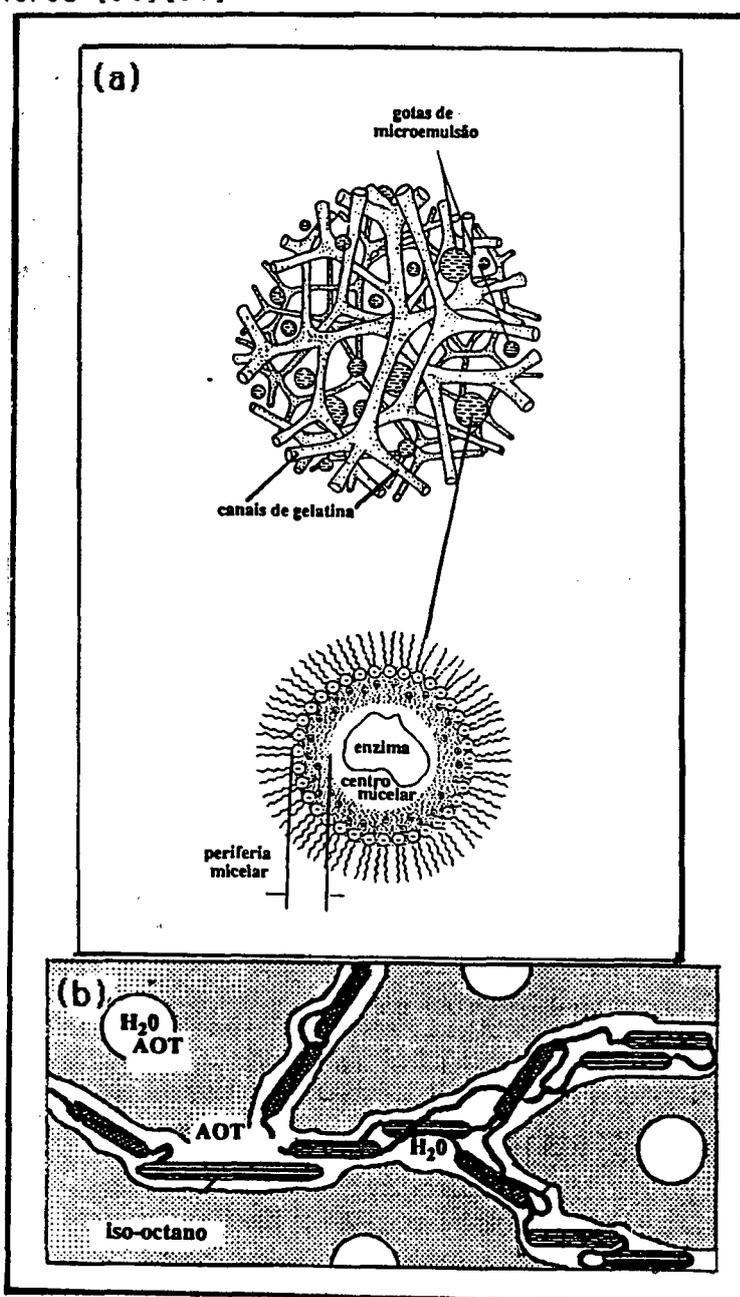


FIGURA 1 13 - Modelo proposto para a estrutura do organo gel com formação de uma rede de gelatina em água em equilíbrio com as microgotas de microemulsão, (a) [95] e (b) [98].

Em 1991, Petit e colaboradores [98][99] realizaram medidas de condutividade, espalhamento de raio-X e espalhamento de nêutrons a fim de analisar os três modelos propostos para a estrutura do organo-gel. Os autores concluem que cada uma das estruturas podem, a priori, existir em alguma parte do diagrama de fase. O espectro de espalhamento de raio-X (sensível a gelatina e água) e os espectros de nêutrons (sensível somente ao centro aquoso da micela) são consistentes com os modelos propostos. Entretanto, os espectros são qualitativamente similares mas quantitativamente diferentes. Segundo os autores o modelo proposto por Quillet está em acordo com os ensaios e resultados por eles obtidos, enquanto que os modelos de Capitani e Atkinson estavam em acordo parcial com os resultados. O modelo de Quillet permite, em particular, a previsão dos espalhamentos observados por Petit, bem como a zona de estabilidade da fase gel no diagrama de fase. Cada um dos modelos propostos permite a variação da composição para a qual a estrutura proposta poder ser formada. Por exemplo, para obter a microestrutura proposta por Capitani, seria necessário uma quantidade de surfactante grande para envolver todos os cilindros. Para obter a microestrutura de Quillet a quantidade de gelatina necessária é independente da quantidade de água da microemulsão.

Petit acrescenta que os experimentos feitos por Atkinson está muito fora do ponto de saturação - ponto no qual toda a água e toda a gelatina são necessárias para formar uma estrutura estável - onde eles realizaram seus experimentos, pois os cálculos quantitativos do raio-X e espalhamento de nêutrons em escala absoluta são possíveis somente próximos a este ponto. O ponto escolhido por Atkinson [Aerosol-OT]=0,1M, $W_0=55$ e 3,5% de gelatina está localizado muito fora do ponto de saturação, mas está incluído no domínio da fase gel no diagrama de fase. Petit ressalta que o modelo proposto por Atkinson provavelmente também é correto, apenas ele trabalhou em uma parte diferente do diagrama de fase. O modelo proposto por Atkinson pode ser adotado, devido a existência de uma quantidade de surfactante para cobrir toda a gelatina e as micelas reversas independentes.

Independentemente do modelo adotado, as principais características (vantagens) do sistema de organo-gel são as seguintes:

- constitui uma solução micelar sólida, transparente, possuindo todas as vantagens do sistema de micelas reversas descritas no item 1.2.4;
- é insolúvel em solventes hidrocarbônicos;
- pode ser utilizado para imobilizar enzimas;
- possui alta reprodutibilidade na sua preparação;

- possui uma área interfacial extremamente grande entre a fase aquosa e orgânica (isto permite uma troca muito rápida dos substratos e os produtos entre as fases, sem necessitar de agitação mecânica).

A utilização de enzimas em sistemas de organo-gel foi publicada recentemente, em 1991, por Rees e Nascimento [100][101]. Os autores imobilizaram a lipase de *Chromobacterium viscosum* (CV lipase) na síntese de uma variedade de ésteres simples utilizando álcoois de cadeia linear e ácidos com cadeias lineares, ramificadas e insaturadas. A esterificação foi realizada a uma temperatura de 25 °C e a CV lipase mostrou uma catálise eficiente na esterificação de ácidos alifáticos de cadeias longas e médias e álcoois com cadeias pequenas, médias e grandes. Os rendimentos foram superiores a 90%. A utilização deste sistema na resolução de álcoois quirais foi demonstrada para a resolução do (+/-) 2-octanol numa esterificação estereoseletiva com o ácido decanóico catalisada por três diferentes tipos de lipases, *Chromobacterim viscosum*, lipase da *Pseudomonas sp* e lipase Microbial. Entre as lipases utilizadas, a *Chromobacterium viscosum* mostrou maior eficiência com a obtenção do produto com 92% de excesso enantiomérico.

AGUIAR [102], em 1992, utilizou o mesmo sistema na esterificação de 1-pentanol com vários ácidos de cadeias lineares longas, na esterificação do ácido oléico com diversos tióis e fez mais estudos sobre algumas propriedades físico-químicas deste sistema. Apesar das vantagens citadas acima o sistema apresenta algumas desvantagens, tais como:

- destruição do gel por alguns solventes (por exemplo, metanol) ou substratos (por exemplo: ácido acético);
- rendimentos muito baixo de esterificação com substratos estericamente impedidos;
- baixa solubilidade de alguns substratos em solventes apolares (por exemplo: ácido sorbico em n-hexano) [102].

1.2 - LIPASE - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL, SÍTIO ATIVO E USOS.

A lipase é uma hidrolase classificada como uma esterase [23], possui um peso molecular em torno de 40 a 50 KDa, com cerca de 300 resíduos de aminoácidos. As lipases são enzimas extracelulares [103], produzidas por fungos tal como *Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum* e por leveduras de *Torulopsis* e *Candida*. As bactérias que produzem lipases são *Pseudomonas*, *Achromobacter* e *Staphylococcus*. Destes organismos, somente *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus* e *Candida* estão comercialmente disponíveis. A lipase é uma glicoproteína na qual a parte glicosilada hidrofílica é posicionada opostamente a região hidrofóbica que circunda o sítio ativo.

A análise da estrutura secundária das lipases, isto é, o modo pelo qual a cadeia peptídica se dispõe ao longo do seu maior eixo, bem como a análise da sua estrutura terciária, isto é, a forma em que a cadeia se dobra e se acomoda para formar uma estrutura tridimensional, foi somente apresentada em 1990 por Brady [104]. Foi determinada a estrutura da lipase proveniente do fungo *Rhizomucor miehei*, e esta é constituída por uma cadeia proteica simples, contendo 269 resíduos de aminoácidos com peso molecular 29 422. O sítio ativo desta lipase é composto por três aminoácidos: Serina 144 (Ser144), Histidina 257 (His 257) e Acido Aspártico 203 (Asp 203). No mesmo ano Winkler e colaboradores [105] publicaram a estrutura tridimensional da lipase pancreática humana (LPH) que cumpre um papel na hidrólise de triglicerídeos em monoglicerídeos e ácidos graxos livres. Através de cristalografia de raio-X, esta lipase apresentou uma cadeia proteica simples com 449 resíduos de aminoácidos. O sítio ativo é composto também pelos resíduos de Ser, His e Asp, como na lipase proveniente do *Rhizomucor miehei*, somente em posições diferentes: Ser 152, His 263 e Asp 176 (figura 1.14). O sítio ativo hidrolítico situa-se na superfície e é coberto por um segmento espiral curto e portanto inacessível para o solvente. A ativação interfacial, uma propriedade característica de enzimas lipofílicas, provavelmente envolve a reorientação de baixo para cima, deixando assim o sítio ativo exposto. Isto ocorre não somente em lipases pancreáticas, mas também em lipases hepáticas e lipoproteínas homólogas.

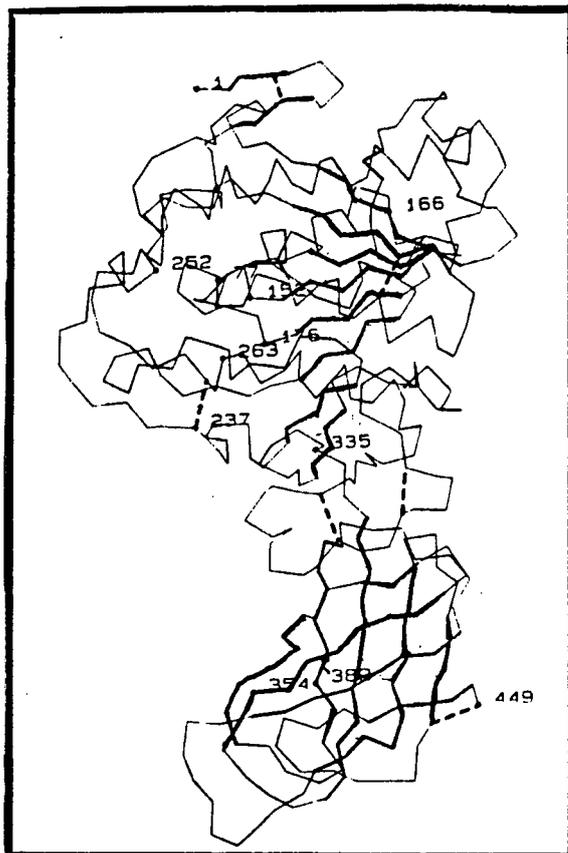


FIGURA 1.14 – Estrutura da lipase pancreática humana [105].

Laumen e Schneider [106] propuseram um modelo de interação entre sítio ativo da lipase da *Pseudomonas fluorescens* para hidrólise do (R,S)-3-fenilbutanoato de metila (figura 1.15a). Os autores propuseram:

- i) que os grupos carboxílicos formados ou hidrolisados devem estar posicionados na cavidade **D**;
- ii) a presença de um hidrogênio na posição β ao grupo carboxílico do éster formado ou hidrolisado, na cavidade **C**;
- iii) a ausência de grupos fenil na posição α ao grupo carboxílico;
- iv) que na cavidade **A** estão alojados os grupos alifáticos e aromáticos por ser esta bastante grande;
- v) que a cavidade **B** somente aloja cadeias alifáticas lineares, por ser esta pequena.

O modelo proposto do sítio ativo não previa a influência da quiralidade na posição α ao grupo carboxílico, por exemplo na hidrólise estereoseletiva do (R,S)-2-hidroxi-4-fenil butanoato de etila (figura 1.15b). Segundo Kloosterman e colaboradores [107] a hidrólise poderia ser explicada assumindo uma pequena cavidade acima do plano do centro quiral exclusiva para o hidrogênio (Figura 1.16). Kloosterman e colaboradores alteraram sensivelmente o modelo proposto por Laumen e Schneider sobre o sítio ativo da lipase da *Pseudomonas fluorescens*, postulando uma cavidade extra E na qual somente hidrogênios podem ser alojados. Kloosterman não tinha certeza se os grupos X e R estão direcionados em duas cavidades diferentes B e F, ou se estes estariam em uma cavidade B bastante grande que alojaria os dois grupos.

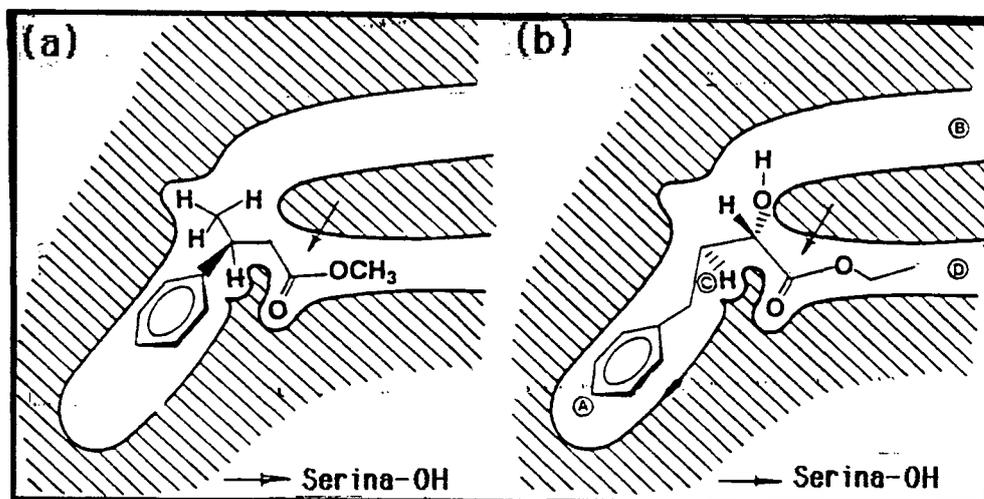


FIGURA 1.15 - Modelo do sítio ativo da lipase da *Pseudomonas fluorescens*: (a) hidrólise do (R,S)-3-fenilbutanoato de metila (→ = sítio nucleofílico), (b) hidrólise do (R,S)-2-hidroxi-4-fenilbutanoato de etila, [107].

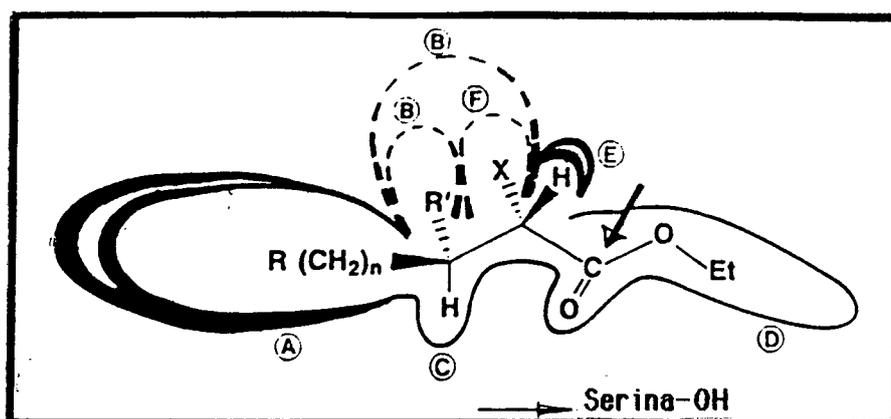


FIGURA 1.16 - Modelo do sítio ativo postulado para a lipase da *Pseudomonas fluorescens*: 2- hidroxihexanoato de etila R = CH₂CH₂; R' = H; X = OH; n=2 e 2-hidroxi-4-fenilbutanoato de etila: R = C₆H₅; R' = H; X = OH; n=2, [107].

Um modelo bem detalhado da interação do sítio ativo da enzima com o substrato foi proposta por Brzozowski e colaboradores [108], em 1991, para a lipase do *Rhizomucor miehei*, através de cristalografia de raio-X. Para investigar a natureza das interações catalíticas e a mudança estrutural associada com a ativação da lipase, os autores reagiram a enzima com N-hexilclorofosfonato de etila, estequiometricamente, com o objetivo de inibir a enzima irreversivelmente na sua forma ativa, permitindo assim a investigação estrutural.

O mapa de densidade eletrônica mostrou que o segmento espiral (resíduos 85-92) moveu-se, expondo o sítio ativo que continha o inibidor. O modelo atômico do inibidor e do sítio ativo mostrou uma ligação covalente direta a qual foi formada entre o O_γ nucleofílico da Ser 144 e o átomo de fósforo do inibidor. O oxigênio carbonílico do éster parece ser estabilizado por uma interação com o nitrogênio amídico e a hidroxila da Ser 82 (figura 1.17 a,b). A cadeia amídica contendo o nitrogênio da Leucina 145 poderia também estar envolvido, mas isto não foi completamente esclarecido. A estrutura tetraédrica do complexo, sítio ativo e inibidor, proposta pelos autores é mostrado na figura 1.18.

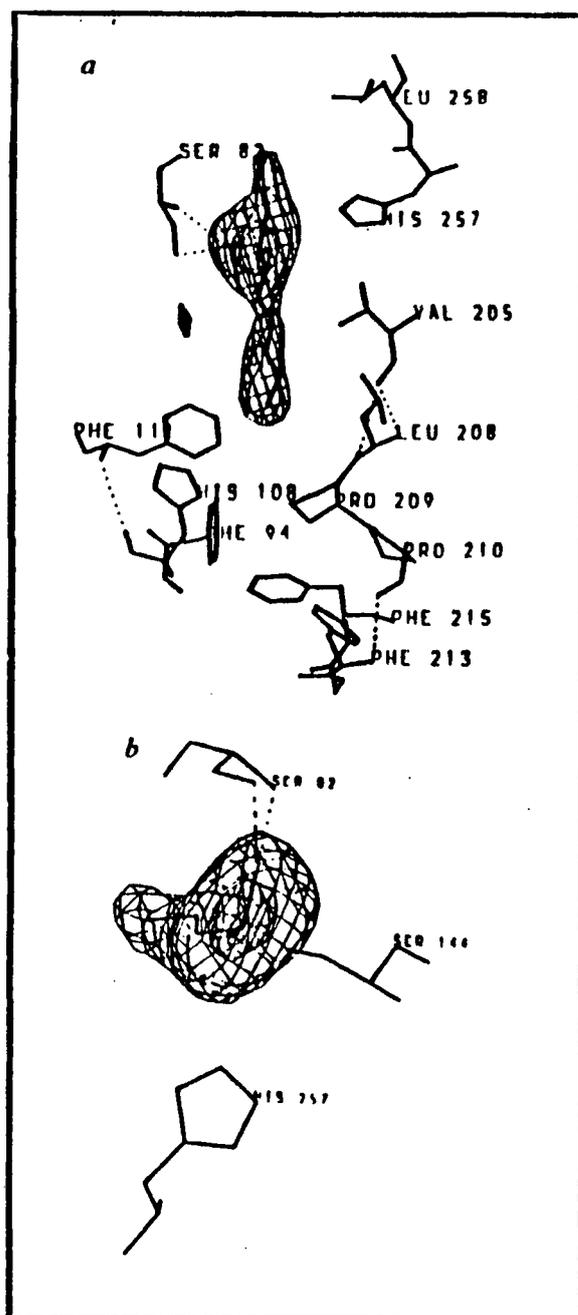


FIGURA 1.17 - Estrutura do sítio ativo da lipase do *Rhizomucor miehei* na presença do N-hexilclorofosfonato de etila: (a) sítio ativo complexo e inibidor, (b) seção transversal mostrando apenas a interação do inibidor com Ser 82, Ser 144 e His 257, [108].

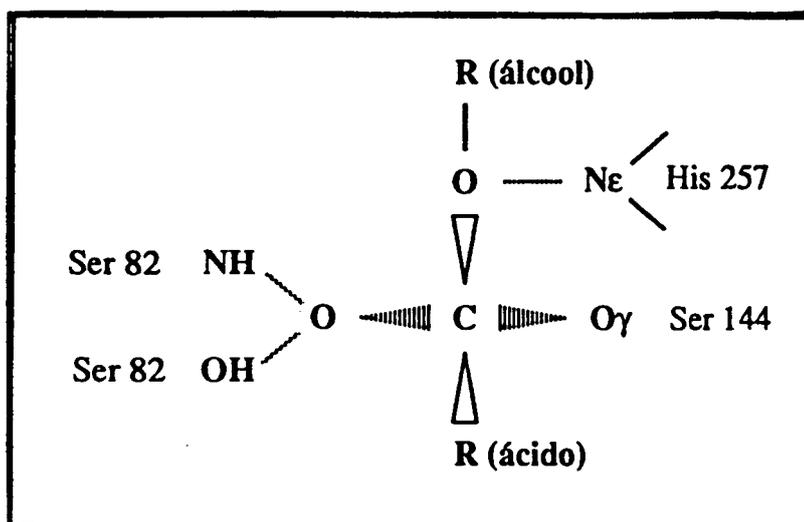


FIGURA 1.18 – Representação esquemática do complexo tetraédrico enzima substrato da lipase *Rhizomucor miehei*, [108].

A comparação com a estrutura nativa mostrou que a Serina 82 assume uma conformação favorável para a interação oxi-ânion somente depois que a "tampa" (parte hidrofóbica) se move, expondo assim o sítio ativo. A formação do oxi-ânion com a Ser 82 no complexo sugere que a parte da "tampa" sofreu um movimento, tornando assim a enzima ativa.

A mudança conformacional da "tampa" pode ser descrita como um movimento simples rígido da parte espiral (resíduos Leucina 85 - Ácido Aspártico 91). Isto consiste de uma translação do centro de gravidade em torno de 8 Å e uma rotação de 167° em torno de um eixo quase paralelo a espiral (figura 1.19a,b). As análises mostraram a existência de duas regiões claramente definidas que funcionam como "dobradiças", o tripeptídeo 82-84 (trp) e o tetrapeptídeo 92-95, um em cada lado da "tampa", e que permitem este movimento. A rotação da hélice em sentido contrário ao sítio ativo, seu lado hidrolítico, deixa-o exposto ao solvente na estrutura nativa, e se torna parcialmente escondido na cavidade polar inicialmente ocupada por moléculas de água bem ordenadas. Simultaneamente o lado hidrofóbico da "tampa" torna-se completamente exposto, expandindo grandemente a superfície em torno do sítio ativo (figura 1.19c,d). Assim, a exposição dos resíduos catalíticos é acompanhada por um aumento marcante da não polaridade em torno da superfície. A ativação interfacial é assim explicada por uma estabilização nesta superfície apolar por um ambiente lipídico o qual, de fato, criaria uma enzima cataliticamente competente, capaz de atacar moléculas de triglicérides dentro da fase lipídica.

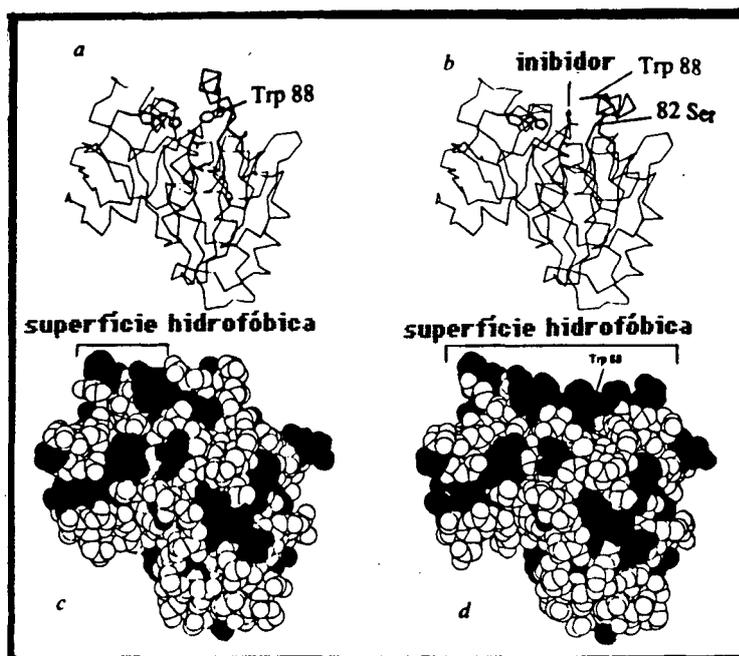


FIGURA 1.19 - Diagrama representativo, representando a mudança conformacional na lipase do *Rhizomucor miehei*.
 (a) enzima nativa;
 (b) complexo enzima-inibidor;
 (c) estrutura atômica da enzima nativa;
 (d) estrutura atômica do complexo enzima inibidor.
 O aumento da superfície apolar é nitida. O inibidor está mascarado pelo Trp 88, [108].

As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica devido a sua grande disponibilidade, baixo custo, não requererem cofator, trabalharem numa faixa de pH relativamente grande e serem muito estáveis [23]. Nos últimos anos seu uso em síntese tem sido amplamente explorada nos mais diversos campos da síntese orgânica. Não só as lipases como também outras enzimas estão sendo utilizadas.

As lipases são utilizadas como catalisadores em solvente orgânico principalmente em: reações de esterificação e transesterificação [21][22][23][26][27][29][31][49][100][101], sínteses assimétricas [110][111][112][113], síntese de amidas [46][47], síntese de glicerídeos [114], síntese de lactonas [115].

CAPÍTULO 2 – PARTE EXPERIMENTAL

2.1 – COMPONENTES DO ORGANO-GEL, REAGENTES E SOLVENTES.

Os componentes do organo gel, reagentes e solvente foram obtidos das seguintes fontes:

- Di-2-etilhexil sulfosuccinato do sódio (Aerosol-OT) e gelatina Tipo A (bloom 300) foram adquiridos da Sigma e foram utilizados sem nenhuma purificação adicional.

- As enzimas C.V. Lipase, Lipase microbial e Lipase da pseudomonas sp foram obtidas da Genzyme Biochemicals Ltd (Inglaterra), com atividade específica de 3335 , 1600 e 1900 unidades mg^{-1} do pó, respectivamente.

- Lipase da candida cylíndracea obtida da Sigma, lote 29F-04419 com atividade de 1010 unidades mg^{-1} do pó.

- Lipase do pâncreas de porco (PPL), obtida da Sigma, nº 3126 com atividade 35-70 unidades mg^{-1} do pó.

- Água bi-destilada foi obtida no laboratório de Química Analítica da UFSC.

- Reagentes e solventes foram obtidos também das seguintes fontes Merck, Riedel-DeHaen, Vetec, Aldrich, Quimidrol, Reagen e BDH . Os solventes foram purificados por destilação simples, caso necessário.

2.2 - PREPARAÇÃO DO ORGANO-GEL.

2.2.1 - PROCEDIMENTO GERAL PARA OBTENÇÃO DO ORGANO-GEL PARA SÍNTESES.

O organo-gel foi preparado adicionando uma solução de Aerosol-OT em n-hexano a 55 °C a uma segunda solução de gelatina em água também a 55 °C. A mistura foi vigorosamente agitada manualmente, até atingir a temperatura ambiente. Foi obtido 10 mL (volume total) de um gel estável e rígido.

A composição do organo-gel utilizado foi a seguinte: 1,4g de gelatina, 2,15mL de água bi-destilada, 4,0mL de solução de Aerosol-OT, 0,5M, 2,2mL de n-hexano e ainda 0,25mL de uma solução contendo as diferentes enzimas em água com concentração de 10 mg mL⁻¹, sendo esta injetada na solução de Aerosol-OT em n-hexano, obtendo uma concentração de 0,25 mg mL⁻¹ de enzima no organo-gel. Era preparado 1mL de solução estoque de enzima, obtendo assim quatro géis. Após estabilização a temperatura ambiente estes foram armazenados em "freezer" a -20 °C até a sua utilização nas reações.

Foi preparado um gel controle, possuindo as mesmas características do gel para reações sem enzima.

2.2.2 - PREPARAÇÃO DO MEIO REACIONAL

O gel foi retirado do "freezer" a -20 °C, sendo separado do tubo de ensaio e ainda congelado foi cortado em secções de volume aproximadamente igual, 125 mm³. Em seguida, o gel foi colocado em um erlenmeyer contendo 30mL de n-hexano. Os substratos, ácido oleico (ácido octadecanóico) e álcoois alifáticos ou aromáticos, foram adicionados na proporção de 1:1 (0,01 mol em todas as reações). O sistema foi deixado em agitação suave, obtida por um agitador magnético (proveniente da Micro-Química, modelo AMA 102) por 10hs a 25 °C, e a reação acompanhada por cromatografia de placa, usando como eluente uma mistura n-hexano : éter, na proporção de 3:2 (v/v). Ao término da reação os produtos e substratos remanescentes foram separados do gel, através de decantação, sendo este lavado várias vezes com solvente orgânico.

Uma reação controle foi executada paralelamente, utilizando um gel com as mesmas características, apenas com a ausência da enzima. Não houve formação de produtos nestas condições.

2.2.3 – PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS.

A solução de n-hexano contendo o produto e reagentes remanescentes, após separação do gel foi concentrada em rotavapor (marca Buchi, modelo RE 111). O concentrado quando necessário foi tratado com 1mL de trietilamina, e em seguida adicionado 50mL de n-hexano para promover a precipitação do sal do ácido . A solução é então filtrada, e o filtrado concentrado. Os produtos eram separados dos reagentes remanescentes através de cromatografia rápida à vácuo ("flash chromatography") utilizando-se sílica . O solvente utilizado foi n-hexano.

2.2.4 – IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS.

A formação dos produtos foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (c.c.d) durante o decorrer da reação. A pureza do produto foi também verificada por c.c.d. durante o decorrer da reação e após purificação. Utilizou-se placas de sílica e uma mistura de n-hexano e éter 3:2 (v/v) como eluente. Os espectros de infravermelho foram feitos num aparelho da Perkin Elmer -modelo 781, e os espectros de ressonância magnética nuclear de próton (¹H RMN) em espectrometro Variam EM 360L.

2.2.5 – DIAGRAMA DE FASES DO ORGANO-GEL EM n-HEXANO.

O diagrama de fases do organo-gel foi obtido, preparando-se vários géis com quantidades variáveis de gelatina e de água. A concentração de Aerosol-OT do sistema foi mantida constante em 0.1M no volume final do gel. O modo de preparação do gel foi idêntico ao procedimento descrito no item 2.2.1. Neste experimento os géis não continham enzima.

Os géis após preparados foram deixados em repouso por 24hs a temperatura ambiente. O aspecto macroscópico do sistema foi analisado visualmente. Grificou-se um diagrama de percentual de gelatina em função de W_0 ($W_0 = [H_2O]/[AOT]$), a partir do qual as áreas das diferentes fases do gel foram delimitadas.

CAPITULO 3 – APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

3.1 – DIAGRAMA DE FASE DO ORGANO-GEL DE n-HEXANO.

O estudo do diagrama de fase, do sistema H₂O/AOT/gelatina/n-hexano, é de grande importância para o entendimento de algumas propriedades físico-químicas do organo-gel. Um dos grandes interesses, em construir o diagrama, era determinar a quantidade mínima de gelatina necessária para a gelificação do sistema. A obtenção de um gel com uma rigidez alta, tal que pudesse ser cortado em secções menores sem que o mesmo sofresse qualquer alteração na realização das reações, também foi estudada. A influência do solvente orgânico utilizado, n-hexano, foi analisada e comparada com um sistema H₂O/AOT/gelatina/ciclo-hexano, mostrado por AGUIAR [102]. Outra área de interesse é a determinação de uma região onde a forma final do gel fosse transparente, para efetuar posteriores estudos de reações monitoradas por técnicas espectroscópicas, tal como ultra violeta.

A construção do diagrama foi bastante trabalhoso. Para a delimitação das áreas foram preparados 420 sistemas do organo-gel, seguindo o procedimento descrito no item 2.2.1 e neste caso o gel não continha enzima. A concentração do surfactante, AOT, foi mantida constante, 0,1M, a uma temperatura de 25°C. Foram obtidas quatro regiões distintas (figura 3.1). Os aspectos mais relevantes sobre o diagrama serão discutidos nos itens a seguir.

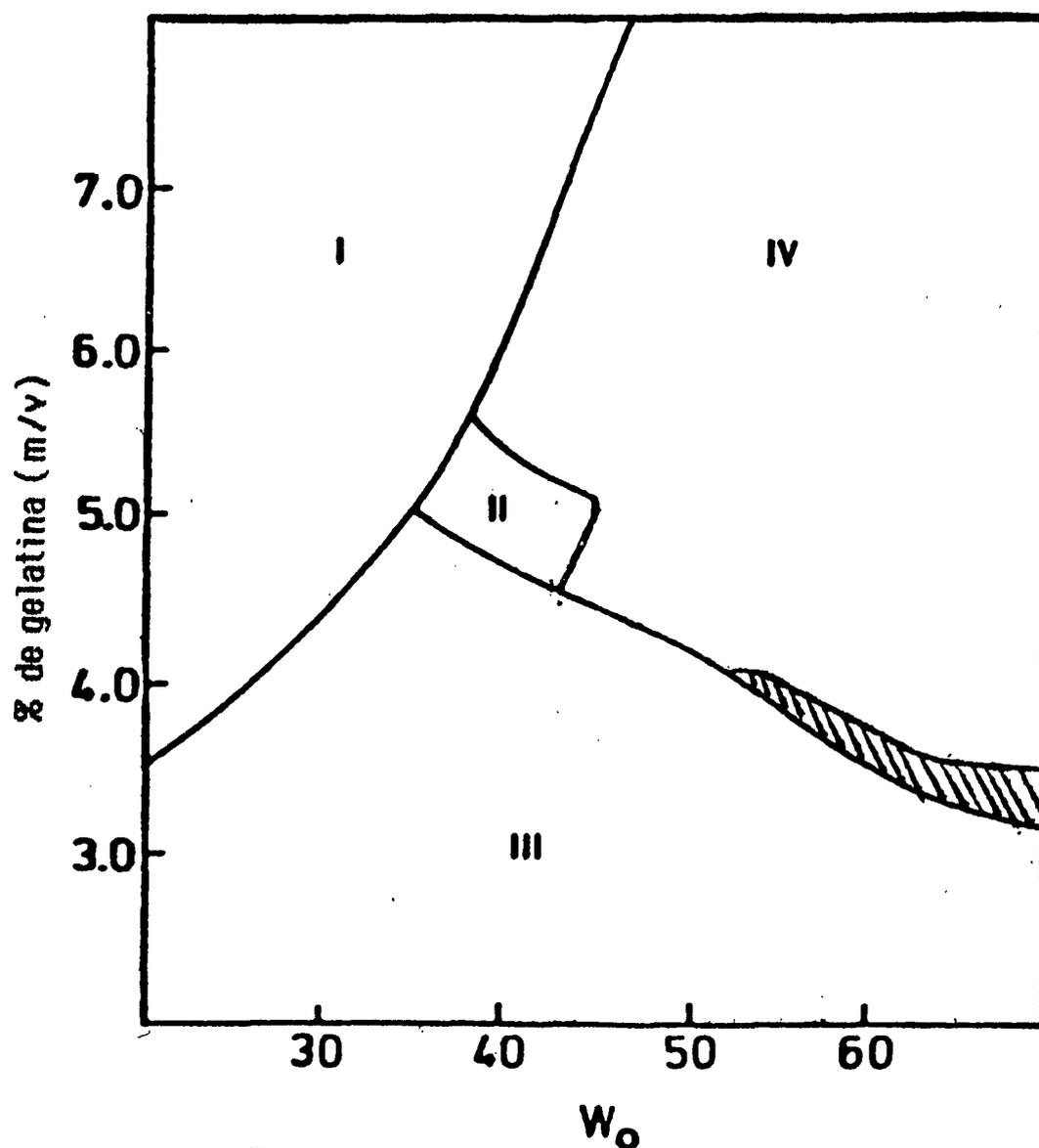


FIGURA 3.1 - Diagrama de fase do sistema gelatina/H₂O/n.hexano/AOT (0.1M). (I) Separação de fase (o solvente se separa da gelatina sólida); (II) Separação de fase (o solvente separa-se do gel); (III) Solução micelar líquida e (IV) Formação de gel.

3.1.1 - REGIÕES DE SEPARAÇÃO DE FASE.

a) Região I

Esta região é denominada de "separação de fase". Nesta região ocorre a separação do solvente orgânico (n-hexano) da gelatina sólida. Esta região está compreendida em valores baixos de W_0 , ou seja, a quantidade de água presente no sistema é insuficiente para solubilizar a gelatina, visto que a concentração de surfactante (AOT) é mantida constante, 0.1M, no experimento. Portanto o aumento do W_0 está relacionado diretamente com o aumento de água no sistema, pois $W_0 = [H_2O]/[AOT]$.

A linha de separação entre as regiões I e IV mostra uma relação entre o aumento da quantidade de gelatina e o aumento da quantidade de água no sistema. Assim, quando a quantidade de gelatina é de 3.4%, ocorre a separação de fase com valores de W_0 igual a 20. Porém com o aumento do W_0 , em torno de 43 a quantidade de gelatina solubilizada no sistema passa para 7.0%.

AGUIAR em 1992 [102] mostra o diagrama de fase, figura 3.2, utilizando como solvente o ciclo-hexano. A região de "separação de fase" com este solvente também se encontra em valores baixos de W_0 , mostrando que há uma dependência da quantidade de água no sistema para ocorrer a formação do gel.

HAERING e LUISI em 1986 [89] quando descreveram o procedimento que permitia a formação do gel, utilizaram um sistema de $H_2O/AOT/isooctano$, e já postularam que em valores baixos de W_0 não ocorria a formação do gel, porque não era possível dissolver a gelatina no sistema.

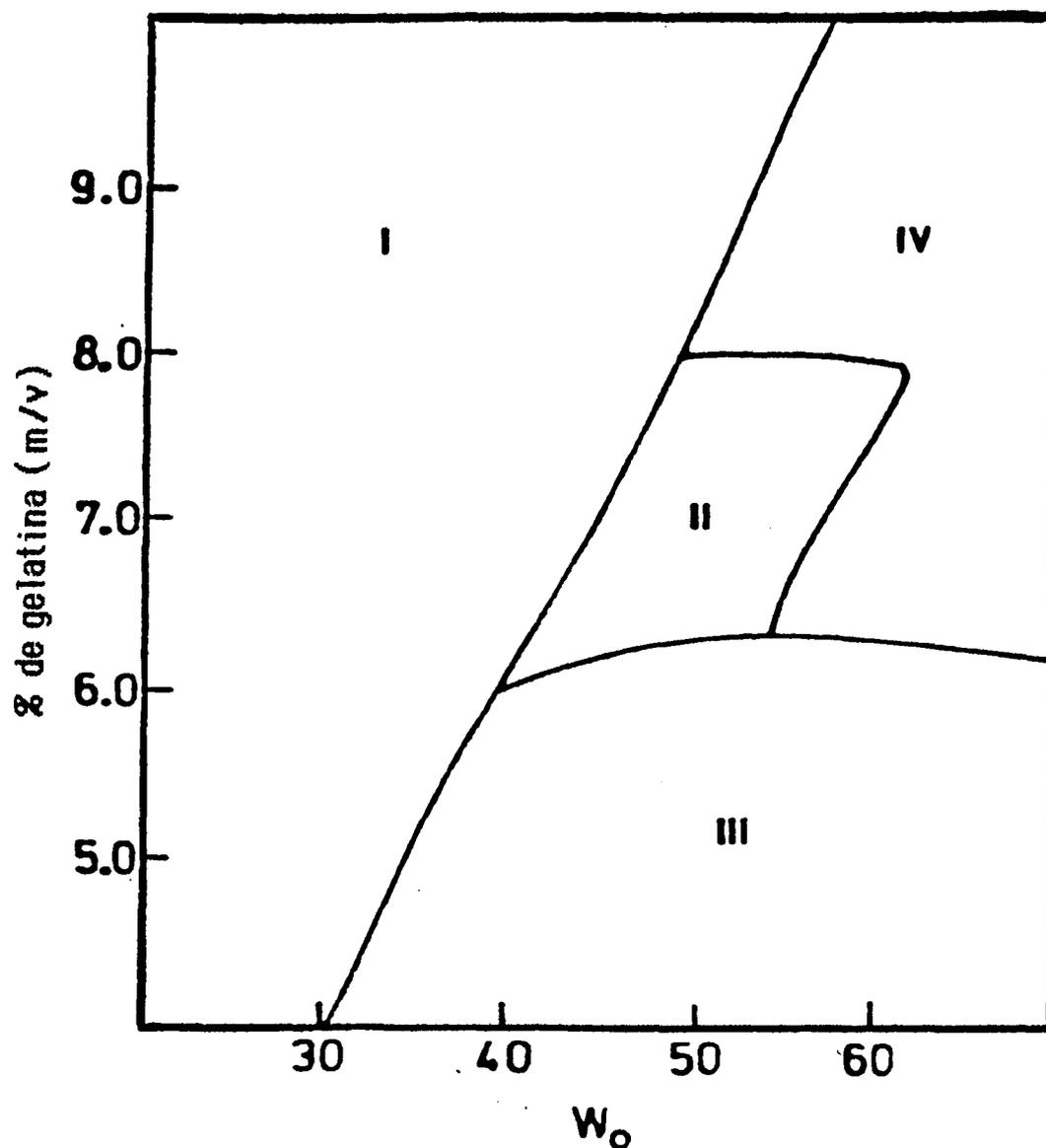


FIGURA 3.2 – Diagrama de fase do organo-gel de ciclo-hexano/AOT (0.1M). (I) Separação de fase (o solvente se separa da gelatina sólida); (II) Separação de fase (o solvente separa-se do gel); (III) Solução micelar líquida e (IV) Formação de gel.

b) Região II

Nesta região ocorre também separação de fase. Neste caso uma pequena quantidade de solvente se separa do gel. Nesta região a quantidade de água presente é suficiente para solubilizar a gelatina e formar o gel. Esta separação de fase é explicada devido a quantidade insuficiente de gelatina presente, a qual impossibilita a gelificação de todo o sistema.

No diagrama de fase do sistema H₂O/AOT/ciclo-hexano, mostrado por AGUIAR, a região de separação encontra-se em valores de W_0 de aproximadamente 35,5 a 60 com porcentagem de gelatina de 6,0% a 8,0%. Para o sistema H₂O/AOT/n.hexano a separação ocorre em valores menores de porcentagem de gelatina e W_0 ocorrendo na faixa de 4,6% a 5,6% e 34 a 44 respectivamente. Isso mostra a grande dependência que o sistema possui principalmente com relação ao solvente utilizado.

3.1.2 - REGIÃO III - REGIÃO DA SOLUÇÃO MICELAR LÍQUIDA.

Nesta região ocorre a formação de uma solução micelar líquida e transparente. Neste caso a quantidade de água presente no sistema já é suficiente para solubilizar a gelatina, porém esta última encontra-se em quantidade insuficiente para gelificar o sistema. Analisando a linha que delimita as regiões III e IV, observa-se que a medida que aumenta a quantidade de água, ou seja, que aumenta o valor de W_0 , a região de solução micelar líquida tende a diminuir. Experimentos com valores de W_0 superiores a 70 mostram que ocorre a formação de solução micelar líquida até valores de W_0 100 e com uma porcentagem de gelatina de 2,7%. Com quantidades maiores de gelatina, ocorre a formação do organo-gel. Comparando-se as figuras 3.1 e 3.2 pode-se perceber que a concentração de gelatina requerida para a gelificação do sistema líquido é menor (cerca de 4,5%) para n-hexano do que para o ciclo-hexano.

3.1.3 – REGIÃO IV – REGIÃO DE FORMAÇÃO DE GEL

Na região IV ocorre a formação de gel. Nesta região os componentes do organo-gel estão em equilíbrio, formando uma só fase contínua e solidificada. A formação de gel ocorre numa quantidade de gelatina: acima de 5,6% para W_0 acima de 37; em torno de 4,7% para W_0 em torno de 45. Para valores de W_0 acima de 45, a quantidade de gelatina requerida para a formação de gel varia de 4,5% a 3,2%. Deve-se deixar claro que os valores referentes a porcentagem de gelatina são valores aproximados, visto serem estes bastante difíceis de serem determinados.

No diagrama a região sombreada corresponde a formação de gel transparente. Nesta faixa de concentração encontra-se as condições ótimas para a transparência do organo-gel.

Comparando-se os dois diagramas de fase, observa-se que ambos são qualitativamente similares. A principal diferença encontra-se na linha de transição sol-gel.

3.2 – SÍNTESE DE ÉSTERES UTILIZANDO CV LIPASE IMOBILIZADA EM ORGANO-GEL.

Uma série de ésteres foi sintetizada usando um ácido de cadeia linear contendo uma insaturação, o ácido oleico (ácido octadecanóico) e álcoois variando o tamanho da cadeia. A esterificação foi realizada a 25 °C com um tempo de incubação de 10 hs em n-hexano como solvente externo. A CV lipase mostra uma atividade catalítica eficiente na esterificação do ácido oleico com álcoois alifáticos de cadeias pequenas, médias e grandes.

Inicialmente foram feitas reações variando-se o tamanho da cadeia do álcool. Foram realizados experimentos com álcoois contendo 2 a 18 átomos de carbono, sendo a cadeia normal e saturada. Em seguida, utilizou-se álcoois com ramificações próximas e afastadas do centro nucleofílico, contendo uma insaturação ou um núcleo benzênico também próximos ao grupo nucleofílico do álcool. Os dados analíticos e espectrais são mostrados nas Tabelas 3.1 e 3.2.

A análise dos resultados obtidos mostra que com o aumento da cadeia carbônica do álcool, ocorre um aumento gradual no rendimento da reação, chegando a um valor máximo com 1-octanol e 1-decanol. O mesmo efeito foi observado por Okumura e colaboradores [109] na síntese de ésteres derivados do ácido oleico utilizando álcoois alifáticos primários, secundários e terpênicos catalisada por quatro tipos diferentes de lipase em sistema homogêneo com agitação. Rees e Nascimento [101] observaram o mesmo efeito na síntese de ésteres derivados do ácido decanóico. Este aumento no rendimento pode ser atribuído ao aumento da solubilidade do álcool no meio reacional com o aumento da cadeia carbônica, ou seja, ocorre um aumento das interações hidrofóbicas entre o solvente, surfactante (Aerosol-OT) e o álcool. Com o aumento da solubilidade, mais facilmente o substrato se aproxima da interface da microemulsão gelificada onde se encontra o sítio ativo da enzima.

Os dados espectrais, tabela 3.2, mostram claramente a obtenção dos ésteres. Os dados de infravermelho para deformação axial da C=O de ésteres, encontram-se no intervalo de 1720-1735 cm^{-1} e estes são compatíveis com os valores encontrados na literatura [116], onde a deformação axial da C=O de ésteres ocorre na região de 1735-1750 cm^{-1} . Os dados de $^1\text{H-RMN}$ mostram um triplete (2H) na região compreendida de 3.80-4.30 ppm, correspondente aos prótons metilênicos - $\text{CH}_2\text{-O(C=O)R}$. Os prótons metínicos - CH=CH- da insaturação do ácido oleico encontram-se na região de 5.20-5.60 ppm. A região de 0.90-3.20 ppm corresponde aos prótons dos grupos - CH_3 e - $\text{CH}_2\text{-}$, aparecendo como um multiplete. As figuras 3.3 e 3.4 mostram, a título de exemplificação, os espectros de infravermelho e de $^1\text{H-RMN}$ para o oleato de butanoíla.

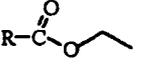
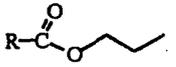
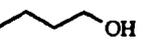
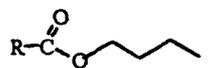
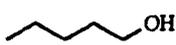
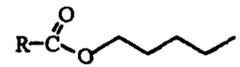
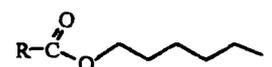
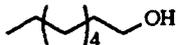
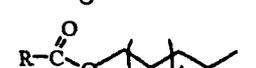
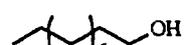
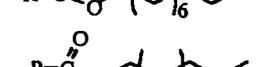
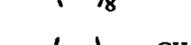
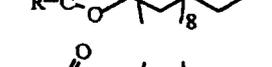
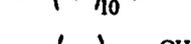
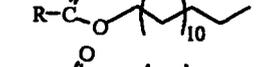
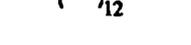
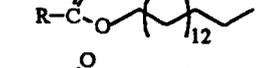
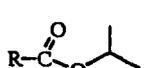
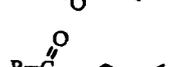
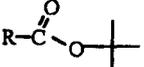
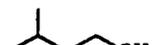
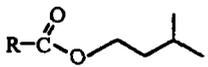
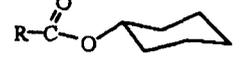
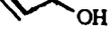
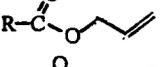
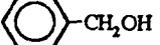
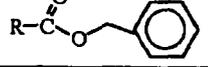
A esterificação do ácido oleico com álcoois possuindo ramificações próximas ao centro nucleofílico do álcool, mostra uma diminuição no rendimento, quanto maior o número de ramificações. Por exemplo, com o álcool terc-butanol, a reação não ocorre. A diminuição no rendimento causada pelas ramificações, pode ser atribuída ao efeito de reconhecimento da enzima, ou seja, estes substratos impedidos estericamente não são alojados efetivamente no centro ativo da enzima para que possa ocorrer a catálise. Outro fator que pode interferir na aproximação, é a interação destas ramificações com a parte apolar do surfactante, impedindo a aproximação do centro nucleofílico do álcool na superfície da microemulsão gelificada onde se localiza o sítio ativo da enzima. Com o afastamento das ramificações, por exemplo para o isobutanol e isopentanol, obtém-se os oleatos de isopropila e isopentila com 47% e 89%, respectivamente, mostrando claramente que o afastamento da ramificação é um fator importante para que o sistema

realize efetivamente a catálise. O mesmo efeito é observado para álcoois cíclicos, por exemplo na esterificação com o ciclo-hexanol o rendimento foi 61%. Rees e Nascimento[101], observaram o mesmo efeito quando a ramificação situava-se próxima ao centro eletrofílico de ácidos. Por exemplo, na esterificação do ácido pentanóico e 2-metil-pentanóico com n-octanol, o rendimento foi de 93% após dois dias de incubação e 10% em sete dias de incubação, respectivamente. Okumura e colaboradores [109] observaram também o mesmo efeito com álcoois secundários e terciários em sistema homogêneo com agitação.

Os dados de infravermelho mostram a banda de deformação axial da C=O de éster em 1735 cm^{-1} . A análise dos espectros de $^1\text{H-RMN}$ para os ésteres mostram para o oleato de isopropila (composto 12) um multiplete na região de 3,80-4,10 ppm para o próton metínico $-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$. Para o oleato de isobutila (composto 13) um duplete na região de 3,60-3,90 ppm referente aos prótons metilênicos $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$. Para o oleato de isopentila (composto 15) um triplete na região na região de 4,00-4,20 ppm referentes aos prótons $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$. Para o oleato de ciclohexila um multiplete na região de 3,90-4,10 ppm referente ao $-\text{O}-\text{ciclohexil}$. Para todos os ésteres, os prótons $-\text{CH}=\text{CH}-$ do ácido aparecem na região de 5,20-5,60 ppm.

A presença de uma insaturação e de um anel benzênico próximo ao centro nucleofílico do álcool também diminuem significativamente o rendimento. Este mesmo efeito foi observado por Okumura e colaboradores [109] para as quatro diferentes lipases, sendo que o rendimento de ésteres oleicos com o álcool benzílico não ultrapassou de 32%. A análise dos espectros de infravermelho e $^1\text{H-RMN}$ mostra para o oleato de alila (composto 17) um duplete na região de 4,40-4,68 ppm referente aos prótons $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$ e para o oleato de benzila (composto 18) um singlete em 5,20 ppm referente aos prótons $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{fenil}$. Os prótons $-\text{CH}=\text{CH}-$ do ácido novamente aparecem na região de 5,40-5,60 ppm. Assim, através da análise dos dados espectrais confirma-se a obtenção dos produtos.

TABELA 3.1 - Síntese de oleatos de alquila catalisada pela CV lipase imobilizada em organo-gel em n.hexano a 25 °C.

Álcool	Éster	Rf ^a	Rend. (%)
		0,59	61
		0,57	64
		0,70	63
		0,69	68
		0,57	72
		0,62	80
		0,70	82
		0,50	68
		0,50	68
		0,58	75
		0,57	74
		0,83	47
		0,74	82
		-----	não reage
		0,82	89
		0,59	61
		0,51	60
		0,51	52

(a) Nas medidas de Rf foi utilizada solução hexano: éter etílico 3:2 (v/v). As reações foram efetuadas com 10 mL de organo-gel de n-hexano seccionado em 30 mL de n-hexano contendo 0,01 mol de cada substrato, apresentando [CV lipase] = 0,25 mg/mL do gel; [AOT] = 0,2 M e $W_0 = 59,72$. As reações foram submetidas a agitação magnética suave, sendo o tempo de reação de 10 hs a 25 °C.

R = $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7-$

TABELA 3.2 – Dados espectrais de ^1H -RMN e Infravermelho dos ésteres derivados do ácido oleico, sintetizados em sistema de organo-gel em n.hexano.

COMPOSTO	PRODUTO	δ_{H} ($-\text{CH}_2-\text{OOCR}$) ^a (ppm)	δ_{H} ($-\text{CH}=\text{CH}-$) ^a (ppm)	($\nu \text{C}=\text{O}$) ^a (cm^{-1})
1	R-O-CH ₂ -CH ₃	4,00-4,40	5,40-5,60	1730
2	R-O-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	4,00-4,30	5,30-5,60	1735
3	R-O-CH ₂ CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	4,00-4,30	5,35-5,60	1735
4	R-O-CH ₂ -(CH ₂) ₃ -CH ₃	4,00-4,30	5,30-5,50	1725
5	R-O-CH ₂ -(CH ₂) ₄ -CH ₃	3,90-4,10	5,20-5,50	1730
6	R-O-CH ₂ -(CH ₂) ₆ -CH ₃	4,00-4,30	5,30-5,50	1730
7	R-O-CH ₂ -(CH ₂) ₈ -CH ₃	3,80-4,10	5,20-5,40	1730
8	R-O-CH ₂ (CH ₂) ₁₀ CH ₃	4,00-4,30	5,30-5,50	1730
9	R-O-CH ₂ -(CH ₂) ₁₂ -CH ₃	4,00-4,30	5,40-5,60	1740
10	R-O-CH ₂ -(CH ₂) ₁₄ -CH ₃	4,00-4,20	5,30-5,50	1720
11	R-O-CH ₂ -(CH ₂) ₁₆ -CH ₃	4,10-4,30	5,40-5,60	1730
12	R-O-CH-(CH ₃) ₂	----	5,20-5,40	1735
13	R-O-CH ₂ -CH-(CH ₃) ₂	3,60-3,90	5,20-5,50	1735
14	R-O-C-(CH ₃) ₃	----	----	----
15	R-O-CH ₂ -CH ₂ -CH-(CH ₃) ₂	4,00-4,20	5,30-5,60	1735
16	R-O-ciclo-hexil	----	5,40-5,60	1730
17	R-O-CH ₂ -CH=CH ₂	4,40-4,68	5,40-5,60	1730
18	R-O-CH ₂ -Ar	5,20	5,40-5,60	1720

(a) Na determinação dos espectros de ^1H -RMN utilizou-se TMS como referência interna e CCl_4 como solvente e os espectros de infravermelho foram feitos em cela de NaCl.

R= $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}-$

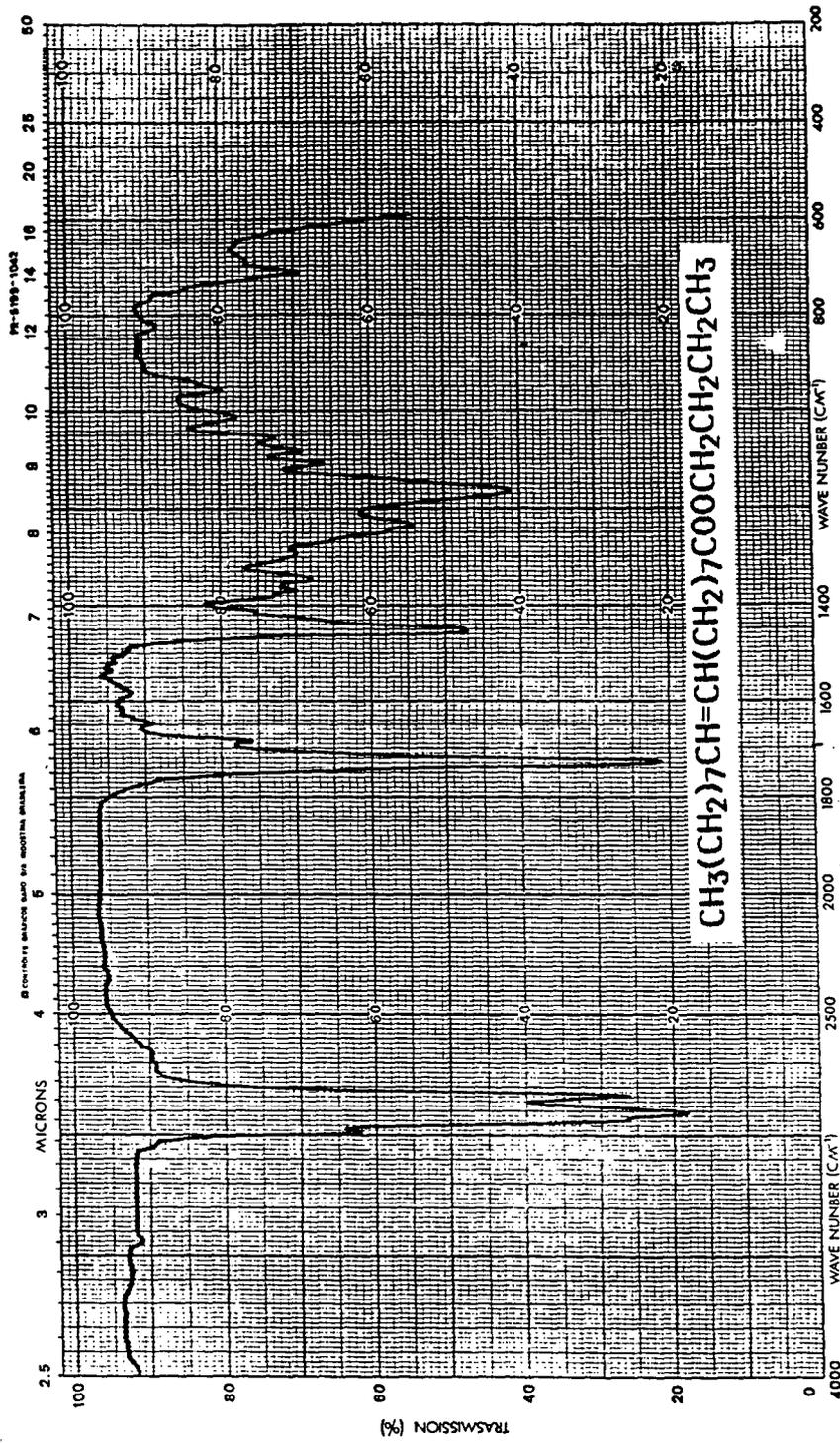


FIGURA 3.3 - Espectro de infravermelho do oleato de butanoíla em filme em
cela de NaCl.

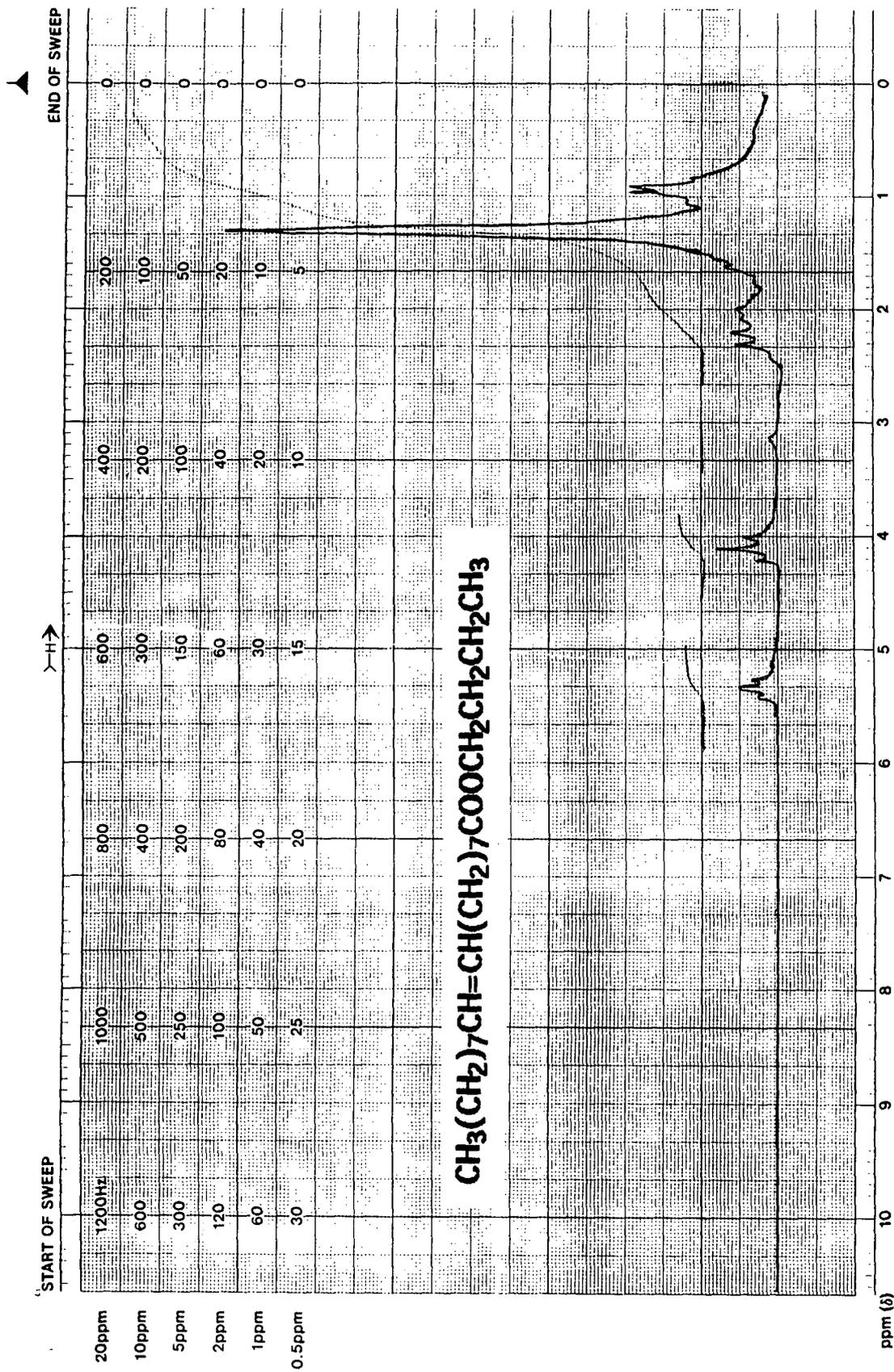


FIGURA 3.4 - Espectro de 1H-RMN 60 MHz do oleato de butanoíla utilizando TMS como referência interna e CCl₄ como solvente.

3.3 – ATIVIDADE DE LIPASES DE DIFERENTES FONTES

Com o intuito de compararmos a atividade de diferentes lipases, cinco lipases de diferentes fontes foram estudadas. Os resultados estão mostrados na tabela 3.3. O experimento foi realizado a 25 °C utilizando os mesmos procedimentos de preparação, purificação e identificação descritos nos itens 2.2.2, 2.2.3 e 2.2.4. Observou-se que a CV lipase foi a que apresentou maior atividade na esterificação do ácido oleico com 1-pentanol, 68%. Não foi observado formação de produto quando a reação foi realizada com a lipase da *Candida cylindracea* ou com a Lipase Pancreática de Porco (PPL) provavelmente devido a baixa atividade de ambas, 1010 unidades mg⁻¹(*) no caso da *Candida cylindracea* e para a PPL 35-70 unidades mg⁻¹. Todas as reações foram efetuadas com 10 mL de gel seccionado em 30 mL de solvente, n-hexano, contendo 0,01 mol de cada substrato com a concentração de enzima no gel de 0,25 mg mL⁻¹. As reações foram realizadas com agitação magnética suave a 25 °C, durante 10 horas.

Tabela 3.3 – Esterificação do ácido oleico com 1-pentanol com lipases de diferentes fontes.

fonte da lipase	tempo de incubação (hs)	rendimento (%)
<i>Chromobacterium viscosum</i>	10	68
<i>Microbial</i>	10	62
<i>Pseudomonas</i>	10	55
<i>Candida Cylindracea</i>	10	não reage
Lipase Pancreática de Porco	10	não reage

(*) Uma unidade hidrolisa 1µeq do ácido graxo a partir do triglicerideo em 1hs a pH=7,7 a 37°C.

A título de comparação Okumura e colaboradores [109] utilizaram quatro tipos de lipase provenientes das seguintes fontes: *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopium* na síntese de ésteres com ácido oleico e 1-pentanol em meio homogênea a 30 °C, por 16hs com agitação. A lipase proveniente da *Rhizopus delemar* foi a que mostrou uma melhor eficiência, formando o produto com 68% de rendimento e com as demais o rendimento foi abaixo de 36%. O resultado obtido em nosso sistema com a lipase *Chromobacterium viscosum* imobilizada em organo-gel é idêntico ao obtido pelos autores com a lipase da *Rhizopus delemar*, mostrando assim que para cada fonte diferente de lipase existe uma atividade específica diferente.

3.4 – REUTILIZAÇÃO DO CATALISADOR

O reutilização de um catalisador é um fator importante quando consideramos a aplicação prática de um determinado método sintético, especialmente se o catalisador é de alto custo. A figura 3.4 mostra a atuação da CV lipase imobilizada em organo-gel em repetidas sínteses do pentanoato de oleila (a reação padrão utilizada foi entre o ácido oleico e o 1-pentanol em n-hexano). O procedimento para o preparo do meio reacional, purificação e identificação foi descrito nos itens 2.2.2, 2.2.3 e 2.2.4. Os resultados obtidos são mostrados na figura 3.5. Através dos dados obtidos, observa-se que o rendimento da reação manteve-se na faixa de 65 a 70%. Assim fica claro que a atividade catalítica da CV lipase, neste sistema, mantém-se num nível muito bom considerando o número de repetições do experimento. A enzima manteve-se ativa depois de 15 conversões com um rendimento em torno de 66%. Não foram observados mudanças na aparência física do gel durante o período de duração do experimento.

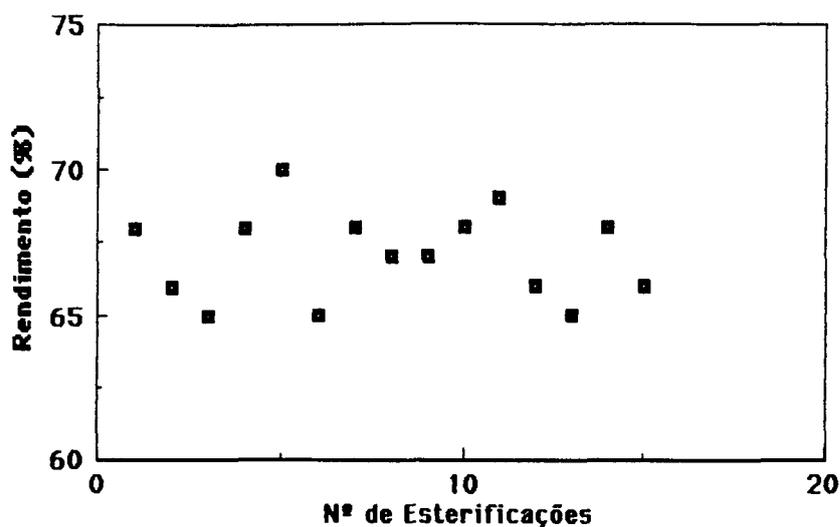


FIGURA 3.5 – Reutilização da CV lipase imobilizada em organo-gel na esterificação do ácido oleico com 1-pentanol.

3.5 – USO DE COLUNA COM FLUXO CONTÍNUO

A fim de testarmos um outro sistema para o uso do gel em síntese, montou-se uma coluna cromatográfica como é mostrado na figura 3.6. Estudou-se a reação entre o ácido oleico e o 1-octanol, pois esta apresentou um dos maiores rendimentos utilizando a CV lipase imobilizada em organo-gel (tabela 3.1). Os substratos e o solvente, n-hexano, foram adicionados na coluna com a ajuda de um funil de separação, e controlou-se o fluxo de entrada e saída. A coluna foi empacotada com 30 mL de gel seccionado com volume de aproximadamente 125 mm^3 , sendo que estes estavam em n-hexano na coluna, a uma temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. As reações foram efetuadas com 0,01 mol de cada substrato, apresentando uma concentração da enzima de $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ no gel. A purificação e identificação dos produtos foi através dos procedimentos citados nos itens 2.2.3 e 2.2.4. Os dados obtidos são mostrados na tabela 3.4.

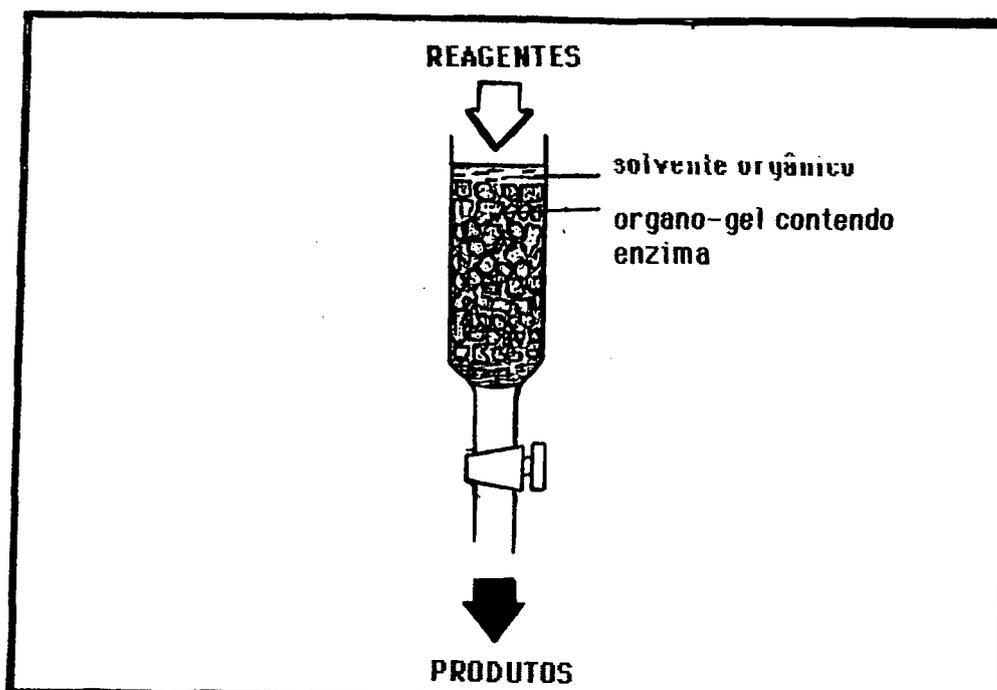


FIGURA 3.6 – Coluna de fluxo contínuo com CV lipase imobilizada em organo-gel, para a esterificação do ácido oleico com 1-octanol.

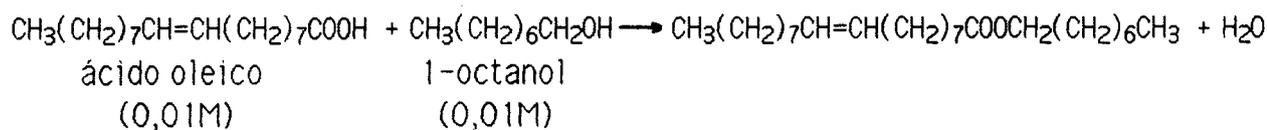


Tabela 3.4 – Reação em coluna de fluxo contínuo para a esterificação do ácido oleico com 1-pentanol.

ÁLCOOL	fluxo (mL min ⁻¹)	tempo de reação (hs)	rendimento (%)
1-octanol	3,75	5:35	42
	1,25	11:00	70

Através da tabela 3.4 pode-se observar claramente que quando o fluxo foi diminuído e, portanto, o tempo da reação aumentado o rendimento da reação aumentou de 28%. Comparando os dois sistemas, com agitação magnética e em coluna com fluxo contínuo, os rendimentos foram muito próximos, sendo 80% com agitação e 70% com coluna, comprovando assim a eficiência do sistema. Uma das vantagens adicionais deste sistema é que o gel necessita de menos lavagens para retirar os substratos remanescentes após o término da reação. A mesma coluna pode ser reutilizada com substratos diferentes [117], mostrando uma possível aplicação industrial do método.

CAPÍTULO 4 - CONCLUSÃO

As principais conclusões obtidas após a realização do trabalho são:

- Através do diagrama de fase do organo-gel, conclui-se que a formação do mesmo, depende grandemente das quantidades de gelatina, de água e de solvente. As quantidades de gelatina e de água variam consideravelmente de um sistema de organo-gel para outro. Esta variação é determinada pelo solvente presente no sistema. Assim, cada solvente interage no sistema de uma forma peculiar dependendo de sua estrutura e propriedades físico-químicas.

- A CV lipase imobilizada em sistema de organo-gel mostrou uma catálise eficiente na esterificação do ácido oleico com álcoois alifáticos de cadeias pequenas, médias e grandes.

- A análise comparativa entre cinco lipases mostrou que a CV lipase apresenta uma melhor eficiência na esterificação do ácido oleico com 1-pentanol neste sistema.

- A atividade da CV lipase em organo-gel mantém-se em um nível muito bom, sendo que a mesma manteve-se ativa depois de 15 conversões, mostrando que a enzima pode ser reutilizada por um longo período.

- A utilização de organo-gel em coluna de fluxo contínuo com enzima imobilizada mostrou ser bastante eficiente. A principal vantagem quando comparada com o sistema em agitação, é que um número menor de lavagem era necessária para retirar todo o produto.

- O gel pode ser armazenado a uma temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a enzima não perde sua atividade, que é confirmada pelos altos rendimentos dos ésteres obtidos.

CAPÍTULO 5 - BIBLIOGRAFIA

- [1] WHITESIDES, G. M., WONG, C. H. Enzymes as catalysts in synthetic organic chemistry. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., v. 24, n.8, p. 617-718, 1985.
- [2] JONES, J. B. Enzymes in organic synthesis. Tetrahedron, vol. 42 ,n. 13, p. 3351-3403, 1986.
- [3] BOLAND, W., FRÖBI, C., LORENZ, M. Estereolytic and lipolytic in organic synthesis. Synthesis, n. 12, 1991.
- [4] SEMENOV, A. N., CEROUSKY, U., TITOV, N. I. et al. Enzymes in preparative organic synthesis: the problem of increasing the yield of product. Collect. Czech. Chem. Commun. v.53, p. 2963-2985, 1988.
- [5] NATARAJAN, K. R. Biocatalysis in organic solvents. J. Chem. Educ. v.68, n. 1, p. 13-16, 1991.
- [6] REESE, E. T., MANDELS, M. Enzyme action on partition chromatographic columns. J. Am. Chem. Soc. v. 80, n. 17, p. 4625-4627, 1958.
- [7] SEMENOV, A. N., KHMELNITSKI, Y. L., BEREZIN, I. V. Water-organic solvent two-phase systems as media for biocatalytic reactions: The potential for shifting chemical equilibria towards higher yield of end products. Biocatalysis, v. 1, p. 3-8, 1987.
- [8] CREMONESI, P., CARREA, G., SPORTOLETTI, G. et al. Enzymatic dehydrogenação the steroids by β -hydroxysteroid dehydrogenase in two-phase system. Arch. Biochem. Biophys. v. 159, p. 7-10, 1973.
- [9] BUCKLAND, B. C., DUNNILL, P., LILLY, M. D. The enzymatic transformation of water-insoluble reactants in nonaqueous solvents. Conversion of cholesterol to cholest-4-ene-3-one by a *Nocardia sp* . Biotech. Bioeng. v. 18, p. 815-826, 1975.

- [10] ANTONINI, E., CARREA, G., CREMONESI, P. Enzyme catalysed reactions in water-organic solvent two-phase systems. Enzyme Microb. Technol. v. 3, p. 291-296, 1981.
- [11] MARTINEK, K., SEMENOV, A. N. Enzymes in organic synthesis: physicochemical means of increasing the yield of end product in biocatalysis. J. Appl. Biochem., v. 3, p. 93-126, 1981.
- [12] CARREA, G. Biocatalysis in water-organic solvent two-phase systems. Trends. Biotechnol., v.2, p. 102-106, 1984.
- [13] MARTINEK, K., SEMENOV, A. N., BEREZIN, I. V. Enzymatic synthesis in biphasic aqueous-organic systems. I. Chemical equilibrium shift. Biochim. Biophys. Acta. v. 658, p. 76-89, 1981.
- [14] MARTINEK, K., SEMENOV, A. N. Enzymatic synthesis in biphasic aqueous-organic systems. II. Shift of ionic equilibria. Biochim. Biophys. Acta. v. 658, p. 90-101, 1981.
- [15] MARTINEK, K., KLIBANOV, A. M., SAMOKHIN, G. P. et al. Preparative enzymic synthesis in biphasic aqueous-organic system. Bioorgan. Khim., v. 3, p. 696-702, 1977.
- [16] KLIBANOV, A. M., SAMOKHIN, G. P., MARTINEK, K. et al. A new approach to preparative enzymatic synthesis. Biotechnol. Bioeng. v.19, p. 1351-1361, 1977.
- [17] BELL, G., BLAIN, J. A., PATTERSON, J. D. E. et al. Ester and glyceride synthesis by *Rhizopus arrizus* mycelia. FEMS Microbiol. Lett., v. 3, p. 223-225, 1978.
- [18] PATTERSON, J. D. E., BLAIN, J. A., SHAW, C. E. L. et al. Synthesis of glycerides and esters by fungal cell-bound enzymes in continuous reactor systems. Biotechnol. Lett., v. 5, p. 211-216, 1979.

- [19] 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. 2587-2692, 1984.
- [20] KLIBANOV, A. M., CAMBOU, B. Enzymatic production of optically active compounds in biphasic aqueous-organic systems. Methods in enzymology, v. 136, p. 117-137, 1987.
- [21] MARLOT, C., LANGRAND, G., TRIANTAPHYLIDES, C., BARATTI, J. Ester synthesis in organic solvent catalyzed by lipases immobilized on hydrophylic supports. Biotechnol. Letters, v. 7, n. 9, p. 647-650, 1985.
- [22] GILLIES, B., YAMAZAKI, H., ARMSTRONG, D. W. Natural flavour esters: production by *Candida cylindracea* lipase adsorbed to silica gel. Biocatalysis in organic media (Proc. Int. Symp. held at Wageningen, Netherlands, 7-10 Dec. 1986). p. 227-232.
- [23] 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). L. 61-69.
- [24] OTERO, C., BALLESTEROS, A., GUISAN, J. M. Immobilization stabilization of lipase from *Candida Rugosa*. Biochem. Biotechnol., v. 19, 1988.
- [25] CARTA, G., GAINER, J. L., BENTON, A. H. Enzymatic synthesis of esters using an immobilized lipase. Biotechnol. Bioeng., v. 37, p. 1004-1009, 1991.
- [26] NICOLOSI, G., PIATTELLI, M., SANFILIPPO, C. Acetylation of phenols in organic solvent catalyzed by a lipase from *Chromobacterium viscosum*. Tetrahedron, v. 48, n. 12, p. 2477-2482, 1992.
- [27] INADA, Y., NISHIMURA, H., TAKAHASHI, K., YOSHIMOTO, T. et al. Ester synthesis catalyzed by polyethylene glycol-modified lipase in benzene. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 122, p. 845-850, 1984.

- [28] KODERA, Y., TAKAHASHI, K., NISHIMURA, H. et al. Ester synthesis from α -substituted carboxylic acid catalyzed by polyethylene glycol-modified lipase from *Candida cylindracea* in benzeno. Biotechnol Lett., v. 12, p. 881-884, 1986.
- [29] NISHIO, T., TAKAHASHI, K., TSUZUKI, T. et al. Ester synthesis in benzeno by polyethylene glycol-modified lipase from *Pseudomonas fragi* 22.39B. J. Biotechnol. v. 8, p. 39-44, 1988.
- [30] INADA, Y., MATSUSHIMA, A., TAKAHASHI, K., SAITO, Y. Polyethylene glycol-(PEG)- Protein conjugates: Application to Biotechnological Processes. J. Bioactive and Compatible Polymers. v. 5, p. 343-361, 1990.
- [31] TAKAHASHI, K., TAMAURA, Y., KODERA, Y. Magnetic lipase active in organic solvents. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 142, n. 2, p. 291-296, 1987.
- [32] SUCKLING, C. J. Immobilized enzymes. Chemical Society Reviews. v. 6, n. 2, p. 215-233, 1977.
- [33] HOLMBERG, K., STARK, M-B. Effect of medium polarity on the reactivity of amino acids in immobilization to silica. Colloids and Surfaces. v. 47, p. 211-217, 1990.
- [34] IWAI, M., OKUMURA, S., TSUJISAKA, Y. Synthesis of terpene alcohol esters by lipase. Agricult. Biolog. Chem. J., v. 44, n. 11, p. 2731-2732, 1980.
- [35] TANAKA, T., ONO, E., ISHIHARA, M. et al. Enzymatic acyl exchange of triglyceride in n.hexane. Agricult. Biolog. Chem. J., v.45, n. 10, p. 2387-2389, 1981.
- [36] ITO, Y., FUJII, H., IMANISHI. Lipase modification by various synthetic polymers for use in chloroform. Biotechnol. Lett., v. 14, n. 12, p. 1149-1152, 1992.

- [37] RABILLER, C. G., KÖNIGSBERGER, K., FABER, K. et al. Enzymatic recognition of diastereomeric esters. Tetrahedron, v. 46, n. 12, p. 4231-4240, 1990.
- [38] KLIBANOV, A. M. Enzymes that work in organic solvent. Chemtech, v. 16, p. 354-359, 1986.
- [39] KLIBANOV, A. M. Enzymatic production of chemicals in organic solvents. Biocatalysis in Organic Media (Proc. Int. Symp. held at Wageningen, Netherlands, 7-10 dec. 1986). p. 115-116.
- [40] CESTI, P., ZAKS, A., KLIBANOV, A., M. Preparative regioselective acylation of glycols by enzymatic transesterification in organic solvents. Appl. Biochem. Biotechnol. n. 11, p. 401-407, 1985.
- [41] THERISOD, M., KLIBANOV, A. M. Facile enzymatic preparation of monoacylated sugars in pyridine. J. Amer. Chem. Soc. n. 108, p. 5638-5640, 1986.
- [42] KIRCHNER, G., SCOLLAR, M. P., KLIBANOV, A. M. Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents. J. Amer. Chem. Soc. n. 107, p. 7072-7076, 1985.
- [43] KAZANDJIAN, R. Z., KLIBANOV, A. M. Regioselective oxidation of phenols catalyzed by polyphenol oxidase in chloroform. J. Amer. Chem. Soc. , n.107, p. 5448-5450, 1985.
- [44] GRUNWALD, J., WIRZ, B., SCOLLAR, M. P., KLIBANOV, A. M. Asymmetric oxido-reductions catalyzed by alcohol dehydrogenase in organic solvents. J. Amer. Chem. Soc. n. 108, p. 6732-6734, 1986.
- [45] DORDICK, J. S., MARLETTA, M. A., KLIBANOV, A. M. Peroxidases depolymerize lignin in organic media but not in water. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, n. 83, p. 6255-6257, 1986.
- [46] GOTOR, V., BRIEVA, R., REBOLLEDO, F. A simple procedure for the preparation of chiral amides. Tetrahedron Lett. v. 29, n. 52, p. 6973-6974, 1988.

- [47] REBOLLEDO, F., BRIEVA, R., GOTOR, V.. Enzymatic synthesis of propargylamides. Tetrahedron Lett. v. 30, n. 39, p. 5345-5346, 1989.
- [48] GOTOR, V., BRIEVA, R., GONZALEZ, C., REBOLLEDO, F.. Enzymatic aminolysis and transamidation reactions. Tetrahedron. v. 47, n. 44, p. 9207-9214, 1991.
- [49] GUTMAN, A. L., SHKOLNIK, E., SHAPIRA, M.. A convenient method for enzymatic benzyl-alkyl transesterification under mild neutral conditions. Tetrahedron. v. 48, n. 40, p. 8775-8786, 1992.
- [50] KITAGUCHI, H., FITZPATRICK, P. A., HUBER, J. E. et al. Enzymatic resolution of racemic amines: crucial role of the solvent. J. Amer. Chem. Soc. n. 111, p. 3094-3095, 1989.
- [51] KLIBANOV, A. M.. Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents. Acc. Chem. Res. n. 23, p. 114-120, 1990.
- [52] ZAMPIERI, G., JÄCKLE, H., LUISI, P. L.. Determination of the structural parameters of reverse micelles after uptake of proteins. J. Phys. Chem. v. 90, p. 1849-1853, 1986.
- [53] FENDLER, J. H. & FENDLER, E. J.. Catalysis in micellar and macromolecular systems. New York, Academic Press., 1975.
- [54] CORDES, E. H.. Reaction kinetic in micelles. New York, plenum Press, 1973.
- [55] MENGER, F. M. & PORTNOV, C. E.. On the chemistry of reactions proceeding inside molecular aggregates. J. Amer. Chem. Soc., v. 89, p. 4698-4703, 1967.
- [56] BUNTON, C. A.. Micellar catalysis and inhibition. Prog. Solid. State Chem. v. 89, p. 4698-4703, 1967.

- [57] ROBINSON, B. H.. Microemulsions - properties and novel chemistry. Chemistry in Britain. v. 4, n. 26, p. 342-348, 1990.
- [58] DANIELSSON, I., LINDMAN, B.. The definition of microemulsion. Colloids and Surfaces. v. 3, p. 391-392, 1981.
- [59] KUNIEDA, H., SHINODA, K.. Solution behavior of aerosol-ot/water/oil system. J. Colloid. Interface Sci. v. 70, n. 3, p. 577-583, 1979.
- [60] LUISI, P. L., GIOMINI, M., PILENI, M. P. et al. Reverse micelles as hosts for proteins and small molecules. Biochem. Biophys. Acta. v. 947, p. 209-246, 1988.
- [61] JAIN, T. K., VARSHNEY, M., MAITRA, A.. Structural studies of Aerosol OT reverse micellar aggregates by FT-IR spectroscopy. J. Phys. Chem. v. 93, p. 7409-7416, 1989.
- [62] MARTIN, C., MAGID, L.. ¹³CNMR investigation of AOT water-in-oil microemulsions. J. Phys. Chem., v. 85, p. 3938-3944, 1981.
- [63] ZULAUF, M., EICKE, H. -F. Inverted micelles and microemulsions in the ternary system H₂O/Aerosol-OT/isooctane as studied by proton correlation spectroscopy. J. Phys. Chem., v. 83, p. 480-486, 1979.
- [64] SJÖBLOM, E., FRIBERG, S.. Light-scattering and electron microscopy determinations of association structures in w/o microemulsions. J. Colloid. Interface Sci., v. 67, p. 16-30, 1978.
- [65] MAITRA, A. N.. Determination of size parameters of water-Aerosol OT-oil reverse micelles from their Nuclear Magnetic Resonance Data. J. Phys. Chem., v. 88, p. 5122-5125, 1984.
- [66] POLITI, M. J., CHAIMOVICH, H.. Water activity in reversed sodium Bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate micelles. J. Phys. Chem., v. 90, p. 282-287, 1986.

- [67] QUIST, P., HALLE, B. Water dynamics and aggregate structure in reversed micelles at sub-zero temperatures. J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1, v. 84, p. 1033-1046, 1988.
- [68] FENDLER, J. H. Membrane mimetic chemistry. New York, Willey Interscience, 1982.
- [69] LUISI, P. L. Enzymes hosted in reversed micelles in hydrocarbon solution. Angew. Chemie, v. 24, n. 6, p. 439-528, 1985.
- [70] MARTINEK, K., LEVASHOV, A. V., KLYACHKO, N. L. et al. Catalysis by water-soluble enzymes in organic solvents. Stabilization of enzymes against denaturation through their inclusion into reversed micelles of surfactants. Dokl. Akad. Nauk. SSSR., v. 236, p. 920-923, 1977.
- [71] MARTINEK, K., KLYACHKO, N. L., KABANOV, A. V. et al. Micellar enzymology: its relation to membranology. Biochem. Biophys. Acta., v. 981, p. 161-172, 1989.
- [72] KLYACHKO, N. L. (1983) PhD Thesis, Moscow State University, Moscow.
- [73] LEVASHOV, A. V., KHMELNITSKY, Y. L., KLYACHKO, N. L. et al. Enzymes entrapped into reversed micelles in organic solvents: sedimentation analysis of the protein- Aerosol OT-H₂O-Octane system. J. Colloid. Interface Sci., v. 88, p. 444-457, 1982.
- [74] SHAPIRO, Y. E., BUDANOV, N. A., LEVASHOV, A. V. ¹³C-NMR of study of entrapping proteins (α -chymotrysin) into reversed micelles of surfactants (Aerosol-OT) in organic solvents (n.octane). Collect. Czech. Chem. Commun., v. 54, 1989.
- [75] RAHAMAN, R. S., HATTON, T. A. Structural characterization of α -chymotrysin containing AOT reversed micelles. J. Phys. Chem., v. 95, p. 1799-1811, 1991.
- [76] RUCKENSTEIN, E., KARPE, P. On the enzymatic superactivity in ionic reverse micelles. J. Colloid. Interface Sci., v. 149, n. 2, p. 408-436, 1990.

- [77] MARTINEK, K., LEVASHOV, A. V., KLYACHKO, N. L. et al. The principles of enzymes stabilization. VI. Catalysis by water-soluble enzymes entrapped into reversed micelles of surfactants in organic solvents. Biochim. Biophys. Acta., v. 657, p. 277-294, 1981.
- [78] FLETCHER, P. D. L., FREEDMAN, R. B., MEAD, J.. Reactivity of α -chymotrypsin in water-in-oil microemulsions. Colloid. Surfaces., v. 10, p. 193-203, 1984.
- [79] BEREZIN, I. V., MARTINEK, K.. Catalysis by enzymes entrapped in reversed micelles of surfactants in organic solvents. Annals. New York Academy of sciences., v. 434, p. 577-579, 1984.
- [80] FLETCHER, P. D. L., ROBINSON, B. H.. Activity of lipase in water-in-oil microemulsions. J. Chem. Soc. Faraday Trans. I., v. 81, p. 2667-2679, 1985.
- [81] SRIVASTAVA, R. C., MADAMWAR, D. B., VYAS, V. V.. Activation of enzymes by reversed micelles. Biotech. Bioeng., v. 29, p. 901-902, 1987.
- [82] FLETCHER, P. D. L., FREEDMAN, R. B., ROBINSON, B. H.. Lipase-catalysed ester synthesis in oil-continuous microemulsions. Biochem. Biophys. Acta., v. 912, p. 278-282, 1987.
- [83] DERKSEN, J. T. P., CUPERUS, F. P.. Lipase-catalysed hydrolysis of Crambe oil in AOT-isoctane reversed micelles. Biotech. Letters., v. 14, n. 10, p. 937-940, 1992.
- [84] HAERING, G., LUISI, P. L.. Hydrocarbon gels from water-in-oil microemulsions. J. Phys. Chem., v. 90, p. 5892-5895, 1986.
- [85] DJABOUROV, M., LEBLOND, J., PAPON, P.. Gelatin of aqueous gelatin solutions. I. Structural investigation. J. Phys. France., v. 49, p. 319-332, 1988.

- [86] QUELLET, C., EICKE, H. -F.. Mutual gelation of gelatin and water-in-oil microemulsions. Chimia, v. 40, p. 233-237, 1987.
- [87] QUELLET, C., EICKE, H. -F.. Some comments on the gelation of gelatin of containing water/oil microemulsions. J. Phys. Chem., v. 91, p. 4211-4212, 1987.
- [88] QUELLET, C., EICKE, H. -F.. Evidence of fractal network formation in gelatin-W/O microemulsions. Europhys. Lett., v. 9, n. 3, p. 293-298, 1989.
- [89] XU, G., QUELLET, C., EICKE, H. -F. Synthesis of covalently cross-linked gelatin gels in percolating water-in-oil microemulsions. Makromol. Chem. Rapid Commun., v. 11, p. 217-222, 1990.
- [90] QUELLET, C., EICKE, H. -F, SAGER, W.. Formation of microemulsion-based gelatin gels. J. Phys. Chem., v. 95, p. 5642-5655, 1991.
- [91] CAPITANI, D., SEGRE, A. L., HAERING, G., LUISI, P. L.. Mobility measurements in microemulsion gels. J. Phys. Chem., v. 92, p. 3500-3504, 1988.
- [92] LESER, M., WEI, G., LÜTHI, P., et al. Applications of enzyme-containing reverse micelles. J. Chim. Phys., v. 84, n. 9, p. 1113-1118, 1987.
- [93] ATKINSON, P. J., GRIMSON, M. J., HEENAN, R. K.. Microemulsion-based gels: A small-angle neutron scattering study. Chem. Phys. Lett., v. 151, n. 6, p. 494-498, 1988.
- [94] HOWE, A. M., KATSIKIDES, A., ROBINSON, B. H.. Structure and dynamics of microemulsion-based gels. Prog. Colloid. Polym. Sci., v. 76, p. 211-215, 1988.
- [95] ATKINSON, P. J., GRIMSON, M. J., HEENAN, R. K.. Structure of microemulsions-based organo-gels. J. Chem. Soc., Chem. Commun., p. 1807-1809, 1989.

- [96] ATKINSON, P. J., CLARK, D. C., HOWE, A. M. Characterization of microemulsions-based organo-gels. Prog. Collid. Polym. Sci., v. 84, p. 129-132, 1991.
- [97] ATKINSON, P. J., ROBINSON, B. H. Structure of microemulsion-based organo-gels. Spec. Publ. -R. Soc. Chem., v. 82, p. 542-545, 1991.
- [98] PETIT, C., ZEMB, Th., PILENI, M. P. Structural study of microemulsion-based gels at the saturation point. Langmuir, v. 7, p. 223-231, 1991.
- [99] PETIT, C., ZEMB, Th., PILENI, M. P. Gelation of reverse micelles. AIP Conf. Proc., v. 226, p. 509-517, 1991.
- [100] REES, G. D., NASCIMENTO, M. G., JENTA, T. R. J., ROBINSON, B. H. Reversed enzymes synthesis in microemulsion-based organo-gels. Biochim. Biophys. Acta, v. 1073, p. 493-501, 1991.
- [101] REES, G. D., JENTA, T. R. J., NASCIMENTO, M. G. et al. The use of water-in-oil microemulsion and gelatin-containing microemulsion-based gels for lipase catalysed ester synthesis in organic solvents. IUPAC- NOST- International Symposium on Enzymes in Organic Synthesis, New Dehli, India, Jan. 1992.
- [102] AGUIAR, L. M. Z. Estudo da atividade enzimática e das propriedades físico-químicas do organo-gel através de reações catalisadas pela CV lipase. Tese (M. Sc.). Curso de Pós-Graduação em Química, UFSC. Florianópolis, 1992.
- [103] CRUEGER, W., CRUEGER, A. Biotechnology: A textbook of industrial microbiology. Cap. 11, 1982.
- [104] BRADY, L., BRZOWSKI, A. M., DEREWENDA, Z. S. A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase. Nature, v. 342, p.767-770, 1990.
- [105] WINKLER, F. K., D'ARCY, A., HUNZIKER, W. Structure of human pancreatic lipase. Nature, v. 343, p. 771-774, 1990

- [106] LAUMEN, K. E. Thesis D-468, 1987.
- [107] KLOOSTERMAN, M., KIERKELS, J. G. T., GUIT, R. P. M. Lipases: Biotransformations, active site models and kinetics. Lipases: structure, mechanism and genetic engineering. Edited by Alberghina, L., Schmid, R. D., Verger, R.. Publisher: VCH, Brannschweig, Germany, 1990.
- [108] BRZozowski, A. M., DEREWENDA, U., DEREWENDA, Z. S. et al. A model for interfacial activation in lipase from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. Nature, v. 351, p. 491-494, 1991.
- [109] OKUMURA, S., IWAI, M., TSUJISAKA, Y.. Synthesis of various kinds of esters by four microbial lipases. Biochim. Biophys. Acta., v. 575, p. 156-165, 1979.
- [110] HEMMERLE, H., GAIS, H. A. -J. Asymmetric hydrolysis and esterification catalyzed by esterases from porcine pancreas in the synthesis of both enantiomers of cyclopentanoid building blocks. Tetrahedron Lett., v. 28, n. 30, p. 3471-3474, 1987.
- [111] MIYAZAWA, T., MIO, M., WATANABE, Y. et al. Lipase-catalyzed transesterifications procedure for the resolution of non-protein amino acids. Biotech. Letters, v. 14, n. 9, p. 789-794, 1992.
- [112] GIL, G., FERRE, E., MEOU, A. et al. Lipase-catalyzed ester formation in organic solvents. Partial resolution of primary allenic alcohols. Tetrahedron Letters, v. 28, n. 15, p. 1647-1648, 1987.
- [113] HÖNIG, H., WASSERTHAL, P. S., WEBER, H. Simultaneous separation of enantiomers of diastereomers by lipase. Tetrahedron Letters, v. 31, n. 21, p. 3011-3012, 1990.
- [114] ERGAN, F., TRANI, M. Effect of lipase specificity on triglyceride synthesis. Biotech. Letters, v. 13, n. 1, p. 19-24, 1991.

- [115] MAKITA, A., NIHIRA, T., YAMADA, Y.. Lipase catalyzed of macrocyclic lactones in organic solvents. Tetrahedron Letters, v. 28, n. 7, p. 805-808, 1987.
- [116] SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C., MORRIL, T. C.. Identificação espectroscópica de compostos orgânicos. 3 ed. Rio de Janeiro, 1987.
- [117] NASCIMENTO, M. G.. Resultados não publicados.